

180
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DE LA ACTIVACION DE LOS RECEPTORES
A NMDA Y EL POTASIO EN LA ACTIVIDAD DE LA
ASPARTATO - AMINOTRANSFERASA EN CELULAS
GRANULARES DE CEREBELO DE RATA EN CULTIVO:
UN MODELO DE DESARROLLO**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARITZA RIVERA GAXIOLA

MEXICO, D. F.

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	4
Embriología del Sistema Nervioso Central en Mamíferos	5
A) Aspectos Básicos	5
B) Embriología del Cerebelo	10
Aminoácidos Excitadores y sus Receptores	19
Caracterización de los Receptores	22
A) Receptores No-NMDA	22
B) Receptores NMDA	25
Metabolismo de Aminoácidos Excitadores	29
Factores Tróficos y Neurotoxicidad	32
OBJETIVO	38
MATERIALES Y METODOS	39
RESULTADOS	43
DISCUSION	60
CONCLUSIONES	70
LITERATURA CONSULTADA	72

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AAT	Aspartato-aminotransferasa
Act. D	Actinomicina D
Asp (L-Asp)	Acido Aspártico
ACBD	Acido trans-1-aminociclobutano-1,3-dicarboxílico
ATPA	Acido α -amino-3-hidroxi-5-tert-butyl-isoxazolepropiónico
AMPA	Acido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolepropiónico
ACPD	Acido 1-amino-ciclopentano-1,3-dicarboxílico
AP3 (L-AP3)	Acido 2-amino-3-fosfonopropiónico
APV	Acido Fosfonoaléxico (Acido Fosfonopentanoico)
BA	Basket Cells (Células en Canasta)
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
Ca ⁺⁺	Calcio (Cati3n divalente)
CF	Climbing Fibers (Fibras Trepadoras)
Cl ⁻	Cloro (an3n monovalente)
CPG	Acido (E)-2-amino-4-propil-1-fosf3nico
CSA (L-CSA)	Acido ciste3nsulfínico
CA (L-CA)	Acido Cisteico
C-hex	Cicloheximida
Cyt	Citoplasma
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
DIV	D3as in vitro
DAG	Diacylglicerol
DHCSA	Acido D-homociste3n sulfínico
τ DGG	τ -D-glutamilglicina
5,7 DCK	Acido dicloroquinur3nico
EC50	Concentraci3n Efectiva al 50%
FUM	Fumarato

Glu (L-Glu)	Acido glutámico
GAMS	Acido γ -D-glutamylaminometil sulfónico
Gly	Glicina
GABA	Acido γ -aminobutírico
GO	Golgi (Células de..)
GLDH	Glutamato deshidrogenasa
GR	Granulares (Células)
GS	Glutamino sintetasa
GAP=GAF=PAG	Glutaminasa activada por fosfato
Gln	Glutamina
HQA	Acido Homoquinolinico
HA-966	1-hidroxi-3-amino-pyrrolidin-2-one
HK	High Potassium (Alto potasio)
IP3	Trifosfato de inositol
Ileu	Isoleucina
KA	Kainic Acid (Acido kainico)
K+	Potasio (catión monovalente)
KCl	Cloruro de Potasio
Kyn	Acido quinurénico
α KG	α -ceto glutarato
LDH	Lactato deshidrogenasa
Mal	Malato
MF	Mossy Fibers (Fibras musgosas)
mM	milimolar
μ M	micromolar
Mg++	Magnesio (catión divalente)
MDH	Malato deshidrogenasa
Mem	Membrana
MK-801	(5)-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imino maleato
Na+	Sodio (catión monovalente)
NADH	Dinucleótido de nicotín amida reducido
NMDA	Acido N-metil-D-aspartico
NBQX	6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxalina-2,3-diona
NGF	Nerve Growth Factor (Factor de Crecimiento Neural)
NH4+	Ión amonio

OAA	Acido oxalacético
pCBPzDA	Acido 1-(p-clorobenzoil)piperazin-2,3-dicarboxílico
PN	Pons (Puente)
PF	Parallel Fibers (Fibras paralelas)
pkC	Protein-kinasa C
Pyr	Piruvato
PBS	Phosphate Buffered Salina (Sol. Salina amortiguadora de fosfatos)
Q-QA	Acido Quiscuálico
Ser	Serina
ST	Estrelladas (Células)
SucCoA	Succinil Coenzima A
SN (SNC)	Sistema Nervioso (Sistema Nervioso Central)
Val	Valina
VSCC	Voltage Sensitive Calcium Channel (Canales de Calcio Sensibles a Voltaje)

INTRODUCCION

Desde hace mucho tiempo, el hombre se ha interesado de manera especial por el funcionamiento ordenado y eficiente de los organismos multicelulares, que requieren que sus diversas partes actúen concertadamente; esto es, se ha interesado por un sistema capaz de vigilar, recibir, seleccionar, integrar, almacenar y devolver información que, en última instancia, le permite la supervivencia al organismo: El Sistema Nervioso.

A pesar de que el estudio del pensamiento, la memoria y el sueño p. ej., son de los temas que más han intrigado al hombre, existen otras funciones involucradas con el sistema nervioso, que resultan de gran importancia. La Neurobiología del Desarrollo es uno de dichos aspectos, y es de especial interés porque entre otras cosas, sirve de base para el entendimiento de muchas de las funciones superiores del cerebro.

Con esta primera parte del trabajo, se pretende dar un esbozo general de la embriología, la bioquímica y la histología del Sistema Nervioso Central (SNC), con un enfoque al cerebelo de la rata, por ser el modelo experimental del presente estudio.

EMBRIOLOGIA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN MAMIFEROS

A) Aspectos Básicos

Una vez que se ha llevado a cabo la formación del cigoto y éste pasa por una serie de divisiones mitóticas sucesivas para dar lugar a los distintos estadios embrionarios conocidos como mórula, blástula, gástrula y formación del celoma (por enterocelia en el caso de mamíferos), para llegar así a la fase de neurula, se puede decir que ha comenzado el desarrollo del Sistema Nervioso (SN) (Figs. 1 y 2).

Previo al estadio de neurula, cuando se lleva a cabo la formación del celoma, se empiezan a distinguir las 3 capas blastodérmicas que darán lugar a los distintos tejidos que conformarán al individuo: ectodermo, mesodermo y endodermo. En el caso específico del SN, es el ectodermo el que da lugar al tubo neural, específicamente, la parte conocida como neuroectodermo (Fig. 2). La notocorda (o corda) es la estructura que induce la competencia de tejidos para formar el tubo neural. Esta estructura se origina a partir de mesodermo cordal y queda en posición ventral al tubo neural en estado embrionario. La notocorda secreta sustancias, como el factor mesodermizante (Cowan, 1979) que se detectan por porciones determinadas del neuroectodermo, dando lugar a una serie sucesiva de fenómenos que conducen a la diferenciación

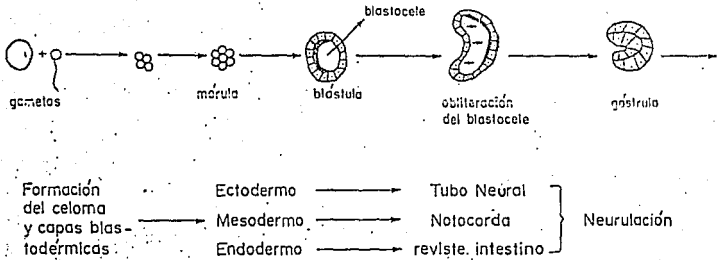


Fig. 1: Representación esquemática del desarrollo de un embrión enterocelomado desde la unión de los gametos hasta la neurulación.

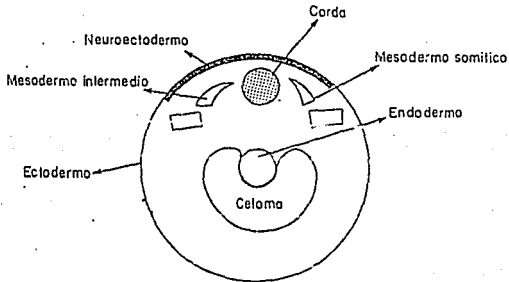


Fig. 2: Corte transversal de embrión de enterocelomado poco antes de la neurulación. La proción de ectodermo que dará lugar propiamente al tejido se señala como neuroectodermo.

de dicho tejido. Inicialmente se forma una estructura conocida como placa neural, compuesta a su vez por una parte alar y una parte basal. La parte basal da origen al tubo neural propiamente y la parte alar a la cresta neural y posteriormente a las estructuras sensoriales. Previo a la formación del tubo, la placa neural forma un surco que finalmente se cierra a nivel de la cuarta vértebra cervical (Fig. 3). La porción más anterior de la corda (precorda) induce la formación del encéfalo, mientras que la porción caudal la formación de médula espinal (Fig. 3). Ambas estructuras en el estado adulto forman lo que se conoce como Sistema Nervioso Central (SNC)(Fig. 3). La porción encefálica tiene 3 engrosamientos (vesículas) iniciales, que más tarde dan lugar las distintas estructuras del SNC adulto (Cuadro I).

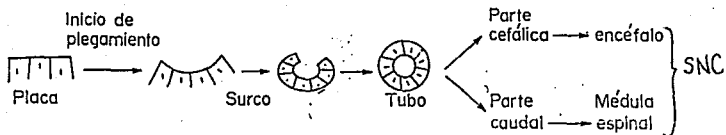


Fig. 3: Proceso de neurulación, desde la formación de la placa neural, hasta la formación del tubo. Se señalan tanto las estructuras a que dará origen cada parte del tubo neural, como las estructuras consideradas dentro del Sistema Nervioso Central.

CUADRO I

Vesículas cerebrales primarias	Vesículas cerebrales secundarias	Encéfalo desarrollado
Prosencéfalo	Telencéfalo	Hemisferios cerebrales (sistema olfatorio, cuerpo estriado, palio y sustancia blanca cerebral).
	Diencefalo	Epi, hipo, subtálamo y tálamo.
Mesencéfalo	Mesencéfalo	Cerebro medio.
Rombencéfalo	Mielencéfalo	Corteza de cerebelo y bulbo raquídeo.
	Metencéfalo	Protuberancia, puente y cerebelo.

B) Embriología del Cerebelo

El cerebelo es una estructura muy importante desde un punto de vista estructural y funcional. Su estructura presenta vías de entrada, circuitos neuronales internos y vías de salida, que corresponden a la de un órgano de coordinación de impulsos motores que emanan del cerebro. Debido al abundante aporte de información proveniente de receptores sensoriales, puede elaborar los impulsos nerviosos motores que permiten fundamentalmente un movimiento preciso, ordenado y armónico. Por otro lado, desde el punto de vista filogenético, el cerebelo es una estructura que se encuentra en todos los vertebrados, incluyendo a los mixinoideos (Larsell, 1967).

Actualmente existe mucha información acerca de las interacciones entre las células que integran al SN. Esto ha permitido entender en gran medida los mecanismos involucrados en el desarrollo del sistema nervioso. En especial, el cerebelo ha sido estudiado por muchos neurobiólogos, dadas las características estructurales de éste, como su localización en el Sistema Nervioso Central, su arquitectura laminar y un número reducido de tipos celulares. Esto ha permitido profundizar en las transformaciones morfológicas y los procesos que ocurren durante el desarrollo, y por eso es que se considera un sistema ideal para el estudio

posterior de los mecanismos básicos involucrados en el desarrollo neuronal (Burgoyne y Cambray, 1988).

En general, durante la neurogénesis de los vertebrados se pueden distinguir 6 fases, a saber:

- a) Proliferación
- b) Migración
- c) Diferenciación
- d) Muerte Celular
- e) Eliminación de Procesos
- f) Formación de Sinapsis

Estas fases representan una serie de eventos que se llevan a cabo en todas las regiones del SNC en todos los vertebrados, de ahí que la rata resulte un buen modelo experimental, además de ser de fácil manejo y obtención. Cabe mencionar que estos eventos se dan para cada célula y por lo tanto, en una región como el cerebelo, la población total de un tipo celular puede estar pasando por más de uno de dichos eventos.

El cerebelo surge como un engrosamiento bilateral de la placa alar de la porción metencefálica del tubo neural. Las 2 placas cerebelares se fusionan gradualmente a lo largo de la línea media dorsal de acuerdo con un gradiente rostro-caudal. Las células corticales cerebelares se originan de dos zonas germinales

separadas: las células de Purkinje, Golgi y algunas de la glía emergen de la matriz celular ventricular de las placas cerebelares. Las células granulares, en canasta y estrelladas, así como otras de la glía se derivan de la Capa Germinal Externa (EGL), cercana a la superficie externa de las placas cerebelares y que en la rata perdura hasta el día 21 postnatal (Fig. 4a). De estas dos zonas, las células migran en direcciones contrarias y forman las unidades estructurales del cerebelo maduro (Ito, 1984).

