

Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Departamento de Biología Celular



Rol del receptor NMDA y el efecto del medio condicionado en el desarrollo de neuronas del hipocampo de ratas.

Por: Víctor Vivas.

Tutoría de: Dra. Lisbeth García.

Trabajo especial de grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Caracas, 14 de Octubre del 2015.

Índice

Índice	2
Lista de abreviaturas.....	3
Introducción.....	6
Regeneración neuronal en el SN de mamíferos.....	7
Neuronas del hipocampo.....	8
Polaridad neuronal.....	9
Polaridad neuronal, factores extracelulares y receptores.....	10
Polaridad neuronal y principales vías de señalización intracelulares.....	13
Receptores de glutamato.....	17
Receptor NMDA.....	18
Localización espacial y temporal de NMDAr en el SNC.....	20
Inhibidores del receptor NMDA.....	22
Antecedentes.....	23
Objetivos.....	26
Objetivo general:.....	26
Objetivos específicos:.....	26
Materiales y métodos.....	27
Obtención de medios condicionados.....	27
Cultivos Primarios de células del Hipocampo.....	28
Tratamiento para las neuronas del hipocampo.....	30
Inmunomarcaje de cultivos celulares.....	30
Análisis Morfométrico.....	32
Análisis estadístico.....	33
Resultados.....	35
Discusión.....	46
Conclusiones y recomendaciones.....	51
Referencias.....	52

Lista de abreviaturas.

Abreviaturas	
A23187	Ionóforo de calcio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AID	Grupo de genes reguladores de la actividad inhibitoria de muerte
Akt	Proteína quinasa B
AMPA	Molécula α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
AMPAr	Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
APC	Adenomatous polyposis coli
AsTs	Tipos de astrocitos
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
Ca ²⁺	Ión calcio
Cdc42	Proteína 42 del control de la división celular.
c-fos	Proto-oncogén celular
CO ₂	Dióxido de carbono
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPC
CRMP2	Proteína mediadora de respuesta a la colapsina 2
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
EGFR	Receptor del crecimiento epidérmico
ErbB	Familia de receptores de membrana
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GSK3	Proteína glicógeno sintasa quinasa
GTP	Guanosín trifosfato
HCl	Ácido clorhídrico

IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
I _{Na}	Corrientes de sodio
IP ₃	Inositol trifosfato
K ⁺	Ion potasio
Lingo	Glicoproteína de superficie rica en Leucina
LKB1	Proteína quinasa B1 del hígado
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MAG	Glicoproteína asociada a la mielina
MAP-2	Proteína asociada a los microtúbulos 2
MapK	Proteína quinasa mitogénica
MC	Medio neurobasal condicionado con nervio ciático
Mg ²⁺	Ion magnesio
MK-801	Inhibidor del NMDAr
Na ⁺	Ion sodio
NB	Medio neurobasal
NgCAM	Molécula de adhesión celular
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NgR	Receptor de NOGO
NMDA	Molécula N-metil-D-aspartato
NMDAr	Receptor N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa
NOGO	Inhibidor del crecimiento de las neuritas
NRGs	Proteínas neurregulinas
NRs	Subunidades del NMDAr
NT-3	Neurotrofina 3
Omgp	Glicoproteína de la mielina de oligodendrocito
p75	Receptor del factor del crecimiento nervioso

PC12	Línea celular de feocromocitoma
PDL	Poli-D-lisina
PDZ	Dominio de PSD95
Pen-Strep	Penicilina-Estreptomicina
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifostato
PirB	Receptor B parecido a Inmunoglobulinas pareadas
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PSDs	Proteína de densidades postsinápticas
Rac	Subfamilia de Rho
RE	Retículo endoplásmico
Rho	Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina
Rho-GDI	Inhibidor específico de disociación del nucleótido de guanina Rho
ROCK	Proteína quinasa asociada a Rho
RTN	Familia reticulón
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso central
Tau	Proteína asociada a los microtúbulos
TMs	Segmentos transmembrana
Trks	Receptores quinasa de tropomiosina
Troy	Miembro de la familia de receptores TNF

Introducción

Las neuronas son un tipo de células del sistema nervioso, cuya principal función es la transmisión de información, gracias a la excitabilidad eléctrica de su membrana plasmática. Están especializadas en la recepción de estímulos y en la conducción del impulso nervioso (en forma de potencial de acción) entre ellas o con otros tipos celulares como, por ejemplo, las fibras musculares de la placa motora. Altamente diferenciadas, la mayoría de las neuronas no se dividen una vez alcanzada su madurez; no obstante, una minoría sí lo hace. ¹ Las neuronas presentan unas características morfológicas típicas que determinan sus funciones: un cuerpo celular, llamado soma; una o varias prolongaciones cortas encargadas de transmitir impulsos hacia el soma celular, denominadas dendritas; y una prolongación usualmente más larga que las dendritas, denominada axón, la cual conducen los impulsos desde el soma hacia otra neurona u órgano diana. ²

Se ha observado que la regeneración neuronal es considerablemente reducida en mamíferos y otros vertebrados superiores, a diferencia de los invertebrados o vertebrados inferiores, además se ha encontrado que la regeneración en el Sistema Nervioso Central (SNC) es usualmente nula, sin embargo en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), si se han evidenciado regeneraciones con éxito. ³

Además de las neuronas en el SN podemos encontrar células gliales, en el caso de SNC encontramos que la neuroglia está compuesta principalmente de dos tipos celulares, los astrocitos y los oligodendrocitos. Los astrocitos asumen un elevado número de funciones clave para la realización de la actividad nerviosa, como funciones bioquímicas implicadas en la actividad neuronal y funciones metabólicas. Además, los astrocitos también envían protuberancias hasta el sistema circulatorio, induciendo el sellado de las células endoteliales de los capilares, que impiden la entrada pasiva en el cerebro de moléculas hidrosolubles. Esta barrera se conoce normalmente como barrera hematoencefálica. ⁴

Por su parte, los oligodendrocitos, los cuales además del sostén y unión entre las neuronas, desempeñan una importante función, que es la de formar la vaina de mielina, que permite una transmisión más rápida del potencial de acción en el SNC.⁵

En el SNP la glía se compone principalmente de células de Schwann, las cuales al igual que los oligodendrocitos en el SNC, tienen la función de mielinizar los axones de las neuronas en el SNP, por lo que siempre están alrededor de estas.⁶

Físicamente, el SNC está conformado por el encéfalo dentro de la cavidad craneana, constituido a su vez por el cerebro, el cerebelo y el bulbo raquídeo; y la médula espinal, que se ubica dentro de la cavidad del conducto raquídeo.⁷⁸ Por su parte, el SNP está conformado por los segmentos de las neuronas motoras autonómicas y sensitivas que se extienden fuera del SNC. Las estructuras que lo componen incluyen: las raíces motoras y sensitivas que se unen cerca del agujero de conjunción para formar los nervios espinales. Los nervios craneales (con excepción de los nervios I y II), los ganglios sensitivos, los terminales motores y sensitivos y gran parte del SN autónomo.⁹

Regeneración neuronal en el SN de mamíferos

Luego de que ocurre una lesión en el SNP, se inicia un proceso conocido como, degeneración walleriana (dos o tres días) y posteriormente, el axón empieza a crecer, sin que esto signifique que la neurona vaya a sobrevivir o que se garantice su regeneración. Sin embargo resulta pertinente hacerse una pregunta, ¿por qué no se produce este crecimiento en el ámbito central?, todo parece indicar que lo que es determinante para que se de esta regeneración es el entorno en el que se encuentran las neuronas.³

En algunos casos las células de Schwann que forman la capa de mielina en el SNP, puede promover la regeneración neuronal, esto lo logran produciendo factores neurotróficos y moléculas de adhesión celular que promueven y guían el crecimiento del axón.³

Cuando un nervio resulta lesionado y los extremos de la vaina de las células de Schwann se encuentran demasiado separados, no se produce la regeneración funcional.³

En general, las células del SNC y el SNP liberan factores que gobiernan el proceso de regeneración, para poder estudiar el efecto de estos factores y su interacción con las células *in vitro*, una opción es cultivar neuronas o líneas similares a las neuronas, en medios condicionados por componentes de estos sistemas.¹⁰

Neuronas del hipocampo

El hipocampo es una eminencia alargada, situada junto a los ventrículos laterales del encéfalo. Esta área cerebral es clave para el aprendizaje y la memoria espacial en los vertebrados.³ El hipocampo es una de las regiones del cerebro más utilizadas debido a que su población neuronal es bastante homogénea. Las neuronas piramidales representan del 85% al 90% de la población total.^{11 12} Por otra parte, las neuronas piramidales en cultivo expresan muchas de las características fenotípicas propias de este tipo celular, desarrollan un axón simple, una dendrita apical larga y varias dendritas circundantes más cortas;^{12 13} Esto las hace excelentes candidatas como modelos para el estudio del funcionamiento del SN.^{13 14} Los cultivos primarios de neuronas del hipocampo de embriones de ratas a los 19 días de gestación, nos permiten estudiar los diferentes aspectos del desarrollo neuronal que normalmente ocurren *in vivo*, estos aspectos pueden ser: la polarización, maduración o desarrollo y la sinaptogénesis (generación de sinapsis).¹⁵ Este modelo fue desarrollado en el laboratorio de G. Banker, es reproducible y está bien caracterizado. Las neuronas del hipocampo desarrollan primero numerosas neuritas inmaduras, de las cuales sólo una se convierte en el axón a las 48h de cultivo, siendo siempre la neurita más larga.¹⁶

Polaridad neuronal

Las neuronas son células altamente polarizadas que constan de tres compartimientos claves, el cuerpo celular, las dendritas y el axón.^{17 18} La polarización en este tipo celular es indispensable para la transmisión del impulso eléctrico, ya que las dendritas reciben señales, mientras que los axones las envían.¹⁹

La polaridad celular, implica el rompimiento de la simetría en la célula y es importante en diferentes procesos biológicos. La polarización neuronal inicialmente fue descrita por Santiago Ramón y Cajal en 1891, en su *Ley de Polarización Dinámica*,²⁰ donde se establece que cada neurona posee estructuras receptoras y emisoras que permiten la transmisión vectorial, es decir la información fluye hacia una dirección entre ellas. El flujo direccional de la información en el sistema nervioso da lugar a la formación de redes neuronales.²¹

En los cultivos primarios de neuronas del hipocampo, se han descrito los cambios morfológicos que ocurren durante la adquisición de la polaridad, lo que ha permitido establecer cinco estadios de diferenciación neuronal (**Figura 1.1**): Primeramente, después de su adhesión al sustrato, las neuronas del hipocampo generan filopodios y lamelipodios, los cuales son proyecciones regulares delgadas y laminadas a partir de un soma redondeado²² (estadio 1). Después de varias horas, las neuronas forman neuritas inmaduras morfológicamente iguales y equidistantes que presentan movimientos de elongación (estadio 2). Luego, entre 2 y 6 días en cultivo, una de las neuritas iniciales crece más rápidamente que el resto, rompiendo la simetría celular y generando una nueva estructura, el axón (estadio 3). La formación de este axón es finalmente lo que permite la polaridad morfológica y funcional. Las demás neuritas conservan su longitud hasta los 4 días de desarrollo *in vitro* aproximadamente, (estadio 4). Posteriormente, se da la generación de espinas dendríticas prematuras, y se empiezan a observar los primeros contactos sinápticos que permiten la transmisión del impulso eléctrico (estadio 5).¹⁵

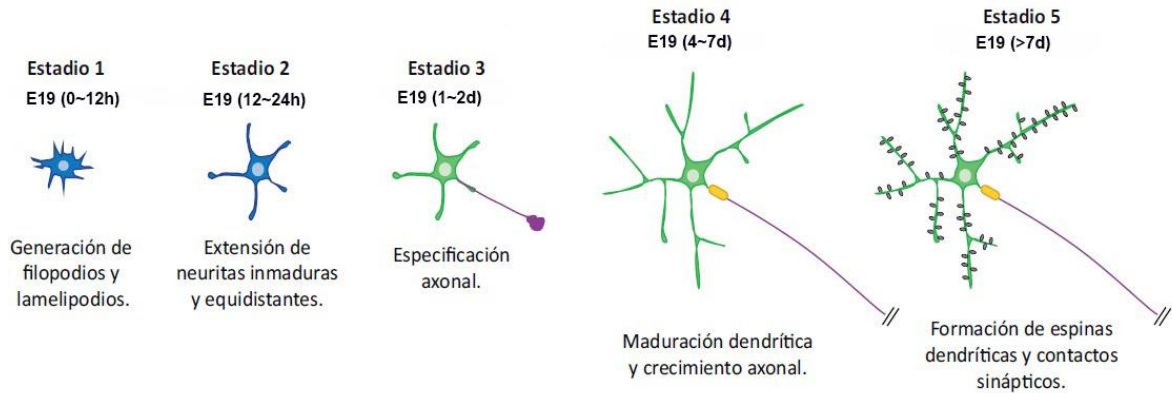


Figura 1.1. Adquisición de polaridad en neuronas de hipocampo E19 *in vitro*. Diferentes estadios del desarrollo de neuronas del hipocampo. Los estadios en azul representan estados no polarizados de la neurona, a partir del estadio 3 donde se rompe la simetría de la célula y esta es polarizada, se diferencian en verde las dendritas y el soma y en morado el axón, por último en amarillo se señala el lugar del segmento inicial del axón. Imagen adaptada de Barnes and Polleux, 2009. ²³

Polaridad neuronal, factores extracelulares y receptores.

Para que se formen el axón y las dendritas, son necesarias distintas vías de señalización intracelular que se activan en respuesta a factores o señales extracelulares. Entre estas señales extracelulares está la familia de factores neurotróficos. Los más conocidos son el factor de crecimiento nervioso (NGF, por su siglas en ingles), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por sus siglas en ingles), la neurotrofina 3 o NT-3 y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, por sus siglas en ingles), todos estos han sido descritos como promotores del desarrollo neuronal, y activan receptores tirosina quinasa (Trks o IGF-1 receptor) que regulan positivamente la actividad del fosfoinositol 3-quinasa (PI3K por su siglas). ²⁴

Específicamente, el BDNF, promueve la especificación del axón, provocando la fosforilación de la proteína quinasa B1 del hígado (LKB1 por sus siglas), dependiente de la proteína quinasa A o PKA. ²⁵

Por otra parte el receptor de IGF-I especifica el crecimiento del axón, activando la vía de señalización de PI3K-cdc42. ²⁶

Las moléculas extracelulares, como la laminina o las moléculas de adhesión NgCAM también promueven la especificación y crecimiento del axonal.²⁷

Otras proteínas que ofrecen señales extracelulares para la polarización celular son las neuregulinas o NRGs.²⁸ Las neuregulinas intervienen activando los receptores de la familia ErbB, compuesta por 4 miembros (ErbB 1-4). Estos receptores poseen en general una misma estructura, tienen dos regiones ricas en cisteínas en su región extracelular y un dominio quinasa seguido de una cola carboxilo terminal con dominios de tirosina autofosforilables.²⁹

No todos los tipos de ErbB interactúan directamente con las NRGs, los que si lo hacen regulan la fosforilación de los receptores ErbB provocando la homo o hetero dimerización de éstos. Concretamente, ErbB1 y ErbB2 no unen NRG,³⁰ ErbB3 si lo hace pero no posee actividad tirosina quinasa.³¹ Sin embargo, ErbB4 es el único miembro capaz de unir NRG1 y provocar una respuesta de forma independiente.³² Cuando estos receptores se fosforilan, varias moléculas son movilizadas hacia sus residuos de tirosina fosforilados, promoviendo la activación intracelular de vías de señalización como la vía PI3K/Akt y Ras/MapK, implicadas en los procesos de proliferación, supervivencia celular y diferenciación.³³

Por otra parte, entre los factores de inhibición del desarrollo neuronal podemos destacar los siguientes: NOGO (Inhibidor del crecimiento de las neuritas), MAG (Glicoproteína asociada a la mielina) y OMgp (Glicoproteína de la mielina de oligodendrocito). La proteína Nogo-A, identificada por 3 grupos independientes,^{34 35 36} forma parte de una familia de proteínas, a la que pertenecen también Nogo-B y Nogo-C que se expresan principalmente en el retículo endoplasmático y reciben el nombre de familia reticulón o RTN.³⁷

Las tres isoformas de Nogo poseen una región de 66 aminoácidos llamada Nogo-66. Este dominio inhibe el crecimiento axonal mediante la unión al receptor NOGO o NgR, por el cual además los

otros dos factores (MAG y OMgp) también ejercen su actividad inhibitoria, esto a pesar de que estas proteínas son estructuralmente distintas.^{38 39 40} Al mismo tiempo Nogo-A posee un dominio N-terminal también llamado NiG el cual ejerce la inhibición mediante su unión a integrinas.⁴¹

La glicoproteína asociada a la mielina o MAG por su siglas en inglés, descrita en 1994 como una inhibidora del crecimiento axonal,⁴² se encuentra en células de Schwann del SNP y oligodendrocitos del SNC y representa el 1% de las proteínas de la mielina del SNC sin embargo constituye el 0,1% de la proteína total en el SNP.⁴³

La glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos o OMgp por sus siglas en inglés, es la primera de las 3 proteínas inhibitoras asociadas a la mielina en ser descrita, fue identificada en análisis de sustancia blanca humana y cultivos de oligodendrocitos de oveja,⁴⁴ recibe su nombre por la localización en la mielina del SNC, pero más tarde se observó que también se expresa en neuronas.

