



**Universitat de Lleida**  
Departament de Ciències  
Mèdiques Bàsiques

**REGULACIÓN NEUROTRÓFICA DE LA SUPERVIVENCIA  
NEURONAL DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO:  
CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS  
DE TRANSDUCCIÓN IMPLICADOS**

César Sanz Rodríguez  
Lleida, diciembre de 1997

A mis padres y hermanos.

A Marian.

A mis amigos de la Unidad de Neurobiología Molecular.



**Universitat de Lleida**  
Departament de Ciències  
Mèdiques Bàsiques  
Av. Alcalde Rovira Roure, 44  
25198 LLEIDA  
Telf. 973-702403-702400  
FAX 973-702426

Memòria que presenta el llicenciat en Medicina i Cirurgia **César Sanz Rodríguez** per obtenir el grau de Doctor en Medicina i Cirurgia per la Universitat de Lleida.

El present treball ha estat realitzat baix la direcció del **Dr. Joan X. Comella Carnicé**, Professor Titular de Biologia Cel·lular de la Universitat de Lleida, del Grup de Neurobiologia Molecular del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida.

Vist i plau del Director de la Tesi

**Joan X. Comella Carnicé**

Lleida 1997



 **Washington**  
WASHINGTON · UNIVERSITY · IN · ST. LOUIS  
**School of Medicine**

The Edward Mallinckrodt  
Department of Molecular Biology  
and Pharmacology

December 17, 1994

Cesar Sanz-Rodriguez  
Rovira Roure 5-2-1  
Lleida, 25006  
SPAIN

Dear Cesar,

As we discussed on the phone, I have no objection to you using the work done in my lab last summer as a chapter in your Ph.D. thesis. The work was done almost completely by you and you were the driving force in the work, both conceptually and technically. I will be proud to have some of the work done in my lab included in your thesis.

If there is anything I or the lab can do to facilitate yours efforts, let us know.

Good luck and keep up the great work.

Sincerely yours,



Eugene M. Johnson, Jr.  
Professor

Washington University School of Medicine  
at Washington University Medical Center  
Campus Box 8103, 660 S. Euclid Ave.  
St. Louis, MO 63110  
(314) 362-7051 FAX: (314) 362-7058

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Joan X. Comella Carnicé, por su dedicación a la dirección de esta Tesis, por su confianza durante todo el tiempo que he trabajado a su lado, por las conversaciones que hemos mantenido y que me han permitido conocer su visión sobre la ciencia y, ante todo, por su amistad. Todo ello me ha permitido vivir con verdadera pasión todas las horas que he pasado en el Laboratorio.

Al Dr. Eugene M. Johnson, Jr., por haberme brindado la oportunidad de realizar una parte de esta Tesis en su Laboratorio en San Luís, por sus enseñanzas y por el estímulo y la inspiración que ha supuesto para mí haber trabajado a su lado.

Al Dr. Josep E. Esquerda Colell, porque una tarde de octubre de 1989 me ofreció la oportunidad de integrarme, en calidad de alumno interno, en la Unidad de Investigación Neurobiológica del *Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques*. De esa forma comenzó mi "idilio" con la muerte neuronal programada y sus mecanismos. Asimismo, por el ejemplo que me ha dado a través de su incondicional dedicación a la Ciencia.

A todos mis amigos y compañeros del *Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques* de la *Universitat de Lleida*, en especial a los miembros de la Unidad de Neurobiología Molecular: Rosa M. Soler, Montserrat Iglesias, Jacint Boix, Carme Espinet, Núria Llecha, Joaquim Egea, Víctor J. Yuste, Joaquim Egea y Eva Giné.

A todos mis amigos y compañeros del *Department of Molecular Biology and Pharmacology* de la *Washington University* en San Luís, Missouri, EE.UU., por su ayuda y colaboración. En especial, quiero mostrar mi gratitud a James L. Franklin y Robert S. Freeman.

A los Drs. Dionisio Martín Zanca y Elena Becker Barroso, del Instituto de Microbiología Bioquímica del C.S.I.C./Universidad de Salamanca, cuya colaboración ha sido muy valiosa en algunas fases de mi trabajo en la Unidad de Neurobiología Molecular.

A Xavier Calomarde, Patricia Osborne y Jennifer Colombo por su ayuda técnica en la realización de este trabajo.

Al *Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques* de la *Facultat de Medicina* de la *Universitat de Lleida*, por posibilitarme la realización de esta Tesis.

A mi familia, en especial a mis padres y a Marian, por su cariño, presencia y apoyo.

## **OBJETIVOS**

---

Uno de los grandes retos que afronta la Neurobiología moderna es el esclarecimiento de los mecanismos que regulan la cantidad de células asignadas durante el desarrollo embrionario a las poblaciones neuronales definitivas. El proceso de *muerte neuronal fisiológica* es uno de los principales mecanismos que determinan un ajuste correcto del número de neuronas. A través de la producción de cantidades limitantes de factores neurotróficos, los tejidos de inervación tienen una función esencial en la regulación de las poblaciones neuronales definitivas y, por tanto, de la *muerte neuronal fisiológica*. El estudio de este proceso de muerte celular programada en la población de las motoneuronas (MTN's) de la médula espinal constituye un reto especialmente atractivo. A diferencia de lo que ocurre con otras poblaciones neuronales, aún no se han tipificado con precisión las moléculas neurotróficas derivadas del músculo específicas para las MTN's.

Los objetivos de esta Tesis pueden ser agrupados en tres bloques:

1. Desarrollo de un modelo experimental de cultivo de MTN's de médula espinal del embrión de pollo. Hemos pretendido elaborar un modelo experimental de cultivo celular apto para el estudio de la muerte fisiológica durante el desarrollo embrionario de las MTN's espinales así como de las interacciones tróficas MTN-músculo. En primer lugar, hemos perfeccionado un método para aislar y cultivar una población pura de MTN's de la médula espinal del embrión de pollo. A continuación, hemos utilizado este sistema *in vitro* para caracterizar el proceso de muerte fisiológica de las MTN's como apoptótico y estudiar la dependencia de las MTN's, para su supervivencia, de las actividades tróficas presentes en el tejido muscular esquelético, así como los mecanismos implicados en la muerte de las MTN's por privación neurotrófica. Nos ha merecido



especial atención la participación del metabolismo de las pirimidinas en el control de la supervivencia de las MTN's embrionarias.

2. Estudio del patrón de expresión de receptores Trk en la población de MTN's espinales embrionarias, así como de la relevancia de la activación de los receptores Trk en la señalización de la supervivencia y diferenciación neuronal. Hemos caracterizado, a nivel proteico, el patrón de expresión de los diferentes receptores Trk en la población de MTN's espinales durante el período de muerte fisiológica. La obtención de esta información ha resultado ser muy útil a la hora de establecer una correlación de relevancia fisiológica con el patrón de expresión de los correspondientes ARNm's así como con la respuesta de supervivencia de las MTN's embrionarias a las diferentes neurotrofinas (NT's) conocidas. Por otra parte, hemos abordado la relación existente entre la autofosforilación y activación de los receptores Trk y la transducción de señales iniciada por las NT's. En concreto, tomando como modelo el receptor TrkA presente en la superficie de las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior del embrión de rata y de las células PC12, hemos investigado cómo se correlaciona la autofosforilación de TrkA a nivel de tirosinas inducida por el factor de crecimiento nervioso (NGF) con las respuestas de diferenciación y supervivencia neuronal.
  
