



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

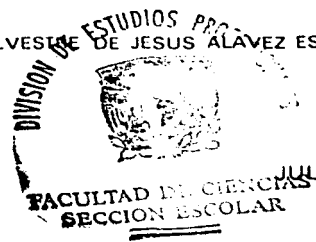
"PAPEL DE LOS RECEPTORES DE NMDA EN LA MUERTE PROGRAMADA EN CEREBELO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
SUGELA SUSANA BLANCAS ZUGARAZO

DIRECTOR DE TESIS: DR SILVESTRE DE JESUS ALAVEZ ESPIDIO



MEXICO, D. F.



JULIO 2002.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Papel de los receptores de NMDA en la muerte programada en cerebelo de rata durante el desarrollo postnatal."

realizado por Sugela Susana Blancas Zugarazo

con número de cuenta 9429078-3 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Silvestre Alavez Espidio

Propietario

Dr. Julio Morán Andrade

Propietario

Dra. Lourdes Massieu Trigo

Suplente

M. en C. Alette Ortega Gómez

Suplente

Biol. Andrea Caballero Benítez

[Handwritten signatures: Silvestre Alavez Espidio, Lourdes Massieu Trigo, Alette Ortega Gómez, Andrea Caballero Benítez]

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

[Handwritten signature]
Dra. Patricia Ramos Morales

A mi familia por su cariño y confianza. Especialmente a mi madre por su gran apoyo y comprensión a mis actividades académicas y por infundir en mi la necesidad de superarme siempre.

A Silvestre por iniciar mi formación en la ciencia, por su apoyo, su tiempo, su confianza y principalmente por brindarme su amistad.

A Julio por aceptarme como parte de su grupo de trabajo y por apoyar mi formación académica.

A Toño, Alette, Andy, Lupita, Miriam, Ari y Armando, por ser los mejores compañeros y ser buenos amigos.

A Minerva, Rosario y Noemí por ser las mejores amigas que puedo tener.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	1
1.2	DESARROLLO DEL CEREBELO	1
1.3	MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EL DESARROLLO DEL SNC	7
1.3a	Papel de los neurotransmisores clásicos en la muerte apoptótica	8
1.3b	Apoptosis	9
II.	ANTECEDENTES	13
III.	HIPÓTESIS	17
IV.	OBJETIVOS	17
V.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	18
5.1	TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES	18
5.2	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA CORTEZA CEREBELAR	18
5.3	DETECCIÓN <i>in situ</i> DE CARACTERÍSTICAS APOPTÓTICAS EN EL CEREBELO	19
5.4	PARTICIPACIÓN DE CASPASAS EN LA MUERTE APOPTÓTICA EN EL CEREBELO	19
5.3a	Cuantificación de la actividad de caspasas	20
5.3b	Análisis de réplicas tipo Western	20
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1	EFFECTO DEL MK-801 EN LA MORFOLOGÍA DE LA CORTEZA CEREBELAR	23
6.2	EFFECTO DEL MK-801 EN LA MUERTE APOPTÓTICA DENTRO DE LA CORTEZA CEREBELAR DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL	23

6.3	EFFECTO DEL MK-801 EN LA ACTIVIDAD DE CASPASAS DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL CEREBELO DE RATA	35
VII.	CONCLUSIONES	46
VIII.	APÉNDICE	47
IX.	REFERENCIAS	49

I. INTRODUCCIÓN

1.1 DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las células neuronales y gliales derivan de una hoja de células ectodérmicas localizada a lo largo de la línea media dorsal del embrión en estado de gástrula. Cuando la hoja comienza a adquirir propiedades neuronales se forma la placa neural (un epitelio columnar), que al plegarse da lugar al surco neural. Posteriormente, las crestas neuronales crecen hasta fusionarse para formar el tubo neural. La región caudal del tubo neural da origen al cordón espinal, y la región rostral al cerebro (Jessell y Sanes, 2000). Durante el desarrollo del tubo neural se comienzan a formar las vesículas cerebrales a lo largo del eje anteroposterior.

El sistema nervioso central (SNC) maduro se comienza a formar a partir de regiones discretas del epitelio neural que se expanden por crecimiento diferencial. La proliferación celular en la parte rostral del tubo neural forma inicialmente tres vesículas cerebrales: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo; que dan origen a las vesículas cerebrales secundarias y finalmente a las estructuras cerebrales maduras (Tabla 1).

1.2 DESARROLLO DEL CEREBELO

Las neuronas cerebelares se distribuyen en regiones discretas, cada una de las cuales recibe proyecciones de varias porciones del cerebro y cordón espinal, y a su vez proyectan a diferentes sistemas motores. Las neuronas en la corteza del cerebelo adulto presentan un arreglo que estratifica la corteza en capas, la más externa es la molecular (CM), por debajo está la monocapa de células de Purkinje (CP) seguida por la capa de neuronas granulares de cerebelo (NGC) y finalmente se encuentra la materia blanca

Vesículas cerebrales primarias	Vesículas cerebrales secundarias	Estructuras cerebrales
Prosencéfalo	Telencéfalo	Corteza cerebral, núcleos basales, formación hipocámpal, bulbo olfatorio y amígdala
	Diencéfalo	Tálamo, hipotálamo, subtálamo, epitálamo, retina y nervio óptico
Mesencéfalo	Mesencéfalo	Cerebro medio
Rombencéfalo	Metencéfalo	Puente y cerebelo
	Mielencéfalo	Médula

Tabla 1. Vesículas cerebrales durante la embriogénesis del SNC y estructuras que originan

(Fig. 1). Las NGC son el tipo celular más abundante del SNC, se estima que aproximadamente el 80 % de todas las neuronas de humano son NGC (Lange, 1975; Herrup y Kuemerle, 1997).

El cerebelo se origina a lo largo del techo del cuarto ventrículo (Millen et al, 1999). Específicamente deriva de las áreas adyacentes a la placa alar (somatosensorial) del tubo neural que reside en el metencéfalo (Fig. 2). Todas las células en el cerebelo emergen de una región de matriz germinal, pero las diversas poblaciones neuronales no emergen de una sola zona germinal. La matriz germinal inicialmente consiste en una zona ventricular neuroepitelial típica y una región germinal más caudal, también conocida como el labio rómbico (Goldowitz y Hamre, 1998).

El labio rómbico es un epitelio germinativo especializado que nunca constituye un compartimento definido y que se origina relativamente tarde durante el desarrollo a partir de la interfase entre el tubo neural y el cuarto ventrículo. Los derivados del labio rómbico

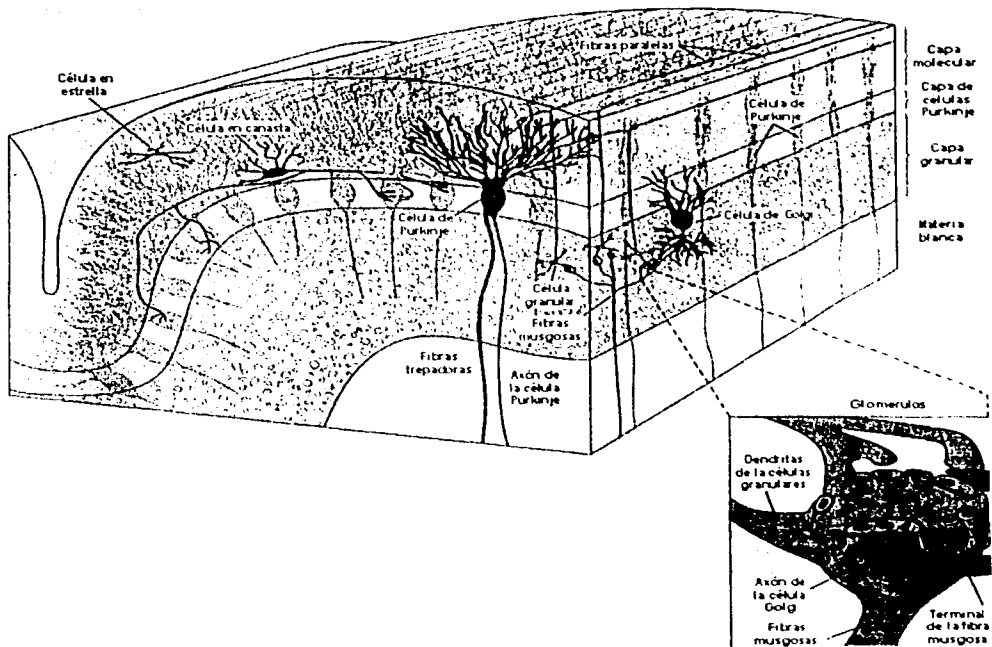


Figura 1. Arreglo citoarquitectónico de la corteza cerebelar. La figura muestra la distribución espacial de las tres capas que forman la corteza cerebelar, la ubicación de los cinco tipos neuronales que forman estas capas y las interacciones entre estos tipos celulares (Modificado de Ghez y Thach, 2000).

se caracterizan por la navegación circunferencial independiente de glia, del tubo neural dorsal al ventral. El labio rómbico cerebelar emerge a través de interacciones precisas entre patrones de procesos anteroposteriores y dorsoventrales y se origina de una región axial; su mantenimiento y expansión está regulada por señales provenientes de la zona ubicada entre el cerebro medio y el cerebro posterior. El labio rómbico cerebelar y del cerebro posterior forma un epitelio continuo proliferativo. Sus derivados están directamente relacionados al sistema cerebelar y precerebelar; en particular origina a las NGC en el dominio anterior del labio rómbico (Harkmark, 1954; Sidman y Rakic, 1973; Hatten y Heintz, 1995; Millen et al, 1999; Wingate, 2001).

Las primeras neuronas que derivan de la zona ventricular son las neuronas nucleares (Goldowitz y Hamre, 1998; Schilling, 2000). Después de éstas, se generan las células de Purkinje a partir del neuroepitelio que recubre el cuarto ventrículo (Fig. 2), donde después de la fase activa de proliferación inician un proceso de migración radial para formar una estructura planar en la corteza cerebelar (Schilling, 2000).

La formación de una matriz germinal secundaria del labio rómbico correspondiente a la capa granular externa (CGE), ocurre cuando las células nucleares y de Purkinje dejaron de dividirse (Goldowitz y Hamre, 1998). En roedores, después del nacimiento, el labio rómbico superior da origen a precursores de células granulares (Fig. 2), estos precursores son los únicos que migran sobre la superficie del cerebelo antes de llegar a la etapa final de mitosis y se acumulan formando la CGE. Una vez formada, una segunda ola de divisiones dentro de la CGE produce NGC post-mitóticas las cuales migran radialmente dentro de la corteza cerebelar para dar lugar a la capa granular interna (CGI) (Hatten y Heintz, 1995; Wingate, 2001) (Fig. 3). Las NGC son los únicos descendientes de la CGE (Hallonet y Le Douarin, 1993; Napieralski y Eisenman, 1993; Otero et al, 1993; Zhang y Goldman, 1996a y 1996b). Mientras los neuroblastos de células granulares

migran a través de la CM y de la capa de CP en desarrollo (Fig. 3), se generan las células en estrella y en canasta a partir del neuroepitelio del cuarto ventrículo que colonizan la CM (Zhang y Goldman, 1996a y 1996b; Goldowitz y Hamre, 1998). Los precursores de neuronas granulares migrando exhiben una morfología unipolar donde sólo un proceso guía la migración (Wingate y Hatten, 1999; Wingate, 2001).

Las células de Golgi provienen de la zona ventricular disminuida por la migración de las células de la CGE de la superficie cerebelar en una posición subapical (Goldowitz y Hamre, 1998). Precursores de interneuronas inhibitorias de la corteza cerebelar se originan del neuroepitelio del cuarto ventrículo y migran hacia fuera a su posición final en la corteza cerebelar. Estas células continúan proliferando durante su tránsito a través de la masa cerebelar profunda y la materia blanca (Schilling, 2000).

En rata, muy pocas NGC se forman durante los primeros cinco días postnatales (DPN) pero a partir del 8 y hasta el 15 DPN se registra un marcado incremento en la proliferación de estas neuronas en la CGE (Altman, 1972). La migración de NGC postmitóticas inmaduras de la CGE a la capa CGI a través de la CM comienza entre los 2-3 DPN y termina en la tercera semana (Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988). Algunas de las NGC que han arribado a la CGI reciben cerca del 5 DPN los primeros contactos sinápticos excitadores de las fibras musgosas provenientes del tallo cerebral y cordón espinal. Sin embargo, se ha descrito que la mayoría de estos contactos sinápticos comienzan a ser funcionales entre los 10-12 DPN (Arsenio-Nuñez y Sotelo, 1985; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988), cuando la mayoría de las NGC han alcanzado la CGI.

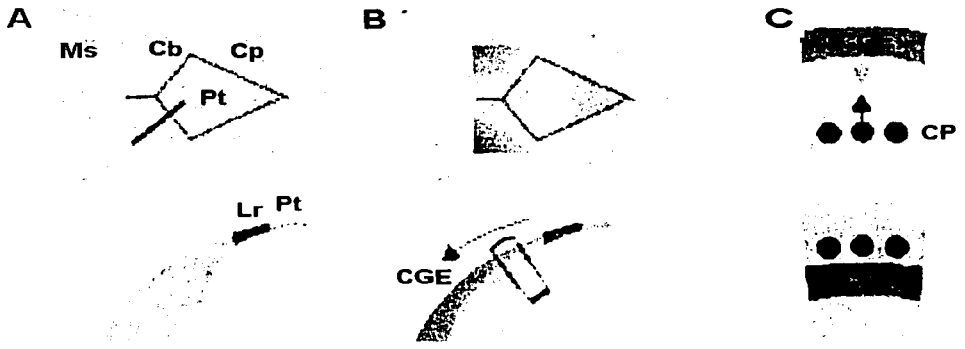


Figura 2. Formación de la estructura precerebelar. El labio rómbico (Lr) se genera en el punto de contacto entre el tubo neural y la placa en expansión del techo (Pt) del cuarto ventrículo. (A) Representación esquemática del tubo neural (panel superior), que muestra la posición del Lr con relación al mesencéfalo (Ms), cerebelo (Cb) y cerebro posterior (Cp) durante el desarrollo. El panel inferior muestra una visión transversal de un corte imaginario del esquema superior, señalado por la línea más oscura. (B) Poco después que el Lr se induce, las neuronas granulares migran de la Pt y se acumulan para formar la capa granular externa (CGE). Panel superior: esquema de la vista dorsal, panel inferior: visión transversal. La flecha del panel inferior muestra la dirección en que migran las neuronas granulares para formar la CGE. (C) Finalmente, sólo después de que los precursores de neuronas granulares se dividen de nuevo en la CGE, las células granulares postmitóticas migran radialmente a través del cerebelo (panel superior), pasando la capa de células Purkinje (CP) para formar la capa granular interna (CGI) (panel inferior). Los precursores de células Purkinje se originan en la zona ventricular y migran a través de la pared del precerebelo en desarrollo (Modificado de Wingate, 2001).