⁴⁵

Cuando uno de estos factores (NOGO, MAG, OMgp) entra en contacto con ciertos receptores de la célula comienza el proceso inhibitorio, entre estos receptores tenemos: Los miembros de la familia receptor Nogo (NgR1 y NgR2), PirB (Receptor B parecido a Inmunoglobulinas apareadas), gangliósidos, Lingo-1 (glicoproteína de superficie rica en Leucina), TROY (miembro de la familia de receptores TNF), integrinas e incluso el EGFR (receptor del crecimiento epidérmico), este último no lo hace directamente sino a través de un proceso de transactivación con el NgR1.^{46 47} Muchas de estas interacciones ligando-complejo receptor, comparten mecanismos y vías de señalización intracelular comunes, las cuales afectan los filamentos de actina y los microtúbulos, modificando el citoesqueleto neuronal y los niveles de expresión de distintas proteínas y factores de transcripción que controlan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular.⁴⁷

Polaridad neuronal y principales vías de señalización intracelulares.

El proceso de formación de un axón es inextricable y aun no es del todo conocido, durante el proceso de la polaridad neuronal, se han identificado varias proteínas claves que se encuentran cascada abajo o están relacionadas de alguna manera a la PI3K, por lo cual las rutas de señalización relacionadas a esta proteína son las más estudiadas (**Figura 1.2**). La activación de PI3K por la presencia de factores de crecimiento extracelulares, implica que se acumule el fosfatidilinositol 3,4,5-trifostato (PIP₃), predominantemente en el cono de crecimiento de una de las neuritas incipientes. Esto es esencial para la disposición de las diferentes proteínas involucradas en el crecimiento del axón.^{48 49} También en neuronas hipocampales en el estadio 2 se ha evidenciado la acumulación de PIP₃ únicamente en una sola neurita tras el tratamiento con laminina.⁴⁸ Incluso se ha demostrado, que al inhibir la PI3K con inhibidores específicos se bloquea la especificación del axón.⁴⁹

PI3K regula positivamente a la proteína AKT (también llamada proteína quinasa B).^{50 51} Al estar AKT activa (a favor del desarrollo del axón), inactiva por fosforilación a la enzima GSK3 en la serina 9, en el cono de crecimiento axonal de neuronas en cultivo.^{52 53} GSK3 es una proteína inhibidora del crecimiento axonal,⁵⁴ por lo cual su inactivación, resulta en la promoción de la formación del axón. El bloqueo de la especificación del axón por GSK3, se debe a que regula negativamente factores de transcripción como la β-catenina, que facilita el anclaje de cadherinas al citoesqueleto de actina,⁵⁵ y proteínas que se asocian a microtúbulos, como la proteína mediadora de respuesta a la colapsina 2 o CRMP2, la proteína Tau, la proteína APC (siglas de adenomatous polyposis coli) y MAP1B, involucradas en el proceso de elongación del citoesqueleto de las neuritas, evento necesario para la especificación del axón.^{54 56 57}

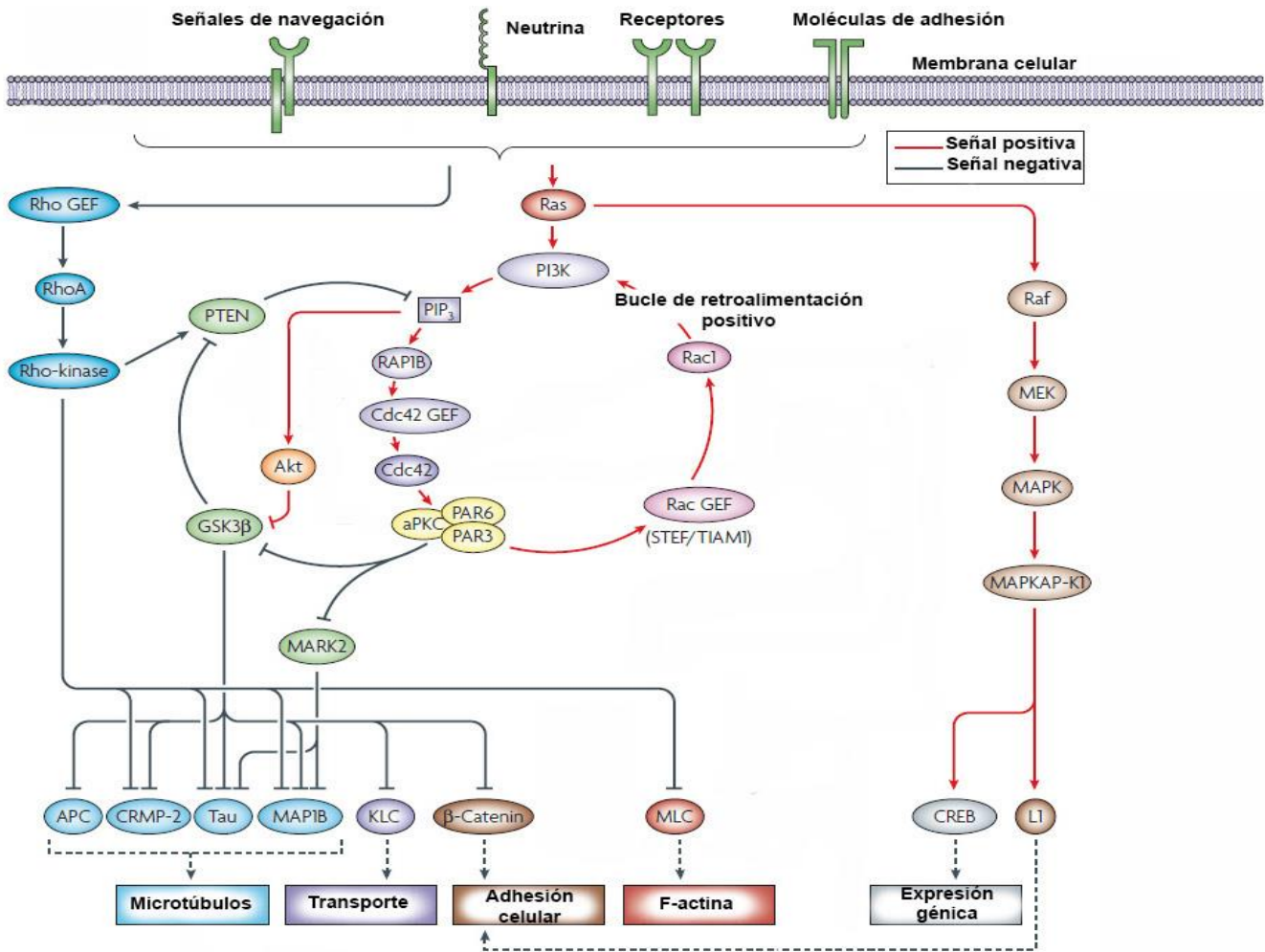


Figura 1.2. Modelo simplificado de señales positivas y negativas para la polaridad neuronal. Se observan los distintos receptores en membrana, más abajo las vías de señalización, en las cuales se destaca la vía inhibitoria de la polaridad Rho y el papel de la PI3K que inicia el ciclo de retroalimentación positiva luego de que es activado por Ras, se observa también que PIP₃ activa Akt, la cual a su vez inhibe la actividad de GSK3 lo que finalmente promueve la polaridad neuronal. Imagen adaptada de Arimura, 2007. ⁵⁷

Además, GSK3 está implicada en otras vías de señalización que modulan la elongación axonal, lo que sugiere que GSK3 podría estar funcionando como señal coordinadora e integradora de las señales que regulan el proceso de adquisición de la polaridad neuronal y la elongación axonal. ⁵⁸

Por otra parte también podemos encontrar que los componentes inhibidores mencionados anteriormente (NOGO, MAG y OMgp) comienzan una vía de señalización consecuentemente inhibitoria, activando la fosfolipasa C que provoca la proteólisis de PIP₂ en la membrana, induciendo

la producción de diacilglicerol o DAG e Inositol trifosfato o IP₃. El IP₃ a su vez puede unirse a los canales de rianodina y estimular la liberación de Ca²⁺ intracelular. El Ca²⁺ intracelular liberado junto con DAG permitiría la activación de la proteína quinasa C o PKC, ⁵⁹ la actividad de las PKC hace posible la proteólisis del receptor p75, lo que causaría la liberación de un dominio intracelular de p75 y desplazaría el factor Rho-GDI de un pre-complejo constituido por p75-Rho-RhoGDI. En ese momento la GTPasa Rho se activaría por unión a guanósín trifosfato o GTP. ⁶⁰ La quinasa de Rho o ROCK se une a Rho activo, lo que cataliza su unión a profilina IIa, perdiendo esta última su afinidad por la actina y disminuyendo así su velocidad de polimerización, causando finalmente la inhibición en el crecimiento de las neuritas. **(ver figura 1.2)** ⁶¹ Adicionalmente Rho promueve la actividad de la quinasa de la cadena ligera de la miosina que también afecta el citoesqueleto e inhibe la actividad de GTPasas como Cdc4 y Rac que normalmente promueven el crecimiento de las neuritas por la vía PI3K/Akt/GSK3β. ⁶²

Polaridad neuronal y segundos mensajeros involucrados.

Una interesante línea de investigación se centra en la implicación de los segundos mensajeros durante el proceso de adquisición de polaridad neuronal y guía axonal, concretamente el adenosín monofosfato cíclico o AMP cíclico (AMPC), el guanósín monofosfato cíclico (GMPC) y al catión calcio (Ca²⁺) intracelular.

Distintos estudios han mostrado que el flujo óptimo de Ca²⁺ en la neurona durante su desarrollo regula la motilidad de los conos de crecimiento y la elongación de las neuritas. ⁶³ Sus efectos en el citoesqueleto están mediados por modificaciones directas en proteínas del citoesqueleto o por la activación de proteínas de unión a Ca²⁺, tales como calmodulina o calcineurina, ésta última es una fosfatasa serina-treonina dependiente de calmodulina, la cual se encuentra en muchos tipos de células pero más abundantemente en las neuronas, la misma es dependiente de Ca²⁺, y está

implicada directamente en la adquisición de polaridad neuronal.⁶⁴ Se ha propuesto además que la laminina dirige la dirección del cono de crecimiento a través de dos señales de calcio distintas temporal y funcionalmente, estas señales tienen en común una cascada de señalización compuesta por calmodulina y quinasas calmodulina II.⁶⁵

Por otra parte en estudios de cultivo *in vitro*, se ha observado que en neuronas piramidales del hipocampo, que eran expuestas a agentes como el A23187 que elevan el Ca^{2+} intracelular, se reducía la tasa de crecimiento axonal.⁶⁶ Estudios posteriores *in vivo*, probaron que las variaciones de Ca^{2+} en el cono de crecimiento regulan la elongación axonal, además comprobaron que suprimiendo el Ca^{2+} con un agente quelante se aceleraba el crecimiento del axón.⁶⁷

También es sabido que en un aumento brusco del Ca^{2+} intracelular se desencadenan mecanismos de muerte celular conocido como excitotoxicidad,⁶⁸ en dicho proceso se evidencia el aumento de la concentración de calcio citosólico resultado de la apertura de canales de calcio en la membrana, la liberación del ión almacenado intracelularmente en el retículo endoplásmico (RE) y en las mitocondrias.⁶⁹ En general, el Ca^{2+} activa enzimas como la PKC, la fosfolipasa A2, fosfolipasa C, algunas endonucleasas, la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} calmodulina, la óxido nítrico sintasa (nNOS) y la calpaína, ocasionando daño mitocondrial, estrés en el RE y aumento de radicales libres, que pueden dañar a las proteínas celulares, el ADN y las membranas lipídicas.⁶⁹

Finalmente se ha encontrado que el Ca^{2+} participa tanto en vías de promoción como de inhibición del desarrollo axonal, se sabe que es necesario para el desarrollo de la célula como también se sabe que en exceso promueve la muerte celular, entonces tenemos un rango de concentración de Ca^{2+} donde este va a promover el desarrollo y que posiblemente dependa del estadio en el que se encuentre la célula, el origen anatómico o incluso la especie de la que proviene la neurona.

Receptores de glutamato

El principal aminoácido excitatorio en el SNC de vertebrados es el L-glutamato, el mismo media la transmisión del impulso nervioso en las sinapsis excitatorias rápidas.⁷⁰ Los receptores de este neurotransmisor pueden ser clasificados de la siguiente forma:

- Los receptores metabotrópicos (mGluRs): Están formados por siete dominios transmembrana y están acoplados a proteínas G. Se encargan de la modulación de la transmisión sináptica lenta,⁷¹ mediante la activación de cascadas de señalización intracelular dependientes de segundos mensajeros.^{72 73 75}
- Los receptores ionotrópicos (iGluRs): Son canales iónicos a los cuales se les acoplan uno o más ligandos. Son los responsables de la despolarización e hiperpolarización de la membrana celular en las sinapsis excitatorias y a diferencia de los receptores metabotrópicos, no están acoplados a proteínas G. Se clasifican en base a su afinidad selectiva por agonistas sintéticos y a sus características electrofisiológicas,⁷⁴ distinguiéndose tres tipos:
 - Receptores de tipo AMPA sensibles a α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPAr).
 - Receptores de tipo kainato sensibles a Ácido kaínico.
 - Receptores de tipo NMDA sensible a N-metil-D-aspartato (NMDAr).

