

113  
2es.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PARTICIPACION DEL CALCIO EN LA ACCION DEL NMDA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINASA EN CELULAS GRANULARES DE CEREBELO EN CULTIVO.**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**B I O L O G O**  
**P R E S E N T A:**

**MARIA ALEJANDRA OLVERA MARTINEZ**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**

**MEXICO, D.F.**

**JULIO DE 1986**

**FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
División de Estudios  
Profesionales  
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo  
revisado el trabajo de tesis que realiz\_ó\_ la pasante \_\_\_\_\_  
OLVERA MARTINEZ MARIA ALEJANDRA

con número de cuenta 8525511-5 con el título: \_\_\_\_\_  
"PARTICIPACION DEL CALCIO EN LA ACCION DEL NMDA SOBRE LA ACTIVIDAD  
DE LA GLUTAMINASA EN CELULAS GRANULARES DE CEREBELO EN CULTIVO"

Consideramos que reúne\_\_\_ los méritos necesarios para que pueda conti-  
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -  
BIOLOGO \_\_\_\_\_.

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

Dr. JULIO EDUARDO ROQUE	MORAN	ANDRADE	<i>FIRMA</i> 
Director de Tesis			
Dr. OCTAVIO	QUESADA	GARCIA	
Dr. ROBERTO	SANCHEZ	OLEA	<i>Roberto Sanchez Olea</i>
M. en C. LAILA	GUTIERREZ	KOBEL	<i>Laila Gutierrez Kobel</i>
Suplente			
Dra. PATRICIA	RAMOS	MORALES	
Suplente			

Ciudad Universitaria, D.F., a 3 de mayo

de 1995

Con profunda admiración y respeto, dedico este trabajo a mis padres, por su amor, entusiasmo, dedicación y apoyo de siempre.

A mis hermanos,

José, Lino, Gerardo, Alberto,

Paty y Miguelito,

por su esfuerzo de seguir adelante siempre juntos, de manera firme y positiva.

A Miguel Ángel, mi compañero y amigo de hoy y siempre, por su alegría, amor y apoyo incondicional.

A DADA, por quien este trabajo ha adquirido para mí aún más valor del que por sí sólo ya tiene.

Al Dr. Julio Morán, por su tiempo y dedicación.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL  
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS DEL  
INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR DE LA  
UNAM, BAJO LA DIRECCION DEL DR. JULIO  
MORAN ANDRADE.**

## INDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCION .....</b>	<b>2</b>
2.1 Desarrollo del Sistema Nervioso.....	2
2.1.1 Desarrollo del cerebelo.....	8
2.2. Neuroquímica del cerebelo .....	12
2.3 Aminoácidos excitadores .....	14
2.3.1 Receptor tipo NMDA .....	17
2.3.2 Neurotoxicidad de los aminoácidos excitadores.....	18
2.3.3 Metabolismo de los aminoácidos excitadores.....	21
2.4 Acción trófica de aminoácidos neuroactivos.....	24
2.5 Papel del calcio en el Sistema Nervioso Central.....	26
2.5.1 Distribución intracelular .....	28
2.5.2 Importancia y clasificación de los Canales de calcio sensi- bles a voltaje.....	28
2.5.3 Sistemas de regulación de calcio intracelular .....	32
2.5.4 Liberación de calcio a partir de reservorios intracelulares	35
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>36</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
4.1 Cultivos celulares primarios .....	37
4.2 Cuantificación de la actividad de la GAF.....	38
4.3 Medición de la sobrevivencia celular mediante la técnica de reducción del MTT.....	39
4.4 Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.....	40
4.5 Análisis estadístico.....	40

<b>5. RESULTADOS</b> .....	41
5.1 Efecto del NMDA sobre células granulares.....	41
5.1.1 Efecto en la morfología.....	41
5.1.2 Efecto del NMDA en la actividad enzimática .....	43
5.2 Dependencia del Ca <sup>++</sup> en el efecto del NMDA.....	44
5.2.1 Efecto de quelantes de Ca <sup>++</sup> extracelular.....	44
5.2.2 Efecto de concentraciones altas de Ca <sup>++</sup> extracelular.....	46
5.2.3 Efecto del ionóforo A23187 sobre la actividad de la GAF..	46
5.2.4 Papel de los CCSV en el efecto del NMDA.....	49
5.2.5 Calcio intracelular.....	53
5.2.5.1 Reservorios de Ca <sup>++</sup> sensibles a dantroleno.....	54
5.2.5.2 Efecto de la cafeína.....	55
5.3 Papel del sistema calcio-calmodulina.....	56
<b>6.DISCUSION</b> .....	57
<b>7.CONCLUSIONES</b> .....	62
<b>8. REFERENCIAS CONSULTADAS</b> .....	63

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

AAT	Aspartato Aminotransferasa
AMPA	Acido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolepropiónico
APV	Acido Fosfonoaléxico (Acido Fosfonopentanoico)
BAPTA	Acido bis-(o-aminofenoxi)-etano-N,N,N',N'-tetracético
BAPTA.AM	Acetoximetil éster del ácido bis-8o-aminofenoxi)-etano-N,N,N',N'-tetracético
Bay-K	(+) BAY-K 8644
CaM	Sistema Calcio Calmodulina
CCSV	Canales de Calcio Sensibles a Voltaje
CGE	Capa Granular Externa
D-AP <sub>7</sub>	D-ácido 2-amino-7-fosfonopropiónico
DHPs	Dihidropiridinas
DIV	Dias In Vitro
EGTA	Acido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil eter)N,N,N',N'-tetracético
GABA	Acido $\gamma$ -aminobutírico
GAD	Glutamato Descarboxilasa
GAF	Glutaminasa activada por fosfato
GLDH	Glutamato deshidrogenasa
GS	Glutamino Sintetasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
LTP	Potenciación a largo plazo (Long Term Potenciation)
MK-801	(5)-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imino maleato
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
NGF	Factor de crecimiento neural (Nerve Growth Factor)



<b>NMDA</b>	<b>Acido N-metil-D-aspártico</b>
<b>PBS</b>	<b>Solución salina amortiguada con fosfatos</b>
<b>PCP</b>	<b>Fenciclidina</b>
<b>PKC</b>	<b>Proteína cinasa C</b>
<b>RE</b>	<b>Retículo Endoplásmico</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema Nervioso Central</b>
<b>W<sub>7</sub></b>	<b>N-(6-Aminohexil)-5-chloro-1-Naphthalene sulfonoamide</b>

## 1. RESUMEN.

*Innumerables eventos en la vida de todos los organismos se encuentran de alguna manera regulados por el calcio. Esta entidad química ha resultado sumamente interesante en múltiples estudios relacionados no sólo con el Sistema Nervioso Central, sino con el organismo en general. Se sabe que el calcio interviene en el movimiento celular, mitosis, secreción, endocitosis, y contracción, por mencionar algunas funciones. Pues bien, dentro del SNC, además de desempeñar algunas de las funciones mencionadas anteriormente, recientemente se ha sugerido que este puede tener alguna participación importante en el efecto trófico producido por el NMDA, por lo que en el presente estudio se analizó su participación.*

*Los resultados obtenidos, confirmaron la importancia del calcio para que se lleve a cabo el efecto trófico del NMDA. Por un lado se demostró que se requiere del calcio proveniente del medio extracelular y que éste no penetra a la célula a través de los canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV), sino que ocurre mediante el canal acoplado al receptor. Por otro lado, encontramos que el  $\text{Ca}^{++}$  proveniente de reservorios intracelulares es muy importante, aunque proporcionalmente menos que el calcio extracelular en el proceso de diferenciación neuronal inducido por NMDA.*

*Finalmente demostramos que el mecanismo de acción del  $\text{Ca}^{++}$  en la glutaminasa activada por fosfato (GAF) no involucra al sistema  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina, por lo que se sugiere que el mecanismo podría estar relacionado con otro sistema de segundos mensajeros.*

## **2. INTRODUCCION.**

### **2.1 Desarrollo del Sistema Nervioso.**

Durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central se forman tres capas blastodérmicas conocidas como mesodermo, endodermo y ectodermo, las cuales darán lugar a los distintos tejidos que conforman al organismo. Es el ectodermo el que dá lugar al sistema nervioso, específicamente la parte conocida como neuroectodermo. La notocorda (o corda) es la estructura que induce a la competencia de tejidos para formar el tubo neural. Esta estructura se origina a partir del mesodermo cordal y queda en posición ventral al tubo neural en estado embrionario.