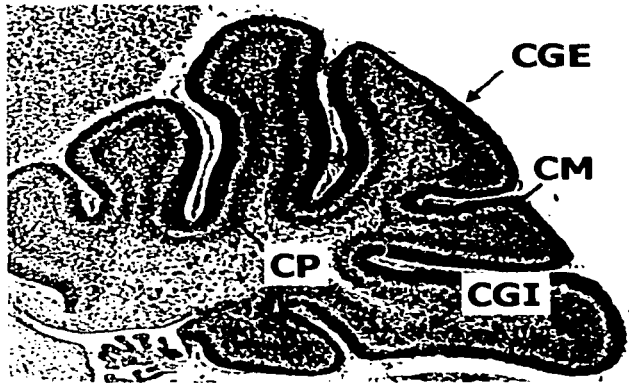


Figura 3. Cerebelo en desarrollo. Corte sagital de un cerebelo de ratón de 7 días postnatales. Los asteriscos denotan la fisura primaria; CP, capa de células de Purkinje; CGI, capa granular interna; CM, capa molecular; CGE, capa granular externa (Modificada de Goldowitz y Hamre, 1998).

1.3 MUERTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE EL DESARROLLO DEL SNC

Durante el desarrollo se ha observado que ocurre un proceso de muerte masiva en ciertas poblaciones del sistema nervioso (SN) (Oppenheim, 1991). Por ejemplo, se estima que hay una degeneración de entre el 50-60 % de motoneuronas durante el desarrollo de la médula espinal (Lance-Jones, 1982; Oppenheim, 1991). Recientemente, se ha determinado que la muerte que ocurre bajo estas condiciones es de naturaleza apoptótica y que debe estar finamente regulada en tiempo y espacio ya que juega un papel crítico en la morfogénesis y sinaptogénesis del SN (Kuida et al, 1996). Las neuronas requieren de la presencia de factores tróficos para sobrevivir y para otros eventos asociados al desarrollo como la diferenciación (Balázs et al, 1988; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988), migración (Komuro y Rakic, 1993) y sinaptogénesis (Bloch y Pumplín, 1988). Las aferencias en general y diversos factores derivados de las células gliales han mostrado ser importantes en la regulación y sobrevivencia de las neuronas en desarrollo (Oppenheim, 1991). La muerte celular se presenta en las células precursoras neuronales y neuroblastos jóvenes en etapas tempranas del desarrollo.

La dependencia de factores tróficos tanto de los diferentes tipos neuronales como de las células gliales es importante en diferentes etapas del desarrollo. Las señales tróficas provienen no sólo de los factores neurotróficos clásicos, sino también de otros factores de crecimiento de diversas familias de proteínas e incluso de la liberación de neurotransmisores por las terminales aferentes y de la actividad eléctrica de las células vecinas (de la Rosa y de Pablo, 2000).

1.3a Papel de los neurotransmisores clásicos en la muerte apoptótica

Existen numerosas evidencias que sugieren que los neurotransmisores juegan un papel crítico durante el desarrollo del SN (Mattson, 1988; Mattson y Hauser, 1991; Meier et al, 1991; Schwartz, 1992). A estas moléculas se les ha involucrado en la modulación y regulación de algunos eventos morfogénéticos durante el desarrollo temprano de varios tipos de circuitos neuronales (Kwong et al, 2000). Se ha sugerido que en esta etapa los neurotransmisores son importantes en la movilidad celular, crecimiento de neuritas, sinaptogénesis y la regulación de la expresión fenotípica por influencia trófica de neuronas (Johnston y Coyle, 1981; Lauder et al, 1986; Emerit et al, 1992; Lauder, 1993, Shuey et al, 1993; Kwong et al, 2000). Algunos de los neurotransmisores que parecen ejercer algunas de estas influencias sobre las neuronas son la acetilcolina, catecolaminas, ácido γ -aminobutírico (GABA) y glutamato, entre otros.

Se ha sugerido que el principal neurotransmisor inhibitor y el principal neurotransmisor excitador, GABA y glutamato, respectivamente, juegan un papel importante en la maduración del SN, regulando la sobrevivencia neuronal. Se ha detectado una notable respuesta apoptótica en cerebros de ratas durante el desarrollo postnatal a agentes que actúan como agonistas o moduladores positivos de los receptores GABA_A, de manera dependiente de la dosis (Ikonomidou et al, 2001).

El glutamato en particular, parece actuar como una señal que modula diferentes procesos durante el desarrollo (Morán et al, 1999). Experimentos *in vivo* han demostrado que al inhibir la neurotransmisión glutamatérgica producida por los receptores ionotrópicos a glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) durante el desarrollo, se genera una amplia neurodegeneración con características apoptóticas en el cerebro de ratas (Ikonomidou et al, 1999).

1.3b Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se caracteriza por una serie de alteraciones morfológicas y bioquímicas. Esta muerte ocurre en dos fases: primero una fase en la que la célula se compromete a morir, seguida por una fase ejecutora caracterizada por notables cambios morfológicos en la estructura celular. La apoptosis a diferencia de la necrosis, se caracteriza por ser una muerte activa en la que se observa la participación de una compleja maquinaria que da lugar a las características morfológicas y bioquímicas que definen este tipo de muerte.

La apoptosis fue descrita originalmente en función a cambios morfológicos particularmente distintos a los observados bajo condiciones de muerte necrótica (Fig. 4). Estos cambios morfológicos incluyen: condensación y fragmentación nuclear, compactación de organelos citoplasmáticos, decremento en el volumen celular, alteraciones en la membrana plasmática y finalmente la formación de fragmentos celulares (llamados cuerpos apoptóticos) con material citoplasmático y nuclear, que son fagocitados por células vecinas (Gorman et al, 1995; Thornberry y Lazebnik, 1998). La detección de estas características morfológicas se ha utilizado tradicionalmente como marcador de células en estado apoptótico.

Bioquímicamente, la apoptosis se caracteriza por una serie de eventos de desensamblaje de estructuras subcelulares, ejecutada por una maquinaria celular compleja y especializada, conducidos principalmente por una familia de proteasas llamadas caspasas (Gorman et al, 1995; Thornberry y Lazebnik, 1998). El nombre hace referencia a la habilidad o capacidad de estas proteasas de cisteína de romper proteínas en un residuo de ácido aspártico (Cohen, 1997). Algunas de las características bioquímicas de la apoptosis son la fragmentación internucleosomal del ADN, la externalización de fosfatidil serina, y la activación de familias de proteínas encargadas de

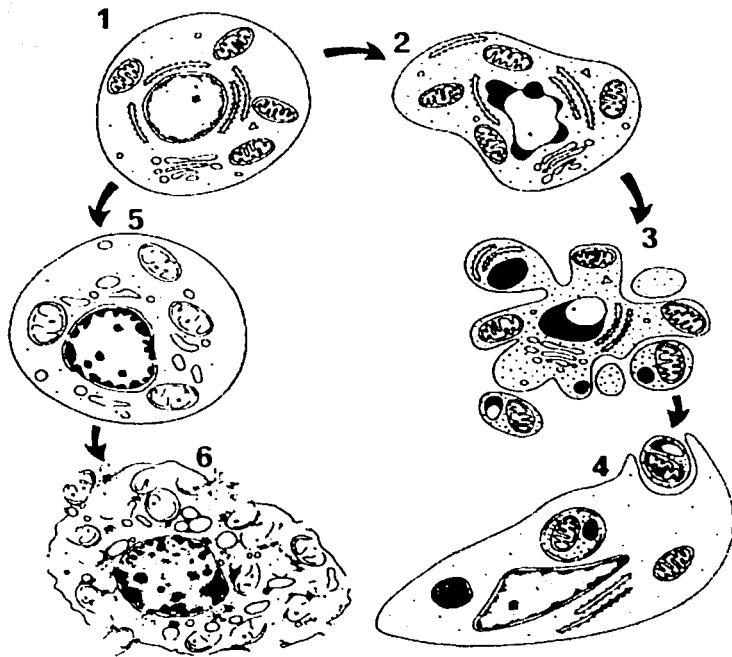


Figura 4. Cambios morfológicos asociados a muerte apoptótica y necrótica. A diferencia de la necrosis (5-6), en la apoptosis (2-4) se mantiene la integridad de la membrana citoplasmática y no se observa hinchamiento de las estructuras subcelulares (2-4). Pero se producen claras alteraciones que a la postre forman cuerpos apoptóticos (3) que son finalmente fagocitados (4) (Tomada de Kerr y Harmon, 1991).

conducir el proceso apoptótico (por ejemplo, la familia de las caspasas y la familia de Bcl-2).

Todas las caspasas se expresan como proenzimas (Fig. 5 A) no activas de 30-50 KDa que contienen un pro-dominio, una subunidad grande (~20 KDa) y una subunidad pequeña (~10 KDa) (Thornberry y Lazebnik, 1998). La activación de estas enzimas involucra un procesamiento proteolítico en los sitios de fragmentación específicos a aspartato entre los 3 diferentes dominios (Fig. 5 B), seguido por una reasociación de las subunidades grande y pequeña para formar un heterodímero activo (Thornberry y Lazebnik, 1998; Budihardjo et al, 1999) que consta de 2 subunidades grandes y 2 subunidades pequeñas (Fig. 5 B). Todas las caspasas contienen como sitio activo un pentapéptido de estructura general QACXG, donde X es R, Q o G (Cohen, 1997). Se ha propuesto que durante un evento apoptótico, las caspasas actúan de manera secuencial, en una cascada de eventos de degradación de estructuras subcelulares (Fig. 6). Las caspasas iniciadoras como la caspasa-8, 9, y 10 activan a otros miembros de la familia conocidos como caspasas efectoras. Las caspasas efectoras, caspasas-3, 6 y 7, son las que actúan directamente sobre sustratos subcelulares específicos para cada caspasa. Entre los sustratos de estas caspasas se encuentran proteínas como la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), láminas de la envoltura nuclear y U1-70 KDa (ribonucleoproteína nuclear pequeña), entre otros (Fig. 6).

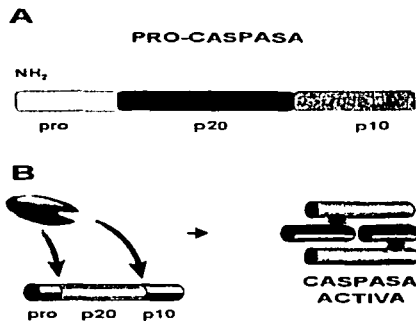


Figura 5. Mecanismo de activación de caspasas. A) Esquema de una pro-caspasa inactiva; se muestra el prodominio (pro) en el extremo amino-terminal, la subunidad grande ~ 20 KDa (p20) y la subunidad pequeña ~ 10 KDa (p10). B) Para de la activación de las caspasas la pro-enzima es fragmentada y las subunidades p20 y p10 se reasocian para formar la enzima activa (Modificado de Hengartner, 2000).

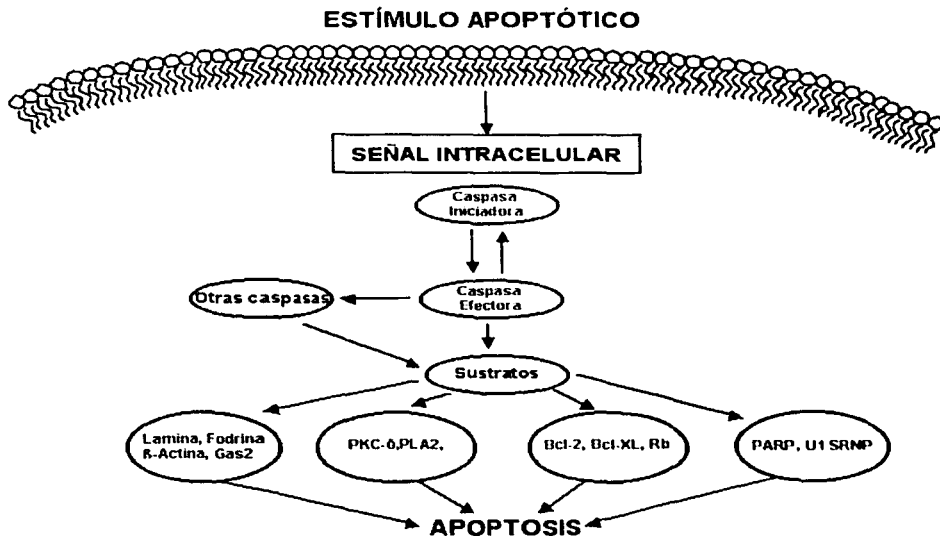


Figura 6. La activación secuencial de caspasas como componente central del proceso apoptótico. Un estímulo apoptótico inicia un proceso que activa un grupo de caspasas (iniciadoras) que a su vez pueden activar a las caspasas efectoras. Las caspasas efectoras pueden actuar sobre diversos sustratos subcelulares (Tomada de Alavez, 2001).

II. ANTECEDENTES

Estudios *in vitro* han demostrado que la despolarización crónica con KCl (25 mM) o la estimulación con NMDA (150 μ M), un agonista de un subtipo de receptores a glutamato, promueven la sobrevivencia y la diferenciación de NGC en cultivo (Gallo et al, 1987; Balázs et al, 1988; Morán y Patel, 1989; Alavez et al, 1996; Morán et al, 1996; Balázs et al, 1998; Morán et al, 1999) (Fig. 7). Así, el glutamato puede ejercer un efecto trófico sobre las NGC que parece estar modulado por los receptores tipo NMDA (Gallo et al, 1987; Balázs et al, 1988; Balázs et al, 1992; Burgoyne et al, 1993; Morán et al, 1999). Recientemente, se ha demostrado que el tipo de muerte que se observa en NGC en cultivo es de naturaleza apoptótica y que las condiciones despolarizantes producidas por el KCl (25 mM) y la estimulación de los receptores tipo NMDA pueden retardar de manera sensible este proceso (D'Mello et al, 1993). Sin embargo, este efecto requiere que las células sean estimuladas al menos durante 5-7 días *in vitro* (DIV) a partir del 2 DIV (Morán et al, 1996) (Fig. 7). Se ha sugerido que la diferenciación y sobrevivencia promovidas por el NMDA en NGC en cultivo, mimetiza el efecto de la activación de los receptores a glutamato de estas células a través de las fibras musgosas provenientes de los núcleos pontinos (Fig. 8) en periodos específicos del desarrollo cerebelar (Balázs et al, 1988; Morán et al, 1996). Los estudios realizados *in vitro* con NGC inmaduras sugieren que el arribo de la porción glutamatérgica de las fibras musgosas a la corteza cerebelar juega un papel importante en la sobrevivencia y/o muerte de las NGC, contribuyendo a la formación adecuada a nivel funcional y estructural del cerebelo.