En el cerebelo de la rata, los procesos de proliferación y migración ocurren alrededor de las primeras 3 semanas de vida postnatal. Tanto los eventos involucrados, como la duración de estas fases, son diferentes para cada tipo celular.

La corteza de cerebelo adulto queda conformada así:

- capa molecular externa (fibras paralelas, células estrelladas y en canasta)
- capa de células de Purkinje (únicas que proyectan hacia afuera de la corteza)
- capa granular interna (células granulares y somas de células de Golgi).

(Fig. 4b)

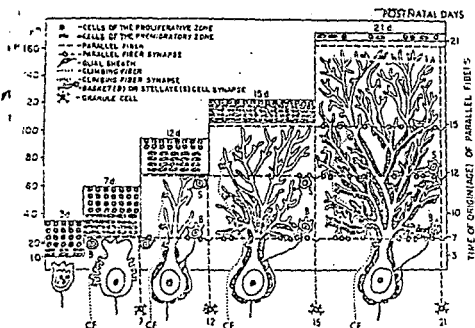


Fig. 4a: Representación del desarrollo de las capas del cerebelo. Se muestra la evolución ontogénica de la EGL en la rata.

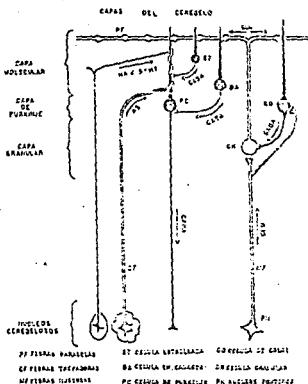


Fig. 4b: Tipos celulares presentes en el cerebelo adulto y el neurotransmisor que utilizan. Se muestran también los núcleos profundos del cerebelo y las aferentes provenientes de médula espinal.

Células de Purkinje:

Las células de Purkinje, como lo describió Cajal (1911), maduran en 3 fases:

En una primera etapa, las pequeñas células fusiformes se distribuyen en capas múltiples, posteriormente adquieren forma estrellada o multipolar y forman una sola hilera de células.

Finalmente, los procesos somáticos maduran gradualmente y las dendritas se rearreglan en un plano perpendicular a lo largo del eje de las capas (Ito, 1984).

La duración de cada estadio es constante para una especie, pero puede ser muy diferente entre distintas especies. En la rata, las células de Purkinje se originan en el feto de 14 a 17 días (Das y Nornes, 1972). A los 4 días de nacida, se acomodan en una sola hilera de células y de los 8 a los 15 días, los procesos desaparecen y reciben aferentes de células en canasta.

Células de Golgi:

Estas células emergen de la matriz celular ventricular junto con las de Purkinje. En la rata, la mayor parte de ellas, se forma después del nacimiento. A los 15 días postnatales ya tienen una configuración adulta típica (Ito, 1984).

Células en Canasta:

Se diferencian de la EGL en los días 6 a 7 postnatales (Altman, 1969, 1972). Sobre el proceso de diferenciación se conoce poco y es probable que durante la división mitótica, el neuroblasto atraviese por una represión irreversible del DNA genómico (Eccles, 1970). El DNA activo restante, puede ser diferente para cada tipo de neurona y ésto puede darles diferentes propiedades químicas.

Células Estrelladas:

Estudios autorradiográficos con timidina tritiada indican que las células estrelladas se diferencian en los días 8 a 11 postnatales en la rata (Altman, 1972b).

No existe en realidad mucha información acerca de los tipos celulares antes mencionados, pero sí de las células granulares, que son las más abundantes en el cerebelo.

Células Granulares:

La EGL consta de 2 zonas: una zona superficial de proliferación y una zona basal premigratoria. Las células granulares de rata pasan a la zona basal durante su primer día de vida como tales y a los 3 días alcanzan la capa granular. Altman

(1972) menciona que la zona proliferativa tiene un grosor de 4 a 5 células en ratas recién nacidas. Durante varios días, la zona proliferativa tiene debajo una zona subproliferativa o premigratoria de 2 a 3 células de grosor y que crece en profundidad entre los 7 y 10 días después del nacimiento. Para el día 11, la zona proliferativa ha disminuido en grosor y le sigue un adelgazamiento en la zona premigratoria hasta que para el día 19 la zona proliferativa ya no constituye ni siquiera una hilera continua de células.

Las células de la capa granular migran del tubo neural, pero retienen su capacidad mitótica y se vuelven a dividir. El último proceso de migración consiste en el movimiento de los somas de las células granulares hacia la parte interna nuevamente, pero dejando un axón muy largo y bifurcado en esta parte. Así, la capa más externa queda como capa molecular, conteniendo dichos axones (fibras paralelas) y células del tipo interneuronas (neuronas de "relevé") estrelladas y de canasta. La capa interna recibe entonces el nombre de capa granular interna. Esta capa se forma durante la segunda semana de vida postnatal. El cerebelo adulto de la rata posee alrededor de 1.1×10^8 células granulares, cuyos somas miden entre 5 y 10 μm de diámetro. Las fibras paralelas tienen un diámetro de alrededor de 0.2 μm .

Durante el proceso de migración, las células granulares establecen una estrecha relación con los procesos (extensiones) de las células gliales de Bergman (Rakic, 1971). Resulta difícil imaginar la migración tan precisa de las células granulares a través de un denso paquete de fibras especialmente en estadios tardíos del desarrollo del cerebelo, por lo que se ha propuesto que la migración podría darse mediante el reconocimiento de componentes de la matriz extracelular entre ambos tipos celulares (Gravas col., 1984 en Bergman y Cambray, 1988).

Ya que la función típica de una neurona es la comunicación, la formación de las sinapsis constituye uno de los procesos finamente regulados durante el desarrollo. Previo a ello, uno de los eventos que se llevan a cabo, es el retraimiento de muchos de los procesos que no alcanzaron el destino correcto, no son funcionales o no se desarrollaron totalmente. Todos estos eventos están directamente relacionados con una serie de estímulos macro y microambientales que a su vez son producto de la información genética y de estímulos externos. Como parte de dichos eventos, se sabe que las primeras entradas sinápticas que reciben las células granulares durante el desarrollo in vivo, son las de las fibras musgosas excitadoras provenientes de puente y médula espinal (Altman, 1982), lo cual ocurre alrededor del 5o día postnatal (Arsenio y Sotelo, 1985). Sin embargo, no es sino hasta alrededor de los días 10 a 12 postnatales cuando se tienen evidencias experimentales (Altman,

1982) de dichas sinapsis. Las fibras musgosas poseen varicosidades llenas de vesículas que hacen sinapsis con las dendritas de las células granulares. Dichos sistemas se conocen como glomérulos (Burgoyne y Cambray, 1988). En el glomérulo también hacen sinapsis las células inhibitoras de Golgi. A su vez, las células granulares tienen su principal grupo de células blanco, en las células de Purkinje (Burgoyne y Cambray, 1988) y parece ser que la sinapsis con dichas células es un evento que juega un papel importante en la supervivencia de las células granulares (Sotelo y Changueux, 1974; Burgoyne y Cambray, 1988). Estas sinapsis se establecen alrededor del día 12 postnatal.

Durante la diferenciación, todos los tipos celulares mencionados, completan la adquisición del fenotipo neural que les conducirá a un estado relativamente especializado, lo que amplía la expresión de ciertas características tanto estructurales, como metabólicas. Es durante este proceso, que las células definen el neurotransmisor a utilizar durante el estado maduro, lo cual conlleva a la expresión de la maquinaria bioquímica para la síntesis, liberación y captura del transmisor y finalmente, sólo un pequeño número de células queda como unidad estructural y funcional del individuo adulto (Fig. 4).

AMINOACIDOS EXCITADORES Y SUS RECEPTORES

Un neurotransmisor se puede definir en términos generales como una sustancia liberada de las terminales sinápticas y que tiene un efecto específico sobre la permeabilidad iónica de la neurona postsináptica. Existe una serie de criterios determinados con los que debe cumplir dicha sustancia para ser considerada como neurotransmisor, como son:

- a) Presencia en las terminales nerviosas
- b) Síntesis en la célula nerviosa
- c) Acción farmacológica:
 - Agonista: que se conozca un ligando exógeno que mimetice el efecto del ligando endógeno
 - Antagonista: que haya compuestos que eviten que el ligando endógeno pueda actuar.Es decir, que existan receptores específicos para dicha sustancia.
- d) Acción fisiológica: Que se induzca la liberación del neurotransmisor y se vea su efecto, para luego comprobar si el efecto es igual cuando se prueba el candidato a neurotransmisor.
- e) Liberación como respuesta a depolarización, de manera dependiente de calcio.

- f) Mecanismos de terminación de la señal (p.ej. por difusión en el espacio sináptico, por enzimas degradadoras o por sistemas de captura de alta afinidad)

Existe una gran variedad de compuestos considerados como neurotransmisores en el SNC. Entre ellos, los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato ocupan un lugar muy importante dada su potencia y amplia distribución, constituyendo pues, los transmisores excitadores más abundantes en el SNC. Si bien es cierto que participan en procesos del metabolismo intermedio, también existe suficiente evidencia de que funcionan como neurotransmisores, entre las cuales se pueden mencionar, el hecho de que el Glu esté distribuido ampliamente en tejido cerebral, en donde además, está más concentrado que cualquier otro aminoácido (Fonnum, 1984). Se han realizado experimentos electrofisiológicos y farmacológicos que permiten considerar al Glu como neurotransmisor, es decir, satisface los criterios de localización presináptica de neuronas específicas, se libera específicamente por medio de estímulos fisiológicos a concentraciones suficientemente altas como para obtenerse una respuesta postsináptica, ha demostrado una identidad de acción con el neurotransmisor natural, incluyendo respuesta a los antagonistas y se conocen mecanismos de terminación de la acción del Glu.

Por otro lado, también se tienen muchos ejemplos de liberación de Glu en estudios in vivo (Fonnum, 1984). Finalmente, existen evidencias inmunohistoquímicas de la localización y alta concentración de enzimas relacionadas con la síntesis de ácido glutámico en estructuras que se consideran glutamatérgicas (Altschuler et al, 1981; Young and Fagg, 1990).

A partir de una serie de estudios farmacológicos y electrofisiológicos, se ha encontrado una gran variedad de receptores a glutamato y aspartato. Debido a que estos aminoácidos son reconocidos de igual manera por todos estos subtipos de receptores, se han utilizado una serie de fármacos capaces de unirse de manera selectiva a cada subtipo de receptor. Actualmente, algunos autores hablan de 2 subtipos principales: los del tipo NMDA (que reconocen específicamente a un aminoácido exógeno conocido como N-metil-D-Aspartato) y los del tipo no- NMDA, que se subdividen a su vez en otros 3 tipos, de acuerdo con su mecanismo de acción y con su agonista preferencial. Estos son: los receptores de ácido kainico y de AMPA, cuyo mecanismo de acción es ionotrópico (al igual que el de NMDA); y el metabotrópico, que utiliza un sistema de segundos mensajeros para llevar a cabo los cambios iónicos producto de su estimulación. Se tiene también evidencia de un quinto subtipo de receptor a aminoácidos excitadores, pero se ha caracterizado pobremente. Este receptor tiene como agonista exógeno al L-AP4 y también tiene una respuesta ionotrópica (Watkins & Evans, 1981; Davies y col., 1983; Koerner & Cotman, 1981).

Caracterización de los receptores

a) Receptores del tipo No-NMDA:

Receptor de Acido Kainico

El receptor de ácido kainico, como se muestra en el Cuadro II tiene como agonistas al KA, al domoato y al acromelato, además del endógeno Glu. Los antagonistas son GAMS, pCBP2DA, DNQX y CNQX. Como se mencionó anteriormente, la respuesta inducida es ionotrópica, provocando una depolarización rápida hasta que se alcanza cierto nivel de potencial de membrana y se activan los receptores de NMDA (Cotman e Iversen, 1987). Estudios recientes han demostrado que el receptor es permeable además de a Na⁺ y K⁺, a iones divalentes como el Ca²⁺ (Miller, 1991, Fig. 5) lo cual sólo se había probado para el receptor de NMDA. En general, los sitios de unión de kainato muestran una distribución complementaria a los sitios que unen NMDA (Cotman et al, 1987). A pesar de que dichos sitios son predominantemente telencefálicos, a veces se encuentra una densidad mayor de sitios que unen kainato en lugares donde hay baja densidad de sitios que unen NMDA, por ejemplo, la zona terminal de las fibras musgosas. En el cerebelo, tanto los sitios de NMDA como los de kainato son más densos en la capa granular que en la molecular (Cotman et al, 1987)(Fig. 5a).

