

103
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE LA DESPOLARIZACION POR POTASIO Y DEL NMDA SOBRE LA
ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS CON LA SINTESIS DE
GLUTAMATO DURANTE EL DESARROLLO DEL CEREBELO"

QUE PARA OBTENER LA LICENCIATURA EN BIOLOGIA PRESENTA:

SANDRA HURTADO GOMEZ

JUNIO DE 1992

TESIS CON
FALLA DE ORDEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
Embriología del sistema nervioso..	3
Desarrollo del cerebelo.....	10
Neuroquímica del cerebelo.....	15
Señales tróficas.....	17
Aminoácidos excitadores.....	21
Metabolismo.....	21
Receptores sinápticos.....	25
Neurotoxicidad.....	28
OBJETIVOS.....	30
METODOLOGIA.....	30
RESULTADOS.....	34
DISCUSION.....	51
REFERENCIAS.....	64
AGRADECIMIENTOS.....	80

RESUMEN

Uno de los modelos utilizados ampliamente en los estudios del desarrollo del sistema nervioso ha sido el cerebelo, ya que presenta múltiples ventajas que van desde su estructura hasta los conocimientos que se tienen de su origen embriológico y de la neuroquímica. Por otro lado, se sabe que la estimulación temprana de los receptores NMDA presentes en las células granulares de cerebelo, o la despolarización por K^+ resultan en un desarrollo mayor de prolongaciones y un incremento en la sobrevivencia de este tipo neuronal (Balázs, 1987,1988). Se sabe que las células granulares son glutamatérgicas y que una de las enzimas involucradas con la síntesis del transmisor es la glutaminasa activada por fosfato (GAF), algunos estudios muestran que existen cambios en la actividad de esta enzima a lo largo del desarrollo, lo cual se relaciona con la diferenciación y establecimiento de vías glutamatérgicas, por lo que se ha considerado a la GAF como un buen marcador del desarrollo de células glutamatérgicas (Patel 1987). Estudios recientes han demostrado que la estimulación temprana de los receptores NMDA y la despolarización por K^+ en las células granulares inducen un incremento en la actividad de la GAF en células granulares (Morán y Patel,1989).

En este trabajo se probaron agonistas y antagonistas a los receptores a aminoácidos excitadores sobre la actividad de la GAF tanto "in vitro" como "in vivo" como un índice de la diferenciación bioquímica de las células granulares.

La actividad de la GAF "in vitro" en presencia de NMDA 150 μ M y

K⁺ 40mM durante 72 h se incrementó en casi un 75% con respecto al control sin que estos tratamientos modifiquen la cantidad de proteína ni la actividad de la lactato deshidrogenasa, una enzima relacionada con el metabolismo general de la célula. El efecto del NMDA sobre la actividad de la GAF requiere de síntesis protéica y de RNAm, ya que es inhibido con cicloheximida (1µg/ml) y actinomicina (0.1µg/ml).

Otros antagonistas a los receptores a aminoácidos excitadores como el kainato (10µM), quinolinato (250 y 500µM), AMPA (10 y 100µM) y LAP4 (10 y 100µM), tuvieron un efecto favorable sobre la morfología de las células granulares, además de inducir un incremento la actividad de la GAF en ocasiones hasta de casi tres veces. Los efectos observados "in vivo" muestran que el NMDA (5mg/Kg) incrementa la actividad de la GAF en un 50% sólo a los 12 días postnatales, por otro lado el antagonista APV (60mg/kg) no tiene efecto alguno, mientras que el MK-801 (0.1 mg/kg) redujo la actividad de la GAF en un 40% a los 11,12,14 y 15 días postnatales. Por suparte el CPP (2.2 mg/kg) presenta este mismo comportamiento pero sólo a los 11y 12 días postnatales.

Estos resultados sugieren que tanto "in vitro" como "in vivo" la activación del receptor NMDA a edades tempranas del desarrollo induce la maduración bioquímica de las células granulares, y parece ser que la entrada de Ca⁺⁺ relacionada con la activación del canal acoplado al receptor NMDA y la de los canales de Ca⁺⁺ sensibles a voltaje coloca a este ión en un sitio importante durante los eventos que se presentan a lo largo del desarrollo de las células granulares.

INTRODUCCION

Desde hace más de un siglo ha existido un gran interés por el funcionamiento del Sistema Nervioso (SN) , sin embargo no es hasta que Ramón y Cajal propone a la neurona como la unidad básica y funcional del SN que se sientan las bases para proponer los mecanismos por los cuales se llevan a cabo algunas de las funciones del SN. A partir de entonces se han llevado a cabo numerosos estudios anatómicos , fisiológicos y bioquímicos que han permitido avanzar sustancialmente en el conocimiento de los distintos campos de las neurociencias. Una de estas áreas de interés ha sido el desarrollo del SN de los vertebrados, del cual se trataran algunos aspectos en este trabajo, enfocándonos principalmente a la neuroquímica del desarrollo del cerebelo.

El sistema nervioso (SN) presenta una organización estructural y funcional compleja producto de una serie de eventos sofisticados y finamente coordinados que se llevan a cabo durante el desarrollo del SN.

EMBRIOLOGIA DEL SISTEMA NERVIOSO.

El desarrollo del SN comienza con la inducción de la notocorda y el mesodermo paracordal sobre el neuroectodermo para formar la placa neural. Dicha influencia está mediada por una serie de moléculas que llevan a la transformación de la placa neural en lo

que se conoce como surco neural. Al continuar el desarrollo los pliegues del surco se elevan y se acercan a la línea media para finalmente fusionarse originando así el tubo neural. Antes del cierre del surco neural algunos grupos celulares del ectodermo cercanos a la placa neural migran para formar la cresta neural (Young, 1975).

La fusión del tubo comienza en la cuarta somita y continúa en dirección cefálica a caudal, sin embargo en los extremos caudal y craneal esta fusión se retarda originando los neuroporos anterior y posterior, los cuales comunican al tubo neural con la cavidad amniótica y que posteriormente sufrirán una obliteración para así cerrar al tubo nervioso (Balinsky, 1978).

En un principio el tubo neural es más voluminoso hacia adelante y cuando el neuroporo anterior todavía está abierto, el tubo se dilata para formar tres vesículas separadas por surcos, la primera (Prosencéfalo) y la tercera (Rombencéfalo) se dividirán en dos, la segunda vesícula (Mesencéfalo) no se dividirá. A lo largo del desarrollo del sistema nervioso estas vesículas se diferenciarán en las distintas estructuras del cerebelo adulto que se muestran en el cuadro I.

CUADRO # 1

Telencéfalo: corteza cerebral, ganglios basales, formación hipocámpal, amígdala, bulbo olfatorio.

PROSENCEFALO

Diencéfalo: epítalamo, hipotálamo, tálamo, nervios y tractos ópticos.

MESENCEFALO

Sustancia nigra, sustancia blanca, (pedúnculos cerebelares), núcleo rojo, colículos, sustancia gris periacueductal.

Mielencéfalo: médula oblonga

ROMBENCEFALO

Metencéfalo: protuberancia, puente, y cerebelo

Cuando el tubo nervioso está constituido las células del epitelio germinativo proliferan activamente formando una gruesa capa periepéndimaria. Estas células migran ligeramente hacia la periferia separándose unas de otras, agrupándose en amasijos y formando el conjunto que constituye el manto, esbozo de sustancia gris. Durante estos eventos se inicia la diferenciación celular.

Las células epiteliales que bordean a la luz del tubo nervioso forman la capa germinativa que dará lugar a dos tipos celulares

conocidos como neuroblastos y espongioblastos. Los neuroblastos son elementos de gran tamaño que darán lugar a las neuronas. Los espongioblastos son células más pequeñas, las cuales se diferencian en dos tipos celulares, algunas se quedan fijas y forman las células endimarias, el resto quedan libres formando así a las células de la glía (Cuadro 2).

Por su parte la cresta produce dos tipos de neuroblastos:

- Células bipolares que se desarrollan en el mismo lugar y que originarán a las células ganglionares raquídeas.
- Células multipolares que migrarán en la profundidad y darán lugar a células ganglionares simpáticas.

CUADRO # 2

Destino embriológico de Neuroblastos y espongioblastos.

CRESTA	Neuroblasto	Neurona simpática	
	Neuroblasto	Neurona sensitiva (Célula ganglionar en T)	
	Espongioblasto fijo	Espongioblasto endimario	Células endimarias
		Astrocito protoplásmico	
TUBO NEURAL	Espongioblasto libre	Astrocito fibroso	Oligodendrocito
	Neuroblasto	Neurona motora	

Durante el desarrollo del sistema nervioso se pueden distinguir las siguientes fases : proliferación, migración diferenciación, establecimiento de sinapsis, muerte celular y reducción de contactos sinápticos. Estos fenómenos se llevan a cabo durante el desarrollo del SN de todos los vertebrados, aunque se presentan variaciones temporales o algunas modificaciones particulares para cada especie o área del SN (Young, 1975).

Durante la proliferación las células sufren una serie de divisiones sucesivas que darán como resultado un grupo de células indiferenciadas que poseen las mismas características.

A través de los procesos de división la célula se extiende a todo lo largo de la pared del tubo neural y se observa que el núcleo migra desde la región proximal al ventrículo a lo largo del tubo neural, durante este fenómeno se lleva a cabo la síntesis de DNA (fase S del ciclo celular). Posteriormente se da un corto periodo de crecimiento premitótico (G2), seguida de la retracción de la célula hacia la superficie ventricular con objeto que se lleve a cabo la división celular. Dado que los ciclos mitóticos de las células neuroepiteliales se encuentran desfasados es posible observar células en diferentes fases del ciclo celular. Más tarde se observa una enorme población de células germinales indiferenciadas, las cuales se dividirán por última vez originando células nerviosas inmaduras que posteriormente madurarán perdiendo entonces la capacidad de dividirse.

Una vez terminada la proliferación se presenta el fenómeno de migración, de esta manera las células cambian del sitio donde se originaron para ubicarse en el sitio definitivo donde se diferenciarán. La mayoría de las células que iniciarán la migración generalmente son postmitóticas, con algunas excepciones como lo son las células granulares del cerebelo, que como se explicará más adelante después de la primera migración se vuelven a dividir para nuevamente migrar (Ito, 1984).

Nicole Le Douarin y colaboradores (1975) observaron que la ruta de migración de diferentes tipos neuronales está determinada por su posición en la cresta neural. También se tienen evidencias de que una serie de factores sintetizados por la glía son capaces de promover la migración, y que aún la propia presencia de las células gliales, son determinantes para que se lleve a cabo la migración neuronal, ya que en ocasiones se ha observado que si no existe un tipo particular de glía los fenómenos de migración no se presentan o se dificultan, y aún la sobrevivencia y desarrollo normal de las neuronas se afecta (Rakic, 1971).

La primer evidencia que permite distinguir a una célula que va a comenzar a diferenciarse en neurona es la adquisición de una forma bipolar, momento en el cual pierde su capacidad mitótica (Young, 1975). La transformación de las células en neuronas comprende los siguientes pasos: Aumento en el volumen del núcleo, aparición de los cuerpos de Nissl (RNA citoplásmico) y finalmente la formación de prolongaciones primero axones y luego dendritas (Aroux y Haegel, 1970). La diferenciación de estas

células consiste también en la activación de ciertos genes que permitan que la célula adquiriera el fenotipo característico de una neurona como es la expresión de las enzimas para la síntesis del neurotransmisor, el desarrollo de mecanismos de captura y liberación del mismo, así como la síntesis de proteínas de membrana que funcionarán como receptores o canales iónicos.

Muchas de las células no llegan a completar su proceso de diferenciación y mueren. Aunque la muerte neuronal durante el desarrollo se considera como un fenómeno natural, aún no se conocen muchos de los aspectos que están involucrados con este evento, se ha sugerido que las neuronas son capaces de competir por un número limitado de contactos sinápticos en las células blanco, de esta manera un número de estas células es eliminado (Oppenheim, 1991). También se ha propuesto que en estadios tempranos del desarrollo la muerte neuronal se presenta como un mecanismo de eliminación de células defectuosas para crear ambientes permisivos con objeto de que se lleve a cabo el crecimiento axonal (Kallen, 1965, Hankin et al., 1988).

La pérdida masiva de células durante estados más avanzados de diferenciación neuronal probablemente se debe por una especie de ajuste cuantitativo de interconexiones de poblaciones neuronales y la eliminación de proyecciones que son en algún sentido incorrectas dándose así un refinamiento de las conexiones sinápticas (Lamb et al., 1988, Clarke, 1981). Más adelante se tratarán algunos aspectos sobre la participación de los aminoácidos excitadores durante los fenómenos de muerte neuronal.

Los fenómenos antes mencionados pueden ocurrir a diferentes tiempos durante el desarrollo del SN, esto quiere decir que probablemente algunos grupos celulares estén migrando mientras otros ya están en proceso de diferenciación, sin embargo cada célula de manera individual pasa por cada una de las fases sin tener que llegar necesariamente a la muerte celular.

DESARROLLO DEL CEREBELO.