Por otra parte, durante el desarrollo postnatal de la rata ocurre muerte celular de naturaleza apoptótica de NGC (Koppel et al 1983; Smeyne y Goldowitz, 1989; Ashwell, 1990). Con el uso de técnicas como el ISNEL (por sus siglas en inglés "*in situ* nick end

labeling") se han identificado NGC que presentan fragmentación de ADN, principalmente en la CGE, durante el desarrollo postnatal. Esta fragmentación alcanza un máximo a los 9 DPN (Tanaka y Marunouchi, 1998). En cultivos organotípicos de cerebelo de ratas de 9 DPN, se detectó la presencia *in situ* de las formas activas de caspasa 3 en NGC de la CGE. La distribución de la forma activa de la caspasa 3, es muy similar a la observada al detectar ADN fragmentado en el cerebelo postnatal de rata *in vivo* (Tanaka et al, 2000).

Recientemente se ha demostrado la participación de algunos de los miembros de la familia de las caspasas en los procesos de muerte neuronal que se observan durante el desarrollo del SN. En ratones deficientes de caspasa 3 se observó un incremento en la cantidad de neuronas y serios problemas de desorganización en las estructuras neuronales (Kuida et al, 1996). Por su parte, ratones deficientes de caspasa 9 mueren perinatalmente con malformaciones cerebrales causadas por una reducción de apoptosis durante el desarrollo temprano del cerebro (Kuida, 2000). Por lo anterior, se considera que caspasa-3 y 9 son relevantes en los procesos de muerte durante el desarrollo del SN, y posiblemente haya participación de otros miembros de la familia de las caspasas.

En este trabajo se explora el papel de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA en la sobrevivencia de las NGC y la activación de algunos miembros de la familia de las caspasas durante el desarrollo postnatal del cerebelo de rata.

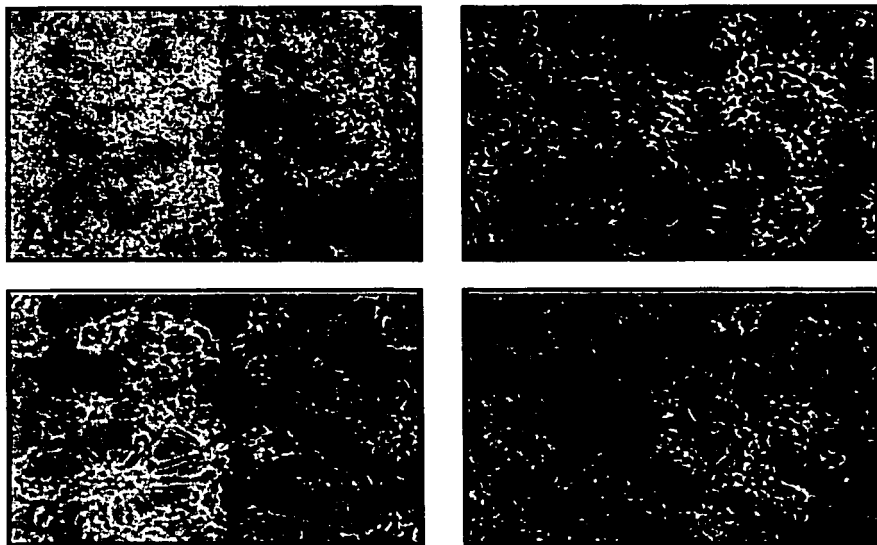


Figura 7. Efecto de la dopolarización en la sobrevivencia de NGC. NGC inmaduras, obtenidas de ratas de 8 días postnatales (DPN) cultivadas 6-8 días *in vitro* (DIV) en un medio con 5 mM KCl degeneran y mueren (A). La estimulación con NMDA 150 mM (B) o con KCl 25 mM (C) es capaz de inducir la sobrevivencia en estas células. Sin embargo, la estimulación de los receptores NMDA en NGC "maduradas" con KCl 25 mM promueve una clara degeneración del cultivo (D).

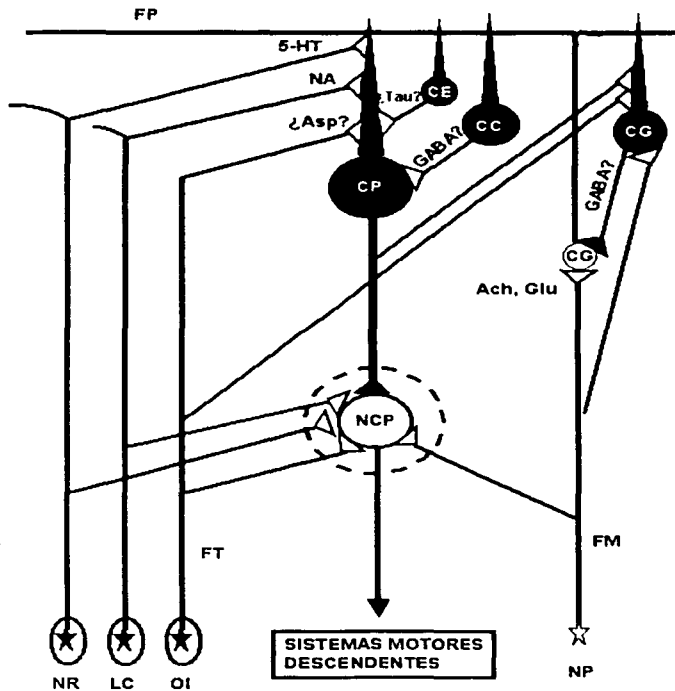


Figura 8. Circuitería del cerebelo. Se observan las tres principales fibras cerebelares: fibras paralelas (FP), fibras trepadoras (FT) y fibras musgosas (FM). Estas últimas llegan de los núcleos pontinos a las células granulares (CG). CP, células Purkinje; CG, células de Golgi; CE, células estrelladas; CC, células de canasta; NCP, núcleos cerebelares profundos; NP, núcleos pontinos; OI, oliva inferior; LC, locus coeruleus; NR, núcleos de raphe. En negro se representan tanto células como contactos de naturaleza inhibitora y en blanco neuronas y contactos excitadores (Modificado de Ito, 1984).

III. HIPÓTESIS

Si las aferencias glutamatérgicas de las fibras musgosas son relevantes para la sobrevivencia de las NGC, al bloquear los receptores a glutamato tipo NMDA con MK-801 en etapas críticas del desarrollo postnatal, se interferirá con el soporte trófico aportado por estas fibras y se producirá un incremento en la muerte apoptótica de NGC.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inhibición de los receptores a glutamato tipo NMDA con MK-801 en el proceso de muerte de las NGC durante el desarrollo postnatal de la rata.

Objetivos particulares

- ◆ Determinar si la inhibición del receptor a glutamato tipo NMDA produce alteraciones morfológicas apreciables en la corteza cerebelar en desarrollo.
- ◆ Determinar mediante histofluorescencia el efecto del MK-801 en la muerte apoptótica de NGC durante el desarrollo postnatal de la rata.
- ◆ Examinar las diferentes capas de la corteza cerebelar para determinar si el proceso de muerte es un evento generalizado o localizado.
- ◆ Evaluar el efecto del MK-801 en la actividad de caspasas iniciadoras (8 y 9) y efectoras (1 y 3) en homogenados de cerebelo durante el desarrollo postnatal.
- ◆ Evaluar el efecto del MK-801 en los niveles de fragmentos activos correspondientes a las caspasas-1, 3, 8, y 9 en homogenados de cerebelo durante el desarrollo postnatal y en la proteólisis de un sustrato específico de caspasas (PARP).

- ♦ Integrar los resultados obtenidos a fin de evaluar la importancia de la población glutamatérgica, vía el receptor NMDA, de las fibras musgosas en la muerte de las NGC durante el desarrollo.

V. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

Ratas Wistar de 1, 5, 9, 12 y 22 DPN se administraron de manera sistémica con MK-801 ([5R,10S]-[+]-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina maleato de hidrógeno, 0.5 mg/Kg de peso; RBI, Cat. M-107) o con el vehículo (solución salina fisiológica, NaCl 0.15 M). Las ratas se inyectaron intraperitonealmente con las soluciones descritas cada 24 h durante tres días. Al cuarto día de tratamiento (4, 8, 12, 15, 25 DPN, respectivamente) los animales se anestesiaron con pentobarbital y se sacrificaron.

5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA CORTEZA CEREBELAR

Ratas de 8, 12, 16 y 25 DPN tratadas como se describe anteriormente fueron perfundidas a través del ventrículo izquierdo con solución salina (NaCl, 0.15 M) y posteriormente con paraformaldehído al 4%. El cerebelo se disectó, deshidrató (ver apéndice) y posteriormente fue incluido en parafina. Se obtuvieron cortes parasagitales de cerebelo de 10 µm de grosor. Los cortes fueron desparafinados, rehidratados, teñidos con hematoxilina de Harris por 5 min, lavados con agua corriente, después con agua destilada, se deshidrataron con etanol (50 % y 70 %), se tiñeron con eosina (eosina Y, 1 g; alcohol etílico, 1 l al 70 %; ácido acético glacial, 5 ml). La mezcla anterior se diluyó 1:1 en alcohol etílico al 70 % y se agregaron 2-3 gotas de ácido acético 1 a 2 segundos

(Humason, 1979), se continuó la deshidratación y se montaron con resina (ver apéndice). Teniendo de base el campo visual del microscopio, finalmente se midió el grosor de cada una de las capas de la corteza cerebelar y se contó el número de las células que hay por unidad de área en la CGE y CGI.

5.3 DETECCIÓN *in situ* DE CARACTERÍSTICAS APOPTÓTICAS EN EL CEREBELO

Otra serie de cortes obtenidos como se describe anteriormente, se desparafinaron, rehidrataron y se tiñeron con Hoechst 33258 (ver apéndice; SIGMA, Cat. B-2883) para detectar células con cromatina condensada o con un Kit para TUNEL acoplado a fluoresceína (ver apéndice; Boehringer Mannheim, Cat. 1684817) para detectar fragmentación de ADN. El análisis de las preparaciones se realizó en un microscopio de epifluorescencia Nikon modelo DIAPHOT-TMD y se usaron los filtros correspondientes para Hoechst y fluoresceína (UV-2A y B-2A, respectivamente). Se determinó el número de células positivas a TUNEL o con la cromatina condensada por unidad de área para cada tiempo y condición en cada una de las capas de la corteza cerebelar.

5.4 PARTICIPACIÓN DE CASPASAS EN LA MUERTE APOPTÓTICA EN EL CEREBELO

Ratas de 8, 12, 16 y 25 DPN tratadas como se describe anteriormente, se sacrificaron por decapitación y el cerebelo fue rápidamente removido en frío. El cerebelo fue pesado y seccionado sagitalmente a la altura del vermis. Una de las mitades obtenidas se homogenizó en solución para caspasas fría (HEPES 100 mM pH 7.5; sacarosa 10 %; EDTA 1 mM; EGTA 20 μ M; CHAPS 0.2 %; DTT 10 mM; leupeptina 10 μ g/ml; pepstatina 2 μ g/ml; aprotinina 2 μ g/ml; PMSF 1 mM) mezclado con glicerol (1:1), a una concentración de 0.5 mg de cerebelo en 1 ml de solución. La otra mitad se

homogenizó en amortiguador de lisis a 4 °C (Tris-HCl 25 mM pH 7.4; NaCl 50 mM; NP-40 2 %; SDS 0.2 %; leupeptina 10 µg/ml; pepstatina 2 µg/ml; aprotinina 2 µg/ml; PMSF 1 mM). Los homogenados obtenidos se centrifugaron a 15 000x g durante 30 minutos, se recuperó el sobrenadante, y se determinó la cantidad de proteína con el método de Bradford (Bradford, 1976). Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta que fueron usadas para medir la actividad de algunas caspasas o para réplicas tipo Western (ver abajo).

5.4a Cuantificación de la actividad de caspasas

De los diferentes homogenados en amortiguador de caspasas, se usó un volumen con 200 µg de proteína y se midió la actividad de caspasas utilizando sustratos fluorogénicos (Peptide Institute, Inc.) acoplados a acetoxi-metilcoumarina (MCA); (Ac-YVAD-MCA) para la caspasa-1, (Ac-DEVD-MCA) para la caspasa-3, (Ac-IETD-MCA) para la caspasa-8 y (Ac-LEHD-MCA) para la caspasa-9. Los sustratos se utilizaron a una concentración final de 12.5 µM en 2.4 ml de amortiguador de caspasas para lectura (igual al descrito en el párrafo anterior pero con un 10 % de la concentración final de inhibidores de proteasas). La fragmentación del sustrato se determinó detectando la aparición de MCA libre durante 15 minutos, utilizando una longitud de onda de excitación de 380 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm en un espectrofluorómetro (Aminco-Bowman Series 2). La actividad se reporta como incremento de fluorescencia (ΔF) por mg de proteína y por hora.

5.3b Análisis de réplicas tipo Western

Las proteínas en los homogenados obtenidos en amortiguador de lisis se separaron a través de una SDS-PAGE (10-17 %) y fueron transferidas a una membrana

de PVDF (Polyvinylidene fluoride; Millipore, Immobilon™-P). La membrana se bloqueó por 1 h con leche descremada al 5 % y posteriormente se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente. Se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra el precursor (116 KDa) y el fragmento de 85 KDa de PARP (Upstate Biotechnology, Cat. 06-557-MN, dilución 1:500), contra el precursor (42 KDa) y la subunidad grande (20 KDa) de la caspasa-1 (SIGMA, Cat. C-4851, 2 µg/ml), contra el precursor (32 KDa) y los fragmentos activos (11 KDa y 17 KDa) de la caspasa-3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Cat. sc-7148, dilución 1:100), contra el precursor (55/57 KDa) y formas procesadas (42/44 KDa, 25 KDa y 14 KDa) de la caspasa-8 (NeoMarkers, Cat. RB-1200-P1, 5 µg/ml) y contra el precursor (48 KDa) y forma procesada (32 KDa) de la caspasa-9 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Cat. sc-7885, dilución 1:100). Finalmente las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina; dirigidos contra IgG de conejo (BIO-RAD Laboratories, Cat. 172-1016, dilución 1:10 000) durante 1 h a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó utilizando un sustrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina (CDP-Star™, BioLabs, Inc., Cat. 7001).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen algunos antecedentes sobre la acción del MK-801, un antagonista no competitivo de los receptores a glutamato tipo NMDA, en estudios realizados con animales en desarrollo. Se ha demostrado en la rata que el cerebelo es una de las estructuras más afectadas por un tratamiento neonatal crónico con MK-801 (Facchinetti et al, 1993). En este trabajo se demuestra que los efectos deletéreos del MK-801 (0.5-1 mg/Kg) se deben al fármaco *per se* y no a un evento de desnutrición ya que este tratamiento no compromete la vida del animal. Lo anterior indica que si bien la transmisión glutamatérgica, vía los receptores tipo NMDA, es importante en la maduración del SN, no determina la sobrevivencia del individuo durante el desarrollo postnatal de la rata.