Receptor de AMPA

Anteriormente se le conocía como receptor de ácido quisquálico, pero éste no es un ligando selectivo y se ha probado una mayor afinidad del receptor por el AMPA (Young y Fagg, 1990). Este receptor, como su nombre lo indica, tiene como agonista preferencial al AMPA. Le siguen en afinidad, el Glu, el kainato y, muy levemente, el ibotenate (Cuadro II Fig. 5b). Los antagonistas son análogos estructurales del ácido quinurénico, como el DNQX y el CNQX. La activación de este subtipo de receptor también induce una depolarización rápida, ionotrópica, a través de la entrada de sodio. El receptor parece estar influido por una proteína moduladora y por aniones caotrópicos (aniones que cambian el estado de hidratación de la membrana, como el tiocianato). Este subtipo de receptor se encuentra principalmente en regiones telencefálicas, particularmente en hipocampo. En cerebelo, se encuentra en mayor densidad en la capa molecular. Excepto por su localización en cerebelo, este subtipo está asociado a los sitios donde se encuentran los receptores de NMDA, lo que sugiere fuertemente que existe una función concertada de estos 2 receptores (Young y Fagg, 1990 y Cotman et al, 1987).

Receptor Metabotrópico:

Como ya se mencionó, este subtipo de receptor tiene una respuesta que involucra segundos mensajeros, producto de la actividad de proteínas G (Fig. 5c). Este receptor parece estar asociado a la formación de fosfatos de inositol y diacilglicerol. Los agonistas preferenciales de este receptor son el ácido quisquálico, el iboténico y el Glu. Recientemente se ha visto que el IS,3R-ACPD, la forma activa del trans-(dicarboxil)ACPD, es un agonista selectivo de los receptores metabotrópicos del ácido glutámico. Los antagonistas que mejor se conocen actúan a nivel de transducción de la señal, es decir, cuando el receptor ya ha sido activado por el agonista. La toxina Pertussis, por ejemplo, bloquea la inhibición de la adenilato ciclasa (Stryer, 1988) al impedir la hidrólisis del GTP (Alberts, 1983) impidiendo el efecto normal de la unión del agonista con su receptor. Un antagonista poco selectivo y poco potente, pero que actúa a nivel de este receptor, es el L-AP3.

b) Receptores del tipo NMDA

Como se observa en el Cuadro II, el subtipo de receptor a aminoácidos excitadores conocido como NMDA tiene como agonista específico al ácido N-metil-D-aspartico y como preferenciales a los ácidos D-Homocisteinsulfónico, Homoquinolinico y CPG. Posee un canal permeable a sodio (el contraión es potasio) y, a diferencia del resto de los receptores conocidos, es permeable a calcio. La respuesta que se induce por NMDA es más larga que en los otros receptores ionotrópicos, ya que entran sodio y calcio. Dentro de dicho canal se encuentra un sitio al que se une magnesio de manera dependiente de voltaje. En condiciones basales, el magnesio unido al canal inhibe el paso de iones aunque el receptor esté estimulado. Esta inhibición se bloquea cuando se aumenta el voltaje de las membranas y el magnesio sale del canal, esto es, la activación del receptor es dependiente de voltaje, la corriente es regenerativa y se incrementa con la depolarización (Cotman e Iversen, 1987). El canal del receptor también se bloquea por PCP, MK-801, TCP y quetamina. El complejo del receptor tiene también dos sitios de modulación: uno que une glicina o serina y otro que une zinc (Young & Fagg, 1990). La glicina, que funciona como neurotransmisor inhibitorio, en este caso se une a un sitio insensible a estricnina, a diferencia del receptor de la glicina y actúa como potenciador de la acción del NMDA (Johnson & Asher, 1987; Patel y col., 1990). De hecho, se ha sugerido que el receptor

no funciona en tanto no esté ocupado el sitio de la glicina. También existen fármacos que actúan a ese nivel, como antagonistas tales como el HA-966, el ácido 7- Cl-Kyn y el 5,7-DCK (Fig.5d y Cuadro II). Por otro lado, también se ha encontrado un sitio del receptor que une poliaminas del tipo espermina y espermidina; dicho sitio no ha sido claramente localizado, pero algunos autores lo sitúan en la parte del receptor que mira hacia dentro de la célula (Ransom y Stec, 1988). En general, la distribución de sitios que unen NMDA es telencefálica. En cerebelo, se encuentra principalmente en la capa granular y casi siempre está asociado a zonas con alta densidad de sitios que unen AMPA y a veces con sitios que unen kainato (Cotman et al, 1987).

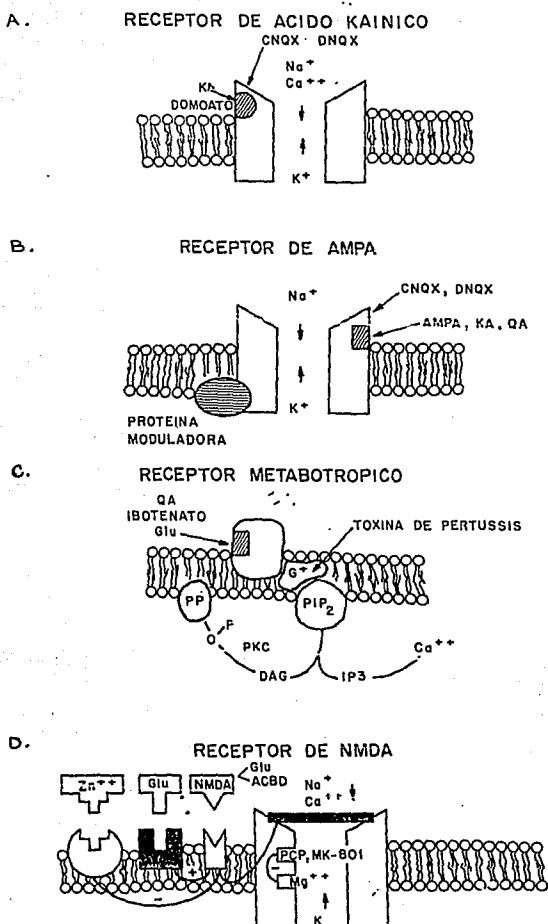


Fig. 5 Modelos esquemáticos de los receptores a aminoácidos excitadores con los iones y las drogas que interactúan con cada uno de ellos (Reynolds & Miller, 1988; Young & Fagg, 1990). Los detalles se describen en el texto.

CUADRO II

RECEPTORES A AMINOACIDOS EXCITADORES (SNC DE MAMIFEROS)

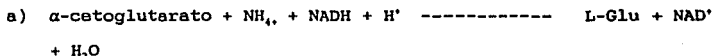
	Receptores	NMDA	K	AMPA	METABOTROPICO
A G O N I S T A S	ESPECIFICOS	NMDA ACBD	K	AMPA ATPA	
	PREFERENCIALES	D-HCSA HQA CPG	K Domoato Acromelato	Q ODAP *	ACPD (2S, 3S, 4S)CPG Q IBOTENATO
	ENDOGENOS	L-Glu ← L-Asp L-CSA	—————	L-CA L-HCSA L-HCA QUINOL	—————→
	POTENCIADORES	Gly, D-Ser			
A N T A	COMP. ESP. (sitio de reconoc. del agonista)	D-CPP D-AP5 D-AP7		NBQX	
	OTROS			CNQX DNQX	L-AP3
I S T A S	ESPEC. NO COMP. (nivel de canal)	Mg++ MK-801 PCP TCP Quetamina			TOXINAS DE ARANA Y AVISPA, pCB-PzDA, pBB-PzDA, tDGG, GAMS, KYN
	Antipotenciadores	HA-966 7-ClKyn 5,7-DCK			*5-Bromowilardina

METABOLISMO DE AMINOACIDOS EXCITADORES

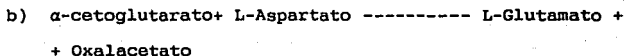
El ácido glutámico es el neurotransmisor principal en el SNC. De ahí, que tenga un especial interés el obtener información acerca del metabolismo de este aminoácido en el cerebro (Hertz et al., 1983; Schousboe, 1987). El ácido glutámico no sólo funciona como neurotransmisor, sino que además participa en vías metabólicas secundarias, forma parte de proteínas, es precursor del GABA y participa en procesos de detoxificación por amonio. Para este trabajo es importante hacer énfasis sobre la actividad de las enzimas que sintetizan Glu como neurotransmisor. Las reacciones de mayor importancia en este sentido son las catalizadas por la glutamato-deshidrogenasa (Wolf & Schünzel, 1987), la glutaminasa activada por fosfato (GAF) (Hamberger et al., 1979) y la aspartato-aminotransferasa (AAT) (Altschuler et al., 1985).

La reacción que cataliza cada una de ellas es:

Glu-deshidr.



AAT



GAF

c) Glutamina ----- L-Glutamato

 NH_4^+

Existe otra vía biosintética de ácido glutámico, pero solo se lleva a cabo en células gliales (específicamente astrocitos):

GS

Glu ----- Glutamina + NH_3 + H^+

La enzima que cataliza esta reacción es la glutamino sintetasa y constituye una de las formas de eliminación del neurotransmisor del espacio sináptico. Las otras enzimas se encuentran asociadas a neuronas glutamatérgicas. A partir de estudios inmunohistoquímicos se ha concluido que la AAT está asociada a de manera particular a estructuras glutamatérgicas (Palaiologos, 1989).

La AAT tiene una localización mitocondrial y citoplásmica. La GAF es mitocondrial, al igual que la glutamato deshidrogenasa. (Fig. 6). Algunos autores mencionan que la glutamato deshidrogenasa también tiene localización citoplásmica (Strayer, 1988).

Por otro lado, se ha demostrado (Patel et al, 1987) que la actividad de la GAF se ve modificada durante el desarrollo de neuronas glutamatérgicas, lo cual la relaciona con la diferenciación de éstas y el establecimiento de vías

glutamatergicas. Sin embargo, estudios recientes proponen que no sólo la GAF participa en estos procesos sino que actúa de manera concertada con la AAT, específicamente, la actividad de una enzima, depende de la actividad de la otra. La reacción que cataliza la AAT sólo puede proveer una síntesis neta de L-Glu a partir de L-Asp, por lo que requiere de la GAF para proveer el L-Glu que se va a utilizar como neurotransmisor (Fig. 6) (Palacios et al., 1989).

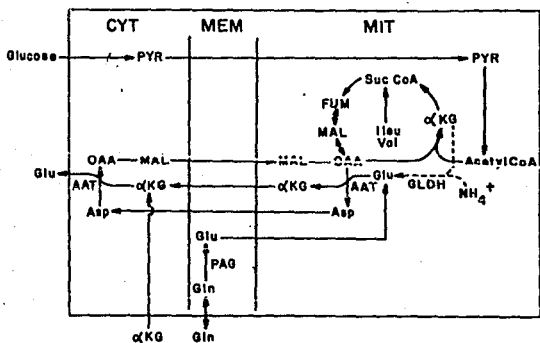


Fig. 6: Esquema de las reacciones citoplásmicas y mitocondriales relacionadas con la biosíntesis del neurotransmisor Glu. En este esquema se muestra cómo las enzimas AAT y GAF deben funcionar de manera concertada para sintetizar el Glu como neurotransmisor liberable.

FACTORES TROFICOS Y NEUROTOXICIDAD

Como ya se mencionó, la muerte celular es un evento que se requiere para la formación de un individuo adulto. Existen muchos ejemplos de muerte natural que se dan durante el desarrollo normal de los vertebrados (Gluecksmann, 1951). La muerte celular juega un papel esencial en el modelaje y refinamiento de muchos tejidos tanto durante la ontogenia como en el estado adulto. Este evento es particularmente común en el desarrollo del SNC (Hamburger & Levi-Montalcini, 1949). Existe suficiente evidencia (Balász, 1988) que indica que dicha muerte se debe al desarrollo de necesidades de sobrevivencia específicas que involucran células blanco de neuronas en desarrollo que producen pequeñas cantidades de moléculas específicas por las cuales las terminales nerviosas parecen competir (Bardé, 1989). Aquellas células que incorporan suficiente factor trófico (las moléculas específicas antes mencionadas) sobreviven, en tanto que las que no tienen un suficiente apoyo trófico, se mueren (Martín et al; 1988).