El desarrollo del SNC comienza con la inducción de la notocorda y el mesodermo paracordal sobre el neuroectodermo para formar la placa neural. Esta influencia está mediada por una serie de sustancias tales como el factor mesodermizante 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 del mismo tipo (Young, 1975).

La fusión del tubo neural comienza en la cuarta somita y continúa en dirección cefálica y caudal, sin embargo, en los extremos craneal y caudal esta fusión se retarda originando los neuroporos anterior y posterior, los cuales comunican al tubo neural con la cavidad amniótica sufriendo posteriormente una obliteración para así cerrar el tubo nervioso (Balinski, 1978) (Fig. 1).

La porción más anterior de la notocorda (precorda) induce la formación del encéfalo , mientras que la porción caudal, la formación de la médula espinal (Fig. 1).

### CIERRE DE LOS NEUROPOROS

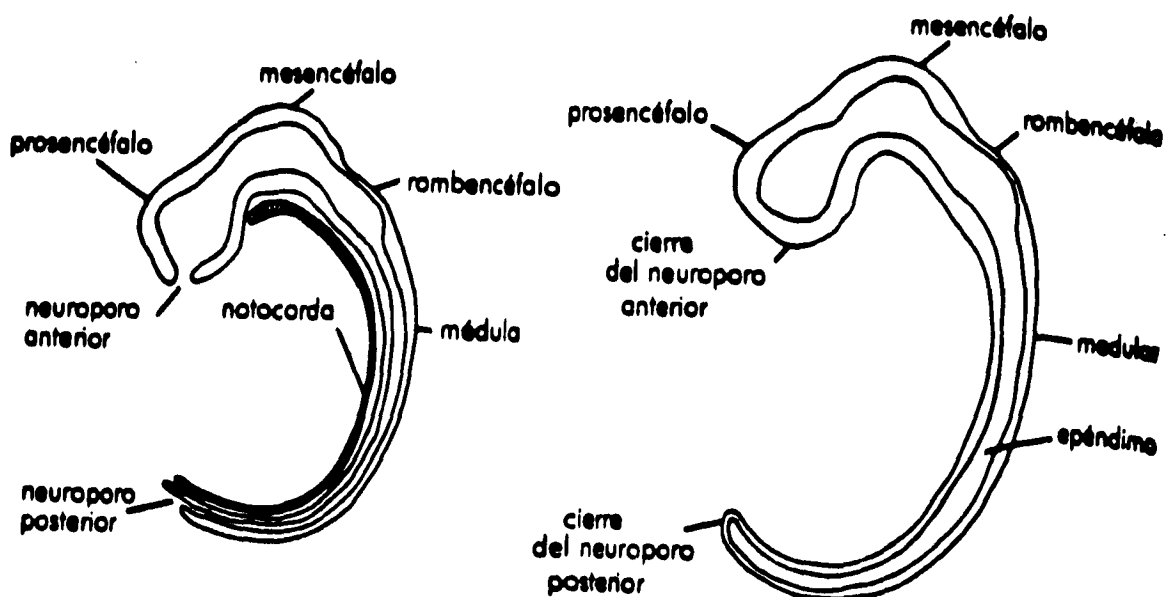


Fig.1. Desarrollo del SNC en humanos. Las últimas partes del tubo neural que se cierran se denominan neuroporo anterior y posterior y lo hacen en la etapa de 20 a 25 somitas. Al concluir la cuarta semana termina el cierre del tubo neural. Como se puede apreciar en la figura, las dos terceras partes del SNC darán origen a las vesículas cerebrales y el tercio caudal a la médula espinal.

Cuando el tubo nervioso está constituido, las células del epitelio germinativo proliferan activamente formando una gruesa capa periependimaria. Estas células migran ligeramente hacia la periferia separándose unas de otras, agrupándose en amasijos y formando el conjunto que constituye el manto, esbozo de lo que será la sustancia gris (Fig 2a). Durante estos eventos se inicia la diferenciación celular (Fig 2b).

Las células epiteliales que bordean 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 que se diferenciarán 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 (Fig 3).

Por otra parte, la cresta produce dos tipos de neuroblastos que darán lugar a las células de la raíz dorsal y a las células ganglionares simpáticas.

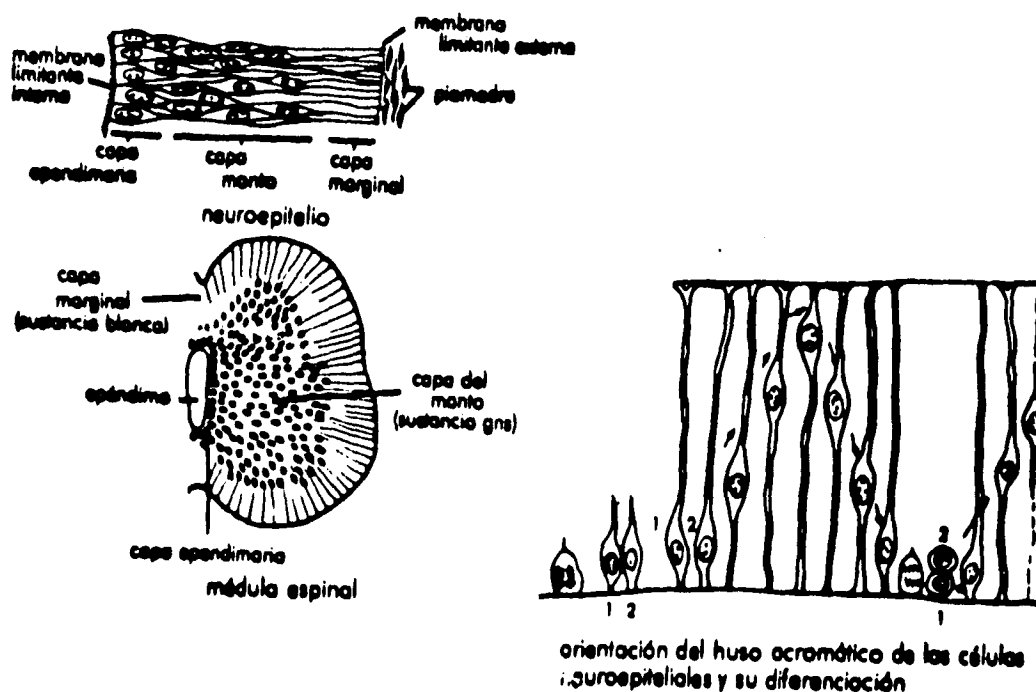
En general, durante la neurogénesis de los vertebrados se pueden distinguir seis fases:

a) Proliferación. Durante esta fase las células pasan por una serie de divisiones mitóticas sucesivas que darán lugar a un grupo de células indiferenciadas cuyas características son las mismas.

b) Migración. Una vez que se ha terminado el proceso anterior, las células cambian del sitio donde se originaron para ubicarse en el sitio definitivo donde se diferenciarán. La mayoría de las células que inician la migración son postmitóticas, con algunas excepciones, tales como las células granulares del cerebelo, las que después de la primera migración se vuelven a dividir para nuevamente migrar (Ito, 1984). Durante esta fase, se ha observado que existen factores sintetizados por la glía los cuales son capaces de promover la migración, y aún más, que la sola presencia de éstos es determinante para que se lleve a cabo la migración (Rakic, 1971).

## HISTOGENESIS DEL SNC

### 2a. Histogénesis del tubo neural



### 2b. Orientación del huso acromático

Fig. 2. Histogénesis del SNC. a) En la superficie del manto, las prolongaciones celulares forman la capa marginal. A nivel de la médula espinal, la capa ependimaria queda como una sola capa de células, que conserva el nombre de capa ependimaria; el manto será la sustancia gris y la marginal, la sustancia blanca. b) Orientación del huso cromático de las células neuroepiteliales y su diferenciación (tomado de Ontogenia neural, 1991).