En el presente trabajo, hemos utilizado una estrategia diferente a la empleada por Facchinetti y colaboradores (Facchinetti et al, 1993) para bloquear la transmisión glutamatérgica por periodos discretos y cortos, y de esta manera determinar etapas críticas de la acción del glutamato en el desarrollo del SNC de la rata. Así, hemos encontrado que la administración de MK-801 (0.5 mg/Kg de peso) durante tres días consecutivos disminuye el peso del animal pero no afecta el peso del cerebelo o del encéfalo. Sin embargo, el grupo de Facchinetti (1993) observa una reducción en el peso del cerebelo de las ratas tratadas crónicamente con MK-801. Esta diferencia puede deberse tanto al tiempo de tratamiento, que en el trabajo del grupo de Facchinetti es más prolongado (1-22 DPN), como a las altas concentraciones del fármaco que utilizan en este trabajo (0.5-1 mg/Kg).

6.1 EFECTO DEL MK-801 EN LA MORFOLOGÍA DE LA CORTEZA CEREBELAR

Para analizar la morfología de la corteza cerebelar se usaron cortes de cerebelo, obtenidos de los diferentes grupos experimentales, teñidos con hematoxilina-eosina y se determinó tanto el grosor como el número de células presentes en cada una de las capas del cerebelo.

Durante el desarrollo postnatal de la rata el grosor de la CGE disminuye de manera significativa a partir del 12 DPN (Fig. 9; Tabla 2) y desaparece por completo a 25 DPN (Fig. 9; Ito, 1984).

El tratamiento con MK-801 induce de manera significativa un mayor grosor de la CGE a 8 DPN y lo reduce a 12 DPN (Fig. 9; Tabla 2). Sin embargo, aunque este tratamiento no modifica de manera significativa la densidad celular de la CGE a 8 o 12 DPN, produce un ligero incremento en el número de células que puede estar relacionado con el incremento en el grosor de la capa (Tabla 2). Por otra parte, el MK-801 reduce de manera significativa (aproximadamente un 11 %) el número de células en la CGE a 16 DPN (Tabla 2), que podría indicar un evento de pérdida celular causado por la inhibición los receptores tipo NMDA sin afectar el grosor de la capa.

6.2 EFECTO DEL MK-801 EN LA MUERTE APOPTÓTICA DENTRO DE LA CORTEZA CEREBELAR DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL

Para determinar el efecto del MK-801 en la cantidad de células con características apoptóticas, como la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, en el cerebelo de rata durante el desarrollo postnatal, cortes de cerebelo fueron teñidos con Hoechst y con TUNEL.

El número total de células que muestran condensación de ADN, en un área correspondiente a las tres capas de la corteza cerebelar de la misma folia, muestra una

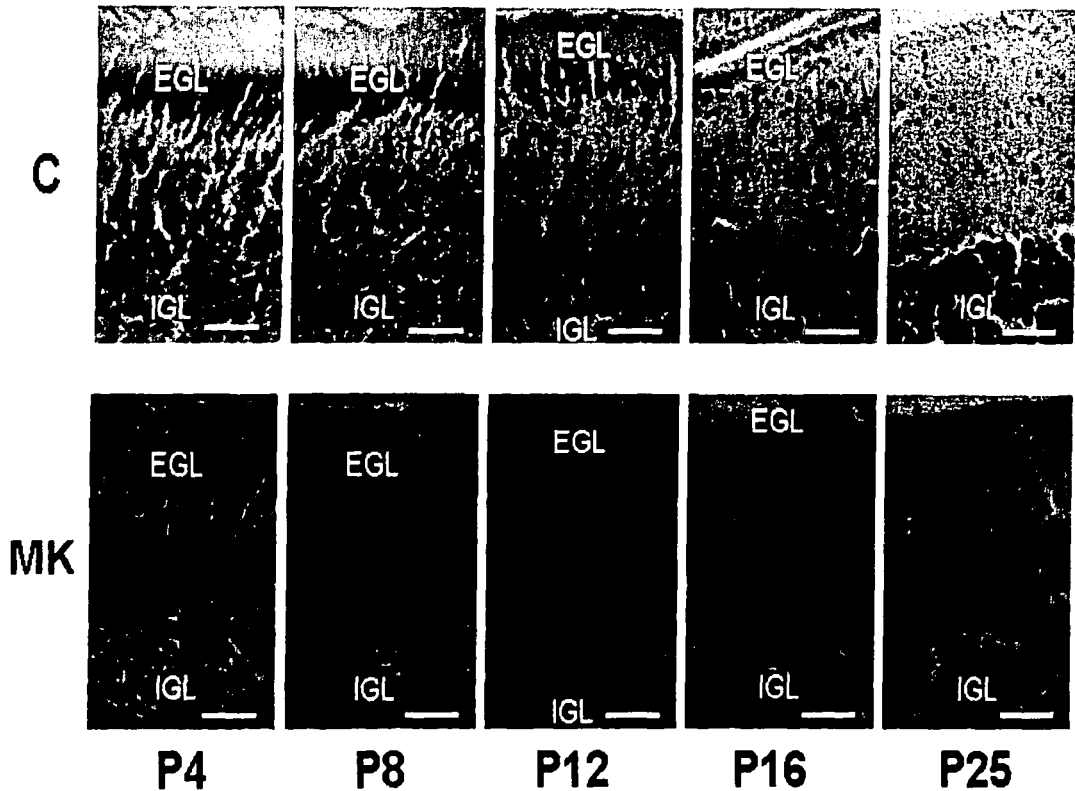


Figura 9. Efecto del MK-801 en la morfología de las capas de la corteza cerebelar de rata durante el desarrollo postnatal. Cortes parasagítales de cerebelos obtenidos de ratas tratadas con solución salina (C) o con MK-801 (0.5 mg/Kg de peso) (MK) durante tres días consecutivos, como se describe en métodos. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina a los tiempos indicados. CGE, capa granular externa, CGI, capa granular interna. Las barras corresponden a 50 μ m.

	C		MK	
	Grosor (μm)	Células/ mm^2	Grosor (μm)	Células/ mm^2
4 DPN	14.0 \pm 2.4	31068.3 \pm 1490.1	15.9 \pm 2.4	34383.9 \pm 614.0
8 DPN	11.7 \pm 1.3	36839.9 \pm 0.0	17.1 \pm 0.8 ^a	37883.7 \pm 1091.5
12 DPN	12.1 \pm 0.4	27261.5 \pm 1079.3	9.0 \pm 1.0 ^c	30945.5 \pm 908.6
16 DPN	5.6 \pm 0.6	25343.1 \pm 859.4	6.3 \pm 0.7	22591.4 \pm 286.0 ^b

Tabla 2. Efecto del MK-801 en el grosor y en el número de células (por mm^2) que presenta la CGE (capa granular externa) durante el desarrollo postnatal de la rata. Valores obtenidos del análisis de los cortes parasagitales teñidos con Hematoxilina-Eosina como se describe en la figura 9. Se examinó una área correspondiente a la misma folia de tres cortes seriados de cada uno de los tres animales tratados para cada condición. Los valores se expresan como el promedio \pm el error estándar. ^a $p < 0.03$; ^b $p < 0.04$; ^c $p < 0.05$; con respecto al control.

clara tendencia a disminuir con el desarrollo postnatal (Fig. 10 y 11). Durante la primera semana postnatal se observa una gran cantidad de células con ADN condensado, por mm^2 de corteza cerebelar (4 DPN, 748.3 \pm 70.1 y 8 DPN, 842.9 \pm 33.4), que se reduce dramáticamente a menos de un tercio hacia el 12 DPN (229.3 \pm 14.5). A 16 DPN la cantidad de núcleos condensados disminuye ligeramente con respecto a 12 DPN, pero sin mostrar diferencia significativa y hacia 25 DPN la condensación de núcleos se reduce a niveles muy bajos (48.3 \pm 0.6). Por otra parte, el tratamiento con MK-801 reduce significativamente el número de núcleos condensados a 8 DPN (652.1 \pm 35.9) y 25 DPN (35.4 \pm 2.4) y los incrementa a 16 DPN (de 182.8 \pm 14.2 a 295.7 \pm 9.8).

En función a que analizar las 3 capas de la corteza cerebelar de manera simultánea podría no reflejar alteraciones importantes en alguna de éstas por efecto del MK-801, decidimos examinar las diferentes capas cerebelares de manera independiente.

Este análisis revela que, en todas las etapas de desarrollo exploradas en este trabajo, es la CGE la capa que presenta el mayor número de núcleos condensados (excepto al 25 DPN, tiempo en la que esta capa desaparece) mientras que el menor

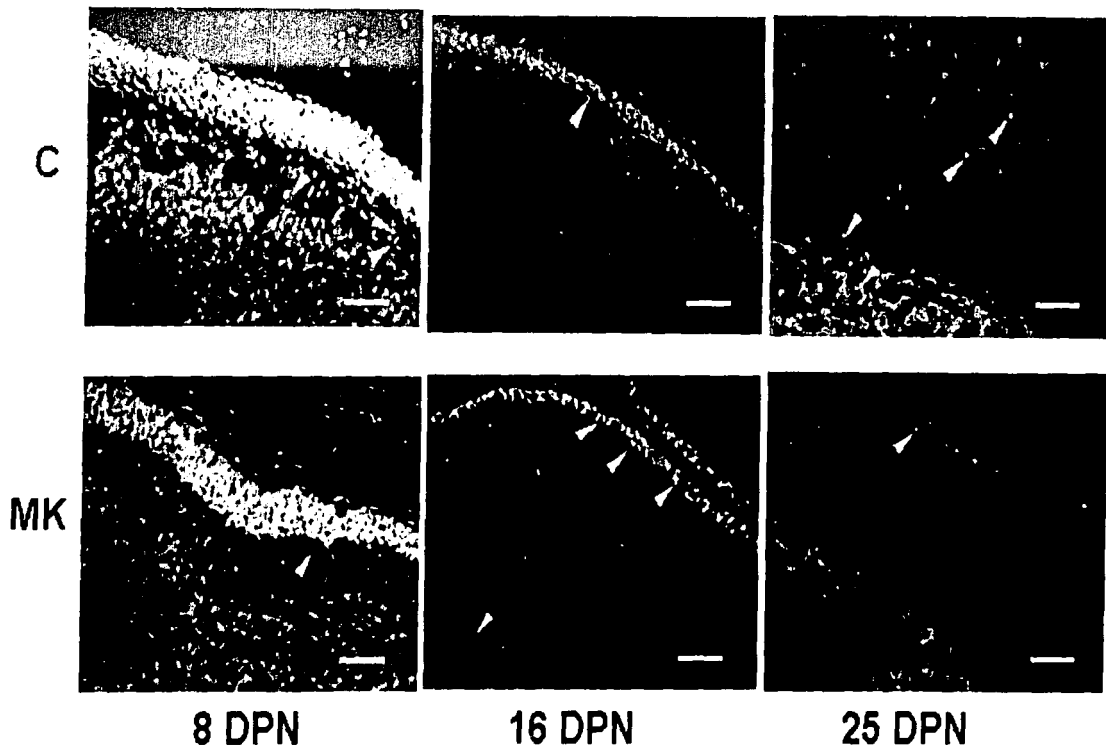


Figura 10. Efecto del MK-801 en la condensación nuclear dentro de la corteza cerebelar de rata durante el desarrollo postnatal. Cortes parasagiales de cerebelos obtenidos de ratas tratadas con solución salina (C) o con MK-801 (0.5 mg/Kg de peso) (MK) durante tres días consecutivos como se describe en métodos. Los cortes fueron teñidos con Hoechst (0.1 %) a los tiempos indicados y observados bajo epifluorescencia. Las cabezas de flecha indican núcleos con cromatina condensada, las barras corresponden a 50 μ m.

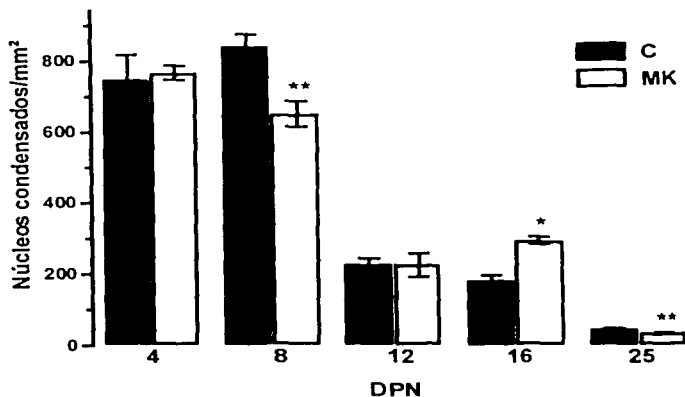


Figura 11. Efecto del MK-801 en el número de células con ADN condensado dentro de la corteza cerebelar en el desarrollo postnatal de la rata. Valores obtenidos del análisis de los cortes parasagitales teñidos con Hoechst como se describe en la figura 10. La cantidad de núcleos condensados se determinó contando un área de 1 mm² correspondiente a la misma folia de tres cortes seriados de cada uno de los tres animales examinados para cada condición. Los valores se expresan como el promedio \pm el error estándar. * p < 0.015; ** p < 0.035; con respecto al control.

número se encuentra en la CGI (Tabla 3). En los animales tratados con MK-801 se observa que la cantidad de núcleos condensados disminuye significativamente en la CGE a 12 DPN, en el caso de la CM a los 8 y 25 DPN, y en la CGI a 25 DPN (Tabla 3). Este tratamiento produce un incremento significativo en la cantidad de núcleos condensados a 16 DPN tanto en la CGE como en la CGI (Tabla 3).