La expresión secuencial controlada de la información genética es esencial para el crecimiento y la diferenciación ordenados de las células. Sólo una pequeña fracción del genoma de una célula se expresa en un momento dado (Stryer, 1988). Existen 2 esquemas generales que deben tomarse en consideración para la muerte

neuronal ocasionada por la falta de factores tróficos: una posibilidad es que las neuronas requieran factores tróficos para mantener su actividad metabólica y por lo tanto, sobrevivir. La otra posibilidad sugiere que la ausencia de factores tróficos ocasiona un proceso metabólico activo, por ejemplo, actuando como represores de genes maestros que si se activan, generan toda una serie de actividades cuyo fin último es la muerte de la célula. Martín y col. (1988) proponen esta última, como la causa de muerte celular en un estudio realizado con neuronas simpáticas de ganglios cervicales.

Una de las moléculas tróficas mejor caracterizadas es el Factor de Crecimiento Neural (NGF). El NGF estimula a neuronas simpáticas y otras neuronas sensoriales (Barde, 1989) a dividirse y diferenciarse (Stryer, 1988). El NGF es un polipéptido sintetizado y secretado continuamente en pequeñas cantidades por células blanco de neuronas simpáticas y sensoriales derivadas de la cresta. Este factor se une a receptores específicos de procesos neuronales, y luego, tanto el NGF (Hendry et al., 1974) como el receptor (Johnson et al., 1987) se transportan de manera retrógrada al soma (Martín et al., 1988). El NGF se agrupa junto con el Factor Neurotrófico derivado de Cerebro (BDNF), el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) (Barde, 1989), el NT3 y el NT4 y se les conoce como neurotrofinas.

Actualmente no se tienen bien definidos a los factores tróficos para las células granulares, pero sin lugar a dudas incluye hormonas, neurotransmisores y moléculas específicas reguladoras del crecimiento. Los únicos factores hormonales que se sabe tienen efecto sobre las células granulares son las hormonas tiroideas T3 y T4 (Burgoyne & Cambray, 1988). Estudios realizados para conocer los factores que requieren estas células han demostrado que las células sobreviven en un medio simple suplementado con insulina (Huck, 1983).

Otra posible clase de factores tróficos pueden ser los neurotransmisores (Burgoyne & Cambray 1988). Se ha probado que el neurotransmisor inhibitor GABA tiene un efecto trófico sobre células granulares (Hansen et al., 1984), incluyendo el desarrollo de neuritas, formación de cúmulos y principalmente la expresión de receptores sinápticos de GABA. Por otro lado, se considera que el Glu es un posible candidato a neurotransmisor de las células granulares (Sandoval & Cottman, 1978), y a su vez, las células granulares poseen receptores a aminoácidos excitadores que incluyen a los del tipo NMDA en altas concentraciones cuando las células son inmaduras y en bajas concentraciones en el cerebelo adulto (Garthwaite et al., 1986), sugiriendo que estos receptores pueden tener un papel importante durante el desarrollo de estas células (Burgoyne & Cambray, 1988). De hecho, Balász y col. (1988) sugieren que el NMDA previene la muerte de células granulares que

normalmente se observa en cultivos con un medio con suero. Por un lado, ellos han estudiado el efecto de la depolarización por potasio en la sobrevivencia de las células granulares y proponen que la depolarización mimetiza de algún modo la acción que las fibras musgosas tienen en un estadio temprano del desarrollo de las células granulares in vivo (Gallo et al., 1987) y que el efecto trófico de la depolarización está mediado por un incremento de Ca^{++} intracelular, por la entrada de éste mediante canales de calcio sensibles a voltaje (VSCC) (Balász, 1988). De algún modo, entonces, el NMDA está reemplazando al K^+ como agente depolarizante, ya que su receptor posee un canal permeable a Ca^{++} . Se sabe también, que las células granulares requieren de dicha depolarización sólo durante un tiempo muy corto y preciso de su desarrollo; tiempo que coincide con la actividad de las fibras musgosas sobre ellas, in vivo (Balász et al., 1988) (Figs. 7 y 8).

Sin embargo, también es conocido que la aplicación focal de pequeñas cantidades de aminoácidos excitadores o sus análogos en determinado estadio del desarrollo es neurotóxico (Fig. 7), (Olney, 1984). Se ha sugerido que la isquemia, hipoxia e hipoglucemia tienen como resultado la liberación masiva de aminoácidos excitadores que sobreestimula a las neuronas y puede ocasionar convulsiones epilépticas sostenidas (Balász, 1988). Se ha comprobado (Simon et al., 1984) que se puede prevenir el daño neuronal en hipocampo y en núcleo caudado ocasionado por isquemia, aplicando antagonistas del receptor de NMDA (como APV, por

ejemplo). Se propone que ambos efectos, trófico y tóxico, del NMDA están mediados por el mismo mecanismo, que es un incremento notable en el flujo de Ca^{++} (Fig. 8) (Rothman & Olney, 1987; Garthwaite & Garthwaite, 1986b; Choi, 1988,). Esta acción bipotencial de los aminoácidos excitadores (Glu y específicamente NMDA) como sustancias tróficas y tóxicas, los convierten en agentes especialmente importantes en el control del desarrollo neuronal, desde la iniciación de la formación de neuritas y diferenciación de las características neuronales hasta la regresión y eliminación de procesos, así como la muerte neuronal en el estado adulto.

DAÑO OSMOTICO	DAÑO RELACIONADO CON EL CALCIO
Depolarización	Entrada de calcio por canales acoplados a agonistas (especialmente NMDA)
Entrada pasiva de Cl ⁻	Malfuncionamiento mitocondrial
Influjo posterior de cationes	Activación de Proteasas
Entrada de agua	Activación de lipasas
Lisis osmótica	Se incrementa la activación del receptor a NMDA

Fig. 7: Mecanismos propuestos para la neurotoxicidad de los aminoácidos excitadores (Rothman & Olney, 1987)

Estado de maduración de la células granulares	Efecto del NMDA		
	Depolarización	Trófico	Tóxico
Células granulares externas	?	-	-
postmitóticas, en migración	?	-	-
Células granulares de la capa interna			
recién llegadas e innervadas	?	+	-
diferenciándose	+	-	+
bien diferenciadas	±	-	-

Fig. 8: El efecto del NMDA depende del estado de maduración de las células granulares (Garthwaite et al., 1986, 1987; Balázs & Jørgensen, 1987; Balázs et al., 1987; Garthwaite & Garthwaite, 1986). (+)= efecto demostrado; (-)= efecto no detectado; (±)=efecto débil; (?)= no se sabe.

OBJETIVO

Dados los antecedentes de que el NMDA y el potasio ejercen una acción sobre la actividad de la GAF en las células granulares y ésta se ha tomado por lo tanto como una enzima marcadora del desarrollo, con el presente trabajo se pretendió retomar la participación de la activación de los receptores a NMDA y la depolarización por potasio, como factores involucrados con la actividad de una enzima que recientemente se ha sugerido que está relacionada más directamente con la síntesis de glutamato como neurotransmisor, a saber, la aspartato-aminotransferasa.

Por todo lo anterior, se buscó finalmente establecer un modelo de desarrollo bioquímico, considerando una actividad concertada de las enzimas antes mencionadas.

MATERIALES Y METODOS

Se obtuvieron cultivos primarios enriquecidos en células granulares (95%) de cerebelo de ratas Wistar. Las células se obtuvieron por disociación de cerebelos de ratas de 8 días de nacidas (8P) mediante la técnica descrita por Morán y Patel (1989). El medio de cultivo en que se sembraron fue un medio basal de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Microlab), 5 mM de KCl, 2mM de glutamina y una solución de penicilina-estreptomicina, 50U/ml y 50 µg/ml, respectivamente. Para permitir la adherencia neuronal, las cajas en que se sembraron, fueron tratadas previamente con 5 µg/ml de poli-L-lisina durante 24 hrs. Las células se sembraron a una densidad final de 1.2 a 1.5 x 10⁵ cels./ml; aproximadamente 19 hrs. después, se les agregó una solución de citosina arabinosa 10 µM para evitar el crecimiento de células no neuronales (Balasz et al, 1988).

Los astrocitos se cultivaron de manera similar, excepto que las cajas no requieren ser tratadas previamente con poli-L-lisina y tampoco se agrega citosina arabinosa. Los astrocitos requieren cambio de medio una vez transcurrida una semana de su siembra y luego cada tercer día. Las células de corteza de cerebro se siembran de manera análoga a las células granulares, con la única diferencia de que las ratas que se utilizan son fetos de 17 días (17E).

Las células se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO₂ (4.5%) y aire saturado con vapor de agua (95%) (Morán y Patel, 1989). Después de 2 días in vitro (DIV) las neuronas se sometieron a diferentes tratamientos por espacio de 72 hrs. Los astrocitos se trataron a las 2 semanas in vitro y también se les dejó el tratamiento durante 72 hrs. El tratamiento de las células consistió en la adición de alícuotas pequeñas ($\leq 100 \mu\text{l}$ /caja) conteniendo las distintas drogas. A los 5 DIV (neuronas) y 19 DIV (astrocitos) las células se lavaron con PBS a 38°C y congelaron a -70°C (las células permanecían en las cajas de cultivo). Para la realización de los ensayos, las células se descongelaron y homogeneizaron en 200 μl de buffer de imidazol pH 7.4; las resuspensiones se trasladaron a tubos eppendorf y se sonicaron 3 seg. a 15 Hz. Se separaron muestras para la determinar la concentración de proteína (20 μl por duplicado) y para medir la actividad enzimática (aspartato-aminotransferasa [AAT] y lactato deshidrogenasa [LDH]).

La actividad de la AAT se cuantificó de acuerdo con una técnica modificada de Lai y col. (1989):

Se prepararon 2 soluciones que contenían lo siguiente:

Sol. A: α -oxoglutarato 8.5 Mm y L-aspartato 17 Mm
en Buffer HEPES-Tris Ph 7.5

Sol. B: NADH 0.23 Mm, MDH 10 U/ml, Tritón X-100 0.17%
en Buffer HEPES-Tris Ph 7.5

El ensayo consistió en la medición de la utilización de NADH por el tejido (Fig. 4), en un espectrofotómetro, a 340 nm. Se calibró el aparato con 900 μ l de sol. B y 70 μ l de tejido. Inmediatamente después, se agregaron 100 μ l de sol. A, para activar la reacción que se siguió durante 3 min (Fig. 9).

AAT

L-Asp + α -oxoglutarato ----- Oxalacetato + L-Glu

MDH

Oxalacetato + NADH ----- L-Mal + NAD- + H+

Fig. 9.- Reacción general de la mezcla que se utiliza para medir la actividad de la enzima AAT.

La actividad de la enzima se calculó a partir del coeficiente de extinción molar del NADH (6.23×10^3) y se expresa como actividad (μ moles/unidad de tiempo) por mg de proteína o en algunos casos, por caja de cultivo. Paralelo al análisis de actividad de la AAT se midió la actividad de la LDH, como parámetro del metabolismo general (Bergmeyer et al, 1968). La actividad se midió espectrofotométricamente a través de la desaparición de NADH, utilizando piruvato como sustrato. La cantidad de proteína en las muestras se midió mediante la técnica descrita por Lowry et al (1951), utilizando una curva patrón de albúmina bovina.

En algunos casos se estudiaron estos mismos parámetros en astrocitos de 2 semanas in vitro de cerebelo de rata y neuronas corticales de cerebro de rata en cultivo, para así comprobar la especificidad enzimática y celular de los tratamientos.

RESULTADOS

ESTUDIOS BIOQUIMICOS

La actividad de la enzima AAT sí se ve modificada de manera específica en la preparación de nuestro estudio. Tanto el KCl, como el NMDA incrementan la actividad de la enzima de manera dependiente de la concentración (Figs. 10 y 11). La actividad de la enzima aumenta de un 65-75% cuando se les trata durante 72 hrs. con KCl o con NMDA.

Como se observa en la Fig. 10 , la EC50 para KCl es 9 mM. La actividad específica de la enzima aumenta de 7.03 ± 0.26 $\mu\text{mol/h/mg}$ prot. a 5 mM de KCl hasta 12.12 ± 1.04 $\mu\text{mol/h/mg}$ prot. a 40 mM de KCl. Al incrementar posteriormente la concentración de KCl, ya no se observan aumentos significativos en la actividad de la enzima.