3. Los mecanismos de la supervivencia neuronal mediada por  $Ca^{2+}$ . Aunque los factores neurotróficos son los principales determinantes de la supervivencia neuronal durante el período de *muerte neuronal fisiológica*, en los últimos años han aumentado las evidencias que demuestran la implicación en dicho fenómeno biológico de otros factores, como la actividad bioeléctrica. La despolarización crónica de la membrana celular con elevadas concentraciones de  $K^+$  en el medio de cultivo estimula la supervivencia de una larga lista de

poblaciones neuronales a través de un incremento mantenido de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático libre. Hemos realizado una aproximación al estudio de los mecanismos implicados en este fenómeno. En concreto, hemos examinado en varios tipos neuronales la posibilidad de que el  $\text{Ca}^{2+}$  estimule la supervivencia neuronal a través de la activación de proteínas con actividad tirosina kinasa (TK) citoplasmáticas.

## **GLOSARIO**

<b>ActD</b>	Actinomicina D	<b>DMEM</b>	Medio Eagle
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico		suplementado con sales según modificación de Earle
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario	<b>EDTA</b>	Tetraetilamonio disódico
<b>aPY</b>	Anti-fosfotirosina	<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>AraC</b>	Arabinósido de citosina	<b>ELA</b>	Esclerosis lateral amiotrófica
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>ERK</b>	Kinasa de regulación extracelular
<b>ARNm</b>	Acido ribonucleico mensajero	<b>FCS</b>	Suero bovino fetal
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato	<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico
<b>BAG-1</b>	Atanatógen 1 asociado a Bcl-2	<b>FGFa</b>	Factor de crecimiento fibroblástico ácido
<b>Bak</b>	Antagonista homólogo a Bcl-2	<b>FGFb</b>	Factor de crecimiento fibroblástico básico
<b>Bax</b>	Proteína X asociada a Bcl-2	<b>FGF-5</b>	Factor de crecimiento fibroblástico 5
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de cerebro	<b>GAP</b>	Proteína activadora de la actividad guanosina trifosfatasa
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina	<b>GAP-43</b>	Proteína de 43 kDa asociada al crecimiento superior
<b>CaM-BP100</b>	Proteína de unión a la calmodulina de 100 kDa	<b>GCS</b>	Ganglio cervical superior
<b>CaMK-I</b>	Kinasa dependiente de calmodulina tipo I	<b>G-CSF</b>	Factor estimulador de colonias granulocítico
<b>CaMK-II</b>	Kinasa dependiente de calmodulina tipo II	<b>GDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de la glía
<b>cAMP</b>	Adenosina monofosfato cíclico	<b>GDNFR</b>	Receptor del GDNF
<b>CAMP</b>	Camptotecina	<b>GDNFR<math>\alpha</math></b>	Subunidad $\alpha$ del GDNFR
<b>CAPK</b>	Proteína kinasa activada por ceramida	<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>CAPP</b>	Proteína fosfatasa activada por ceramida	<b>GFAP</b>	Proteína fibrilar de la glía
<b>CDF</b>	Factor de diferenciación colinérgica	<b>GHEBS</b>	Tampón de disección para el aislamiento de MTN's
<b>Cdk</b>	Proteína kinasa dependiente de ciclina	<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias granulocítico-monocítico
<b>cGMP</b>	Guanosina monofosfato cíclico	<b>GPA</b>	Actividad promotora de crecimiento
<b>ChAT</b>	Colina acetil transferasa	<b>GPARG</b>	Receptor de la GPA
<b>ChDF</b>	Factor de desarrollo colinérgico	<b>GPARG<math>\alpha</math></b>	Subunidad $\alpha$ del GPARG
<b>CHX</b>	Cicloheximida	<b>GPI</b>	Puente glicosil-fosfatidilinositol
<b>CNTF</b>	Factor neurotrófico ciliar	<b>GRF</b>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
<b>CNTFR</b>	Receptor del CNTF	<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>CNTFR<math>\alpha</math></b>	Subunidad $\alpha$ del CNTFR	<b>Herb-A</b>	Herbimicina A
<b>CORD</b>	Cordicepina		
<b>CT-1</b>	Cardiotrofina 1		
<b>DAG</b>	Diacilglicerol		
<b>db-cAMP</b>	dibutilil-cAMP		
<b>dC</b>	2'-Deoxicidina		
<b>dCTP</b>	2'-Deoxicidina trifosfato		
<b>Depr</b>	Deprivado de MEX		

<b>HIHS</b>	Suero de caballo termoinactivado	<b>NBTI</b>	Nitrobenziltioinosina
<b>HS</b>	Suero de caballo	<b>N-CAM</b>	Molécula de adhesión celular neurógena
<b>hsp70</b>	Proteína de shock térmico de 70 kDa	<b>NFκB</b>	Factor transcripcional NFκB
<b>ICE</b>	Enzima conversor de la interleukina 1β	<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento insulinoide	<b>NPY</b>	Neuropéptido Y
<b>IGF-I</b>	Factor de crecimiento insulinoide I	<b>NT</b>	Neurotrofina
<b>IGF-II</b>	Factor de crecimiento insulinoide II	<b>NT-3</b>	Neurotrofina 3
<b>IκB</b>	Subunidad inhibidora de NFκB	<b>NT-4</b>	Neurotrofina 4
<b>IL-6</b>	Interleukina 6	<b>NT-4/5</b>	Neurotrofina 4/5
<b>IP</b>	Fosfatidilinositol	<b>NT-5</b>	Neurotrofina 5
<b>IP4P</b>	Fosfatidilinositol 4-fosfato	<b>NT-6</b>	Neurotrofina 6
<b>IP4,5P</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato	<b>PADPRP</b>	Poli(ADP-ribosa) polimerasa
<b>IP1,4,5P</b>	Fosfatidilinositol 1,4,5-trisfosfato	<b>pb</b>	Pares de bases
<b>IPG</b>	Inositol fosfoglicano	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa
<b>IRS-1</b>	Substrato 1 del receptor de la insulina	<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>JNK</b>	Kinasa N-terminal de c-Jun	<b>PDGF-α</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas α
<b>kDa</b>	Kilodalton	<b>PDGF-β</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas β
<b>kpb</b>	Kilopares de bases	<b>pl</b>	Punto isoeléctrico
<b>L15-bic</b>	Medio de cultivo L15 suplementado con HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<b>PI-3K</b>	Fosfoinositol-3 kinasa
<b>L15H</b>	Medio de cultivo L15 suplementado con HIHS	<b>PKA</b>	Proteína kinasa A ó dependiente de cAMP
<b>LIF</b>	Factor inhibidor de la leucemia	<b>PKC</b>	Proteína kinasa C
<b>LIFR</b>	Receptor del LIF	<b>PKN</b>	Proteína kinasa N
<b>LIFRα</b>	Subunidad α del LIFR	<b>PLC-γ</b>	Fosfolipasa C-γ
<b>LIFRβ</b>	Subunidad β del LIFR	<b>PMA</b>	12-O-Tetradecanoil-forbol-13-acetato
<b>MAP</b>	Proteína asociada a microtúbulos	<b>pRb</b>	Proteína del retinoblastoma
<b>MAPK</b>	Proteína kinasa activada por mitógenos	<b>PTP1D</b>	Fosfatasa fosfotirosínica 1D
<b>MARCKS</b>	Substrato de la PKC miristoilado rico en residuos de alanina	<b>ROR</b>	Radical de oxígeno reactivo
<b>MEK</b>	MAPK kinasa	<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de acrilamida bajo condiciones desnaturalizantes
<b>MEX</b>	Extracto de músculo esquelético	<b>SH2</b>	Dominio de homología con Src tipo 2
<b>MTA</b>	Metil-5'-tioadenosina	<b>SH3</b>	Dominio de homología con Src tipo 3
<b>MTN</b>	Motoneurona	<b>SMP</b>	Proteína de migración lenta
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido	<b>SN</b>	Sistema nervioso
<b>NAIP</b>	Proteína inhibidora de la apoptosis neuronal	<b>SNA</b>	Sistema nervioso autónomo
		<b>SNC</b>	Sistema nervioso central