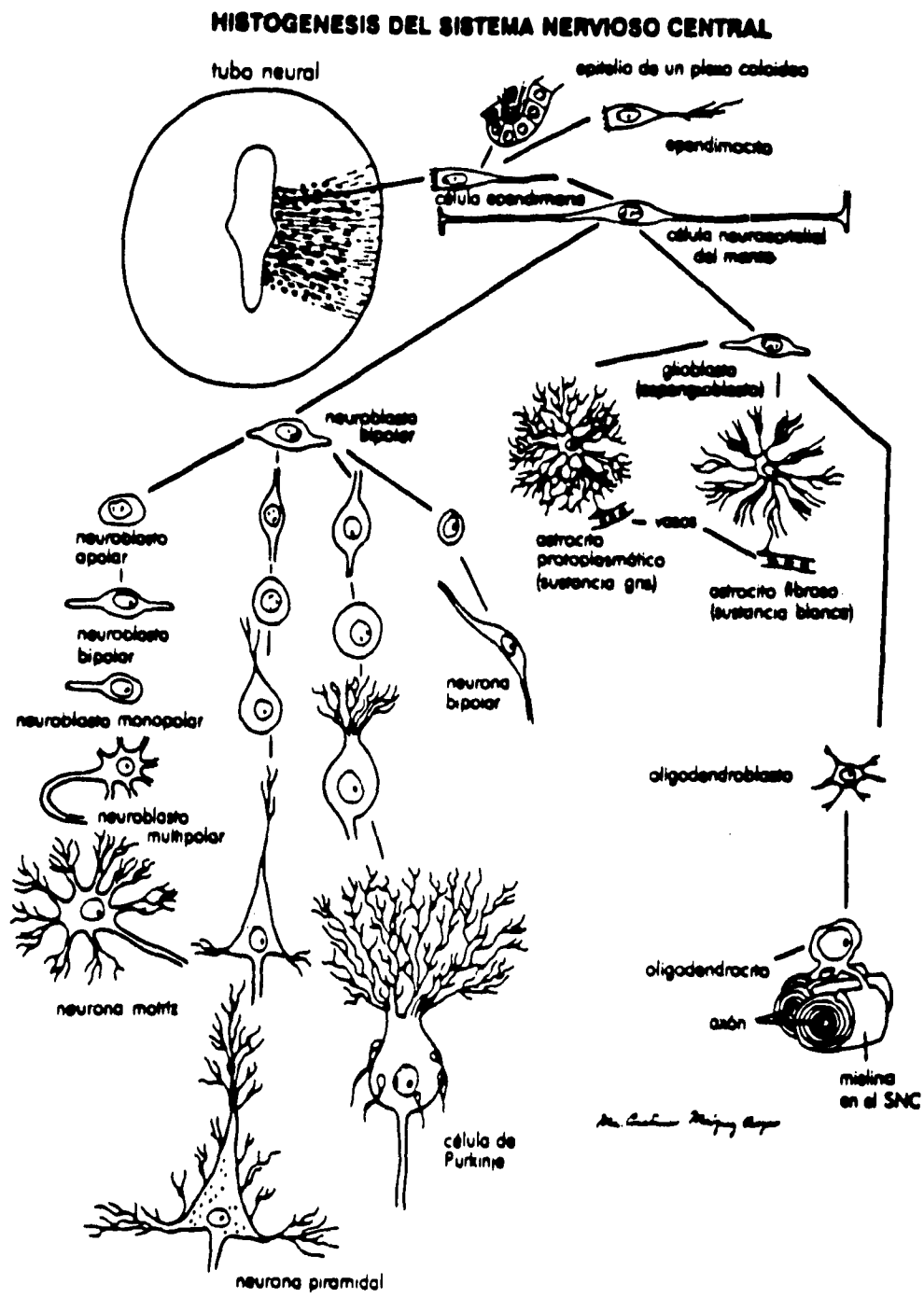


Fig. 3. Histogénesis del SNC. Se representan aquí sólo algunas de las células derivadas de los glioblastos (espongioblastos) y de los neuroblastos, debido a que ambas experimentan una diversificación extraordinaria (Vazquez Nin, et. al., 1991).

c) **Diferenciación.** En general este evento consiste en la expresión e inhibición de genes regulada por señales ambientales coordinadas en el tiempo y en el espacio, sin embargo, no es un proceso que produzca en el caso de las neuronas, solamente un tipo celular con características comunes a todas las neuronas que comparten ciertos rasgos comunes, de hecho cuando se diferencian se está creando, desde el punto de vista cuantitativo, tanta diversidad como en el resto del embrión (Vazquez Nin, et al, 1991). La primera evidencia que permite distinguir a una célula que va a diferenciarse en neurona es la adquisición de una forma bipolar, momento en el cual pierde su capacidad mitótica (Young, 1975).

d) **Formación de sinapsis.** Se refiere al comienzo de la formación de contactos interneurales, una vez que las células ya han pasado por todos los eventos anteriores.

Estos eventos se llevan a cabo en todas las regiones del SNC en todos los vertebrados. Cabe mencionar que estas fases 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 una de ellas.

e) **Muerte celular.** En esta fase muchas de las células que no llegan a completar el proceso de diferenciación mueren. La muerte neuronal es considerada como un proceso natural, algunos han sugerido que las neuronas son capaces de competir por un número limitado de contactos sinápticos en las células blanco, por lo que de esta manera un número de estas células es eliminado (Oppenheim, 1991).

f) **Eliminación de procesos.** Se refiere a la muerte neuronal como un tipo de eliminación de células defectuosas para crear ambientes permisivos con el objeto de que se lleve a cabo el crecimiento axonal (Kallen, 1965, Hankin et al, 1988).



### 2.1.1 Desarrollo del cerebelo.

El cerebelo ha sido estudiado por muchos neurobiólogos dadas sus características estructurales, su arquitectura laminar y su número reducido de tipos celulares, por lo que se ha podido profundizar en las transformaciones morfológicas y los procesos que ocurren durante el desarrollo. Por eso se considera un sistema ideal para el estudio posterior de los mecanismos básicos involucrados en el desarrollo neural (Burgoyne y Cambray, 1988).

El cerebelo surge como un engrosamiento bilateral de la placa alar de la porción metencefálica del tubo neural. Las dos placas cerebelares se fusionan gradualmente a lo largo de una 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 las células gliales de la matriz celular ventricular de las placas cerebelares.

Las células granulares, en canasta y estrelladas, así como otras de la glía, se derivan a partir de la capa germinal externa (CGE), cercana a la superficie externa de las placas cerebelares. De estas dos zonas las células migran en direcciones contrarias y forman las unidades estructurales del cerebelo maduro (Ito, 1984).

Una de las principales entradas nerviosas al cerebelo se dá mediante las sinápsis excitadoras que se establecen entre las células granulares (objeto de nuestro estudio) y las fibras musgosas cuyos somas se encuentran entre el puente y la médula (Eccles, 1973). Se ha observado que cada célula granular posee de tres a seis pequeñas dendritas que realizan contactos 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.

Durante el desarrollo del cerebelo, las células precursoras de las granulares y de las de Golgi, se forman a partir de un grupo de células del manto que emigran del techo del cuarto ventrículo, hacia la parte superficial. Estas células descienden para originar las células granulares y de Golgi, dejando libre la superficie que posteriormente 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.

Las células estrelladas tienen el mismo origen, aunque su diferenciación comienza a partir del día 8-11 postnatal (Altman, 1972 [a y c]).

Por otro lado, 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 una 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, 1984).

La corteza del cerebelo adulto queda conformada finalmente de la siguiente manera:

- 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 células de Golgi) (Fig. 4).

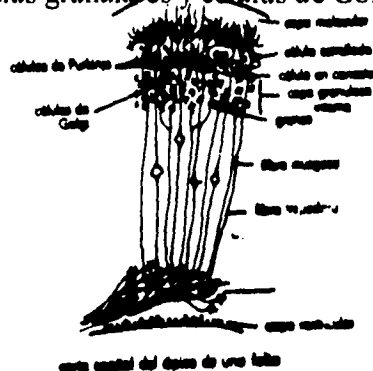


Fig. 4. Cerebelo adulto. Se muestra un corte sagital con la conformación final del cerebelo adulto.