Estos 3 tipos de receptores se diferencian en varios aspectos. Por ejemplo los receptores AMPA y kainato poseen cinéticas de activación rápida de 10 a 50ms y son permeables a Na^+ , K^+ y, en menor medida, a Ca^{2+} .⁷⁵ En cambio el NMDAr tiene una cinética de activación más lenta, de 200 a 300ms y es principalmente permeable al Ca^{2+} . Otra diferencia radica en que el NMDAr es bloqueado por cationes Mg^{2+} mientras que los otros no.³

Receptor NMDA

La estructura de los NMDAr se presenta en forma esquemática en la **Figura 1.3.A**. Son proteínas formadas por distintos monómeros (oligoméricas) y sus subunidades se forman de 4 segmentos transmembrana (TM1, TM2, TM3 y TM4).⁷⁶ La región N-terminal del segmento TM1 y a continuación el dominio S1, constan de unos 150 aminoácidos, estas regiones quedan expuestas al exterior celular, la región exterior a la membrana entre TM3 y TM4 forman el dominio S2 que junto con el dominio S1 forman el área de interacción con el ligando. El segmento TM2 forma una horquilla la cual atraviesa parcialmente la membrana como se observa en la **Figura 1.3.A** este segmento confiere las distintas selectividades iónicas del canal.⁷⁷ También se observa en la figura como el extremo N-terminal de la molécula está situado en el exterior celular y el C-terminal hacia el citoplasma.^{78 79} El receptor se forma por combinaciones de diferentes subunidades: NR1, NR2 y NR3⁸⁰ formando tetrámeros o incluso se ha propuesto que forma pentámeros.⁷⁴ La NR1 está codificada por un gen único, no obstante, el transcrito puede generar al menos ocho isoformas. Mientras que para las subunidades del tipo NR2 existen cuatro genes diferentes que codifican para las subunidades NR2A, NR2B, NR2C y NR2D.⁸¹

Los NMDAr son los receptores de glutamato de mayor abundancia en el cerebro de mamíferos.⁷⁵ Situados principalmente en la membrana postsináptica de las sinapsis excitatorias.⁸² Estos canales iónicos tienen alta permeabilidad para el ión Ca^{2+} y como se mencionó anteriormente son bloqueados por un ion Mg^{2+} de manera dependiente de voltaje.^{83 84} Los NMDAr funcionan como detectores moleculares de coincidencia, cuya activación requiere de la unión de sus coagonistas, glutamato y glicina o D-serina,^{85 86 87} y adicionalmente la despolarización simultánea de la membrana neuronal (**Figura 1.3.B**).⁷⁵ Estas propiedades como canales iónicos convierten a los NMDAr en esenciales para los fenómenos de plasticidad sináptica, como la depresión a largo plazo

(Long Term Depression, LTD) y la potenciación a largo plazo (Long Term Potentiation, LTP), estos mecanismos constituyen la base fisiológica conocida de los procesos de memoria y aprendizaje.⁸⁸

89

Actualmente es aceptado que el receptor funcional es un tetrámero compuesto obligatoriamente por dos subunidades del tipo NR1 y dos subunidades NR2,⁹⁰ estas forman receptores heterodiméricos cuando las dos subunidades NR2 son iguales, es decir 2 subunidades NR1 y 2 NR2A, pero también pueden formar receptores heterotriméricos, como por ejemplo dos subunidades NR1 con una NR2A y otra NR2B. Cada combinación de heterómeros del receptor posee distintas características fisiológicas, como por ejemplo el potencial de membrana necesario para eliminar el bloqueo de Mg^{2+} ,^{91 92 93} o el tiempo de cierre del canal.⁹² Esto evidencia una diversidad en la composición y función de los NMDAr, lo cual a su vez acarrea consecuencias importantes en el comportamiento general de la célula.^{94 75} Hasta el momento, se han identificado más de una docena de NMDAr funcionalmente diferentes en el SNC. Las subunidades de tipo NR3 han sido menos estudiadas y se cree que podrían actuar como dominantes negativos de la actividad del receptor;⁹⁵⁹⁶ ya que su presencia en los tetrámeros reduce la entrada de Ca^{2+} .⁹⁷ De hecho se demostró en el 2009 que la expresión de NR3A no permite la estabilización y el fortalecimiento prematuros de las sinapsis excitatorias durante el desarrollo postnatal.⁹⁸ Sin embargo, la regulación negativa de estas subunidades en estadíos posteriores al desarrollo, es un requisito necesario para la correcta maduración de las sinapsis y consolidación de la memoria.⁹⁸

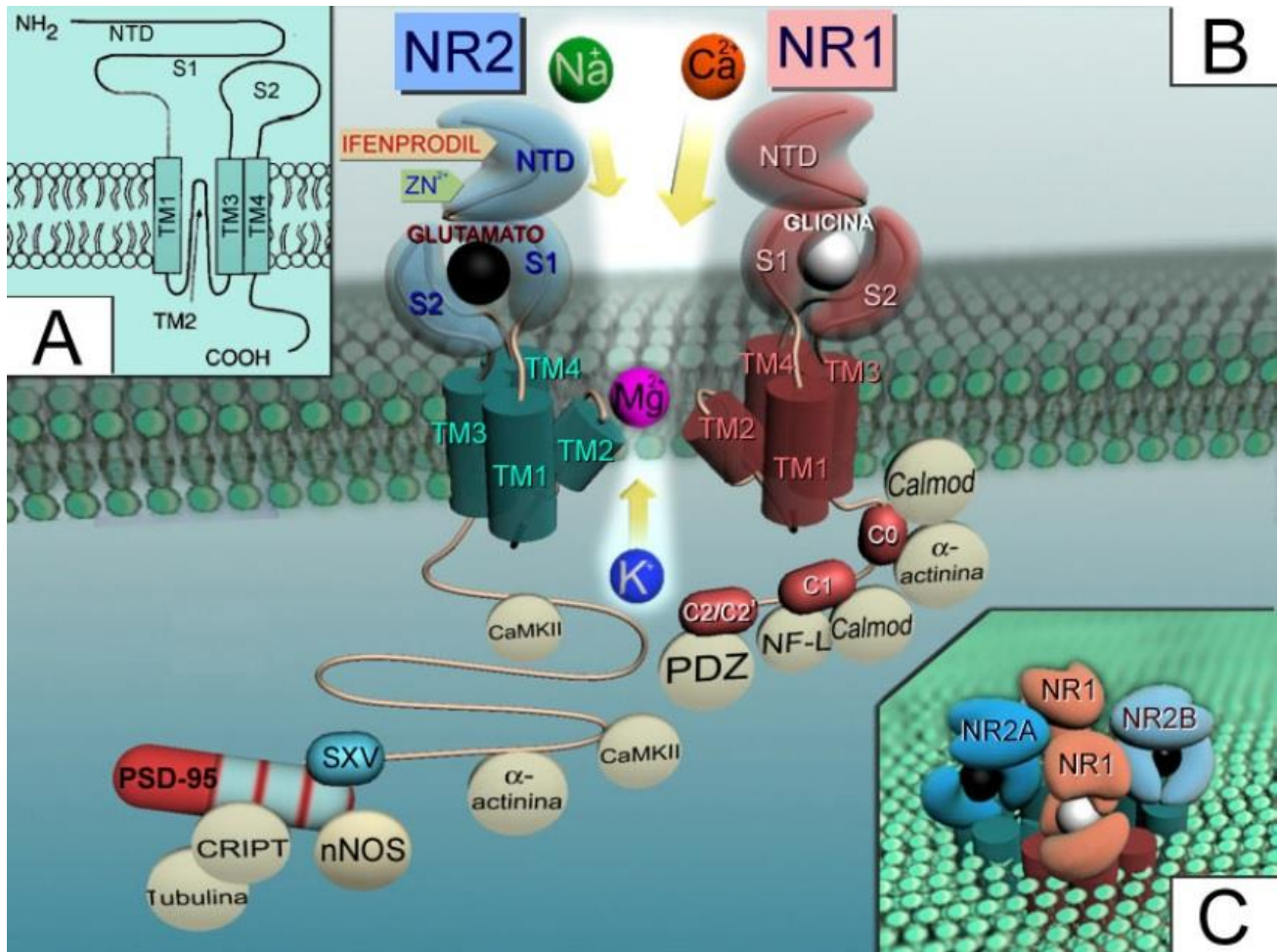


Figura 1.3. Esquema general del NMDAr, su estructura y disposición en la membrana. (A), Estructura de las subunidades del NMDAr. Se muestra la disposición de los dominios extracelulares, formados por la región NTD, S1 y S2, los 4 dominios transmembrana (TM1-4) y la región C-terminal en el citosol de la célula. (B), Ejemplo esquemático de la activación y modulación de un NMDAr formado por subunidades (NR2A-D) y NR1. La unión del glutamato a la subunidad NR2 y de la glicina a la subunidad NR1, permiten la activación del receptor. Para que se dé la activación del receptor, a la par, debe tener lugar la salida del Mg^{2+} que bloquea el canal iónico formado por los 4 segmentos transmembrana TM2. La apertura del canal permite la salida de K^{+} y la entrada de Na^{+} y Ca^{2+} . Los dominios C-terminales poseen numerosos puntos de anclaje para diversas proteínas como las que se muestran en el esquema (C). Se muestra la disposición de las 4 subunidades que conforman el receptor en la membrana, es decir la estructura cuaternaria.⁹⁹

Localización espacial y temporal de NMDAr en el SNC

La disposición de las subunidades del NMDAr dentro del SNC es variable, teniendo que la expresión de NR1 es prácticamente ubicua en todos los lugares donde se hallan NMDAr y en todos los estadios del desarrollo. Por el contrario las distintas subunidades NR2 se encuentran distribuidas por

distintos tejidos y en distintos estadios del desarrollo.¹⁰⁰ En las neuronas del hipocampo que son las usadas en este estudio, los receptores estarán constituidos mayoritariamente por los heterómeros NR1/NR2B y NR1/NR2D.^{101 92 102} Cabe destacar que la disposición del NMDAr también varía dependiendo de su localización específica en la membrana celular, pudiéndose encontrar NMDAr sinápticos y extrasinápticos.⁹²

El NMDAr en la supervivencia neuronal.

Es comúnmente aceptado que la activación de los NMDAr sinápticos son parte esencial de la supervivencia neuronal. La actividad de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc o CREB por sus siglas en inglés,¹⁰³ juega un papel importante, ya que promueve la síntesis de moléculas a favor de la supervivencia como el BDNF, del que se ha hablado antes y la expresión de genes tales como c-fos o el grupo de genes reguladores de la actividad inhibitoria de muerte o AID por sus siglas en inglés, estos factores aumentan la resistencia de las mitocondrias al estrés celular.¹⁰⁴ Otros mecanismos neuroprotectores mediados por el receptor son el aumento de las defensas antioxidantes,¹⁰⁵ la inducción de vías de proliferación celular como MAPK/ERK.¹⁰⁶ y también la inducción de las vías como la PI3K/AKT,^{103 107} las cuales como se ha nombrado anteriormente están involucradas en el crecimiento de neuritas.

Por otro lado, los NMDAr sinápticos se encuentran en las densidades postsinápticas o PSDs, que son complejos multiproteicos anclados en la membrana postsináptica que permiten la interacción entre canales iónicos, diversos receptores, proteínas andamio y de señalización, necesarios para la transmisión sináptica. En las PSD los NMDAr pueden interaccionar con otros receptores tales como los ErbB, gracias a proteínas como la PSD-95, que posee dominios PDZ que permiten la interacción con estos receptores,¹⁰⁸ **(Figura 1.3).**¹⁰⁹ Estos complejos generan señales que incluyen vías

dependientes e independientes de Ca^{2+} , y que establecen el tipo de información que se transmitirá al interior de la célula.

Por último el BDNF promueve la fosforilación de las subunidades NR2B, lo que aumenta la actividad del NMDAr.^{110 111} Adicionalmente, en cultivos de neuronas del hipocampo, esta neurotrofina incrementa la abundancia y el transporte a la membrana de los NMDAr.¹¹² Con la activación de CREB, el glutamato induce la síntesis de BDNF^{113 103} lo cual, causa una modificación en la sensibilidad neuronal al glutamato, la homeostasis del Ca^{2+} y la plasticidad sináptica.^{114 115}

Inhibidores del receptor NMDA

Existen diversos inhibidores del NMDAr que han permitido estudiar el receptor, evaluando los cambios que se presentan en el sistema biológico, cuando la función del receptor está inhibida. Algunos de estos inhibidores o antagonistas del receptor son, la ketamina, el dextrometorfano (DXM), la metoxetamina (MXE), el óxido nitroso (N_2O), el APV o AP5, el ifenprodil, la fenciclidina o PCP, entre otros.

En este trabajo se hará uso del MK-801, también llamado Dizocilpina, que es un potente antagonista no competitivo del NMDAr. Se ha propuesto que el inhibidor MK-801 no afecta la unión del ligando al receptor, sino que se une dentro del canal iónico en el mismo lugar de unión del PCP, una droga que impide el flujo de iones, incluyendo la afluencia de Ca^{2+} a través del canal. Algunos autores proponen que el bloqueo con MK-801 requiere que los NMDAr estén activados, ya que el canal debe abrirse para que el fármaco se una en su interior.¹¹⁶

Antecedentes

La regeneración de tejido nervioso en mamíferos ha sido un área de investigación con mucha actividad, dadas las implicaciones y las aplicaciones que podrían tener los descubrimientos de esta área sobre la neurociencia y la medicina regenerativa. Este trabajo se basa en los estudios de Villegas y colaboradores^{117 28 118} quienes han estudiado el medio condicionado por nervios ciáticos (MC) de ratas adultas, como una fuente de los factores que son liberados en el SNP luego de una lesión. Este grupo de investigación ha demostrado que el MC induce la diferenciación parcial en las células PC12. Las células PC12 son un modelo neuronal, ampliamente utilizado en la investigación del proceso de desarrollo de neuritas, estas células al ser tratadas con NGF, se diferencian reversiblemente en neuronas y¹¹⁹ desarrollan axones¹²⁰, aumentando también las corrientes de Na⁺, Ca²⁺ y K⁺ dependientes de voltaje.¹²¹ Sin embargo, las células PC12 al ser tratadas con MC desarrollan sólo dendritas¹²⁰ y poseen corrientes de Ca²⁺, además hay un incremento de corrientes de K⁺, pero sin cambios significativos en las corrientes de Na⁺.¹²¹ Las corrientes de Na⁺ dependientes de voltaje son una importante característica fisiológica en los axones de las neuronas, más aún son un evento que precede la formación del axón.¹²²

Además, han demostrado la participación necesaria del receptor ErbB en la regulación de la elongación de neuritas y la inducción de corrientes de sodio en las células PC12, tratadas con MC o con MC y el inhibidor k252a (esta última condición bajo la cual las células logran desarrollar axones y corrientes de Na⁺).¹²³ Estos investigadores proponen un modelo en el cual el MC promueve la elongación inicial de las neuritas, gracias a la activación de la ruta PI3K/Akt/GSK3 β a través de receptores ErbB, al tiempo que la activación de otras rutas celulares que implican a PKC no convencionales y al receptor p75, impiden la mayor elongación de las neuritas y el desarrollo del axón.

Trabajos más recientes del laboratorio de neurociencia del IDEA, han estudiado el efecto del MC sobre el desarrollo de axones en neuronas del hipocampo, demostrando que el MC posee factores que afectan el desarrollo del axón de estas neuronas, disminuyendo la longitud promedio de los axones y la expresión de los neurofilamentos-H.¹⁰

Así mismo, se ha observado que el MC es capaz de inducir un aumento en los niveles de calcio intracelular, en parte gracias a la activación del NMDAr en neuronas del hipocampo.¹²⁴ Sin embargo, no se ha estudiado la relación directa entre la activación del NMDAr y el proceso de diferenciación y desarrollo de neuritas mediado por el MC en estas neuronas. Es entonces por esto que en el presente trabajo se busca entender la implicación del NMDAr en el desarrollo del axón y las dendritas, con la finalidad de que esta información contribuya a dilucidar una parte de las rutas de señalización a favor y en contra del desarrollo de las neuritas, lo cual a su vez permitirá la identificación de nuevos blancos terapéuticos para el proceso de regeneración neuronal.