<b>SNE</b>	Sistema nervioso entérico	<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico	<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>SNS</b>	Sistema nervioso simpático	<b>TK</b>	Tirosina kinasa
<b>SNT</b>	Diana asociada a su de fosforilación a nivel de residuos de tirosina inducida por factor neurotrófico	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa	<b>TRPM-2</b>	Mensaje 2 prostático inhibido por la testosterona
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético	<b>Tyr</b>	Residuo de tirosina
		<b>UV</b>	Ultravioleta
		<b>2-AP</b>	2-Aminopurina
		<b>6-TG</b>	6-Tioguanina

## **PUBLICACIONES Y CONGRESOS**

A continuación, se enumeran los diferentes artículos y comunicaciones a congresos en los que se ha traducido el trabajo que integra esta Tesis Doctoral:

## ARTÍCULOS

**Comella JX<sup>+</sup>, Sanz-Rodríguez C<sup>+</sup>, Aldea M, Esquerda JE.** 1994. Skeletal muscle-derived trophic factors prevent motoneurons from entering an active cell death program *in vitro*. *Journal of Neuroscience* 14:2674-2686. (+, ambos autores deben ser considerados primeros autores).

**Comella JX, Soler RM, Iglesias M, Sanz-Rodríguez C, Esquerda JE.** 1995. Cultivo de neuronas colinérgicas y su aplicación al estudio de las interacciones tróficas en el sistema neuromuscular. En: *Bases experimentales para el estudio del Sistema Nervioso*, eds. JA Armengol, FJ Miñano, Vol. 2, pp. 541-563. Sevilla: Ediciones de la Universidad de Sevilla.

**Franklin JL, Sanz-Rodríguez C, Juhasz A, Deckwerth TL, Johnson EM Jr.** 1995. Chronic depolarization prevents programmed death of sympathetic neurons *in vitro* but does not support growth: requirement for Ca<sup>2+</sup> influx but not Trk activation. *Journal of Neuroscience* 15:643-644.

**Sanz-Rodríguez C, Boix J, Comella JX.** 1997. Cytosine arabinoside is neurotoxic to chick embryo spinal cord motoneurons in culture. *Neuroscience Letters* 233:141-144.

**Soler RM, Egea J, Mintenig GM, Sanz-Rodríguez C, Iglesias M, Boix J, Comella JX.** 1998. Calmodulin is involved in membrane depolarization-mediated survival of motoneurons by PI-3 kinase and Ras/MAPK independent pathways. *Journal of Neuroscience*, en proceso de revisión.

**Becker E, Soler RM, Giné E, Sanz-Rodríguez C, Egea J, Martin-Zanca D, Comella JX.** 1998. Development of survival responsiveness to BDNF, NT3 and NT4/5, but not to NGF, in cultured motoneurons from chick embryo spinal cord. *Journal of Neuroscience*, en proceso de revisión.

**Sanz-Rodríguez C, Franklin JL, Johnson EM Jr.** 1998. NGF-induced tyrosine phosphorylation of the Trk receptor: correlation with neuronal survival and differentiation. *Journal of Neurochemistry*, en proceso de revisión.



## Skeletal Muscle–derived Trophic Factors Prevent Motoneurons from Entering an Active Cell Death Program *in vitro*

Joan X. Comella, Cesar Sanz-Rodriguez, Marti Aldea, and Josep E. Esquerda

Unit of Neuromuscular Research, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, E-25006 Lleida, Spain

The purpose of the experiments reported here is to provide evidence that motoneurons (MTNs) isolated from chick embryo spinal cords go through an active process of cell death when deprived of trophic support *in vitro*. In order to analyze and characterize this process, MTNs were isolated with a metrizamide gradient technique and cultured in the presence of saturating concentrations of soluble muscle extract. When muscle extract was washed off from the cultures, MTNs entered a process of cell death that could be blocked with inhibitors of mRNA and protein synthesis. Two other additional criteria were used to define this process as an active one. First, ultrastructural analysis of MTNs dying as a consequence of muscle extract deprivation showed that some, but not all, of the MTNs displayed clear signs of apoptotic cell death. Those included cytoplasm condensation, fragmentation of chromatin, and preservation of cytoplasmic organelles. Second, internucleosomal degradation of DNA was detected in MTNs deprived of muscle extract. When DNA was analyzed by Southern hybridization techniques using digoxigenin-labeled genomic probes, a clear ladder pattern could be identified on muscle extract–deprived MTNs. The degradation of DNA upon trophic deprivation could be prevented by cycloheximide (CHX). In an attempt to characterize further the process of active cell death in MTNs, we found a time point of commitment to cell death of ~10 hr by using three different approaches: muscle extract deprivation plus readdition of muscle extract, muscle extract deprivation plus addition of CHX, and muscle extract deprivation plus addition of actinomycin D. Moreover, we show that MTNs deprived of trophic support from muscle extract but maintained alive with CHX could not be rescued from cell death by readding muscle extract if CHX was washed off the cultures within the first 15 hr of muscle extract deprivation. However, muscle extract alone was able to rescue MTNs that had been

kept alive with CHX for periods of time longer than 24 hr after muscle extract deprivation. From these results we postulate that the activation of the cell death program after trophic deprivation is transient.