Como ya se ha mencionado, uno de los modelos más utilizados en los estudios del desarrollo ha sido el cerebelo de rata, debido a los amplios conocimientos que se tienen acerca de su anatomía, además de que se conoce muy bien la histología del cerebelo tanto en el adulto como en los primeros estados del desarrollo (Fig.5).

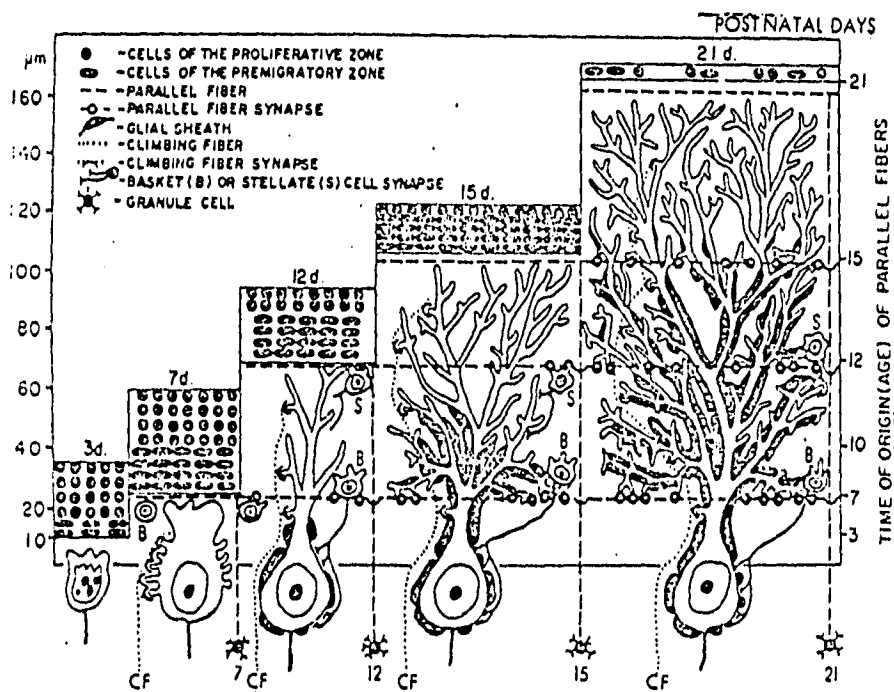


Fig. 5. Representación del desarrollo de las capas del cerebelo. Se muestra la evolución ontogénica de la CGE en la rata.

Otro aspecto importante de este modelo es el hecho de que se pueden obtener cultivos primarios de células disociadas como en el caso de las células granulares, 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 utilizando técnicas específicas pueden seleccionarse las células granulares inmaduras que *in vitro* 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. Esta capa persiste hasta el día 21 postnatal y se divide en dos zonas: una superficial de proliferación y una inferior o premigratoria.

Los procesos de migración y proliferación ocurren durante este período 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; el proceso dura aproximadamente tres días y en la mayoría se inicia a partir del sexto día postnatal, sin embargo, algunas comienzan a migrar desde los primeros días postnatales. Durante la migración las 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 cual 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 sinápsis 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.

Se ha observado que durante la migración de las células granulares se establece una estrecha relación entre éstas 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, Rakic y Sidman, 1973). Se ha propuesto que la relación entre la glía y estas neuronas es de tipo física ya que en ausencia de la glía de Bergmann el proceso de migración de las células granulares se realiza con dificultad (Altman, 1975).

## 2.2 Neuroquímica del cerebelo.

Algunas evidencias tanto bioquímicas como electrofisiológicas muestran que un grupo de neuronas del cerebelo utilizan al ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) como neurotransmisor. Tal es el caso de las células de Golgi, de Purkinje, en canasta y estrelladas, donde se ha observado que las respuestas producidas por estas células pueden ser bloqueadas por la acción de antagonistas específicos al receptor GABA como es el caso de la bicuculina. Además, se ha demostrado que las células con las que hacen contactos poseen numerosos receptores sinápticos a GABA (Ito, 1984).

Las células granulares que nos interesan en este estudio utilizan al ácido glutámico como neurotransmisor (Young et al, 1984, 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 calcio, antagonizada por magnesio y estimulada por una depolarización por potasio (Sandoval y Cotman, 1978, Levi et al, 1982).

Existen evidencias de que una parte de las entradas sinápticas que reciben las neuronas granulares son excitadoras y provienen de las fibras musgosas (Fig 5). Estas conexiones pueden ser colinérgicas (Kasa y Silver, 1969), aunque una gran proporción de éstas utilizan al ácido glutámico como neurotransmisor (Somogi et al, 1986). Por lo tanto el glutamato puede interactuar

con los receptores a aminoácidos excitadores que poseen las células granulares, entre los cuales se encuentran aquellos que son sensibles al ácido N-metil-D-aspartico (NMDA).

Por otra parte 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 estrelladas y en canasta realizan sinápsis con las células de Purkinje, las cuales reciben entradas excitadoras de las fibras trepadoras provenientes de la ojiva inferior; dicha excitación se encuentra mediada por del ácido aspártico o glutámico. El extenso árbol dendrítico de las células de Purkinje y las de Golgi realizan contactos con las fibras paralelas (Fig. 6).

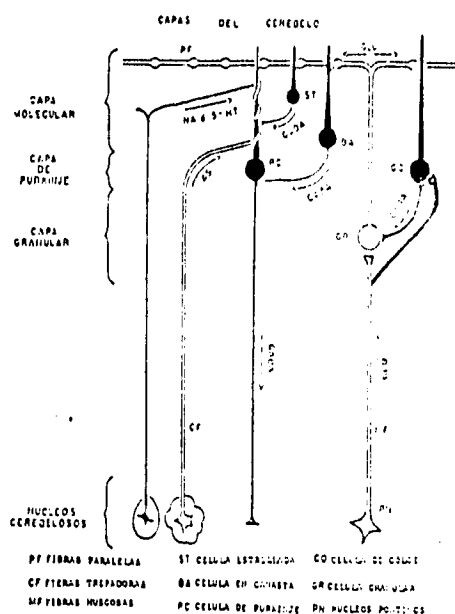


Fig. 6. Tipos celulares presentes en el cerebelo adulto y el neurotransmisor que utilizan. Se muestran también los núcleos profundos del cerebelo y las aferentes provenientes de la médula espinal.

### 2.3 Aminoácidos excitadores.

Como se mencionó anteriormente, las células granulares utilizan al ácido glutámico como neurotransmisor y además poseen receptores sinápticos a estos aminoácidos, por lo que a continuación se hace una descripción más detallada de los aminoácidos excitadores (AAE).

Se sabe que el L-glutamato y el L-aspartato son los principales aminoácidos excitadores en el sistema nervioso central de los vertebrados y al parecer los neurotransmisores más ampliamente distribuidos en el SNC de los mamíferos (Fonnum, 1984).

La idea inicial de que el ácido glutámico podría actuar como neurotransmisor surgió en 1960, aunque años atrás ya se había resaltado la idea de que la concentración del ácido glutámico en el cerebro era mucho más elevada que en los demás tejidos. En la actualidad no cabe duda de que el glutamato se puede considerar como un neurotransmisor, debido a que cumple con todos los criterios estipulados para que una sustancia pueda actuar como tal, esto es: se conoce su presencia en las terminales nerviosas, se sabe que se sintetiza en la neurona, que posee una acción fisiológica en las células postsinápticas y que responde de manera específica ante la acción de agonistas y antagonistas específicos. Además, este compuesto se libera específicamente por medio de estímulos fisiológicos a concentraciones suficientemente altas como para obtenerse una respuesta postsináptica.

También, se tienen evidencias inmunohistoquímicas de la localización y alta concentración de enzimas relacionadas con la síntesis de ácido glutámico en estructuras glutamatérgicas (Altschuler et al, 1981; Young and Fagg, 1990) y de la liberación del glutamato en estudios *in vivo* (Fonnum, 1984).