En este orden de ideas, es importante mencionar que en el MC se ha identificado la presencia de proteínas NRG, las cuales activan receptores ErbB^{28 125 10} y en la literatura existen evidencias que demuestran que la activación de estos receptores conducen a la reducción significativa de las corrientes de Ca²⁺ en el NMDAr.^{126 127} Así como también la inhibición del NMDAr altera la expresión y la activación de receptores ErbB.¹²⁸

Por otra parte, existen evidencias experimentales que implican al NMDAr en la regulación de la elongación de las neuritas. Algunos trabajos reportan que los componentes de la mielina disminuyen la elongación de las neuritas y que el bloqueo del NMDAr revierte este efecto. Cabe destacar que en el MC también se ha identificado la presencia de varios inhibidores asociados a la mielina.¹²⁹ Por otra parte, se ha reportado que en células P19, (línea celular derivada de un teratocarcinoma, ampliamente usadas como modelos de la diferenciación y proliferación neuronal)

¹³⁰ ¹³¹ ¹³² el NMDAr y el aumento de Ca^{2+} intracelular por parte del mismo, juegan un papel importante en el proceso de diferenciación de esta línea celular a neuronas, ya que al inhibir la actividad del NMDAr con ifenprodil, afecta gravemente la extensión de las neuritas, disminuyendo su tamaño. ¹³³

También recientemente se ha demostrado que CRMP2 (una de las moléculas claves en el proceso de diferenciación del axón, que también se ha identificado en el MC, ¹³⁴ modula positivamente la actividad del NMDAr y a la actividad de un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, regulando la homeostasis del Ca^{2+} en neuronas expuestas al glutamato (el ligando natural del NMDAr). ¹³⁵

Como el MC posee factores que favorecen la diferenciación, permitiendo el desarrollo y elongación inicial de las neuritas, pero también posee factores que impiden una mayor elongación de las neuritas y la especificación del axón, es posible que la activación del NMDAr, en presencia de los factores presentes en el medio condicionado, esté asociada a cualquiera de los dos procesos: elongación inicial o al bloqueo de una mayor elongación. ¹⁰

Por esta razón, se plantean 3 posibles escenarios, 1) que la inactivación del receptor promueva el desarrollo, 2) que lo inhiba, o 3) que simplemente no tenga ningún efecto sobre el proceso de neuritogénesis en las neuronas del hipocampo tratadas o no con MC y que su actividad esté relacionada a otros procesos.

Dependiendo de lo que ocurra al inhibir la actividad del NMDAr en neuronas del hipocampo, se podrá tener evidencia que soporte los posibles eventos.

Objetivos

Objetivo general:

- ➔ Determinar el efecto de la inhibición del receptor de NMDA, sobre la diferenciación de las neuronas del hipocampo, mediada por medio condicionado por nervios ciáticos (MC).

Objetivos específicos:

- Obtener MC para el tratamiento de las neuronas del hipocampo y verificar su actividad mediante la identificación por inmunocitoquímica de células GFAP positivas en el cultivo a los 7 días.
- Determinar la presencia de axones y dendritas en neuronas del hipocampo tratadas con MC y/o bloqueadores del receptor de NMDA a los 2 días de cultivo, por medio de inmunofluorescencia.
- Determinar por análisis morfométricos si el bloqueo de la actividad del receptor de NMDA, afecta el grado de diferenciación de las neuronas del hipocampo tratadas con MC a los 2 días de cultivo.

Materiales y métodos

Obtención de medios condicionados

Para la obtención del MC se utilizó el protocolo descrito por Villegas y colaboradores (1995) ¹¹⁷. Se utilizaron nervios ciáticos de ratas adultas de *Sprague dawley*, los cuales fueron colocados en capsulas Petri con tampón fosfato Salino (PBS). Se eliminaron los restos de grasa de los nervios y se pasaron por dos placas de Petri con PBS, para luego ser transferidos a frascos de cultivo de 25 cm², todo ello en condiciones de esterilidad. En total se utilizaron 8 nervios por frasco de cultivo con 6ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) libre de suero, suplementado con 1% glutamax, 0,04% de vitaminas, 0,04% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina-estreptomicina (Pen-Strep). Los nervios fueron mantenidos en una incubadora a 37°C y a 5% CO₂. Se realizó un cambio de medio a los 4 días, luego al octavo día, los nervios se transfirieron a frascos nuevos con NB (Neurobasal) suplementado con glutamax 0,25%, 1% de penicilina-estreptomicina (Pen-Strep). El MC se recolectó cada 24h durante 3 días consecutivos (días 9, 10 y 11), se filtró a través de membranas de 0,22µm de diámetro y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

Para los tratamientos de las células, se procedió a hacer una mezcla con cantidades iguales del medio recolectado a los días 9, 10 y 11. La mezcla de MC fue suplementada con otra mezcla de 2% del suplemento para cultivos neuronales B27 (Gibco17504-044), glutamato 0,025% y glutamax 0,25%. Considerando que uno de los efectos más notorios del MC sobre los cultivos del hipocampo, es el desarrollo de células gliales, se constató la capacidad de promover el desarrollo de glía para los MC obtenidos, a través de la identificación de neuronas y células gliales mediante inmunomarcaje, lo cual se explicará más adelante. En la **figura 2.1** se muestra un esquema del procedimiento de obtención de MC para el tratamiento de las neuronas del hipocampo. ¹⁰

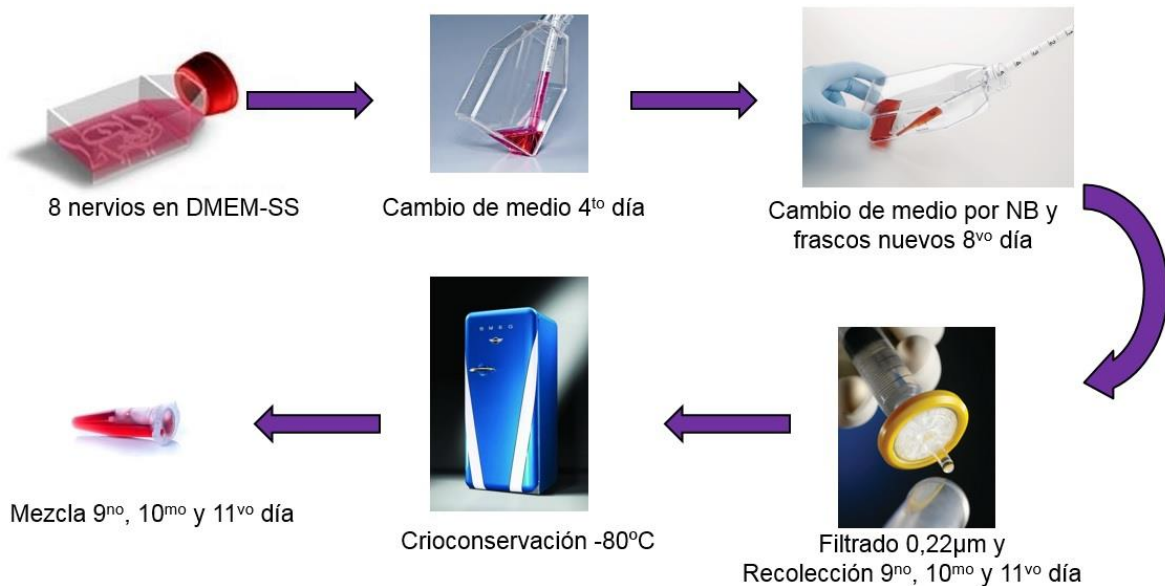


Figura 2.1. Obtención de MC para el tratamiento de células: 8 nervios de rata se colocan en frascos de cultivo en DMEM sin sueros (DMEM-SS), el medio se cambia a los 4 días y luego a los 8 días, los nervios se trasladan a frascos de cultivo nuevos con NB sin B27 para las neuronas del hipocampo. Se recolecta el medio condicionado a los días 9, 10 y 11, en ese momento se filtra por 0,22µm. Se almacena a -80°C hasta su uso. El medio condicionado que se utiliza para los tratamientos son mezclas de igual volumen de los días 9, 10 y 11.

Cultivos Primarios de células del Hipocampo

La extracción de neuronas del hipocampo se realizó a partir de Embriones de Rata *Sprague dawley* de 19 días de gestación (E19). El procedimiento de extracción y el cultivo se basaron en los reportados en las referencia: ^{136 10}. Los embriones se obtuvieron por cesárea, luego del sacrificio de la madre en cámara de CO₂. En condiciones de esterilidad se realizó la extracción de los hipocampos. El medio de disección (HBSS; Solución Salina balanceada de Hank's) (1X HBSS: 9,6 mM de N-2hidroxiethylpiperazina-N'-ácido etanosulfónico [HEPES] pH 7,4, 1% Pen-Strep) fue colocado en cápsulas de Petri, las cuales estuvieron sobre hielo durante todo el procedimiento. Primeramente, se decapitaron los embriones y las cabezas fueron transferidas a una de las placas de Petri con HBSS. Después se retiró la piel y la calota de las cabezas para exponer el cerebro, extrayendo éste a una nueva placa. Los hipocampos fueron extraídos del cerebro bajo una lupa. Los cerebros fueron

transferidos a una nueva placa para luego, cuidadosamente, eliminar las meninges. A continuación, se separaron los dos hemisferios del cerebro y se cortó el cuerpo calloso para exponer los hipocampos. Cada hemisferio se transfirió a una nueva placa. Finalmente, en otra placa con HBSS se cortaron los hipocampos, con la ayuda de una tijera, y se transfirieron con una pinza curva fina a un tubo cónico con 10ml de HBSS.

Disociación y cultivo de las células del hipocampo: Los hipocampos se lavaron 3 veces con HBSS. Después, se agregaron 5ml de HBSS-tripsina 1X y se incubaron por 15 min a 37°C, agitando cada 5 min. Luego, se realizaron 3 lavados con HBSS. Al terminar el último lavado, se eliminó por completo el HBSS y los hipocampos se disociaron en el medio NB con 0,25% glutamax, 1% Pen-Strep, 2% B27, 12.5µM Glutamato, haciendo uso de una pipeta Pasteur.

Las neuronas primeramente se cultivaron en cubreobjetos de 12mm, tratados previamente e incubados toda la noche a temperatura ambiente con 0,1 mg/ml de poli-D-lisina (PDL) y laminina 1 mg/ml, de la misma forma se procedió luego con los cultivos realizados directamente en placa plástica de 48 pozos (véase preparación de cubreobjetos para inmunomarcaje).

Para las pruebas de la actividad del MC (identificación de glía), el cultivo se mantuvo por 7 días en placas plásticas de 48 pozos, se realizaron 3 réplicas MC obtenido. A estos cultivos se les cambió la mitad del medio (100µl) a los 3 días, el cambio de medio se realizó sin glutamato.

Tratamiento para las neuronas del hipocampo

Se realizaron distintos cultivos de neuronas del hipocampo en placas de 24 y 48 pozos donde se probaron distintos tratamientos, a saber:

1. Células en medio NB
2. Células en NB con el inhibidor MK801
3. Células en MC
4. Células en MC más el inhibidor MK801
5. Células en NB con NMDA
6. Células en NB con el inhibidor MK801 y NMDA

El tratamiento 1 y 3, permiten evaluar el efecto del MC en relación a la condición control (NB). Por su parte en los tratamientos 2 y 4 se mostrará el efecto de la inhibición del NMDAr en ausencia (2) y presencia de factores liberados por nervios ciáticos (4). El tratamiento 5 se le agregó NMDA para inducir la activación del NMDAr y en el tratamiento 6 se utilizó de control para verificar que el MK801 bloquea los efectos mediados por la activación del NMDAr.

Inmunomarcaje de cultivos celulares

Preparación de cubreobjetos para el inmunomarcaje: Los cubreobjetos (12mm) se colocaron en HCl 4N durante 3 días, se lavaron luego con agua milliQ, (2 lavados rápidos y 3 de 40min), todos con agitación. Después se dejaron en etanol al 70% durante toda la noche y al día siguiente se procedió a su esterilización en autoclave. Para aumentar la adherencia de las células, el día anterior a la extracción de las neuronas, a cada cubreobjeto se le colocó 100µl de PDL (0.1 mg/ml) y laminina (1 mg/ml) y se incubaron toda la noche, protegidos de la luz. Al día siguiente, se lavaron 3 veces con agua milliQ estéril.

Fijación en Paraformaldehído al 4%: Para la fijación, se retiró el medio de crecimiento y se lavaron las células con PBS a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el PBS y se agregó paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20min, igualmente a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados rápidos y 4 lavados de 5 minutos cada uno, con PBS, las placas se guardaron con PBS a 4°C hasta su uso.

Incubación con anticuerpos y pruebas no inmunológicas: Los anticuerpos primarios y secundarios se prepararon en una solución de 2% de suero normal de cabra (NGS) en PBS. En primer lugar, las células se permeabilizaron, mediante su incubación en una solución de tritón X-100 al 0,25% en PBS, durante 10min. Luego se bloquearon con 10% NGS en PBS durante al menos 1h y posteriormente, se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios respectivos, a 4°C y en cámara húmeda. Como anticuerpos primarios se utilizó el SMI35R (ratón, 1:5000), que reconoce neurofilamentos-H, los cuales están presentes en los axones, el anticuerpo contra MAP-2 (Proteína asociada a los microtúbulos 2; conejo, 1:500) para la identificación de neuronas y sus dendritas. En el caso de la prueba de actividad para el MC, se usó el anticuerpo contra MAP-2, desarrollado en ratón para marcar las neuronas y el anticuerpo contra GFAP (proteína fibrilar ácida de la glía; conejo, 1:500), para el marcaje de las células de la glía, esto debido a que se ha demostrado que uno de los efectos más notorios del MC es la promoción del desarrollo de células gliales en los cultivos.¹⁰ Al día siguiente, las células se lavaron en PBS, 3 lavados rápidos, seguidos de 4 lavados de 5 min cada uno. Seguidamente, las células se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con los respectivos anticuerpos secundarios y 4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) (1:10.000) para el marcaje de los núcleos. Se utilizó el anticuerpo anti-ratón conjugado al fluoróforo Alexa 488 (1:200), que emite en color verde, y el anticuerpo anti conejo conjugado al fluoróforo Alexa 594 (1:300), el cual emite en color rojo. Al finalizar el tiempo de incubación, se repitieron los lavados en PBS y se

procedió a montar los cubreobjetos en láminas portaobjetos, sobre 6 μ L del medio de montaje Mowiol-Dabco, se dejó secar hasta el día siguiente y se guardaron a 4°C.

Adquisición de Imágenes de fluorescencia: Las imágenes fueron adquiridas mediante el software Metamorph versión 7.7.3.0 (Molecular Devices, Inc.), con una cámara de carga acoplada (CCD)(Photometrics Cool SNAP HQ2), en un microscopio invertido Zeiss, modelo Observer Z.1

Análisis Morfométrico

El análisis morfométrico de las neuronas del hipocampo se empleó para determinar el grado de desarrollo celular, se tomaron en cuenta varios factores para cuantificar las neuritas, a saber: la longitud de las neuritas, siendo discriminadas entre axones o dendritas, el porcentaje de células con axón, el porcentaje de células con axones ramificados, el número de dendritas por célula, y el porcentaje de neuronas con dendritas ramificadas.

Para determinar presencia de axones, se consideraron 2 criterios:

- Los marcados positivamente con SMI35R.
- La neurita que sea al menos 3 veces más larga que el promedio de las demás.

La longitud total de los axones por célula fue obtenida al promediar, la suma de cada axón con sus ramificaciones de cada célula, igualmente la longitud total del árbol dendrítico fue el resultado del promedio de las sumas de todas las dendritas con sus ramificaciones de cada célula. El porcentaje de células con axón, se obtuvo al dividir en número de células con axón entre el número total de células estudiadas. La cantidad de dendritas por célula, se obtuvo al dividir el número total de dendritas entre el número total de células estudiadas. Por último se reporta el porcentaje de células cuyos axones o dendritas presentaban ramificaciones. Los análisis de las imágenes y el procesamiento fue realizado con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) y Photoshop CS4.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa de estadística GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego California USA). El cual consistió en estudiar las diferencias que hay según cada tratamiento con respecto a la longitud total, tanto de axones como de dendritas, a través de análisis estadísticos de ANOVA, donde cada célula del estudio representó un dato para el análisis de los 2 experimentos analizados. La distribución de los datos, no cumplió la premisa de normalidad, por lo cual, se usó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, comparándose 2 grupos separados (NB, NBMK801, MC, MC MK801) y (NB, NBMK801, NMDA, NMDA MK801). En el caso de los datos porcentuales se obtuvo, la media aritmética, la desviación estándar y el error estándar.

Pruebas de inmunofluorescencia para revelar el rol del NMDAr y el MC sobre el desarrollo de axones y dendritas.

