

UCH-FC
Biotecnología
M 971
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE
PREGRADO

**“ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DE
NMDA EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD DE
NEURONAS DE HIPOCAMPO”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de
los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

ERNESTO FABIÁN MUÑOZ PALMA

Director del Seminario de Título:
Dr. Christian González-Billault



Noviembre 2016
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

ERNESTO FABIÁN MUÑOZ PALMA

“ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DE NMDA EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD DE NEURONAS DE HIPOCAMPO”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Christian González-Billault

Director Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Christian González-Billault, sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Magdalena Sanhueza Tohá

Presidenta

Firma manuscrita en tinta azul de la Dra. Magdalena Sanhueza Tohá, sobre una línea horizontal.

Dra. Cecilia Vergara Montecinos

Integrante

Firma manuscrita en tinta azul de la Dra. Cecilia Vergara Montecinos, sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, noviembre de 2016

*Dedico esta tesis a
María y Ernesto, mis padres.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar reconociendo y agradeciendo profundamente el interminable esfuerzo y trabajo que mis padres, María Palma y Ernesto Muñoz Rojo, han realizado hasta el día de hoy para que yo pueda finalizar esta importante etapa en la vida. No habría sido posible sin el apoyo de ellos.

Además, quisiera agradecer al resto de mi familia, a mis hermanos Christian, Claudia y Rodrigo que me han soportado y acompañado por largos años, a mi abuela Heroína Rojo por su cuidado.

Gracias a mis queridos amigos de la vida, Paulina y Cristian, Álvaro, Bárbara, Gloria, entre otros. También agradezco a Claudia y a Reinaldo por apoyar desde siempre mis estudios. Gracias a mis grandes amigos de la universidad, Pamela, Gabriel, Claudio y Yassef por su agradable compañía.

Quiero continuar agradeciendo el constante apoyo, confianza y disposición de Christian González desde mi llegada al laboratorio para realizar el trabajo de investigación. Además, quisiera agradecer enormemente el conocimiento, ayuda y agradable compañía que Cristina Olmos ha compartido conmigo. También, quisiera agradecer enormemente a Carlos Wilson por la generosidad de compartir sus conocimientos, experiencia e interminable ayuda en mi formación como científico y profesional. Gracias por ser mis mentores en la vida científica y profesional.

Estoy feliz de haber sido parte del agradable laboratorio CENEDYN y agradezco a las personas que lo conforman. En especial a Sebastián, Daniel, Felipe y Pablo por su buena onda y en brindarme su ayuda en el trabajo.

No continuaré el listado de personas, pero hay una cantidad enorme de gente de las cuales estoy muy agradecido por compartir conmigo sus vidas y apoyarme durante largo tiempo.

Para finalizar, todo el trabajo que está plasmado en la siguiente tesis no habría sido posible sin el constante apoyo, compañía y cariño de todas estas personas, en especial el de mis padres.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Transmisión glutamatérgica en el sistema nervioso central.....	5
1.2. Generalidades del receptor de NMDA y su función en el sistema nervioso central.....	6
1.3. Expresión y localización de los receptores de NMDA.....	8
1.4. Establecimiento de la polaridad neuronal: mecanismo de la adquisición de la morfología y función neuronal.....	10
1.5. Participación del citoesqueleto y la familia de proteínas Rho GTPasa en la adquisición de la morfología neuronal.....	12
1.6. Participación y señalización del ión Ca^{2+} en la adquisición de la morfología neuronal.....	14
1.7. Receptores de NMDA en el desarrollo neuronal.....	16
1.8. Problema.....	17
2. HIPÓTESIS.....	18
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	19

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Materiales.....	20
3.2 Métodos.....	20
3.2.1 Cultivo primario de neuronas hipocampales.....	20
3.2.2 Extracción de proteínas totales desde homogenizados celulares.....	21
3.2.3 Inmunodetección mediante ensayo de western blot.....	22
3.2.4 Detección de la expresión celular y modulación farmacológica de los receptores de NMDA.	23
3.2.5 Inmunodetección mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía de epifluorescencia y confocal.....	24
3.2.6 Expresión ectópica de las subunidades del receptor de NMDA mediante transfección.....	25
3.2.7 Registros intracelulares de Ca ²⁺	25
3.2.8 Análisis de actividad de Cdc42 y Rac1 mediante sensores FRET.....	26
3.2.9 Análisis de imágenes.....	27
3.2.10 Análisis estadístico.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Expresión y localización de la subunidad NR1 en cerebros embrionarios y en neuronas de hipocampo durante la adquisición de la polaridad neuronal.....	28
4.2. Estudio funcional de los receptores de NMDA en neuronas en estadio 3.....	31
4.3. Estudio funcional de los receptores de NMDA en el establecimiento de la polaridad neuronal (estadios 1 y 2)	38
4.4. Participación de los receptores de NMDA en el establecimiento de la polaridad	

neuronal.....	42
4.5. La activación de los receptores de NMDA induce la liberación de Ca ²⁺ desde el retículo endoplasmático.....	48
4.6. La actividad de los receptores de NMDA regula la activación de proteínas Cdc42 y Rac1.....	55
5. DISCUSIÓN.....	60
5.1. Expresión, localización y funcionalidad de los receptores de NMDA durante la adquisición de polaridad neuronal.....	60
5.2. Contribución de los receptores de NMDA en el establecimiento de la polaridad neuronal.....	62
5.3. Activación de los receptores de NMDA durante el desarrollo neuronal temprano.....	65
5.4. Señalización de Ca ²⁺ mediada a través de los receptores de NMDA durante la adquisición de polaridad neuronal.....	67
6. CONCLUSIONES.....	71
7. BIBLIOGRAFÍA.....	72

INDICE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los receptores de NMDA.....	8
Figura 2. Establecimiento de la polaridad neuronal.....	12
Figura 3. Expresión y localización celular de la subunidad NR1 en neuronas hipocampales.....	30
Figura 4. Estudio funcional de los receptores de NMDA en neuronas hipocampales inmaduras.....	34
Figura 5. Inhibición farmacológica de los receptores de NMDA en neuronas de 3 DIV...	37
Figura 6. Estudio funcional de los receptores de NMDA en neuronas en estadio 1 de polaridad.....	39
Figura 7. Estudio funcional de los receptores de NMDA en neuronas en estadio 2 de polaridad.....	41
Figura 8. Contribución de los receptores de NMDA en la adquisición de la polaridad neuronal.....	44
Figura 9. La modulación farmacológica de los receptores de NMDA altera la elongación axonal de neuronas hipocampales.....	46
Figura 10. La sobre-expresión de las subunidades NR1-GFP, NR2A y NR2B incrementa el crecimiento axonal de neuronas hipocampales.....	48
Figura 11. Estudio del acoplamiento funcional entre los receptores de NMDA y los receptores de rianodina e IP3 en neuronas en estadio 2 de polaridad.....	51
Figura 12. Estudio del acoplamiento funcional entre los receptores de NMDA y los receptores de rianodina e IP3 en neuronas en estadio 3 de polaridad.....	54
Figura 13. Los receptores de NMDA regulan la activación de las proteínas Cdc42 y Rac1	58

ABREVIATURAS

2-APB	:	2-Aminoethoxydiphenylborane.
AMPA	:	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (<i>α-amino-3-hydroxi-5-methyl-4-ioxazolepropionic acid</i>).
ARNm	:	ácido ribonucleico mensajero.
BSA	:	albúmina de suero bovino (<i>bovine serum albumin</i>).
CaMK	:	proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (<i>Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase</i>).
cDNA	:	ácido desoxirribonucleico complementario.
CFP	:	proteína fluorescente cian (<i>cyan fluorescent protein</i>).
CICR	:	liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (<i>calcium-induced calcium release</i>).
D-AP5	:	ácido D-(-)-amino-fosfo-pentanoico (<i>D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid</i>).
DIV	:	día(s) <i>in vitro</i> .
EGTA	:	ácido etilendiaminotetracético.
Fluo4-AM	:	indicador fluorescente de Ca^{2+} .
FRET	:	transferencia de energía de resonancia de Förster (<i>Förster resonance energy transfer</i>).
GDP	:	guanosín difosfato (<i>guanosine diphosphate</i>).
GFP	:	proteína fluorescente verde (<i>green fluorescent protein</i>).
GPCRs	:	receptores acoplados a proteínas G (<i>G protein coupled receptors</i>).
GTP	:	guanosín trifosfato (<i>guanosine triphosphate</i>).
GTPasa	:	proteína trifosfatasa de guanosina.
HBSS	:	solución salina balanceada de Hank (<i>Hank's balanced salt solution</i>).
iGluR	:	receptores ionotrópicos de glutamato (<i>ionotropic glutamate</i>

	:	<i>receptors</i>).
IP3R	:	receptor de inositol 3,4,5-trifosfato (<i>inositol 1,4,5-trisphosphate receptor</i>).
KA	:	ácido kaínico (<i>kainic acid</i>).
LTP	:	potenciación a largo plazo (<i>long-term potentiation</i>).
MEM	:	medio esencial mínimo (<i>minimun essential media</i>).
mGluRs	:	receptores metabotrópicos de glutamato (<i>metabotropic glutamate receptors</i>)
MK-801	:	(5 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>a,d</i>]cyclohepten-5,10-imine maleate.
NMDA	:	N-metil-D-aspartado (<i>N-methyl-D-aspartate</i>).
NR1	:	subunidad del receptor de glutamato para NMDA de tipo 1
NR2A	:	subunidad del receptor de glutamato para NMDA de tipo 2A
NR2B	:	subunidad del receptor de glutamato para NMDA de tipo 2B
PBS	:	amortiguador fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>).
PKC	:	proteína quinasa C (<i>protein kinase C</i>).
PI3K	:	fosfoinositol 3-quinasa (<i>phosphoinositide 3-kinase</i>).
p/v	:	peso/volumen.
RE	:	retículo endoplasmático.
RSTG	:	(<i>RS</i>)-Tetrazol-5-yl)glycine
RyR	:	receptor de rianodina (<i>ryanodine receptor</i>).
SDS-PAGE	:	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
TBS	:	amortiguador tris salino (<i>tris-buffered saline</i>).
TBS-T	:	TBS Tween-20.
vs	:	versus.
v/v	:	volumen/volumen.
YFP	:	proteína fluorescente amarilla (<i>yellow fluorescent protein</i>).

RESUMEN

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central. Los receptores de NMDA son canales catiónicos no selectivos que permean Ca^{2+} activados por glutamato y participan en la maduración neuronal y plasticidad sináptica. Asimismo, la maduración funcional y el desarrollo sináptico dependen de un apropiado desarrollo morfológico a nivel neuronal, lo que implica el surgimiento del compartimento somato-dendrítico y el axonal. Sin embargo, la contribución de los receptores de NMDA en la polarización neuronal y especificación del axón no ha sido explorada. En este trabajo se estudió la contribución de los receptores de NMDA y la entrada de Ca^{2+} extracelular en el establecimiento de la polaridad de neuronas de hipocampo en cultivo.

Mediante ensayos de inmunodetección (*western blot* e inmunofluorescencia) realizados en cultivos neuronales (E18,5) se detectó la expresión endógena de la subunidad NR1 en etapas tempranas de la polarización neuronal. A través de ensayos de registro de Ca^{2+} intracelular y microscopía confocal se detectó que los receptores de NMDA son funcionales en las primeras 48 h de cultivo, tiempo en que ocurre la polarización neuronal. Además, su inhibición farmacológica abolió la entrada de Ca^{2+} mediada por los agonistas NMDA y RSTG, descartando la estimulación inespecífica de estos agonistas sobre otros receptores. Los cultivos neuronales se trataron con agonistas y antagonistas específicos de los receptores de NMDA para evaluar la polaridad neuronal y el crecimiento axonal. Los análisis mostraron que la inhibición de estos receptores retrasó el desarrollo de las neuronas y redujo el crecimiento axonal, mientras

que la activación promovió tanto la polarización como el crecimiento del axón. Adicionalmente, se expresaron ectópicamente las subunidades de los receptores de NMDA en neuronas en cultivo, lo cual promovió el crecimiento axonal. Por otra parte, la activación de los receptores promovió la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático a través de los receptores de rianodina e IP3 (liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , CICR). Finalmente, la sobre-expresión de la subunidad NR1 promovió la activación de las proteínas Rho GTPasas Cdc42 y Rac1, evaluado mediante biosensores FRET. Tanto Cdc-42 como Rac1 son determinantes moleculares del establecimiento de la polaridad neuronal y el crecimiento del axón. En contra parte, la inhibición de los receptores de NMDA redujo la actividad de ambas proteínas, sugiriendo que los receptores de NMDA median el remodelamiento de F-actina a través de un mecanismo dependiente de Ca^{2+} .

En conjunto, los resultados obtenidos en este seminario de título sugieren que los receptores de NMDA contribuyen a la adquisición de polaridad neuronal *in vitro*, apoyando la noción de que el glutamato no solo es necesario para la neurotransmisión, sino también para el desarrollo neuronal temprano y para el crecimiento axonal.

ABSTRACT

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter at central nervous system. NMDA receptors (NMDARs) are non-selective cation channels that permeate Ca^{2+} activated by glutamate and participate in both neuronal maturation and synaptic plasticity, affecting several neuronal functions. Likewise, the functional maturation and synaptic development depend on an appropriate morphological development at the neuronal level, which implies the emergence of somato-dendritic and axonal compartments. However, the contribution of NMDARs to neuronal polarity and axonal specification has not been explored. In this work we studied the contribution of NMDARs to the establishment of neuronal polarity through the influx of extracellular Ca^{2+} and signaling.

Immunodetection analysis conducted on hippocampal cultured neurons (E18,5) showed that endogenous NR1 subunit is expressed at early stages of neuronal polarization. Ca^{2+} imaging performed on live neurons by confocal microscopy revealed that NMDARs are functional between the first 48 h of culture, time at which neuronal polarization occurs. In addition, the pharmacological inhibition of NMDARs abolished Ca^{2+} influx mediated both by the agonists NMDA and RSTG, discarding off-targets of NMDA and RSTG stimulation. Cultured neurons were treated with specific NMDAR agonists and antagonists to evaluate neuronal polarity and axonal growth. The analysis showed that NMDA receptors inhibition delayed the development of neurons and decreased axonal growth, whereas their activation promoted both polarization and axonal growth. Additionally, over-expression of NMDA receptor subunits promoted

axonal growth. Moreover, stimulation of NMDA receptors promoted Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum through ryanodine and IP3 receptors through a mechanism that depends on extracellular Ca^{2+} influx (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release, CICR). Finally, NR1 subunit over-expression increased the activity of the Rho GTPases proteins Cdc42 and Rac1 molecular determinants of neuronal polarization, as assessed by FRET biosensors. In contrast, inhibition of NMDA receptors decreased both Rac1 and Cdc-42 activities. Together, these data suggest that NMDA receptor mediates the remodeling of F-actin through a Ca^{2+} dependent mechanism.

Collectively, these results suggest that NMDA receptors contribute to neuronal polarity acquisition *in vitro*, supporting the notion that glutamate is not only necessary for neurotransmission but also for early neuronal development and axonal growth.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Transmisión glutamatérgica en el sistema nervioso central

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos, promoviendo la comunicación neuronal (Horak et al., 2014). Estructuralmente, el glutamato es un aminoácido polar con carga negativa, sintetizado y secretado por las neuronas del SNC, que señala a través de receptores de membrana tanto metabotrópicos (mGluRs) como ionotrópicos (iGluRs) (Brosnan and Brosnan, 2013; Kew and Kemp, 2005; Nedergaard et al., 2002). Los mGluRs son receptores acoplados a proteínas G (*G protein coupled receptors*, GPCRs) que, luego de su activación por glutamato, son capaces de transducir señales al interior celular para modular la transmisión sináptica y excitabilidad neuronal (Niswender and Conn, 2010).

Los iGluRs, en cambio, corresponden a una familia de canales iónicos conformados por cuatro subunidades trans-membranales que forman el poro central del canal (Paoletti et al., 2013). Además, el flujo de iones a través de estos canales depende del potencial eléctrico de la membrana plasmática, de modo que en condiciones normales permiten la entrada de cationes sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) desde el medio extracelular y la salida de iones potasio (K^+) desde el interior celular (Luscher and Malenka, 2012; Traynelis et al., 2010; Willard and Koochekpour, 2013). Existen tres subtipos de iGluRs según su estructura y la afinidad que presentan por sus agonistas sintéticos; 1) receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), 2) receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y 3) receptores de ácido kaínico (KA) (Flores-Soto et al., 2012; Horak et al., 2014; Willard and Koochekpour,

2013). Los receptores AMPA son los más abundantes en las sinapsis maduras, mediando la neurotransmisión excitatoria rápida. Los receptores de NMDA, en cambio, contribuyen a la regulación de esta neurotransmisión, controlando el número de receptores AMPA expuestos en la membrana y, en consecuencia, mediando así la neurotransmisión excitatoria lenta (Horak et al., 2014).

Una vez liberado desde el terminal presináptico, el glutamato se une a los tres tipos de iGluRs de las regiones postsinápticas. La unión del glutamato activa a los receptores AMPA promoviendo el ingreso de iones Na^+ y, consecuentemente, despolarizando localmente la membrana plasmática. El glutamato también se une a los receptores de NMDA, sin embargo, estos canales se encuentran bloqueados por Mg^{2+} extracelular (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). El cambio en la polaridad de la membrana inducida por los receptores AMPA provoca la liberación del ión Mg^{2+} de los receptores de NMDA. Así, tanto la unión de glutamato, como la despolarización, son requeridas simultáneamente para generar un ingreso principalmente de iones Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA (Hestrin et al., 1990; Johnson and Ascher, 1987; Mizuno et al., 2001).

1.2. Generalidades del receptor de NMDA y su función en el sistema nervioso central

Los receptores de NMDA son canales iónicos permeables principalmente al ión Ca^{2+} , permitiendo también la entrada de iones Na^+ , su apertura depende tanto de la unión de glutamato en el receptor como de los cambios en el potencial eléctrico de la

membrana plasmática que libera el Mg^{2+} del interior del canal (Al-Hallaq et al., 2007; Bonaccorso et al., 2011). Los receptores de NMDA contribuyen al fenómeno de potenciación a largo plazo (*Long-Term Potentiation, LTP*), proceso paradigmático para evaluar el desarrollo de memoria y aprendizaje en modelos celulares (Lynch, 2004; Traynelis et al., 2010).

Los receptores de NMDA son complejos heterotetraméricos ubicados en la membrana plasmática de la neurona. Cada una de las cuatro subunidades es una proteína integral, las que en conjunto forman el poro central del canal iónico (Traynelis et al., 2010). Hasta la fecha han sido identificadas siete subunidades que pueden conformar el receptor de NMDA, las que han sido agrupadas en tres subfamilias según la homología de sus secuencias aminoacídicas: NR1, NR2 (NR2A, NR2B, NR2C y NR2D) y NR3 (NR3A y NR3B). Los complejos heterotetraméricos típicamente están ensamblados a partir de dos subunidades NR1 y dos subunidades de las subfamilias NR2 o NR3 (Figura 1A) (Monyer et al., 1992; Moriyoshi et al., 1991; Paoletti et al., 2013; Traynelis et al., 2010). Las diferentes combinaciones de subunidades determinan diferencias en su permeabilidad al ión Ca^{2+} . La expresión de las subunidades NR1 y NR2 en sistemas heterólogos, muestran que los receptores compuestos por las subunidades NR2A o NR2B presentan mayor permeabilidad al ión Ca^{2+} en comparación a las subunidades NR2C o NR2D (Siegler Retchless et al., 2012). La expresión de la subunidad NR3A, en cambio, disminuye la conductancia y permeabilidad de Ca^{2+} en los receptores de NMDA (Perez-Otano et al., 2001).

Cada subunidad del complejo heterotetramérico posee un dominio carboxilo terminal hacia la región intracelular (*carboxyl-terminal domain*, CTD), un dominio transmembrana (*transmembrane domain*, TMD), y dos dominios extracelulares: un dominio amino terminal (*amino-terminal domain*, NTD) y un dominio de unión a ligando (*ligand-binding domain*, LBD) que une glicina en la subunidad NR1 y glutamato en las subunidades NR2 (Figura 1B) (Lee et al., 2014; Traynelis et al., 2010; Zhu and Paoletti, 2015).