**[Key words: motoneuron, neurotrophic factors, apoptosis, programmed cell death, neuronal death, protein synthesis inhibitors]**

During embryonic development, most neuronal populations undergo a process referred to as natural or programmed cell death in which about half of neurons die (reviewed by Oppenheim, 1991). For motoneurons (MTNs) of the lumbar spinal cord of chick embryos, this process takes place in a defined period of time [embryonic days 6–10 (E6–E10)] coincident with synaptogenesis between motor nerve terminals and muscle cells and with the beginning of neuromuscular activity (Hamburger, 1975; Oppenheim and Heaton, 1975). It is now clear that neuronal populations depend on specific neurotrophic factors to survive (Barde, 1989). Death of neurons during development seems to result from the failure to obtain sufficient amounts of a neurotrophic molecule from their territory of innervation, either because of the limited quantities of factor produced and released by target tissue or because of the inability of neurons to gain access to the factor (Oppenheim, 1989; Snider and Johnson, 1989). The most extensively studied neurotrophic factor is NGF, a molecule that supports survival *in vivo* and *in vitro* of sympathetic neurons, some sensory neurons, and certain cholinergic neurons of the CNS (Ebendal, 1992).

Recently, several groups have demonstrated that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT-3) are able to support the survival of MTNs. BDNF rescues MTNs from death induced by facial (Sendtner et al., 1992; Koliatsos et al., 1993) or sciatic (Yan et al., 1992) nerve lesions in neonatal rats. The effect of BDNF on rescuing MTNs of the facial nucleus after nerve lesion was also observed with NT-3, although greater doses were needed (Sendtner et al., 1992). Moreover, BDNF was able to rescue chick MTNs from naturally occurring death *in vivo* (Oppenheim et al., 1992). Finally, several members of the neurotrophin family that include BDNF, NT-3, and NT-5 have been shown to be neurotrophic for cultured embryonic rat MTNs at picomolar concentrations (Henderson et al., 1993).

Muscle is the natural target or innervating tissue for MTNs and it has been demonstrated that MTNs can be rescued from death, both *in vitro* (Dohrmann et al., 1986; Tanaka, 1987; Martinou et al., 1989; Bloch-Gallego, 1991) and *in vivo* (Oppenheim et al., 1988; McManaman et al., 1990; Houenou et al., 1991) by crude or partially purified muscle extracts. Although

Received Mar. 25, 1993; revised Oct. 11, 1993; accepted Oct. 19, 1993.

J.X.C. and C.S.R. contributed equally to the elaboration of this work. We acknowledge the contribution of Anna Buj-Bello to the initial phases of this work, and we thank Dr. Eugene M. Johnson, Jr., and colleagues of our department for the critical reading of the manuscript. We also thank Dr. C. E. Henderson, CNRS-INSERM, Montpellier, France, for providing laminin and anti-SC1 monoclonal antibody, and Dr. M. Epstein, University of Wisconsin, for donating anti-ChAT antiserum. We are grateful to Xavier Calomarde for helping with photographic work. This work was funded by the Ministerio de Educación y Ciencia (Grant PB90-0504) and Ajuntament de Lleida.

Correspondence should be addressed to Joan X. Comella, Unit of Neuromuscular Research, Departament Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Rovira Roure 44, E-25006 Lleida, Spain.

Copyright © 1994 Society for Neuroscience 0270-6474/94/142674-13\$05.00/0

# CULTIVO DE NEURONAS COLINÉRGICAS Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES TRÓFICAS EN EL SISTEMA NEUROMUSCULAR

J.X.Comella, R.M.Soler, M.Iglesias, C.Sanz-Rodríguez y J.E.Esquerda

*Unitat de Recerca Neuromuscular, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina de Lleida. Universitat de Barcelona*

## 1. INTRODUCCIÓN

Los orígenes de las técnicas de cultivo de neuronas se remontan a la primera década de nuestro siglo. En 1910, G. Harrison logró, por vez primera, crecer fragmentos de tejido nervioso procedentes de médula espinal de rana, embebidos en una gota de linfa coagulada<sup>11</sup>. Con este sencillo y elegante sistema experimental, Harrison pudo observar directamente la formación y crecimiento de fibras nerviosas a partir de neuroblastos, zanjando definitivamente la polémica sobre el origen de la fibras nerviosas en favor de los conceptos anteriormente defendidos por Ramón y Cajal. Harrison además realizó importantes observaciones como la contracción espontánea de las fibras musculares cuando éstas eran cultivadas conjuntamente con fragmentos de médula espinal<sup>10</sup>.

Algunos años mas tarde, Maximow perfeccionó las técnicas de cultivo celular e introdujo los términos *histiotípico* para describir el crecimiento difuso de uno o varios tipos celulares, y *organotípico* para designar un crecimiento organizado que implica tanto diferenciación histológica como citológica<sup>17</sup>.

Actualmente, en el contexto neurobiológico, se utiliza el termino organotípico para describir el cultivo de tejido nervioso en el que se observa un proceso de diferenciación *normal* después de ser aislado del organismo. En estos cultivos se mantienen las relaciones ordenadas entre los diversos tipos neuronales y gliales así como las conexiones sinápticas que definen grupos particulares de neuronas, formando circuitos sinápticos.

## Chronic Depolarization Prevents Programmed Death of Sympathetic Neurons *in vitro* but Does Not Support Growth: Requirement for $\text{Ca}^{2+}$ Influx but Not Trk Activation

James L. Franklin, Cesar Sanz-Rodriguez,<sup>a</sup> Anna Juhasz,<sup>b</sup> Thomas L. Deckwerth, and Eugene M. Johnson, Jr.  
Department of Molecular Biology and Pharmacology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110

Continuous exposure of many types of neurons in cell culture to elevated concentrations of  $\text{K}^+$  greatly enhances their survival. This effect has been reported to be mediated by a sustained rise of cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration caused by influx of  $\text{Ca}^{2+}$  through voltage-gated channels activated by  $\text{K}^+$ -induced chronic depolarization. In this report we investigate the effects of elevated  $\text{K}^+$  on the programmed death that embryonic rat sympathetic neurons undergo in culture when deprived of NGF. Elevated  $\text{K}^+$  in the culture medium did not significantly prevent death of NGF-deprived cells until after the third day following plating of embryonic day 21 neurons. On the fifth day after plating, incrementally increasing  $\text{K}^+$  concentrations in the culture medium from 5 to 100 mM caused chronic depolarization of neurons and had a biphasic effect on survival of NGF-deprived cells. Enhanced survival was steeply related to membrane potential, increasing from no enhanced survival in cells held at potentials between  $-51$  and  $-34$  mV to 90–100% of control survival at about  $-21$  mV. At potentials positive to  $-21$  mV, survival decreased. Associated with the chronic depolarization was a sustained rise of steady-state free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration that showed a biphasic relationship to membrane potential roughly similar to that exhibited by survival. Steady-state  $\text{Ca}^{2+}$  concentration increased with increasingly lower membrane potentials to a peak at about  $-23$  mV (to  $\approx 240$  nM from  $\approx 40$  nM at about  $-51$  mV) and then decreased at more positive potentials. The elevation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was largely blocked by dihydropyridine and phenylalkylamine  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists and was potentiated by a dihydropyridine  $\text{Ca}^{2+}$  channel agonist. Neither the rise of  $\text{Ca}^{2+}$ , or survival was affected by the  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin. Therefore, the  $\text{Ca}^{2+}$  elevation was probably caused by  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type, but not N-type, chan-