Antes de hacer los cultivos en placas plásticas, los primeros ensayos se montaron en vidrios de 12mm con neuronas del hipocampo de embriones de ratas de 19 días de gestación. El marcaje en cultivos celulares sobre cubreobjetos permite observar las células en el microscopio a 40X, con objetivos que utilizan aceite de inmersión, lo que resulta en imágenes bastante definidas. Esta técnica ha sido empleada en numerosas ocasiones en los laboratorios del IDEA, sin embargo, como se puede observar en la **figura 2.2**, muchos de estos cultivos resultaron tener abundantes áreas donde los procesos se encontraban rotos o dañados, principalmente los axones, pero también en las dendritas, este problema causó la obtención de resultados poco confiables. A pesar de realizar los procedimientos de fijación e inmunomarcaje con la mayor delicadeza posible y probar diferentes lotes del sustrato PDL (con lo cual se buscó mejorar la adherencia de las células), el problema persistió durante varios ensayos, por esta razón se decidió hacer el montaje de los sucesivos ensayos

directamente sobre placas de plástico de 48 pozos. Las imágenes igualmente se tomaron a 40X, pero con un objetivo seco de menor resolución.

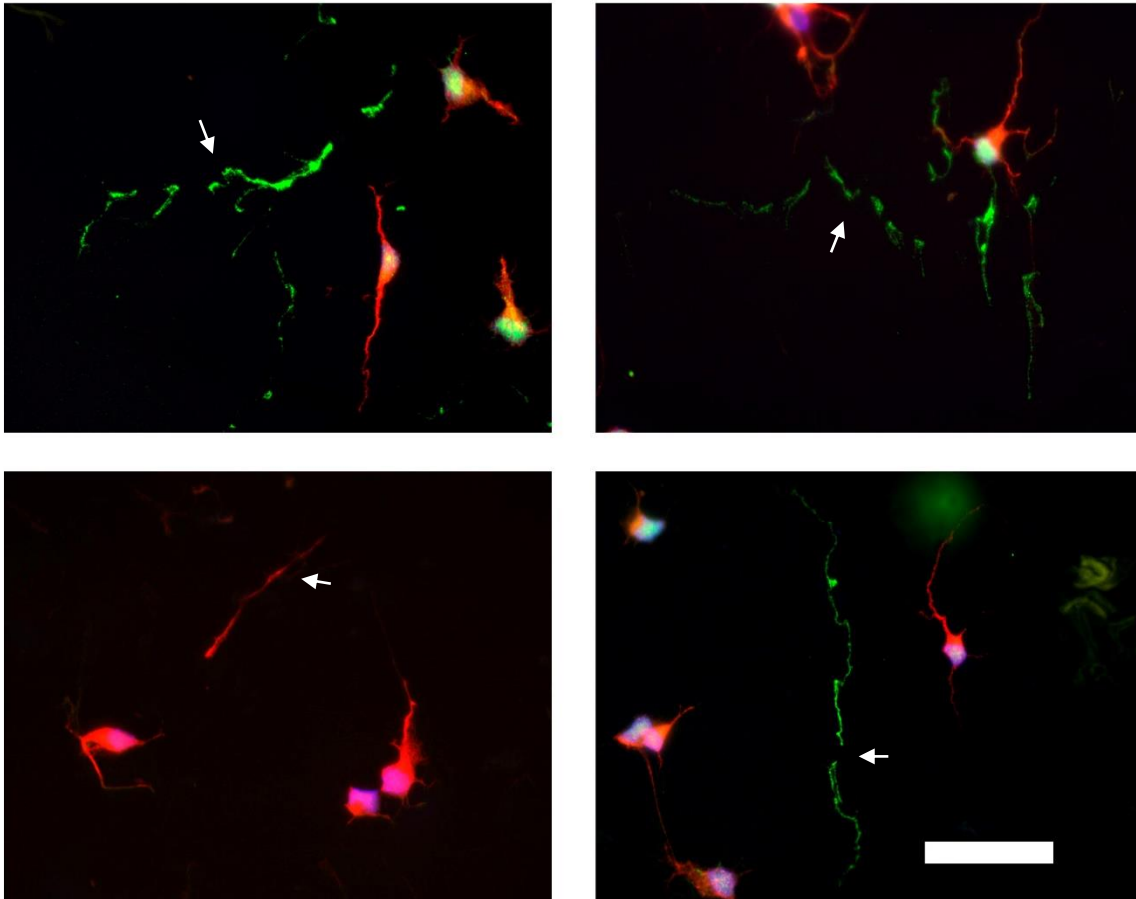


Figura 2.2. Problema experimental de inmunofluorescencia de cultivos sobre vidrios: Micrografías representativas neuronas del hipocampo de embriones de ratas con 19 días de gestación, a los 2 días de cultivo sobre cubreobjetos de 12mm, Las dendritas se inmunomarcaron con anticuerpos contra la proteína MAP-2 y se muestran en color rojo, los neurofilamentos-H de los axones se muestran en verde, y los núcleos de las células están marcados con DAPI en azul. Flechas blancas indican procesos rotos. Escala 50 μ m.

Resultados

Prueba de inmunofluorescencia para comprobar actividad de los MC recolectados

Para probar el rol del NMDAr en el efecto mediado por el MC, primeramente se realizó la obtención del MC. Se obtuvo el MC de 7 grupos de nervios cultivados separadamente. De cada uno de estos grupos se obtuvo 18ml aproximadamente, luego con la finalidad de verificar el nivel de actividad de estos medios, se realizó el cultivo de prueba, comparándolo con un medio control NB. En la **figura 3.1** se muestran micrografías donde podemos observar que todos los MC probados resultaron tener actividad promotora del crecimiento de neuroglia, específicamente astrocitos.

Primeramente tenemos el tratamiento control NB que favorece el crecimiento de neuronas sobre otros grupos celulares, donde se observó como era de esperarse, abundante presencia de neuronas pero poca presencia de astrocitos, además las neuronas se notaban más grandes y ramificadas que en los tratamientos con MC, donde se observó menos presencia de neuronas y mayor presencia de neuroglia. En todos los MC se observaron 2 tipos de astrocitos, el tipo 1 o (AsT-1) también llamado protoplasmático, el cual se muestra con un contorno irregular con procesos longitudinales en forma aplanada, abarcando amplias áreas del cultivo. El astrocito tipo 2 o (AsT-2) se observó de contorno más regular y con numerosos procesos filamentosos, ramificados y cilíndricos.¹³⁷ Aunque todos los MC mostraron actividad, los MC 3, 5, 6 y 7 revelaron tener mayor actividad. Los medios 3 y 5 fueron los utilizados para los cultivos donde se probaron los tratamientos para el estudio del rol del NMDAr.

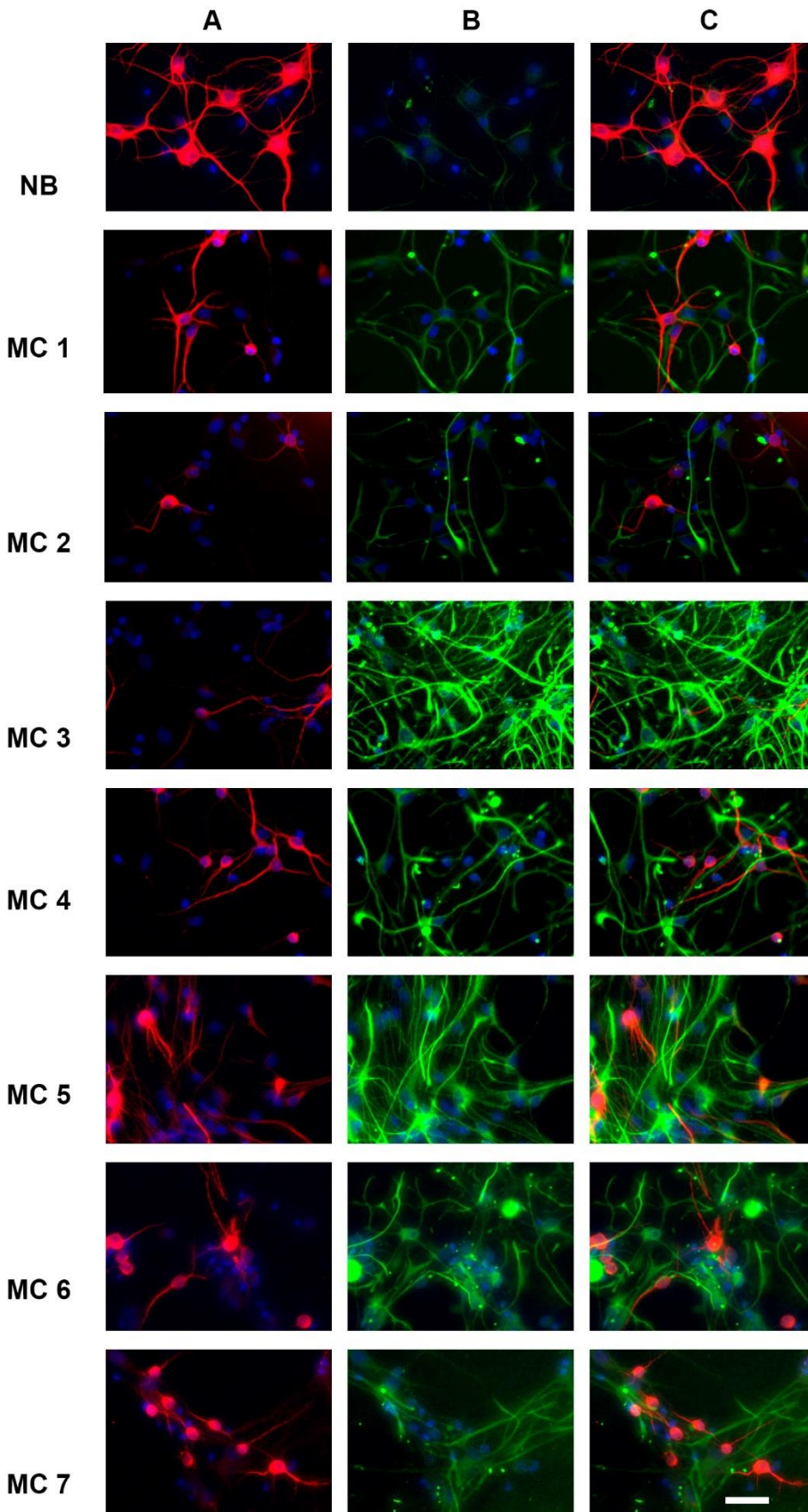


Figura 3.1. Efecto de distintos MC en la proporción de astrocitos y neuronas en cultivos: Micrografías representativas de células del hipocampo E19, a los 7 días de cultivo, en el lado izquierdo se indica el medio utilizado. A) Se observa el marcaje contra MAP-2, las neuronas en rojo. B) se observa el marcaje contra GFAP, los astrocitos en verde. C) se observa la superposición de A y B. Los núcleos están marcados con DAPI en azul, Escala 20µm.

En la **figura 3.2** se muestran micrografías de los cultivos en plástico, aquí como en la **figura 2.2**, se muestra únicamente la imagen resultado de la superposición de los canales: rojo para el marcaje con el anticuerpo contra MAP2, verde para el marcaje con el anticuerpo SMI35R y azul para el marcaje de los núcleos con DAPI, en la misma se puede apreciar que todos los tratamientos presentaron neuronas con neuritas, es importante mencionar que no todos los axones se observaron positivos para SMI35, sino que algunos fueron identificados como aquellas neuritas cuya longitud era al menos 3 veces mayor que la del promedio de todas las demás neuritas, estos axones son llamados SMI35 negativos.

En estos cultivos logramos notar que es común que en el desarrollo de los axones, los neurofilamentos-H se acumulen primero en la parte más distal del axón de la célula, ^{138 139} por lo que algunas veces no es claro el vínculo entre el axón y su soma, sin embargo con el marcaje de MAP-2 siempre se encuentra el enlace, esto es debido a que MAP-2 coexiste en el axón junto con los neurofilamentos-H, en los estadios en que se encontraban las neuronas de estos ensayos. ^{140 141}

También se puede mencionar que, en el cultivo, se encontraron varios casos de neuronas poliaxónicas, es decir neuronas con más de un axón, aunque en una proporción bastante minoritaria, solo un 2,14% de las células con axón. Un ejemplo se puede observar en la micrografía D de la **Figura 3.2**.

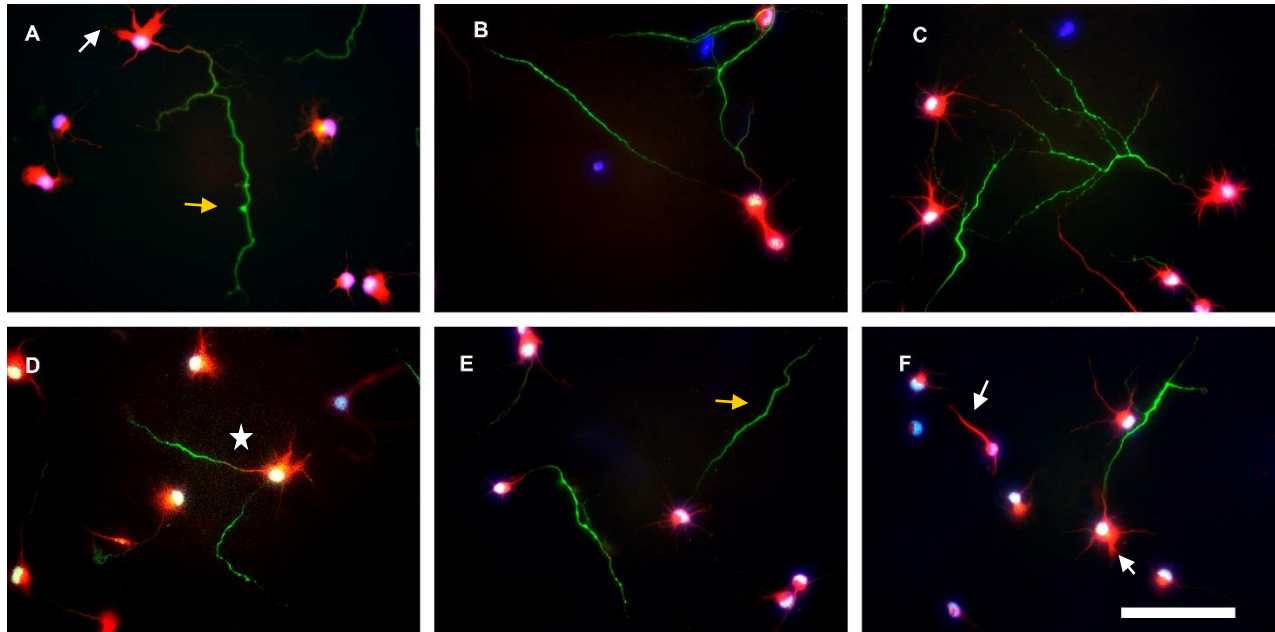


Figura 3.2. Efecto del bloqueo del NMDAr en cultivos de neuronas en presencia y ausencia de MC y NMDA: Micrografías representativas de la prueba de inmunofluorescencia de neuronas del hipocampo de embriones de ratas con 19 días de gestación, a los 2 días de cultivo. Las dendritas se inmunomarcaron con anticuerpos contra la proteína MAP-2 (se señalan algunas dendritas con flechas blancas) y se muestran en color rojo, los neurofilamentos-H de axones se muestran en verde (se señalan algunos axones con flechas amarilla), y los núcleos de las células están marcados con DAPI en azul, en D se marca con una estrella la neurona poliaxónica, cada imagen corresponde a un tratamiento: A) NB, B) MC, C) NB + NMDA, D) NB + MK801, E) MC + MK801 y F) NMDA + MK801. **Escala 100 μ m.**

En la **figura 3.2** se muestran micrografías de cultivos celulares de hipocampo E19 a las 48 horas tratadas con los distintos tratamientos que se indican en la figura. Como se observa en todos los casos se encontraron neuronas con dendritas y axones de tamaños variables. Principalmente de neuronas en el estadio 3 del desarrollo.

A continuación se muestran las gráficas realizadas para el análisis de los datos obtenidos.