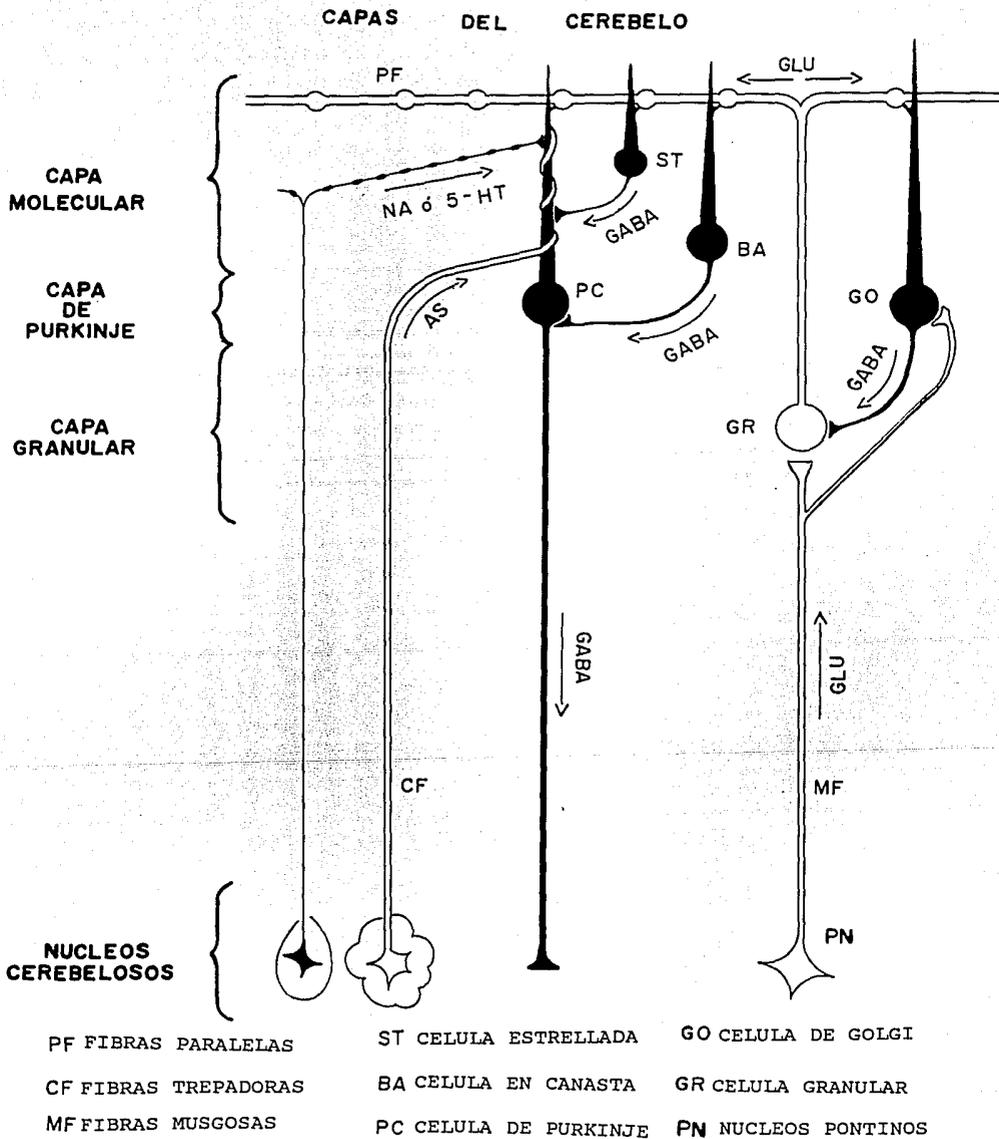
El cerebelo ha sido utilizado como modelo para estudiar los fenómenos de desarrollo ya que presenta una estructura laminar y un número limitado de tipos neuronales en los que se observa una citoarquitectura muy especial (Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988). Esta estructura ha sido utilizada como modelo para el estudio de la maduración del SNC desde hace más de un siglo, por lo que se conocen perfectamente los detalles anatómicos y ultraestructurales.

El arreglo de las células del cerebelo da lugar a tres capas cuando se realizan cortes transversales (Figura 1a). La externa o capa molecular que está compuesta por los axones de las células granulares (fibras paralelas), los árboles dendríticos de las células de Purkinje y por las células estrelladas y en canasta.

La segunda capa la forman los somas de las células de Purkinje, cuyas dendritas realizan contactos con las fibras paralelas. Los somas de estas células también reciben contactos de las fibras trepadoras cuyos somas se localizan en la oliva inferior.

Finalmente la capa más interna es la granular, donde se

FIGURA 1



localizan los somas de las células de Golgi y las células granulares, las cuales reciben contactos de las fibras musgosas y los somas de las células de Golgi. Una de las principales entradas nerviosas al cerebelo se da mediante la sinápsis excitadora que se establece entre las células granulares y las fibras musgosas cuyos somas se localizan en el puente y la médula (Eccles, 1973) . Se ha observado que cada célula granular posee de tres a seis pequeñas dendritas que realizan contactos postsinápticos con estas fibras musgosas. (Ito, 1984). Por su parte las células granulares envían información a otras neuronas a través de sus axones en la capa molecular, estas sinápsis se establecen con las células en canasta y las células de Purkinje.

En lo que se refiere al desarrollo del cerebelo, en la unión del esbozo de éste y el techo del cuarto ventrículo, las células del manto emigran a la superficie, situándose en el velo marginal formando una capa cortical. Estas células descienden para originar las células granulares y de Golgi, dejando libre la superficie que se transformará en la capa molecular.

Las células en canasta del cerebelo de rata se originan a partir de la diferenciación de células germinales de la capa granular externa durante los días 6-7 postnatales (Altman, 1972 [A]). Las células en estrelladas tienen el mismo origen, aunque su diferenciación comienza a partir del día 8-11 posnatal (Altman, 1972 [A y C]).

Por su parte las células del manto de mayor tamaño ascienden para formar las células de Purkinje, cuyas dendritas ocuparán la

mayor parte de la capa molecular, y sus axones llegarán hasta las células del núcleo dentado. Las migraciones celulares finalizarán con la formación de una sustancia gris periférica y de sustancia blanca central al contrario de lo que ocurre en la médula. Algunas de las células restantes del manto que no migraron se convierten en los núcleos cerebelosos (Langman, 1964).

Uno de los modelos más utilizados en los estudios del desarrollo ha sido el cerebelo de rata, ya que se tienen amplios conocimientos acerca de la anatomía del SN de este animal, además también se conoce muy bien la histología del cerebelo tanto en el adulto como del desarrollo de esta estructura. Otro aspecto importante de este modelo es la posibilidad de obtener cultivos primarios de células disociadas como es el caso de las células granulares del cerebelo las cuales son fáciles de obtener y cultivar con un alto grado de pureza. Una ventaja de este sistema de cultivo es que el proceso de disociación cerebelar se lleva a cabo entre los días 6-8 postnatales y en combinación con ciertas manipulaciones se da una selección de células granulares inmaduras, la mayoría de las cuales "in vivo" todavía están en periodo de replicación, pero "in vitro" estas células se sincronizan, dejan de dividirse y comienzan a diferenciarse.

En la rata las células granulares se originan postnatalmente a partir de células de la capa germinal externa (CGE) la cual persiste hasta el día 21 postnatal, el periodo de mayor proliferación en la rata se da entre el día 5-8 postnatal

(Fujita, 1967) dicha capa se divide en dos zonas, una superficial de proliferación y la inferior o premigratoria.

Todos estos procesos de migración y proliferación ocurren durante las primeras tres semanas postnatales en la rata, y en su inicio las células de la zona premigratoria comienzan a alargarse lateralmente adquiriendo una forma de huso y perdiendo su capacidad mitótica (Altman, 1972 [B]). Posteriormente estas células comienzan a migrar, aunque no todas lo hacen al mismo tiempo, este proceso dura aproximadamente 3 días y en la mayoría se inicia a partir del día 6 postnatal, sin embargo algunas han comenzado a migrar desde los primeros días postnatales. Durante la migración estas células dejan sus axones en la capa molecular, los cuales se extenderán a lo largo de ésta, originando así las fibras paralelas. Algunas observaciones indican que existe un gradiente de maduración de las fibras paralelas, en el que las fibras maduras se localizan en la parte baja de la capa molecular, mientras que las inmaduras se mantienen en la parte más superior de esta capa (Burgone y Cambray-Deakin, 1988).

Las células granulares atraviesan toda la capa molecular llegando hasta la capa granular en donde establecen los primeros contactos sinápticos con las fibras musgosas a partir del día 5 (Arsenio Nuñez y Sotelo, 1985), aunque esta sinapsis comienza a ser funcional aproximadamente entre el día 10 y 12 postnatal. Después del día 12 se realizan los contactos sinápticos entre las células de Golgi y las granulares.

Durante la migración de las células granulares se ha observado que se establece una estrecha relación entre estas células y las

células gliales de Bergmann, lo que ha permitido sugerir que las células granulares migran a través de la capa molecular a lo largo de los procesos de este tipo de glía (Rakic, 1971,1973). Cuando se trata de observar la migración de la células granulares en ausencia de este tipo de glía, este fenómeno es factible que llegue a realizarse, aunque con cierta dificultad, por lo que se ha propuesto que la relación entre la glía y estas neuronas es de tipo física (Altman,1975 [C]).

La migración e incorporación de las células granulares a sus funciones neuronales tan especializadas de la corteza cerebelar involucra una serie de procesos de reconocimiento químico, regulación del crecimiento celular y establecimiento de conexiones intercelulares (Ito, 1984).

NEUROQUIMICA DEL CEREBELO.

Algunas evidencias muestran que la mayoría de las neuronas del cerebelo utilizan al ácido t amino butírico (GABA) como neurotransmisor (Células de Golgi, de Purkinje, en canasta y estrelladas) ya que se ha observado que las respuestas producidas por estas células pueden ser bloqueadas por la acción de antagonistas específicos al receptor de GABA como lo es la bicuculina. Además se ha demostrado que las células con las que hacen contacto poseen numerosos receptores sinápticos a GABA (Ito, 1984).

Por su parte las células granulares utilizan al ácido glutámico como neurotransmisor (Young et al., 1974, Hudson et al., 1976, Hertz y Schousboe, 1987), se tienen evidencias de que el glutamato

es liberado de sinaptosomas de cerebelo de rata, y que dicha liberación es dependiente de Ca^{++} , antagonizada por Mg^{++} y estimulada por una despolarización por K^+ (Sandoval y Cotman, 1978, Levi, et al., 1982). Sin embargo aún no se conoce con certeza cuales son las vías metabólicas involucradas en las síntesis del transmisor, más adelante se hace referencia sobre algunos de los posibles mecanismos involucrados en este fenómeno. Existen evidencias de que parte de la población de las fibras musgosas es colinérgica (Kasa y Silver 1969), sin embargo una gran proporción de esta libera ácido glutámico como neurotransmisor (Somogi et al., 1986). De esta manera es que el glutamato puede interactuar con los receptores a aminoácidos excitadores que poseen las células granulares, entre los que se incluyen los del tipo del N- metil-D aspartato (NMDA).

Las células granulares también reciben entradas sinápticas de las células de Golgi, que liberan GABA induciendo una respuesta inhibitoria en las células granulares, se tienen evidencias de que dicha influencia se manifiesta como una depresión de los potenciales de campo registrados en los axones de las células granulares, dicha acción es antagonizada por picrotoxina y bicuculina (Bisti et al., 1971).

Las células en canasta y estrelladas realizan sinapsis con las células de Purkinje, las cuales reciben entradas excitadoras de las fibras trepadoras provenientes de la oliva inferior, dicha excitación es mediada por ácido aspártico. El extenso árbol dendrítico de las células de Purkinje y de las de Golgi realiza contactos con las fibras paralelas.

SEÑALES TROFICAS DURANTE EL DESARROLLO.

Una de la preguntas centrales en la neurobiología del desarrollo es cómo las neuronas migran, adquieren su forma final y establecen contactos sinápticos. Actualmente se sabe que existen algunos factores en el medio extracelular que son liberados por las propias neuronas o por las células gliales, que pueden ser determinantes para que se lleven a cabo los procesos antes mencionados. Estas sustancias se les conoce como factores tróficos y han sido identificados como aminoácidos, proteínas, y algunos compuestos que normalmente funcionan como neurotransmisores.

El desarrollo de las células granulares puede ser modificado por varios factores extrínsecos e intrínsecos, como la desnutrición, el hipotiroidismo y agentes tóxicos. La deficiencia nutricional reduce el número de células granulares en ratas hembras en un 20%, y en machos en un 10%, sin embargo el número de células de Purkinje se mantiene constante en ambos grupos (Hillman y Chen, 1981).