nels. Antagonists of L channels blocked both survival and the sustained increase of steady-state free  $\text{Ca}^{2+}$  at similar concentrations, suggesting that the relevant factor determining survival of depolarized cells was  $\text{Ca}^{2+}$  influx rather than some other effect of depolarization. Surprisingly, however, there was no clear correlation between the sustained rise of  $\text{Ca}^{2+}$  and survival. Some membrane potentials that induced similar increases of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration produced widely different levels of survival. While chronic depolarization promoted survival of neurons in the absence of NGF, cells supported in this manner showed little growth as measured by neurite extension, total cellular protein, and mean somal diameter.

Compounds commonly used as calmodulin antagonists blocked survival of depolarized cells at concentrations that did not affect survival of cells maintained in NGF. However, these antagonists appeared to block survival by inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  influx rather than through an effect on calmodulin. Exposure to NGF, but not depolarization without NGF, caused activation of the tyrosine kinase activity of Trk, suggesting that depolarization does not promote survival by activating Trk. Both NGF and depolarization caused tyrosine phosphorylation of a protein with a molecular weight of about 44 kDa that may be an extracellular signal-regulated protein kinase (ERK).

These data show that increased  $\text{Ca}^{2+}$  influx induced by chronic depolarization can substitute for trophic factors in promoting survival of sympathetic neurons that would otherwise undergo programmed death. The data also demonstrate that the relationship between intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and survival in depolarized neurons is not as straightforward as previously supposed. Additionally, these results suggest that  $\text{Ca}^{2+}$  may promote neuronal survival by activating tyrosine kinases downstream from receptor tyrosine kinases and that the signal transduction pathways for growth and survival are separate.

**[Key words: programmed cell death, NGF, neuronal calcium, apoptosis, tyrosine kinases, Trk]**

Massive cell death occurs as a part of the normal development of the vertebrate nervous system (Oppenheim, 1991). Depending on the neuronal population, approximately 20–80% of the neurons produced during neurogenesis die before or shortly after birth. A primary purpose of this death is thought to be attainment of an appropriate match between the amount of innervation of a neuronal target and the target size. Availability of neurotrophic substances provided by target and other tissues

Received Dec. 20, 1993; revised May 20, 1994; accepted June 29, 1994.

We thank Ms. Jeany Colombo for technical assistance, Dr. Steven Rothman for providing  $\text{Ca}^{2+}$  measurement equipment, Dr. Brenda Shivers of Parke-Davis for the gift of  $\omega$ -conotoxin, and Dr. William Mobley of the University of California at San Francisco for providing the Trk antibody. Drs. Douglas Creedon, Steven Estus, David Fickbohm, Alan Willard, and Ms. Patricia Osborne provided helpful criticisms of the manuscript. This work was supported by grants from the Ronald McDonald Foundation (E.M.J.) and Amgen (J.L.F.).

Correspondence should be addressed to James L. Franklin, Department of Molecular Biology and Pharmacology, Washington University School of Medicine, Box 8103, 660 South Euclid Avenue, St. Louis, MO 63110.

<sup>a</sup> Present address: Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá de Henares, Campus Universitario, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>b</sup> Present address: Department of Neurology and Psychiatry, Box 397, University of Szeged, Szeged, Hungary H-6701.

Copyright © 1995 Society for Neuroscience 0270-6474/95/150643-22\$05.00/0



## Cytosine arabinoside is neurotoxic to chick embryo spinal cord motoneurons in culture

Cesar Sanz-Rodriguez<sup>1</sup>, Jacint Boix, Joan X. Comella\*

*Unitat de Neurobiologia Molecular, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Rovira Roure 44, 25198 Lleida, Spain*

Received 23 December 1996; revised version received 22 January 1997; accepted 22 January 1997

### Abstract

Cytosine arabinoside (1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine, AraC) is a commonly used antimetabolic agent that kills proliferating cells by inhibiting DNA synthesis. We report that AraC is toxic to cultured chick embryo spinal cord motoneurons (MTNs) in a concentration-dependent fashion with an EC<sub>50</sub> of about 2  $\mu$ M. Interestingly, this type of MTN death is specific, resembles that occurring upon muscle extract (MEX) trophic deprivation regarding its morphological and temporal characteristics, and has apoptotic features, as judged by observation of nuclear morphology. The death of AraC-treated MTNs can be blocked by 2'-deoxycytidine (dC), a pyrimidine metabolite AraC is structurally related to. Overall, these findings suggest that dC may participate in a pathway, different from inhibition of DNA synthesis, that is necessary for cultured MTNs to respond to the trophic activities present in MEX. © 1997 Elsevier Science Ireland Ltd.

**Keywords:** Motoneurons; Muscle extract; Cytosine arabinoside; Cell death; Apoptosis; Nitrobenzylthioinosine; 2'-Deoxycytidine

Cytosine arabinoside (1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine, AraC) is a pyrimidine antimetabolite structurally related to 2'-deoxycytidine (dC). It is a useful tool to selectively kill dividing cells, since it may be incorporated into DNA, thus causing inhibition of DNA synthesis [7]. Indeed, AraC is widely used in tissue culture of non-mitotic cells to eliminate proliferating cells, such as fibroblasts or glia, as well as a chemotherapeutic agent for certain lymphoproliferative disorders. Yet, AraC may also affect certain non-dividing cells. *In vitro*, AraC is more toxic to neurons than other antimetabolic drugs [1,11]. Moreover, cancer patients treated with AraC can present with central and peripheral nervous system degeneration [6,10]. Several researchers have used *in vitro* models to examine the mechanisms underlying the neurotoxicity of AraC. This drug blocks specifically the survival *in vitro* of postmitotic parasymphathetic, sympathetic, and sensory neurons stimu-

lated by neurotrophic factors [8,12,15] as well as of cerebellar neurons [3]. The neuronal death induced by AraC is apoptotic [3,8,12], in agreement with what has been reported for other cell types [5,9]. AraC appears to exert its neurotoxic effect by interfering with a dC-dependent step included in neurotrophic factor signalling pathways, which is independent of DNA synthesis or repair [8,15]. In this study, we investigated whether AraC is also neurotoxic to postmitotic spinal cord motoneurons (MTNs).