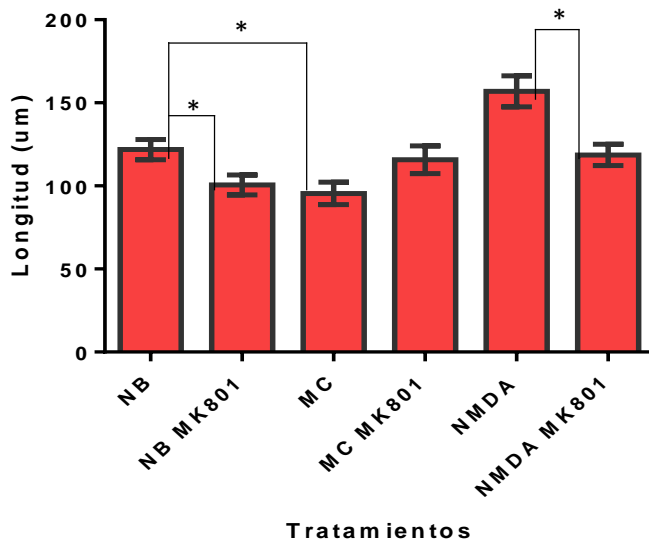


Figura 3.3. Comparación de la longitud promedio del árbol dendrítico por célula, de neuronas del hipocampo de ratas a los 2 días de cultivo, con los tratamientos que se indican en la figura, se midieron el siguiente número de células para cada tratamiento, NB: 150, NB MK801: 113, MC: 106, MC MK801: 99, NMDA: 104, NMDA MK801: 148. La línea sobre las barras revela diferencia significativa entre los tratamientos indicados, el asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$). La gráfica muestra el promedio por célula \pm SEM.

En la **figura 3.3** se muestra la cuantificación de la longitud promedio del árbol dendrítico por tratamiento, donde se observa como hubo una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el NB ($121,8 \pm 6\mu\text{m}$) y el MC ($95,4 \pm 6,8\mu\text{m}$), en este caso el control NB resultó tener mayor longitud del árbol dendrítico respecto al MC, lo que podría indicar que los factores presentes en el MC podrían estar impidiendo un mayor crecimiento de las dendritas. Este efecto tiende a revertirse al inhibir el NMDAr en el MC, sin embargo no es significativo, MC+MK801 ($115,7 \pm 8,4\mu\text{m}$). Es posible que el NMDAr esté mediando la respuesta del MC respecto a la longitud del árbol dendrítico, pero que se requiera aumentar el número de ensayos para obtener una diferencia significativa. Sin embargo,

llama la atención que al agregar el inhibidor MK801 al MC, la tendencia sea contraria a la de agregar el inhibidor a la condición control o al tratamiento de NMDA, esto hace pensar que el efecto de la actividad del NMDAR puede variar dependiendo de si existen otras señales activadas por otros factores.

Por otro lado el árbol dendrítico de las células con el tratamiento NMDA ($156,9 \pm 9,4\mu\text{m}$) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que las de células del control NB ($121,8 \pm 6\mu\text{m}$). Al añadir el inhibidor NMDA+MK801 ($118,6 \pm 6\mu\text{m}$), se revierte este efecto, a valores similares a los del NB (NMDA vs NMDA+MK801, $p < 0,01$), pudiendo esto indicar que la actividad del NMDAr favorece el crecimiento del árbol dendrítico.

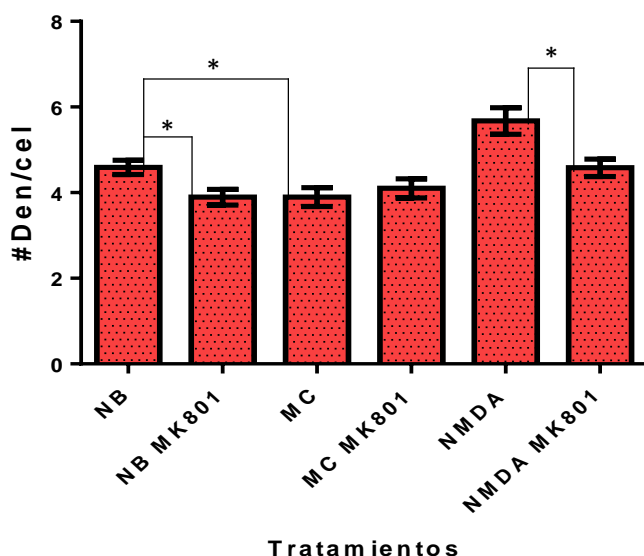


Figura 3.4. Comparación del número de dendritas por célula, en neuronas del hipocampo de ratas, a los 2 días de cultivo, con los tratamientos que se indican en la figura. La línea sobre las barras revela diferencia significativa entre los tratamientos indicados, el asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$). La gráfica muestra el promedio por célula \pm SEM.

Se evidencia en la **figura 3.4** la cuantificación del número de dendritas por célula para cada tratamiento indicado, el control NB ($4,59 \pm 0,17$ #Den/cel) es significativamente mayor ($p < 0,05$) que NB+MK801 ($3,89 \pm 0,18$ #Den/cel) y que el MC ($3,9 \pm 0,23$ #Den/cel), lo que sugiere que el número de dendritas por células se ve reducido, por la inhibición del NMDAr y por los factores presentes en el MC. Sin embargo, no hubo diferencias significativas al comparar MC ($3,9 \pm 0,23$ #Den/cel) y el MC+MK801 ($4,1 \pm 0,23$ #Den/cel) lo que podría indicar que el NMDAr no media este efecto, sin embargo es interesante que tampoco se encontraron diferencias significativas entre NB ($4,59 \pm 0,17$ #Den/cel) y MC+MK801 ($4,1 \pm 0,23$ #Den/cel), por lo cual es necesario realizar un mayor número de ensayos para corroborar si el NMDAr está implicado o no en la disminución del número de dendritas por célula, mediada por el MC. Por otro lado, el tratamiento NMDA ($5,68 \pm 0,31$ #Den/cel) no es significativamente mayor que el NB ($4,59 \pm 0,17$ #Den/cel), pero a pesar de que la tendencia de aumento en el número de dendritas por la activación del NMDAr no fue significativa, al agregar el inhibidor MK801, para bloquear la actividad del receptor, si disminuyo significativamente el número de las dendritas (NMDA vs NMDA+MK801, $p < 0.05$) a un valor muy similar al de NB (NB: $4,59 \pm 0,17$; NMDA+MK801: $4,58 \pm 0,2$)#Den/cel, considerando esta información es posible que el NMDAr si afecte el número de dendritas por célula y se haga más evidente al aumentar el número de ensayos.

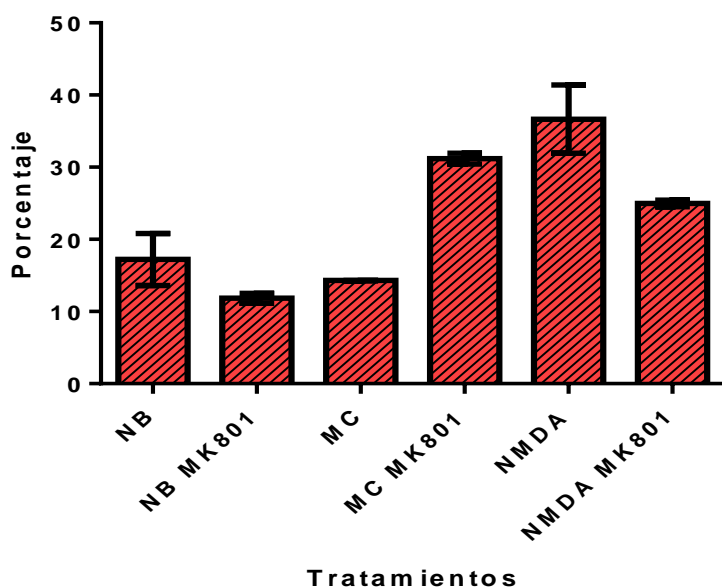


Figura 3.5. Porcentaje de células con dendritas ramificadas, a los 2 días de cultivo, con los tratamientos que se indican en la figura. La gráfica muestra el promedio por célula \pm SEM.

En la **figura 3.5** se muestra, el porcentaje de células con dendritas ramificadas, al observar el tratamiento NB ($17,22 \pm 2,5\%$) tiende a ser mayor que en el NB+MK801 ($11,85 \pm 0,49\%$) y el MC ($14,3\%$), lo que sugeriría que la inhibición del NMDAr y los factores en el MC están reduciendo el porcentaje de células con dendritas ramificadas, pero el tratamiento MC+MK801 ($31 \pm 0,53\%$) muestra un valor más elevado que el NB ($17,22 \pm 2,5\%$). Lo que indicaría que el bloqueo del NMDAr revierte el efecto inhibitorio de los factores del MC sobre el porcentaje de células con dendritas ramificadas, a valores superiores a los del control.

El tratamiento NMDA como en las gráficas anteriores muestra el mayor valor promedio respecto a los demás tratamientos, en este caso del porcentaje de células con dendritas ramificadas, es $36,7 \pm 3,3\%$, situándose sobre todos los demás, lo que indica que la actividad del NMDAr aumenta el porcentaje de células con dendritas ramificadas.

En el tratamiento NMDA+MK801, el MK801 revierte el efecto del NMDA sobre la ramificación de dendritas retornando de casi 37% a $24,9 \pm 0,3\%$, más cercano al valor de NB ($17,22 \pm 2,5\%$). Es importante notar que, al igual que sucede con el parámetro de longitud del árbol dendrítico por célula, el bloqueo de la actividad del receptor NMDA, parece tener un efecto opuesto en presencia de un único ligando, como es el caso del NMDA, que en presencia de numerosos factores como sucede en el caso del MC.

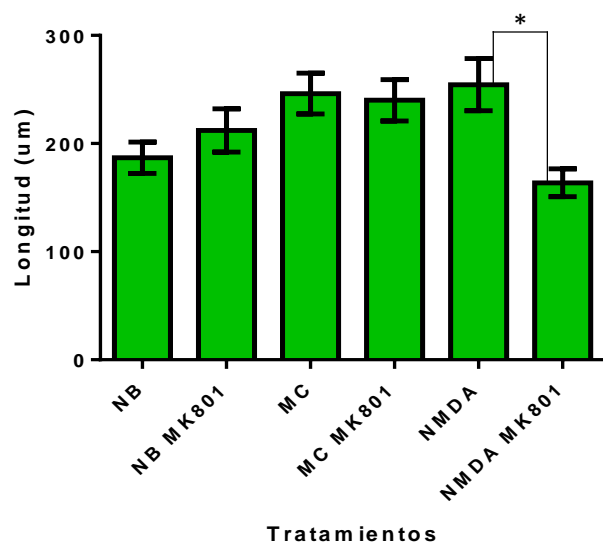


Figura 3.6. Comparación de la longitud promedio de axones por célula, de neuronas del hipocampo de ratas a los 2 días de cultivo, con los tratamientos que se indican en la figura, se midieron el siguiente número de células, NB: 85, NB+MK801: 69, MC: 84, MC+MK801: 68, NMDA: 65, NMDA+MK801: 96. La línea sobre las barras revela diferencia significativa entre los tratamientos indicados, el asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$). La gráfica muestra el promedio por célula \pm SEM.

La **Figura 3.6** muestra la cuantificación de la longitud promedio de los axones por célula. En cada tratamiento se contaron alrededor de 60-90 células, de campos escogidos al azar, las cuales fueron

discriminadas entre las que tenían o no axones. En todos los tratamientos se encontraron células con largos axones, además es interesante observar que en la **figura 3.6**, solo se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar el tratamiento NMDA ($254,5 \pm 24,2\mu\text{m}$) con NMDA+MK801 ($163,7 \pm 12,9\mu\text{m}$). Esto podría indicar que hay un efecto positivo en el crecimiento del axón gracias a la función del NMDAr. Además se nota una tendencia de mayor crecimiento del axón en el caso de los tratamientos con MC ($246,2 \pm 18,9\mu\text{m}$) respecto al tratamiento NB ($186,8 \pm 14,47\mu\text{m}$), pero como se mencionó anteriormente, esta tendencia no fue significativa. Lo que quizás pueda significar que los factores presentes en el MC están promoviendo un mayor crecimiento del axón, pero que se requieren más ensayos para aumentar el 'n' y poder obtener diferencias significativas.

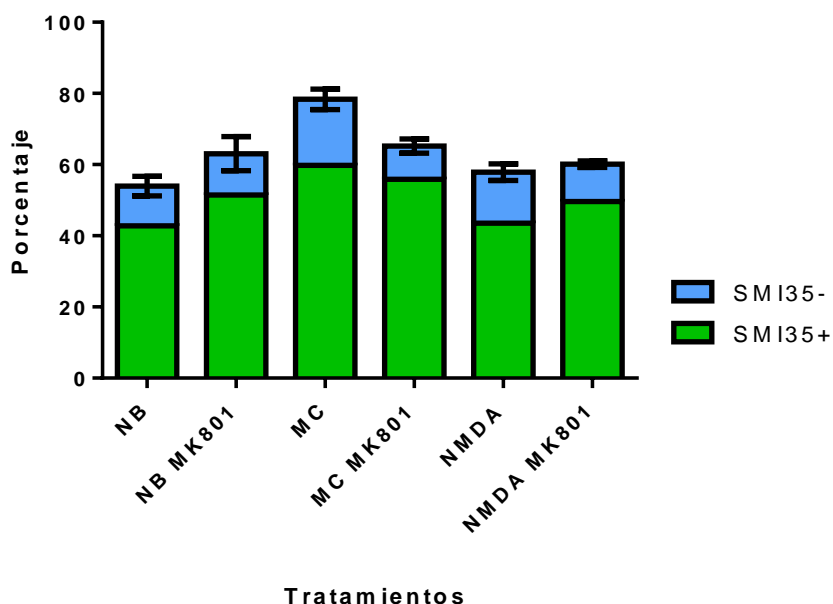


Figura 3.7. Porcentaje de células con axones. Cuantificación de axones SMI35+ (verde), SMI35- (azul), en neuronas del hipocampo de ratas a los 2 días de cultivo, con los tratamientos indicados. La gráfica muestra el promedio por célula \pm SEM.

En la **figura 3.7** se muestra el porcentaje de células con axones por cada tratamiento indicado, discriminando entre los SMI35+ en verde y los SMI35- en azul. Podemos observar como el porcentaje de células con axón se mantuvo por encima del 50% en todos los casos, notándose además el mayor porcentaje en el tratamiento con el MC, donde llegó al (78,34 ± 9,8%). En general, en todos los tratamientos se observa una mayor proporción de axones marcados SMI35+ que SMI35-. El menor porcentaje total se observó en el control NB (53,96 ± 3,6%).

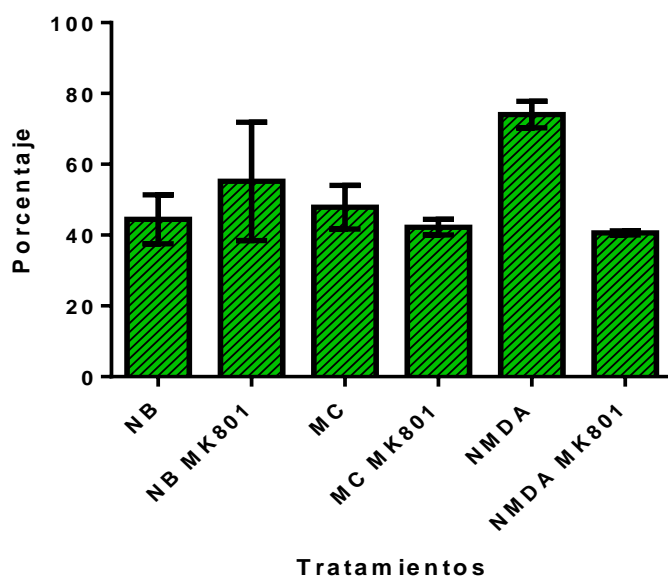


Figura 3.8. Porcentaje de células con axones ramificados, a los 2 días de cultivo, con los tratamientos que se indican en la figura. La gráfica muestra el promedio por célula ± SEM.