Aparentemente, bloquear los receptores a glutamato tipo NMDA puede modular de manera diferencial la cantidad de células con ADN condensado en las diferentes capas de la corteza cerebelar dependiendo del estado de desarrollo del cerebelo. Es interesante notar que de acuerdo a estos resultados, existe una dependencia de glutamato de las NGC en la CGE y CM del cerebelo a 8 DPN, esto es, antes de que las fibras musgosas se consideren activas (12 DPN). Por otro lado, la condensación de ADN no es una

	C			MK		
	CGE	CM	CGI	CGE	CM	CGI
4 DPN	1384.2 ± 155.4	480.6 ± 27.0	380.0 ± 33.9	1135.2 ± 179.4	530.6 ± 31.0	313.7 ± 37.2
8 DPN	1248.1 ± 86.0	831.8 ± 42.2	486.2 ± 90.7	806.7 ± 147.1	561.6 ± 10.8 ^b	332.6 ± 31.7
12 DPN	542.7 ± 16.4	148.5 ± 24.8	39.5 ± 2.1	382.6 ± 37.3 ^a	201.8 ± 23.6	47.9 ± 7.7
16 DPN	363.8 ± 55.2	167.0 ± 4.5	50.0 ± 2.3	681.9 ± 45.3 ^d	192.4 ± 40.7	86.9 ± 9.5 ^c
25 DPN	n.d.	123.7 ± 8.5	41.0 ± 2.0	n.d.	73.6 ± 8.6 ^b	29.8 ± 0.6 ^a

Tabla 3. Efecto del MK-801 en el número de células con ADN condensado (por mm²) en cada una de las capas de la corteza cerebelar durante el desarrollo postnatal de rata. Valores obtenidos del análisis de los cortes parasagittales teñidos con Hoechst como se describe en la figura 10. La cantidad de núcleos condensados se determinó contando un área de cada capa (CGE, CM y CGI) correspondiente a la misma folia de tres cortes seriados de cada uno de los tres animales tratados para cada condición. Los valores se expresan como el promedio ± el error estándar. n.d., no detectados; ^a p < 0.01; ^b p < 0.015; ^c p < 0.02; ^d p < 0.05.

característica exclusiva de fenómenos apoptóticos y puede asociarse a otros eventos celulares como la proliferación o a un déficit energético, por lo que no se puede asegurar que el efecto del MK-801 en la condensación nuclear observada refleje únicamente la sobrevivencia celular. Por esto, es necesario determinar otras características apoptóticas, como la fragmentación del ADN, y comprobar si realmente los cambios observados en la condensación nuclear reflejan de manera cercana eventos de naturaleza apoptótica.

Usando la técnica de TUNEL encontramos una tendencia similar a la observada al utilizar la tinción de Hoechst, ya que el número de células con ADN fragmentado en los animales control tiende a disminuir durante el desarrollo y se observa un máximo hacia el 8 DPN (Fig. 12 y 13). Al igual que con la tinción de Hoechst, el MK-801 produce una respuesta diferencial en función a la edad reduciendo la cantidad de núcleos positivos a TUNEL a 8 DPN y mostrando un incremento a 16 DPN.

Existen algunos reportes que sugieren la presencia de fragmentación de ADN en células de cerebelo de rata durante el desarrollo. En este sentido, nuestros resultados son

consistentes con el estudio de White y Barone (2001), quienes determinan que los niveles más altos de fragmentación en el cerebelo de rata durante el desarrollo se encuentran en los primeros 10 días del desarrollo postnatal, con un máximo a los 10 DPN, y una clara disminución hacia 14 DPN y los días siguientes. Sin embargo, nuestros resultados difieren de los obtenidos por Monti y Contestabile (2000) ya que en su estudio no se reportan cambios significativos en la cantidad de ADN fragmentado durante las dos primeras semanas del desarrollo postnatal. Cabe mencionar que en su estudio, Monti y Contestabile determinan la cantidad total de ADN fragmentado en homogenados de cerebelo, sin tomar en cuenta el gran incremento en peso que éste sufre durante la segunda semana del desarrollo postnatal. Esto podría enmascarar la reducción en la cantidad de ADN fragmentado durante el desarrollo postnatal encontrada tanto en este trabajo como por White y Barone (2001), ni aporta información de la posible distribución del proceso apoptótico. Al comparar los resultados obtenidos con ambas técnicas, encontramos que el total de núcleos condensados es significativamente mayor que el total de núcleos positivos a TUNEL. Esto parece reflejar una clara diferencia en la sensibilidad entre ambas técnicas. La técnica del Hoechst nos es útil para determinar cuando la cromatina de una célula se encuentra condensada y parece ser mucho más sensible que el TUNEL. El Hoechst es sumamente permeable y su capacidad para teñir material nuclear sólo depende de su intercalación en el ADN. Por otra parte, la técnica del TUNEL que solo determina la presencia de ADN condensado, requiere que los cortes sean permeabilizados para permitir el acceso a los reactivos y la detección de ADN fragmentado depende de la actividad adecuada de una enzima (deoxinucleotidil terminal transferasa, TdT).

Al analizar los resultados de condensación y fragmentación de ADN obtenidos en este estudio, observamos que los patrones de ambos grupos presentan algunas

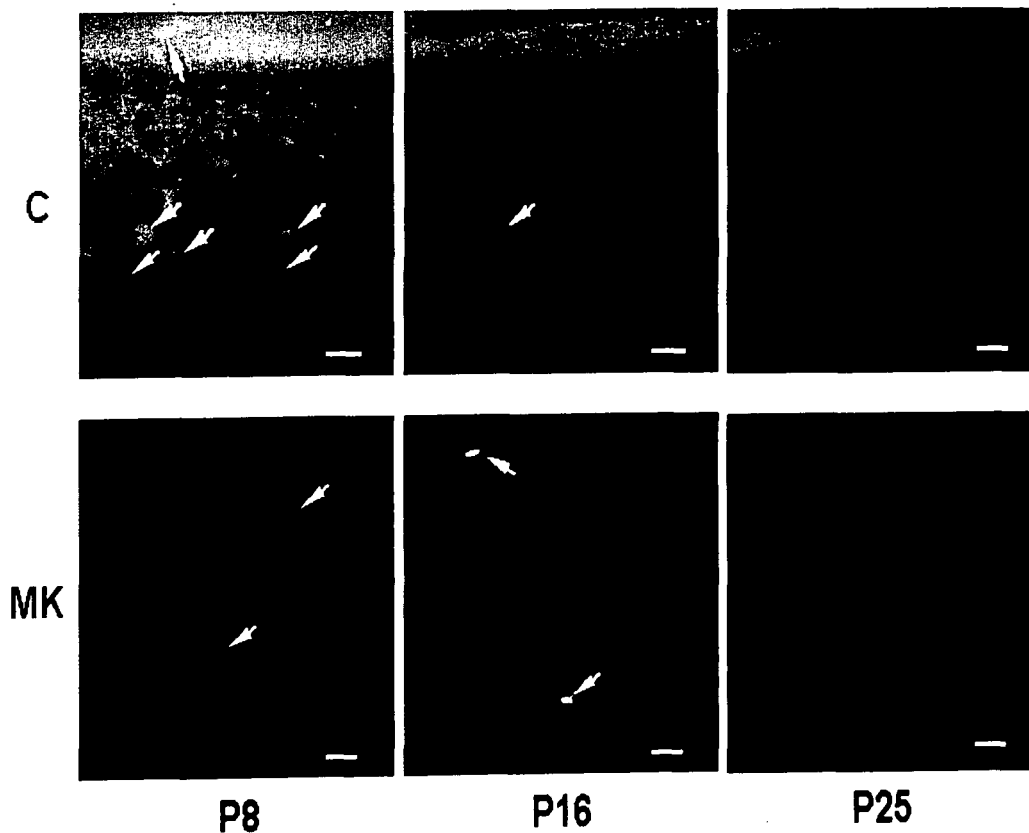


Figura 12. Efecto del MK-801 en la fragmentación de ADN dentro de la corteza cerebelar de rata durante el desarrollo postnatal. Cortes parasagitales de cerebelos obtenidos de ratas tratadas con solución salina (C) o con MK-801 (0.5 mg/Kg de peso) (MK) durante tres días consecutivos como se describe en métodos. Los cortes fueron teñidos con TUNEL a los tiempos indicados y observados bajo epifluorescencia. Las flechas señalan células positivas a TUNEL; las barras corresponden a 10 μ m.

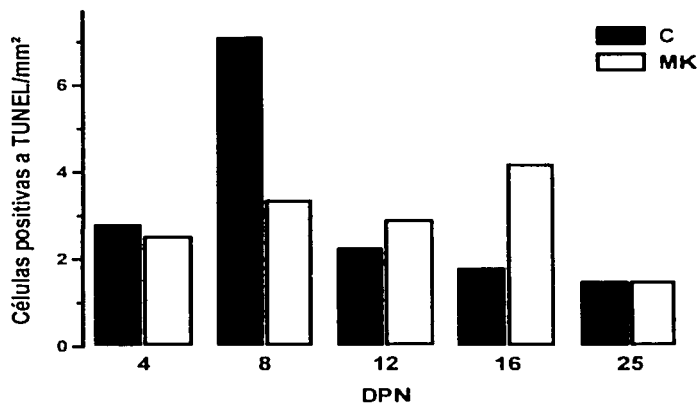


Figura 13. Efecto del MK-801 sobre el número de células con ADN fragmentado dentro de la corteza cerebelar durante el desarrollo postnatal de la rata. Valores obtenidos del análisis de los cortes parasagitales teñidos con TUNEL como se describe en la figura 12. La cantidad de células positivas a TUNEL se determinó contando un área correspondiente a la misma folia de dos cortes seriados de uno de los animales tratados para cada condición.

diferencias, básicamente durante la primera semana de desarrollo postnatal. En este periodo (4-8 DPN) se detectan los niveles mayores en la cantidad de núcleos con ADN condensado (Fig. 10), pero la cantidad máxima de núcleos con ADN fragmentado se encuentra a 8 DPN (Fig. 13). Independientemente de que la fragmentación de ADN es sensiblemente menor que la condensación, particularmente en estadios tempranos de desarrollo, el máximo evento de condensación y el máximo de fragmentación se observan a 8 DPN (Fig. 10 y 13). Estos resultados sugieren, que en esta etapa hay una población de células con ADN condensado que corresponderían a un evento apoptótico y otra población que está en un evento proliferativo. Se sabe que en la rata las NGC experimentan eventos de proliferación entre los 5-15 DPN, con una marcada intensidad

en los primeros 10 días (Altman, 1972). Así, la alta incidencia de condensación nuclear que se observa durante este periodo puede ser resultado de eventos mitóticos. Cabe resaltar que el máximo de células con ADN fragmentado dentro de la corteza cerebelar de rata que se observa alrededor de 8 DPN es consistente con el análisis espacio-temporal de muerte fisiológica durante el desarrollo del SNC realizado por White y Barone (2001) en rata.

Es interesante que inhibir los receptores a glutamato tipo NMDA justo antes de 8 DPN (5-8 DPN) sea capaz de reducir la cantidad de células en proceso apoptótico (Fig. 11 y 13). Este tratamiento no sólo disminuye la cantidad de células con ADN condensado y fragmentado, también incrementa significativamente el grosor de la CGE. Se sabe que entre los 5-8 DPN se forman las primeras sinapsis entre las NGC y las fibras musgosas, pero se ha propuesto que estas conexiones comienzan a ser funcionales hasta los 10-12 DPN (Arsenio-Núñez y Sotelo, 1985; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988), por lo que no se esperaría un efecto tan significativo de la inhibición de la transmisión glutamatérgica sobre las NGC antes de este evento (5-8 DPN). Existen dos puntos importantes que pueden ser de utilidad para explicar este efecto del MK-801. Por una parte se ha descrito que el NMDA es capaz de despolarizar NGC premigratorias en cortes organotípicos obtenidos de cerebelo de rata durante el desarrollo postnatal (Garthwaite et al, 1986; Garthwaite et al, 1987). Por otro lado, se ha sugerido que en las NGC se incrementa la sensibilidad a NMDA antes de su migración y que posiblemente, una liberación parácrina de glutamato, que actúa sobre los receptores NMDA, modula la migración, sinaptogénesis y la subsecuente eliminación de sinapsis de estas células (Pearce et al, 1987; Rabacchi et al, 1992; Komuro y Rakic, 1993; Rossi y Slater, 1993). Por lo anterior, es probable que las NGC de rata, durante la primera semana de desarrollo postnatal, sean capaces de responder a glutamato, y es también posible que la fuente de éste, sean las mismas NGC.

Así, el MK-801 podría inhibir una señal parácrina de carácter glutamatérgico en las CGE, inhibiendo también los niveles altos de muerte apoptótica observados a 8 DPN. Estos resultados sugieren que de existir una liberación parácrina, o de otro tipo, de glutamato no sólo estaría asociada a la regulación de procesos de migración, sino que en esta etapa temprana de diferenciación de las NGC también se podría regular la sobrevivencia.

Es interesante notar que en una etapa un poco más avanzada de desarrollo del cerebelo, hacia 16 DPN, la inhibición previa de los receptores tipo NMDA (entre 13-16 DPN) incrementa la cantidad de células apoptóticas (con ADN condensado y fragmentado; Fig. 10 y Fig. 13) en la corteza cerebelar, y reduce el número celular dentro de la CGE y de la CGI. En este caso, es probable que el efecto sobre la sobrevivencia celular sea el resultado de interferir con el soporte trófico de la porción glutamatérgica de las fibras musgosas, como se ha sugerido (Gallo et al, 1987; Balázs et al, 1988; Balázs et al, 1992). Recientemente Monti y Contestabile (2000) exploraron el efecto del CGP (un antagonista competitivo de los receptores NMDA) durante el desarrollo del cerebelo de rata y encuentran que este fármaco sólo incrementa la muerte de las NGC cuando los receptores son bloqueados de 7-11 DPN. Esta discrepancia con nuestros resultados podría deberse al protocolo de tratamiento realizado por éste grupo. En el trabajo citado, los autores usaron concentraciones de CGP (5-7 mg/Kg/día) que generan niveles de mortalidad altos (más de un 20 %; Facchinetti et al, 1993). Además, el estudio sólo abarcó 13 días de desarrollo postnatal, por lo que no exploran el tiempo en el que nosotros encontramos los cambios más significativos producidos por la inhibición de los receptores tipo NMDA en el desarrollo postnatal del cerebelo de rata (alrededor de 16 DPN). Otra diferencia entre nuestro estudio y el referido, es que estos últimos administran el CGP de manera subcutánea, lo que podría ocasionar diferencias en la absorción, y por lo tanto en

el efecto del fármaco. Las diferencias en el tratamiento puede afectar también el tiempo en el que se observa el efecto.