MTNs were purified from 5.5-day-old chick embryos (COPAGA, Spain) as previously reported [2]. First, spinal cord MTNs that had been cultured for 24 h in the presence of muscle extract (MEX), were treated with varying concentrations (10 nM–100  $\mu$ M) of AraC while in the presence of MEX for 5 additional days. Both MTN survival and morphological changes occurring during the experiment were assessed in detail. At very high concentrations of AraC (100  $\mu$ M), MTNs degenerated very rapidly while swelling and accumulating vacuoles, in what clearly looked like a dose-related and non-specific toxic effect. However, at concentrations of AraC ranging from 10 nM to 10  $\mu$ M, no changes were observed in the exposed cul-

\* Corresponding author. Tel.: +34 73 702438; fax: +34 73 702426; e-mail: joan.comella@cmb.udl.es

<sup>1</sup> Present address: Servicio de Hematología, Hospital Universitario de la Princesa, 28006 Madrid, Spain.

## COMUNICACIONES A CONGRESOS

**Comella JX, Buj AM, Sanz-Rodríguez C, Esquerda JE.** Growth of motoneurons isolated from chick embryo spinal cord on muscle cryostat sections. Congreso: *4ème Colloque National sur les Maladies Neuromusculaires, Association Française contre les Myopathies*; Montpellier, Francia, 24-28 junio 1991.

**Comella JX, Sanz-Rodríguez C, Esquerda JE.** Changes in chick muscle extract-trophic activity for cultured motoneurons throughout development and in tubocurarine-treated embryos. Congreso: *9th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience*; La Grand Motte, Francia, 14-18 junio 1992.

**Sanz-Rodríguez C, Comella JX, Esquerda JE.** Synthesis of new macromolecules is needed for motoneurons to die after trophic deprivation *in vitro*. Congreso: *9th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience*; La Grand Motte, Francia, 14-18 junio 1992.

**Comella JX, Sanz-Rodríguez C, Esquerda JE.** Inhibitors of protein and RNA synthesis prevent motoneuron cell death after trophic deprivation *in vitro*. Congreso: *1992 Annual Meeting of the Society for Neuroscience*; Anaheim, California, EE.UU., 25-30 octubre 1992. (Abstracto publicado en *Society for Neuroscience Abstracts*. 1992. 1(31.7):51).

**Franklin JL, Sanz-Rodríguez C, Juhasz A, Johnson EM Jr.** Differential effects of NGF and chronic depolarization on the survival and neurite outgrowth of sympathetic neurons in culture. Congreso: *1993 Annual Meeting of the Society for Neuroscience*; Washington, D.C., EE.UU., 7-12 noviembre 1993. (Abstracto publicado en *Society for Neuroscience Abstracts*. 1993. 1(187.13):442).

**Comella JX, Soler RM, Sanz-Rodríguez C, Ichart X, Yuste V, Boix J, Fibla J, Iglesias M, Giné E, Esquerda JE.** Apoptotic neuronal death in cultured spinal cord motoneurons. Congreso: *18th Gif Lecture in Neurobiology*; Gif-sur-Yvette, Francia, 9-10 diciembre 1993.

**Sanz-Rodríguez C, Giné E, Becker E, Soler RM, Esquerda JE, Martín-Zanca D, Comella JX.** Adquisición de dependencia neurotrófica a neurotrofina 3 (NT-3) de motoneuronas de médula espinal de embrión de pollo *in vitro*. Congreso: *Vº Congreso Nacional de la Sociedad Española de Biología Celular*, Badajoz, 14-17 diciembre 1993.

**Becker E, Soler RM, Sanz-Rodríguez C, Martín-Zanca D, Comella JX.** Adquisición *in vitro* de respuesta a BDNF y NT3 en motoneuronas espinales de embrión de pollo. Congreso: *VIº Congreso de la Sociedad*

*Española de Neurociencias*; Valladolid, 2-6 julio 1995. (Abstracto publicado en *Revista de Neurología*. 1995. 23(separata):600).

**Soler RM, Becker E, Sanz-Rodríguez C, Martín-Zanca D, Comella JX.** Respuesta funcional a neurotrofinas de las motoneuronas de embrión de pollo en cultivo. Congreso: *VIº Congreso Nacional de la Sociedad Española de Biología Celular*, Lleida, 19-22 septiembre 1995.

**Comella JX, Soler RM, Egea J, Giné E, Sanz-Rodríguez C.** High potassium increases survival of motoneurons from chick embryo spinal cord through a calmodulin-dependent mechanism. Congreso: *1996 Annual Meeting of the Society for Neuroscience*; Washington, D.C., EE.UU., 11-16 noviembre 1996. (Abstracto publicado en *Society for Neuroscience Abstracts*. 1996. 2(587.10):1477).

**Sanz-Rodríguez C, Johnson EM Jr, Franklin JL.** Effects of tyrosine kinase antagonists of NGF-induced survival and activation of TrkA in sympathetic neurons. Congreso: *1996 Annual Meeting of the Society for Neuroscience*; Washington, D.C., EE.UU., 11-16 noviembre 1996. (Abstracto publicado en *Society for Neuroscience Abstracts*. 1996. 1(227.8):562).

## ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	.....	1
<b>1. LA MUERTE NEURONAL FISIOLÓGICA</b>	.....	2
1.1 Definición de muerte neuronal fisiológica	.....	4
1.2 Las funciones biológicas de la muerte neuronal fisiológica	.....	5
1.3 La muerte neuronal fisiológica es un fenómeno generalizado	.....	7
1.4 La muerte neuronal fisiológica en la población de motoneuronas de la médula espinal	.....	9
1.5 La morfología de la muerte neuronal fisiológica	.....	12
1.6 La muerte neuronal fisiológica no está programada genéticamente	.....	14
1.7 Muerte neuronal fisiológica: un proceso dependiente del tejido periférico	.....	15
1.8 Influencias de las aferencias y de otras células no diana en la supervivencia neuronal	.....	20
1.9 La supervivencia neuronal está regulada por la actividad neuronal	.....	22
<b>2. LOS FACTORES NEUROTRÓFICOS</b>	.....	28
2.1 La Teoría Neurotrófica	.....	29
2.2 Las neurotrofinas	.....	33
2.2.1 El NGF	.....	33
2.2.1.1 El NGF y el sistema nervioso periférico	.....	36
2.2.1.2 El NGF y el sistema nervioso central	.....	39
2.2.2 El BDNF	.....	41
2.2.3 La NT-3	.....	43
2.2.4 La NT-4/5	.....	46
2.2.5 La NT-6	.....	47
2.2.6 La estructura de las neurotrofinas	.....	48
2.2.7 El GDNF	.....	49
2.3 Otros factores neurotróficos distintos de las neurotrofinas	.....	51
2.3.1 El CNTF	.....	51
2.3.2 El CDF/LIF	.....	54
2.3.3 Otros factores con actividad neurotrófica	.....	55
2.4 Los factores neurotróficos pueden favorecer la muerte neuronal	.....	57
2.5 Las motoneuronas y los factores neurotróficos	.....	58
2.5.1 El NGF	.....	61
2.5.2 El BDNF	.....	62
2.5.3 La NT-3	.....	63
2.5.4 La NT-4/5	.....	64



