



Universitat de Lleida
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques

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

César Sanz Rodríguez
Lleida, diciembre de 1997

A mis padres y hermanos.

A Marian.

A mis amigos de la Unidad de Neurobiología Molecular.



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

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

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

Vist i plau del Director de la Tesi

Joan X. Comella Carnicé

Lleida 1997





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

The Edward Mallinckrodt
Department of Molecular Biology
and Pharmacology

December 17, 1994

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

Dear Cesar,

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

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

Good luck and keep up the great work.

Sincerely yours,



Eugene M. Johnson, Jr.
Professor

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

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OBJETIVOS

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

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

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

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

2. Estudio del patrón de expresión de receptores Trk en la población de MTN's espinales embrionarias, así como de la relevancia de la activación de los receptores Trk en la señalización de la supervivencia y diferenciación neuronal. Hemos caracterizado, a nivel proteico, el patrón de expresión de los diferentes receptores Trk en la población de MTN's espinales durante el período de muerte fisiológica. La obtención de esta información ha resultado ser muy útil a la hora de establecer una correlación de relevancia fisiológica con el patrón de expresión de los correspondientes ARNm's así como con la respuesta de supervivencia de las MTN's embrionarias a las diferentes neurotrofinas (NT's) conocidas. Por otra parte, hemos abordado la relación existente entre la autofosforilación y activación de los receptores Trk y la transducción de señales iniciada por las NT's. En concreto, tomando como modelo el receptor TrkA presente en la superficie de las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior del embrión de rata y de las células PC12, hemos investigado cómo se correlaciona la autofosforilación de TrkA a nivel de tirosinas inducida por el factor de crecimiento nervioso (NGF) con las respuestas de diferenciación y supervivencia neuronal.

3. Los mecanismos de la supervivencia neuronal mediada por Ca^{2+} . Aunque los factores neurotróficos son los principales determinantes de la supervivencia neuronal durante el período de *muerte neuronal fisiológica*, en los últimos años han aumentado las evidencias que demuestran la implicación en dicho fenómeno biológico de otros factores, como la actividad bioeléctrica. La despolarización crónica de la membrana celular con elevadas concentraciones de K^+ en el medio de cultivo estimula la supervivencia de una larga lista de

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

GLOSARIO

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

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

SNE	Sistema nervioso entérico	TGF	Factor de crecimiento transformante
SNP	Sistema nervioso periférico	TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
SNS	Sistema nervioso simpático	TK	Tirosina kinasa
SNT	Diana asociada a sus de fosforilación a nivel de residuos de tirosina inducida por factor neurotrófico	TNFα	Factor de necrosis tumoral α
SOD	Superóxido dismutasa	TRPM-2	Mensaje 2 prostático inhibido por la testosterona
TCA	Ácido tricloroacético	Tyr	Residuo de tirosina
		UV	Ultravioleta
		2-AP	2-Aminopurina
		6-TG	6-Tioguanina

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

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

ARTÍCULOS

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

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

Franklin JL, Sanz-Rodríguez C, Juhasz A, Deckwerth TL, Johnson EM Jr. 1995. Chronic depolarization prevents programmed death of sympathetic neurons *in vitro* but does not support growth: requirement for Ca²⁺ influx but not Trk activation. *Journal of Neuroscience* 15:643-644.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. INTRODUCCIÓN

Los orígenes de las técnicas de cultivo de neuronas se remontan a la primera década de nuestro siglo. En 1910, G. Harrison logró, por vez primera, crecer fragmentos de tejido nervioso procedentes de médula espinal de rana, embebidos en una gota de linfa coagulada¹¹. Con este sencillo y elegante sistema experimental, Harrison pudo observar directamente la formación y crecimiento de fibras nerviosas a partir de neuroblastos, zanjando definitivamente la polémica sobre el origen de la fibras nerviosas en favor de los conceptos anteriormente defendidos por Ramón y Cajal. Harrison además realizó importantes observaciones como la contracción espontánea de las fibras musculares cuando éstas eran cultivadas conjuntamente con fragmentos de médula espinal¹⁰.