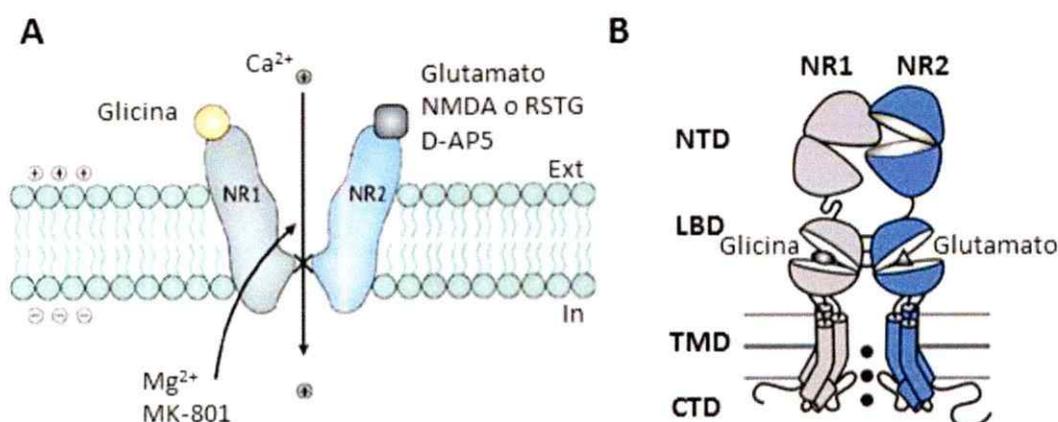


Figura 1. Estructura de los receptores de NMDA. Representación de las subunidades NR1 y NR2 que conforman a los receptores de NMDA. **A**, Modelo de la interacción de glutamato, glicina y Mg^{2+} con sus respectivos sitios de unión. También se muestran los sitios de unión para los agonistas NMDA y (RS)-Tetrazol-5-yl)glycine (RTSG) y los inhibidores D-AP5 y MK-801. **B**, Representación de los dominios proteicos de las subunidades NR1 y NR2 con sus respectivos sitios de unión para glicina y glutamato. Modificado de (Lipton, 2006) y (Zhu and Paoletti, 2015), respectivamente.

1.3. Expresión y localización de los receptores de NMDA

Mediante ensayos de hibridación *in situ* se ha detectado que la presencia de ARN mensajeros (ARNm) de las subunidades NR2 posee diversos patrones temporales de expresión. Mientras las subunidades NR1, NR2B y NR2D se expresan en hipocampus

de cerebros embrionarios de rata desde los 14 días de gestación (E14), las subunidades NR2A y NR2B predominan en estructuras superiores del cerebro adulto, como el hipocampo y la corteza. Adicionalmente, la subunidad NR1 se expresa extensamente en el SNC de ratas desde los 14 días de gestación (E14) hasta la edad adulta (Monyer et al., 1994; Paoletti et al., 2013).

Mutaciones que inducen la pérdida de la función (total o parcial) de los receptores de NMDA, conducen a trastornos neurológicos en humanos. Estudios epidemiológicos revelan la existencia de múltiples mutaciones posibles en los genes que codifican las subunidades de los receptores de NMDA, desarrollando déficit cognitivo, trastornos en el espectro autista, epilepsia y esquizofrenia, entre otras (Burnashev and Szepetowski, 2015).

La carencia de receptores de NMDA en ratones sugiere su importancia para el desarrollo y la plasticidad neuronal. Ratones *knock-out* (KO) para las subunidades NR1 y NR2B no presentan alteraciones en la formación del hipocampo, no obstante, mueren dentro del primer día luego del nacimiento debido a una falla respiratoria (Forrest et al., 1994; Single et al., 2000). Además, ratones KO para la subunidad NR1 específicamente en la región CA1 del hipocampo, presentan una pérdida de las corrientes eléctricas postsinápticas y fallas en LTP, revelando un déficit severo en la consolidación de la memoria espacial (Tsien et al., 1996). Estos antecedentes sugieren que los receptores de NMDA son necesarios para el adecuado funcionamiento del SNC. No obstante, no ha sido descrita la contribución de los receptores de NMDA en la adquisición de la morfología de las neuronas, particularmente al surgimiento de los compartimentos

somato-dendríticos y axonal, los cuales son indispensables para la transmisión del impulso eléctrico y propagación del potencial de acción a nivel del SNC.

1.4. Establecimiento de la polaridad neuronal: mecanismo de la adquisición de la morfología y función neuronal

Las neuronas están entre los tipos celulares más polarizados y presentan dos compartimentos que son estructural y funcionalmente distintos: el axón y las dendritas. La generación de estas dos estructuras celulares es fundamental para la formación de circuitos neuronales funcionales en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, ya que permiten propagar el potencial de acción e integrar la comunicación del sistema nervioso (Barnes and Polleux, 2009).

La adquisición y segregación de los compartimentos somato-dendrítico y axonal es el resultado de una secuencia de etapas de cambios moleculares, celulares y morfológicos que en su conjunto reciben el nombre de “establecimiento de la polaridad neuronal” (Dotti et al., 1988).

El modelo canónico para el estudio del establecimiento de la polaridad neuronal es el cultivo primario de neuronas de hipocampos embrionarios de rata de 18,5 días de gestación (E18,5) (Banker and Cowan, 1977). Además, la adquisición de la polaridad de neuronas en cultivo recapitula los aspectos moleculares y celulares de la diferenciación neuronal (Andersen and Bi, 2000; Dotti et al., 1988).

Inmediatamente después de aislar, sembrar y cultivar *in vitro* las neuronas de hipocampo, éstas se asemejan a cuerpos celulares simétricos que exhiben estructuras

enriquecidas en filamentos de actina (F-actina) alrededor del cuerpo celular, como una lamela y filopodios (estadio 1, 6 h en cultivo). Luego, las neuronas desarrollan prolongaciones membranosas que son morfológicamente equivalentes y reciben el nombre de neuritas menores (estadio 2, 12-24 h en cultivo). Luego, una de estas neuritas crece a una velocidad 5-6 veces mayor que el resto, desarrollando el axón de la neurona (estadio 3, 24-48 h en cultivo). Así, la polarización neuronal ocurre durante la transición desde el estadio 2 al estadio 3. Posteriormente, las neuritas menores aumentan su velocidad de crecimiento, desarrollando el árbol dendrítico de la neurona (estadio 4, 3-4 días en cultivo). Finalmente, ocurre la maduración funcional del axón, estableciéndose un dominio específico para iniciar el potencial de acción, el segmento inicial del axón (*axon initial segment*, AIS), el desarrollo de espinas dendríticas y contactos sinápticos (estadio 5, más de 10 días en cultivo) (Figura 2) (Dotti et al., 1988; Tahirovic and Bradke, 2009).

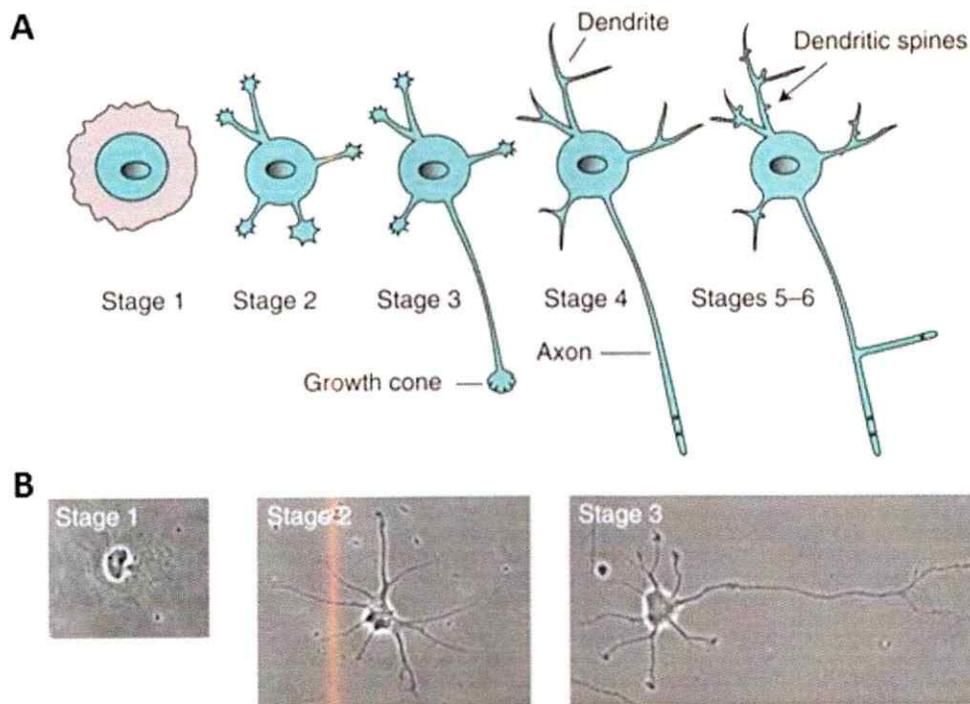


Figura 2. Establecimiento de la polaridad neuronal. Etapas del desarrollo de neuronas hipocampales embrionarias en cultivo. **A**, Representación de los cambios morfológicos durante el desarrollo neuronal a lo largo de los diferentes estadios (1-6) de crecimiento. **B**, Imágenes de microscopía de contraste de fase de neuronas durante la adquisición de polaridad neuronal (estadios 1-3). Modificado de (Tahirovic and Bradke, 2009).

1.5. Participación del citoesqueleto y la familia de proteínas Rho GTPasa en la adquisición de la morfología neuronal

La determinación del establecimiento de la polaridad neuronal depende de múltiples factores en distintos niveles celulares. Entre estos, el citoesqueleto de actina y tubulina y sus reguladores, la familia de proteínas Rho GTPasa y proteínas quinasas como CaMKK y PI3K, están involucradas en el establecimiento de la polaridad neuronal y en la formación del axón (Barnes and Polleux, 2009; Bradke and Dotti, 2000; Cosker et al., 2008; Nakamuta et al., 2011; Watabe-Uchida et al., 2006).

La diferenciación neuronal requiere una reorganización del espacio intracelular, para lo cual la dinámica del citoesqueleto cumple un rol fundamental (Stiess and Bradke, 2011). En particular, la capacidad dinámica de polarización tanto de los filamentos de actina como de los microtúbulos, son esenciales para la migración neuronal, crecimiento y guía axonal (da Silva and Dotti, 2002; Witte and Bradke, 2008).

Por otro lado, la familia de proteínas monoméricas pequeñas Rho GTPasas, compuestas por Rac1, Cdc42 y RhoA, son importantes reguladores del citoesqueleto de actina. Estas proteínas funcionan como interruptores moleculares mediante el ciclado entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo (unido a GDP) (Govek et al., 2005). Las proteínas Rho GTPasas participan activamente en la morfogénesis neuronal, incluyendo migración, polaridad, crecimiento y guía axonal, formación de dendritas, formación de sinapsis y plasticidad (Luo, 2000). Se ha descrito que Cdc42 promueve la activación local de Rac1 por medio del complejo de polaridad Par3-Par6-aPKC y Tiam/STEF, proteínas GEF específicas de Rac (Nishimura et al., 2005). Tras su activación, las proteínas Rho GTPasas afectan el remodelamiento del citoesqueleto de actina a través de proteínas de unión a actina, como cofilina y el complejo Arp2/3 (*Actin-related protein 2/3*) (Sit and Manser, 2011). De forma general, Rac1, Cdc42 y RhoA remodelan el citoesqueleto de actina promoviendo la formación de lamelipodios, filopodios y fibras de estrés, respectivamente (Nobes and Hall, 1995). Tanto la activación de Rac1 como Cdc42, y la inactivación de RhoA, promueven la polarización, mantenimiento neuronal, formación de neuritas y el crecimiento axonal (Garvalov et al., 2007; Gonzalez-Billault et al., 2012; Govek et al., 2005; Tahirovic and Bradke, 2009).



1.6. Participación y señalización del ión Ca^{2+} en la adquisición de la morfología neuronal

El Ca^{2+} citosólico es un segundo mensajero en casi todas las células eucariontes, activando numerosas respuestas, como la contracción muscular, el metabolismo mitocondrial, la expresión génica, el crecimiento y proliferación celular y la neurotransmisión (Berridge et al., 2000; Clapham, 2007). Tanto la procedencia del ión Ca^{2+} , como su concentración modularán la respuesta celular y la activación de vías de transducción de señales (Parekh, 2011).

A nivel neuronal, la entrada fisiológica de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los receptores de NMDA promueve la neuritogénesis y la ramificación y extensión de neuritas en neuronas granulares cerebelares de rata (Brewer and Cotman, 1989; Pearce et al., 1987; Rashid and Cambray-Deakin, 1992), y a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L promueve la ramificación dendrítica en cultivos de neuronas corticales de rata (Ramakers et al., 2001). Por otra parte, la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (RE), mediada principalmente por el receptor de rianodina (RyR) y el receptor de inositol 3,4,5-trifosfato (IP3R), promueve la extensión de neuritas, movilidad del cono de crecimiento y extensión del axón en cultivos neuronales de médula espinal de *Xenopus* e hipocampales de rata (Jacques-Fricke et al., 2006; Nakamuta et al., 2011; Wilson et al., 2016).

Adicionalmente, la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular estimula la liberación de Ca^{2+} desde el RE, proceso denominado como liberación de Ca^{2+} inducida

por Ca^{2+} (*calcium-induced calcium-release*, CICR) (Fabiato and Fabiato, 1975). Aunque este fenómeno fue demostrado y ampliamente estudiado en células musculares, la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} también ocurre en neuronas (Berridge, 1998; Verkhratsky and Shmigol, 1996). Los receptores de rianodina e IP₃, presentes en el RE, contienen múltiples sitios alostéricos de unión a Ca^{2+} responsables de gatillar la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} hacia el citoplasma (Del Prete et al., 2014; Verkhratsky and Petersen, 2002). Trabajos previos en cultivos de neuronas ganglionares de la raíz dorsal sugieren que la entrada de Ca^{2+} proveniente desde el medio extracelular promueve la elongación de neuritas a través de este mecanismo (Birch et al., 1992; Kocsis et al., 1994).

Estudios realizados en neuronas granulares cerebelares de ratas postnatales de 7 días (P7) y células HEK293T sugieren que el incremento de Ca^{2+} citoplasmático gatillado tanto por la liberación de Ca^{2+} desde almacenamientos internos como por la entrada desde el medio extracelular regulan la actividad de las proteínas Rho GTPasas, incrementando la actividad de Cdc42 y Rac1 y disminuyendo la actividad de RhoA (Jin et al., 2005). Adicionalmente, estudios en neuronas tectales ópticas de *Xenopus* revelaron que la activación de los receptores de NMDA generó un crecimiento del árbol dendrítico mediado por Cdc42 y Rac1, junto con una disminución en la actividad de RhoA (Govek et al., 2005; Li et al., 2000; Sin et al., 2002). Finalmente la actividad de las proteínas Rho GTPasas puede ser regulada por las proteínas quinasas PKC y CaMKII, cuya actividad es modificada por la presencia de Ca^{2+} intracelular (Fleming et al., 1999; Jin et al., 2005; Price et al., 2003).

1.7. Receptores de NMDA en el desarrollo neuronal

La activación de los receptores de NMDA permite la entrada de iones Ca^{2+} , segundo mensajero que regula numerosas funciones biológicas, incluyendo plasticidad neuronal como LTP, aprendizaje y memoria, y desarrollo neuronal. Estudios previos en cultivos de neuronas granulares cerebelares de rata (P5) mantenidos hasta 8 h *in vitro* sugieren que la estimulación de los receptores de NMDA promueve la neuritogénesis (Pearce et al., 1987; Rashid and Cambray-Deakin, 1992) y la ramificación y extensión de neuritas en estos cultivos mantenidos por 6-9 DIV (días *in vitro*, DIV) (Brewer and Cotman, 1989). Adicionalmente, se ha descrito que la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA promueve la migración de neuronas granulares en el desarrollo del cerebelo de ratón (Komuro and Rakic, 1993).

Los receptores de NMDA se encuentran presentes en los conos de crecimiento de neuronas dopaminérgicas de 5-9 DIV (Schmitz et al., 2009). De forma similar, neuronas hipocampales embrionarias cultivadas por 3-6 DIV, que presentan la subunidad NR1 distribuida en el soma, dendritas y axón, incorporan Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el interior de los conos de crecimiento del axón luego de la estimulación de los receptores de NMDA (Wang et al., 2011). Lo anterior permite sugerir una posible regulación local de la entrada del ión Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA que contribuya a la dinámica del cono de crecimiento axonal, estructura determinante en el desarrollo del axón y el establecimiento de la polaridad neuronal. En conjunto, estos antecedentes sugieren que la activación de los receptores de NMDA y la señalización

por Ca^{2+} mediada por éstos podrían estar involucradas en la regulación de diferentes procesos celulares, como la adquisición de la morfología neuronal y crecimiento axonal.

1.8. Problema

Los receptores de NMDA son indispensables para la transmisión excitatoria mediada por glutamato a nivel del SNC. Sin embargo, se desconoce la contribución de los receptores de NMDA en el desarrollo de la morfología temprana de las neuronas, es decir, en el establecimiento de la polaridad neuronal. Así mismo, se desconoce la contribución de la entrada del ión Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los receptores de NMDA y sus posibles blancos moleculares que puedan contribuir a la adquisición de la polaridad neuronal.

2. HIPÓTESIS

Los receptores de NMDA contribuyen al establecimiento de la polaridad de neuronas embrionarias de hipocampo en cultivo mediante la entrada y señalización de Ca^{2+} proveniente del medio extracelular.

Objetivo General

Estudiar la participación de la entrada de Ca^{2+} mediada por los receptores de NMDA en el establecimiento de la polaridad de neuronas de hipocampo en cultivo.

Objetivos Específicos

1.- Estudiar la expresión y la localización celular de la subunidad NR1 en cultivos de neuronas de hipocampo durante la adquisición de la polaridad neuronal.

2.- Estudiar la contribución de los receptores de NMDA al establecimiento de la polaridad neuronal.

3.- Estudiar la contribución de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los receptores de NMDA a la adquisición de la polaridad neuronal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales. NMDA fue obtenido desde Sigma (*MO, USA*). (RS)-Tetrazol-5-yl)glycine, D-AP5, (+)-MK-801 maleato, 2-APB y rianodina fueron adquiridos desde Tocris Bioscience. Los anticuerpos primarios anti-NR1 para ensayos de western blot e inmunofluorescencia provienen desde Merk Millipore (N° cat: 05-432, Darmstadt, Germany) y BD Pharmingen (N° cat: 556308), respectivamente; este último fue proporcionado por la Dra. Brigitte Van Zundert (CIB, UNAB, Santiago de Chile). El anticuerpo primario anti- α -tubulina fue adquirido desde Sigma (*MO, USA*). Los anticuerpos primarios anti-MAP2 y Tau-1 fueron obtenidos desde Merk Millipore (Darmstadt, Germany). El anticuerpo primario anti- β III-tubulina (*mouse*) fue adquirido desde Promega (*WI, USA*) y anti- β III-tubulina (*rabbit*) fue adquirido desde Sigma. Los anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa de rabanita (anti-HRP) provienen desde *Jackson Immuno Research*. Faloidina conjugada a Alexa Fluor 546 y Alexa Fluor 647 provienen desde Invitrogen. Los anticuerpos secundarios *Alexa Fluor anti-mouse* y *anti-rabbit* se obtuvieron desde Lifetechnologies, (CA, USA). Los cDNA que codifican las subunidades de los receptores de NMDA (NR1-GFP, NR2A y NR2B) fueron proporcionados por la Dra. Brigitte Van Zundert. Los sensores FRET Raichu-Cdc42 y Raichu-Rac1 fueron proporcionados por el Dr. Alfredo Cáceres (IMMF, Córdoba, Argentina).

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivo primario de neuronas hipocampales. Como modelo de estudio se utilizó el cultivo primario de neuronas aisladas de hipocampos de cerebros embrionarios

de rata Sprague-Dawley de 18,5 días de gestación (E18,5). El aislamiento y cultivo de neuronas se realizó de acuerdo al protocolo descrito por (Kaech and Banker, 2006). Brevemente, los hipocampos fueron disectados en medio HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) suplementado con HEPES y tratados con tripsina al 0,25% por 20 min a 37°C en medio HBSS. Luego, los hipocampos fueron lavados de la digestión y fueron disgregados en medio MEM (*Minimum Essential Media*) suplementado con 10% de suero de caballo (MEM 10% HS). De acuerdo al experimento y a la densidad celular requerida, las neuronas fueron sembradas en MEM 10% HS sobre cubreobjetos de vidrio tratados previamente con poli-D-lisina (1 mg/mL), y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂ durante 1 h. Luego de este tiempo, suficiente para la adherencia de las células a la superficie de los cubreobjetos, el medio MEM 10% HS fue reemplazado por medio Neurobasal suplementado con B27, GlutaMax, piruvato de sodio y antibióticos. Las neuronas se mantuvieron en cultivo durante el tiempo requerido según los experimentos en las condiciones ya descritas (37°C, 5% CO₂).