En la **figura 3.8** se muestra, el porcentaje de células con axones ramificados por cada tratamiento, se observa como el porcentaje de células con axones ramificados se mantuvo un por encima del 40% en el caso de los tratamientos NB (44,43 ± 6,9%), MC (47,89 ± 6,2%), MC+MK801 (42,22 ± 2,2%) y NMDA+MK801 (40,59 ± 0,6%). El tratamiento NB+MK801 fue el de resultados más variables pero

su media se situó en $(55,17 \pm 16,7\%)$ de células con axones ramificados, posicionándose por encima de los anteriormente mencionados. Sin embargo, el tratamiento NMDA con un $(74 \pm 3,8\%)$ fue el de mayor porcentaje de células con axones ramificados, lo que sugiere que la actividad NMDAr pudiera estar promoviendo el porcentaje de células ramificadas, Por otra parte, el MC no parece afectar el porcentaje de células ramificadas ya que su valor es bastante parecido al control NB.

Discusión

En la presente tesis se ha estudiado, el papel del NMDAr y el efecto de los factores liberados por nervios ciáticos durante su degeneración en cultivo, los cuales están contenidos en el MC, sobre el desarrollo de axones y dendritas de neuronas provenientes del hipocampo de embriones de rata con 19 días de gestación. Más aun, se estudió si el receptor de NMDA podía estar involucrado en los efectos del MC sobre la diferenciación de las neuronas del hipocampo.

Se ha llevado a cabo un análisis cuantitativo de las características de estas células, cuyos resultados pueden usarse como referencia morfométrica del desarrollo neuronal.

Respecto a la polaridad de la neurona se observó que a los dos días de cultivo se encontraba MAP2 en la mayoría de los axones, independientemente del tratamiento, esto puede deberse a que la composición molecular del citoesqueleto axonal y dendrítico es similar en los primeros estadios del cultivo, cuando los procesos no se encuentran maduros o están empezando a definirse.¹⁴⁰ Sin embargo, se ha reportado ampliamente que la proteína MAP2, se encuentra exclusivamente asociada al árbol dendrítico de las neuronas y no a los procesos axonales, para las neuronas en estadios de desarrollo posteriores,^{142 143 144 140} fenómeno que no se evidenció en este caso, debido al estadio de las células que se escogió para realizar el estudio. El SMI35, por su parte, reconoce

neurofilamentos-H fosforilados ¹⁴⁵ presentes sólo en los axones. ^{13 140 146} Se observó que los neurofilamentos-H se acumulan en la parte distal del axón, esto concuerda con lo obtenido por otros autores para las neuronas del ganglio de la raíz dorsal del sistema periférico. ^{139 138} En este sentido, es posible que la acumulación de los neurofilamentos-H en el axón sea un proceso conservado, e independiente del tipo de neurona.

Por otra parte, respecto a los estudios del MC, es importante mencionar que Villegas y colaboradores en 1995 ¹⁴⁷ demostraron que el MC induce neuritogénesis en ganglios ciliares de pollo y ganglios de la raíz dorsal de embriones de rata. Además, teniendo en cuenta que luego de una degeneración walleriana, el SNP puede tardar hasta dos semanas para completar la regeneración, mientras que en el SNC es un proceso tan lento que puede durar meses o incluso años, ^{148 149} es lógico pensar que los factores liberados por el SNP luego de una lesión promueven la regeneración de las células nerviosas, sin embargo como ya ha sido reportado ¹⁰ el MC, que contiene estos factores, afecta el grado de madurez del axón de las neuronas del hipocampo, al disminuir la longitud de los axones, la expresión de neurofilamentos-H y las I_{Na} desarrolladas por estas células, así mismo se ha reportado una disminución de la longitud del árbol dendrítico. Los resultados relacionados a los parámetros de las dendritas del presente trabajo concuerdan con los reportados previamente, el MC disminuye la longitud del árbol dendrítico, sin embargo los resultados asociados a la longitud del axón son contradictorios con lo que se ha encontrado en este estudio, ya que no se vio disminuida la longitud de los axones, de hecho este parámetro aunque no fue significativamente diferente, en el MC tiende a ser mayor que en el control NB. Es difícil decir con certeza a qué se deba esto, es posible que hayan variadas algunas condiciones entre los cultivos, relacionadas a los lotes de suplemento o al sustrato empleado, los datos que se obtuvieron para el presente trabajo provienen de cultivos en plástico, cuando los anteriores estudios fueron en vidrio, siendo posible

que esto afecte en mayor medida a los axones por ser procesos más largos que las dendritas. Considerando estas diferencias, es vital realizar nuevas extracciones de MC y probar nuevos lotes de suplemento y sustrato para poder corroborar el efecto del MC y el NMDAr sobre el desarrollo axonal, empleando cultivos sobre vidrio y cultivos sobre placas plásticas.

En relación a los resultados obtenidos para los parámetros de las dendritas con el MC y el inhibidor del receptor de NMDA, es importante señalar que en otra línea de investigación en el 2006, un grupo de investigadores encontraron que la señalización de NRG1 por unión a su receptor erbB4, en interacción con PSD-95, puede contribuir a la hipofunción del NMDAr en la esquizofrenia.¹⁵⁰ Luego en 2011 otro grupo consigue que la hipofunción del NMDAr en el hipocampo y la corteza prefrontal, mediada por NRG1-ErbB4 se restringe a los NMDAr sinápticos, lo que impide la potenciación a largo plazo y explica la disfunción cognitiva en la enfermedad. Además proponen que esta restricción sobre los NMDAr esta mediada por la proteína tirosina quinasa Src.¹⁵¹ Según este modelo la actividad del NMDAr se vería disminuida en el MC, dado que en este medio se ha encontrado NRG1,^{28 125} lo que activaría la vía NRG1-ErbB4, este modelo concuerda con lo encontrado en este trabajo, si nos fijamos, el MC y el NB con MK801 mostraron comportamientos similares y no se hallaron diferencias significativas en ningún caso entre estos tratamientos, esto podría indicar que efectivamente, el efecto del MC disminuye la actividad del NMDAr, como ocurre cuando el NMDAr es inhibido por MK801 en el medio NB. Sin embargo, llama la atención que al bloquear la actividad del NMDAr en presencia del MC, la tendencia de los parámetros relacionados a las dendritas es contraria a la del bloqueo de la actividad en la condición control (NB) y en el tratamiento con NMDA, posiblemente esto se debe a la presencia de otros factores en el MC, es sabido que en el MC hay factores que promueven y otros que inhiben la polaridad neuronal,¹⁰ es posible que el conjunto de señales activadas por otros factores cambien el efecto de la actividad del receptor de NMDA sobre

el árbol dendrítico. Por lo cual, se requerirá de más estudios para dilucidar todos los mecanismos implicados.

Con respecto a los resultados obtenidos con los tratamientos de NMDA y MK801, como se mencionó anteriormente, se ha reportado que en células P19 el aumento de Ca^{2+} intracelular por parte del NMDAr, juega un papel importante en el proceso de diferenciación de esta línea celular a neuronas, ya que al inhibir la actividad del NMDAr con ifenprodil, afecta gravemente la extensión de las neuritas.¹³³ Lo que concuerda con lo observado en este trabajo, cuando se compara el tratamiento NMDA vs. NMDA MK801, tanto en axones como en dendritas, hay una diferencia significativa que indica que la actividad del NMDAr permite una mayor extensión de las neuritas.

Una tesis que contribuye al modelo del NMDAr como un promotor del desarrollo neuronal viene dada por estudios en los que emplean la regulación negativa sobre la entrada de calcio del NMDAr por su subunidad NR3A, la co-expresión de NR1/NR3A forma receptores de glicina excitadores, insensibles al glutamato, al NMDA, y al bloqueo por Mg^{2+} o inhibidores como el MK801,¹⁵² además como ya ha sido mencionado, la presencia de esta subunidad en los tetrámeros reduce la entrada de Ca^{2+} y no permite la estabilización y el fortalecimiento prematuros de las sinapsis excitatorias.⁹⁸ En ratones knockout para NR3A se evidenciaron, respuestas acentuadas del NMDAr y un aumento de las espinas dendríticas en las neuronas tempranas cerebrocorticales postnatales.^{96 153} Esto confirma el rol del NMDAr en el desarrollo neuronal.

En estudios previos de otro grupo de investigación, determinaron que existe una relación entre el NMDAr y RhoA, donde además encontraron que aumentando la actividad de Rac, selectivamente aumentaba la extensión de ramas del árbol dendrítico, de forma dependiente de receptores de glutamato NMDAr, este fenómeno también ocurría al aumentar la actividad de Cdc42, aunque en menor medida, lo que tiene sentido si consideramos que Rac y Cdc42 forman parte de una vía con un ciclo de retroalimentación positivo que activa a Akt, la cual a su vez inhibe GSK3 β , lo que finalmente promueve la elongación de las neuritas,⁵³ y es la misma vía que activa la NRG1 por medio de receptores ErbB.³³ Por otro lado también encontraron que activando RhoA, se reducía el crecimiento del árbol dendrítico.¹⁵⁴ Poco después se confirmó que el crecimiento del árbol dendrítico efectivamente estaba mediado por NMDAr y que la activación de estos receptores causaban la disminución de la actividad de RhoA.¹⁵⁵ Estos hallazgos coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo y podrían brindar una explicación de su mecanismo de acción.

Con respecto al papel del receptor NMDA en el desarrollo del axón, algunos trabajos reportan que los componentes de la mielina disminuyen la elongación de las neuritas y que el bloqueo del NMDAr revierte este efecto.¹²⁹ Desde este punto de vista podría verse al NMDAr como un inhibidor de la elongación de las neuritas, esto contradice los resultados que se han obtenido en este y otros trabajos, ya que en general los hallazgos obtenidos respaldan el rol del NMDAr como un promotor de la longitud de los axones y dendritas, se apunta a que el NMDAr contribuye al desarrollo de la neurona. Es posible que estas diferencias se deban a que la activación del NMDAr tenga un efecto diferente dependiendo del balance de otras señales, activadas por otros factores como la mielina. Sin embargo se debe notar que el MC, el cual contiene inhibidores de la mielina, en este caso no ejerció un efecto inhibitorio sobre la longitud de los axones. Por otra parte, estos resultados que colocan al NMDAr como un inhibidor de la elongación de las neuritas se han reportado para

neuronas del hipocampo P1, es decir neuronas del hipocampo de ratas con un día de nacidas, en el presente trabajo se usaron neuronas del hipocampo de embriones de rata con 19 días de gestación, es posible que la función del NMDAr sobre el crecimiento de las neuritas varíe dependiendo del estado de madurez de la célula, como ocurre en el caso de los componentes de la mielina que promueven la elongación en embriones, pero inhiben su desarrollo en animales adultos.^{59 156}

Conclusiones y recomendaciones

Todos los MC probados demostraron tener actividad mediante la identificación inmunocitoquímica de células GFAP positivas a los 7 días en cultivo.

El MC afectó negativamente el grado de diferenciación de las neuronas del hipocampo de embriones de rata, respecto al número de dendritas por célula y la longitud del árbol dendrítico.

Inhibir el NMDAr disminuyó significativamente el número de dendritas por célula, sin embargo cuando están presentes los factores del MC y se inhibe el NMDAr se observa la tendencia contraria.

Se requiere de la realización de un mayor número de ensayos para corroborar si el NMDAr está involucrado en los efectos mediados por el MC sobre el árbol dendrítico de las neuronas.

La activación del NMDAr por unión del ligando NMDA, favorece el desarrollo de axones y dendritas

en neuronas del hipocampo de embriones de rata E19 a los dos días de cultivo y el inhibidor MK801 es capaz de bloquear efectivamente este efecto.

Se recomienda que para cultivo de células con largos procesos se realice el cultivo sobre placas plásticas que brindan mejor adherencia que el vidrio.

Referencias

1. Cayre, M., Malaterre, J., Scotto-Lomassese, S., Strambi, C. & Strambi, A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **132**, 1–15 (2002).
2. Gómez-Álvarez, R. P. *Citología e histología vegetal y animal*. (McGraw-Hill Interamericana, 2011).
3. Ripoll, D. R. *Fundamentos de psicobiología*. (Editorial UOC, 2010).
4. Devlin, T. M. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. (Reverte, 2004).
5. (Editores), M. I. E. Hernán J. Pimienta. *Sistema nervioso*. (Universidad del Valle, 2003).
6. Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*. (Garland Science, 2007).
7. Purves, D. *Neuroscience*. (Sinauer Associates, 2012).
8. Sopena, E. R. *Atlas Sopena del cuerpo y la vida: anatomía, fisiología, genética, salud y enfermedad*. (Editorial Ramón Sopena, 1989).
9. Micheli, F. E. & Pardal, M. M. F. *Neurología*. (Ed. Médica Panamericana, 2010).

10. García Lisbeth. Trabajo de grado para optar por el título de Doctor en la Universidad Simón Bolívar. Efecto de factores liberados por nervios periféricos en la diferenciación de células PC12 y células del hipocampo. (2013).
11. Jareb, M. & Banker, G. Inhibition of axonal growth by brefeldin A in hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 8955–8963 (1997).
12. Campaña, A. D. *et al.* Dendritic morphology on neurons from prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens is altered in adult male mice exposed to repeated low dose of malathion. *Synap. N. Y. N* **62**, 283–290 (2008).
13. Kaech, S. & Banker, G. Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* **1**, 2406–2415 (2006).
14. Bakker, A., Kirwan, C. B., Miller, M. & Stark, C. E. L. Pattern Separation in the Human Hippocampal CA3 and Dentate Gyrus. *Science* **319**, 1640–1642 (2008).
15. Dotti, C. G., Sullivan, C. A. & Banker, G. A. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **8**, 1454–1468 (1988).
16. Yoshimura, T., Arimura, N. & Kaibuchi, K. Signaling networks in neuronal polarization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 10626–10630 (2006).
17. Goslin, K. & Banker, G. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* **108**, 1507–1516 (1989).
18. Valtorta, F. & Leoni, C. Molecular mechanisms of neurite extension. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **354**, 387–394 (1999).
19. Trigos Anna. Trabajo de grado para el título de licenciado en la Universidad Simón Bolívar. Evaluación del efecto de un medio condicionado de nervios ciáticos de ratas carente de Pro-NGF en la polarización de células PC12. (2010).

20. Berlucchi, G. Some aspects of the history of the law of dynamic polarization of the neuron. From William James to Sherrington, from Cajal and van Gehuchten to Golgi. *J. Hist. Neurosci.* **8**, 191–201 (1999).
21. Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. *Principios de neurociencia*. (McGraw-Hill Interamericana de España, 2001).
22. Alberts, B. & Bray, D. *Introducción a la biología celular*. (Ed. Médica Panamericana, 2006).
23. Barnes, A. P. & Polleux, F. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* **32**, 347–381 (2009).
24. Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 609–642 (2003).
25. Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G. & Poo, M.-M. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* **129**, 565–577 (2007).
26. Sosa, L. *et al.* IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* **9**, 993–995 (2006).
27. Esch, T., Lemmon, V. & Banker, G. Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 6417–6426 (1999).
28. Villegas, R. *et al.* Neuregulin found in cultured-sciatic nerve conditioned medium causes neuronal differentiation of PC12 cells. *Brain Res.* **852**, 305–318 (2000).
29. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127–137 (2001).
30. Holmes, W. E. *et al.* Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* **256**, 1205–1210 (1992).

31. Guy, P. M., Platko, J. V., Cantley, L. C., Cerione, R. A. & Carraway, K. L. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8132–8136 (1994).
32. Riese, D. J., van Raaij, T. M., Plowman, G. D., Andrews, G. C. & Stern, D. F. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5770–5776 (1995).
33. Birchmeier, C. ErbB receptors and the development of the nervous system. *Exp. Cell Res.* **315**, 611–618 (2009).
34. Chen, M. S. *et al.* Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* **403**, 434–439 (2000).
35. GrandPré, T., Nakamura, F., Vartanian, T. & Strittmatter, S. M. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* **403**, 439–444 (2000).
36. Prinjha, R. *et al.* Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* **403**, 383–384 (2000).
37. Oertle, T. *et al.* Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 5393–5406 (2003).
38. Venkatesh, K. *et al.* The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 808–822 (2005).
39. Wang, K. C. *et al.* Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* **417**, 941–944 (2002).
40. Kim, W.-Y. & Snider, W. D. Neuroscience. Overcoming inhibitions. *Science* **322**, 869–872 (2008).