El hipotiroidismo en ratas también produce efectos a nivel de la proliferación y la migración de las células granulares, así como una reducción en la longitud de las fibras paralelas, número de sinapsis y sobrevivencia de las células granulares (Crepel, 1974, 1975). Algunos de estos efectos que se observan en animales con hipotiroidismo es el incremento en la muerte de células granulares, terminación prematura de la proliferación y una aceleración en la migración de dichas células. Tales efectos sugieren que para que se lleve a cabo la diferenciación de las

células granulares es necesaria la producción de algunas hormonas tiroideas como la T3 y T4 (Sarafian y Verity, 1986). Algunos reportes indican que en células granulares en cultivo crecidas en suero careciente de hormonas tiroideas y al adicionar posteriormente T3 y T4 se observa la estimulación la agregación celular, fasciculación de neuritas y sobrevivencia, lo cual indica que estas hormonas tienen un efecto en la diferenciación aunque se requiere un factor adicional que se encuentra en el suero. (Sarafian y Verity, 1986).

Otros estudios indican que cultivos de células granulares requieren para sobrevivir un medio químicamente definido suplementado con insulina, aunque no se conoce si la insulina actúa como un factor de crecimiento o ejerce una acción similar a la de un factor de crecimiento aún no identificado (Huck, 1983).

Se sabe que el incremento en la concentración de potasio puede aumentar la sobrevivencia de algunos tipos neuronales en cultivo (Scott, 1971, 1977; Lasher y Zagon, 1972; Bennett y White, 1981), así como la maduración de células granulares del cerebelo (Balázs, 1988; Balázs, Gallo y Kinsbury, 1988, Morán y Patel, 1989).

Estudios recientes han demostrado que la despolarización por potasio en células granulares provoca un incremento en la actividad de la glutaminasa activada por fosfato, la cual es una enzima que está involucrada en la síntesis de ácido glutámico que es utilizado como neurotransmisor (Morán y Patel, 1989)

Se ha propuesto que algunos compuestos que normalmente funcionan como neurotransmisor actúan también como factores

tróficos, tal es el caso del GABA ya que estimula el crecimiento de neuritas y agregación de células granulares (Hansen, et al, 1984), aunque estos efectos no han sido observados "in vivo".

Se tienen evidencias de que la estimulación del receptor tipo NMDA promueve la sobrevivencia de estas células mediada por una despolarización ocasionada por glutamato "in vivo" o por K^+ "in vitro" (Bálazs and Jorgensen, 1990, Bálazs et al 1988).

Lo anterior parece indicar que estos receptores juegan un papel importante durante el desarrollo, ya que se ha observado que si estos receptores son estimulados tempranamente, las células granulares muestran un crecimiento mayor de dendritas, el cual puede ser inhibido por la presencia de antagonistas específicos a NMDA como el 2-amino-5-fosfonovalerato (APV), estas evidencias sugieren que el glutamato que es liberado normalmente estimula el crecimiento de neuritas (Pearce, et al., 1987).

Se ha observado que en algunas áreas del sistema nervioso existe un incremento en la densidad de los receptores a NMDA en estadios tempranos del desarrollo, lo cual hace pensar que participan en algunos de los fenómenos que están ocurriendo en las neuronas durante el periodo de diferenciación (Bálazs, 1988).

Algunos estudios muestran un crecimiento temprano de neuritas en células granulares en cultivo, lo cual ocurre después de las primeras horas "in vitro" (Pearce et al., 1987). Este efecto se puede estimular si se adicionan al medio de cultivo agonistas al receptor NMDA; de esta manera se observa un crecimiento mayor de neuritas y como ya se mencionó, también se promueve la sobrevivencia neuronal. Por otro lado si se adicionan enzimas

capaces de metabolizar al glutamato, el crecimiento se inhibe de manera muy similar a lo que ocurre en presencia de APV.

Otros estudios en neuronas de retina de rana en desarrollo muestran resultados muy similares, ya que la activación de los receptores a NMDA promueve un mayor desarrollo del árbol dendrítico, lo cual es inhibido en presencia de antagonistas como el APV o el MK-801 (Hollis y Constantine-Paton).

Los resultados antes mencionados sugieren que la activación de los receptores a NMDA durante las primeras etapas del desarrollo promueve un crecimiento de neuritas en algunos tipos neuronales.

Sin embargo este comportamiento no es muy común para la mayoría de las células que presentan receptores a aminoácidos excitadores, ya que como se expondrá más adelante existen numerosas evidencias que indican que tanto "in vivo" como "in vitro" los aminoácidos excitadores pueden ejercer un efecto tóxico.

Basados en los estudios de Garthwaite se concluyó que dependiendo de la etapa del desarrollo de las células granulares la activación del receptor a NMDA puede inducir o no daño celular (Garthwaite et al., 1986, 1987), por lo tanto la influencia trófica de la estimulación del receptor a NMDA es un evento temporal durante la vida de las células granulares y que solo se manifiesta durante el periodo inicial del desarrollo de estas células.

AMINOACIDOS EXCITADORES.

Se sabe que los principales aminoácidos excitadores son L-glutámico y L-aspartico, y que parecen ser los neurotransmisores

más ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central de mamífero (Fonnum,1984).

Los ácidos glutámico y aspártico ejercen una acción excitadora prácticamente con casi todas las neuronas con las que entran en contacto. La excitación inducida por el glutamato es extraordinariamente grande, instantánea y de rápida terminación, lo cual va acompañado por una caída en la resistencia de la membrana, un incremento en la entrada de sodio y otros iones permeables; dicha respuesta no puede ser mediada por los canales de sodio responsables de propagar el potencial de acción, ya que el efecto no se bloquea con tetrodotoxina (Zieglgalsberg y Puil, 1973).

En casi todos los aspectos el L-aspártico provoca un efecto similar a la acción del L-glutámico, aunque este es menos potente.

METABOLISMO.

Ambos aminoácidos glutámico y aspártico se consideran no esenciales y son sintetizados a partir de glucosa y otros precursores del ciclo de Krebs por reacciones de transaminación (Figura 1b).

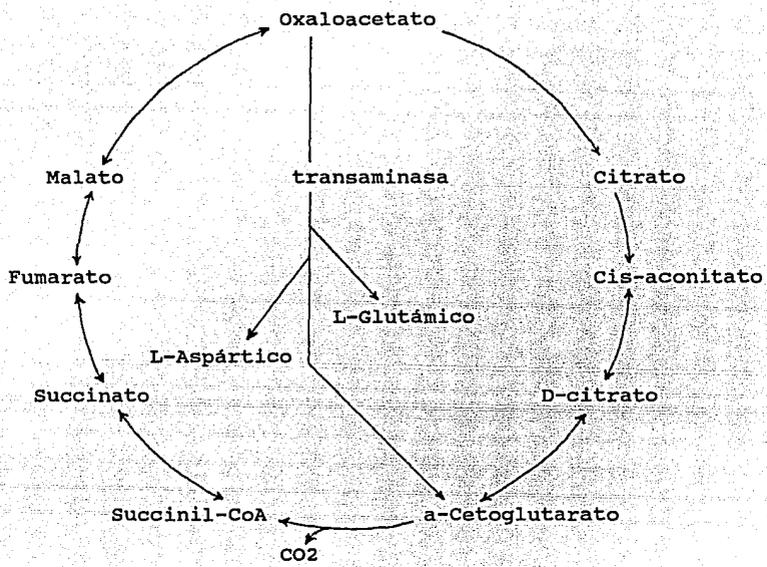
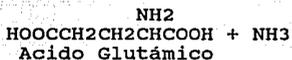
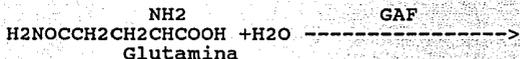
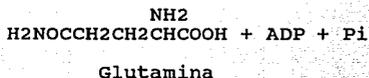
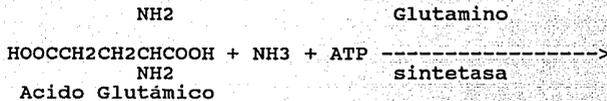


FIGURA 1b. Los intermediarios del ciclo de Krebs intervienen en la formación de L-Glutamato y L-Aspartato mediante reacciones de transaminación.

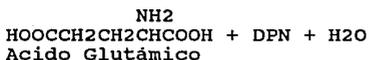
Las células gliales tienen la capacidad de capturar, y convertir parte del glutamato liberado como neurotransmisor en glutamina a través de la glutamino sintetasa. La glutamina que se forma por medio de este proceso puede ser transferida a las neuronas donde será nuevamente transformada en glutámico, este proceso se lleva a cabo a través de la glutaminasa activada por

fosfato (GAF), (Hamberger et al, 1979; Patel et al, 1982).



Se ha observado que para la GAF existen cambios en relación a su actividad durante el desarrollo, lo cual se relaciona con la diferenciación de las neuronas y establecimiento de vías glutamatérgicas, debido a esto se le ha considerado como un marcador del desarrollo de células que utilizan al glutámico como neurotransmisor (Patel et al., 1987).

Existen otras vías a través de las cuales se puede sintetizar este transmisor, una de las cuales es por la incorporación de Nitrógeno al a-cetoglutarato vía la deshidrogenasa del ácido glutámico (DAG) :

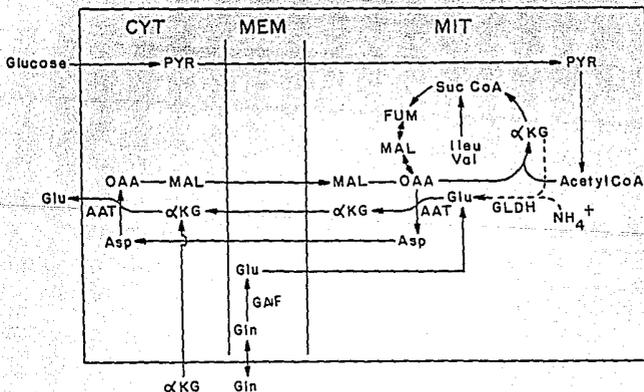


Estudios inmunohistoquímicos han permitido conocer que la aspartato amino transferasa (AAT) es una enzima relacionada con estructuras glutamatérgicas (Altschuler et al, 1981 ; Wenthold et al, 1986), sin embargo existe poca información acerca de la importancia funcional para las neuronas glutamatérgicas respecto a esta enzima.

Algunos estudios proponen que la AAT es la enzima principal para la síntesis del glutámico (Hertz y Schousboe, 1987), aunque recientemente se ha propuesto que tanto la AAT como la PAG actúan de manera sinérgica para llevar a cabo la síntesis del transmisor, de tal modo que la actividad de una enzima dependería de la otra (Cuadro 3).



CUADRO # 3



Vías alternativas de síntesis de glutamato, a partir de glutamina mediada por la enzima GAF y a partir de a-CG por la AAT.

RECEPTORES SINAPTICOS.

Se han propuesto al menos cinco tipos de receptores a aminoácidos excitadores de acuerdo a la sensibilidad farmacológica: NMDA, AMPA (A), Kainato (K), Quiscualato (Q) y LAP4. Estas cinco clases de receptores han sido caracterizadas de manera electrofisiológica, bioquímica y anatómica. Las respuestas que genera la estimulación de cada receptor es diferente debido a las características moleculares que poseen, lo cual refleja también diferentes sensibilidades farmacológicas.

En general este es un buen punto de partida para poder distinguir a un receptor de otro, sin embargo aún no se conocen antagonistas específicos que permitan distinguir las respuestas del receptor tipo K y Q , aunque se sabe que este último está acoplado a un sistema de segundos mensajeros. Debido a que en ocasiones se dificulta el poder distinguir estos cuatro tipos con el del NMDA generalmente se hace referencia a los receptores tipo NMDA y no NMDA.

Se ha propuesto que los receptores tipo NMDA, K y Q pertenecen a un mismo complejo molecular (Jahr y Stevens, 1987; Cull-Candy y Usowicz, 1987), pero algunos estudios electrofisiológicos y de binding sugieren que son entidades moleculares separadas (Cull-Candy et al., 1988; Ascher y Nowak, 1988), por otro lado también se sabe que el RNAM se codifica por separado para cada tipo de receptor (Kushner, et al., 1988).

CUADRO # 4 RECEPTORES A AMINOACIDOS EXCITADORES.

AGONISTAS	NMDA	K	Q	L-AP4	A
Específicos	N-Methyl-D-as- pártico	Ac.Kainico Ac.Domóico	Ac.Quiscuálico	Ac.L- AP4	AMPA

Endógenos L-glutámico, L-aspártico, L-CSA, L-CA, L-HCSA, L-HCA, QUIN

Potenciadores

Glicina, D-Serina

ANTAGONISTAS

CNQX y DNQX

Competitivos CPP
D-AP5
D-AP7

No competitivos
Mg++
MK-801
PCP
Ketamina

Del sitio a 7-Cl-Kyn
glicina HA-966

Como se puede observar el cuadro 4 el receptor mejor caracterizado es el del tipo NMDA. Dicho receptor se encuentra acoplado a un canal iónico, que es permeable además del Na⁺ y K⁺ al Ca⁺⁺, lo cual constituye una característica única entre los

receptores sinápticos (Ascher y Nowak, 1987; Mac Dermott y Dale, 1987). La activación de dicho canal es dependiente de voltaje, esto se debe a un bloqueo por Mg^{++} que se presenta cerca del potencial de reposo de la célula (Mayer y Westbrook, 1987).