Por otra parte, con el desarrollo de la técnica de iontoforesis se logró demostrar en preparaciones fisiológicas que el glutamato tiene un poderoso efecto excitador sobre la mayor parte de las neuronas del SNC. Estos estudios llevaron a suponer que los ácidos glutámico y aspártico podrían ser los aminoácidos excitadores primarios en este sistema (López-Colomé, 1983).

A partir de numerosos estudios farmacológicos y electrofisiológicos, se ha demostrado que los aminoácidos excitadores ejercen sus funciones fisiológicas a través de distintos subtipos de receptores (que han sido reconocidos utilizando una serie de fármacos que se unen específicamente a ellos). De esta manera, se han caracterizado 5 diferentes tipos de receptores a AAE; el sensible al ácido kaínico (AK), el activado por el ácido quisquálico (AQ), el sensible a N-metil-D-aspartato (NMDA), el modulado por el ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP<sub>4</sub>) y el receptor sensible al ácido trans-1,3-dicarboxílico-1-aminociclopentano (AMPA) (Fig. 7).

Los cuatro primeros son ionotrópicos, es decir, la unión del neurotransmisor a su receptor abre o cierra un canal iónico, mientras que el último es metabotrópico, ya que la interacción del neurotransmisor con el receptor induce una serie de reacciones enzimáticas que involucran a segundos mensajeros.

También, de manera general, se puede decir que los receptores a AAE, se clasifican en dos tipos: aquellos sensibles al aminoácido exógeno NMDA (receptores del tipo NMDA) y aquellos que no lo son (receptores tipo no-NMDA) (Watkins et al, 1990).



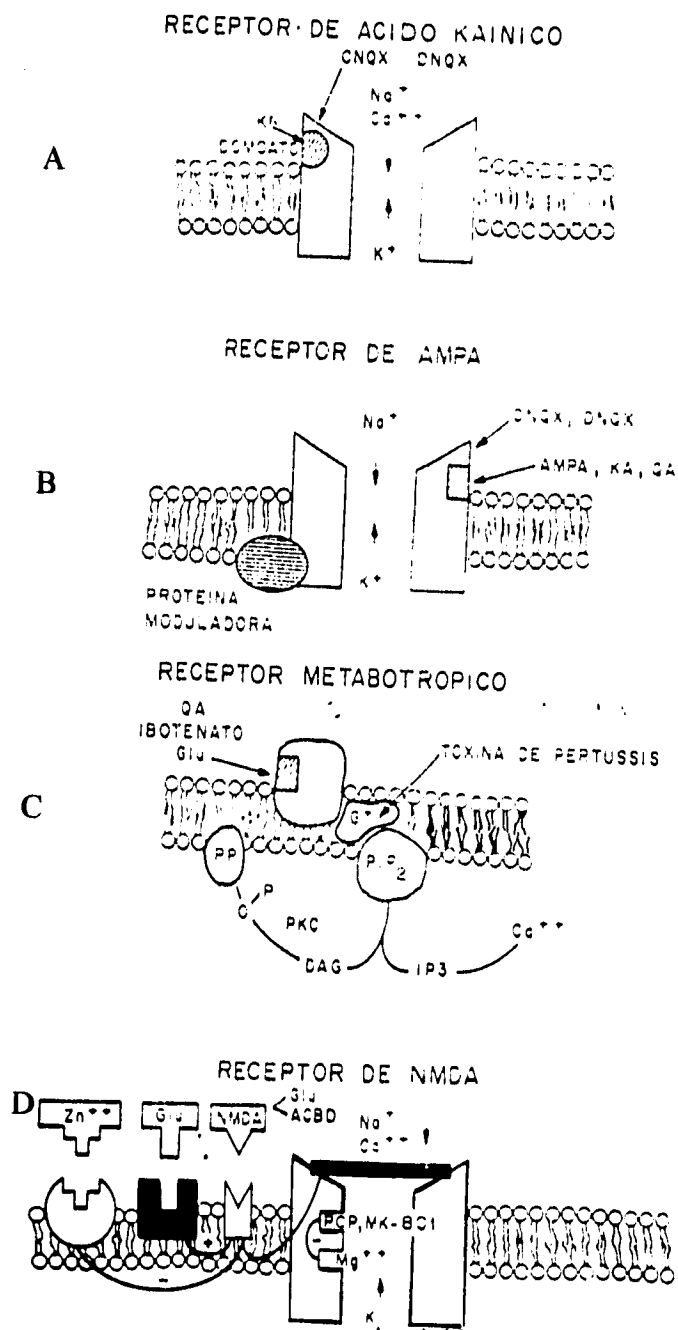


Fig. 7. Modelos esquemáticos de los receptores a aminoácidos excitadores con los iones y las drogas que interactúan con cada uno de ellos (Reynolds and Miller, 1988; Young and Fagg, 1990).

### 2.3.1 Receptor tipo NMDA.

De todos los receptores a aminoácidos excitadores, la estructura molecular del receptor a NMDA es la mejor caracterizada. Se sabe que es un complejo molecular que consta de al menos cinco sitios de modulación alostérica. Este receptor posee un canal permeable a sodio (siendo el contraión potasio) y a diferencia del resto de los receptores conocidos (exceptuando el sensible al AK), es permeable a calcio. Dentro de dicho canal se encuentra un sitio al que se une magnesio de manera dependiente de voltaje. En condiciones basales el  $Mg^{++}$  unido al canal inhibe el paso de iones aunque el receptor esté estimulado. Esta inhibición desaparece cuando se aumenta el voltaje de las membranas y el  $Mg^{++}$  sale del canal, esto es, la activación del receptor es dependiente del voltaje (la corriente es regenerativa y se incrementa con la depolarización) (Cotman e Iversen, 1987). El canal del receptor se bloquea con fenciclidina (PCP), MK-801, TCP y quetamina, todos estos son anestésicos disociativos (Kemp, et al, 1987).

El complejo del receptor tiene además dos sitios de modulación: uno que une glicina o serina y otro que une  $Zn^{++}$  (Young and Fagg, 1990). La glicina se une a un sitio insensible a estricnina, actuando como potenciador de la acción del NMDA (Johnson and Ascher, 1987; Patel et al, 1990). De hecho, se ha sugerido que el receptor no funciona si no está ocupado el sitio de la glicina.

Existen también otros sitios de modulación en el receptor, tal es el caso del que corresponde al catión divalente zinc, el cual se ha demostrado, que bloquea selectivamente las corrientes inducidas por NMDA, pero a diferencia del magnesio, no lo hace de una manera dependiente de voltaje. El  $Zn^{++}$  también bloquea el sitio de la PCP de manera diferente a otras clases de antagonistas al NMDA. Esta acción es mimetizada únicamente por dosis altas de algunas estructuras tricíclicas, tales como la desipramina y la prometazina (Lodge and Johnson, 1990).

Los antagonistas de este receptor se han clasificado en competitivos y no competitivos, de acuerdo al sitio del receptor en el que actúan. Los antagonistas competitivos se unen al sitio de reconocimiento del neurotransmisor, mientras que los antagonistas no competitivos actúan a nivel del ionóforo o de los otros sitios acoplados. Algunos ejemplos de los primeros son el APV, CPP, D-AP<sub>7</sub> y, en el caso de los segundos, el MK-801, PCP, Ketamina y Mg<sup>++</sup> ( Monaghan et al, 1989; Reynolds y Miller, 1988) (Fig. 7).

### 2.3.2 Neurotoxicidad de los aminoácidos excitadores.

Se sabe que el glutamato al activar los receptores a NMDA puede actuar como un potente agente neurotóxico. Esto se ha demostrado directamente en cultivos celulares, en los cuales una exposición de 5 min con 100 μM de ácido glutámico puede producir un daño considerable en neuronas corticales (Choi et al, 1987). Estudios *in vitro* han demostrado que la neurotoxicidad causada por el glutamato tiene dos componentes: el primero es la entrada de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> la cual va acompañada de agua, por lo que se ocasiona un hinchamiento agudo de las neuronas (Rothman, 1985; Choi, 1987). El segundo depende de la entrada masiva de calcio extracelular que resulta en la degeneración neuronal total, debido a que la entrada de este catión desencadena una serie de reacciones enzimáticas tales como la activación de proteasas, fosforilasas, deshidrogenasas y otros sistemas enzimáticos que pueden ocasionar graves daños en la célula como son la ruptura de la membrana celular, daño irreversible de las mitocondrias, degradación de proteínas que constituyen el citoesqueleto y activación de otros sistemas enzimáticos capaces de ocasionar reacciones que llevan a la muerte neuronal.