Con respecto a la ubicación de la muerte en el cerebelo durante el desarrollo postnatal de la rata, White y Barone (2001) reportan que el máximo de células con características apoptóticas se encuentra a 10 DPN y lo ubican tanto en la región pre- como postmigratoria (CGE y CGI). Sin embargo, el grupo de Tanaka (Tanaka y Marunouchi, 1998; Tanaka et al, 1998; Tanaka et al, 2000) sugiere que la muerte apoptótica bajo estas mismas condiciones está restringida a la CGE (básicamente en la zona proliferativa de las NGC, con un máximo a 9 DPN), a pesar de que en estudios previos realizados en roedores se había detectado muerte no sólo en la CGE, sino también en la CGI y otras regiones del cerebelo en desarrollo (Kruger et al, 1995; Wood et al, 1993). En el presente trabajo detectamos condensación y fragmentación de la cromatina en las tres capas cerebelares (CGE, CM y CGI), en concordancia con los resultados presentados por los grupos de Wood (1993) en ratón y de Kruger (1995) en rata. Esta diferencia puede explicarse en función a que en cultivos organotípicos de cerebelo, como los utilizados por el grupo de Tanaka, la regionalización de la muerte podría modificarse ya que el ambiente y las señales que rodean las células de los cultivos pueden no ser las mismas que en un animal vivo. En función a los resultados obtenidos con este tipo de cultivos, el grupo de Tanaka solamente analiza la CGE en el único trabajo *in vivo* que realiza con cerebelos de ratas durante el desarrollo (Tanaka y Marunouchi, 1998), por lo que no se descarta la posibilidad de que exista muerte neuronal en otras capas del cerebelo.

En cuanto a la sensibilidad de las diferentes capas del cerebelo al MK-801 durante el desarrollo, observamos que a 8 DPN hay una tendencia a reducir la cantidad de células con cromatina condensada en las tres capas de la corteza cerebelar (CGE, CM y CGI),

pero sólo en la CM las diferencias son estadísticamente significativas (Tabla 3). Estos resultados sugieren que bloquear los receptores NMDA en esta etapa (8 DPN), afecta particularmente neuronas de la zona premigratoria y posiblemente, esto se vea reflejado en la muerte de NGC en proceso de migración, ubicadas principalmente en la CM. Después de esta etapa, el tratamiento con MK-801 sólo es capaz de modificar la sobrevivencia celular a 16 DPN. En esta etapa, el MK-801 incrementa de manera significativa el número de neuronas con ADN condensado tanto en la CGE como en la CGI. Estos resultados concuerdan con la hipótesis propuesta por Balázs (Balázs et al, 1988; Balázs et al, 1992) que sugieren una función trófica para el glutamato proveniente de las fibras musgosas en esta etapa del desarrollo del cerebelo. Una gran cantidad de resultados *in vitro* apoyan esta hipótesis (Gallo et al, 1987; Balázs et al, 1988; Morán y Patel, 1989; Morán y Rivera-Gaxiola, 1992; Burgoyne et al, 1993; Komuro y Rakic, 1993; Balázs et al, 1998; Morán et al, 1999).

6.3 EFECTO DEL MK-801 EN LA ACTIVIDAD DE CASPASAS DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL CEREBELO DE RATA

Un sustrato endógeno de las caspasas que se ha utilizado ampliamente como marcador de la actividad de éstas proteasas durante la apoptosis es la PARP (poli-ADP-ribosa polimerasa; 116 KDa) (Germain et al, 1999). Para determinar si estas proteasas participan activamente en la pérdida celular observada en el desarrollo del cerebelo, se realizaron réplicas tipo Western usando un anticuerpo policlonal contra PARP. Nuestros resultados muestran niveles altos de PARP (banda de 116 KDa) durante las dos primeras semanas postnatales en el cerebelo de rata con un máximo a 16 DPN (Fig. 14). Esto puede estar asociado a la necesidad de reparar el ADN durante los eventos de proliferación que se observa en las NGC durante este periodo. Independientemente del incremento en la cantidad de PARP, observamos proteólisis de esta molécula que puede

estar asociada a actividad de caspasas (fragmento de 80 KDa), con un máximo en la densidad de la banda a 16 DPN (Fig. 14). El tratamiento con MK-801 incrementa los niveles de PARP y muy ligeramente los niveles de fragmentación entre 8 y 12 DPN. Esto puede reflejar una disminución en la actividad de caspasas al inhibir los receptores a glutamato tipo NMDA durante esta etapa de desarrollo postnatal del cerebelo de la rata. Este tratamiento disminuye casi por completo la banda de 116 KDa (PARP) a 16 DPN y solo permite observar el resultado de la proteólisis de 80 KDa (Fig. 14), lo que sugiere una gran actividad de caspasas que podría ser la responsable de la desaparición de PARP. Hacia 25 DPN los niveles de PARP y del fragmento son muy bajos y la administración de MK-801 los disminuye aún más (Fig. 14).

Se sabe que las caspasas participan activamente en procesos apoptóticos (Thornberry y Lazebnik, 1998). Para determinar la actividad de las caspasas-1, 3, 8 y 9 se emplearon sustratos fluorogénicos en homogenados de cerebelo obtenidos de ratas en diferentes etapas de desarrollo postnatal. El incremento de fluorescencia se expresa por h y por mg de proteína. Los resultados fueron corregidos por mg de peso de cerebelo para minimizar el efecto del incremento en la cantidad de tejido de esta estructura durante el desarrollo. También se realizaron réplicas tipo Western para detectar la presencia y los niveles de las diferentes subunidades que conforman los heterodímeros activos de las caspasas mencionadas, poniendo especial atención en los fragmentos activos.

Al determinar las actividades de las caspasas efectoras (1 y 3) y de las caspasas iniciadoras (8 y 9), encontramos que todas presentan una clara tendencia a disminuir a lo largo del desarrollo postnatal (Fig. 15).

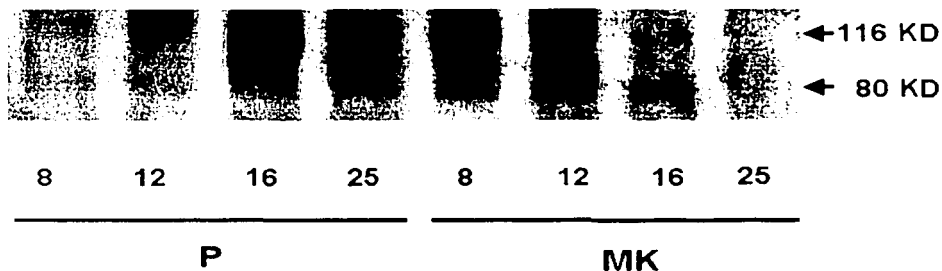


Figura 14. Efecto del MK-801 en los niveles de PARP en homogenados de cerebelo durante el desarrollo postnatal de la rata. Réplica tipo Western realizada con homogenados de cerebelo de ratas a las que se les administró solución salina (P) o MK-801 (0.5 mg/Kg de peso; MK) durante tres días consecutivos, obtenidos en los tiempos indicados. Se observa la banda que corresponde a PARP (116 KD) y la banda del fragmento (80 KD).

Por otro lado, el MK-801 afecta de manera diferencial la actividad de éstas caspasas bajo las condiciones analizadas. El MK-801 sólo incrementa de manera significativa la actividad de la caspasa-1 a 8 DPN (Fig. 15 A), mientras que incrementa significativamente la actividad de caspasa-3 a 16 y 25 DPN (Fig. 15 B). Estos resultados muestran una correlación muy cercana a la actividad de caspasas que sugiere la proteólisis de PARP (Fig. 14). El tratamiento con MK-801 no modifica significativamente la actividad de caspasa-8 (Fig. 15 C), pero si disminuye (8 DPN) e incrementa (12 DPN) la actividad de caspasa-9 (Fig. 15 D).

Para corroborar estos resultados, hemos determinado los niveles de los fragmentos activos para cada caspasa estudiada a través de réplicas tipo Western y se ha calculado por densitometría la intensidad de las bandas correspondientes a los fragmentos activos. Estos resultados fueron corregidos por peso de cerebelo para hacerlos comparables a las actividades determinadas y para evitar alteraciones producidas por el crecimiento del cerebelo.

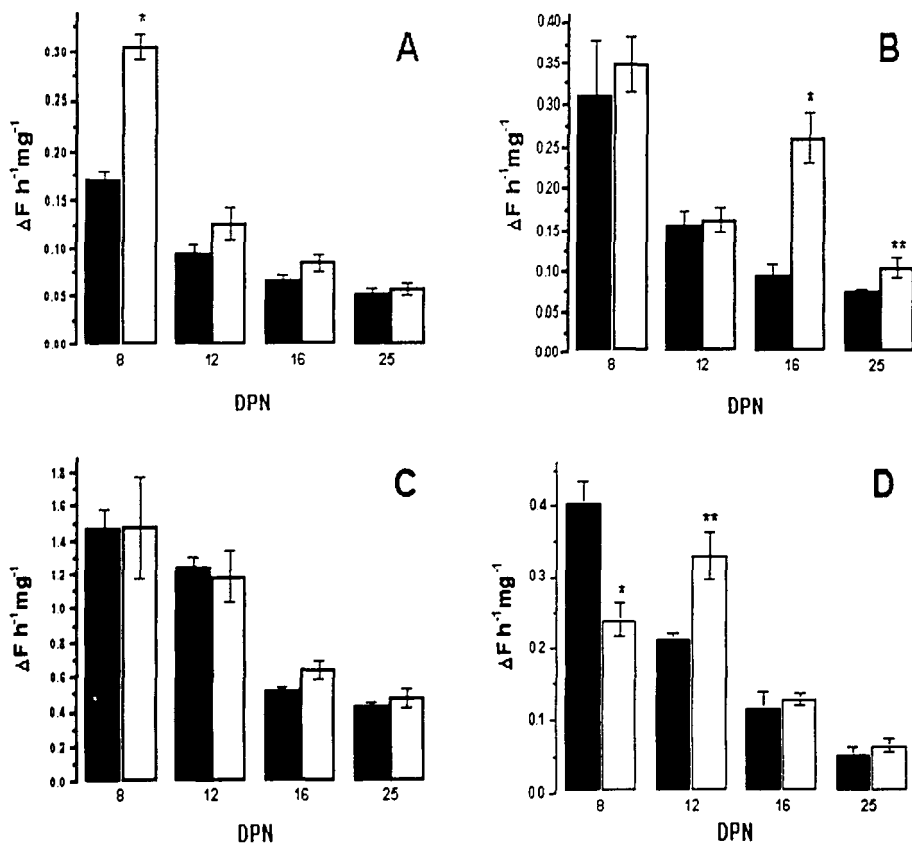


Figura 15. Efecto del MK-801 en la actividad de caspasa-1, 3, 8 y 9 en homogenados de cerebelo de rata durante el desarrollo postnatal. La actividad de las enzimas se obtienen de homogenados de cerebelo de ratas tratadas con solución salina (barras negras) o con MK-801 (0.5 mg/Kg de peso, barras blancas) durante tres días consecutivos, que fueron obtenidos en los tiempos indicados y la actividad de cada caspasa fue determinada utilizando sustratos fluorescentes, como se describe métodos. Los valores son el promedio de una $n=4 \pm$ el error estándar y se expresan como el incremento en la fluorescencia por hora y por mg de proteína, corregido por peso de cerebelo. A, caspasa-1, * $p < 0.005$; B, caspasa-3, * $p < 0.01$ y ** $p < 0.045$; C, caspasa-8, D, caspasa-9, * $p < 0.015$ y ** $p < 0.03$, diferencias significativas contra el control.

Los niveles de la subunidad grande (20 KDa) de la caspasa-1 tienden a disminuir durante el desarrollo, y el MK-801 sólo incrementa dichos niveles a 8 DPN (Fig. 16 B), lo cual es consistente con los resultados de la actividad de la caspasa-1 (Fig. 15 A).

Hasta ahora la actividad de caspasa-1 se ha asociado principalmente a procesos inflamatorios y se ha sugerido que su participación podría no ser relevante durante el desarrollo (Kuida et al, 1995; Wang y Lenardo, 2000). Sin embargo, el grupo de Tanaka (1998) reporta actividad de caspasa-1 en NGC de la CGE en cultivos organotípicos de cerebelo de rata durante el desarrollo, lo que sugiere una posible participación de esta caspasa en procesos de muerte en el cerebelo.

Posteriormente Monti y Contestabile (2000) observaron un incremento en la actividad de caspasa-1 a 11 DPN en el cerebelo de rata después de bloquear los receptores NMDA con CGP (entre 7-11 DPN); pero este incremento es menor que el observado en este trabajo a 8 DPN por efecto del MK-801 (tratamiento entre 5-8 DPN) (Fig. 15 A). Es posible que estas diferencias se deban a que Monti y Contestabile bloquearon los receptores NMDA en una etapa del desarrollo posterior disminuyendo así la cantidad de células capaces de responder al fármaco con una activación de caspasa-1 aunado a las diferencias metodológicas que existen entre el estudio de Monti y Contestabile y el presente trabajo, discutidas anteriormente.