2.5.5	El GDNF	.....	64
2.5.6	El CNTF	.....	65
2.5.7	El CDF/LIF	.....	67
2.5.8	Los FGF's	.....	67
2.5.9	Los IGF-I y -II	.....	69
2.5.10	Los PDGF- $\alpha$ y - $\beta$ y la IL-6	.....	70
2.5.11	El TGF $\beta$	.....	70
2.5.12	La cardiotrofina 1	.....	70
<b>3.</b>	<b>LOS RECEPTORES DE LAS NEUROTROFINAS Y SUS MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL NEUROTRÓFICA</b>	.....	<b>72</b>
3.1	Las propiedades moleculares de los dos tipos de receptores de las neurotrofinas	.....	73
3.1.1	El receptor de baja afinidad	.....	73
3.1.2	Los receptores de alta afinidad	.....	75
3.1.2.1	El receptor TrkA	.....	75
3.1.2.2	El receptor TrkB	.....	77
3.1.2.3	El receptor TrkC	.....	78
3.1.2.4	El receptor <i>Dtrk</i>	.....	79
3.1.2.5	El receptor TrkE	.....	81
3.1.2.6	La naturaleza molecular de los receptores de alta afinidad	.....	81
3.2	El patrón de expresión de los receptores de las neurotrofinas	.....	84
3.2.1	El receptor p75	.....	84
3.2.2	Los receptores Trk	.....	85
3.3	Las funciones biológicas de los receptores de las neurotrofinas	.....	89
3.3.1	Los receptores Trk	.....	89
3.3.2	El receptor p75	.....	92
3.4	El transporte retrógrado de las neurotrofinas	.....	96
3.5	Los efectos de las neurotrofinas a nivel intracelular	.....	98
3.6	La transducción de señales mediada por los receptores Trk	.....	101
3.6.1	La fosforilación de los receptores Trk	.....	101
3.6.2	La vía p21ras-MAPK	.....	105
3.6.2.1	Shc, Grb2/Sem-5 y mSOS	.....	105
3.6.2.2	p21ras	.....	107
3.6.2.2.1	El control de la actividad de p21ras por las GAP's y los GRF's	.....	108
3.6.2.2.2	La cascada de kinasas activada por p21ras	.....	109
3.6.3	Las vías independientes de p21ras	.....	111
3.6.3.1	La fosfolipasa C- $\gamma$	.....	111
3.6.3.2	La fosfatidilinositol-3 kinasa	.....	112

3.6.3.3	La proteína SNT	.....	114
3.6.3.4	La proteína kinasa C	.....	115
3.6.3.5	La proteína kinasa N	.....	118
3.6.3.6	La proteína kinasa A y el cAMP	.....	119
3.7	La transducción de señales mediada por el receptor p75	.....	120
3.8	La duración de la señal como un mecanismo adicional de transducción de señales	.....	122
3.9	El receptor del GDNF	.....	123
3.10	Los receptores del CNTF y del LIF	.....	125
<b>4.</b>	<b>LA TEORIA NEUROTRÓFICA DEL SIGLO XXI: NUEVOS CONCEPTOS Y ASPECTOS FISIOLÓGICOS</b>	.....	129
4.1	Las neurotrofinas y sus funciones fisiológicas: los experimentos de delección génica	.....	129
4.1.1	Los <i>knockouts</i> de NGF y TrkA: análisis de la función fisiológica del NGF	.....	131
4.1.2	Los <i>knockouts</i> de BDNF, NT-4/5 y TrkB: análisis de la función fisiológica del BDNF y de la NT-4/5	.....	134
4.1.3	Los <i>knockouts</i> de NT-3 y TrkC: análisis de la función fisiológica de la NT-3	.....	136
4.1.4	Los ratones deficitarios de p75	.....	138
4.1.5	¿Una sólo neurotrofina para cada población neuronal?	.....	139
4.1.6	¿Existe redundancia funcional entre los diferentes receptores Trk?	.....	140
4.1.7	Los circuitos neurotróficos autocrinos y paracrinos	.....	142
4.1.8	La Teoría de la Transición de los Requerimientos Neurotróficos	.....	144
4.1.9	La participación del CNTF y de moléculas CNTF-oides durante el desarrollo embrionario del Sistema Nervioso	.....	147
4.2	Los factores neurotróficos como factores de regeneración nerviosa	.....	148
<b>5.</b>	<b>LA HIPÓTESIS DEL CALCIO</b>	.....	152
5.1	La despolarización crónica bloquea la muerte neuronal <i>in vitro</i>	.....	153
5.2	La implicación de canales de Ca <sup>2+</sup> y la concentración de Ca <sup>2+</sup> intracelular en la supervivencia neuronal estimulada por la despolarización	.....	154
5.3	La Hipótesis del Reostato del Calcio	.....	155

<b>6.</b>	<b>EL PROCESO DE MUERTE NEURONAL FISIOLÓGICA ES APOPTÓTICO</b>	.....	158
6.1	La muerte neuronal fisiológica es apoptótica	.....	158
6.2	La muerte neuronal fisiológica es un proceso activo	.....	161
6.3	Apoptosis y fragmentación del ADN	.....	164
	6.3.1 La actividad endonucleásica en la apoptosis	.....	166
	6.3.2 La función de los fenómenos nucleolíticos en la apoptosis	.....	168
6.4	Los mecanismos moleculares de la muerte neuronal apoptótica	.....	169
	6.4.1 El <i>stress</i> oxidativo	.....	170
	6.4.2 La regulación de los niveles de Ca <sup>2+</sup> , la proteína kinasa C y el cAMP	.....	173
	6.4.3 El ciclo de la esfingomielina y la ceramida	.....	174
	6.4.4 El arabinósido de citosina y el metabolismo de los nucleótidos	.....	176
	6.4.5 La poli(ADP-ribosa) polimerasa	.....	177
	6.4.6 Los motivos octámeros	.....	178
6.5	El control genético de la apoptosis	.....	179
	6.5.1 Los genes de muerte celular y los genes supresores de la muerte celular en <i>Caenorhabditis elegans</i>	.....	180
	6.5.2 El protooncogén <i>bcl-2</i> y sus homólogos	.....	183
	6.5.2.1 La familia <i>bcl-2</i> y el control de la supervivencia neuronal	.....	186
	6.5.2.2 Mecanismos de acción de las proteínas de la familia <i>bcl-2</i>	.....	188
	6.5.3 Las cisteína proteasas: homólogos de <i>ced-3</i>	.....	191
	6.5.4 <i>reaper</i>	.....	192
	6.5.5 Factores transcripcionales: las familias <i>fos</i> y <i>jun</i>	.....	193
	6.5.6 Reguladores del ciclo celular	.....	195
	6.5.6.1 <i>c-myc</i>	.....	195
	6.5.6.2 p53	.....	196
	6.5.6.3 Las ciclinas y las proteína kinasas dependientes de ciclinas	.....	198
	6.5.6.4 La proteína del retinoblastoma	.....	201
	6.5.6.5 El factor transcripcional E2F	.....	202
	6.5.7 Otros genes aparentemente implicados en la apoptosis	.....	203
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	.....	205
7.1	Técnicas de cultivo celular	.....	206
	7.1.1 Generalidades	.....	206