3.2.2. Extracción de proteínas totales desde homogenizados celulares. Para confirmar la presencia de la subunidad NR1 a partir de extractos proteicos en el modelo de estudio, se realizaron homogeneizados cerebro completo, de hipocampos y de cortezas de cerebros embrionarios (E18,5). Para ello, los tejidos fueron disgregados mecánicamente e incubados por 20 min a 4°C utilizando la solución de lisis celular RIPA (*Radio immunoprecipitation assay*) que contuvo Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), NaCl (150 mM), Tritón X-100 (1% v/v), desoxicolato de sodio (0,5%), SDS (0,1%), PMSF (1 mM), NaF

(1 mM), Caliculina A (100 nM) y una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Roche, Applied Science, Indianápolis, USA). El lisado obtenido se centrifugó a 14.000 rpm por 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford utilizando la proteína estándar Albúmina de Suero Bovino (BSA, *Bovine serum albumin*). Las proteínas se denaturaron utilizando una solución que contuvo Tris-HCl (60 mM, pH 6,8), glicerol (5% v/v), dodecil sulfato de sodio (2% p/v) y azul de bromofenol (0,02% p/v), luego fueron mantenidas a 95°C por 5 min. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Por otra parte, neuronas hipocampales fueron sembradas en placas plásticas de 35 mm de diámetro (1.5×10^6 de células por placa) tratadas previamente con poli-D-lisina como se mencionó anteriormente. Luego, se realizaron extractos proteicos a partir de cultivos neuronales de 24-48 h. Para ello, las neuronas fueron removidas mecánicamente y resuspendidas en tampón RIPA para su lisado.

3.2.3. Inmunodetección mediante ensayo de western blot. Los extractos proteicos totales obtenidos desde cerebros, cortezas e hipocampos embrionarios (E18,5) y de cultivos primarios de neuronas hipocampales de 24 y 48 h fueron separados electroforéticamente en geles de SDS-PAGE al 7,5% en una cámara Mini-protean (BioRad) y transferidos eléctricamente a membranas de nitrocelulosa (330 mA, 90 min, 4°C). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 3% en solución TBS-Tween-20 (TBS-T) (0,05 % v/v) en agitación durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-NR1 (*mouse*, 1:1.000) y anti- α -tubulina (*mouse*, 1:10.000) disueltos en leche al 1% en TBS-T (0,05%

v/v) a 4°C durante toda la noche en agitación. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-T (0,05% v/v) y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa de rabanita (*anti-mouse*, 1:2.000, *Jackson Immuno Research*) en leche al 1% en TBS-T (0,05% v/v) por 90 min a temperatura ambiente con agitación. La detección de las proteínas se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia (*Super SignalTM West Dura Extended Duration Substrate* o *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Thermo Scientific).

3.2.4. Detección de la expresión celular y modulación farmacológica de los receptores de NMDA. Para evaluar la expresión y distribución celular de la subunidad NR1, polaridad y elongación axonal, las neuronas fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (1.5×10^4 células por pocillo) pre-tratados con poli-D-lisina. Para el análisis de expresión y distribución celular de la subunidad NR1, las neuronas se mantuvieron durante 24 h o 72 h en cultivo, rescatando los estadios 2 y 3 de polaridad, respectivamente. Para analizar la participación de los receptores de NMDA en la adquisición de la polaridad neuronal, las células fueron tratadas con los agonistas (NMDA o RSTG) o antagonistas (D-AP5 o MK-801) de los receptores de NMDA 4 h después de la siembra (cuando las neuronas se encuentran en estadio 1) y fueron mantenidas hasta completar 24 h *in vitro*. Para análisis de elongación axonal, las neuronas fueron tratadas con los agonistas (NMDA o RSTG) o antagonistas (D-AP5 o MK-801) de los receptores de NMDA a las 18 h en cultivo (cuando las neuronas se encuentran principalmente en estadio 2) hasta completar 72 h *in vitro*.

Posteriormente, las neuronas fueron fijadas para realizar ensayos de inmunofluorescencia.

3.2.5. Inmunodetección mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía de epifluorescencia y confocal. Luego de los tratamientos, las neuronas se lavaron con PBS y luego se fijaron con una solución de paraformaldehído y sacarosa al 4% p/v disueltos en PBS durante 25 min a 37° C. Luego, las neuronas se lavaron con PBS para posteriormente ser permeabilizadas con TritónX-100 0,2% en PBS durante 5 min. Luego, se realizaron lavados con PBS y las células fueron bloqueadas con BSA al 5% p/v en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la incubación de los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en BSA al 1% p/v durante toda la noche a 4°C. Para la expresión y distribución celular de NR1, se utilizaron los anticuerpos anti-NR1 (*mouse*, 1:100), anti- β III-tubulina (*rabbit*, 1:750) y faloidina conjugada a AlexaFluor-647 (incubado junto con los anticuerpos secundarios). Para análisis de polaridad neuronal, se utilizó el anticuerpo anti- β III-tubulina (*mouse*, 1:1000) y faloidina conjugada a AlexaFluor-546 (incubado junto con los anticuerpos secundarios) y se contabilizó el número de neuronas en estadio 1, 2 y 3 de polaridad luego de las primeras 24 h de cultivo. Para estudiar el crecimiento axonal, se utilizaron los anticuerpos anti-MAP2 (*rabbit*, 1:500) y anti-Tau-1 (*mouse*, 1:500), marcadores de los compartimentos somato-dendrítico y axonal en células polarizadas, respectivamente. Después de las respectivas incubaciones con los anticuerpos primarios, las células fueron lavadas con PBS y luego incubadas con anticuerpos secundarios conjugados a *AlexaFluor* (488 *anti-mouse*, 546 *anti-rabbit*) junto con faloidina conjugada a

AlexaFluor (546 o 647) según corresponda. La incubación se realizó a temperatura ambiente en oscuridad durante 45 minutos. Luego de realizar lavados con PBS, los cubreobjetos fueron montados en medio de montaje Fluor Save™ Reagent (Merk Millipore) sobre portaobjetos de vidrio. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio de epifluorescencia Axiovert 200 M (Zeiss, Germany) y un microscopio confocal LSM 710 (Zeiss, Germany), pertenecientes a la unidad de microscopía avanzada de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

3.2.6. Expresión ectópica de las subunidades del receptor de NMDA mediante transfección. Se realizaron ensayos de ganancia de función de las subunidades de receptor de NMDA mediante la expresión transitoria de las subunidades NR1-GFP, NR2A o NR2B. Para ello, neuronas hipocampales fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (4×10^4 células por pocillo) pre-tratados con poli-D-lisina. Las neuronas fueron transfectadas, utilizando Lipofectamina® 2000 (Invitrogen) 1 h después de la siembra con los vectores que codifican para cada una de las subunidades de los receptores de NMDA. Como control de transfección, las neuronas se co-transfectaron con un vector que codifica la proteína fluorescente verde (pCAG-GFP) en una razón 1:4 = GFP: subunidad del receptor de NMDA. Según datos previos, estas condiciones aseguran la transfección de las subunidades. Las neuronas se mantuvieron durante 3 días en cultivo y se realizaron ensayos de inmunofluorescencia contra las proteínas MAP2 y Tau.

3.2.7. Registros intracelulares de Ca^{2+} . Para evaluar la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los receptores de NMDA, las neuronas se sembraron sobre

cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro en placas de 6 pocillos (1.5×10^5 células por pocillo) pre-tratados con poli-D-lisina. Las neuronas se cultivaron por 4, 18 y 72 h (estadios 1, 2 y 3, respectivamente). Luego, se incubaron durante 20 min a 37°C con la sonda Fluo4-AM ($5 \mu\text{M}$, disuelta en medio HBSS sin Ca^{2+}) (Lifetechnologies, CA, USA). Posteriormente, las neuronas se incubaron por 40 min a 37°C en medio Neurobasal (tiempo necesario para la desesterificación y compartimentalización de la sonda Fluo4-AM). Durante este intervalo de tiempo, se incubaron los inhibidores D-AP5, MK-801, 2-APB y rianodina, según corresponda. Los cubreobjetos fueron montados en una cámara de registro con Krebs (126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.5 mM NaHCO_3 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.2 mM MgCl_2 , 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.2). Como control de la entrada extracelular de Ca^{2+} se utilizó medio HBSS sin Ca^{2+} suplementado con Hapes. Los registros fueron realizados mediante un *time-lapse* de 5 min utilizando un microscopio confocal LSM 710 Zeiss (Germany) a una magnificación de 20x, con una frecuencia de adquisición de imágenes de 0,5 Hz. El análisis de la fluorescencia se realizó con el plug-in “Time Series Analyzer” del software Fiji-ImageJ (NIH, USA).

3.2.8. Análisis de actividad de Cdc42 y Rac1 mediante sensores FRET. Las neuronas de 1 DIV (4×10^4 células por pocillo) fueron transfectadas con los sensores FRET Raichu-Cdc42 o Raichu-Rac1 para medir la actividad local de Cdc42 o Rac1, respectivamente (Nakamura et al., 2006). Cada sensor se transfectó solo o se co-transfectó junto con el cDNA que codifica la subunidad NR1-GFP en una razón 1:4 = sensor FRET: NR1-GFP. Luego de 18 h de expresión de los vectores, las neuronas fueron fijadas y montadas para la adquisición de imágenes mediante microscopía

confocal. La inhibición de los receptores de NMDA (mediado por MK-801 y D-AP5) se llevó a cabo durante el tiempo de expresión de los sensores (18 h). Las neuronas transfectadas fueron excitadas a 458 nm, y la emisión fluorescente de la proteína dadora (CFP) fue colectada a 460-490 nm y la de la proteína aceptora (YFP) a 505-530 nm. La razón de emisión aceptor/dador fue establecido como la eficiencia de FRET (YFP/CFP). El mapa de FRET fue generado dividiendo la imagen de la razón aceptor/dador por la máscara binaria obtenida a partir de la imagen de la proteína dadora CFP. Las mediciones de la eficiencia de FRET fueron llevadas a cabo seleccionando una región de interés (*region of interest*, ROI) en la neurona completa, soma, axón completo y axón proximal y distal.

3.2.9 Análisis de imágenes. Todos los análisis y procesamiento de imágenes adquiridos mediante microscopía de epifluorescencia y confocal se realizaron con el software Fiji-ImageJ (NIH, USA).

3.2.10 Análisis estadístico. Todos los valores se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Los resultados corresponden al promedio de al menos 3 réplicas provenientes de 3 cultivos independientes (N=3) (a menos que se indique otra situación). La cantidad de neuronas analizadas se indica en cada figura (n). Las diferencias entre las condiciones controles y experimentales fueron determinadas mediante prueba t-Student o análisis de varianza (ANOVA) seguido de un post-test (Dunnett). Un valor de $P < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Expresión y localización de la subunidad NR1 en cerebros embrionarios y en neuronas de hipocampo durante la adquisición de la polaridad neuronal

La subunidad NR1 se encuentra en todas las conformaciones del receptor de NMDA. Su presencia es obligatoria ya que es esencial para la dimerización con las subunidades regulatorias NR2 (NR2A-D) o NR3 (NR3A-B) y conformar así el poro de los receptores de NMDA (Atlason et al., 2007; Paoletti et al., 2013). Con el objetivo de confirmar la presencia de la subunidad NR1 en neuronas embrionarias de hipocampo en cultivo durante el proceso de polarización, se extrajeron proteínas desde homogeneizados de cerebro completo, corteza e hipocampo embrionarios (E18,5) de rata y se determinó la expresión de la subunidad mediante ensayos de western blot. La subunidad NR1 fue detectada en los 3 tejidos estudiados como una banda de 130 kDa, sugiriendo que la subunidad se expresa en estadios embrionarios (Figura 3A). Asimismo se detectó la presencia de la subunidad NR1 en proteínas extraídas de neuronas cultivadas por 24 y 48 h (estadios 2 y 3 de polaridad, respectivamente) (Figura 3B), sugiriendo que la subunidad NR1 se expresa antes y durante la adquisición de la polaridad neuronal.

Mediante ensayos de inmunofluorescencia se estudió la localización y distribución celular de la subunidad NR1 en neuronas de hipocampo en los estadios 1, 2 y 3 de polaridad (Figura 3C). La subunidad NR1 fue detectada tanto en neuronas en estadio 1 como en el soma y neuritas menores de neuronas en estadio 2 (24 h *in vitro*) (Figura 3C). Finalmente, la subunidad NR1 fue detectada en neuronas en estadio 3 de

polaridad (72 h *in vitro*) a nivel del soma y el axón emergente, observándose la segregación y enriquecimiento de la subunidad hacia el segmento distal de éste (Figura 3C).

En conjunto, los resultados sugieren que la subunidad NR1 está presente durante las etapas en que ocurre la adquisición de la polaridad neuronal.

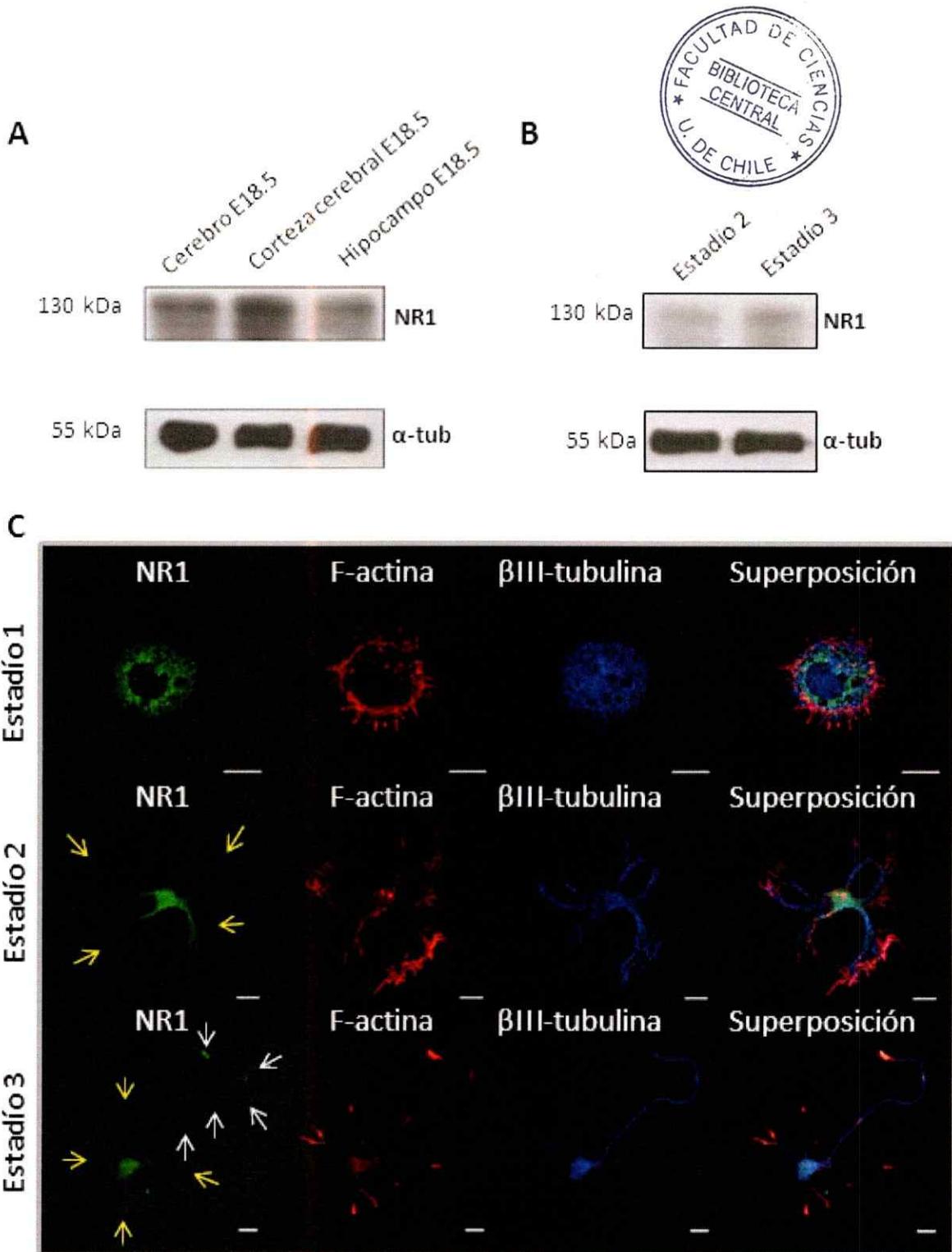


Figura 3. Expresión y localización celular de la subunidad NR1 en neuronas hipocámpales. A, Detección mediante Western Blot de la subunidad esencial NR1 en homogeneizados de cerebro, corteza e hipocampo embrionarios (E18,5) de rata. Como control de carga se utilizó α -tubulina. B, Detección mediante western blot de la

subunidad NR1 en cultivos neuronales de 24 y 48 h *in vitro* (estadios 2 y 3 de polaridad, respectivamente). C, Detección de la distribución celular de la subunidad NR1 mediante inmunofluorescencia en neuronas en estadio 1, 2 y 3 de polaridad. Flechas amarillas: neuritas menores, flechas blancas: axón. Barra de escala: 10 μm .

4.2. Estudio funcional de los receptores de NMDA en neuronas en estadio 3

Para estudiar la participación de los receptores de NMDA en neuronas inmaduras, es decir, que no están totalmente polarizadas, se confirmó la funcionalidad de estos receptores en neuronas en cultivo mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos de los receptores de NMDA y se evaluó la entrada de Ca^{2+} al interior celular.

La activación sostenida de los receptores de NMDA induce muerte neuronal en cultivos de neuronas corticales maduros (Brennan et al., 2009; Koponen et al., 2003), mientras que la actividad fisiológica es necesaria para el establecimiento y fortalecimiento de la sinapsis (Lau et al., 2009). Considerando lo anterior, en este trabajo se estudió tanto la concentración como el tiempo apropiado de estimulación de los agonistas y antagonistas del receptor de NMDA. Como agonistas se utilizó NMDA y (RS)-Tetrazol-5-yl)glycine (RSTG). Ambos compuestos sintéticos son altamente específicos, siendo este último más potente que NMDA debido a que presenta mayor afinidad por el receptor (Schoepp et al., 1991). Ambos compuestos poseen gran afinidad por el sitio de unión a glutamato, localizado en las subunidades regulatorias de la subfamilia NR2 (Furukawa et al., 2005; Schoepp et al., 1991).

Para estudiar la funcionalidad de los receptores de NMDA se realizaron ensayos para detectar la entrada de Ca^{2+} en neuronas en cultivo (3 DIV) mediante la sonda fluorescente Fluo4-AM y microscopía confocal. Después de incubar con la sonda Fluo4-

AM, las neuronas se montaron en una cámara de registro en solución Krebs con Ca^{2+} (2,5 mM). Luego de 1 min de registro, las neuronas se estimularon con NMDA en tres concentraciones (10, 25 o 50 μM) y se registró hasta completar 5 min (Figura 4A). La Figura 4B muestra el cambio relativo de intensidad de fluorescencia (F/F_0) obtenido durante los 5 min de registro a nivel del soma. La estimulación con NMDA 10 μM generó un leve incremento en la intensidad de Fluo4-AM (Figura 4A-B), mientras que el tratamiento con 25 o 50 μM de NMDA generó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia comparado con NMDA 10 μM (Figura 4B-C), sugiriendo que la entrada de Ca^{2+} generada por la activación de los receptores de NMDA depende de la dosis del agonista. Investigaciones previas han descrito que concentraciones superiores a 50 μM de NMDA resultan tóxicas para cultivos neuronales maduros (Brennan et al., 2009; Gepdiremen et al., 1998; Zhou et al., 2009). Considerando la evidencia previa y los resultados aquí presentados, se definió una concentración de NMDA de 50 μM como la concentración de trabajo. Además, para confirmar la funcionalidad del receptor de NMDA se utilizó el agonista RSTG (10 μM) (Schmitz et al., 2009; Schoepp et al., 1991) el cual generó un aumento en la fluorescencia de Fluo4-AM, confirmando los resultados obtenidos con NMDA (Figura 4A-C).

Adicionalmente, se realizaron registros en medio sin Ca^{2+} (*Hank's balanced salt solution* [HBSS] sin Ca^{2+}). El tratamiento con NMDA no aumentó la intensidad de la fluorescencia de la sonda, sugiriendo que la acumulación de Ca^{2+} registrado es dependiente de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Figura 4D-F).

En conjunto, estos resultados sugieren que los receptores de NMDA son funcionales en neuronas inmaduras de hipocampo en cultivo.