Como se muestra en la Fig. 11, la EC₅₀ para el NMDA es de 25 μM y el efecto máximo se observa a 50 μM . Cuando las células se cultivan con 5mM de KCl y 15 μM de NMDA, la actividad de la AAT no se ve modificada, sin embargo, si se cultivan con 10 mM de KCl, un incremento a 20 μM de NMDA ejerce un efecto de aumento en un 30% de la actividad de la AAT. Si se continúa aumentando la

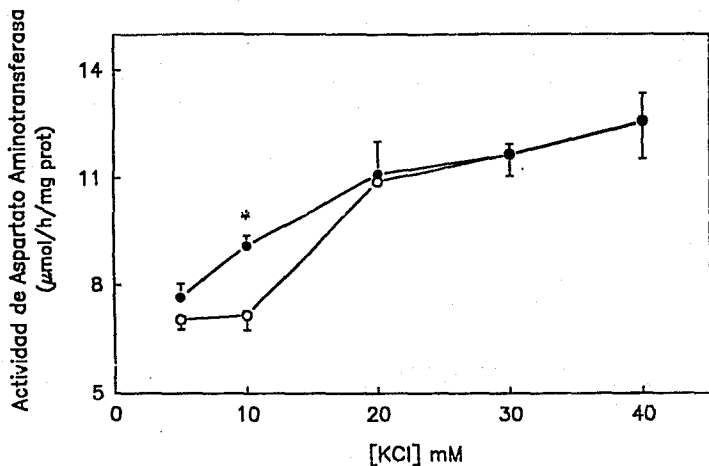


Fig. 10: Efecto de KCl y NMDA sobre la actividad de la aspartato-aminotransferasa. Las células se cultivaron 5DIV en 5mM KCl y se trataron durante 72 hr con diferentes concentraciones de KCl, con (●) y sin (○) NMDA 20 µM. Los resultados se expresan como promedios \pm SEM de 6 experimentos diferentes. * = diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.005$) con respecto al control (ANOVA).

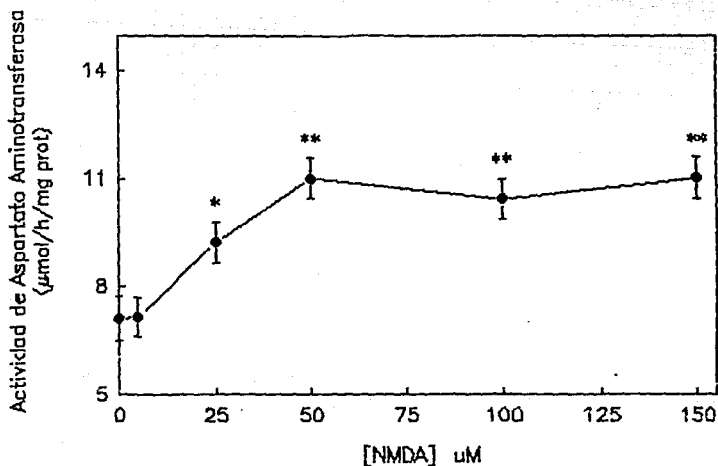


Fig. 11: Efecto de la concentración de NMDA sobre la actividad de la AAT. Las células se cultivaron durante 5DIV y se trataron durante 72 hrs con diferentes concentraciones de NMDA (v. texto). Los resultados se expresan como promedios \pm SEM de 6-8 experimentos diferentes. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (* = $p < 0.01$, ** = $p < 0.001$) (t de Student).

concentración de KCl, el efecto del NMDA no se ve modificado. Se ha sugerido que una depolarización parcial de la membrana de las células granulares evita la acción antagonista del Mg^{++} sobre el receptor de NMDA (Balázs 1988, Morán y Patel, 1989). Nuestros resultados apoyan el hecho de que esta depolarización se logra teniendo una concentración final de 10 mM de KCl (Fig.1) y además, la adición de 10 mM de Mg^{++} inhibe en un 85% la acción del KCl (Tabla I) y la del NMDA en aproximadamente un 75% (Fig. 12).

Los efectos de alto potasio (HK) y NMDA no modifican la actividad de la lactato deshidrogenasa, así como tampoco se ve modificada la actividad de la AAT en otros tipos celulares, como astrocitos y neuronas corticales (Tabla II).

-Características de la estimulación de la AAT por alto potasio

La depolarización ocasionada por HK podría estar estimulando la liberación de Glu endógeno y por lo tanto, su acción sería indirecta, estimulando vía los receptores de Glu. El efecto del KCl se ve reducido aproximadamente en un 12% cuando se utiliza 0.25 μM de MK-801 (un potente antagonista del receptor de NMDA) (Tabla I) y cuando se utiliza 150 μM de DNQX (antagonista de receptores de Glu no-NMDA), la actividad del KCl se reduce en un 7% (Tabla I).

Tabla I. Efecto del calcio y los antagonistas de aminoácidos excitadores sobre el incremento inducido por potasio en la actividad de la aspartato -aminotransferasa de células granulares.

Condición	AAT Actividad μmolas/h/mg prot
Control	7.56 ± 0.14 (8)
KCl	12.88 ± 0.41 (8) **
KCl + Nifedipina	7.71 ± 0.37 (6) +
KCl + Magnesio	8.46 ± 0.25 (6) *,+
KCl + TTX	12.04 ± 0.61 (6) **
KCl + MK801	11.40 ± 0.60 (3) **
KCl + DNQX	11.98 ± 0.70 (3) **
KCl + DNQX + MK801	11.75 ± 0.65 (3) **

Se cultivaron células granulares en 10 mM KCl durante 2 días y luego se trataron con 30 mM KCl, con o sin 0.1-0.5 μM Nifedipina, 10 mM Mg⁺⁺, 1 μM tetrodotoxina (TTX), 0.25 μM MK-801 ó 100 μM DNQX. A los 5 DIV se homogenizaron las células y se estimó la actividad de la AAT tal como se describe en los métodos. Los resultados se expresan como promedios ± SEM del número de experimentos expresado en el paréntesis. Los asteriscos indican diferencias estadísticas con respecto al control (*P < 0.01; **P < 0.001) y las cruces indican diferencias estadísticas con respecto a KCl (+P < 0.001) al realizar una ANOVA.

Tabla II. Efecto del potasio y del NMDA sobre la actividad de la AAT, LDH y GAP de neuronas cerebelares y corticales, así como de astrocitos de cerebello.

	Neuronas Granulares		Astrocitos		Neur. Corticales	
	NMDA	KCl	NMDA	KCl	NMDA	KCl
AAT	165.0 ± 6.3	178.4 ± 7.3	107.8 ± 6.9	95.6 ± 5.5	85.7 ± 5.5	101.9 ± 6.3
PAG	287.2 ± 9.8	277.6 ± 13.4	---	---	---	---
LDH	94.8 ± 9.3	91.8 ± 3.8	---	---	---	---
Proteína	109.6 ± 2.0	104.2 ± 4.1	---	---	92.6 ± 5.3	98.9 ± 6.4

Se cultivaron células granulares y corticales durante 2 días y luego se trataron con 150 μ M NMDA o 30 mM KCl. Después de 5 DIV se congelaron las células y se midieron las actividades de las enzimas como se describe en los métodos. Los astrocitos también fueron tratados durante 72 hrs, pero después de 2 semanas en cultivo. Los resultados se expresan como porcentaje del control \pm E.S. de 4-6 experimentos diferentes.

El incremento en la actividad de la AAT por HK es dependiente de Ca^{++} , ya que $0.1\mu M$ de Nifedipina inhiben este efecto (Tabla I). Por otro lado, es independiente del flujo de Na^+ , como lo muestran los resultados con TTX $1\mu M$.

-Características de la estimulación de la AAT por NMDA

El efecto observado del NMDA se debe a la estimulación selectiva de los receptores de NMDA, ya que tanto antagonistas competitivos (APV $300\mu M$) como no competitivos (MK-801 $0.25\mu M$) bloquean completamente la activación inducida por NMDA $150\mu M$ de la AAT (Fig. 12). Además, como se observa en la misma figura, el DNQX $100\mu M$ no interfiere con el efecto del NMDA.

-Características a nivel molecular de la activación de la AAT por alto potasio y NMDA

Con el objeto de esclarecer la forma en que el KCl 40 mM y el NMDA $150\mu M$ están ocasionando el efecto observado sobre la AAT, se probaron drogas que inhiben la síntesis de proteínas a 2 niveles distintos, como lo son la cicloheximida y actinomicina D. Cuando las células se cultivan durante las últimas 48 hrs con KCl 40 mM o NMDA $150\mu M$ en presencia de $1\mu g/ml$ de cicloheximida, efecto de HK se ve reducido en un 50% (Fig. 13a) y el del NMDA en un 68% (Fig. 13b). De manera análoga, cuando se agrega actinomicina D $0.01\mu g/ml$ en lugar de cicloheximida, bajo las mismas condiciones, tanto el efecto de HK, como el de NMDA, se

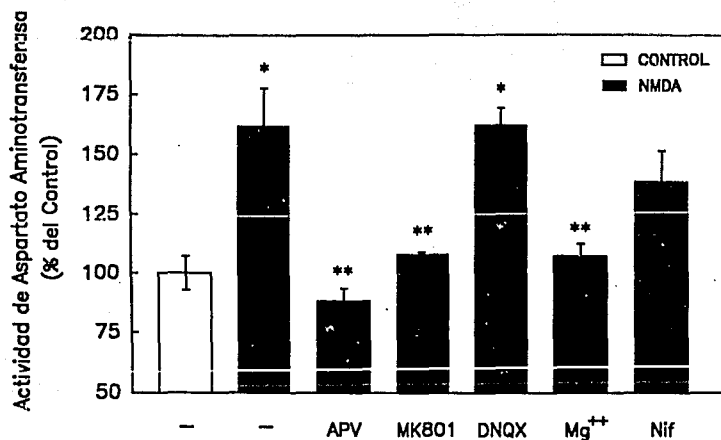


Fig. 12: Efecto de antagonistas de receptores de aminoácidos excitadores tipos NMDA y no-NMDA sobre la actividad de la AAT. Los resultados se expresan como porcentajes del control \pm SEM de 4-6 experimentos diferentes. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (*, $p < 0.005$) y con respecto al NMDA (**, $p < 0.005$) (ANOVA).

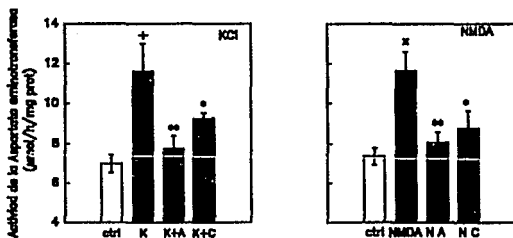


Fig. 13: Efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas (Actinomicina D 0.01 µg/ml y cicloheximida 1 µg/ml) sobre la actividad de la AAT inducida por 40mM KCl o 150µM NMDA. Los resultados se expresan como porcentajes del control \pm SEM. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (*, $p < 0.001$) o con respecto a NMDA o KCl (**, $p < 0.001$) (ANOVA).

ven bloqueados casi por completo (Fig. 13). Cabe mencionar que las concentraciones de cicloheximida y actinomicina D utilizadas, no tuvieron efecto alguno sobre la integridad celular, ni sobre la actividad de la AAT por sí solas.

-Efecto de otros aminoácidos excitadores (endógenos y exógenos)

Las pruebas realizadas con otros aminoácidos excitadores muestran que, dentro de los agonistas exógenos, sólo el ácido kaínico, a bajas concentraciones (10 μ M) tiene un efecto estadísticamente significativo (aumento del 30%) sobre la actividad de la AAT (Fig. 14). En la figura 15 se muestra que el efecto del ácido kaínico está mediado a través de su receptor, puesto que el DNQX inhibe completamente su acción, en tanto que ni el MK-801, ni el Mg^{++} lo hacen. La nifedipina tampoco inhibió este efecto. El AMPA, el ácido Quíscualico y el LAPB no tienen efecto positivo sobre la enzima (Fig. 14). Dentro de los endógenos que también se proponen como agonistas del receptor a NMDA, el ácido quinolínico aumenta la actividad de la enzima en un 40% (Fig. 14), efecto que se inhibe con MK-801, Nifedipina y Mg^{++} (Fig. 16). El ácido-L-homocisteico y el homoquinolínico no tienen efecto alguno sobre la actividad de la enzima (Fig. 14).