A partir de estos y otros resultados *in vivo* que se han realizado utilizando antagonistas altamente específicos se ha relacionado al receptor NMDA con algunas enfermedades del sistema nervioso tales como la epilepsia, la cual aunque se desconoce su etiología, se sabe que puede ser el resultado de la liberación masiva de aminoácidos excitadores, que pueden causar convulsiones

epilépticas sostenidas (Balász, 1988a), teniendo como consecuencia un deterioro de estructuras importantes que tienen que ver, por ejemplo, con el funcionamiento del sistema motor.

Otra de las enfermedades que se puede relacionar con el efecto tóxico de los aminoácidos excitadores es el mal de Huntington el cual se manifiesta por mal funcionamiento del SNC durante la etapa adulta de los individuos, caracterizándose esta enfermedad porque los afectados presentan movimientos involuntarios y disfunciones mentales, en este caso probablemente debido a la pérdida de neuronas estriatales, lo cual se ha demostrado experimentalmente realizando inyecciones de kainato, glutamato o quinolato en el estriado (Plaitakis et al, 1982).

Otra de las evidencias experimentales que apoyan esta idea es que se ha comprobado que se puede prevenir el daño neuronal ocasionado por isquemia o hipoglucemia, en hipocampo y en núcleo caudado, aplicando antagonistas del receptor a NMDA (Simon et al, 1984). También se han relacionado recientemente a los AAE con enfermedades tales como Alzheimer y SIDA (Lehmann et al, 1990). Es importante destacar que este efecto se encuentra mediado también por un incremento notable en el flujo de  $Ca^{++}$  (Fig. 8).

## AMINOACIDOS EXCITADORES

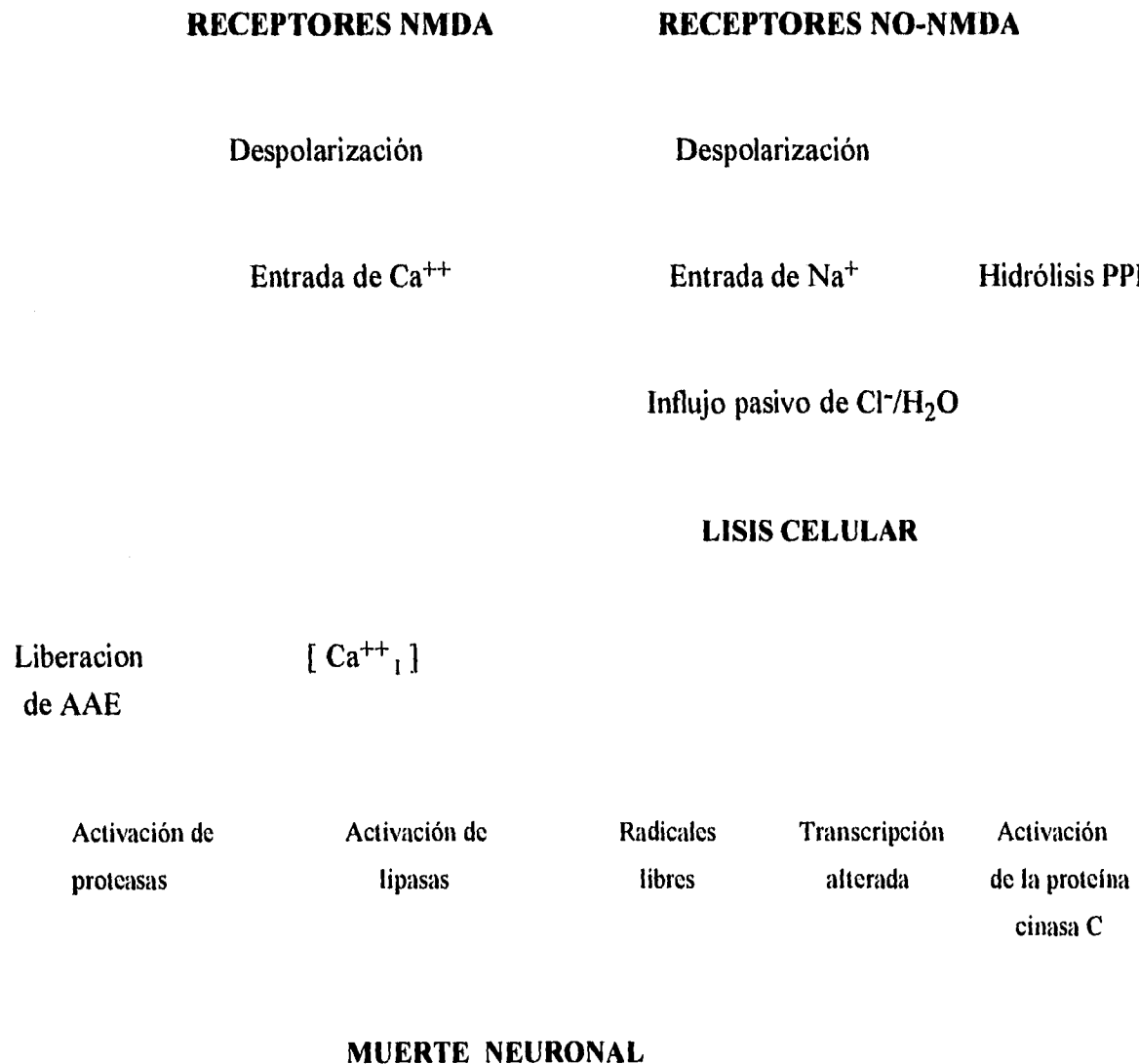
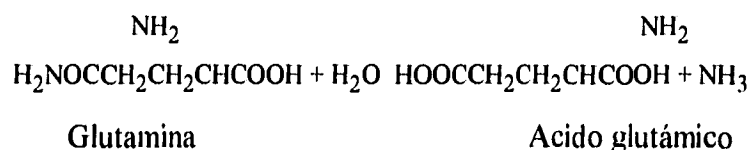


Fig. 8. Mecanismos propuestos para la neurotoxicidad de los AAE (Rothman and Olney, 1987)

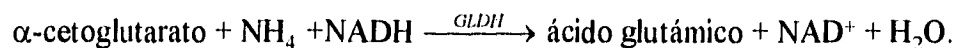
### 2.3.3 Metabolismo de los aminoácidos excitadores.

El ácido glutámico tiene una participación fundamental en diversos procesos fisiológicos tanto en el organismo como en el SNC, ya que no sólo actúa como neurotransmisor sino que además es precursor del principal aminoácido inhibitor (GABA), participa en vías metabólicas secundarias, así como en los procesos de detoxificación por amonio.

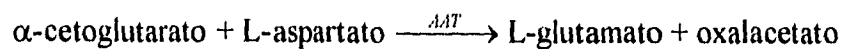
En el SNC las células gliales se encargan de convertir parte del ácido glutámico liberado como neurotransmisor en glutamina a través de una reacción catalizada por la enzima glutaminosintetasa (GS). Esto constituye no sólo una de las formas inactivación de este neurotransmisor, sino que sirve para que posteriormente la glutamina que se forma por medio de este proceso pueda ser transferida a las neuronas donde será nuevamente transformada en glutámico, mediante la acción de la enzima glutaminasa activada por fosfato (GAF) (Hamberger et al, 1979; Patel et al, 1982). La reacción de esta enzima se presenta a continuación:



Existen otras vías a través de las cuales se sintetiza este transmisor, una de las cuales es por la incorporación de nitrógeno al  $\alpha$ -cetoglutarato, vía la deshidrogenasa del ácido glutámico (GLDH):



Otra de las enzimas involucradas en la síntesis del ácido glutámico como neurotransmisor es la aspartatoaminotransferasa (AAT) cuya localización es mitocondrial y citoplásmica a diferencia de la GAF que es mitocondrial, lo mismo que la glutamato deshidrogenasa (Strayer, 1988). En estudios recientes se ha propuesto que no sólo la GAF participa en el proceso de síntesis, sino que además actúa de manera concertada con la AAT. La reacción que cataliza la AAT es la siguiente:



Es importante mencionar que aunque existen otras vías metabólicas que sintetizan glutamato como la catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), glutamato sintetasa, etc., parece ser que sólo el glutamato sintetizado por la GAF en combinación con la AAT, es utilizado como neurotransmisor. Es decir, que existe una compartimentalización metabólica para el glutámico y por lo tanto estas enzimas, GAF y AAT, pueden ser consideradas como marcadores específicos de neuronas glutamatérgicas (Palaiologos et al, 1989) (Fig. 9).