Algunos años mas tarde, Maximow perfeccionó las técnicas de cultivo celular e introdujo los términos *histiotípico* para describir el crecimiento difuso de uno o varios tipos celulares, y *organotípico* para designar un crecimiento organizado que implica tanto diferenciación histológica como citológica¹⁷.

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

Chronic Depolarization Prevents Programmed Death of Sympathetic Neurons *in vitro* but Does Not Support Growth: Requirement for Ca²⁺ Influx but Not Trk Activation

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

Continuous exposure of many types of neurons in cell culture to elevated concentrations of K⁺ greatly enhances their survival. This effect has been reported to be mediated by a sustained rise of cytoplasmic free Ca²⁺ concentration caused by influx of Ca²⁺ through voltage-gated channels activated by K⁺-induced chronic depolarization. In this report we investigate the effects of elevated K⁺ on the programmed death that embryonic rat sympathetic neurons undergo in culture when deprived of NGF. Elevated K⁺ in the culture medium did not significantly prevent death of NGF-deprived cells until after the third day following plating of embryonic day 21 neurons. On the fifth day after plating, incrementally increasing K⁺ concentrations in the culture medium from 5 to 100 mM caused chronic depolarization of neurons and had a biphasic effect on survival of NGF-deprived cells. Enhanced survival was steeply related to membrane potential, increasing from no enhanced survival in cells held at potentials between -51 and -34 mV to 90-100% of control survival at about -21 mV. At potentials positive to -21 mV, survival decreased. Associated with the chronic depolarization was a sustained rise of steady-state free Ca²⁺ concentration that showed a biphasic relationship to membrane potential roughly similar to that exhibited by survival. Steady-state Ca²⁺ concentration increased with increasingly lower membrane potentials to a peak at about -23 mV (to ≈240 nM from ≈40 nM at about -51 mV) and then decreased at more positive potentials. The elevation of intracellular Ca²⁺ was largely blocked by dihydropyridine and phenylalkylamine Ca²⁺ channel antagonists and was potentiated by a dihydropyridine Ca²⁺ channel agonist. Neither the rise of Ca²⁺, or survival was affected by the Ca²⁺ channel antagonist, ω-conotoxin. Therefore, the Ca²⁺ elevation was probably caused by Ca²⁺ influx through L-type, but not N-type, chan-

nels. Antagonists of L channels blocked both survival and the sustained increase of steady-state free Ca²⁺ at similar concentrations, suggesting that the relevant factor determining survival of depolarized cells was Ca²⁺ influx rather than some other effect of depolarization. Surprisingly, however, there was no clear correlation between the sustained rise of Ca²⁺ and survival. Some membrane potentials that induced similar increases of Ca²⁺ concentration produced widely different levels of survival. While chronic depolarization promoted survival of neurons in the absence of NGF, cells supported in this manner showed little growth as measured by neurite extension, total cellular protein, and mean somal diameter.

Compounds commonly used as calmodulin antagonists blocked survival of depolarized cells at concentrations that did not affect survival of cells maintained in NGF. However, these antagonists appeared to block survival by inhibiting Ca²⁺ influx rather than through an effect on calmodulin. Exposure to NGF, but not depolarization without NGF, caused activation of the tyrosine kinase activity of Trk, suggesting that depolarization does not promote survival by activating Trk. Both NGF and depolarization caused tyrosine phosphorylation of a protein with a molecular weight of about 44 kDa that may be an extracellular signal-regulated protein kinase (ERK).

These data show that increased Ca²⁺ influx induced by chronic depolarization can substitute for trophic factors in promoting survival of sympathetic neurons that would otherwise undergo programmed death. The data also demonstrate that the relationship between intracellular Ca²⁺ concentration and survival in depolarized neurons is not as straightforward as previously supposed. Additionally, these results suggest that Ca²⁺ may promote neuronal survival by activating tyrosine kinases downstream from receptor tyrosine kinases and that the signal transduction pathways for growth and survival are separate.