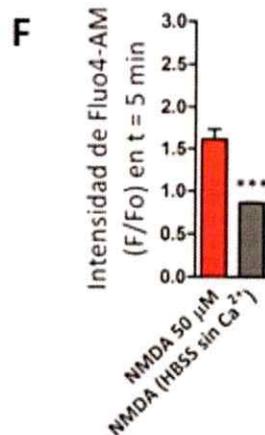
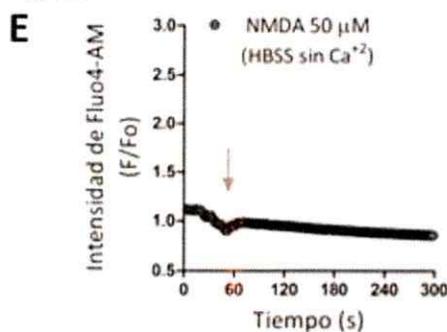
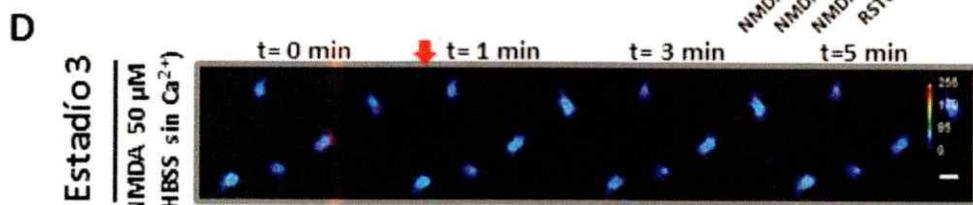
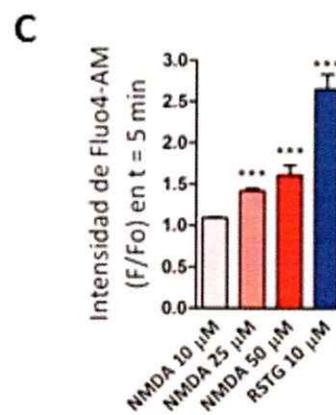
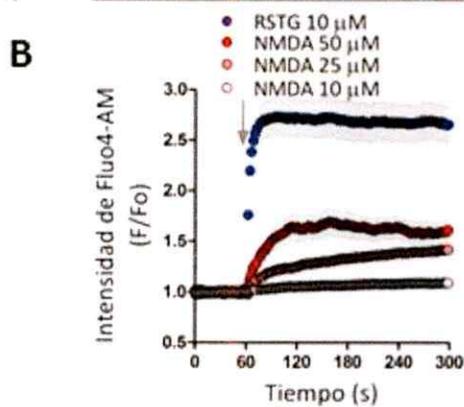
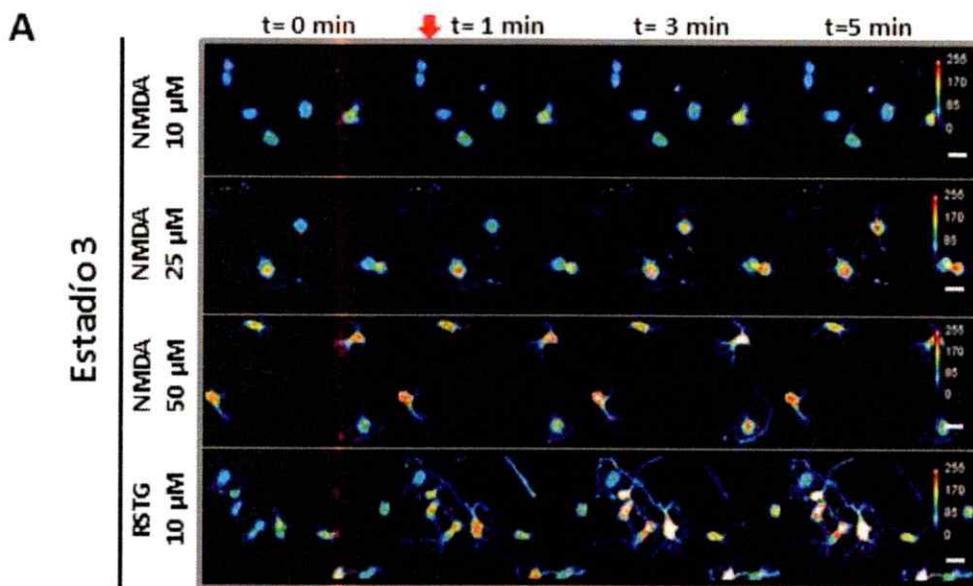


Figura 4. Estudio funcional de los receptores de NMDA en neuronas hipocampales inmaduras. Las neuronas (3 DIV) se incubaron con la sonda Fluo4-AM para registrar los cambios intracelulares de Ca^{2+} en neuronas tras la estimulación con agonistas del receptor de NMDA. **A**, Dosis respuesta de NMDA (10, 25 o 50 μM) y estimulación con RSTG (10 μM). **B**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo mostrada en **A**. **C**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en el final del registro ($t = 5$ min) a partir de **B**, $***p < 0,001$ vs NMDA (10 μM), ANOVA, post-test Dunnett. **D**, No hubo ingreso de Ca^{2+} extracelular tras la estimulación con NMDA (50 μM) en medio HBSS sin Ca^{2+} . **E**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo en medio sin Ca^{2+} mostrada en **D**. **F**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min en medio sin Ca^{2+} a partir de **E** comparado con la estimulación con NMDA (50 μM) en medio con Ca^{2+} . $***p < 0,001$ vs NMDA, Prueba t-Student, $N=3$. 50 neuronas fueron analizadas para cada condición. Barras de escala: 20 μm .

Para bloquear el funcionamiento de los receptores de NMDA y confirmar su activación, se utilizaron los inhibidores D-AP5 y MK-801. El primero corresponde a un inhibidor competitivo que bloquea el sitio de unión de glutamato en las subunidades NR2 o NR3 evitando la activación de los receptores de NMDA (Evans et al., 1982). Por otro lado, MK-801 es un inhibidor no competitivo capaz de ingresar al interior del poro del canal y bloquearlo únicamente cuando éste se encuentra activo (Huettner and Bean, 1988; Wong et al., 1986).

Utilizando la misma aproximación de los registros intracelulares de Ca^{2+} y, considerando lo reportado en la literatura, se evaluó la concentración necesaria de los inhibidores D-AP5 y MK-801 para bloquear la acción específica de los agonistas NMDA y RSTG en nuestro modelo de estudio. Para ello, luego de incubar la sonda Fluo4-AM, las neuronas (3DIV) se incubaron durante 40 minutos con D-AP5 (50 o 100 μM) o con MK-801 (5 μM) previo a los registros de las señales de Ca^{2+} . La inhibición con D-AP5 (50 μM) bloqueó parcialmente la entrada de Ca^{2+} generada por el tratamiento con NMDA (Figura 5A-C). En contraparte, neuronas tratadas previamente

con D-AP5 (100 μ M) (Grover et al., 2009; Wang et al., 2011) bloqueó de forma efectiva a los receptores luego de la estimulación con NMDA (Figura 5A-C). Para el caso de MK-801, fue necesario una concentración de 5 μ M (Xiao et al., 2013) para bloquear los receptores de NMDA luego de la estimulación tanto con NMDA como con RSTG (Figura 5D-F). Debido a lo anterior, en los siguientes experimentos se utilizó una concentración de 100 μ M para D-AP5 y 5 μ M para MK-801.

En conjunto, los resultados sugieren que los agonistas utilizados activan específicamente a los receptores de NMDA en neuronas hipocampales en estadio 3 de polaridad, incrementando la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

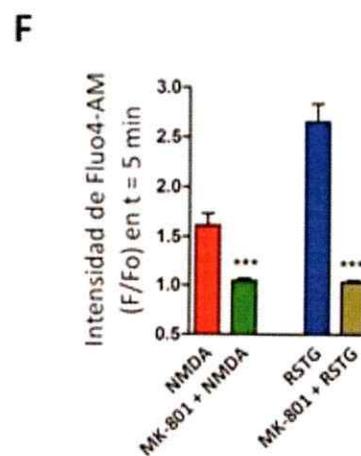
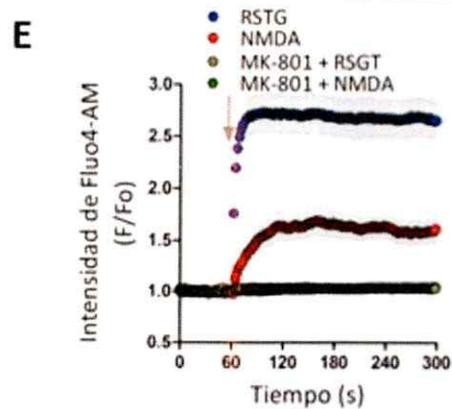
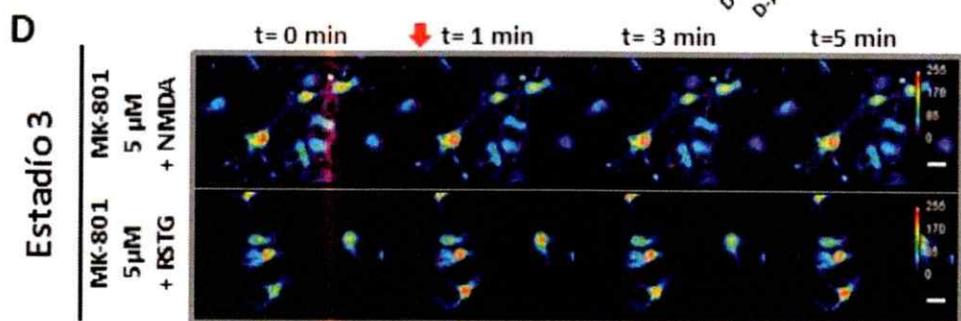
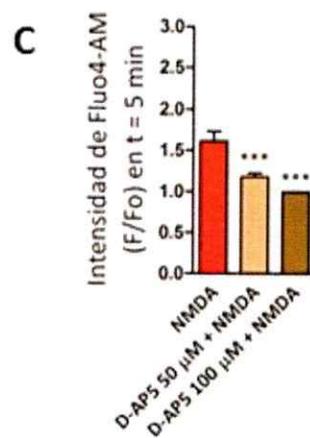
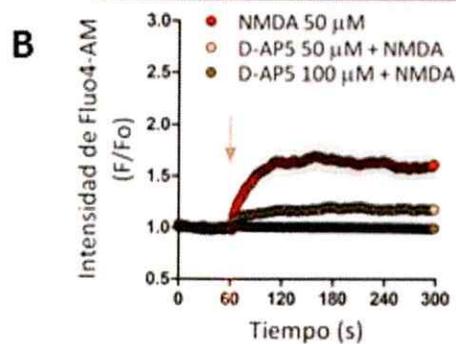
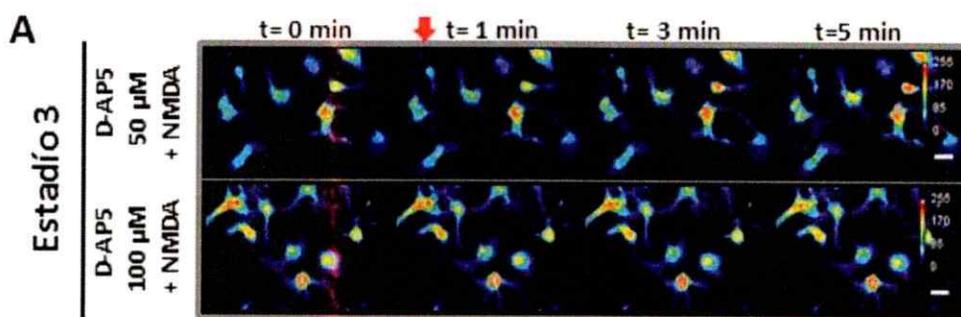


Figura 5. Inhibición farmacológica de los receptores de NMDA en neuronas de 3 DIV. **A**, El tratamiento con D-AP5 50 μM bloqueó parcialmente la entrada de Ca^{2+} tras la estimulación con NMDA. Sin embargo, el tratamiento con D-AP5 100 μM bloqueó completamente la activación de los receptores de NMDA luego de la estimulación con NMDA. **B**, Cuantificación de la razón F/F_0 en el tiempo mostrado en **A**. **C**, Cuantificación de la razón F/F_0 correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min a partir de **B**. *** $p < 0,001$ vs NMDA, ANOVA, post-test Dunnett. **D**, El tratamiento con MK-801 (5 μM) generó una completa inhibición del aumento de la señal de Ca^{2+} generado por la estimulación con NMDA (50 μM) como con RSTG (10 μM). **E**, Cuantificación de la razón F/F_0 luego de la estimulación de los receptores de NMDA tanto en ausencia como en presencia de MK-801 mostrada en **D**. **F**, Cuantificación de la razón F/F_0 correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min a partir de **E**; incluye la fluorescencia obtenida debido a NMDA o RSTG. *** $p < 0,001$ vs NMDA o RSTG, respectivamente, Prueba t-Student, $N=3$. 50 neuronas fueron analizadas para cada condición. Barras de escala: 20 μm .

4.3. Estudio funcional de los receptores de NMDA en el establecimiento de la polaridad neuronal (estadios 1 y 2)

Luego de haber establecido la concentración de trabajo de los agonistas y antagonistas, se procedió a estudiar la funcionalidad de los receptores de NMDA en estadios previos al quiebre de simetría celular (estadios 1 y 2 de polaridad).

Para estudiar la actividad de los receptores de NMDA en estadios tempranos de polaridad, las neuronas se cultivaron por 4 horas luego de la siembra, tiempo en el cual la mayoría de las neuronas se encuentran en estadio 1. Luego, se incubaron con Fluo4-AM para estudiar la entrada de Ca^{2+} mediada por los receptores de NMDA (Figura 6). La estimulación con NMDA produjo un leve aumento en la intensidad de la sonda (Figura 6A-C). La estimulación con RSTG, en cambio, generó un mayor incremento en la intensidad de fluorescencia (Figura 6A-C). Debido a que la señal registrada fue de menor intensidad que aquellas encontradas en neuronas en estadio 3 (Figura 4A-C), se

utilizó como control positivo el ionóforo ionomicina (1 μ M) en t = 300s del registro. (Figura 6A-C).

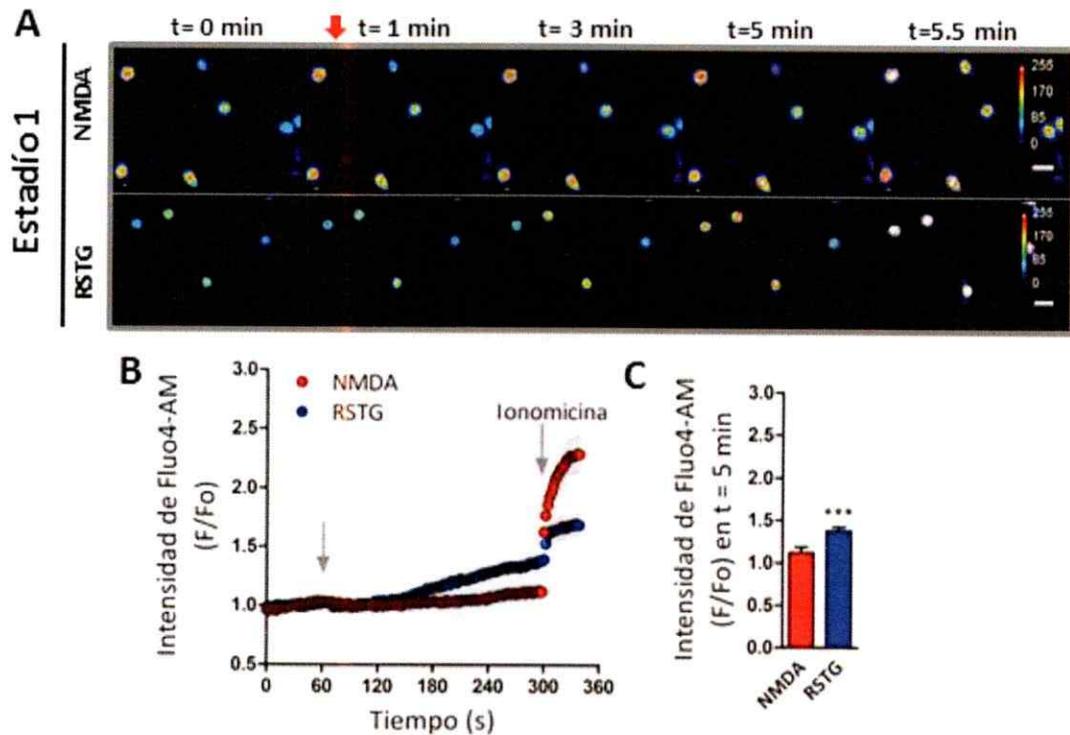


Figura 6. Estudio funcional de los receptores de NMDA en neuronas en estadio 1 de polaridad. Las neuronas de 4 h *in vitro* se incubaron con la sonda Fluo4-AM para registrar los cambios intracelulares de Ca^{2+} en neuronas tras la estimulación con agonistas del receptor de NMDA. **A**, Estimulación con NMDA o con RSTG. Incluye la estimulación con ionomicina en t = 5,5 min. **B**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo mostrada en **A**. **C**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en t = 5 min luego de la estimulación de los receptores de NMDA tanto con NMDA como con RSTG a partir de **B**. *** $p < 0,001$ vs NMDA, Prueba t-Student, N=3. 50 neuronas fueron analizadas para cada condición. Barras de escala: 20 μ m.

Posteriormente, se realizaron registros en neuronas de 18 h *in vitro*, tiempo en el cual la mayoría de las neuronas se encuentran en estadio 2, previo a la polarización neuronal. Los registros de la entrada de Ca^{2+} de la figura 7A-C muestran un rápido incremento de la intensidad de Fluo4-AM luego de la estimulación tanto con NMDA

como con RSTG. El tratamiento con NMDA en medio HBSS sin Ca^{2+} , en cambio, no generó el incremento de la intensidad de la sonda (Figura 7D-F). La estimulación con NMDA en neuronas pre-incubadas con D-AP5 no generó un ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Figura 7G-I). De igual modo, MK-801 inhibió efectivamente la respuesta a la estimulación con NMDA (Figura 7G-I). Los resultados sugieren que los agonistas utilizados activan específicamente a los receptores de NMDA en neuronas en estadio 2 de polaridad, es decir, momentos antes de perder la simetría neuronal.

En conjunto, nuestros datos sugieren que los receptores de NMDA son funcionales en estadios 2 y 3 de polaridad. Sin embargo, debido a que la respuesta ante su estimulación en estadio 1 fue leve, este hallazgo sugeriría que la actividad de los receptores de NMDA se alcanza conforme la neurona madura.