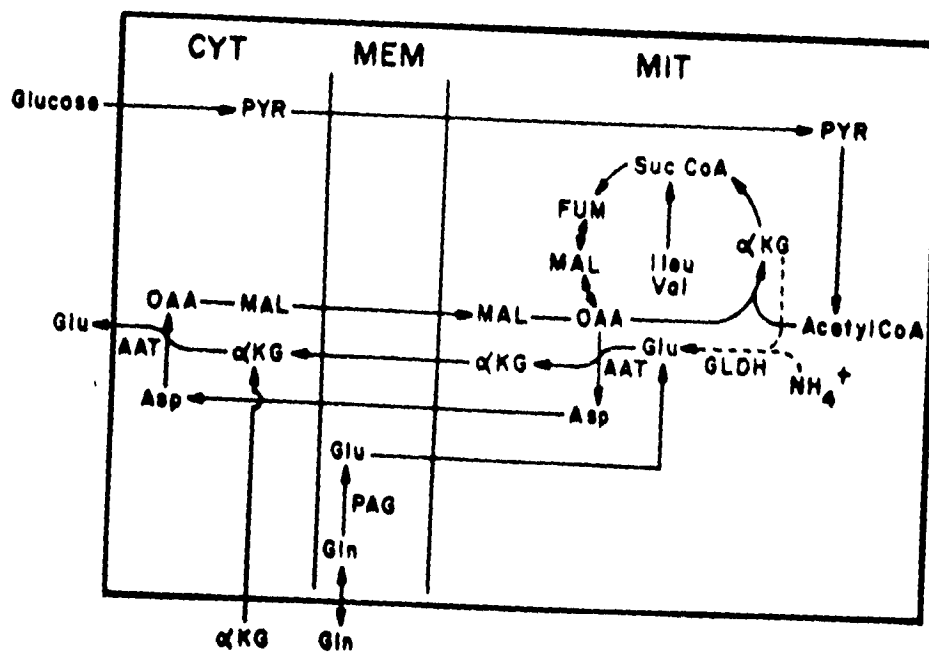


Fig. 9 Esquema de las vías citoplásmicas y mitocondriales alternativas en la síntesis del Glu. En esta figura se muestra cómo las enzimas AAT y GAF deben funcionar de manera concertada para sintetizar el Glu utilizado como neurotransmisor.



## 2.4 Acción trófica de aminoácidos neuroactivos.

Se sabe que durante el desarrollo del SNC algunos factores producidos por las neuronas y las células gliales influyen de manera determinante para que se lleven a cabo una serie de eventos durante el desarrollo, tales como la migración, sobrevivencia y sinaptogénesis. Estas sustancias son conocidas como factores tróficos.

En el caso del cerebelo, aún no se conoce bien el papel de los factores tróficos durante su desarrollo. Se tienen algunas evidencias, sin embargo, de que otras moléculas como las hormonas tiroideas T3 y T4 son indispensables para estimular la agregación celular, fasciculación de neuritas y sobrevivencia de las neuronas granulares, aunque se requiere de un factor adicional que se encuentra en el suero (Serafian and Verity, 1986). Por otro lado, se sabe también que la sobrevivencia de las células se ve afectada por insulina (Huck, 1983), por lo que se ha sugerido que alguna molécula relacionada con ésta podría ser un factor trófico endógeno.

Más recientemente se ha propuesto que otros compuestos neuroactivos como los neurotransmisores podrían tener una acción trófica durante el desarrollo de las células granulares. Un ejemplo es el caso del GABA, el cual promueve el desarrollo de neuritas, la formación de cúmulos y principalmente la expresión de receptores sinápticos de GABA (Hansen et al, 1984).

Dentro de los neurotransmisores excitadores, el glutamato parece tener una acción trófica clara, particularmente en las células granulares, las cuales como ya se ha mencionado poseen receptores a aminoácidos excitadores incluyendo 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 éstas (Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988). Además se tienen evidencias de que la estimulación del receptor tipo NMDA promueve la sobrevivencia de las células mediada por una despolarización ocasionada por glutamato *in vivo* o por K<sup>+</sup> *in vitro* (Bálazs and Jorgensen, 1990; Bálazs et al, 1988), lo cual no sucede cuando se utiliza ibodenato o quinolenato.

Como ya se ha mencionado, el efecto trófico del NMDA es dependiente además, del grado de depolarización que exista en la membrana y del estado de desarrollo en que se encuentren las neuronas, ya que este efecto se lleva a cabo entre los 2 y 4 días *in vitro*, y se mimetiza con una elevación en la concentración de  $K^+$  extracelular de 25 mM. El aporte de NMDA para promover la sobrevivencia de las células granulares en un período de 2-3 DIV, corresponde al mismo tiempo en el cual las células granulares se diferencian y migran hasta la capa granular interna y reciben los impulsos glutamatérgicos *in vivo* (Altman, J. 1972). La entrada de  $Ca^{++}$  a través de los canales asociados al receptor y/o de los canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV) y (debido a la depolarización producida en un medio que contiene 25 mM de  $K^+$ ) probablemente, fundamenta el hecho de que este efecto trófico es dependiente de la concentración de calcio. Por otra parte, la posibilidad de que la hidrólisis de los fosfolípidos de inositol pudiera contribuir a los efectos tróficos observados con el NMDA debe estudiarse, debido a que las respuestas de estos en presencia de NMDA son particularmente potentes en cultivos de células granulares (Nicoletti, et al, 1986).

Cabe destacar que los estudios que se han realizado en la retina de rana en desarrollo han arrojado resultados muy similares, ya que la activación de los receptores a NMDA promueve un mayor desarrollo del árbol dendrítico, el cual se inhibe en presencia de antagonistas como el APV o el MK-801 (Hollis y Constantine-Paton, 1990). Así mismo, se sabe que para el caso del glutamato la exposición prolongada durante el desarrollo a antagonistas de AAE, puede retardar potencialmente cambios en la maduración de las células producidas por glutamato e interfiere con el desarrollo normal del SNC.

Las evidencias mencionadas anteriormente junto con muchísimas más demuestran que en efecto, los aminoácidos excitadores tienen un efecto trófico en este tipo neuronal, sin embargo, existen algunas evidencias de que este solo es temporal durante la vida de las células granulares y que sólo se manifiesta durante el período inicial de estas ya que se ha demostrado también (Garthwaite et al, 1986, 1987) que la activación a este tipo de receptor puede inducir o no daño celular ya que como se aclara más adelante este tipo de aminoácidos también pueden ser la causa de la toxicidad en estos tipos celulares.

Es importante señalar que en el efecto ambifuncional, trófico y tóxico que poseen los aminoácidos excitadores, el calcio tiene un papel sumamente interesante. Se ha propuesto que ambos efectos se encuentran mediados por el mismo mecanismo, es decir, un notable incremento en el flujo de  $Ca^{++}$  (Rothman and Olney, 1986; Garthwaite, 1986; Choi, 1988).

Sin embargo, aún se tienen muchas dudas acerca del mecanismo a través del cual este ión participa en ambos fenómenos.

## 2.5 Papel del calcio en el Sistema Nervioso Central.

En muchos de los procesos metabólicos el calcio juega un papel sumamente interesante y el sistema nervioso central no es, en este sentido, la excepción. Por ejemplo, se sabe que muchas de las actividades celulares son reguladas por un equilibrio de unión del calcio citosólico libre con moléculas receptoras específicas, tales como el sistema calcio-calmodulina, del cual se hablará posteriormente.