Los receptores a NMDA se encuentran acoplados a otros sistemas de regulación, ya que se ha descrito que en este receptor existe un sitio para la glicina, dicho aminoácido es indispensable para la activación basal del receptor, sin embargo, en concentraciones micromolares es capaz de provocar un incremento o potenciación de la respuesta inducida ya sea por NMDA u otro agonista (Johnson y Ascher, 1987; Patel, et al 1990).

La acción inducida por glutamato sobre el receptor a NMDA puede ser antagonizada selectivamente, ya sea competitivamente por el 2-amino-5-fosfonovalerato (APV), o no competitivamente por drogas como el MK-801.

En el caso de los receptores no NMDA, como ya se, mencionó pueden activarse preferencialmente por ácido Kainico o Quiscuálico. Se sabe que el glutamato en combinación con el Zinc pueden producir una respuesta aproximada a la inducida por el agonista de receptor Q (Peters et al., 1987), dicho receptor está ligado a un sistema de segundos mensajeros, logrando así una movilización de Ca^{++} y como consecuencia la activación de una proteína cinasa (Sugiyama et al., 1987). Las respuestas inducidas por este receptor pueden ser potenciadas por Zn^{++} y antagonizadas por compuestos como GAMS y CNQX. Por otro lado el receptor tipo A es capaz de producir respuestas rápidas debidas a la activación

de corrientes de Na^+ (Cull-Candy et al., 1988).

Por último el receptor a Kainato induce respuestas en las que se genera una activación de canales de Na^+ (Ascher y Nowak, 1988) sin embargo parece que el Zn^{++} no es capaz de potenciar la respuesta para este tipo de receptor.

NEUROTOXICIDAD.

Se sabe que el glutamato al activar los receptores a NMDA puede actuar como un potente agente neurotóxico, sin embargo las observaciones "in vivo" de este fenómeno se dificultan, ya que se enmascaran debido a la eficiencia de los sistemas de captura del glutámico del espacio extracelular (Schousboe, 1981), debido a esto la toxicidad del glutamato se puede demostrar más directamente en cultivos celulares, de esta manera una exposición de 5 min con 100 μm de glutámico puede producir un gran daño en neuronas corticales (Choi et al., 1987). Las observaciones "in vitro" indican que la toxicidad producida por el glutamato tiene dos componentes, el primero ocasionado por un hinchamiento agudo de las neuronas y que depende de una entrada de Na^+ y Cl^- acompañado de agua, (Rothman, 1985, Choi, 1987). El segundo componente depende de Ca^{++} extracelular el cual puede ocasionar graves daños debido a una entrada masiva de este ión, lo que resultaría en una degeneración neuronal (Choi, 1987).

Las razones por las que el Ca^{++} puede ocasionar estos daños son múltiples, entre las que se pueden mencionar la activación

de proteasas, fosforilasas, deshidrogenasas y otros sistemas enzimáticos que pueden ocasionar graves daños en la célula como son la ruptura de membranas celulares, degradación de proteínas que constituyen al citoesqueleto, y activación de otros sistemas enzimáticos capaces de ocasionar reacciones que llevarán a la célula a la muerte.

Lo anterior indica que el receptor a NMDA juega un papel clave en los fenómenos de toxicidad ya que, como se mencionó anteriormente, es el único receptor a aminoácidos excitadores que permite la entrada de Ca^{++} a través de su canal.

Un gran número de enfermedades de SN conocidas como degenerativas se han relacionado con muerte neuronal, asociada a un efecto neurotóxico de los aminoácidos excitadores.

Algunas de estas enfermedades degenerativas están asociadas con altos niveles de aminoácidos excitadores en el plasma, debido a deficiencias en los mecanismos enzimáticos de degradación de estos aminoácidos (Plaitakis et al., 1982), tales deficiencias traen como consecuencia un deterioro progresivo de estructuras como el cerebelo y funcionamiento del sistema motor.

El mal de Huntington es una patología que se puede relacionar con la toxicidad inducida por aminoácidos excitadores, en este caso los pacientes manifiestan un funcionamiento normal del SN, hasta que en la etapa adulta desarrollan una enfermedad en la que presentan movimientos involuntarios y disfunciones mentales, en este caso se ha observado una pérdida de neuronas estriatales. Muchas de las características morfológicas y neuroquímicas del

mal de Huntington se pueden reproducir experimentalmente en animales tratados con inyecciones de Kainato, glutamato o quinolato en el estriado.

OBJETIVOS.

En el presente trabajo se probaron el efecto del K⁺ y de agonistas y antagonistas de los receptores tipo NMDA y no NMDA, sobre la actividad de la glutaminasa activada por fosfato, como un indicador de la diferenciación bioquímica de las células granulares, ya que se pretende hacer una descripción farmacológica más amplia de este fenómeno, y conocer si "in vivo" se observa un efecto semejante al observado "in vitro" en relación a la actividad de esta enzima. Con el propósito de saber si los tratamientos "in vivo" y en los cultivos alteraban la actividad de otras enzimas, se llevaron a cabo mediciones de la actividad de la LDH como un indicador general del metabolismo.

METODOLOGIA.

La obtención de los cultivos primarios de células granulares se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Patel y Hunt (1985), Morán y Patel (1989), a partir de ratas Wistar de 8 días postnatales, y que consiste en la disociación de las células mecánicamente y con tripsina (0.025%).

El medio de cultivo utilizado fué un medio basal Eagle suplementado con suero fetal de bovino al 10% (Microlab), glutamina 2mM, penicilina 50 U/ml, y 50 ug/ml de estreptomocina.

Las células granulares se sembraron en cajas de petri de 35mm de diámetro tratadas previamente con poli L-lisina, a una densidad de 1.5 millones/ml; 20 horas después se les adicionó citosina arabinosa 10 uM.

Las cajas de petri se mantuvieron en una incubadora a 37 °C en una atmósfera de 95% de CO₂, 5% de aire.

A los 2 días in vitro (DIV) las células fueron tratadas con los agonistas y antagonistas de los aminoácidos excitadores, dicho tratamiento se aplicó durante 72 h, posteriormente las células se lavaron con un amortiguador de fosfatos 10 mM y se congelaron a -70°C.

En el caso de los experimentos "in vivo" se utilizaron ratas de 9, 12, 15, 19 y 25 días de nacidas a las cuales se les aplicó una inyección intraperitoneal durante 3 días con los siguientes fármacos:

NMDA 5 mg/Kg

APV 60 mg/Kg

MK-801 0.1 y 1 mg/Kg

CPP 2.5 mg/Kg

Al cuarto día de tratamiento las ratas fueron sacrificadas por decapitación, parte del cerebelo se fijó en formol salino para estudios histológicos y el resto del tejido se utilizó para realizar los estudios bioquímicos. Los homogenados se prepararon en un amortiguador de imidazol 10 mM pH 7.2, finalmente el tejido se congeló a -70 y °C.

Para llevar a cabo la medición de la actividad de la GAF y de la LDH los cultivos se descongelaron y se resuspendieron en 200 ul de amortiguador de imidazol. Tanto para los experimentos "in vitro" como "in vivo" las muestras se sonicaron durante 5 segundos.

Para medir la actividad de la GAF se utilizó la técnica descrita por Kvamme y Olsen 1980, para lo cual se requirió de las siguientes soluciones:

AMORTIGUADOR

Na(PO₄) 20 mM

NaCl 90 mM

KCl 56 mM

Manitol 100 mM

Sacarosa 30 mM

HEPES 4 mM

MgCl₂ 5 mM

Para obtener la mezcla de ensayo a este amortiguador se le adicionó:

Oligomicina 200 ug/ml

Antimicina 12 ug/ml

Glutamina 0.46 mM

U-C-14 Glutamina 50 uCi/ml

PROCEDIMIENTO

A 80 ul de mezcla de ensayo se le adicionó 20 ul de tejido y se incubó durante 20 min a 37 °C. Posteriormente se le adicionó 1 ml de agua fría e inmediatamente la muestra se hizo pasar por una columna de intercambio iónico la cual se lavó con 5ml de agua, 6 ml de ácido acético 0.005 M y 6 ml de ácido acético 0.5 M. De

este último lavado se tomó 1 ml al que se le adicionó 10 ml de líquido de centelleo, finalmente para determinar la cantidad de glutamato radiactivo la muestra se contó en un contador de centelleo. La actividad se expresó como nmolas / h / mg de proteína.

Para determinar la actividad de la LDH se utilizó la técnica descrita por Bergmeyer H-U, Bernt E, Hess B. (1968).

Soluciones:

Amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M pH 7.5

Piruvato de Sodio 20 mM

NADH 9.4 mM

PROCEDIMIENTO

La actividad de la LDH se midió como un decremento en la densidad óptica a 340 nm como resultado de la oxidación del NADH con el piruvato como sustrato. Se utilizaron 1.4 ml de amortiguador de fosfatos, 25 ul de la solución de NADH, 20 ul de tejido y 25 ul de la solución de piruvato. La reacción se siguió durante 1 min, los resultados se expresaron como umolas de lactato producidas /mg de proteína.

Lactato + NAD -----> Piruvato + NADH + H⁺

La determinación de proteína se llevó a cabo mediante la técnica de Lowry et al., (1951).

RESULTADOS.

EFECTO DEL K+ Y NMDA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GAF "IN VITRO".

En estudios anteriores se demostró que cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata tratados con K+ o NMDA durante 48 - 72 h incrementan específicamente la actividad de la GAF (Morán y Patel, 1989). En este trabajo se corroboraron tales resultados, como se muestra en la tabla I. La presencia de K+ 40mM o NMDA 150uM aumentó significativamente la actividad de la GAF en aproximadamente 75% respecto al control. El tratamiento con K+ o NMDA no afectó de manera sustancial la concentración de proteína.

TABLA I

Efecto del K+ y del NMDA sobre la actividad de la GAF en células granulares en cultivo.

CONDICION	ACTIVIDAD (nmol/h/mg prot)	PROTEINA (ug/caja 60mm)
Control	28.79 ± 2.4	142 ± 3.8
K+ 40mM	79.94 ± 6.72 *	148 ± 2.6
NMDA 150uM	82.70 ± 2.60 *	156 ± 2.8

Las células se sembraron en un medio Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino y K+ 10mM. Los tratamientos se aplicaron durante 72 hrs. Los valores mostrados son el promedio de 4 experimentos ± desviación estándar. * P < 0.001 T de Student.

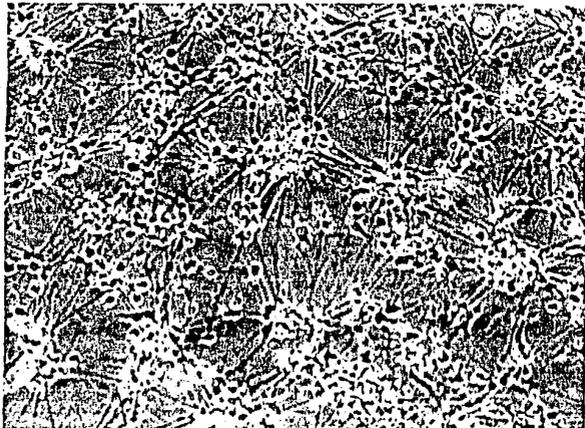
Efecto del K^+ y del NMDA sobre la morfología de las células granulares.

El tratamiento con K^+ y NMDA (Figura 2) tiene un efecto notable tanto en la morfología como en incremento de la sobrevivencia de las células granulares cultivadas por tiempos largos (> 10 DIV). A tiempos más cortos (alrededor de 5 DIV), las células tratadas con K^+ 40mM bajo microscopía de luz muestran un mayor desarrollo de prolongaciones citoplasmáticas, incrementándose tanto en número como en grosor. En lo que se refiere al soma este se observa más oscuro que los controles. En el caso de las células tratadas con NMDA presentan el mismo fenómeno de desarrollo de las prolongaciones que en presencia de K^+ , aunque en este caso se observa una formación mayor de cúmulos de células que las tratadas con K^+ .

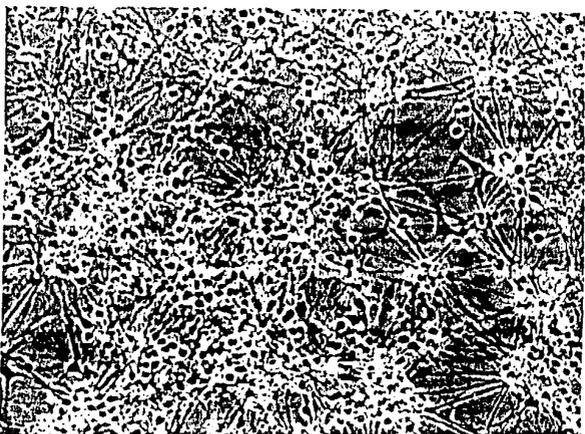
Efecto del NMDA y K^+ sobre la actividad de la LDH "in vitro".

Con la finalidad de conocer si los efectos inducidos por el NMDA y K^+ son específicos para la GAF o involucran una activación del metabolismo general de la célula, se llevaron a cabo mediciones de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH), en presencia de K^+ y NMDA. Como se muestra en la tabla II estos tratamientos no afectan de manera significativa la actividad de la LDH.