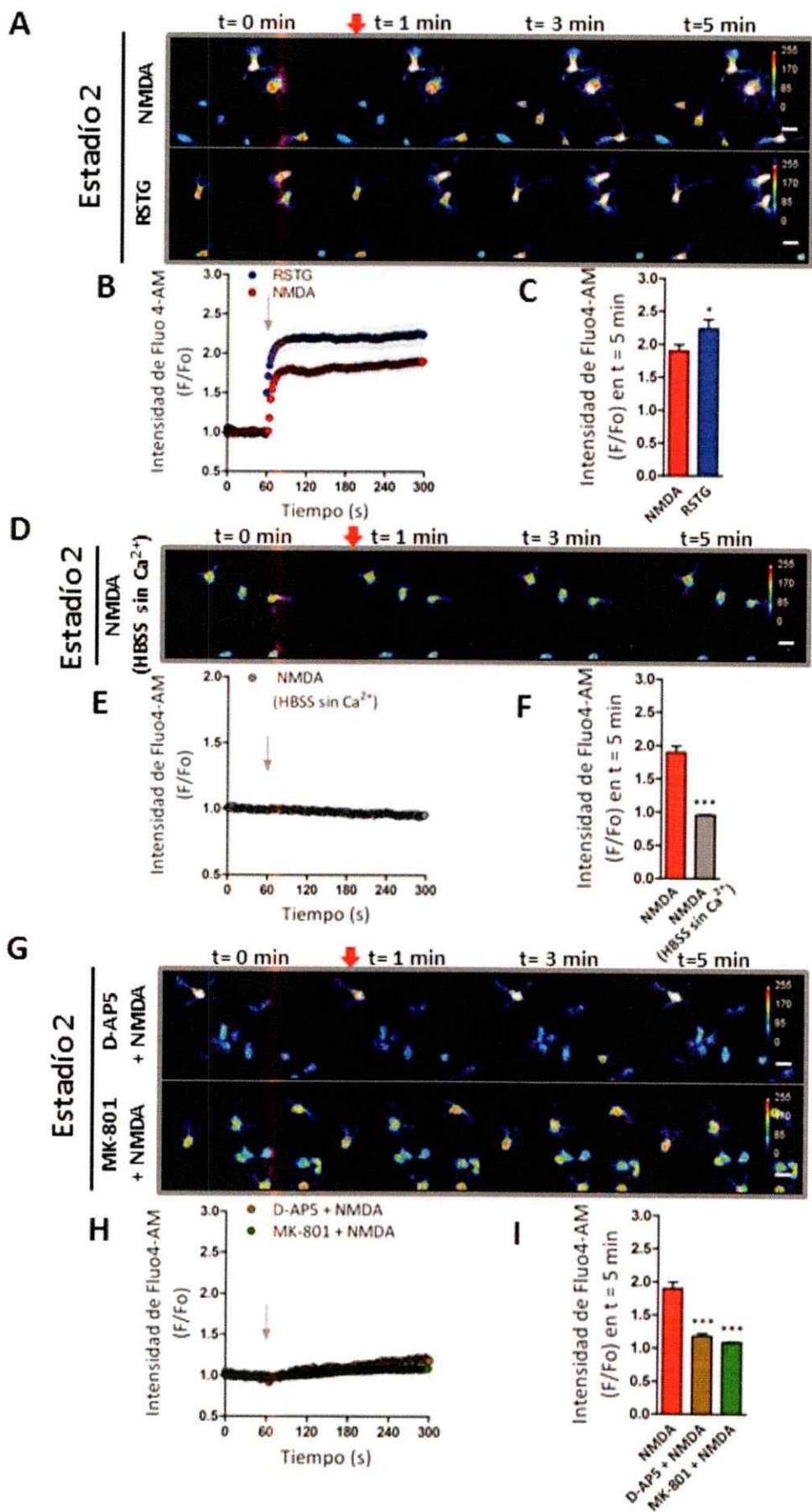


Figura 7. Estudio funcional de los receptores de NMDA en neuronas en estadio 2 de polaridad. Las neuronas de 18 h *in vitro* se incubaron con la sonda Fluo4-AM para registrar los cambios intracelulares de Ca^{2+} tras la estimulación con agonistas del receptor de NMDA. **A**, Estimulación con NMDA o con RSTG. **B**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo mostrada en **A**. **C**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min a partir de **B**, $*p < 0,05$ vs NMDA, Prueba t-Student. **D**, No hubo ingreso de Ca^{2+} extracelular tras la estimulación con NMDA en medio HBSS sin Ca^{2+} . **E**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo en medio sin Ca^{2+} mostrada en **D**. **F**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min en medio sin Ca^{2+} a partir de **E**, $***p < 0,001$ vs NMDA, Prueba t-Student. **G**, La presencia tanto de D-AP5 como de MK-801 bloqueó el ingreso de Ca^{2+} extracelular luego de la estimulación con NMDA. **H**, Cuantificación de la razón F/Fo luego de la estimulación de los receptores de NMDA mostrada en **G**. **I**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min a partir de **H**. $***p < 0,001$ vs NMDA, ANOVA, post-test Dunnett. $N = 3$, 50 neuronas fueron analizadas para cada condición. Barras de escala: 20 μM .

4.4. Participación de los receptores de NMDA en el establecimiento de la polaridad neuronal

Con el objetivo de estudiar la contribución de los receptores de NMDA en el establecimiento de la polaridad neuronal, se realizaron ensayos de pérdida y ganancia de función mediante estrategias farmacológicas.

En primer lugar, para evaluar la adquisición de polaridad, las neuronas se trataron con los inhibidores o agonistas de los receptores de NMDA 4 h después de la siembra (tiempo en el cual la mayoría de las neuronas se encuentran en estadio 1 y en el cual se detectó un leve ingreso de Ca^{2+} tras la activación de los receptores de NMDA [Figura 6A-C]). Luego de 24 h en cultivo, las neuronas se fijaron para contabilizar la población de neuronas en estadios 1, 2 y 3 de polaridad (Figura 8A-B). El tratamiento con D-AP5 o MK-801 produjo un incremento significativo en el número de neuronas en estadio 1 de polaridad y una disminución de la población de neuronas en estadio 2 en

comparación con la condición control. Si bien hubo una disminución en el número de neuronas en estado 3, tal diferencia fue estadísticamente significativa solo en el caso de la inhibición con MK-801 (Figura 8B). En contraste, el tratamiento con NMDA no afectó significativamente la polarización neuronal. Sin embargo, del tratamiento con RSTG produjo un incremento significativo de neuronas en estado 2 de polaridad (Figura 8B).

Estos datos sugieren que los receptores de NMDA contribuyen a la adquisición de la polaridad de neuronas de hipocampo en cultivo.

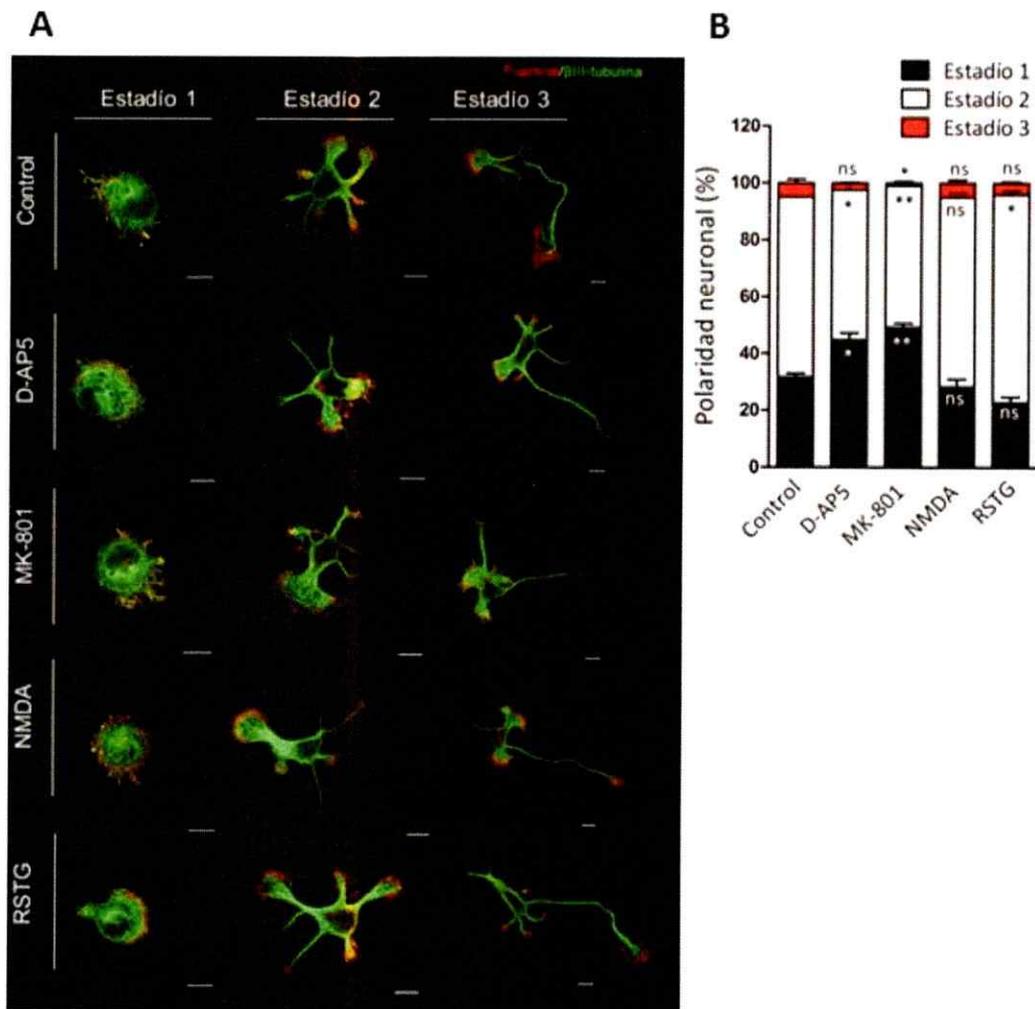


Figura 8. Contribución de los receptores de NMDA en la adquisición de la polaridad neuronal. Las neuronas se trataron con D-AP5, MK-801, NMDA o RSTG 4 h después de la siembra y se fijaron luego de 24 h en cultivo para detectar mediante inmunofluorescencia a la proteína β III-tubulina (marcador neuronal) y F-actina con faloidina conjugada a Alexa Flúor 546. **A**, Imágenes representativas de neuronas en estadio 1, 2 y 3 de polaridad (24 h). **B**, Análisis de la distribución poblacional de estadios de polaridad luego de modular la actividad de los receptores de NMDA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs el control en estadio 1, 2 o 3, según corresponda, ns = estadísticamente no significativo, ANOVA, post-test Dunnett. Resultados provienen desde 3 cultivos independientes (N=3). Alrededor de 70 neuronas fueron analizadas para cada condición. Barra de escala: 10 μ m.

En segundo lugar, se evaluó la contribución de los receptores de NMDA en el crecimiento axonal. Para ello, las neuronas fueron tratadas con D-AP5 o MK-801 a las 18 h en cultivo (tiempo en el cual la mayoría de las neuronas se encuentran en estadio 2, previo al quiebre de simetría). Posteriormente, las neuronas se fijaron a las 72 h de cultivo para evaluar el crecimiento axonal. Se detectó mediante inmunofluorescencia a las proteínas MAP2 y Tau, marcadores de los compartimentos somato-dendríticos y axonal, respectivamente. Tanto la inhibición con D-AP5 como con MK-801 disminuyó el crecimiento axonal (Figura 9A-B), sugiriendo que los receptores de NMDA contribuyen al crecimiento del axón en neuronas en cultivo. En contraste, tanto el tratamiento con NMDA como con RSTG incrementó significativamente la longitud axonal (Figura 9A-B). Ninguno de los tratamientos farmacológicos afectaron la segregación de las proteínas MAP2 y Tau en sus respectivos compartimentos, sugiriendo un efecto específico sobre el crecimiento axonal y no sobre la determinación de estos compartimentos (Figura 9A). Adicionalmente, tratamientos con concentraciones crecientes de NMDA (0, 10, 25, 50, 75 y 100 μ M) a las 18 h en cultivo, promovieron el crecimiento axonal en una forma dependiente de la concentración (Figura 9C).

En conjunto, estos datos sugieren que los receptores de NMDA contribuyen al crecimiento axonal de neuronas hipocampales en cultivo.

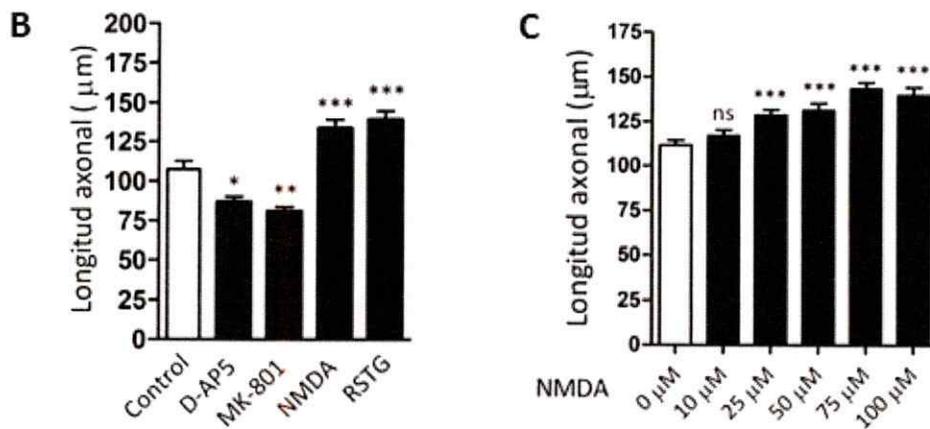
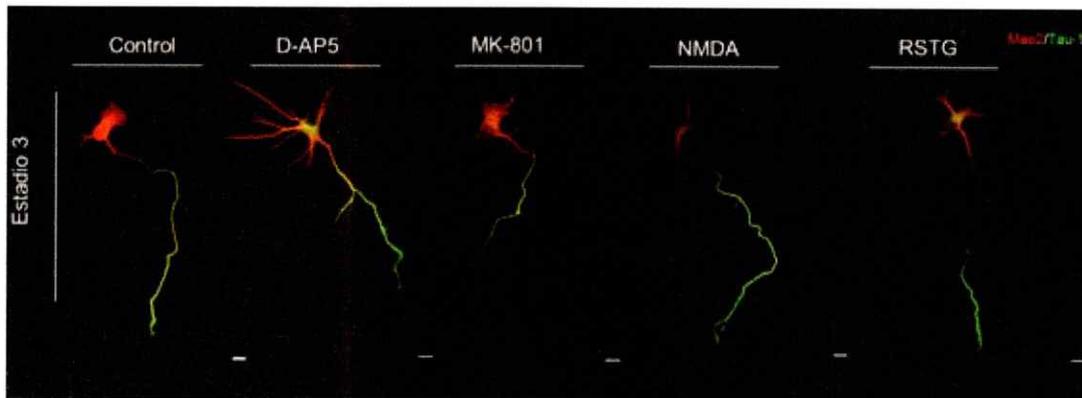
A

Figura 9. La modulación farmacológica de los receptores de NMDA altera la elongación axonal de neuronas hipocámpales. Las neuronas se trataron con D-AP5, MK-801, NMDA o RSTG 18 h después de la siembra y se fijaron luego de 72 h en cultivo. Posteriormente, se detectó mediante inmunofluorescencia a las proteínas MAP2 y Tau. **A**, Imágenes representativas de neuronas en estadio 3 de polaridad bajo los tratamientos señalados. **B**, Medición de la longitud axonal de las neuronas (3DIV) bajo los tratamientos farmacológicos correspondientes. **C**, Medición de la longitud axonal de neuronas de 3DIV tratadas con concentraciones crecientes de NMDA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs el control; ns = estadísticamente no significativo, ANOVA, post-test Dunnett. Resultados provienen desde 3 cultivos independientes ($N=3$). 150 neuronas fueron analizadas para cada condición. Barra de escala: 10 μm .

Adicionalmente, se utilizó una aproximación genética de ganancia de función de los receptores de NMDA. Se ha reportado que la expresión ectópica de las subunidades

NR2A o NR2B regula la arborización dendrítica de neuronas tectales en *Xenopus* (Ewald et al., 2008) y de neuronas de la médula espinal ventral (Sepulveda et al., 2010).

Para evaluar la ganancia de función de las subunidades de los receptores de NMDA, se utilizaron vectores que codifican para las subunidades NR1-GFP, NR2A y NR2B (Kim et al., 2005; Luo et al., 2002). Las neuronas se transfectaron inmediatamente después de la siembra con el vector que codifica las subunidades NR1-GFP, NR2A o NR2B junto con el vector pCAG-GFP. Además, la expresión del vector pCAG-GFP se utilizó como condición control. Después de 3 DIV las neuronas se fijaron para detectar mediante inmunofluorescencia la distribución de MAP2 y Tau y para estudiar la longitud axonal. Las neuronas que fueron transfectadas con la subunidad NR1-GFP exhibieron un incremento de un $33\% \pm 5$ en la longitud axonal vs el control (Figura 10A-B). La expresión de la subunidad NR2A generó un incremento de un $76\% \pm 7$ en el crecimiento del axón (Figura 10A-B). La expresión de la subunidad NR2B generó un incremento de un $40\% \pm 6$ en el crecimiento axonal (Figura 10A-B), similar al efecto de la sobre-expresión de la subunidad NR1. Además, el incremento exhibido por la expresión de la subunidad NR2A fue estadísticamente significativo en comparación con las subunidades NR1 y NR2B ($33\% \pm 4$ y $27\% \pm 1$, respectivamente).

1

En conjunto, estos datos sugieren que los receptores de NMDA contribuyen al crecimiento axonal de neuronas hipocampales *in vitro*.

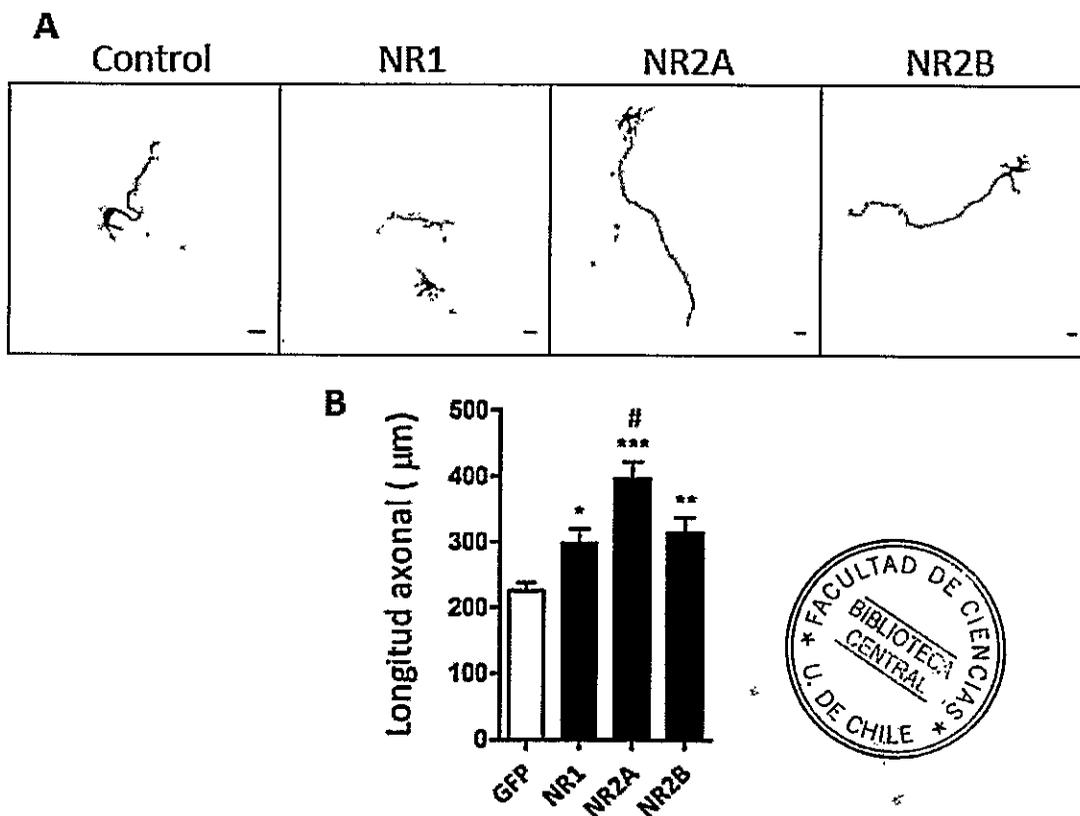


Figura 10. La sobre-expresión de las subunidades NR1-GFP, NR2A y NR2B incrementa el crecimiento axonal de neuronas hipocámpales. Las neuronas se transfectaron inmediatamente después de la siembra con las subunidades NR1-GFP, NR2A o NR2B junto con GFP como control de transfección. Las neuronas se fijaron luego de 72 h en cultivo. **A,** Imágenes representativas de neuronas control (GFP) y transfectadas con NR1-GFP, NR2A o NR2B. **B,** Cuantificación de la longitud axonal. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs control, ANOVA, post-test Dunnett, y # $p < 0,05$ vs NR1-GFP o NR2B, Prueba t-Student, $N=3$. 40 neuronas fueron analizadas para cada una de las condiciones. Barra de escala: 20 μm .

4.5. La activación de los receptores de NMDA induce la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático

La entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA promueve la liberación de Ca^{2+} mediado por los receptores RyR e IP3R del RE (Ruiz et al., 2009; Verkhratsky and Shmigol, 1996). Adicionalmente, el incremento de Ca^{2+} citoplasmático mediado

tanto por los receptores de NMDA como por los receptores RyR e IP3R promueven la activación de las proteínas Rho GTPasa Cdc42 y Rac1, involucradas en el remodelamiento del citoesqueleto de actina, regulando diferentes aspectos del crecimiento neuronal (Jacques-Fricke et al., 2006; Jin et al., 2005; Nakamuta et al., 2011; Wilson et al., 2016).

Con el fin de evaluar el proceso de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} tras la estimulación de los receptores de NMDA, se realizaron experimentos de registros de Ca^{2+} intracelular en neuronas hipocampales en estadio 2 y 3 de polaridad en un contexto de inhibición tanto del RyR como del IP3R. Para ello, se incorporó Fluo4-AM en neuronas de 18 h en cultivo y luego fueron incubadas con rianodina en concentraciones inhibitorias (25 μM) (Adasme et al., 2015; Wilson et al., 2016) o con el inhibidor del receptor de IP3 (2-APB, 10 μM) (Ruiz et al., 2009), previo a la estimulación de los receptores de NMDA.