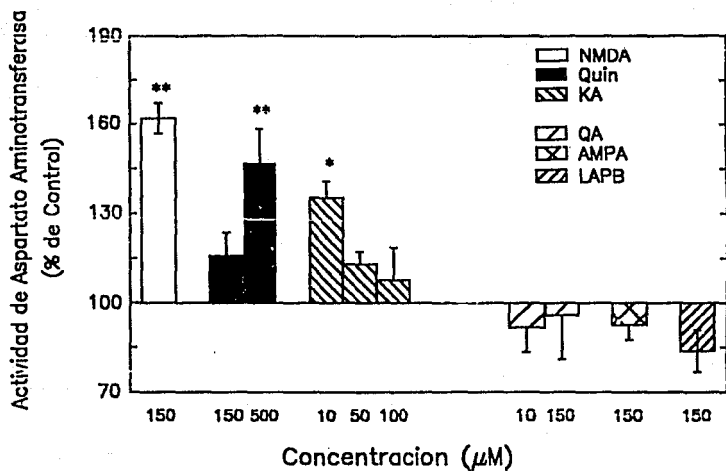


Fig. 14: Efecto de agonistas de receptores tipos no-NMDA sobre la actividad de la AAT. Los resultados se expresan como porcentajes del control \pm SEM de 4-6 experimentos diferentes.
Diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$) con respecto al control (t de Student).

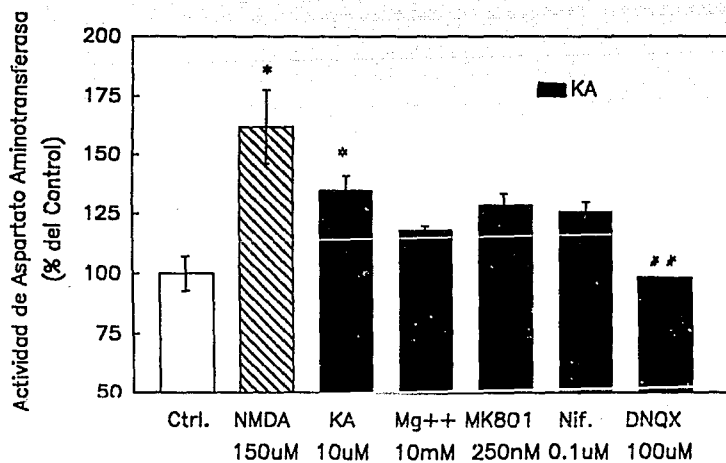


Fig. 15: Efecto del ácido kaínico y antagonistas de receptores tipos NMDA y no-NMDA sobre la actividad de la AAT. Los resultados se expresan como porcentos del control \pm SEM de 3 experimentos diferentes.

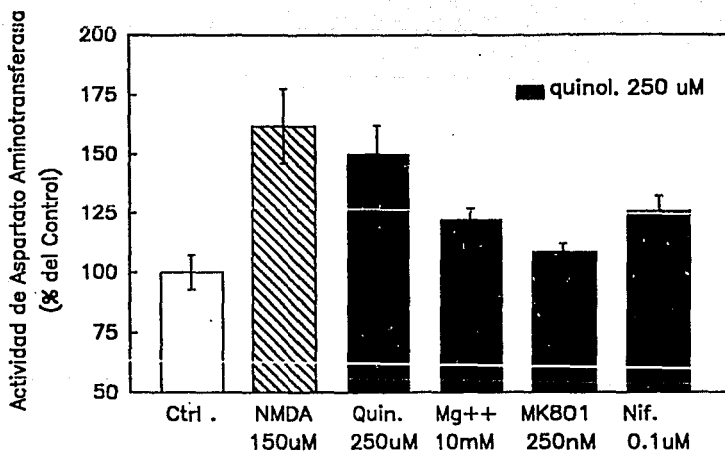


Fig. 16: Efecto del ácido quinolinico y antagonistas de receptores tipo NMDA, así como de la nifedipina sobre la actividad de la AAT. Los resultados se expresan como porcentajes del control \pm SEM. Diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.005$) con respecto al control y ** con respecto al ácido quinolinico ($p < 0.005$) (ANOVA)

Se probaron también concentraciones desde 10 μ M hasta 1 mM de Glu y Asp. Como se muestra en la Fig. 17, el efecto es muy pequeño, ya que ambos aminoácidos son incorporados por la célula rápidamente. Por otro lado, el inhibidor utilizado (Asp- β -hidroximate) tiene un efecto secundario tóxico.

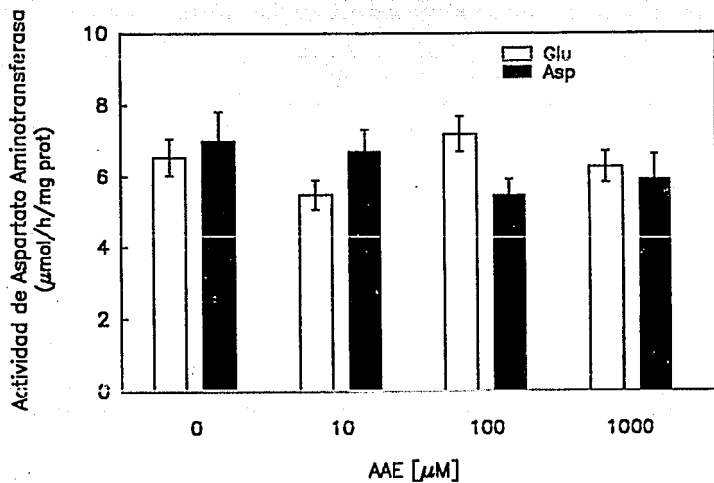


Fig. 17: Efecto de los aminoácidos excitadores Glu y Asp sobre la actividad de la AAT de células granulares cultivadas durante 5 días y tratadas durante las últimas 72 hrs. Las diferencias no son significativas.

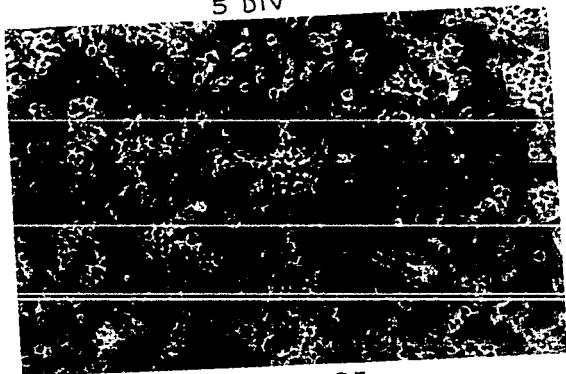
ESTUDIOS DE MORFOLOGIA

El cultivo de células granulares de cerebelo de rata de 8 días de nacidas en un medio basal Eagle con 10 mM de KCl y suplementado a los 2 DIV (Días in vitro) con 30 mM de KCl o 150 μ M de NMDA no tiene efecto alguno sobre la morfología de las células observadas con microscopía de luz cuando éstas se congelan a los 5 DIV, si se les compara con células crecidas únicamente con 10 mM de KCl (Fig.18). Sin embargo, si las células se dejan en cultivo más tiempo (7 a 12 DIV), se observa un claro deterioro morfológico en cuanto a un adelgazamiento y ruptura de neuritas, vacuolización de los somas, separación celular del sustrato y hasta la muerte celular.

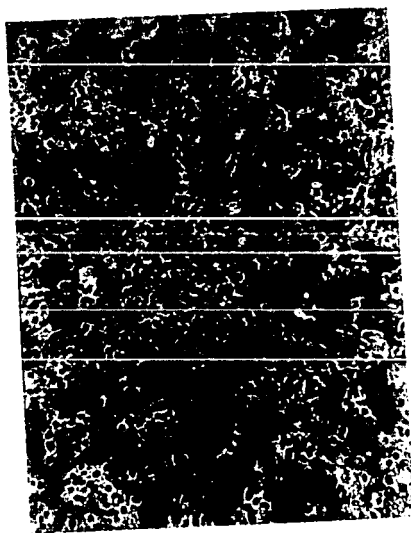
A los 5 DIV ninguno de los tratamientos, incluyendo los antagonistas MK-801, APV, los inhibidores de síntesis proteica actinomicina D y cicloheximida, afectaron la morfología al observarse con microscopía de luz y la sobrevivencia de las células.

5 DIV

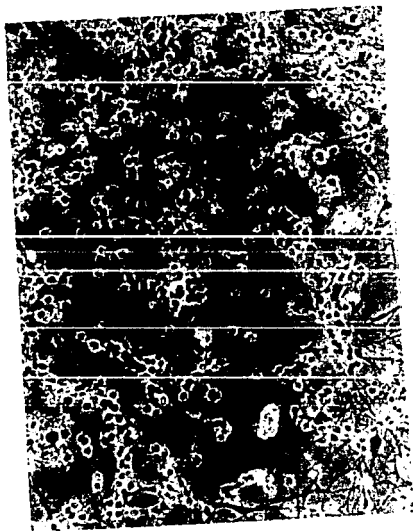
59



CONTROL



NMDA 150 μ M



KCl 40 mM

DISCUSION

En este trabajo se estudió la activación de los receptores a NMDA y la depolarización por potasio como posibles factores tróficos de las células granulares del cerebelo. Debido a que recientemente se ha propuesto (Schousboe & Hertz, 1987; Hertz & Schousboe, 1987) que la enzima AAT participa directamente en la síntesis de Glu como neurotransmisor, se pretendió demostrar que el efecto trófico antes mencionado está relacionado con la diferenciación bioquímica, específicamente sobre el aumento en la actividad de la AAT.

Si bien es cierto que se ha demostrado que la enzima glutaminasa activada por fosfato parece ser una pieza clave en la síntesis del Glu utilizado por las neuronas como neurotransmisor (Sandoval y col.; 1989), algunos estudios inmunohistoquímicos (Altschuler et al., 1981; 1982; 1985; Wenthold et al., 1983; 1986) han sugerido un papel importante de la AAT en la síntesis de este Glu al demostrar una correlación entre la distribución de la AAT y la localización de neuronas glutamatérgicas en el Sistema Nervioso Central, incluyendo al cerebelo. Sin embargo, se tenía poca información acerca de la importancia de la AAT en neuronas que utilizan el ácido glutámico como neurotransmisor. Schousboe y

Hertz (1987) demostraron que existe una mayor actividad de la AAT en células glutamatérgicas que en otro tipo de neuronas. En uno de los trabajos pioneros sobre la importancia de la AAT en células granulares, Palaiologos y cols. (1989), estudiaron el efecto del aminoxiacetato (inhibidor de la AAT) y el fenilsuccinato (bloqueador del transporte keto- dicarboxílico mitocondrial) sobre la liberación de D-[3H]- aspartato (un análogo no metabolizable del Glu). Estos estudios demostraron que la AAT es una enzima clave para la síntesis de Glu como neurotransmisor liberable y sugieren que muy probablemente se requiera de la actividad concertada tanto de la AAT como de la PAG para dicha síntesis.

Existe evidencia sustancial que indica que la actividad bioeléctrica influye en la sobrevivencia de las células neuronales en ciertas etapas de su desarrollo (Brenneman, et al., 1983; Harris, 1981). La depolarización, producto de la actividad neuronal in vivo, induce la sobrevivencia de cultivos celulares de Sistema Nervioso Periférico (Scott y Fisher, 1970; Wakade et al., 1983) y Central, incluyendo a las células granulares del cerebelo (Lasher y Zagon, 1972; Gallo et al., 1987; Balász et al., 1988).

La dependencia de potasio se desarrolla dentro de un intervalo de tiempo de 2 a 4 DIV (Balász et al., 1990), sugiriendo que esta depolarización in vitro está de algún modo mimetizando uno de los eventos más importantes dentro del desarrollo de las células granulares del cerebelo, esto es, las primeras innervaciones

funcionales que éstas reciben de las fibras musgosas, muchas de las cuales, son glutamatérgicas (Balázs et al., 1988). Es importante recalcar que el papel que la depolarización ocasionada por el NMDA o por alto potasio ejerce sobre la maduración y la sobrevivencia de estas células tiene un curso temporal bien delimitado.