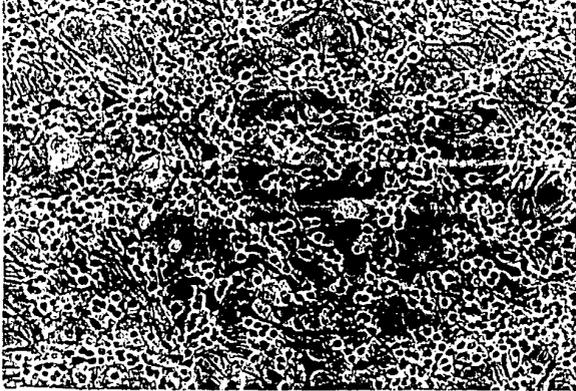
Figura 2
Aspecto de las células granulares a los 5 DIV



CONTROL



K 40 mM



NMDA 150 μ M

TABLA II

Efecto del K⁺ y del NMDA sobre la actividad de la LDH
en células granulares.

CONDICION	ACTIVIDAD ($\mu\text{mol} / \text{h} / \text{mg prot}$)
Control	49.9 \pm 4
K ⁺ 40 mM	45.8 \pm 4.3
NMDA 150 μM	47.3 \pm 3.7

Las células se cultivaron durante 5 DIV en un medio basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal de bovino, el tratamiento se aplicó durante los últimos 3 DIV. Los valores de actividad son el promedio de tres experimentos \pm desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y experimentales.

Efecto de agonistas a aminoácidos excitadores sobre la actividad de la GAF in vitro.

Con el fin de analizar si el efecto observado por acción del NMDA sobre la actividad de la GAF también se presentaba ante la estimulación de los diferentes subtipos de receptores a aminoácidos excitadores se estudió el efecto de agonistas a los receptores del tipo Kainato, Quiscualato y NMDA.

Cuando los cultivos se trataron por 72 h con ácido quinolínico (250 y 500 μM), un posible agonista de los receptores del NMDA, se observó un incremento en la actividad de la GAF de aproximadamente 200% con respecto al control y similar a lo

observado para el K^+ (40mM) (Gráfica 1). Sin embargo a concentraciones mayores (1mM) la actividad sólo aumentó un 33% sobre el control. Cuando se probó ácido Quinolinico 250uM junto con K^+ 40mM no se observó un efecto aditivo, sugiriendo un mecanismo similar de acción.

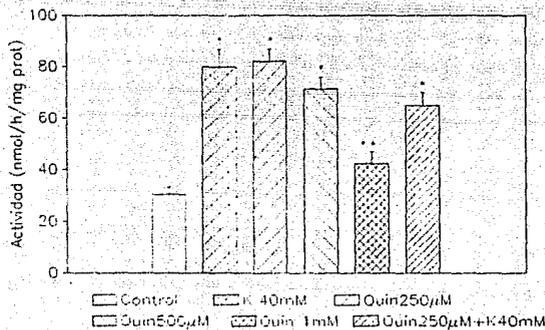
Las células tratadas con ácido Quinolinico 250 y 500uM mostraron un desarrollo notable de las prolongaciones observándose una mayor cantidad y grosor de las neuritas con respecto al control. Por otro lado el tratamiento con ácido Quinolinico 1mM dió como resultado un patrón morfológico similar al observado en las células control, en el que se distinguen los somas brillantes y un número menor tanto de células como de prolongaciones.

El tratamiento con ácido Kainico (10uM), un agonista de los receptores no NMDA, incrementó la actividad de la GAF un poco más de dos veces (Gráfica 2), pero a mayores concentraciones, (100uM) la actividad no presentó cambios significativos con respecto al control. Las células tratadas con Kainato 10uM presentaron axones más gruesos y en mayor número que las tratadas con 100uM, ya que en este caso el desarrollo de prolongaciones fue escaso.

Cuando se probaron otros fármacos como el AMPA y el LAP4, agonistas del receptor de Q y LAP4 respectivamente en una concentración de 10 y 100uM se produjo un incremento en la actividad de la GAF de entre dos y tres veces (Gráfica 3).

El seguimiento morfológico mostró la presencia de axones mucho

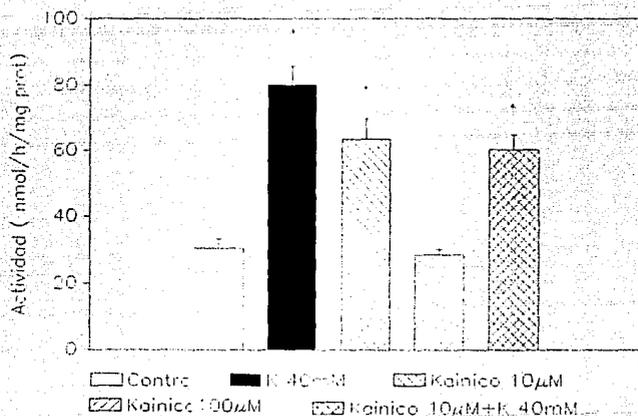
Efecto del Efecto del ácido Quinolínico
sobre la actividad de la GAF



GRAFICA 1

Efecto del K⁺ y del ácido quinolínico sobre la actividad de la GAF. Los tratamientos se aplicaron durante 3 días con las concentraciones señaladas. *P<0.001, **P<0.01 (Prueba t de Student).

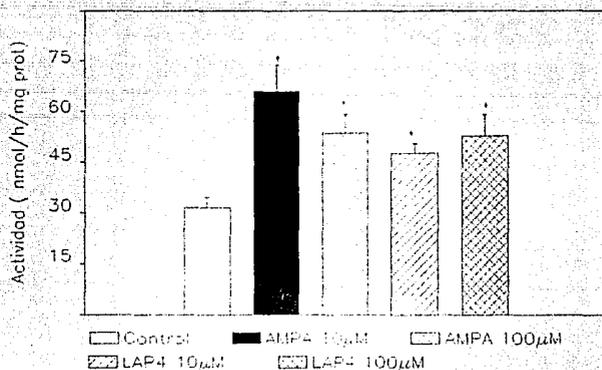
Efecto del Potasio y el Acido kainico
sobre la actividad de la GAF



GRAFICA 2

El incremento en la actividad de la GAF es estadísticamente significativo tanto para K⁺ 40mM como para Kainato 10µM. Cada barra representa un total de tres experimentos. *P<0.001

Efecto del AMPA y del LAP4 sobre la actividad de la GAF



GRAFICA 3

Efecto del AMPA y LAP4 sobre la actividad de la glutaminasa (nmol/h/mg prot). Las células fueron tratadas con las concentraciones indicadas durante 72 h. * $P < 0.001$ cuando se compara cada barra con respecto al control.

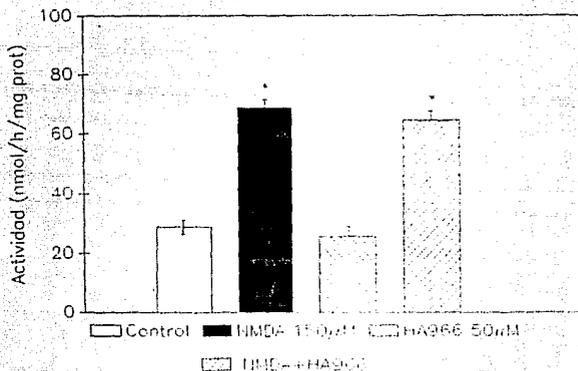
más desarrollados en grosor con respecto al control cuando se utilizaron estos dos agonistas.

Dado que el receptor a NMDA posee un sitio modulado por Glicina, se trató de probar la participación de este aminoácido sobre el efecto inducido por el NMDA utilizando un antagonista específico como el HA966. Los resultados nos muestran que el HA-966 (50 μ M) no tiene influencia sobre la actividad control de la GAF ni modifica el efecto inducido por el NMDA (Gráfica 4). En este caso las células no mostraron grandes diferencias morfológicas con respecto al control.

Dependencia de la síntesis de RNA y proteínas sobre la respuesta inducida por NMDA "in vitro".

El incremento en la actividad de la GAF inducido por NMDA (150 μ M) se estudió en presencia de cicloheximida y actinomicina drogas que inhiben la síntesis de proteínas y de RNA respectivamente.

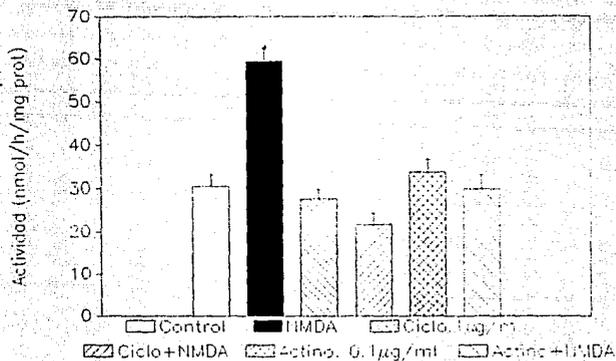
Cuando se adicionó al medio de cultivo cicloheximida (1 μ g/ml) por 48 hrs se bloqueó el efecto del NMDA. De la misma manera dicho efecto se inhibió al tratar a las células con 0.1 μ g/ml de actinomicina durante 48 hrs. Tanto la cicloheximida como la actinomicina solas no afectaron significativamente la actividad de la GAF con respecto al control (Gráfica 5). Las observaciones morfológicas coincidieron con los resultados bioquímicos, ya que con ambas drogas las células mostraron un escaso desarrollo de prolongaciones así como la formación de pequeños cúmulos de células cuyos somas se observaron muy brillantes.



GRAFICA 4

Efecto del NMDA y del HA966 sobre la actividad de la GAF "in vitro". Los cultivos fueron tratados con las concentraciones indicadas durante los últimos 3 DIV. *P<0.001 al comparar contra el control.

Efecto del NMDA, actinomizina y cicloheximida sobre la actividad de la GAF



GRAFICA 5

Efecto del NMDA, actinomizina y cicloheximida sobre la actividad de la glutaminasa. Los resultados se expresan como actividad (nmol/h/mg prot) *P<0.001 al aplicar la prueba de t de student.

Efectos de la estimulación del receptor tipo NMDA en la actividad de la GAF "in vivo".

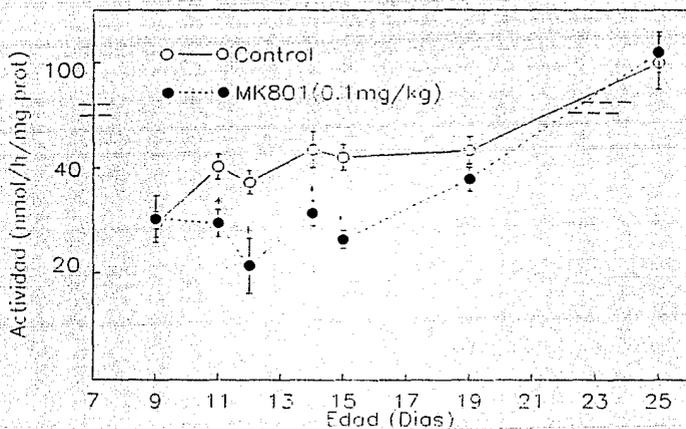
Con el fin de probar si los fenómenos observados en el cultivo eran capaces de reproducirse "in vivo" se utilizaron drogas que interactúan con el receptor NMDA, para lo cual las ratas fueron tratadas durante los primeros días del desarrollo del cerebelo. Los tratamientos se llevaron a cabo durante tres días con una inyección intraperitoneal del fármaco, al cuarto día los animales fueron sacrificados. El tratamiento con MK801 (0.1 mg/Kg) un antagonista no competitivo del receptor NMDA, resultó en un decremento en la actividad de la GAF de hasta un 40% a los 11,12,14 y 15 días de edad con respecto al control, sin embargo dichos cambios no se observan a los 9,19 y 25 días de edad (Gráfica 6).

La presencia de APV (60mg/Kg) otro antagonista de tipo competitivo, a las edades estudiadas no ocasionó cambios en la actividad de la GAF, mientras que el NMDA (5mg/Kg) indujo un incremento significativo de dicha actividad únicamente a los 12 días (Gráfica 7).

Finalmente, otro antagonista de tipo competitivo CPP (2.2 mg/Kg) ocasionó un decremento de hasta el 50% a los 11 y 12 días posnatales con respecto al control, los tratamientos a los 9 y 14 días no mostraron diferencias con respecto al control (Gráfica 8).

Con objeto conocer si los efectos observados eran específicos para la GAF o involucraban al metabolismo general de las células se llevaron a cabo mediciones de la actividad de la LDH

Efecto del MK-801 sobre la actividad de la GAF

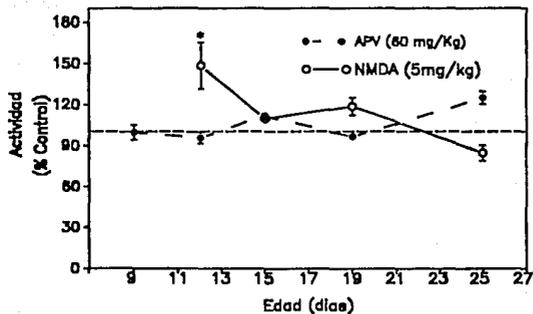


GRAFICA 6

Efecto del MK-801 a los 9,11,12,14,15,19 y 25 días de edad sobre la actividad de la glutaminasa en presencia de 20mM de fosfato. El fármaco se aplicó intraperitonealmente durante tres días.