Es interesante que el MK-801 produce a 8 DPN un incremento en la actividad de la caspasa-1 (Fig. 15 A) y disminuya a la vez eventos de muerte celular en la corteza cerebelar. Esto puede reflejar un incremento en la muerte de células en otras regiones del cerebelo, como los núcleos profundos cerebelares y la materia blanca ya que tanto la actividad como los niveles de proteína se determinaron en homogenados totales de cerebelo. En relación con lo anterior, se ha reportado que hay muerte masiva de células de la materia blanca durante la primera semana de desarrollo postnatal del cerebelo de la

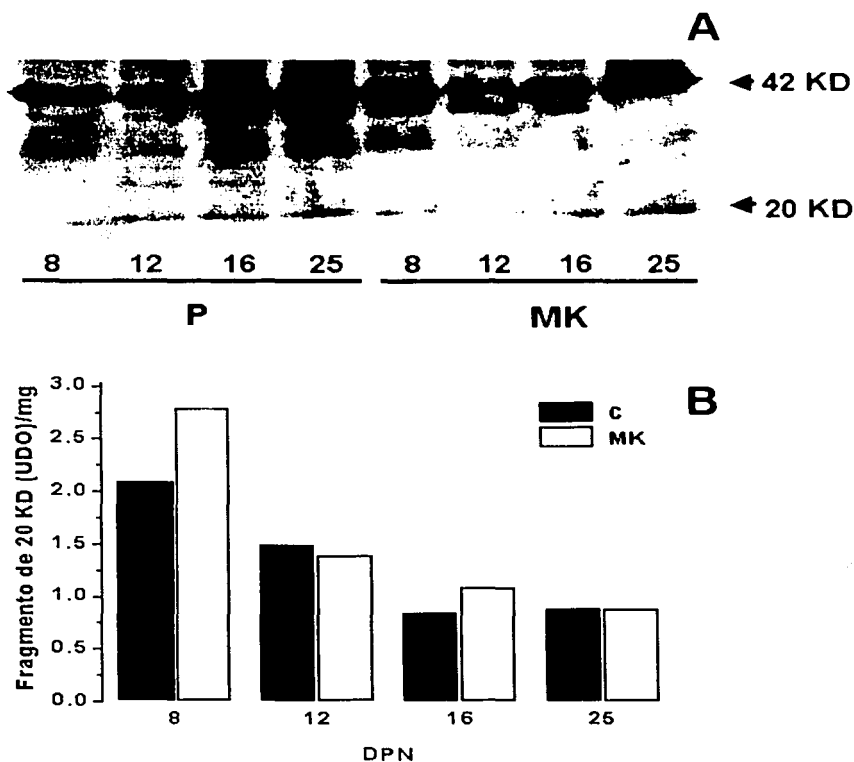


Figura 16. Efecto del MK-801 en los niveles del fragmento activo de caspasa-1 en homogenados de cerebelo durante el desarrollo postnatal de la rata. A) Réplica tipo Western realizada con homogenados de cerebelo de ratas a las que se les administró solución salina (P) o MK-801 (0.5 mg/Kg de peso) (MK) durante tres días consecutivos, obtenidos en los tiempos indicados. Se observa la banda que corresponde a la proenzima de caspasa-1 (42 KD) y la banda de la subunidad activa grande (20 KD). B) Los resultados obtenidos por densitometría al analizar el fragmento activo de la caspasa-1 fueron corregidos por mg de cerebelo y graficados. C, control; MK, MK-801.

rata (Krueger et al, 1995). Ya que en el cerebelo en desarrollo primero se forman los contactos neuronales y posteriormente la glia los mieliniza, es posible que un aumento en la sobrevivencia celular, básicamente de NGC, detenga o retrase regionalmente la maduración del cerebelo al no formarse las sinapsis apropiadas en el momento adecuado y esto genere un daño en la glia incrementando la muerte de estas células. Así, los procesos de muerte observados en células gliales podrían ser regulados por caspasa-1.

Los niveles de la subunidad grande (17 KDa) del complejo activo de la caspasa-3 presentan una tendencia a disminuir conforme se desarrolla el cerebelo, y por su parte el MK-801 solo los incrementa a 12 DPN (Fig. 17 B). Estos resultados no correlacionan del todo con la actividad determinada en este estudio (Fig. 15 B), ya que el incremento en la actividad se observa a 16 DPN.

En función de que en el presente estudio no se determino la actividad de caspasas en tiempos intermedios (de 13 DPN y 25 DPN) es posible que la fragmentación observada se refleja en actividad enzimática en este lapso.

Por otra parte, se ha sugerido que la caspasa-3 juega un papel prominente en la muerte apoptótica que se observa en el encéfalo en desarrollo (Kuida et al, 1996; Wang y Lenardo, 2000). En este trabajo encontramos que la actividad de caspasa-3 aumenta a 16 DPN por efecto de la administración de MK-801, lo que correlaciona con en el incremento de núcleos con ADN condensado y fragmentado que se observa a esta edad (Fig. 11 y Fig. 13). Esto sugiere un evento de muerte apoptótica mediado por la privación de estimulación glutamatérgica en concordancia con resultados previos realizados en estudios *in vitro* (Gallo et al, 1987; Balázs et al, 1988; Morán y Patel, 1989; Balázs et al, 1992; Burgoyne et al, 1993; Alavez et al, 1996; Balázs et al, 1998; Morán et al, 1999).

En lo que respecta a la caspasa-8 y 9 sólo se detectaron algunas formas procesadas de estas caspasas y no las bandas correspondientes a alguno de los

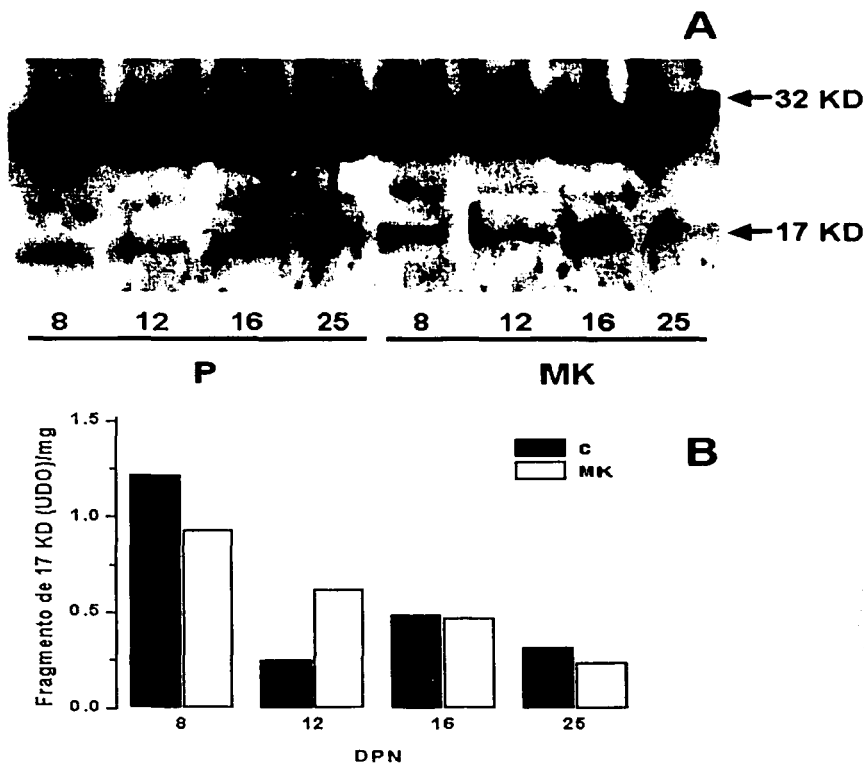


Figura 17. Efecto del MK-801 en los niveles del fragmento activo de caspasa-3 en homogenados de cerebelo durante el desarrollo postnatal de la rata. A) Réplica tipo Western realizada con homogenados de cerebelo de ratas a las que se les administró solución salina (P) o MK-801 (0.5 mg/Kg de peso) (MK) durante tres días consecutivos, obtenidos en los tiempos indicados. Se observa la banda que corresponde a la proenzima de caspasa-3 (32 KD) y la banda de la subunidad activa grande (17 KD). B) Los resultados obtenidos por densitometría al analizar el fragmento activo de la caspasa-3 fueron corregidos por mg de cerebelo y graficados. C, control; MK, MK-801.

fragmentos activos, por lo que los resultados referentes a las densitometrias de formas procesadas de las caspasa-8 y 9 pueden no reflejar de manera confiable la presencia de caspasas activas. Al corregir los resultados de la densitometría por miligramo de cerebelo, se observa una clara tendencia a disminuir durante el desarrollo postnatal del cerebelo de la rata en las dos caspasas iniciadoras, caspasa-8 y 9, (Fig. 18 B y 19 B). Por otra parte, el MK-801 parece incrementar la cantidad de una de las formas procesadas en ambas caspasas (42 KDa, caspasa-8; 32 KDa, caspasa-9) a 8, 12 y 16 DPN, principalmente a 8 DPN (Fig. 18 B y 19 B).

Los resultados de las actividades de caspasas sugieren que la caspasa-8 no está involucrada en los cambios observados al inhibir los receptores a glutamato tipo NMDA en el proceso apoptótico que ocurre durante el desarrollo postnatal del cerebelo de rata.

Por el contrario, la caspasa-9 parece regular el proceso de la muerte a 8 DPN, ya que disminuye la actividad de esta caspasa (Fig. 15 D) y disminuye la cantidad de núcleos con ADN condensado y fragmentado (Fig. 11 y 13). Sin embargo, queda por determinar que caspasa efectora participa en la regulación de este proceso de muerte.

Como ya se comentó, hacia 16 DPN es clara la participación de la caspasa-3 en los eventos de la muerte apoptótica observados en este trabajo (Fig. 15 B), no así la identidad de la caspasa iniciadora que regula la actividad de ésta caspasa. La caspasa-9 podría participar en este proceso ya que incrementa su actividad por efecto de MK-801 a 12 DPN. Considerando que una caspasa iniciadora tiene que activarse antes que una caspasa efectora, es posible que al bloquear los receptores tipo NMDA cuando los contactos sinápticos entre las NGC y las fibras musgosas comienzan a ser funcionales (alrededor de 10-12 DPN) se modifique la activación de la caspasa-9, aunque el efecto de esta activación sobre una caspasa efectora (caspasa-3) parece ser retardado.

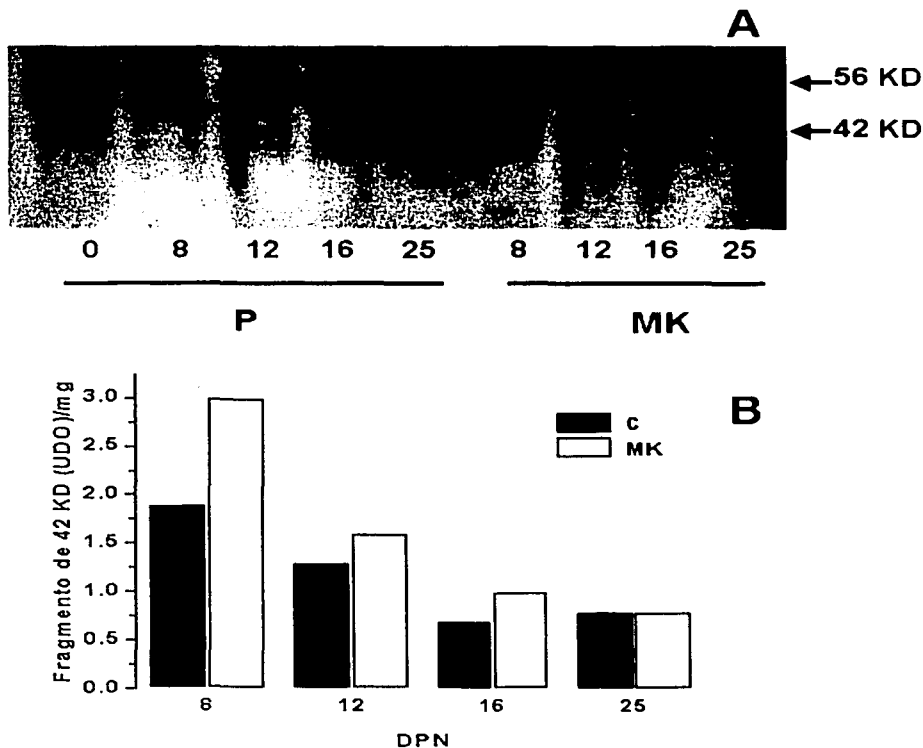


Figura 18. Efecto del MK-801 en los niveles de una de las formas procesadas de caspasa-8 en homogenados de cerebelo durante el desarrollo postnatal de la rata. A) Réplica tipo Western realizada con homogenados de cerebelo de ratas a las que se les administró solución salina (P) o MK-801 (0.5 mg/Kg de peso) (MK) durante tres días consecutivos, obtenidos en los tiempos indicados. Se observa la banda que corresponde a la proenzima de caspasa-3 (56 KD) y la banda de la forma procesada (42 KD). B) Los resultados obtenidos por densitometría al analizar la banda de la forma procesada de la caspasa-8 fueron corregidos por mg de cerebelo y graficados. C, control; MK, MK-801.

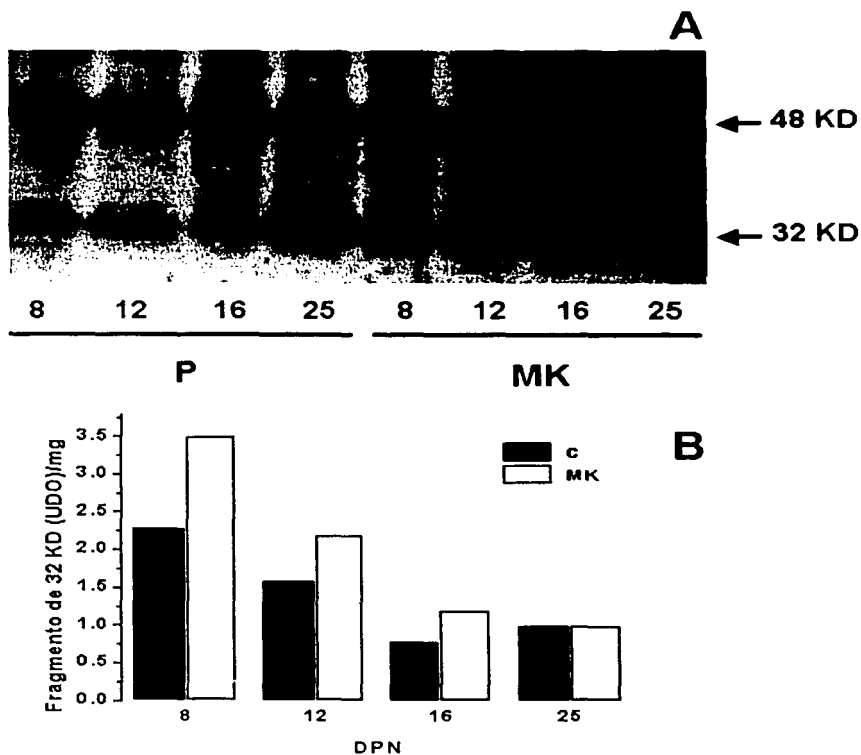


Figura 19. Efecto del MK-801 en los niveles de una de las formas procesadas de caspasa-9 en homogenados de cerebelo durante el desarrollo postnatal de la rata. A) Réplica tipo Western realizada con homogenados de cerebelo de ratas a las que se les administró solución salina (P) o MK-801 (0.5 mg/Kg de peso) (MK) durante tres días consecutivos, obtenidos en los tiempos indicados. Se observa la banda que corresponde a la proenzima de caspasa-3 (48 KD) y la banda de la forma procesada (32 KD). B) Los resultados obtenidos por densitometría al analizar la banda de la forma procesada de la caspasa-9 fueron corregidos por mg de cerebelo y graficados. C, control; MK, MK-801.