Balázs et al (1988) demostraron que el desarrollo inicial de las células granulosas es "indiferente" a la concentración de potasio, sin embargo, sus cultivos no podían mantenerse por más de 5DIV, debido a la muerte celular masiva que a esta edad se observaba. Ellos mismos habían demostrado (1987) ya la necesidad de utilizar concentraciones altas de potasio (25-40mM) para la posterior sobrevivencia de las células cuando éstas alcanzaban los 3DIV. De manera análoga, en otra investigación (1988), demostraron el requerimiento de NMDA entre los 2-4 DIV para la sobrevivencia de las células granulares, apoyando con ésto la idea de que este tipo celular debe alcanzar cierto estado de desarrollo antes de depender de potasio o NMDA. Sin embargo, a medida que continua el desarrollo, el efecto trófico del NMDA y del potasio se sustituye por un efecto tóxico y finalmente, cuando las células están totalmente diferenciadas, ya no tienen más que un ligero efecto depolarizante.

En el presente trabajo se utilizaron condiciones en las que la dependencia de la depolarización por parte de las células no afectara la sobrevivencia, la morfología, ni el contenido de

proteína, comparando con las células control. Esto es, se crecieron en un medio con 10 mM de KCl basal y se realizaron los estudios cuando las células tenían 5DIV. En nuestra preparación, la muerte celular masiva se daba alrededor de los 7 DIV.

Como se muestra en las figuras 10 y 11, tanto el potasio como el NMDA son capaces de estimular la actividad de la AAT de manera dependiente de la dosis.

El efecto observado, aún cuando es específico para las enzimas involucradas en la síntesis del neurotransmisor, como la glutaminasa activada por fosfato (Morán y Patel, 1989) y la aspartato-aminotransferasa, la respuesta de esta última es menos pronunciada; probablemente porque en los ensayos no se diferencia entre la enzima mitocondrial y la citoplásmica pudiendo ser que se afecten de manera diferente, o bien, que la producción de Glu por la glutaminasa, no esté relacionada 1:1 con su transformación en Asp por la AAT mitocondrial y nuevamente a Glu por la AAT citoplásmica.

De hecho, Peng et al (1991) establecen que la transaminación sí es uno de los eventos más importantes en la formación del Glu como neurotransmisor liberable, ya que la inhibición de la actividad de la alanina-aminotransferasa y/o la aspartato-aminotransferasa por aminoxiacetato, disminuye fuertemente la liberación de Glu endógeno como neurotransmisor;

pero no siempre se requerirá del transporte transmitocondrial, ya que cuando se tienen al α -KG y Ala como precursores, no se inhibe la liberación de Glu con fenilsuccinato (inhibidor de la lanzadera aspartato-malato).

Como se observa en la Tabla II, la LDH, la glutamato deshidrogenasa (datos del laboratorio no publicados) y el contenido de proteína no se ven afectados sustancialmente por los tratamientos. El hecho de que una enzima citoplásmica (LDH) y una enzima de localización mitocondrial (GLDH) no se vean afectadas por el tratamiento, resulta importante, ya que sugiere por un lado que el metabolismo general de la célula no está siendo modificado y, por otro lado, que el tratamiento no afecta de manera exclusiva a enzimas mitocondriales. Además, en la misma Tabla II, se observa que el efecto es específico para el tipo celular; es decir, la actividad de la enzima no se modifica ni en astrocitos ni en células corticales. Patel y cols. (1990) sugirieron recientemente que la acción trófica del NMDA puede darse en cultivos de neuronas subcorticales. Ellos probaron que la AAT no se ve modificada, mientras que otras enzimas marcadoras para distintos tipos neuronales se incrementaron. Esta discrepancia con nuestros resultados probablemente se deba a la alta heterogeneidad celular de su preparación, ya que ellos tienen astrocitos, células colinérgicas, gabaérgicas y un bajo porcentaje de células glutamatérgicas, en tanto que nuestra preparación está enriquecida en un 95% con células glutamatérgicas. Esto podría

sugerir que en la preparación de Patel y cols. el efecto de la AAT se ve enmascarado.

La Tabla I muestra que los cambios en la actividad de la AAT debidos a la depolarización por KCl involucran probablemente un incremento intracelular de Ca^{++} , ya que la nifedipina inhibe el efecto potenciador. Parece poco probable que el KCl esté ejerciendo su efecto a través de la liberación de aminoácidos excitadores por depolarización y éstos a su vez, estén interactuando con los receptores, ya que cuando se ponen antagonistas a los receptores tipo NMDA (MK-801 y APV) y a los del tipo no-NMDA (DNQX), el efecto no se ve reducido de manera significativa. Más bien, su efecto podría ser a nivel de la activación de canales de calcio sensibles a voltaje (VSCC), cuya presencia se ha demostrado en estas células (Carboni and Wojcik, 1988; Slesinger and Lansman, 1991; Morán et al., 1991).

En el caso del efecto del NMDA, también existe una clara participación del Ca^{++} (Fig. 12). Se sabe que la activación de los receptores a NMDA aumentan la conductancia del Ca^{++} (Mayer and Westbrook, 1987). Aún más, se ha observado que si se cambia la concentración externa de calcio, se altera notablemente el potencial de reversión de las respuestas inducidas por el agonista, sugiriendo que el canal del receptor no solo es permeable a Na^{+} y K^{+} , sino también al Ca^{++} (MacDermott and Dale, 1987). Con el uso del colorante arsenazo III se ha demostrado que

la activación del receptor a NMDA aumenta la concentración de calcio intracelular. De hecho, se ha visto que este canal es 10 veces más permeable a Ca^{++} que a Na^+ (Miller, 1991). También se ha probado en este receptor, el bloqueo del flujo de este ión divalente por Mg^{++} . En la Fig. 12 se muestra además, que la entrada de Ca^{++} no es por canales sensibles a nifedipina. Actualmente se ha propuesto que el receptor a ácido kaínico también es permeable a calcio (Pruss et al., en prensa, en Miller, 1991). Holopainen et al (1989) demuestran que el ácido kaínico a concentraciones de 10 μM y 100 a 1000 μM inducen un aumento de calcio intracelular, efecto que, además, no se inhibe con dihidropiridinas (antagonistas del tipo-L de VSCC). Nosotros probamos que solo concentraciones bajas (10 a 50 μM) de ácido kaínico, tienen un efecto positivo sobre la actividad de la AAT. Este efecto del ácido kaínico podría estar dado entonces por un aumento de Ca^{++} a través de VSCC o directamente por el propio canal del receptor.

La falta de estimulación de las enzimas AAT y FAG por otro tipo de entrada de Ca^{++} , a saber, la inducida por el ionóforo A23187 (observaciones no publicadas), indica entonces que las vías de entrada de Ca^{++} con 'fines' tróficos son específicas y que el ionóforo del receptor a NMDA (probablemente el del kaínico) y los canales de calcio sensibles a voltaje (activados por KCl y ácido kaínico) son las más probables. Además de la vía de entrada, también es importante la fuente de calcio, la magnitud del

incremento del ión y el curso temporal de dicho incremento.

Fuera del efecto del kaínico a bajas concentraciones, se puede decir que el aumento en la actividad de la AAT está mediado exclusivamente por los receptores a NMDA, ya que el DNQX (antagonista de receptores no-NMDA) no inhibe su efecto y el APV y el MK-801 (potentes antagonistas del receptor a NMDA) bloquean completamente su acción. De los otros agonistas probados, sólo el ácido quinolínico tuvo un efecto sobre la actividad de la AAT (Fig. 14). Ambos compuestos se proponen como ligandos endógenos de los receptores a NMDA de algunas regiones del SNC, incluyendo al cerebelo (Stone y Burton, 1988); por lo que podrían estar activando al receptor a NMDA con su consecuente entrada de calcio, aunque, cabe mencionar que dicha entrada del ión podría también estar mediada por VSCC. Estos resultados favorecen, por lo tanto, la propuesta de que el ácido quinolínico sea, aparte del Glu, ligando endógeno del receptor del tipo NMDA.

Por otro lado, resulta muy interesante mencionar que los experimentos con cicloheximida y actinomomicina D (ambos inhibidores de la síntesis proteica a distintos niveles) indican que el efecto inducido por el potasio y el NMDA requiere de una síntesis de novo de proteínas y RNA. Este hecho constituye un argumento a favor de que el papel trófico del NMDA tiene una base genética, es decir, el NMDA probablemente sea capaz de influir sobre la expresión de genes involucrados con la síntesis de AAT. Esta posibilidad está

apoyada por una serie de estudios recientes en los que se ha demostrado una acción de los aminoácidos excitadores sobre la expresión de genes tempranos en esta misma preparación (Szekely et al, 1990).

Para finalizar, resulta evidente que tanto la depolarización por potasio como el efecto del NMDA son herramientas que, en el mejor de los casos, pretenden tener su correlación con el modelo in vivo.

Por una parte, ya se mencionó que las células granulares reciben sus primeras aferentes sinápticas funcionales de las fibras musgosas, algunas de las cuales son glutamatérgicas. El modelo que se propone para hipocampo resulta adecuado también para las células granulares del cerebelo: el Glu se une a los receptores tipo NMDA y no-NMDA. El receptor tipo NMDA no se puede activar, ya que la concentración de Mg^{++} in vivo es suficiente para inhibirlo, pero los otros receptores sí se activan y cambian el voltaje de la membrana, pudiendo entonces actuar el NMDA (además del calcio que entra por su canal, también se activan los VSCC). De algún modo, la expresión de los genes relacionados con la PAG y la AAT se ve aumentada y se inicia una mayor síntesis de dichas enzimas. La PAG convierte la glutamina en glutamato en la mitocondria y la AAT permite que éste se libere como neurotransmisor mediante la actividad de la lanzadera aspartato/malato (Palaiologos, et al., 1989). Estas enzimas

funcionan de una manera concertada, ya que la síntesis neta de ácido glutámico la lleva a cabo la glutaminasa, pero en su utilización como neurotransmisor, parece ser la AAT la directamente involucrada (Fig. 6). Por otro lado, esto requiere de una asociación celular muy especial, ya que tanto la piruvato carboxilasa y la glutamino sintetasa (enzimas que sintetizan sustratos que requieren la AAT y la PAG respectivamente) se encuentran sólo en astrocitos.

Así pues, se establece una interacción celular, enzimática y genética que permite el desarrollo de las células granulares del cerebelo de la rata en un periodo crítico del desarrollo de este órgano.

CONCLUSIONES

a) La estimulación por KCl y NMDA aumentan la actividad de la AAT de células granulares de 5 DIV obtenidas de cerebelo de rata de 8 días de nacidas (SP).

b) El efecto del NMDA y el KCl es específico para las enzimas involucradas con la síntesis del neurotransmisor (AAT y GAF).

c) El efecto está mediado por receptores del tipo NMDA. Dos de los agonistas endógenos propuestos, el ácido homoquinolínico y el D-homocisteínsulfínico tienen un efecto positivo.

d) El ácido kainico parece tener un efecto similar a bajas concentraciones, probablemente debido a la depolarización, al igual que el KCl.

e) Los efectos observados parecen involucrar la síntesis de novo de proteínas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren por lo tanto, que la estimulación del receptor a NMDA pudiera tener un efecto trófico sobre las células granulares durante el desarrollo y que la AAT constituye, junto con la GAF, un parámetro marcador del desarrollo de neuronas glutamatérgicas.