* $P < 0.001$ (Prueba de t de student).

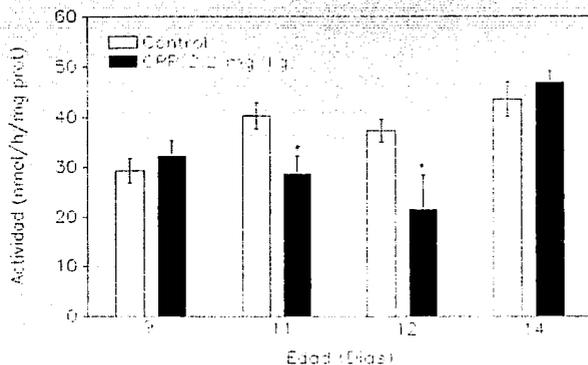
Efecto del NMDA y del APV sobre la actividad de la GAF in vivo



GRAFICA 7

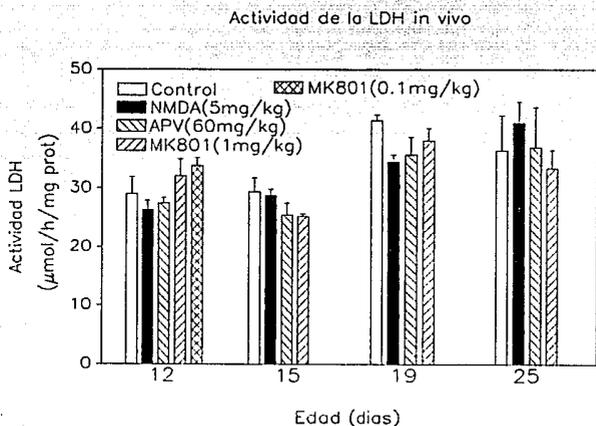
El incremento en la actividad de la GAF solo se presenta con NMDA a los 12 días postnatales lo cual no ocurre a otras edades o en presencia de APV, los resultados se expresan como % del control. *P<0.001

Efecto del CPP sobre la actividad de la GAF



GRAFICA 8

Efecto del CPP en ratas de 9,11,12, y 14 días de edad tratadas por tres días con una dosis de 2.2 mg/kg. *P<0.001 al comparar contra el control con una prueba de t de student.



GRAFICA 9

Actividad de la LDH ($\mu\text{mol/h/mgprot}$) a distintas edades bajo la presencia de NMDA, APV y MK-801 administrados sistémicamente durante tres días, las concentraciones utilizadas se muestran en la figura.

bajo las distintas condiciones, y como muestra la gráfica 9 no encontramos diferencias significativas con respecto al control a ninguna de las edades estudiadas.

DISCUSION.

Efectos "in vitro" sobre la actividad de la GAF.

En el presente trabajo se estudió el efecto de agonistas y antagonistas de los receptores a aminoácidos excitadores sobre la actividad de la GAF, como un índice de maduración bioquímica de las células granulares del cerebelo. Este estudio se llevó a cabo en cultivos neuronales así como preparaciones "in vivo".

Durante los procesos de diferenciación celular se llevan a cabo una serie de fenómenos que involucran la activación de ciertos genes cuyos productos son determinantes para iniciar los procesos de diferenciación, entre los que se encuentra el establecimiento de vías metabólicas que serán claves para determinar el fenotipo de la célula, dándole características exclusivas que permitirán distinguir a un tipo celular de otro.

Se tienen evidencias de que las células granulares del cerebelo son glutamatérgicas y que poseen receptores a aminoácidos excitadores (Fonnum , 1984; Garthwaite y Balázs ,1981).

Estudios anteriores demostraron que la actividad de la GAF es determinante en la síntesis de glutamato que será utilizado como neurotransmisor (Bradford , et al., 1978 ; Hamberger et al.,1979; Patel et al., 1982) y que cambios en la actividad de

esta enzima se relacionan con la formación de ciertas vías en el SN (Patel et al., 1987). Estudios inmunocitoquímicos sugieren que existe una estrecha correlación entre la distribución de las neuronas que utilizan aminoácidos excitadores como neurotransmisor y la de la inmureactividad a la glutaminasa en distintas preparaciones del SNC (Altschuler et al., 1981; Wenthold et al., 1986).

Una serie de estudios demostraron que tanto la activación del receptor NMDA como la despolarización por K^+ promovían la sobrevivencia de cultivos de células granulares (Balázs 1988) y que estas mismas condiciones llevan a un incremento en la actividad de la GAF (Morán y Patel, 1988). En este trabajo se corroboraron los efectos inducidos por el NMDA y K^+ en cultivos primarios de células granulares de cerebelo sobre la actividad de la GAF y sobre la morfología de estas células. El NMDA 150 μ M y K^+ 40mM incrementaron la actividad de la GAF hasta casi tres veces, sin que estos tratamientos ocasionaran cambios significativos en la actividad de la LDH, una enzima relacionada con el metabolismo general, lo cual indica que el efecto observado es específico para la GAF. Como se puede observar en la tabla I los tratamientos con NMDA y K^+ no indujeron un cambio importante sobre la cantidad de proteína presente en los cultivos.

Por otro lado se sabe que el Ca^{++} juega un papel importante en muchas de las funciones celulares como el movimiento celular, mitosis, secreción, endocitosis, transmisión sináptica,

contracción e intermediario del metabolismo entre otras funciones.

Se sabe que los canales acoplados al receptor tipo NMDA son permeables a Ca^{++} , y que al ser activados ocasionan un incremento en los niveles de Ca^{++} intracelular (Mac Dermott et al., 1986). Estudios electrofisiológicos indican que existe una población de canales de Ca^{++} sensibles a voltaje (CCSV) en las células granulares que bajo condiciones despolarizantes como K^+ 40mM permiten una entrada masiva de Ca^{++} (Kingsbury y Balázs 1987). El Ca^{++} es capaz de inducir cambios metabólicos bioquímicos que podrán participar en los procesos de diferenciación de la célula, entre los que se encuentra la activación de ciertas enzimas involucradas en la síntesis del transmisor como la GAF. Recientemente se demostró que la diferenciación bioquímica de las células granulares, medida como la actividad de la GAF es dependiente de un incremento intracelular de Ca^{++} ocasionado por un aumento en la conductancia a este ión por activación del receptor NMDA (Morán y Patel, 1989.)

Como ya se mencionó anteriormente los receptores a aminoácidos excitadores se pueden caracterizar de acuerdo a distintas sensibilidades farmacológicas y respuestas producidas por cada uno, de tal forma se reconocen cinco tipos quisqualato (Q), kainato (K), AMPA, LAP4 y NMDA. Con excepción del de tipo Q que es metabotrópico, el resto presenta un canal iónico permeable a Na^+ y K^+ .

Con la finalidad de conocer si el fenómeno observado con NMDA en relación al incremento en la actividad de la GAF, era

exclusivamente mediado por este tipo de receptor, se decidió probar otros tipos de receptores a aminoácidos excitadores.

Los tratamientos con ácido quinolinico (250, 500uM y 1 mM) indujeron un incremento en la actividad de la GAF de casi tres veces. Dicho compuesto interactúa con receptores a aminoácidos excitadores preferencialmente con el del NMDA (Stone y Perkins, 1983), además se ha sugerido que este compuesto podría ser uno de los ligandos endógenos capaz de mediar la excitación de algunos tipos neuronales del SNC (Stone y Perkins, 1981).

Estudios de unión al receptor sináptico indican que en otras regiones del SN como en la corteza cerebral el quinolinato tiene mayor afinidad por el receptor NMDA que en el cerebelo (Monaghan y Beaton, 1991). Al interactuar el quinolinato con el receptor NMDA y se generaría una despolarización, capaz de inducir una entrada de Ca^{++} vía el canal del receptor NMDA o a través de activación de los canales de calcio sensible a voltaje CCSV.

Estudios anteriores han demostrado que el kainato a bajas concentraciones (25-50uM) es capaz de incrementar la sobrevivencia de las células granulares del cerebelo (Balázs, 1990). Recientemente, se ha demostrado que el efecto trófico de bajas concentraciones de kainato es totalmente dependiente de la entrada de Ca^{++} a través de los canales sensibles a dihidropiridinas (DHP) (Balázs et al., 1990). Estos canales podrían ser activados por una despolarización ocasionada por el kainato (Balázs et al., 1990).

Por medio de estudios de electrofisiología se sabe que dichos

canales se manifiestan a partir de los primeros días del cultivo (1-5 días) presentando una conductancia mayor (18.5 pS) que los que se manifiestan en cultivos maduros de células granulares de cerebelo (11.1 pS) (Morán et al., 1991). Otra serie de estudios muestran que el kainato a bajas concentraciones incrementa los niveles de Ca^{++} intracelular y se propone que dicha entrada sea a través de CCSV (Murphy y Miller, 1989) en forma similar al efecto despolarizante del K^{+} . Con concentraciones mayores a 100 μ M de kainato se incrementa la entrada de Ca^{++} de una manera dependiente de la concentración, elevando los niveles de Ca^{++} hasta un punto en que el Kainato tiene efectos neurotóxicos sobre las células granulares (Murphy y Miller, 1989).

El efecto observado con bajas concentraciones de kainato en relación al incremento en la actividad de la GAF y desarrollo morfológico favorable podría deberse a la activación de CCSV, con lo que la entrada de Ca^{++} sería una señal para la activación de ciertos mecanismos bioquímicos capaces de promover la diferenciación bioquímica y morfológica de las células granulares del cerebelo.

La activación de otros tipos de receptores no NMDA como el AMPA y LAP4 indujo un incremento en la actividad de la GAF de casi el doble. Estos receptores son de tipo ionotrópico y al ser activados se induce un incremento en la permeabilidad a los iones Na^{+} y K^{+} con lo que se genera un efecto despolarizante en la membrana, y que como ya se mencionó provoca una activación de CCSV y un consecuente incremento en los niveles de Ca^{++}

intracelular.

Por todo lo anterior se sugiere que el Ca^{++} a cierta concentración y a edades tempranas del desarrollo de las células granulares induce una diferenciación bioquímica y morfológica de estas células.

Como ya se mencionó anteriormente el canal acoplado al receptor NMDA es permeable a Na^+ , K^+ y Ca^{++} además de presentar un sitio modulador al que se une la glicina (Johnson y Ascher, 1987; Bertolino et al., 1988), dicho aminoácido potencia el daño celular inducido por NMDA en neuronas de corteza, tal efecto es antagonizado con HA-966 (Patel et al., 1990). Por otro lado estudios electrofisiológicos demostraron que las corrientes inducidas por el NMDA en ovocitos de rana inyectados con RNAm cerebelar no son potenciadas por Glicina, mientras que las registradas al utilizar RNAm cerebral si presentaban dicho comportamiento (Sekiguchi et al., 1990). En este trabajo se probó el efecto del HA-966 sobre la actividad de la GAF en cultivos de células granulares sin que se observaran diferencias significativas. Esto sugeriría variantes regionales en el SN para potenciar la respuesta con Glicina, lo cual puede suceder también con los antagonistas como el HA-966, por lo que se ha sugerido la ausencia del sitio de unión a Glicina en el receptor NMDA expresado en cerebelo (Sekiguchi et al., 1990). Por otro lado, también se sabe que el HA-966 es menos específico y selectivo que otros antagonistas a este sitio de Glicina como el 7-Cl-Kyn (Kloog et al., 1990), lo que podría ser una explicación

alternativa a la falta de efecto del HA-966.

La posibilidad de que el NMDA ejerza un efecto trófico en estas células se refuerza con los efectos observados sobre la morfología de las células tratadas con NMDA. Las observaciones de la morfología de los cultivos de las células granulares con NMDA (150 μ M) y K⁺ (40mM) muestran un desarrollo mayor de prolongaciones y un incremento notable en la sobrevivencia lo cual sugiere que el NMDA tiene un efecto trófico.

Por otro lado el NMDA incrementa específicamente la actividad de enzimas involucradas en la síntesis del transmisor de las células granulares, como la GAF (ver gráficas) y la aspartato amino transferasa (Morán y Rivera, en prensa). Dicho efecto podría estar mediado por la entrada de Ca⁺⁺ a través del canal acoplado al receptor del NMDA (Balázs 1990). Un efecto similar se observó bajo las condiciones despolarizantes inducidas por K⁺, tales resultados podrían deberse a la activación de CCSV con lo que la entrada de Ca⁺⁺ induce un efecto trófico que repercute en la morfología y la bioquímica de la células granulares. Lo anterior está apoyado por la acción de drogas que inhiben los CCSV como la nifedipina (Morán y Patel 1989). Estos resultados sugieren que la activación del receptor NMDA y la despolarización por K⁺ "in vitro" son un sustituto de las primeras inervaciones funcionales que reciben las células granulares "in vivo" provenientes de las fibras musgosas.