Luego de registrar los niveles de Ca^{2+} intracelulares durante 1 min, se estimularon los receptores de NMDA tanto con NMDA como con RSTG. Tanto el tratamiento con rianodina como con 2-APB bloqueó el incremento en la intensidad de fluorescencia obtenido luego de estimular los receptores de NMDA (Figura 11A-H), sugiriendo que el ingreso de Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA induce una liberación de Ca^{2+} desde el RE en neuronas en estadio 2 de polaridad. Además, la inhibición conjunta tanto de los receptores RyR e IP3R generó de forma similar una reducción en los niveles de Ca^{2+} intracelular tras la estimulación con los agonistas de los receptores de NMDA (Figura 11I-L). Por otra parte, la adición de EGTA 2,25 mM

(quelante de Ca^{2+}) luego de la estimulación de los receptores de NMDA bajo la inhibición de los IP3R redujo notablemente la intensidad de fluorescencia del indicador de Ca^{2+} sustentando el hecho de que la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los receptores de NMDA promueve la salida de Ca^{2+} desde los almacenamientos internos del RE (Figura 11G).

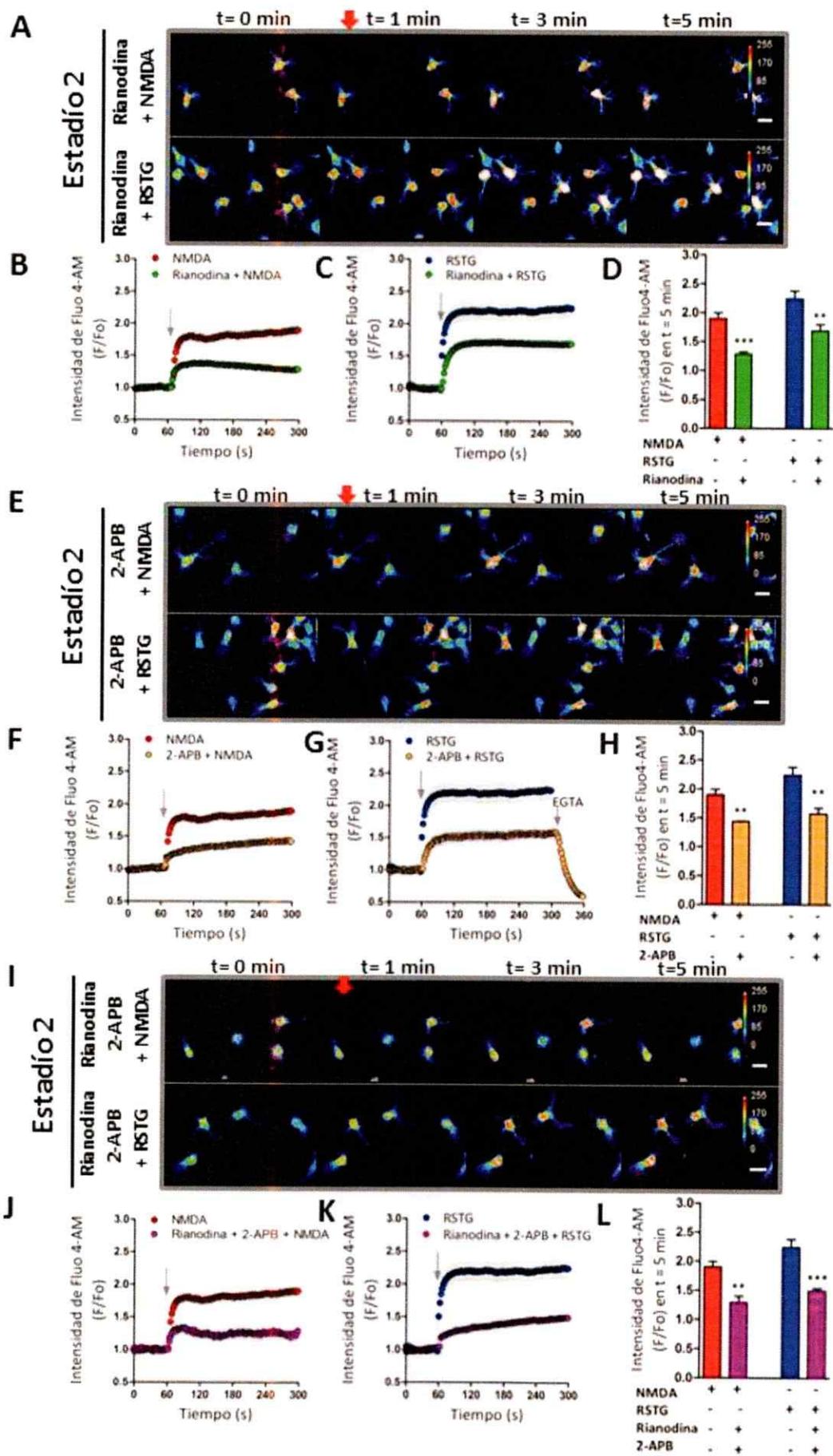


Figura 11. Estudio del acoplamiento funcional entre los receptores de NMDA y los receptores de rianodina e IP3 en neuronas en estadio 2 de polaridad. Las neuronas de 18 h *in vitro* se incubaron con la sonda Fluo4-AM y con rianodina, 2-APB o ambos para registrar los cambios intracelulares de Ca^{2+} tras la estimulación con agonistas del receptor de NMDA. **A**, Muestra el bloqueo del incremento de la intensidad de fluorescencia en presencia de rianodina luego de estimular los receptores de NMDA tanto con NMDA como con RSTG. **B y C**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo bajo la estimulación con NMDA o RSTG mostrada en **A**. Incluye la estimulación con NMDA o RSTG. **D**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min a partir de **B y C**. **E**, Muestra el bloqueo del incremento de la intensidad de fluorescencia en presencia de 2-APB luego de la estimulación tanto con NMDA como con RSTG. **F y G**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo bajo la estimulación con NMDA o RSTG mostrada en **E**. Incluye la estimulación con NMDA o RSTG. Además, la adición de EGTA en $t = 5$ min disminuye el ingreso de Ca^{2+} al interior celular mostrada en **G**. **H**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min a partir de **F y G**. **I**, Muestra el bloqueo del incremento de la intensidad de fluorescencia en presencia de rianodina y 2-APB luego de estimular los receptores de NMDA tanto con NMDA como con RSTG. **J y K**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo bajo la estimulación con NMDA o RSTG mostrada en **I**. Incluye la estimulación con NMDA o RSTG. **L**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min a partir de **J y K**. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs NMDA o RSTG según corresponda, ns= estadísticamente no significativo, Prueba t-Student, N=2. 30 neuronas fueron analizadas para cada condición. Barras de escala: 20 μ M.

Por otro lado, se realizaron registros intracelulares de Ca^{2+} inducidos por la activación de los receptores de NMDA bajo condiciones de inhibición de los receptores de RyR e IP3R en neuronas en estadio 3 de polaridad (Figura 12). Similar a los experimentos anteriores, el bloqueo de los receptores de Rianodina o de IP3 generó una reducción en el incremento del Ca^{2+} intracelular mediado por los receptores de NMDA (Figura 12A-H). De igual manera, la inhibición conjunta de los receptores RyR e IP3R causó una disminución en el registro intracelular de Ca^{2+} (Figura 12I-L).

En conjunto, estos resultados sugieren que el ingreso de Ca^{2+} mediado por los receptores de NMDA promueve la salida de Ca^{2+} desde el RE a través de los receptores

RyR e IP3R en neuronas de hipocampo durante las etapas de adquisición de la polaridad neuronal.

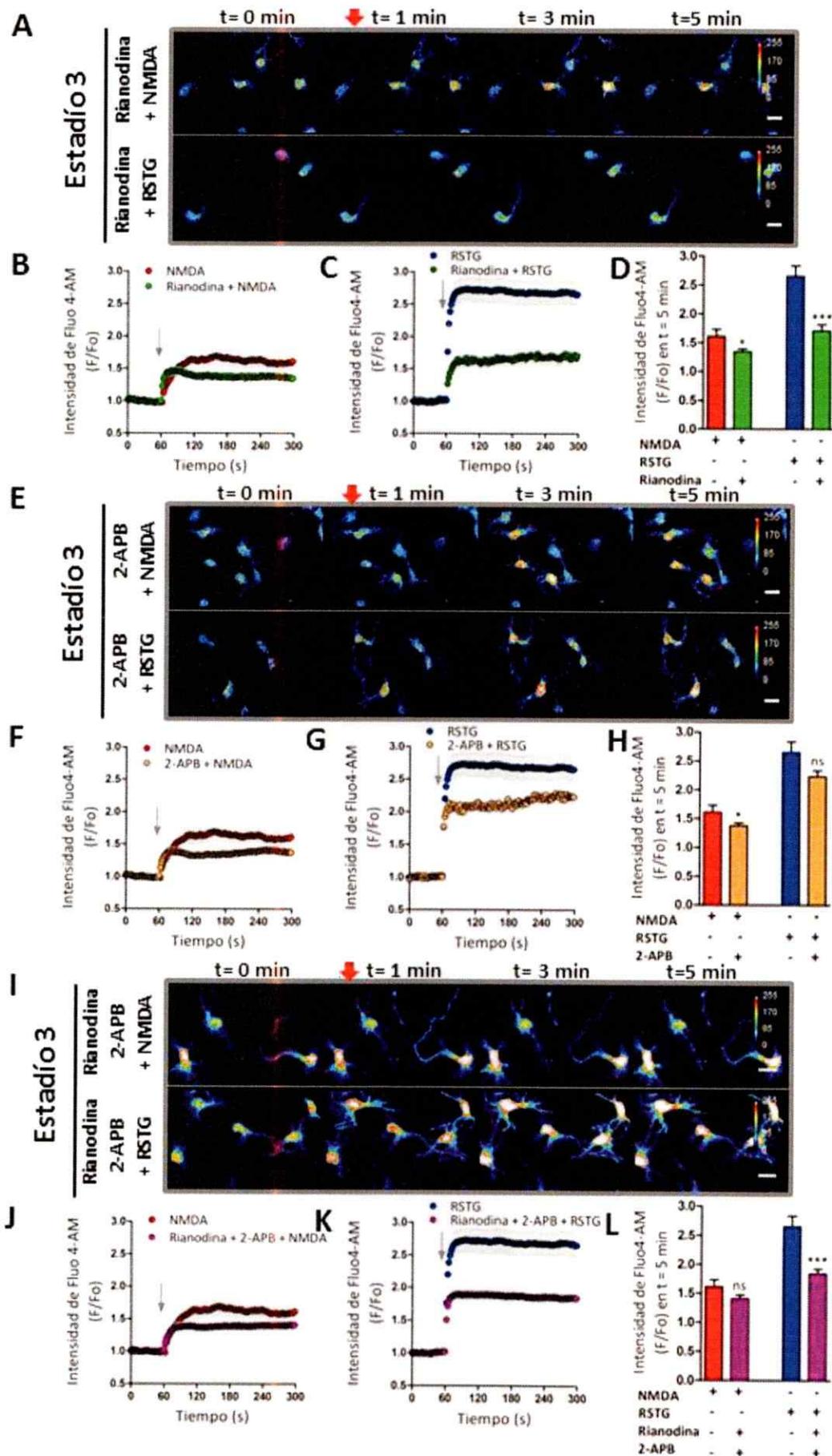


Figura 12. Estudio del acoplamiento funcional entre los receptores de NMDA y los receptores de rianodina e IP3 en neuronas en estadio 3 de polaridad. Las neuronas de 72 h *in vitro* se incubaron con la sonda Fluo4-AM y con rianodina, 2-APB o ambos para registrar los cambios intracelulares de Ca^{2+} tras la estimulación con agonistas del receptor de NMDA. **A**, Muestra el bloqueo del incremento de la intensidad de fluorescencia en presencia de rianodina luego de la estimulación tanto con NMDA como con RSTG. **B y C**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo bajo la estimulación con NMDA o RSTG mostrada en **A**. Incluye la estimulación con NMDA o RSTG. **D**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min a partir de **B y C**. **E**, Muestra el bloqueo del incremento de la intensidad de fluorescencia en presencia de 2-APB luego de la estimulación tanto con NMDA como con RSTG. **F y G**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo bajo la estimulación con NMDA o RSTG mostrada en **E**. Incluye la estimulación con NMDA o RSTG. **H**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min a partir de **F y G**. **I**, Muestra el bloqueo del incremento de la intensidad de fluorescencia en presencia de rianodina y 2-APB luego de estimular los receptores de NMDA tanto con NMDA como con RSTG. **J y K**, Cuantificación de la razón F/Fo en el tiempo bajo la estimulación con NMDA o RSTG mostrada en **I**. Incluye la estimulación con NMDA o RSTG. **L**, Cuantificación de la razón F/Fo correspondiente a la intensidad de fluorescencia en $t = 5$ min a partir de **J y K**. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ vs NMDA o RSTG según corresponda, ns= estadísticamente no significativo, Prueba t-Student, N=2. 30 neuronas fueron analizadas para cada condición. Barras de escala: 20 μ M.

4.6 La actividad de los receptores de NMDA regula la activación de proteínas

Cdc42 y Rac1

Estudios previos sugieren que el incremento de Ca^{2+} citoplasmático proveniente tanto desde el medio extracelular como desde el RE puede generar la activación de las proteínas Rho GTPasa Cdc42 y Rac1, y la disminución de la actividad de RhoA (Sin et al., 2002). Adicionalmente, la familia de proteínas Rho GTPasa regula la polarización, formación de neuritas, crecimiento axonal y dendrítico (Garvalov et al., 2007, González-Billault et al., 2012; Govek et al., 2005; Jin et al., 2005; Li et al., 2000; Sin et al., 2002; Wilson et al., 2016).

Considerando nuestros resultados, se evaluó la actividad de las proteínas Cdc42 y Rac1 en neuronas que sobre-expresan las unidades NR1-GFP. Se recurrió a sondas reporteras basadas en la transferencia de energía de resonancia de Förster (*Förster resonance energy transfer*, FRET), Raichu-Cdc42 y Raichu-Rac1 (Itoh et al., 2002; Nakamura et al., 2006). Estos sensores están conformados por 4 módulos (de N a C-terminal): un dador de energía (*Cyan Fluorescent Protein*, CFP), la proteína Cdc-42 o Rac1, el dominio de unión a Cdc42/Rac1 de la proteína Pak-1 (*Pak1-binding domain*, PBD) y el receptor de energía (*Yellow Fluorescent Protein*, YFP). Cuando la GTPasa está unida a GDP (estado inactivo), el biosensor se encuentra desplegado. Bajo esta condición, la proteína dadora CFP no transfiere energía a la proteína aceptora YFP (ausencia de FRET). Sin embargo, cuando el dominio Cdc42 o Rac1 está unido a GTP (estado activo), éste se une al PBD, aproximando la proteína dadora CFP a la proteína aceptora YFP, transfiriendo energía (presencia de FRET) (Itoh et al., 2002; Nakamura et al., 2006).

Para estudiar la actividad de las proteínas Cdc42 y Rac1 después de la expresión de la subunidad NR1-GFP, neuronas hipocampales de 1 DIV se transfectaron con los sensores FRET Raichu o se co-transfectaron con la subunidad NR1-GFP. Además, las neuronas fueron incubadas con los inhibidores MK-801 y D-AP5 para bloquear a los receptores de NMDA desde el estadio 2 de polaridad. Luego de 1 día de expresión, las neuronas se fijaron para evaluar la eficiencia de FRET mediante el uso de microscopía confocal (Figura 13). La cuantificación de la eficiencia de FRET fue medida en la neurona completa, compartimento somato-dendrítico, axón completo, axón distal y

proximal y se evaluó la razón (axón distal/proximal). Los mapas de FRET se muestran en la figura 13. El código de color, que reporta la eficiencia de FRET, es proporcional a la actividad de la GTPasa en estudio (Figura 13A, C). La expresión de la subunidad NR1 incrementó globalmente la actividad de Cdc42 ($24\% \pm 0,09$), mientras que la inhibición de los receptores de NMDA disminuyó significativamente la actividad de Cdc42 ($35\% \pm 0,02$) (Figura 13A-B). En contraparte, la expresión de la subunidad NR1 generó un incremento global de la actividad de Rac1 ($50\% \pm 0,2$), mientras que la inhibición con los antagonistas de los receptores de NMDA generó una disminución de la actividad de Rac1 ($23\% \pm 0,03$) (Figura C-D).

En conjunto, estos datos sugieren que los receptores de NMDA regulan el ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular y promueven tanto la salida de Ca^{2+} desde el RE como la activación de Cdc42 y Rac1, proteínas de la familia Rho GTPasa que están involucradas en el desarrollo neuronal.

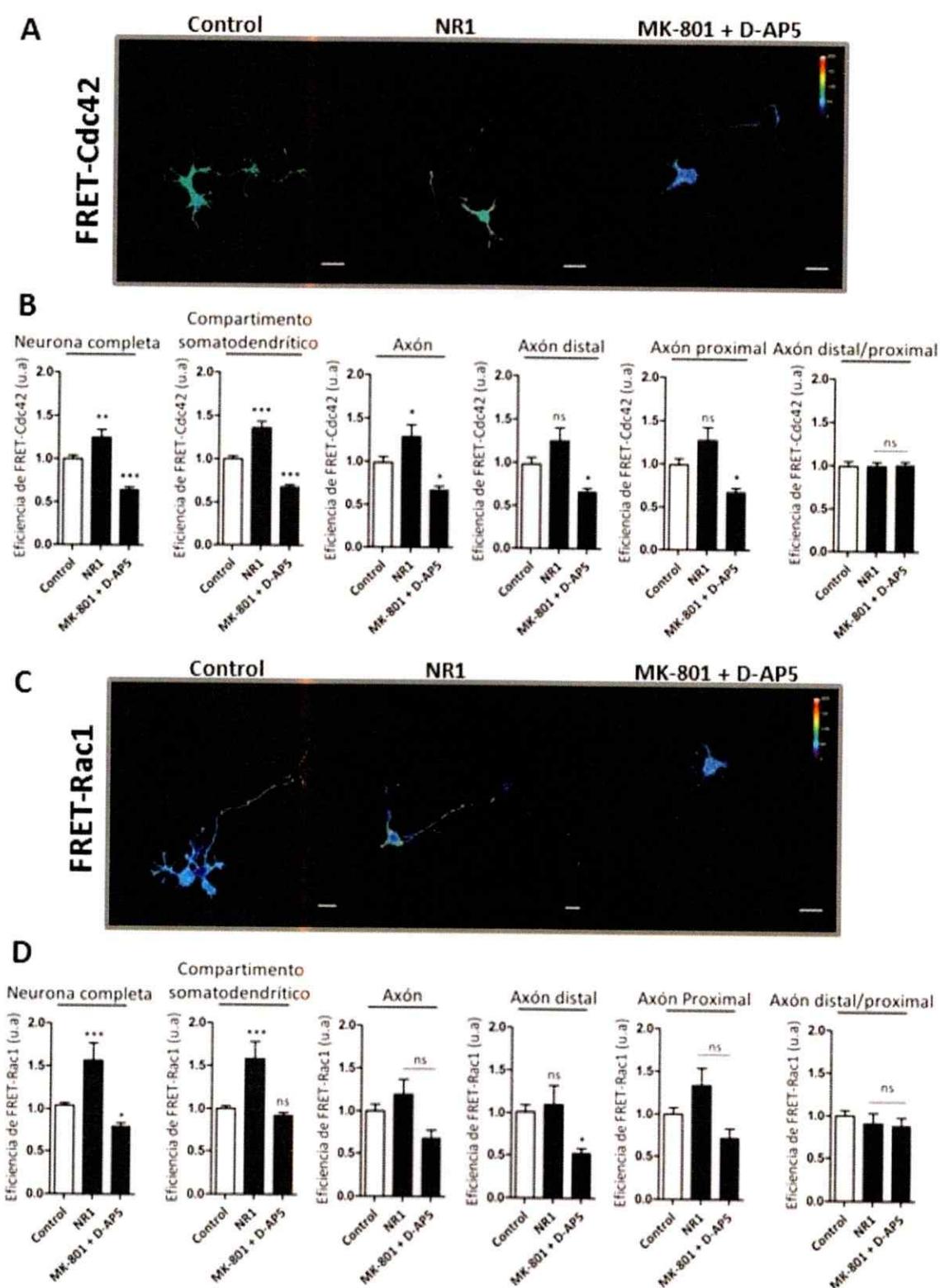


Figura 13. Los receptores de NMDA regulan la activación de las proteínas Cdc42 y

Rac1. Neuronas hipocampales de 1DIV fueron transfectadas con los sensores FRET Raichu-Cdc42 o Raichu-Rac1 o co-transfectadas con la construcción que expresa la subunidad NR1-GFP y fueron fijadas a los 2DIV para evaluar la eficiencia de FRET. **A** y **C**, Mapas de FRET representativos para Cdc42 o Rac1, respectivamente, en neuronas control, co-transfectadas con la subunidad NR1-GFP y neuronas tratadas con los inhibidores D-AP5 más MK-801. **B** y **D**, Cuantificación de la eficiencia de FRET para Cdc42 y Rac1, respectivamente, en la neurona completa, compartimento somato-dendrítico, axón completo, axón distal y proximal y la razón (axón distal/proximal). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ comparado contra el control, ns= estadísticamente no significativo, ANOVA, post-test Dunnett, N=2. 20 neuronas fueron analizadas para cada condición. Barras de escala: 20 μm .

5. DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que los receptores de NMDA contribuyen al establecimiento de la polaridad y al desarrollo axonal de neuronas de hipocampo en cultivo, a través del ingreso de Ca^{2+} extracelular por medio de los receptores de NMDA promoviendo la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático y la activación de las proteínas Cdc42 y Rac1 involucradas en la polarización y crecimiento neuronal, hallazgos que revelan la importancia de los receptores de NMDA desde el inicio del desarrollo neuronal, contribución que hasta el momento era desconocida.

5.1. Expresión, localización y funcionalidad de los receptores de NMDA durante la adquisición de polaridad neuronal

Los receptores de NMDA participan en la transmisión sináptica del SNC, distribuyéndose preferencialmente en las membranas postsinápticas de las sinapsis glutamatérgicas (Chen and Roche, 2007; Rao and Craig, 1997). Sin embargo, un creciente cuerpo de evidencia sugiere que la localización y función de los receptores de NMDA no solo se presenta en las dendritas, sino también en axones y conos de crecimiento de neuronas maduras, sugiriendo un rol de estos receptores en terminales presinápticos tanto en cultivos de neuronas como en preparaciones de hipocampo, corteza visual y cerebral (Buchanan et al., 2012; Ehlers et al., 1998; Gill et al., 2015; McGuinness et al., 2010; Rodriguez-Moreno et al., 2011). En adición a lo anterior, un reporte previo muestra la presencia funcional de los receptores de NMDA en el cono de crecimiento de neuronas hipocámpales ya polarizadas (Wang et al., 2011) proporcionando evidencia de la presencia presináptica de los receptores de NMDA en

neuronas inmaduras. Sin embargo, la presencia y función de los receptores de NMDA durante la polarización neuronal era desconocida. Nuestros datos sugieren que la subunidad NR1 se encuentra presente en el soma, neuritas menores y a lo largo del axón durante la adquisición de polaridad neuronal, sugiriendo que los receptores de NMDA se expresan tempranamente en el desarrollo neuronal.

Adicionalmente, nuestros hallazgos sugieren que los receptores de NMDA son funcionales durante este periodo de desarrollo. El ingreso de Ca^{2+} registrado en neuronas en estadio 2 y 3 de polaridad generado por la estimulación de los receptores de NMDA, que fue bloqueada por inhibidores específicos del receptor, proporcionan nueva evidencia de la presencia funcional de los receptores de NMDA previo y posterior al quiebre de simetría celular. Además, los registros intracelulares de Ca^{2+} en estadio 1 de polaridad muestran un leve incremento de Ca^{2+} intracelular generado por la presencia de los agonistas de los receptores de NMDA, sugiriendo, en conjunto, una expresión y distribución diferencial de los receptores durante la adquisición de polaridad neuronal, previamente desconocida. Previos reportes sugieren que la expresión de la subunidad NR2B en cultivos de neuronas hipocampales es levemente detectable desde los 2 DIV, incrementa su expresión durante el desarrollo, pero disminuye tardíamente (18 DIV). La subunidad NR2A, en cambio, es detectable posteriormente en comparación a la subunidad NR2B e incrementa su expresión durante el desarrollo neuronal (Bustos et al., 2014), apoyando la noción de que existe un cambio en la expresión de las subunidades de los receptores de NMDA tanto durante la adquisición de polaridad neuronal como en el desarrollo neuronal posterior.

Debido a que la señal obtenida en los registros intracelulares de Ca^{2+} en estadio 1 de polaridad es comparativamente menor considerando las obtenidas en estadios 2 y 3 tras la estimulación de los receptores de NMDA, esto podría sugerir que la abundancia de los receptores presentes en la membrana plasmática en el estadio 1 es menor. Experimentos adicionales son requeridos para evaluar la expresión de los receptores de NMDA desde el inicio del desarrollo de las neuronas. Si bien nuestros datos sugieren que la subunidad NR1 se expresa desde el inicio del desarrollo neuronal *in vitro*, los receptores de NMDA no son igualmente funcionales desde el principio, sugiriendo una participación funcional en el crecimiento axonal más que en el surgimiento de las neuritas menores, proporcionando nueva evidencia de que la función de los receptores de NMDA cambia conforme se desarrolla la neurona.

5.2. Contribución de los receptores de NMDA en el establecimiento de la polaridad neuronal

La estimulación sostenida tanto de los receptores de NMDA como AMPA, resulta en toxicidad celular y neurodegeneración en diversas condiciones patológicas (Arundine and Tymianski, 2003; Dong et al., 2009; Hynd et al., 2004). Tales efectos igualmente son asociados a la activación específica de los receptores de NMDA mediante el uso de los agonistas NMDA o RSTG en cerebros de ratón y rata (An et al., 2014; Schoepp et al., 1994). No obstante lo anterior, diversos estudios sugieren que la activación de los receptores de NMDA con el agonista NMDA, de forma aguda y en un rango de concentración más bajo (10-50 μM), no genera efectos nocivos, sino que, por el contrario, promueve la extensión neurítica, la ramificación tanto dendrítica como

axonal, y la migración celular de neuronas granulares cerebelares (Brewer and Cotman, 1989; Komuro and Rakic, 1993; Rashid and Cambray-Deakin, 1992). Consistentemente con lo anterior, nuestros datos sugieren que la incubación con NMDA (50 μM) promueve tanto la adquisición de polaridad como el crecimiento axonal de neuronas en cultivo. Cabe destacar que la estimulación con esta concentración no induce muerte celular en cultivos de neuronas hipocámpales de 3 DIV (Zhou et al., 2009).

El ingreso de Ca^{2+} en las neuronas dependió de la concentración de NMDA usada. Lo anterior se correlaciona con evidencia previa que sugiere que la estimulación con NMDA en estas concentraciones promueve el crecimiento axonal. Altas concentraciones de NMDA (75 o 100 μM) generaron mayores incrementos en el largo axonal. No obstante, tales concentraciones están dentro del rango de toxicidad (Brennan et al., 2009; McNamara and Dingledine, 1990; Zhou et al., 2009). Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con el agonista RSTG, quien provocó un mayor ingreso de Ca^{2+} , promovió mayormente la adquisición de polaridad y el crecimiento axonal comparado con el agonista NMDA, sugiriendo que la promoción del desarrollo neuronal depende de la cantidad de Ca^{2+} que ingresa a las células. Consistente con lo anterior, se ha reportado que el grado de migración de células precursoras de oligodendrocitos depende del nivel de estimulación de los receptores de NMDA (Xiao et al., 2013), mientras que estudios en cultivos de neuronas dopaminérgicas sugieren que elevadas concentraciones de RSTG (50 μM) generan un incremento en el crecimiento axonal (Schmitz et al., 2009).

Por otra parte, nuestros datos sugieren que la inhibición de los receptores de NMDA retrasó la adquisición de polaridad neuronal y redujo el crecimiento axonal. Similares resultados en neuronas granulares cerebelares sugiere que el bloqueo de los receptores de NMDA por D-AP5 produjo retracción de las neuritas y redujo la formación de lamelipodios desde el cuerpo celular (Rashid and Cambray-Deakin, 1992) mientras que en neuronas maduras de *Xenopus* redujo la dinámica y la tasa de crecimiento dendrítico (Rajan and Cline, 1998; Rajan et al., 1999).

Se ha reportado extensamente que la sobre-expresión de las subunidades regulatorias de los receptores de NMDA NR2A o NR2B regula la arborización dendrítica de neuronas tectales en *Xenopus* (Ewald et al., 2008) y de neuronas embrionarias de la médula espinal ventral de rata (Sepulveda et al., 2010), mientras que la delección genética de la subunidad NR2A redujo la longitud total y la complejidad dendrítica en neuronas del giro dentado de hipocampo de ratón (Kannangara et al., 2014), proporcionando así importantes roles de los receptores de NMDA en la modulación de la neurogénesis. Sin embargo, el efecto de la sobre-expresión genética de los receptores de NMDA durante el desarrollo neuronal temprano era desconocido. Nuestros datos sugieren que la sobre-expresión de cada una de las subunidades de los receptores de NMDA promovió considerablemente el crecimiento axonal. A pesar de que la presencia exclusiva de un tipo de subunidad no conforma el complejo tetramérico sin la presencia de las otras subunidades (Monyer et al., 1992; Traynelis et al., 2010), de todas formas la expresión promovió el crecimiento, sugiriendo algún tipo de compensación en la regulación de la expresión o disponibilidad de las subunidades para

conformar adecuadamente los canales durante el desarrollo neuronal temprano, similar al cambio en las subunidades regulatorias NR2A y NR2B que ocurre durante el desarrollo (Bellone and Nicoll, 2007; Bustos et al., 2014; Paoletti et al., 2013). Además, los receptores de NMDA conteniendo las subunidades NR2A poseen una mayor probabilidad de apertura en comparación con los receptores de NMDA que contienen las subunidades NR2B (Paoletti et al., 2013), sugiriendo que las neuronas que sobreexpresan las subunidades NR2A podrían ingresar una mayor cantidad de Ca^{2+} resultando en el mayor aumento en el crecimiento axonal, tal como lo encontrado con la estimulación de los receptores de NMDA dependiente de la dosis.

En conjunto, los resultados presentados sugieren que los receptores de NMDA no sólo regulan el desarrollo dendrítico y sináptico, sino también contribuyen tanto a la adquisición de polaridad como al crecimiento axonal, sugiriendo nuevos roles de los receptores de NMDA durante el desarrollo neuronal temprano.

5.3. Activación de los receptores de NMDA durante el desarrollo neuronal temprano

Las evidencias experimentales obtenidas a partir de los registros intracelulares de Ca^{2+} , retraso en el desarrollo neuronal en cultivo y la reducción de la elongación axonal debido a la inhibición de los receptores de NMDA, sugieren que estos receptores estarían siendo activados y participarían durante las etapas tempranas del desarrollo neuronal. Estos antecedentes se correlacionan con los reportes que indican que el inhibidor MK-801 es capaz de bloquear el poro del canal del receptor en una manera dependiente de su actividad, es decir, sólo cuando el Mg^{2+} es liberado desde el canal ya

activado (Huettner and Bean, 1988; Nabavi et al., 2013; Wong et al., 1986). El efecto de la inhibición de los receptores de NMDA mediado por MK-801 en la adquisición de polaridad y crecimiento axonal fue más prominente que lo hallado con D-AP5, sugiriendo que los receptores de NMDA son activados durante el desarrollo neuronal temprano permitiendo consecuentemente el bloqueo mediado por MK-801. No obstante, los mecanismos que activan a los receptores de NMDA durante la adquisición de polaridad son desconocidos. Los hallazgos que se presentan en esta investigación nos permiten hipotetizar que el glutamato, neurotransmisor endógeno, provocaría la activación de los receptores de NMDA. Sin embargo, se desconoce la procedencia de este neurotransmisor en los cultivos neuronales.

Se ha descrito durante largo tiempo que la liberación de neurotransmisores desde terminales presinápticos en neuronas maduras ocurre tanto en respuesta a la actividad como de forma espontánea (Kavalali, 2015; Ramirez and Kavalali, 2011). Sin embargo, recientes reportes en cultivos neuronales hipocampales inmaduros (4-5 DIV) sugieren que la existencia de altos niveles de reciclado vesicular espontáneo, conteniendo transportadores de glutamato, mediarían una liberación espontánea de los neurotransmisores (Andreae et al., 2012). En adición, estos resultados sugieren que el modo de liberación de los neurotransmisores cambia desde una manera exclusivamente espontánea temprana en el desarrollo a predominantemente evocada en neuronas maduras. Trabajos posteriores del mismo grupo de investigación sugieren que la inhibición de los receptores de NMDA durante el desarrollo neuronal temprano (1-3 DIV, 48 h de inhibición), periodo de reciclado vesicular exclusivamente espontáneo,

redujo la complejidad del árbol dendrítico en neuronas de 8 DIV, no obstante, la inhibición de los receptores de NMDA durante los 6-8 DIV no generó tal reducción (Andreae and Burrone, 2015). Estos hallazgos indican un importante rol de la liberación espontánea de neurotransmisores temprana en el desarrollo modulando la posterior formación y ramificación del árbol dendrítico previo a la formación de sinapsis. Colocando en contexto nuestros resultados, es posible sugerir que la reducción de la complejidad del árbol dendrítico encontrada por (Andreae and Burrone, 2015) a los 8 DIV por la inhibición de los receptores de NMDA en etapas tempranas de adquisición de polaridad, presumiblemente la reducción se debe al retraso en el desarrollo neuronal que sugiere nuestra investigación.

Considerando los antecedentes descritos en la literatura y los hallazgos aquí mostrados, se sugiere que el glutamato endógeno, posiblemente sintetizado y liberado por las neuronas, promueve el desarrollo neuronal temprano y la extensión del axón por un mecanismo mediado por los receptores de NMDA. Tal como se ha propuesto en la señalización mediada por glutamato en neuronas maduras (McGuinness et al., 2010). Así, la señalización de este neurotransmisor durante el desarrollo neuronal temprano podría ser un importante mecanismo celular autónomo para la regulación del crecimiento y la diferenciación neuronal.

5.4. Señalización de Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA durante la adquisición de polaridad neuronal

Los resultados también sugieren que la activación de los receptores de NMDA induce la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes internos del RE, principal reserva intracelular de Ca^{2+} , debido a que la intensidad de fluorescencia del indicador Ca^{2+} Fluo4-AM fue reducida por la presencia de los inhibidores de los canales RyR e IP3R. Nuestros datos proporcionan evidencia de un acoplamiento funcional entre los receptores de NMDA y los receptores de rianodina e IP3 durante el desarrollo neuronal temprano. Acorde a lo anterior, estudios previos en preparaciones de hipocampo de rata adulta y cultivos maduros de neuronas corticales sugieren que la señalización mediada por los receptores de NMDA involucra la activación tanto de los receptores de rianodina como de IP3 (Lazarewicz et al., 1998; Zhou et al., 2009).

La evidencia aquí presentada sugiere que el fenómeno de *CICR* ocurre en cultivos de neuronas hipocampales durante la adquisición de la polaridad neuronal, sugiriendo un mecanismo de señalización que amplifica la concentración intracelular de Ca^{2+} . Reportes previos sugieren que la liberación de Ca^{2+} vía los receptores de rianodina e IP3 participa en la extensión de neuritas en neuronas de *Xenopus*, movilidad del cono de crecimiento y extensión del axón en neuronas hipocampales de rata (Jacques-Fricke et al., 2006; Nakamuta et al., 2011; Wilson et al., 2016) sugiriendo que la liberación de Ca^{2+} desde el RE generado por la estimulación de los receptores de NMDA podría contribuir al desarrollo neuronal temprano.

Se ha descrito que el incremento de Ca^{2+} citosólico, proveniente tanto del medio extracelular como del medio intracelular, regula la actividad de la familia de proteínas Rho GTPasa (Fleming et al., 1999; Jin et al., 2005; Price et al., 2003). Nuestros ensayos

de FRET sugieren que la sobre-expresión de la subunidad NR1 de los receptores de NMDA promovió la actividad de las proteínas Cdc42 y Rac1, mientras que la inhibición farmacológica de los receptores de NMDA generó una disminución de la actividad de estas Rho GTPasas, resultados que están en acuerdo con estudios previos realizados en neuronas tectales ópticas de *Xenopus* que revelan que la estimulación de los receptores de NMDA promovió el crecimiento del árbol dendrítico mediado por el incremento de la actividad de Cdc42 y Rac1 (Li et al., 2000; Sin et al., 2002).

Por otra parte, reportes previos indican que el incremento intracelular de Ca^{2+} mediado tanto por la activación de los receptores de NMDA como por la liberación de Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina e IP3 promueven la activación de PKC y CaMKII consecuentemente promoviendo la actividad de las proteínas Rho GTPasa (Fleming et al., 1999; Jin et al., 2005; Price et al., 2003) quienes están involucradas en el remodelamiento del citoesqueleto de actina y promueven varios aspectos del desarrollo neuronal (Garvalov et al., 2007; Gonzalez-Billault et al., 2012; Govek et al., 2005; Tahirovic et al., 2010). Considerando estos datos, es posible que la actividad de Cdc42 y Rac1, promovida por la actividad de los receptores de NMDA, dependa de las proteínas PKC y CaMKII, en nuestro modelo de estudio. Se requieren experimentos adicionales para evaluar la contribución específica en la regulación de las proteínas Cdc42 y Rac1 tras el aumento de Ca^{2+} intracelular proveniente de la activación de los receptores de NMDA tanto como de los receptores de rianodina e IP3 en neuronas hipocampales durante su desarrollo temprano.

Interesantemente, reportes recientes de nuestro grupo de investigación sugieren que la liberación de Ca^{2+} mediada por los receptores de rianodina induce la activación de Rac1 y la subsecuente activación del complejo NADPH oxidasa, promoviendo la adquisición de polaridad y crecimiento axonal (Wilson et al., 2016; Wilson et al., 2015). Considerando que los receptores de NMDA son funcionales durante estos estadios de polaridad y que median la liberación de Ca^{2+} desde el RE, es posible hipotetizar un mecanismo de acoplamiento funcional entre la actividad glutamatérgica, mediada por los receptores de NMDA, con la producción de especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS). Estudios previos sugieren que la activación sostenida de los receptores de NMDA con glutamato en el rango de concentración gluto-tóxico, activan a la enzima NOX2, generando ROS. Sin embargo, se desconoce la participación de los receptores de NMDA en este proceso cuando son activados dentro de un rango fisiológico (Brennan et al., 2009; Cavaliere et al., 2013; Girouard et al., 2009; Reyes et al., 2012), en que promuevan la adquisición de polaridad y el crecimiento axonal.

En resumen, los resultados obtenidos en este seminario de título sugieren que los receptores de señalización dependiente de glutamato son necesarios no solo para la neurotransmisión, sino también para el desarrollo neuronal temprano y el crecimiento axonal.

6. CONCLUSIONES

Los ensayos de inmunodetección indican que la subunidad NR1 de los receptores de NMDA se expresa en neuronas hipocampales durante la adquisición de la polaridad neuronal en cultivo. Adicionalmente, los registros intracelulares de Ca^{2+} muestran que los receptores de NMDA son funcionales durante estas etapas del desarrollo neuronal.

La inhibición farmacológica de los receptores de NMDA redujo tanto el desarrollo de la adquisición de polaridad como el crecimiento axonal, mientras que la sobre-expresión ectópica y la activación específica de los receptores de NMDA promovió el desarrollo neuronal y el crecimiento axonal dependiente de la señalización del ión Ca^{2+} .

El ingreso de Ca^{2+} mediado por los receptores de NMDA promueve la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de los receptores de rianodina e IP3. Además, análisis de FRET muestran que el Ca^{2+} que entra por los receptores de NMDA regula la actividad de las proteínas Cdc42 y Rac1, sugiriendo la modulación del citoesqueleto de actina.