7.1.2	Purificación de motoneuronas	.....	207
7.1.3	Cultivo celular de motoneuronas y ensayos de supervivencia	.....	208
7.1.3.1	Tratamiento de las placas de cultivo con poli-DL-ornitina y laminina	.....	209
7.1.3.2	Preparación del extracto muscular denervado	.....	209
7.1.4	Cultivo celular de neuronas simpáticas del ganglio cervical superior y ensayos de supervivencia y medición del crecimiento neurítico	.....	210
7.1.4.1	Tratamiento de las superficies de cultivo con sustrato colagénico	.....	213
7.1.5	Evaluación de la apoptosis neuronal	.....	213
7.1.6	Cultivo celular de células PC12	.....	214
7.2	Métodos morfológicos	.....	214
7.2.1	Microscopía óptica	.....	214
7.2.2	Morfometría	.....	215
7.2.3	Microscopía electrónica	.....	215
7.2.4	Inmunocitoquímica	.....	216
7.3	Técnicas de análisis bioquímico	.....	217
7.3.1	Cuantificación de la actividad colina acetiltransferasa	.....	217
7.3.2	Ensayos de inhibición de la síntesis de proteínas	.....	217
7.3.3	Detección de la fragmentación del ADN mediante la técnica de <i>Southern blotting</i>	.....	218
7.3.4	Ensayo de fosforilación a nivel de tirosinas	.....	219
7.4	Metodología general	.....	221
7.4.1	Reactivos y factores neurotróficos	.....	221
7.4.2	Material fotográfico	.....	222
7.4.3	Estadística	.....	223
7.4.4	Informática	.....	223

## **RESULTADOS** ..... 224

<b>8.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL FENÓMENO DE LA MUERTE FISIOLÓGICA DE LAS MOTONEURONAS ESPINALES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO</b>	.....	225
8.1	Proceso de purificación, evaluación del grado de pureza y procedimientos de cultivo	.....	225
8.2	La muerte de las motoneuronas por privación de extracto muscular es apoptótica	.....	230
8.3	Análisis ultraestructural de la muerte de las motoneuronas <i>in vitro</i>	.....	231

8.4	La inhibición de la función lisosómica no evita la muerte celular de las motoneuronas	.....	234
8.5	La muerte de las motoneuronas tras la privación trófica es un proceso activo	.....	235
8.6	Patrón escalonado de degradación del ADN en las motoneuronas en proceso de degeneración tras la privación trófica	.....	238
8.7	El "compromiso" letal de las motoneuronas privadas de extracto muscular	.....	239
8.8	El programa de muerte celular se activa de forma transitoria tras la privación trófica	.....	242
8.9	Participación del cAMP y de la PKA en la señalización de la supervivencia de las motoneuronas <i>in vitro</i>	.....	244
8.10	Participación de la PKC en la señalización de la supervivencia de las motoneuronas <i>in vitro</i>	.....	246
8.11	La fosforilación a nivel de residuos de tirosina de proteínas intracelulares es relevante para la supervivencia de las motoneuronas <i>in vitro</i>	.....	250
8.12	Implicación del <i>stress</i> oxidativo en la muerte de motoneuronas por privación trófica	.....	250
8.13	El arabinósido de citosina es neurotóxico para las motoneuronas espinales del embrión de pollo <i>in vitro</i>	.....	251
8.14	El arabinósido de citosina interfiere con un proceso dependiente de 2'-deoxicitidina	.....	256

<b>9.</b>	<b>EXPRESIÓN DE RECEPTORES Trk EN LA POBLACIÓN DE MOTONEURONAS ESPINALES EMBRIONARIAS: CORRELACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES Trk CON LA SEÑALIZACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y DIFERENCIACIÓN DE LAS NEURONAS</b>	.....	258
9.1	El anticuerpo 203 permite detectar y diferenciar los diferentes receptores Trk	.....	259
9.2	La activación de los receptores Trk comporta la fosforilación a nivel de residuos de tirosina de las MAPK's	.....	261
9.3	Las motoneuronas de la médula espinal del embrión de pollo presentan receptores TrkB y TrkC en su superficie	.....	261
9.4	La activación de los receptores TrkB y TrkC de las motoneuronas comporta la fosforilación a nivel de residuos de tirosina de las MAPK's	.....	263

9.5	Identificación de agentes farmacológicos con capacidad para inhibir la autofosforilación del receptor TrkA	.....	264
9.6	El efecto de los inhibidores de la autofosforilación del receptor TrkA varía con la duración de la exposición al NGF	.....	269
9.7	Los resultados hallados en células PC12 y en neuronas simpáticas muestran un alto grado de concordancia	.....	271
9.8	El K252-a y la herbimicina A, pero no la metil-5'-tioadenosina, bloquean el efecto promotor de la supervivencia del NGF	.....	272
9.9	La metil-5'-tioadenosina inhibe el crecimiento neurítico de las neuronas simpáticas	.....	278
<b>10.</b>	<b>MECANISMOS DE LA SUPERVIVENCIA NEURONAL MEDIADA POR Ca<sup>2+</sup>: ACTIVACIÓN DE LAS MAPK's</b>	.....	280
10.1	La despolarización crónica estimula la supervivencia de las motoneuronas espinales	.....	280
10.2	La despolarización induce la fosforilación a nivel de residuos de tirosina de las MAPK's	.....	283
	<b>DISCUSIÓN</b>	.....	286
11.1	Aislamiento de las motoneuronas espinales del embrión de pollo	.....	287
11.2	La muerte de las motoneuronas por privación de extracto muscular es apoptótica	.....	291
11.3	El programa de muerte celular se activa de forma transitoria tras la privación neurotrófica	.....	294
11.4	El arabinósido de citosina es neurotóxico para las motoneuronas espinales del embrión de pollo <i>in vitro</i>	.....	300
11.5	Las motoneuronas de la médula espinal del embrión de pollo presentan receptores TrkB y TrkC en su superficie	.....	303
11.6	La autofosforilación de los receptores Trk es necesaria para las respuestas de supervivencia y diferenciación neuronal, aunque de forma diferente	.....	307
11.7	Los mecanismos de la supervivencia neuronal mediada por Ca <sup>2+</sup>	.....	314
11.8	Los requerimientos neurotróficos de las motoneuronas	.....	318
11.9	Los factores neurotróficos y las enfermedades neurodegenerativas	.....	325

<b>CONCLUSIONES</b>	.....	328
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	.....	331