En este trabajo se probaron inhibidores de la síntesis protéica y del RNAm, tanto la cicloheximida (1 μ g/ml) como la

actinomicina (0.1ug/ml) bloquearon completamente el efecto observado con NMDA (150uM) sobre el incremento en la actividad de la GAF. La sola presencia de dichos inhibidores por 48 h no ocasionó diferencias significativas sobre la actividad de la GAF con respecto al control. Estos resultados indican que el incremento en la actividad de la GAF inducida por NMDA de requiere una síntesis protéica de novo y probablemente de la síntesis de RNAm para la glutaminasa de acuerdo a los resultados obtenidos con actinomicina (Gráfica 5).

Estos resultados se apoyan en observaciones en las que la estimulación temprana de los receptores NMDA induce la expresión de algunos genes involucrados con los procesos de transcripción, dichos genes son capaces de expresarse a tiempos cortos y largos posteriores a la estimulación (Szekely, et al., 1990). La inducción de estos factores de transcripción, debida a la activación del receptor NMDA puede ser un mecanismo clave para iniciar la expresión de otros genes relacionados con distintas funciones neuronales.

Efectos de la estimulación del receptor NMDA sobre la actividad de la GAF "in vivo".

Una parte importante de los objetivos de este trabajo fue conocer los cambios en la actividad de la GAF en presencia de agonistas y antagonistas del receptor NMDA a lo largo del desarrollo del cerebelo "in vivo", para lo cual se utilizaron antagonistas competitivos como el APV y el CPP, y no competitivos

como el MK-801. Se sabe que la activación de receptor NMDA puede tener efectos farmacológicos importantes en diversos modelos animales entre los que se incluyen memoria, aprendizaje (Parada-Turska y Tursky, 1990), epilepsia y muerte neuronal (Lehman, 1989).

Existen evidencias que muestran que los antagonistas no competitivos del receptor NMDA, como el MK-801, aplicados sistémicamente son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Tricklebank et al., 1989 ; Mondadori, 1989). Se sabe que el MK-801 tiene gran afinidad por su sitio de unión en el receptor NMDA y que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que se ha tratado de utilizar como fármaco en algunas patologías del SN en las que está involucrado el receptor NMDA (Peterson et al., 1983 ; Lehman 1989).

También se ha demostrado que los antagonistas competitivos tienen mayores efectos en preparaciones "in vitro" que "in vivo", se ha sugerido que esto se debe a que estos fármacos presentan algunos problemas para atravesar la barrera hematoencefálica (Croucher et al., 1982; Czuczwar y Meldrum, 1982). Además se sabe que el CPP tiene efectos más potentes que el APV en muchos modelos animales (Tricklebank et al., 1989). En estudios de aprendizaje se ha demostrado que ratas adultas tratadas con CPP (0.3 a 10 mg / kg), administrado intraperitonealmente, presentan una disminución significativa sobre una conducta aprendida (Tan et al., 1989).

Los tratamientos fueron aplicados 3 días previos a cumplir la edad requerida para los experimentos, por otro lado se sabe que

a partir del día 5 postnatal las células granulares establecen los primeros contactos sinápticos con las fibras musgosas (Arsenio, Nuñez y Sotelo, 1985), aunque esta sinápsis comienza a ser funcional entre el día 10-12 postnatal.

En este trabajo en los animales tratados con MK-801 (0.1 mg/Kg) se observó un decremento en la actividad de la GAF del cerebelo a los 11,12,14 y 15 días postnatales hasta en un 40% con respecto al control. Este efecto puede explicarse por un bloqueo en la transmisión sináptica que comienza a establecerse entre las fibras musgosas y las células granulares, evitando así que el glutamato liberado pueda interactuar con el receptor tipo NMDA e inducir una señal de diferenciación, medida en este caso como un incremento en la actividad de la GAF.

De manera similar se observó un decremento en la actividad de la GAF a los 11 y 12 días postnatales con CPP (2.2 mg/kg), hasta de un 40% con respecto al control. El bloqueo del receptor NMDA en presencia de este antagonista sugiere que la activación de este receptor a edades tempranas del desarrollo de las células granulares es un evento necesario para que se lleven a cabo algunos de los procesos de diferenciación bioquímica en los que se incluyen la activación de ciertas enzimas, como ya se ha mencionado. El hecho de que a los 14 días no se observen diferencias significativas con el tratamiento de CPP (2.2 mg/kg), lo cual si ocurre con MK-801, se puede deber a un cambio en la afinidad por el CPP en el sitio de unión al receptor NMDA,

o bien al desarrollo de la barrera hematoencefálica, que dificultarían el paso de compuestos, incluyendo al CPP.

Por otro lado, a los 9 días postnatales tanto el MK-801 como el CPP no ocasionaron cambios en la actividad de la GAF, esto puede deberse a que durante este tiempo apenas se ha iniciado el establecimiento de la sinapsis y comienzan a establecerse los mecanismos de activación del receptor NMDA.

A pesar de que se sabe que algunos compuestos tienen dificultad de atravesar la barrera hematoencefálica, como el APV y el propio NMDA, existen algunos modelos animales en los que estas drogas tienen ciertos efectos (Lincoln et al., 1988 ; Parada-Turska y Turski, 1990), por lo que se decidió probar ambos fármacos con objeto de conocer si podían tener influencia sobre la actividad de la GAF "in vivo". Sin embargo el tratamiento de APV (60 mg/kg) no ocasionó diferencias significativas con respecto al control. Estos resultados se pueden deber a que el APV presente problemas para atravesar la barrera hematoencefálica.

En cuanto al NMDA, se observó sólo a los 12 días un incremento en la actividad de la GAF hasta de un 50% con respecto al control, lo que se puede explicar por el hecho de que a la edad a la que comenzó el tratamiento todavía se puede lograr una estimulación adicional o externa a la que comienza a establecerse entre las fibras musgosas y las células granulares. A edades mayores en las que probablemente los sitios de unión al agonista

en el receptor NMDA estén ocupados por el ligando endógeno, o la respuesta trófica está saturada, el NMDA exógeno no tiene efecto.

El análisis de la actividad de la LDH no mostró diferencias importantes entre los tratamientos con las distintas drogas utilizadas en los experimentos "in vivo", por lo que los efectos observados son específicos para la GAF, lo que refleja una acción más dirigida a la maquinaria involucrada con la síntesis del transmisor.

Todos estos resultados sugieren que tanto "in vivo" como "in vitro" la activación del receptor NMDA a edades tempranas del desarrollo de las células granulares es capaz de inducir la maduración bioquímica de estas células. Además parece ser que hay una participación importante del Ca^{++} en estos fenómenos, y que esta entrada está relacionada tanto con la activación del canal acoplado al receptor NMDA como con la de los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje (CCSV) en el caso del K^+ y los agonistas no NMDA. Esto coloca al Ca^{++} en un sitio importante en los mecanismos involucrados en estos fenómenos, por lo cual se sugiere analizar su participación en los fenómenos de diferenciación durante el desarrollo del cerebelo.

Se tienen suficientes evidencias de que el incremento en la concentración intracelular de Ca^{++} debida a la activación de canales de CCSV o del receptor NMDA puede ocasionar daño celular en diferentes preparaciones del SN (Mayer y Westbrook, 1987; Choi 1987; Balázs, 1988). Por otro lado, el efecto de la entrada de Ca^{++} debida a despolarización por K^+ y de la activación del

receptor NMDA a edades tempranas del desarrollo promueve la sobrevivencia de las células granulares, por lo que se sugiere que el Ca^{++} juega un papel dual dependiente de la edad, es decir como factor trófico durante el desarrollo, y como neurotóxico en el estado maduro. (Balázs et al., 1987, 1988). Existen observaciones que apoyan esta idea tanto en preparaciones en cultivo (Balázs et al., 1987 ; Morán 1988) como en rebanadas de cerebelo e "in vivo" (Garthwaite, et al., 1986). Lo anterior sugiere que el efecto trófico del Ca^{++} es un evento temporal en la vida de las células granulares y que se presenta justo cuando estas células han migrado hasta la capa granular y comienzan a ser inervadas por las fibras musgosas. Posteriormente, cuando las células están en proceso de diferenciación, puede manifestarse el efecto tóxico (Garthwaite 1986, 1987; Balázs et al., 1987).

Se ha propuesto que el incremento en la sobrevivencia de las células granulares debido a la entrada de Ca^{++} a través de CCSV o vía la activación del receptor NMDA involucra al sistema Ca^{++} calmodulina, y parece ser que la proteína-cinasa II es la responsable de estos efectos (Gallo et al., 1987).

Es posible que el efecto trófico observado por activación del receptor NMDA no sea único para las células granulares del cerebelo, sino que también se pueda presentar en otros tipos celulares del SN, y que estos eventos dependan del estadio de desarrollo (Rothman y Olney, 1986; Garthwaite, 1986).

REFERENCIAS

[A]Altman, J. (1972): Postnatal development of cerebellar cortex in the rat. I The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J.Comp.Neurol.*, 145: 353-398.

[B]Altman, J., (1972): Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J.Comp.Neurol.* 145: 399-464.

[C]Altman, J., (1972): Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III Maturation of the components of the granular layer. *J.Comp.Neurol.* 145:465-514.

Altman, J., (1975): Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. IV Spatial organization of bipolar cells, parallel fibers and glial palisades, *J.Comp.Neurol.* 163:427-448.

Altschuler, R.A., Neises, G.R., Harmison, G.G., Wenthold, R.J., and Fex, J. (1981). Immunocytochemical localization of aspartate amino transferase immunoreactivity in cochlear nucleus of guinea pig. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78:6553-6557.

Aroux M y Haegel P, *Embriologia cuadernos prácticos (cuaderno tres)*, Ed. Toray-Masson, Barcelona, 1970.

Arsenio-Nuñez y Sotelo C, (1985). Development in the spinocerebral system in the postnatal rat. *J. Comp Neurol.* 237: 291-306.

Ascher, P., and Nowak, L. (1988) Quisqualate and Kainate activated channels in mouse central neurons in culture. J. Physiol. 399, 227, 245.

Balázs R., (1988) Metabolic imbalance and nerve cell damage in the brain, *Proy. Brain Res.*, 73: 447-463.

Bálazs R., Gallo, V., and Kinsbury, A., Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture, *Dev. Brain Res.*, 40 (1988) 269-276.

Bálazs R., Hack N., and Jorgensen O.S., Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of cerebellar granule cells in culture: effect of Kainic acid, *Neurosci. Vol. 37, No. 1, (1990) 251-258.*

Balinsky, *Introducción a la embriología*, Ed. Omega Barcelona, 1978.

Bennett and White (1981) The survival and development of cholinergic neurons in potassium-enriched media. *Brain Res.* 173:549-553.

Bergmeyer H.U., Bernt E., Hess B. (1968) In methods of enzymatic Analysis. (H-U. Bergmeyer ed.) pp 736-741, Academic Press, New York.

Bertolino M., Vicini S., Mazzetta J. and Costa E. (1988) Phencyclidine and glycine modulate NMDA-activated high conductance cationic channels by acting different sites. *Neurosci. Lett* 84, 351-355.

Bisti S., Iosif G., Marchesi G.F. and Strata P. (1971): Pharmacological properties of inhibitions in the cerebellar cortex. *Exp. Brain Res.*, 14: 24-37.

Burgoyne R. y Cambray-Deakin M, The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell, *Brain Res. Reviews* 13 (1988) 77-101.

Burgoyne R.D., Pearce I.A. and Cambray-Deakin M. (1988) N-Methyl-D-aspartate raises cytosolic calcium concentration in rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosci. Lett.* 91, 47-52.

Bradford H.F., Ward H.K. and Thomas A.J., Glutamine as major substrate for nerve-endings, *J.Neurochem.*, 30 (1978) 1453-1459.

Clarke P.G.H., 1981, Chance, repetition and error in the development of normal nervous systems. *Perspect. Biol. Med.* 25:2-19.

Cline T. and Constantine-Paton. NMDA receptor agonist and antagonist alter retinal ganglion cell arbors structure in the developing frog retinotectal projection. *Jour Neurosc* 10(4): 1197-1216.

Crepel, F. (1974) Excitatory and inhibitory processes acting upon cerebellar Purkinje cells during maturation in the rat: Influence of hypothyroidism. *Exp. Brain Res.*, 20:403-420.

Crepel, F. (1975) Consequences of hypothyroidism during infancy of the function of cerebellar neurons in the adult rat. Brain Res., 85:157-160.

Croucher, M.J., Collins J.F., and Meldrum B.S., 1982, Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonist. Science 216, 899.

Cull-Candy, S.G., and Usowicz, M.M. (1987) Multiple conductance channels activated by excitatory amino acids in cerebellar neurons. Nature 325, 525-528.

Cull-Candy, S.G., Howe, J.R., and Ogden, D.C. (1988) Noise and single Channels activated by excitatory amino acids in cerebellar granule neurons. J. Physiol. 400, 189-222.

Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M.A., and Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture J. Neurosci. /, 357-368.

Choi, D.W., (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. J Neurosci. 7, 369-379.

Czuczwar, S.J. and Meldrum B., 1982, Protection against chemically induced seizures by 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid, European J.Pharmacol. 83, 335.