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

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

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

We thank Ms. Jeany Colombo for technical assistance, Dr. Steven Rothman for providing Ca²⁺ measurement equipment, Dr. Brenda Shivers of Parke-Davis for the gift of ω-conotoxin, and Dr. William Mobley of the University of California at San Francisco for providing the Trk antibody. Drs. Douglas Creedon, Steven Estus, David Fickbohm, Alan Willard, and Ms. Patricia Osborne provided helpful criticisms of the manuscript. This work was supported by grants from the Ronald McDonald Foundation (E.M.J.) and Amgen (J.L.F.).

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

^a Present address: Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá de Henares, Campus Universitario, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

^b Present address: Department of Neurology and Psychiatry, Box 397, University of Szeged, Szeged, Hungary H-6701.

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



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

Cesar Sanz-Rodriguez¹, Jacint Boix, Joan X. Comella*

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

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

Abstract

Cytosine arabinoside (1- β -D-arabinofuranosylcytosine, AraC) is a commonly used antimetabolic agent that kills proliferating cells by inhibiting DNA synthesis. We report that AraC is toxic to cultured chick embryo spinal cord motoneurons (MTNs) in a concentration-dependent fashion with an EC₅₀ of about 2 μ M. Interestingly, this type of MTN death is specific, resembles that occurring upon muscle extract (MEX) trophic deprivation regarding its morphological and temporal characteristics, and has apoptotic features, as judged by observation of nuclear morphology. The death of AraC-treated MTNs can be blocked by 2'-deoxycytidine (dC), a pyrimidine metabolite AraC is structurally related to. Overall, these findings suggest that dC may participate in a pathway, different from inhibition of DNA synthesis, that is necessary for cultured MTNs to respond to the trophic activities present in MEX. © 1997 Elsevier Science Ireland Ltd.

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

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

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

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

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

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

COMUNICACIONES A CONGRESOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ÍNDICE

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

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

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

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

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

RESULTADOS 224

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

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

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

9.5	Identificación de agentes farmacológicos con capacidad para inhibir la autofosforilación del receptor TrkA	264
9.6	El efecto de los inhibidores de la autofosforilación del receptor TrkA varía con la duración de la exposición al NGF	269
9.7	Los resultados hallados en células PC12 y en neuronas simpáticas muestran un alto grado de concordancia	271
9.8	El K252-a y la herbimicina A, pero no la metil-5'-tioadenosina, bloquean el efecto promotor de la supervivencia del NGF	272
9.9	La metil-5'-tioadenosina inhibe el crecimiento neurítico de las neuronas simpáticas	278
10.	MECANISMOS DE LA SUPERVIVENCIA NEURONAL MEDIADA POR Ca²⁺: ACTIVACIÓN DE LAS MAPK's	280
10.1	La despolarización crónica estimula la supervivencia de las motoneuronas espinales	280
10.2	La despolarización induce la fosforilación a nivel de residuos de tirosina de las MAPK's	283
	DISCUSIÓN	286
11.1	Aislamiento de las motoneuronas espinales del embrión de pollo	287
11.2	La muerte de las motoneuronas por privación de extracto muscular es apoptótica	291
11.3	El programa de muerte celular se activa de forma transitoria tras la privación neurotrófica	294
11.4	El arabinósido de citosina es neurotóxico para las motoneuronas espinales del embrión de pollo <i>in vitro</i>	300
11.5	Las motoneuronas de la médula espinal del embrión de pollo presentan receptores TrkB y TrkC en su superficie	303
11.6	La autofosforilación de los receptores Trk es necesaria para las respuestas de supervivencia y diferenciación neuronal, aunque de forma diferente	307
11.7	Los mecanismos de la supervivencia neuronal mediada por Ca ²⁺	314
11.8	Los requerimientos neurotróficos de las motoneuronas	318
11.9	Los factores neurotróficos y las enfermedades neurodegenerativas	325

CONCLUSIONES	328
BIBLIOGRAFÍA	331