En conjunto, lo hallado en esta investigación proporciona nueva evidencia de la importancia funcional de los receptores de NMDA para el desarrollo neuronal temprano, conocimiento que hasta el momento era desconocido.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adasme, T., A. Paula-Lima, and C. Hidalgo. 2015. Inhibitory ryanodine prevents ryanodine receptor-mediated Ca(2)(+) release without affecting endoplasmic reticulum Ca(2)(+) content in primary hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 458:57-62.
- Al-Hallaq, R.A., T.P. Conrads, T.D. Veenstra, and R.J. Wenthold. 2007. NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *J Neurosci.* 27:8334-8343.
- An, Y., N. Belevych, Y. Wang, H. Zhang, J.S. Nasse, H. Herschman, Q. Chen, A. Tarr, X. Liu, and N. Quan. 2014. Prostacyclin mediates endothelial COX-2-dependent neuroprotective effects during excitotoxic brain injury. *J Inflamm Res.* 7:57-67.
- Andersen, S.S., and G.Q. Bi. 2000. Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays.* 22:172-179.
- Andreae, L.C., and J. Burrone. 2015. Spontaneous Neurotransmitter Release Shapes Dendritic Arbors via Long-Range Activation of NMDA Receptors. *Cell Rep.*
- Andreae, L.C., N.B. Fredj, and J. Burrone. 2012. Independent vesicle pools underlie different modes of release during neuronal development. *J Neurosci.* 32:1867-1874.
- Arundine, M., and M. Tymianski. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* 34:325-337.
- Atlason, P.T., M.L. Garside, E. Meddows, P. Whiting, and R.A. McIlhinney. 2007. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor. *J Biol Chem.* 282:25299-25307.
- Banker, G.A., and W.M. Cowan. 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 126:397-342.
- Barnes, A.P., and F. Polleux. 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci.* 32:347-381.
- Bellone, C., and R.A. Nicoll. 2007. Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron.* 55:779-785.
- Berridge, M.J. 1998. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 21:13-26.
- Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:11-21.
- Birch, B.D., D.L. Eng, and J.D. Kocsis. 1992. Intranuclear Ca²⁺ transients during neurite regeneration of an adult mammalian neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:7978-7982.
- Bonaccorso, C., N. Micale, R. Ettari, S. Grasso, and M. Zappala. 2011. Glutamate binding-site ligands of NMDA receptors. *Curr Med Chem.* 18:5483-5506.
- Bradke, F., and C.G. Dotti. 2000. Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 10:574-581.
- Brennan, A.M., S.W. Suh, S.J. Won, P. Narasimhan, T.M. Kauppinen, H. Lee, Y. Edling, P.H. Chan, and R.A. Swanson. 2009. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci.* 12:857-863.
- Brewer, G.J., and C.W. Cotman. 1989. NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 99:268-273.
- Brosnan, J.T., and M.E. Brosnan. 2013. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids.* 45:413-418.

- Buchanan, K.A., A.V. Blackman, A.W. Moreau, D. Elgar, R.P. Costa, T. Lalanne, A.A. Tudor Jones, J. Oyrer, and P.J. Sjostrom. 2012. Target-specific expression of presynaptic NMDA receptors in neocortical microcircuits. *Neuron*. 75:451-466.
- Burnashev, N., and P. Szepetowski. 2015. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Pharmacol*. 20:73-82.
- Bustos, F.J., L. Varela-Nallar, M. Campos, B. Henriquez, M. Phillips, C. Opazo, L.G. Aguayo, M. Montecino, M. Constantine-Paton, N.C. Inestrosa, and B. van Zundert. 2014. PSD95 suppresses dendritic arbor development in mature hippocampal neurons by occluding the clustering of NR2B-NMDA receptors. *PLoS One*. 9:e94037.
- Cavaliere, F., M. Benito-Munoz, M. Panicker, and C. Matute. 2013. NMDA modulates oligodendrocyte differentiation of subventricular zone cells through PKC activation. *Front Cell Neurosci*. 7:261.
- Clapham, D.E. 2007. Calcium signaling. *Cell*. 131:1047-1058.
- Cosker, K.E., S. Shadan, M. van Diepen, C. Morgan, M. Li, V. Allen-Baume, C. Hobbs, P. Doherty, S. Cockcroft, and B.J. Eickholt. 2008. Regulation of PI3K signalling by the phosphatidylinositol transfer protein PITPalpha during axonal extension in hippocampal neurons. *J Cell Sci*. 121:796-803.
- Chen, B.S., and K.W. Roche. 2007. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology*. 53:362-368.
- da Silva, J.S., and C.G. Dotti. 2002. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci*. 3:694-704.
- Del Prete, D., F. Checler, and M. Chami. 2014. Ryanodine receptors: physiological function and deregulation in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener*. 9:21.
- Dong, X.X., Y. Wang, and Z.H. Qin. 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 30:379-387.
- Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*. 8:1454-1468.
- Ehlers, M.D., E.T. Fung, R.J. O'Brien, and R.L. Huganir. 1998. Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J Neurosci*. 18:720-730.
- Evans, R.H., A.A. Francis, A.W. Jones, D.A. Smith, and J.C. Watkins. 1982. The effects of a series of omega-phosphonic alpha-carboxylic amino acids on electrically evoked and excitant amino acid-induced responses in isolated spinal cord preparations. *Br J Pharmacol*. 75:65-75.
- Ewald, R.C., K.R. Van Keuren-Jensen, C.D. Aizenman, and H.T. Cline. 2008. Roles of NR2A and NR2B in the development of dendritic arbor morphology in vivo. *J Neurosci*. 28:850-861.
- Fabiato, A., and F. Fabiato. 1975. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol*. 249:469-495.
- Fleming, I.N., C.M. Elliott, F.G. Buchanan, C.P. Downes, and J.H. Exton. 1999. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem*. 274:12753-12758.

- Flores-Soto, M.E., V. Chaparro-Huerta, M. Escoto-Delgadillo, E. Vazquez-Valls, R.E. Gonzalez-Castaneda, and C. Beas-Zarate. 2012. [Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]. *Neurologia*. 27:301-310.
- Forrest, D., M. Yuzaki, H.D. Soares, L. Ng, D.C. Luk, M. Sheng, C.L. Stewart, J.I. Morgan, J.A. Connor, and T. Curran. 1994. Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron*. 13:325-338.
- Furukawa, H., S.K. Singh, R. Mancusso, and E. Gouaux. 2005. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*. 438:185-192.
- Garvalov, B.K., K.C. Flynn, D. Neukirchen, L. Meyn, N. Teusch, X. Wu, C. Brakebusch, J.R. Bamberg, and F. Bradke. 2007. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci*. 27:13117-13129.
- Gepdiremen, A., S. Sonmez, A. Kiziltunc, M. Ikbal, F. Erman, and S. Duzenli. 1998. Effects of norepinephrine on NMDA-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell culture of rat pups. *Fundam Clin Pharmacol*. 12:517-520.
- Gill, I., S. Droubi, S. Giovedi, K.N. Fedder, L.A. Bury, F. Bosco, M.P. Sceniak, F. Benfenati, and S.L. Sabo. 2015. Presynaptic NMDA receptors - dynamics and distribution in developing axons in vitro and in vivo. *J Cell Sci*. 128:768-780.
- Girouard, H., G. Wang, E.F. Gallo, J. Anrather, P. Zhou, V.M. Pickel, and C. Iadecola. 2009. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci*. 29:2545-2552.
- Gonzalez-Billault, C., P. Munoz-Llancao, D.R. Henriquez, J. Wojnacki, C. Conde, and A. Caceres. 2012. The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 69:464-485.
- Govek, E.E., S.E. Newey, and L. Van Aelst. 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev*. 19:1-49.
- Grover, L.M., E. Kim, J.D. Cooke, and W.R. Holmes. 2009. LTP in hippocampal area CA1 is induced by burst stimulation over a broad frequency range centered around delta. *Learn Mem*. 16:69-81.
- Hestrin, S., P. Sah, and R.A. Nicoll. 1990. Mechanisms generating the time course of dual component excitatory synaptic currents recorded in hippocampal slices. *Neuron*. 5:247-253.
- Horak, M., R.S. Petralia, M. Kaniakova, and N. Sans. 2014. ER to synapse trafficking of NMDA receptors. *Front Cell Neurosci*. 8:394.
- Huettnner, J.E., and B.P. Bean. 1988. 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.
- Hynd, M.R., H.L. Scott, and P.R. Dodd. 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 45:583-595.
- Itoh, R.E., K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 2002. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol*. 22:6582-6591.
- Jacques-Fricke, B.T., Y. Seow, P.A. Gottlieb, F. Sachs, and T.M. Gomez. 2006. Ca²⁺ influx through mechanosensitive channels inhibits neurite outgrowth in opposition to other influx pathways and release from intracellular stores. *J Neurosci*. 26:5656-5664.

- Jin, M., C.B. Guan, Y.A. Jiang, G. Chen, C.T. Zhao, K. Cui, Y.Q. Song, C.P. Wu, M.M. Poo, and X.B. Yuan. 2005. Ca²⁺-dependent regulation of rho GTPases triggers turning of nerve growth cones. *J Neurosci.* 25:2338-2347.
- Johnson, J.W., and P. Ascher. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature.* 325:529-531.
- Kaech, S., and G. Banker. 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc.* 1:2406-2415.
- Kannangara, T.S., C.A. Bostrom, A. Ratzlaff, L. Thompson, R.M. Cater, J. Gil-Mohapel, and B.R. Christie. 2014. Deletion of the NMDA receptor GluN2A subunit significantly decreases dendritic growth in maturing dentate granule neurons. *PLoS One.* 9:e103155.
- Kavalali, E.T. 2015. The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci.* 16:5-16.
- Kew, J.N., and J.A. Kemp. 2005. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl).* 179:4-29.
- Kim, M.J., A.W. Dunah, Y.T. Wang, and M. Sheng. 2005. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron.* 46:745-760.
- Kocsis, J.D., M.N. Rand, K.L. Lankford, and S.G. Waxman. 1994. Intracellular calcium mobilization and neurite outgrowth in mammalian neurons. *J Neurobiol.* 25:252-264.
- Komuro, H., and P. Rakic. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 260:95-97.
- Koponen, S., K. Kurkinen, K.E. Akerman, D. Mochly-Rosen, P.H. Chan, and J. Koistinaho. 2003. Prevention of NMDA-induced death of cortical neurons by inhibition of protein kinase Czeta. *J Neurochem.* 86:442-450.
- Lau, C.G., K. Takeuchi, A. Rodenas-Ruano, Y. Takayasu, J. Murphy, M.V. Bennett, and R.S. Zukin. 2009. Regulation of NMDA receptor Ca²⁺ signalling and synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans.* 37:1369-1374.
- Lazarewicz, J.W., W. Rybkowski, M. Sadowski, A. Ziembowicz, M. Alaraj, J. Wegiel, and H.M. Wisniewski. 1998. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated, calcium-induced calcium release in rat dentate gyrus/CA4 in vivo. *J Neurosci Res.* 51:76-84.
- Lee, C.H., W. Lu, J.C. Michel, A. Goehring, J. Du, X. Song, and E. Gouaux. 2014. NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature.* 511:191-197.
- Li, Z., L. Van Aelst, and H.T. Cline. 2000. Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat Neurosci.* 3:217-225.
- Lipton, S.A. 2006. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 5:160-170.
- Luo, J.H., Z.Y. Fu, G. Losi, B.G. Kim, K. Prybylowski, B. Vissel, and S. Vicini. 2002. Functional expression of distinct NMDA channel subunits tagged with green fluorescent protein in hippocampal neurons in culture. *Neuropharmacology.* 42:306-318.
- Luo, L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 1:173-180.
- Luscher, C., and R.C. Malenka. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4.
- Lynch, M.A. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 84:87-136.
- Mayer, M.L., G.L. Westbrook, and P.B. Guthrie. 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature.* 309:261-263.

- McGuinness, L., C. Taylor, R.D. Taylor, C. Yau, T. Langenhan, M.L. Hart, H. Christian, P.W. Tynan, P. Donnelly, and N.J. Emptage. 2010. Presynaptic NMDARs in the hippocampus facilitate transmitter release at theta frequency. *Neuron*. 68:1109-1127.
- McNamara, D., and R. Dingledine. 1990. Dual effect of glycine on NMDA-induced neurotoxicity in rat cortical cultures. *J Neurosci*. 10:3970-3976.
- Mizuno, T., I. Kanazawa, and M. Sakurai. 2001. Differential induction of LTP and LTD is not determined solely by instantaneous calcium concentration: an essential involvement of a temporal factor. *Eur J Neurosci*. 14:701-708.
- Monyer, H., N. Burnashev, D.J. Laurie, B. Sakmann, and P.H. Seeburg. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 12:529-540.
- Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann, and P.H. Seeburg. 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*. 256:1217-1221.
- Moriyoshi, K., M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, N. Mizuno, and S. Nakanishi. 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*. 354:31-37.
- Nabavi, S., H.W. Kessels, S. Alfonso, J. Aow, R. Fox, and R. Malinow. 2013. Metabotropic NMDA receptor function is required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:4027-4032.
- Nakamura, T., K. Kurokawa, E. Kiyokawa, and M. Matsuda. 2006. Analysis of the spatiotemporal activation of rho GTPases using Raichu probes. *Methods Enzymol*. 406:315-332.
- Nakamuta, S., Y. Funahashi, T. Namba, N. Arimura, M.R. Picciotto, H. Tokumitsu, T.R. Soderling, A. Sakakibara, T. Miyata, H. Kamiguchi, and K. Kaibuchi. 2011. Local application of neurotrophins specifies axons through inositol 1,4,5-trisphosphate, calcium, and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Sci Signal*. 4:ra76.
- Nedergaard, M., T. Takano, and A.J. Hansen. 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*. 3:748-755.
- Nishimura, T., T. Yamaguchi, K. Kato, M. Yoshizawa, Y. Nabeshima, S. Ohno, M. Hoshino, and K. Kaibuchi. 2005. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol*. 7:270-277.
- Niswender, C.M., and P.J. Conn. 2010. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 50:295-322.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*. 23:456-459.
- Nowak, L., P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet, and A. Prochiantz. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. 307:462-465.
- Paoletti, P., C. Bellone, and Q. Zhou. 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 14:383-400.
- Parekh, A.B. 2011. Decoding cytosolic Ca²⁺ oscillations. *Trends Biochem Sci*. 36:78-87.
- Pearce, I.A., M.A. Cambray-Deakin, and R.D. Burgoyne. 1987. Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett*. 223:143-147.
- Perez-Otano, I., C.T. Schulteis, A. Contractor, S.A. Lipton, J.S. Trimmer, N.J. Sucher, and S.F. Heinemann. 2001. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci*. 21:1228-1237.

- Price, L.S., M. Langeslag, J.P. ten Klooster, P.L. Hordijk, K. Jalink, and J.G. Collard. 2003. Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *J Biol Chem.* 278:39413-39421.
- Rajan, I., and H.T. Cline. 1998. Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J Neurosci.* 18:7836-7846.
- Rajan, I., S. Witte, and H.T. Cline. 1999. NMDA receptor activity stabilizes presynaptic retinotectal axons and postsynaptic optic tectal cell dendrites in vivo. *J Neurobiol.* 38:357-368.
- Ramakers, G.J., B. Avci, P. van Hulten, A. van Ooyen, J. van Pelt, C.W. Pool, and M.B. Lequin. 2001. The role of calcium signaling in early axonal and dendritic morphogenesis of rat cerebral cortex neurons under non-stimulated growth conditions. *Brain Res Dev Brain Res.* 126:163-172.
- Ramirez, D.M., and E.T. Kavalali. 2011. Differential regulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release at central synapses. *Curr Opin Neurobiol.* 21:275-282.
- Rao, A., and A.M. Craig. 1997. Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron.* 19:801-812.
- Rashid, N.A., and M.A. Cambray-Deakin. 1992. N-methyl-D-aspartate effects on the growth, morphology and cytoskeleton of individual neurons in vitro. *Brain Res Dev Brain Res.* 67:301-308.
- Reyes, R.C., A.M. Brennan, Y. Shen, Y. Baldwin, and R.A. Swanson. 2012. Activation of neuronal NMDA receptors induces superoxide-mediated oxidative stress in neighboring neurons and astrocytes. *J Neurosci.* 32:12973-12978.
- Rodriguez-Moreno, A., M.M. Kohl, J.E. Reeve, T.R. Eaton, H.A. Collins, H.L. Anderson, and O. Paulsen. 2011. Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *J Neurosci.* 31:8564-8569.
- Ruiz, A., C. Matute, and E. Alberdi. 2009. Endoplasmic reticulum Ca(2+) release through ryanodine and IP(3) receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell Calcium.* 46:273-281.
- Schmitz, Y., J. Luccarelli, M. Kim, M. Wang, and D. Sulzer. 2009. Glutamate controls growth rate and branching of dopaminergic axons. *J Neurosci.* 29:11973-11981.
- Schoepp, D.D., W.H. Lunn, C.R. Salhoff, and J.W. McDonald. 1994. The NMDA receptor agonist DL-(tetrazol-5-yl)glycine is a highly potent excitotoxin. *Eur J Pharmacol.* 270:67-72.
- Schoepp, D.D., C.L. Smith, D. Lodge, J.D. Millar, J.D. Leander, A.I. Saccaan, and W.H. Lunn. 1991. D,L-(tetrazol-5-yl) glycine: a novel and highly potent NMDA receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 203:237-243.
- Sepulveda, F.J., F.J. Bustos, E. Inostroza, F.A. Zuniga, R.L. Neve, M. Montecino, and B. van Zundert. 2010. Differential roles of NMDA Receptor Subtypes NR2A and NR2B in dendritic branch development and requirement of RasGRF1. *J Neurophysiol.* 103:1758-1770.
- Siegler Retchless, B., W. Gao, and J.W. Johnson. 2012. A single GluN2 subunit residue controls NMDA receptor channel properties via intersubunit interaction. *Nat Neurosci.* 15:406-413, S401-402.
- Sin, W.C., K. Haas, E.S. Ruthazer, and H.T. Cline. 2002. Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature.* 419:475-480.

- Single, F.N., A. Rozov, N. Burnashev, F. Zimmermann, D.F. Hanley, D. Forrest, T. Curran, V. Jensen, O. Hvalby, R. Sprengel, and P.H. Seeburg. 2000. Dysfunctions in mice by NMDA receptor point mutations NR1(N598Q) and NR1(N598R). *J Neurosci.* 20:2558-2566.
- Sit, S.T., and E. Manser. 2011. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 124:679-683.
- Stuessi, M., and F. Bradke. 2011. Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way. *Dev Neurobiol.* 71:430-444.
- Tahirovic, S., and F. Bradke. 2009. Neuronal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a001644.
- Tahirovic, S., F. Hellal, D. Neukirchen, R. Hindges, B.K. Garvalov, K.C. Flynn, T.E. Stradal, A. Chrostek-Grashoff, C. Brakebusch, and F. Bradke. 2010. Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. *J Neurosci.* 30:6930-6943.
- Traynelis, S.F., L.P. Wollmuth, C.J. McBain, F.S. Menniti, K.M. Vance, K.K. Ogden, K.B. Hansen, H. Yuan, S.J. Myers, and R. Dingledine. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 62:405-496.
- Tsien, J.Z., P.T. Huerta, and S. Tonegawa. 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell.* 87:1327-1338.
- Verkhatsky, A., and O.H. Petersen. 2002. The endoplasmic reticulum as an integrating signalling organelle: from neuronal signalling to neuronal death. *Eur J Pharmacol.* 447:141-154.
- Verkhatsky, A., and A. Shmigol. 1996. Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium.* 19:1-14.
- Wang, P.Y., R.S. Petralia, Y.X. Wang, R.J. Wenthold, and S.D. Brenowitz. 2011. Functional NMDA receptors at axonal growth cones of young hippocampal neurons. *J Neurosci.* 31:9289-9297.
- Watabe-Uchida, M., E.E. Govek, and L. Van Aelst. 2006. Regulators of Rho GTPases in neuronal development. *J Neurosci.* 26:10633-10635.
- Wilson, C., E. Munoz-Palma, D.R. Henriquez, I. Palmisano, M.T. Nunez, S. Di Giovanni, and C. Gonzalez-Billault. 2016. A Feed-Forward Mechanism Involving the NOX Complex and RyR-Mediated Ca²⁺ Release During Axonal Specification. *J Neurosci.* 36:11107-11119.
- Wilson, C., M.T. Nunez, and C. Gonzalez-Billault. 2015. Contribution of NADPH oxidase to the establishment of hippocampal neuronal polarity in culture. *J Cell Sci.* 128:2989-2995.
- Willard, S.S., and S. Koochekpour. 2013. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci.* 9:948-959.
- Witte, H., and F. Bradke. 2008. The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr Opin Neurobiol.* 18:479-487.
- Wong, E.H., J.A. Kemp, T. Priestley, A.R. Knight, G.N. Woodruff, and L.L. Iversen. 1986. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:7104-7108.
- Xiao, L., C. Hu, W. Yang, D. Guo, C. Li, W. Shen, X. Liu, H. Aijun, W. Dan, and C. He. 2013. NMDA receptor couples Rac1-GEF Tiam1 to direct oligodendrocyte precursor cell migration. *Glia.* 61:2078-2099.
- Zhou, X., C. Moon, F. Zheng, Y. Luo, D. Soellner, J.L. Nunez, and H. Wang. 2009. N-methyl-D-aspartate-stimulated ERK1/2 signaling and the transcriptional up-regulation of plasticity-related genes are developmentally regulated following in vitro neuronal maturation. *J Neurosci Res.* 87:2632-2644.

Zhu, S., and P. Paoletti. 2015. Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. *Curr Opin Pharmacol.* 20:14-23.