41. Hu, F. & Strittmatter, S. M. The N-terminal domain of Nogo-A inhibits cell adhesion and axonal outgrowth by an integrin-specific mechanism. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 1262–1269 (2008).
42. McKerracher, L. *et al.* Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* **13**, 805–811 (1994).
43. Trapp, B. D. Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **605**, 29–43 (1990).
44. Mikol, D. D. & Stefansson, K. A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* **106**, 1273–1279 (1988).
45. Mikol, D. D., Gulcher, J. R. & Stefansson, K. The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. *J. Cell Biol.* **110**, 471–479 (1990).
46. Koprivica, V. *et al.* EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Science* **310**, 106–110 (2005).
47. Yiu, G. & He, Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 617–627 (2006).
48. Ménager, C., Arimura, N., Fukata, Y. & Kaibuchi, K. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J. Neurochem.* **89**, 109–118 (2004).
49. Shi, S.-H., Jan, L. Y. & Jan, Y.-N. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* **112**, 63–75 (2003).
50. Hannigan, G., Troussard, A. A. & Dedhar, S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 51–63 (2005).

51. Scheid, M. P. & Woodgett, J. R. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 760–768 (2001).
52. Jiang, H., Guo, W., Liang, X. & Rao, Y. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell* **120**, 123–135 (2005).
53. Yoshimura, T. *et al.* GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* **120**, 137–149 (2005).
54. Grimes, C. A. & Jope, R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* **65**, 391–426 (2001).
55. Hülsken, J., Birchmeier, W. & Behrens, J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **127**, 2061–2069 (1994).
56. Zhou, F.-Q. & Snider, W. D. Cell biology. GSK-3beta and microtubule assembly in axons. *Science* **308**, 211–214 (2005).
57. Arimura, N. & Kaibuchi, K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 194–205 (2007).
58. Pino, P. del & Del, A. M. Modulación de la elongación axonal y la excitabilidad neuronal por receptores purinérgicos P2Y1, P2Y13 y P2X7. (2013). at <https://repositorio.uam.es/xmlui/handle/10486/14121>
59. Hasegawa, Y. *et al.* Promotion of axon regeneration by myelin-associated glycoprotein and Nogo through divergent signals downstream of Gi/G. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 6826–6832 (2004).
60. Domeniconi, M. *et al.* MAG induces regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* **46**, 849–855 (2005).
61. Lodish, H. *Biología celular y molecular*. (Ed. Médica Panamericana, 2005).

62. Sakumura, Y., Tsukada, Y., Yamamoto, N. & Ishii, S. A molecular model for axon guidance based on cross talk between rho GTPases. *Biophys. J.* **89**, 812–822 (2005).
63. Mattson, M. P. & Kater, S. B. Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **7**, 4034–4043 (1987).
64. Ferreira, A., Kincaid, R. & Kosik, K. S. Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity. *Mol. Biol. Cell* **4**, 1225–1238 (1993).
65. Kuhn, T. B., Williams, C. V., Dou, P. & Kater, S. B. Laminin directs growth cone navigation via two temporally and functionally distinct calcium signals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **18**, 184–194 (1998).
66. Mattson, M. P., Murain, M. & Guthrie, P. B. Localized calcium influx orients axon formation in embryonic hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **52**, 201–209 (1990).
67. Gomez, T. M. & Spitzer, N. C. In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* **397**, 350–355 (1999).
68. Choi, null. Dynamic model of neural networks. *Phys. Rev. Lett.* **61**, 2809–2812 (1988).
69. Sattler, R. & Tymianski, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **78**, 3–13 (2000).
70. Collingridge, G. L. & Lester, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* **41**, 143–210 (1989).
71. Receptores metabotrópicos de glutamato: nuevas dianas moleculares en la terapia de enfermedades neurológicas y psiquiátricas - Revista de Neurología. at <<http://www.revneurolog.com/sec/resumen.php?or=web&i=e&id=2004627>>
72. Schoepp, D., Bockaert, J. & Sladeczek, F. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 508–515 (1990).

73. Sugiyama, H., Ito, I. & Hirono, C. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* **325**, 531–533 (1987).
74. Michaelis, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* **54**, 369–415 (1998).
75. Hollmann, M. & Heinemann, S. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 31–108 (1994).
76. Kuner, T., Wollmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. H. & Sakmann, B. Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* **17**, 343–352 (1996).
77. Bigge, C. F. Ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 441–447 (1999).
78. Paas, Y. The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends Neurosci.* **21**, 117–125 (1998).
79. Wo, Z. G. & Oswald, R. E. Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci.* **18**, 161–168 (1995).
80. Brady, S., Siegel, G., Albers, R. W. & Price, D. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. (Academic Press, 2005).
81. Llansola, M., Sanchez-Perez, A., Cauli, O. & Felipe, V. Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *Cerebellum Lond. Engl.* **4**, 154–161 (2005).
82. Jones, K. A. & Baughman, R. W. Both NMDA and non-NMDA subtypes of glutamate receptors are concentrated at synapses on cerebral cortical neurons in culture. *Neuron* **7**, 593–603 (1991).
83. Mayer, M. L., Westbrook, G. L. & Guthrie, P. B. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**, 261–263 (1984).

84. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. & Prochiantz, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462–465 (1984).
85. Johnson, J. W. & Ascher, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**, 529–531 (1987).
86. Kleckner, N. W. & Dingledine, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* **241**, 835–837 (1988).
87. Wolosker, H. D-serine regulation of NMDA receptor activity. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2006**, pe41 (2006).
88. Collingridge, G. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* **330**, 604–605 (1987).
89. Li, F. & Tsien, J. Z. Memory and the NMDA receptors. *N. Engl. J. Med.* **361**, 302–303 (2009).
90. Schorge, S. & Colquhoun, D. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 1151–1158 (2003).
91. Cull-Candy, S., Brickley, S. & Farrant, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 327–335 (2001).
92. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. & Seeburg, P. H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529–540 (1994).
93. Jatzke, C., Watanabe, J. & Wollmuth, L. P. Voltage and concentration dependence of Ca²⁺ permeability in recombinant glutamate receptor subtypes. *J. Physiol.* **538**, 25–39 (2002).
94. Cathala, L., Misra, C. & Cull-Candy, S. Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 5899–5905 (2000).

95. Ciabarra, A. M. *et al.* Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **15**, 6498–6508 (1995).
96. Das, S. *et al.* Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* **393**, 377–381 (1998).
97. Henson, M. A., Roberts, A. C., Pérez-Otaño, I. & Philpot, B. D. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog. Neurobiol.* **91**, 23–37 (2010).
98. Roberts, A. C. *et al.* Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation. *Neuron* **63**, 342–356 (2009).
99. Sergio Gascón Jiménez, M. D.-G. G. Trabajo de grado para optar por el título de Doctor en la Universidad Autónoma de Madrid. Mecanismos de regulación del receptor de glutamato tipo NMDA en excitotoxicidad e isquemia cerebral. (2011).
100. Stephenson, F. A. Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr. Drug Targets* **2**, 233–239 (2001).
101. Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S. & Mizuno, N. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J. Comp. Neurol.* **347**, 150–160 (1994).
102. Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. & Mishina, M. Distinct spatio-temporal distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **707**, 463–466 (1993).
103. Papadia, S., Stevenson, P., Hardingham, N. R., Bading, H. & Hardingham, G. E. Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 4279–4287 (2005).

104. Zhang, S.-J. *et al.* Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genet.* **5**, e1000604 (2009).
105. Papadia, S. *et al.* Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat. Neurosci.* **11**, 476–487 (2008).
106. Thomas, G. M. & Huganir, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 173–183 (2004).
107. Lafon-Cazal, M., Perez, V., Bockaert, J. & Marin, P. Akt mediates the anti-apoptotic effect of NMDA but not that induced by potassium depolarization in cultured cerebellar granule cells. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 575–583 (2002).
108. Garcia, R. A., Vasudevan, K. & Buonanno, A. The neuregulin receptor ErbB-4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3596–3601 (2000).
109. Kim, E. & Sheng, M. PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 771–781 (2004).
110. Levine, E. S., Crozier, R. A., Black, I. B. & Plummer, M. R. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10235–10239 (1998).
111. Lin, S. Y. *et al.* BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **55**, 20–27 (1998).
112. Caldeira, M. V. *et al.* BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **35**, 208–219 (2007).

113. Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. & Bading, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* **5**, 405–414 (2002).
114. Bano, D. *et al.* Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* **120**, 275–285 (2005).
115. Lee, J., Duan, W. & Mattson, M. P. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* **82**, 1367–1375 (2002).
116. Huettner, J. E. & Bean, B. P. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 1307–1311 (1988).
117. Villegas, G. M., Haustein, A. T. & Villegas, R. Neuronal differentiation of PC12 and chick embryo ganglion cells induced by a sciatic nerve conditioned medium: characterization of the neurotrophic activity. *Brain Res.* **685**, 77–90 (1995).
118. Villegas, R., Villegas, G. M., Núñez, J., Hernández, M. & Castillo, C. Neuron-like differentiation of PC12 cells treated with media conditioned by either sciatic nerves, optic nerves, or Schwann cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **25**, 451–461 (2005).
119. Greene, L. A. & Tischler, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 2424–2428 (1976).
120. Longart, M. *et al.* Sciatic nerve conditioned medium depleted of pro-NGF modulates sodium currents and neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroscience* **159**, 550–558 (2009).

121. Castillo, C., Carreño, F., Villegas, G. M. & Villegas, R. Ionic currents in PC12 cells differentiated into neuron-like cells by a cultured-sciatic nerve conditioned medium. *Brain Res.* **911**, 181–192 (2001).
122. Xu, X. & Shrager, P. Dependence of axon initial segment formation on Na⁺ channel expression. *J. Neurosci. Res.* **79**, 428–441 (2005).
123. García, L. *et al.* ErbB receptors and PKC regulate PC12 neuronal-like differentiation and sodium current elicitation. *Neuroscience* **236**, 88–98 (2013).
124. García, L., Tirado, M., Caraballo, J., Hernandez, D. & Castillo, C. Factors Released by Sciatic Nerve Regulate Intracellular Calcium in Hippocampal Neurons. Program N°:130.14. 2013 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience. Online. (2013).
125. Malavé, C. *et al.* Role of glypican-1 in the trophic activity on PC12 cells induced by cultured sciatic nerve conditioned medium: identification of a glypican-1-neuregulin complex. *Brain Res.* **983**, 74–83 (2003).
126. Gu, Z., Jiang, Q., Fu, A. K. Y., Ip, N. Y. & Yan, Z. Regulation of NMDA Receptors by Neuregulin Signaling in Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* **25**, 4974–4984 (2005).
127. Li, B., Woo, R.-S., Mei, L. & Malinow, R. ErbB4, a receptor of the schizophrenia-linked protein neuregulin-1, controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* **54**, 583–597 (2007).
128. du Bois, T. M., Newell, K. A. & Huang, X.-F. Perinatal phencyclidine treatment alters neuregulin 1/erbB4 expression and activation in later life. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* **22**, 356–363 (2012).
129. Sarit Derey. Trabajo de grado para optar por el título de Doctor en la ciudad universitaria de New York. Glutamate Receptor Signaling is a Mediator of Neurite Outgrowth Inhibition by MAG. (2010).

130. Morley, P., MacPherson, P., Whitfield, J. F., Harris, E. W. & McBurney, M. W. Glutamate receptor-mediated calcium surges in neurons derived from P19 cells. *J. Neurochem.* **65**, 1093–1099 (1995).
131. Canzoniero, L. M. *et al.* Glutamate receptor-mediated calcium entry in neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells. *J. Neurosci. Res.* **45**, 226–236 (1996).
132. Chistina Grobin, A., Inglefield, J. R., Schwartz-Bloom, R. D., Devaud, L. L. & Morrow, A. L. Fluorescence imaging of GABAA receptor-mediated intracellular [Cl⁻] in P19-N cells reveals unique pharmacological properties. *Brain Res.* **827**, 1–11 (1999).
133. Georgiev, D., Taniura, H., Kambe, Y., Takarada, T. & Yoneda, Y. A critical importance of polyamine site in NMDA receptors for neurite outgrowth and fasciculation at early stages of P19 neuronal differentiation. *Exp. Cell Res.* **314**, 2603–2617 (2008).
134. Longart M. Caracterizacion de la actividad neurotrofica liberada por el nervio ciatico en cultivo. (1999).
135. Brustovetsky, T., Pellman, J. J., Yang, X.-F., Khanna, R. & Brustovetsky, N. Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) interacts with N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and Na⁺/Ca²⁺ exchanger and regulates their functional activity. *J. Biol. Chem.* **289**, 7470–7482 (2014).
136. Longart, M., Liu, Y., Karavanova, I. & Buonanno, A. Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J. Comp. Neurol.* **472**, 156–172 (2004).
137. Raff, M. C., Abney, E. R. & Miller, R. H. Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve. *Dev. Biol.* **106**, 53–60 (1984).
138. Shen, H., Barry, D. M. & Garcia, M. L. Distal to proximal development of peripheral nerves requires the expression of neurofilament heavy. *Neuroscience* **170**, 16–21 (2010).

139. Yabe, J. T., Wang, F. S., Chylinski, T., Katchmar, T. & Shea, T. B. Selective accumulation of the high molecular weight neurofilament subunit within the distal region of growing axonal neurites. *Cell Motil. Cytoskeleton* **50**, 1–12 (2001).
140. Matus, A., Bernhardt, R., Bodmer, R. & Alaimo, D. Microtubule-associated protein 2 and tubulin are differently distributed in the dendrites of developing neurons. *Neuroscience* **17**, 371–389 (1986).
141. Correa, G. & Longart, M. Análisis morfométrico del proceso de diferenciación in vitro de neuronas del hipocampo. *Investig. Clínica* **51**, 501–518 (2010).
142. Longart, M., Liu, Y., Karavanova, I. & Buonanno, A. Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J. Comp. Neurol.* **472**, 156–172 (2004).
143. Caceres, A., Banker, G., Steward, O., Binder, L. & Payne, M. MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res.* **315**, 314–318 (1984).
144. De Camilli, P., Miller, P. E., Navone, F., Theurkauf, W. E. & Vallee, R. B. Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* **11**, 817–846 (1984).
145. Anti-Neurofilament H & M NF-H/NF-M Hypophosphorylated Antibody - SMI 35 - BioLegend. at <<http://www.biolegend.com/anti-neurofilament-h-&-m-nf-h-nf-m-hypophosphorylated-antibody-11118.html#>>
146. Garvalov, B. K. *et al.* Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 13117–13129 (2007).
147. Villegas, G. M., Haustein, A. T. & Villegas, R. Neuronal differentiation of PC12 and chick embryo ganglion cells induced by a sciatic nerve conditioned medium: characterization of the neurotrophic activity. *Brain Res.* **685**, 77–90 (1995).

148. George, R. & Griffin, J. W. Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiclotomy model. *Exp. Neurol.* **129**, 225–236 (1994).
149. Griffin, J. W. *et al.* Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *J. Neuroimmunol.* **40**, 153–165 (1992).
150. Hahn, C.-G. *et al.* Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat. Med.* **12**, 824–828 (2006).
151. Pitcher, G. M. *et al.* Schizophrenia susceptibility pathway neuregulin 1-ErbB4 suppresses Src upregulation of NMDA receptors. *Nat. Med.* **17**, 470–478 (2011).
152. Henson, M. A., Roberts, A. C., Pérez-Otaño, I. & Philpot, B. D. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog. Neurobiol.* **91**, 23–37 (2010).
153. Chatterton, J. E. *et al.* Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**, 793–798 (2002).
154. Li, Z., Van Aelst, L. & Cline, H. T. Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat. Neurosci.* **3**, 217–225 (2000).
155. Sin, W. C., Haas, K., Ruthazer, E. S. & Cline, H. T. Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature* **419**, 475–480 (2002).
156. García Lisbeth. Seminario presentado en la Universidad Simón Bolívar como parte de un estudio de doctorado. Elementos clave en la señalización activada por MAG relacionados al proceso de inhibición de la neuritogénesis. (2012).