Do, K.Q., Herrling P.L., Streit, P., Turski, W.A., and Cuenod, M. (1986) In vitro release and electrophysiological effects in situ of homocysteic acid and endogenous N-methyl-D-aspartic acid agonist in the mammalian striatum. *J. Neurosci.* 6, 2226-2231.

Eccles J., (1973). *J. Physiol.* 229: 1-32.

Foster A.C. , Collins J.F. and Schwarcz, 1983 : On the excitotoxic properties of quinolinic acid 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds, *Neuropharmacology* 22, 1331.

Fonnum, F., 1984, Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42 (1984) 1-11.

Fujita S., (1967) Quantitative analysis of cell proliferation and differentiation in the cortex of the postnatal mouse cerebellum. *J. Cell Biol.* 32, 277-287.

Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, R. and Jorgensen, O.S., (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.*, 7: 2203-2214.

Garthwaite, J. and Balázs, R., Separation of cell types from the cerebellum and their properties, *Adv. Cell. Neurobiol.*, 2 (1981) 461-489.

Garthwaite , G. and Gartwaite, J. (1986) Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices: dependence on calcium concentration. *Neurosci. Lett.*, 66: 193-198.

Garthwaite, G., Yamini, B. Jr. and Garthwaite J. (1987) Selective loss of Purkinje and Granule cells responsiveness to N methyl- D - Aspartate in rat cerebellum during development. *Dev. Brain Res.*, 36: 288-292.

Garthwaite, J., Garthwaite, G., and Hajos, F., Amino acid neurotoxicity: relationship to neuronal depolarization in rat cerebellar slices, *Neuroscience*, 18 (1986) 449-460

Gospodarowicz, D. (1988) Molecular and developmental biology aspects of fibroblast growth factor. In *biology of growth factors*, V. 234, J. E. Kudlow, D. H. Mac Lennan, A. Berstein and A. I. Gotlieb, eds. (New York: Plenum Publishing Corp.) pp 23-39.

Hamberger, A., Chiang G.H., Nysten E.S., Schiff S.W. and Cotman C.W., (1979). Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain res.* 168:513-530.

Hankin M.H., Scheider, B.F., Silver J. 1988. Death of the subcallosal glial sling is correlated with formation of the cavum septi pellucidi. *J.Comp. Neurol.* 272: 191-202.

Hansen, G. H. Meier, E, and Schousboe, A., GABA influences the ultrastructure composition of cerebellar granule cells during development in culture, In. J. Dev. Neurosc., 2 (1984) 247-257.

Hatten, M. E. Lynch, M., Rydel, R. E., Sanchez, J., Joseph-Silverstein, J., Moscatelli, D., and Rifkin, D.B. (1988) In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor. Dev. Biol. 125, 280-289.

Hertz L. and Schousboe A., (1987). Primary cultures of GABAergic and glutamatergic neurons as model systems to study neurotransmitter functions. I. Differentiated cells. En Model Systems of developmental and aging of the nervous system (A. Vernadakis, ed.) Martinus Nijhoff Publishig. pp 19-31.

Hillman, D. E., and Chen S. 1981: Vulnerability of cellular development in malnutrition. I Quantitation of layer volume and neuron numbers. Neuroscience, 6: 1249-1262.

Huck, S. Serum-free medium for cultures of the posnatal mouse cerebellum: only insulin is essential, Brain Res. Bull., 10 (1983) 667-674.

Hudson D.B., Balcana T., Bean G., and Tiriras P.A. (1976). Glutamic acid: a strong candidate as the transmitter of the cerebellar granule cells. Neurochem Res 1: 73-81.

Ito, M., The cerebellum and neural control, Raven Press N.Y. 1984.

Jahr, C.E., and Stevens, C.F. (1987) Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. Nature 325, 522-525.

Johnson J.W. and Asher P. (1987) Glycine potentiates the NMDA responses in cultured mouse brain neurons. Nature 325, 529-531.

Kallen B., 1965. Degeneration and regeneration in the vertebrate central nervous system during embryogenesis. Prog. Brain Res. 14: 77-96.

Kasa, P., y Silver A. (1969). J. Neurochem. 16: 389-396.

Kushner L., Lerma J., Zukin R.S., and Bennet M.V.L. (1988). Coexpression of N-methyl-D-aspartate and phencyclidine receptors in *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3250-3254.

Kvamme and Olsen, 1980 Brain Res. 181: 228-233.

Kingsbury A. and Balázs R., Effect of calcium agonist and antagonist on cerebellar granule cells, Eur. J. Pharmacol., 140 (1987) 275-283.

Kloog Y., Lamdani-Itkin H. and Sokolovsky M. (1990) the glycine site of N-Methyl-D-Aspartate receptor channel: differences between the binding of HA-966 and of 7-Chloro-Kynurenic acid. *J. Neurochem.* Vol 54 No. 5 1576-1583.

Lasher R.S. and Zagon I.S. (1972) The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *Brain Res.* 41: 482-488.

Lamb A.H., Sheard P.W., Ferns M.J. 1988. Meritocratic selection hypothesis in the control of motoneuron death during development. In *developmental Neurobiology of the frog*, ed. M. Pollock, pp 53-76. New York: Liss.

Langman J, *Embriología médica*, Ed interamericana, México, 1964.

Le Douarin N.M., Renaud D., Teillet M.A. and Le Douarin G.H. 1975. Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblast in interspecific chimeras after heterotopic transplantations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 728-732.

Lehmann, J., *The NMDA receptor*, *Drugs Fut.*, 14 (1989) 1059-1071.

Levi G., Gordon R.D., Gallo V., Wilkin G.P. and Balzs R. (1982): Putative acidic amino acid transmitters in the cerebellum. I Depolarization-induced released. *Brain Res.*, 239: 425-445.

Lincoln J., Coopersmith R., Harris E., Cotman C., Leon M., (1988) NMDA receptor activation and early olfactory learning. Dev. Brain Res., 39: 309-312.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Mac Dermott, A.B., and Dale, N. (1987). Receptors, ion Channels and synaptic potentials underlying the integrative action of excitatory amino acids. Trends Neurosci. 10, 280-284.

Mac Dermott A.B., Mayer M.L., Westbrook G.L., Sith S.J. and Baker J.L., NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons, Nature (Lond.), 321 (1986) 519-522.

Mayer M.L., Westbrook G.L. and Guthrie P.B. (1984). Voltage-dependent block by Mg⁺⁺ of NMDA responses in spinal cord neurons. Nature 309: 261-263.

Mayer M.L., and Westbrook, G.L. (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. Prog. Neurobiol., 28:197-276.

Mondadori C., Weiskrantz L., Buerki H., Petschke F., and Fagg G.E., (1989) NMDA receptor antagonists can enhance or impair learning performance in animals. Exp. Brain Res. 75: 449-456.

Moran J., and Rivera M. Effect of potassium and NMDA on the aspartate aminotransferase activity in cultured cerebellar granule cells. *Juornal Neurosc Res.* En prensa.

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

Moran O., Ein F., Zegarra-Moran O. and Sciancalepore M., Voltage dependente calcium channels in cerebellar granule cell primary cultures. *Eur. Biophys. J.* (1991) 20: 157-164.

Murphy S.N. and Miller R.J: (1989) Regulation of Ca⁺⁺ influx into striatal neurons by Kainic acid. *J. Pharmac.exp. Ther.* 249, 183-193.

Oppenheim R.W., 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14 : 453-501.

Palaiologos G., Hertz L., Schousboe A., (1989) Role of aspartate aminotransferase and mitochondrial dicarboxylate transport for release of endogenously and exogenously supplied neurotransmitter in glutamatergic neurons. *Neurochem Res.* 14 (4): 359-366.

Parada-Turska, J., Tursky, W.A., (1990) Excitatory amino acid antagonists and memory: effect of drugs acting at N-methyl-D-aspartate receptors in learning and memory tasks. Neuropharmac. Vol 29 No.12, pp 1111-1116.

Patel A.J., Hunt A. and Hayashi M. (1987). Effect of thyroid deficiency on the regional development of glutaminase, a glutamatergic neuron marker, in the rat brain. Int. J. Dev. Neurosci. 5:295-303.

Patel, J., Zinkand, C.W., Thompson, C., Keith, R., and Salama A., (1990) Role of glycine in the N-Methyl-D-Aspartate mediated neuronal cytotoxicity, Journal of Neurochem. Vol. 54 No.3 849-854.

Patel A.J., Hunt A., Gordon R.D. and Balázs R., The activities indifferent neural cell types of certain enzymes associated with metabolic compartmentation of glutamate, Dev. Brain Res. 4 (1982) 3-11.

Pearce, I. A. ,Cambray-Deakin, M. A. and Burgoyne, R.D., Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells, FEBS Lett., 223 (1987) 143-147.

Perkins M.N. and Stone T.W. 1983, Quinolinic acid regional variations in neuronal sensitivity, Brain Res. 259,172.

Peters, S., Koh, J., and Choi, D.W. (1987). Zinc selectively blocks the actions of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. Science 236, 589-593.

Peterson D.W., Collins J.F., Bradford H.F.(1983). The kindled amygdala model in epilepsy: anticonvulsant action of amino acid antagonist. Brain Res.275: 169-172.

Plaitakis A., Berl S., and Yahr M.D. (1982) Abnormal glutamate metabolism in adult-onset degenerative neurological disorder. Science 216, 193-196.

Rakic P., (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in Macacus rhesus. J Comp Neurol. 14: 283-312.

Rakic P. and Sidman R.L. (1973). Sequence of developmental abnormalities leading to granule cells deficit in cerebellar cortex of weaver mutant mice. J Comp Neurol. 152: 103-132.

Rothman, S. M. (1985). The neurotoxicity of excitatory amino acid is produced by passive chloride influx. J.Neurosc. 5 1483-1489.

Rothman, S. M. and Olney, J.W. (1986) Glutamate and the pathophysiology of the hypoxic-ischemic brain damage. *Ann. Neurol.*, 19: 105-111.

Sandoval, M.E., and Cotman C.W. (1978): Evaluation of glutamate as a neurotransmitter of cerebellar parallel fibers. *Neuroscience*, 3: 199-206.

Sarafian, T. and Verity, M. A., Influences of thyroid hormones on rat cerebellar cell aggregation and survival in culture, *Dev. Brain Res.*, 26 (1986) 261-270.

Sekiguchi M., Okatamoto K. and Sakai Y., 1991. Glycine-insensitive NMDA-sensitive receptor expressed in *Xenopus* oocytes by guinea pig cerebellar mRNA. *J. Neurosci.* 10, 2148.

Somogyi P., Halasy K., Somogyi J., Strom-Mathisen J. and Ottersen O.P. (1986): Quantification of immunogold labelling reveals enrichment of glutamate in mossy and parallel fibre terminals in cat cerebellum. *Neuroscience* 19:1045-1050.

Scott, B. S., (1971) Effect of potassium on neuron survival in cultures dissociated human nervous tissue. *Exp. Neurol.* 30:297-308.

Scott, B. S., (1977) The effect of elevated potassium on the time course of neuron cell survival in cultures of dissociated dorsal root ganglia. *J. Cell Physiol.* 91: 305-316.

Schousboe, A. (1981) Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int. Rev. Neurobiol.* 22, 1-45.

Sugiyama, H., Ito, I., and Hirono, C. (1987). A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325, 531-533.

Szekely A.M., Costa E., and Grayson R.D., (1990). Transcriptional program coordination by N-Methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptor stimulation in primary cultures of cerebellar neurons. *Molecular Pharmacology*, 38:624-633.

Tan S., Kirk R.C., Abraham W.C., and Mc. Naughton. (1989) Effects of NMDA antagonists CPP and MK-801 on delayed conditional discrimination. *Psychopharmacology*. 98:556-560.

Tricklebank M., Singh L., Oles R., Preston C., Iversen S. (1989) The behavioural effects of MK-801: a comparison with antagonists acting non-competitively and competitively at the NMDA receptor. *Eur. Journal. Pharmacol.* 167: 127-135.

Wenthold R.J., Skaggs K.K. and Altschuler R.A. 1986 Immunocytochemical localization of aspartate amino transferase and glutaminase immunoreactivities in the cerebellum. *Brain Res.* 365: 371-375.

Young A.B., Oster-Granite M.L., Herndon R.M. and Snyder Sit (1975). Glutamic acid: selective depletion by viral induced granule cell loss in hamster cerebellum. *Brain Res* 73: 1-13.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Zieglgansberg W. and Puil E.A. 1973. Actions of glutamic acid and other amino acids on maze learnig in the white rat. Neurol. Psychiat. 51,446-451.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Julio Morán, por el empeño e interés que demostró durante la realización de este trabajo.

A Claudia Rodríguez, por haberme auxiliado enormemente con los cultivos de las células granulares.

A mis sinodales por haber revisado esta tesis; gracias por todas las sugerencias:

Mónica Romo de Vivar, Marco Antonio Sánchez, Jaime Martínez, Claudia Rodríguez y Julio Morán.

A la DGAPA, por haberme otorgado una beca durante la realización de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias, por darme la oportunidad de conocer la Biología.