VII. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo postnatal de la rata se presentan eventos que sugieren procesos de muerte apoptótica en la corteza cerebelar a los 8 DPN. La administración de MK-801 disminuye sensiblemente este proceso pero es capaz de producir muerte apoptótica a 16 DPN.

- La muerte apoptótica observada durante el desarrollo postnatal de la rata involucra tanto como condensación como fragmentación del material nuclear.
- Los eventos de muerte observados en este trabajo involucra la fragmentación de PARP y la activación de caspasas.

VIII. APÉNDICE

8.1 Deshidratación e inclusión en parafina

El tejido se sumerge durante 30 min en una serie de soluciones (v:v) de alcohol etílico (etanol) en agua, incrementando gradualmente el porcentaje de alcohol: 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 % y en alcohol absoluto (2x30'). Finalmente se pasa por xileno (dos veces, 15 min) y se incluye el tejido en parafina a 60 °C durante una hora y se dejan enfriar.

8.2 Desparafinación y rehidratación

Calentar los cortes a 60 °C, 1 h. Pasarlos por xileno y una serie de alcoholes en el siguiente orden (2x3'): Xileno, etanol absoluto, 95 %, 90 %, 80 % y 70 %. Lavar con agua y colocarlos en PBS hasta la tinción.

8.3 Hematoxilina de Harris (Humason, 1979)

Disolver 1 g de hematoxilina en 10 ml de alcohol etílico. Disolver 20 g de alúmina de potasio ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) o alúmina de amonio ($NH_4Al(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) en 200 ml de agua y hervir. Agregar la hematoxilina y hervir ½ min. Agregar 0.5 g óxido de mercurio. Enfriar rápidamente. Agregar unas gotas de ácido acético. No guardar por más de uno o dos meses.

8.4 Tinción con Hoechst

A los cortes rehidratados en PBS se les elimina el exceso de líquido y se colocan en una cámara húmeda. Se les agrega unas gotas de Hoechst 0.1 % y se cubren con un pedazo de parafilm. Se incuban por 15 min. Se sacan de la cámara húmeda y se elimina

el exceso de Hoechst lavando con PBS (2x1'). Se monta la preparación en PBS-glicerol (1:9) y se observa en el microscopio de fluorescencia. Las longitudes de onda de excitación y de emisión del Hoechst son 350 nm y 460 nm, respectivamente.

8.5 TUNEL (acoplado a fluoresceína)

Cortes desparafinados y rehidratados se incuban con proteinasa K (20 $\mu\text{g/ml}$ en 10 mM Tris/HCl, pH 7.4-8; por 15-30 min a 21-37 °C), se lavan 2 veces con PBS y se incuban en Triton X-100 (0.1 % en citrato de sodio, 0.1 %) por 2 min a 4 °C. Después de esto, los cortes se lavan 2 veces con PBS y se seca el área alrededor del corte, se agregan 50 μl del reactivo de TUNEL del Kit y se cubre el corte con parafilm e incuban durante 60 min a 37 °C en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo de incubación, los cortes se lavan 3 veces con PBS y montan en PBS-glicerol (1:9). Las longitudes de onda de excitación y emisión de la fluoresceína son 495 y 515, respectivamente.

IX. REFERENCIAS

- Alavez, S., Gutiérrez-Kobeh, L., Morán, J. (1996). Characterization of the activation of glutaminase induced by N-Methyl-D-Aspartate and potassium in cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience Research*. 45: 637-646.
- Alavez, S. (2001). Caracterización del proceso de muerte neuronal programada, y su inhibición por NMDA y potasio, en células granulares del cerebelo en cultivo durante el desarrollo. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM. México.
- Altman, J. (1972). Postnatal Development of the Cerebellar Cortex in the Rat: III. Maturation of the components of the granular layer. *Journal Comparative Neurology*. 145: 465-514.
- Arsenio-Núñez, M. L., Sotelo, C. (1985). Development in the spino cerebral system in the postnatal rat. *Journal Comparative Neurology*. 237: 291-306.
- Ashwell, K. (1990). Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Developmental Brain Research*. 55: 219-230.
- Balázs, R., Jorgensen, O. S., Hack, N. (1988). N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience*. 27: 437-451.
- Balázs, R., Hack, N., Resink, A., Aronica, E., Van der Valk, J. B. F. (1992). Trophic effect of excitatory amino acids on differentiating granule cells: involvement of calcium and other second messengers. *Molecular Neuropharmacology*. 2: 203-206.
- Balázs, R., Gallo, V., Kingsbury, A. (1998). Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Developmental Brain Research*. 40: 269-279.
- Bloch, R., Pumplun, D. H. (1988). Molecular events in synaptogenesis: nerve-muscle adhesion and postsynaptic differentiation. *American Journal Physiology*. 254 (3): C345-64.
- Bradford, M. M. Sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*. 72: 248-254.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell Developmental Biology*. 15: 269-90.
- Burgoyne, R., Cambray-Deakin, M. (1988). The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Research Reviews*. 13: 77-101.
- Burgoyne, R., Graham, M. E., Cambray-Deakin, M. (1993). Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *Journal of Neurocytology*. 22: 689-695.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*. 326: 1-16.

D'Mello, S. R., Galli, C., Ciotti, T., Calissano, P. (1993). Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium : inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proceedings of the National Academy of Science. USA.* 90: 10989-10993.

Emerit, M. B., Riad, M., Hamon, M. (1992). Trophic effects of neurotransmitters during brain maturation. *Biological Neonate.* 62: 193-201.

Facchinetti, F., Ciani, E., Dall'Olio, R., Virgili, M., Contestabile, A., Fonnum, F. (1993). Structural, neurochemical and behavioural consequences of neonatal blockade of NMDA receptor through chronic treatment with CGP 39551 or MK-801. *Developmental Brain Research.* 74: 219-224.

Gallo, V., Kingsbury, A., Baláz, R., Jorgensen, O. (1987). The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *Journal of Neuroscience.* 7 (7): 2203-2213.

Garthwaite, G., Hajós, F., Garthwaite, J. (1986). Ionic requirements for neurotoxic effects of excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neuroscience.* 18 (2): 437-447.

Garthwaite, G., Yamini, Jr. B., Garthwaite, J. (1987). Selective loss of Purkinje and granular cell responsiveness to *N*-methyl-D-aspartate in rat cerebellum during development. *Developmental Brain Research.* 36: 288-292.

Germain, M., Affar, E. B., D'Amours, D., Dixit, V. M., Salvesen, G. S., Poirier, G. G. (1999). Cleavage of automodified Poly(ADP-ribose) Polymerase during apoptosis: evidence for involvement of caspase-7. *The Journal of Biological Chemistry.* 274 (40): 28379-28384.

Ghez, C., Thach, W. T. The cerebellum en Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (eds.). (2000). *Principles of Neural Science.* 4^a ed. McGraw-Hill, Inc. USA. pp. 832-852.

Goldowitz, D. Hamre, K. (1998). The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends in Neuroscience.* 21 (9): 375-382.

Gorman, A. M., Orrenius, S., Ceccatelli, S. (1995). Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *NeuroReport.* 9 (10): R49-R55.

Hallonet, M. E. R., Le Douarin, N. M. (1993). Tracing neuroepithelial cells of the mesencephalic and metencephalic alar plates during cerebellar ontogeny in quail-chick chimeras. *European Journal of Neuroscience.* 5: 1145-1155.

Harkmark, W. (1954). Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons: A morphological and experimental investigation on chick embryos. *Journal Comparative Neurology.* 100: 115-209.

Hatten, M. E., Heintz, N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annual Review of Neuroscience.* 18: 385-408.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407: 770-776.

Herrup, K., Kuemerle, B. (1997). The compartmentalization of the cerebellum. *Annual Review of Neuroscience*. 20: 61-90.

Humason, G. L. (1979). *Animal Tissue Techniques*. 4th ed. W. H. Freeman and Company. USA. pp 113.

Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T. I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J. W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 283: 70-74.

Ikonomidou, C., Bittigau, P., Koch, C., Genz, K., Hoerster, F., Felderhoff-Mueser, U., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J. W. (2001). Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochemical Pharmacology*. 62: 401-405.

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

Jessell, T. M., Sanes, J. R. The Induction and Patterning of the Nervous System en Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (eds.). (2000). *Principles of Neural Science*. 4th ed. McGraw-Hill, Inc. USA. pp. 1019-1040.

Johnston, M. V., Coyle, J. T. (1981). Development of the central neurotransmitter system. *Ciba Foundation Symposium*. 86: 251-270.

Kerr, J. F. R., Harmon, B. V. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective en Tomei, L. D., Cope, F. O. (eds.). (1991). *Apoptosis: The molecular basis of cell death* (Current Communications in cell and molecular biology. vol 3). Cold Spring Harbor Laboratori Press. USA. pp. 5-29.

Komuro, H., Rakic, P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*. 260 (5104): 95-7.

Koppel, H., Lewis, P. D., Patel, A. J. (1983). Cell death in the early granular layer of normal and undernourished rats: further observations, including estimates of rate of cell loss. *Cell Tissue Kinetic*. 16: 99-106.

Krueger, B. K., Burne, J. F., Raff, M. C. (1995). Evidence for large-scale astrocyte death in the developing cerebellum. *Journal of Neuroscience*. 15 (5): 3366-3374.

Kuida, K., Lippke, J. A., Ku, G., Harding, M. W., Livingston, D. J., Su, M. S., Flavell, R. A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 267 (5206): 2000-3.

Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 384: 368-372.

Kuida, K. (2000). Caspase-9. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 32 (2): 121-4.

Kwong, W. H., Chan, W. Y., Lee, K. K. H., Fan, M., Yew, D. T. (2000). Neurotransmitters, neuropeptides and calcium binding proteins in developing human cerebellum: a review. *The Histochemical Journal*. 32: 521-534.

Lance-Jones, C. (1982). Motoneuron cell death in the developing lumbar spinal cord of the mouse. *Developmental Brain Research*. 4: 473-79.

Lange, W. (1975). Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell and Tissue Research*. 157: 115-24.

Lauder, J. M., Han, V. K. M., Henderson, P., Verdoorn, T., Towle, A. C. (1986). Prenatal ontogeny of the GABAergic system in the rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience*. 19: 465-493.

Lauder, J. M. (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptor and second messengers. *Trends of Neuroscience*. 16: 233-240.

Mattson, M. P. (1988). Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Research Reviews*. 13: 179-212.

Mattson, M. P., Hauser, K.F. (1991). Spatial and temporal integration of neurotransmitter signals in the development of neural circuitry. *Neurochemistry International*. 19: 17-24.

Meier, E., Hertz, L. Schousboe, A. (1991). Neurotransmitters as developmental signals. *Neurochemistry International*. 19 (12): 1-15.

Millen, K. J., Millonig, J. H., Wingate, R. J. T., Alder, J., Hatten, M. E. (1999). Neurogenetics of the Cerebellar System. *Journal of Child Neurology*. 14 (9): 574-582.

Monti, B., Contestabile, A. (2000). Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. *European Journal of Neuroscience*. 12: 3117-3123.

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

Morán, J., Rivera-Gaxiola, M. (1992). Effect of potassium and N-Methyl-D-Aspartate on the aspartate aminotransferase activity in cultured cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience Research*. 33: 239-247.

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

Morán, J., Alavez, S., Rivera-Gaxiola, M., Valencia, A., Hurtado, S., (1999). Effect of NMDA antagonists on the activity of glutaminase and aspartate aminotransferase in the developing rat cerebellum. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 17 (1): 57-65.

Napieralski, J. A., Eisenman, L. M. (1993). Developmental analysis of external granule cell layer in the meander tail mutant mouse: do cerebellar microneurons have independent progenitors?. *Development Dynamics*. 197: 244-254.

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

Otero, R. A., Sotelo, C., Alvarado-Mallart, R.-M. (1993). Chick/quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of the origin and migration of cerebellar cells. *Journal Comparative Neurology*. 333: 597-615.

Pearce, I. A., Cambray-Deakin, M. A., Burgoyne, R. D. (1987). Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Letters*. 223: 143-7.

Rabacchi, S., Bailly, Y., Delhay-Bouchaud, N., Mariani, J. (1992). Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science*. 256: 1823-25.

de la Rosa, E. J., de Pablo, F. (2000). Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends in Neuroscience*. 23: 454-458.

Rossi, D. J., Slater, N. T. (1993). The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology*. 32 (11): 1239-1248.

Schilling, K. (2000). Lineage, development and morphogenesis of cerebellar interneurons. *Progress in Brain Research*. 124: 51-68.

Schwartz, J. P. (1992). Neurotransmitters as neurotrophic factors: a new set of functions. *International Review of Neurobiology*. 34: 1-23.

Sidman, R. L., Rakic, P. (1973). Neuronal migration with special reference to developing human brain: A review. *Brain Research*. 62: 1-35.

Smeyne, R. J., Goldowitz, D. (1989) Development and death of external granular layer cell in the weaver mouse cerebellum: a quantitative study. *Journal of Neuroscience*. 9: 1608-1620.

Shuey, D. L., Sadler, T. W., Tamir, H., Lauder, J. M. (1993). Serotonin and morphogenesis. *Anatomical Embryology*. 187: 75-85.

Tanaka, M., Marunouchi, T. (1998). Immunohistochemical analysis of developmental stage of external granular layer neurons which undergo apoptosis in postnatal rat cerebellum. *Neuroscience Letters*. 242: 85-88.

Tanaka, M., Sawada, M., Miura, M., Marunouchi, T. (1998). Insulin-like growth factor-1 analogue prevents apoptosis mediated through an interleukin-1 β converting enzyme (caspase-1)-like protease of cerebellar external granular layer neurons: developmental stage-specific mechanisms of neuronal cell death. *Neuroscience*. 84 (1): 89-100.

Tanaka, M., Momoi, T., Marunouchi, T. (2000). *In situ* detection of activated caspase-3 in apoptotic granule neurons in the developing cerebellum in slice cultures and in vivo. *Developmental Brain Research*. 121:223-228.

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

Wang, J., Lenardo, M. J. (2000). Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *Journal of Cell Science*. 113: 753-757.

White, L. D., Barone, Jr. S. (2001). Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. *Cell Death and Differentiation*. 8: 345-356.

Wingate, R. J., Hatten, M. E. (1999). The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development*. 126: 4395-4404.

Wingate, R. J. T. (2001). The rhombic lip and early cerebellar development. *Current Opinion in Neurobiology*. 11 (1): 82-88.

Wood, K. A., Dipasquale, B., Youle, R. J. (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.

Zhang, L., Goldman, J. E. (1996a). Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *Journal Comparative Neurology*. 370: 536-550.

Zhang, L., Goldman, J. E. (1996b). Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron*. 16: 47-54.