LITERATURA CITADA

- Alberts, B., 1988. Molecular Biology of the Cell. New York. Garland Publishing Inc. 1140 pp.
- Altman, J., 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. III. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. J.Comp.Neurol., 136: 269-294
- Altman, J. 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. J.Comp.Neurol. 145: 353-398
- 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
- Altman, J., 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III. Maturation of hte components of the granular layer., J. Comp.Neurol. 145: 465-514
- Altman, J., 1982. Morphological development of the cerebellar cortex in the rat. IV Spatial organization of bipolar cells, parallel fibres and glial pallisades. JComNeurol. 163: 427-448
- Altschuler, R. A., D. T. Monaghan D. T., W. G. Haser, R. J. Wenthold, N.P. Curthoys and C. W. Cotman., 1985: Immunocytochemical localization of glutaminase-like and aspartate aminotransferase-like immunoreactivities in the rat and guinea pig hippocampus. BrainRes 330: 225-233
- Altschuler, R. A., G. R. Neises, G. G. Harmison. R. J. Wenthold, J. Fex., 1981. Immunocytochemical localization of aspartate aminotransferase immunoreactivity in cochlear nucleus of the guinea pig. Proc.Natl.Acad.Sci 78: 6553-6557
- Altshuler R. A., J.L. Mossinger, G. G. Harmison, R. J. Wenthold, J. Fex., 1982. Aspartate aminotransferase-like immunoreactivity as a marker for aspartate/glutamate in guinea pig photorreceptors. Nature (London) 298: 657-659
- Arsenio-Núñez & C. Sotelo., 1985. Development in the spinocerebellar system in the postnatal rat. JCompNeurol. 237: 291-306

- Balász, R., N. Hack & O.S. Jorgensen., 1988. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells. *NSL* 87: 80-86
- Balász, R., O.S. Jorgensen & N. Hack., 1988. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neurosci.* 27: 437-451
- Balász, R., 1988. Metabolic imbalance and nerve cell damage in the brain. *Progress in Brain Research* 73: 447-463
- Balász R., N. Hack & O. S. Jorgensen., 1990. Selective stimulation of excitatory aminoacid receptor subtypes and the survival of the cerebellar granule cells in culture: effect of kainic acid. *Neurosci* 37(1): 251-258
- Balázs, R., 1988. Metabolic imbalance and nerve cell damage in the brain. *ProgBrRes* 73:447-463
- Balázs R., V. Gallo and A. Kingsbury., 1988. Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *DevBrainRes* 40:269-279
- Barde, Y.A., 1989. *Neuron* 2:1525-1534.
- Bergmeyer, H. U., E. Bernt, B. Hess., 1968 in *Methods of Enzymatic Analysis* (H. Bergmeyer ed.) pp 736-741. Academic Press, N.Y.
- Brenneman, D. E., E.A. Neale, W.H. Habig, L.M. Bowers y P. G. Nelson., 1983. Developmental and neurochemical specificity of neuronal deficits produced by electrical impulse blockade in dissociates spinal cord cultures. *DevBrainRes* 9:3-27
- Burgoyne, R.D. and M.A. Cambray-Deakin., 1988. *The Cellular Neurobiology of Neuronal Development: The Cerebellar Granule Cell.* *Brain Res.* 13: 77-101
- Cajal Ramon y ., 1911. *Histologie du Système Nerveux de l'homme et des Vertébrés .Vol.II Maloine,Paris.*
- Carboni E., W.J. Wocjik., 1988. Dehydropyridine binding sites regulate calcium influx through specific voltage-sensitive channels in cerebellar granule cells. *JNeurochem* 50: 1279-1286
- Choi, D.W., 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role of ischemic damage. *TrendsNeurosci* 11:465-469
- Cotman, C.W., D. Monaghan, O. Ottersen & J-Storm-Mathisen., 1987. Anatomical organization of excitatory aminoacid receptors and their pathways. *TINS* 10(7): 273-279

- Cotman, C.W. & L.L. Iversen., 1987. Excitatory aminoacids in the brain -focus on NMDA receptors, *TINS* 10 (7): 263-265
- Das, G.D. & H.O. Nornes., 1972. Neurogenesis in the cerebellum of the rat: an autorradiographic study. *Z.Anat.Entwickl.Gesch.* 138: 155-165.
- Davies, J. et al., 1983. Recent advances in the pharmacology of excitatory aminoacids in the mammalian central nervous system, in: *Wenner-Gren Symposium Excitotoxins*. Edited by K. Fuxe, P.J. Roberts and R. Schwarcz. Macmillan Press, London pp. 43-54.
- Eccles, J.C., 1970. Neurogenesis and morphogenesis in the cerebellar cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 66:294-301.
- Fonnum, F., 1984. Glutamate: A neurotransmitter in Mammalian Brain. *Jour.of Neurochem.* Short Review pp 1-11.
- Gallo V., A. Kingsbury, R. Balázs and O.S. Jorgensen., 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *JNeurosci* 7:2203-2213
- Garthwaite, J., G. Garthwaite & F. Hajos., 1986. Aminoacid neurotoxicity: relationship to neuronal depolarization in rat cerebellar slices. *Neurosci* 18: 449-460
- Gluecksmann, A., 1951. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol.Rev.* 26: 59-86.
- Hamburger, V. and R. Levi-Montalcini., 1949. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of chick embryo under normal and experimental conditions. *J.Exp.Zool.* 111: 457-502
- Hamberger, A., G.H.Chiang., E.S.Nylen, S.W. Scheff & C. W. Cotman., 1979. Glutamate as a central nervous system transmitter I. evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Br.Res.* 168: 513- 530
- Hansen, G.H., E. Meier, A. Schousboe., 1984. GABA influences the ultrastructure composition of cerebellar granule cells during development in culture. *Int.J.Dev.Neurosci.* 2:247-257
- Harris, W.A., 1981. Neural activity and development. *AnnuRevPhysiol* 43: 689-710
- Hendry, I.A., J. Thoenen, and L.L. Iverson. 1974. The retrograde transport of nerve growth factor. *Br.Res.* 68: 103-121
- Hertz L. and A. Schousboe. 1987. Primary cultures of GABAergic and glutamatergic neurons as model of systems to study neurotransmitter functions. I. Differentiated cells. In *Vernadakis A (ed):*

"Model Systems of Developing and Aging of the Nervous System". Amsterdam: Martinus Nijhoff Publishing, pp 33- 42

Hertz, L. E. Kvamme, E.G. McGeer & A. Schousboe (eds.), 1983. Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system. Neurology and Neurobiology, pages 1-800, vol 7, Alan R. Liss Inc., N.Y.

Hertz, L., Ch. R. K. Murthy & A. Schousboe., 1988. Metabolism of glutamate and related aminoacids. The Biochemical Pathology of Astorocytes. Alan R. Liss, Inc. 395-406

Holopainen I., M.O.K. Enkvist, K.E.O. Akerman., 1989. GFlutamate receptor agonists increase intracellular Ca++ independently of voltage-gated Ca++ channels in rat cerebellar granule cells. NeurosciLett 98:57-62

Huck S., 1983. Serum-free medium for cultures of the postnatal mouse cerebellum: only insulin is essential BrainResBull., 10 667-674

Hudson, D. B., T. Valcana, G. Bean, and P.S. Thomas., 1976. Glutamic Acidñ a strong candidate as the neurotransmitter of cerebellar granule cells. Neurochem.Res. 1: 73-81

Imperial, S., C. Quiroga, M. Busquetes, A. Cortés y J. Bozal., 1988. Generation process of cytosolic aspartate-aminotransferase molecular forms by several treatments. Jour.ofProt.Chem. 7 (2): 129-139.

Ito, Masao., 1984. The Cerebellum and Neural Control. Raven press New York 580 pp

Ito, M., 1984. Glutamate as a neurotransmitter in the cerebellar cortex. Biomed.Res. 5:suppl:63-66

Johnson, E.M. Jr., M. Taniuchi, H.B. Clark, J.E. Springer, S. Koh, M.W. Tayrien and Loy, R., 1987. Demonstration of the retrograde transport of nerve growth factor receptor in the peripheral and central nervous system. J.Neurosci. 7:923-929.

Johnson, J.M. & P. Asher., 1987. Glycine potentiates the NMDA responses in cultured mouse brain neurons. Nature 325: 529-531

Koerner, J.F. and C. W. Cottman., 1981. Micromolar L-2-amino-4-phosphonobutyric acid selectively inhibits perforant path synapses from lateral entorhinal cortex. Br.Res. 216:192-198.

- Lai J.C.K., C.R.K. Murthy, A.J.L. Cooper, E. Hertz and L. Hertz., 1989. Differential effects of ammonia and β -methylene-DL-aspartate on metabolism of glutamate and related aminoacids by astrocytes and neurones in primary culture. *Neurochem.Res* 14:377-389.
- Larsell, O. 1967. *The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum form Monotremes through Apes*. Vol. 1, edited by J. Jansen. University of Minnesota Press, Minneapolis.
- Lasher J., R. Zagon., 1972. The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *BrainRes* 7:761-770
- Lasher, J. and R. Zagon., 1972. The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *BrainRes* 7: 761-770
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A. L. Farr & R.J. Randall., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J.Biol.Chem.* 193: 265-275
- Mac Dermott, A.B. & N. Dale., 1987. Receptors, ion channels & synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory aminoacids. *TINS* 10(7): 280-283
- Martin D. P., R. E. Schmidt, P.S. DiStefano, O. H. Lowry, J.G. Carter and Johnson, E.M., 1988. Inhibitors of protein synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *The Journal of Cell Biology*. 106: 829-844
- Mayer, M.L. & Westbrook, G.L., 1987. The physiology of excitatory aminoacids in the vertebrate central nervous system. *ProgNeuroBiol.* 28:197-275
- Miller, R.J., 1991. The revenge of kainate receptor. *TINS* 14(11):477-479.
- Morán J. & A. Patel., 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev. Brain Res.* 46: 97-105
- Morán O., F. Lin, O. Zegarra-Morán & Sciancalepore., 1991. Voltage dependent calcium channels in cerebellar granule cells primary cultures. *EurBiophysJ* 20:157-164
- Morán, J. & A. Patel., 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of granule neurons and not astrocytes. *BrRes* 486: 15-25

- Mossman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J.Immunol.Meth.* 65: 55-63
- Palaiologos, G., L.Herz & A. Schousboe., 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
- Patel, A.J., A. Hunt and C.Sanfeliu., 1990. Cell-type specific effect of N-methyl-D-aspartate on biochemical differentiation of subcortical neurons in culture. *IntJDevNeurosci* 8: 379-389
- Rakic, P., 1971. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus rhesus, *J. Comp.Neurol.* 141:283-312
- Patel, A., C.W. Zinkand., C. Thompson., R. Keith & A. Salama., 1990. Role of glycine in the N-methyl-D-Aspartate mediated neuronal cytotoxicity. *J.Neurochem.* 54(3): 849-854
- Ransom, R.W. & N.L. Stec., 1988. *J.Neurochem.* 51: 830-836.
- Rothman, S.M. & J.W. Olney., 1986b. Neurotoxicity of excitatory aminoacid receptor agonists in rat cerebellar slice: dependence on calcium concentration *NeurosciLett* 66: 193-198
- Sandoval, M.E. and Cottman, C.W., 1978. Evaluation of glutamate as a neurotransmitter of cerebellar parallel fibers *Neurosci* 3: 199-206
- Schousboe A. and L. Hertz., 1987. Primary cultures of GABAergic and glutamatergic neurons as model of systems to study neurotransmitter functions, II. Developmental Aspects. In Vernadakis A (ed): "Model Systems of Developing and Aging of the Nervous System". Amsterdam: Martinus Nijhoff Publishing, pp 33- 42
- Schousboe, A., 1987. An overview of the biochemistry and pharmacology of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Biochem.Soc.Trans.* 15: 205-208
- Scott, B. S. and K. C. Fisher, 1970. Potassium concentration and number of neurones in cultures of dissociated ganglia. *Exp.Neu* 27:16-22
- Simon, R.P. J.H. Swan, T. Griffiths and Meldrum, B.S., 1984. *Science* 226:850-852.
- Slesinger P.A., J.B. Lansman., 1991. Inactivation of calcium currents in granule cells cultured from mouse cerebellum. *JPhysiol* 435: 101-121

- Sotelo, C. and J. P. Changeaux., 1974. Transsynaptic degeneration 'en cascade' in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice. *BrainRes.* 67:519-526
- Stone T.W., N.R. Burton., 1988. NMDA receptors and ligands in vertebrate CNS. *ProgNeurobiol* 30: 333-368
- Stryer, L., 1988. *Biochemistry*. New York. W. H. Freeman Eds.
- Wakade, A. R., D. Edagar, H. Thoenen., 1983. Both nerve growth factor and high K⁺ concentration support the survival of chick embryo sympathetic neurons. *Exp.CellRes.* 144: 377-384
- Wakade A.R., D. Edgar, H. Thoenen., 1983. Both nerve and growth factor and high K concentration support the survival of chick embryo sympathetic neurons. *ExpCellRes* 144:377-375
- Watkins, J.C. & R.H. Evans., 1981. Excitatory amino acids transmitters. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 21:165-204.
- Wenthold,R.J. and A.R. Altschuler., 1983 in *Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System* (Hertz,L. Kvamme, E., McGeer, E.G. and Schousboe,A. eds.) Alan R. Liss.
- Wenthold, R.J., K.K. Skaggs, R.A. Altschuler., 1986. Immunocytochemical localization of aspartate aminotransferase and glutamine immunoreactivities in the cerebellum. *BrainRes* 363: 371-375
- Wolf, G. & G. Schuenzel., 1987. Glutamate dehydrogenase in aminocidergic structures of the postnatally developing rat cerebellum. *Neurosci.Lett.* 78: 7-11
- Young, J.Z., 1975. *The Life of Mammals*. 2nd ed; Clarendon Press. Oxford, 528 pp
- Young, A.B., G. E. Fagg., 1990. Excitatory aminoacid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *EAA Pharmacol.* 42-48