Por otra parte, para que las neuronas lleven a cabo su comunicación han desarrollado mecanismos especializados de señales, en muchos de los cuales el calcio es fundamental. Por ejemplo, se conoce desde hace varios años que dentro del proceso de la neurotransmisión es indispensable una elevación en la concentración del calcio intracelular para que se lleve a cabo la liberación de los neurotransmisores.

Además, se conoce también que una forma de facilitación de la transmisión sináptica puede involucrar mecanismos dependientes de calcio en lo que se refiere a la regulación de las vesículas que se fusionan con la membrana presináptica durante cada impulso eléctrico en la terminal. Muchos canales iónicos que intervienen en la frecuencia y duración de las respuestas eléctricas en las neuronas se encuentran directa o indirectamente regulados por  $\text{Ca}^{++}$  a través de las cinasas y fosfatasa dependientes de éste.

Otro de los eventos en los cuales interviene el calcio es durante el desarrollo, permitiendo al cono axónico el movimiento hasta llegar al lugar adecuado para formar la sinápsis. La elongación activa de las neuritas y la movilidad del crecimiento de los conos depende también de la participación del calcio en concentraciones muy específicas. El aumento o disminución en la concentración de este ión, debido a los neurotransmisores o la actividad eléctrica se encuentra asociado con el retroceso de la elongación de las neuritas, o el cese completo del movimiento del cono axónico. En el hipocampo adulto el  $\text{Ca}^{++}$  se encuentra asociado con la potenciación a largo plazo (LTP).

Por otra parte, los cambios transitorios en la concentración interna de  $\text{Ca}^{++}$  pueden disparar la transcripción de genes tempranos inmediatos tales como el *c-fos* y el *c-jun*. Estos genes codifican para las proteínas de unión del DNA, las cuales se piensa que inician o modulan la expresión de estos genes conduciéndolos quizás a cambios posteriores en el funcionamiento neural especializado.

Las primeras evidencias que se tienen sobre los mecanismos de regulación controlados por calcio provienen de la identificación bioquímica, a finales de los 70, de enzimas y proteínas claves que unen este catión cuando su concentración se encuentra por encima del nivel normal.

### 2.5.1. Distribución intracelular.

El conocimiento preciso de la distribución del calcio interno y las características cinéticas de sus pozas son un prerrequisito indispensable para poder comprender numerosos aspectos de la fisiología de las células nerviosas, muchas técnicas bioquímicas y citológicas han sido empleadas para estudiar la distribución de calcio dentro de las células nerviosas.

Las neuronas y las células neurosecretoras son muy semejantes a otras células en cuanto a su contenido total de calcio, el cual es de unos cuantos milimoles por litro, sin embargo, la concentración interna de calcio libre es de alrededor de  $10^{-7}$  M, esto es, alrededor de cuatro órdenes de magnitud más bajo que la concentración extracelular de calcio libre. Una gran parte del calcio intracelular se encuentra unido a algunas superficies membranales y a componentes citosólicos o dentro de organelos. Esta distribución es precisa para mantener un gradiente transmembranal que a su vez es esencial para mantener la integridad celular, ya que como se mencionó, un decremento o incremento en esta entidad química puede conducir a la activación o supresión de una gran cantidad de eventos incluyendo la muerte neuronal.

### 2.5.2. Importancia y clasificación de los Canales de Calcio Sensibles a Voltaje.

Los canales de calcio en las neuronas tienen muchas funciones, al igual que en otras células excitables, estos generan señales químicas y eléctricas cuando se abren en respuesta a la despolarización de la membrana, permitiendo que el  $\text{Ca}^{++}$  fluya en respuesta a un gradiente electroquímico. La entrada de calcio acarrea cargas despolarizantes que pueden contribuir a la actividad eléctrica de la célula, tales como las despolarizaciones marcapasos, bases despolarizantes paroxismales en la actividad epileptiforme y espigas de calcio, además, como ya se ha mencionado, la entrada de este catión conduce también a un aumento intracelular de su concentración, teniendo como consecuencia la activación de mensajes químicos, por ejemplo, mecanismos sensibles que controlan la apertura de los canales iónicos, liberación del transmisor, activación enzimática,

metabolismo, expresión génica, y el crecimiento o retracción de las neuritas. El conocimiento y distinción de los diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{++}$  es importante para entender su funcionamiento y modulación neuronal por drogas y neurotransmisores.

Los canales de calcio sensibles a voltaje se han clasificado en dos tipos, dependiendo de sus propiedades fisiológicas, estos son:

a) Canales de calcio activados por bajo voltaje o tipo "T".

Estos canales tiene la propiedad de activarse cuando los potenciales de membrana son relativamente negativos, tiene una conductancia de canal simple pequeña y se encuentran mediando una corriente transiente de calcio, la cual es importante para determinar la frecuencia de generación del potencial de acción en neuronas y células cardíacas.

Estos canales no son sensibles a las dihidropiridinas al igual que los canales de tipo N. Se han propuesto algunos bloqueadores muy potentes para este tipo de canales, mediante disecciones de corrientes totales en registros celulares completos, tal es el caso del octanol, difenilhidantoína y amiloride, sin embargo estos fármacos necesitan estudiarse más rigurosamente para determinar su selectividad en este tipo de canal y en determinados tejidos.

b) Canales de calcio activados por alto voltaje.

Requieren para su activación un potencial de membrana más positivo. Estos canales se subdividen en canales del tipo L, N y P.

Los canales del tipo N y P se inactivan a potenciales de membrana más positivos que  $-40\text{mV}$  y tienen una conductancia intermedia de un canal simple, comparados con los del tipo T y L.

Los canales T y L son sumamente importantes porque se encuentran principalmente en neuronas donde desempeñan un papel relevante en la liberación del neurotransmisor. De estos, son los del tipo L de los que se tiene una mayor información en cuanto estudios relacionados con el SNC.

Existen tres principales grupos de antagonistas químicos para estos canales que además se utilizan en la terapia de enfermedades cardiovasculares, estos grupos son los de las fenilalquilaminas, benzotiazepinas y por último las de las dihidropiridinas (Cuadro 1).

Las fenilalquilaminas son un grupo diverso de compuestos ejemplificados por el verapamil. La inhibición de los canales de calcio por verapamil se ve enormemente facilitada por estimulación repetitiva con pulsos de voltaje despolarizantes que activan estos canales, lo cual indica que estas drogas ganan un acceso más rápido a su receptor cuando el canal se encuentra abierto.

En contraste con las fenilalquilaminas, las dihidropiridinas son moduladores primarios de los canales de calcio dependientes de voltaje. Las dihidropiridinas pueden actuar como activadores o como inhibidores, pares enantioméricos, a menudo pueden tener influencias contrarias sobre la función del canal, ya que estas no se unen preferencialmente cuando el canal se encuentra en estado abierto. Las dihidropiridinas se unen a su sitio del receptor desde la superficie extracelular del canal de calcio.

Por otra parte, el receptor de las benzotiazepinas no ha sido tan estudiado como el de los dos grupos anteriores (Catterall and Striessnig, 1992).

Acercas de los canales del tipo N, se tiene poca información en cuanto a su farmacología se refiere, sin embargo, se sabe que son insensibles a las dihidropiridinas al igual que los del tipo T.

<b>TIPO DE CANAL</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>L</b>
Conductancia de canal simple (110 Ba)	8 pS	13 pS	25 pS
Cinética de canal simple	Apertura tardía por disparo breve	Inactivación disparo amplio	poca inactivación
Conductancia relativa	$Ba^{++} = Ca^{++}$	$Ba^{++} > Ca^{++}$	$Ba^{++} < Ca^{++}$
Bloqueo iónico inorgánico	$Ni^{++} > Cd^{++}$	$Cd^{++} = Ni^{++}$	$Cd^{++} > Ni^{++}$
Bloqueo via $\omega$ -CgTx	Debil, reversible	Persistente	Persistente
Sensible a Dihidropiridina?	Resistente	Resistente	Sensible
Rango de activación (para 10 Ca)	Positivo a -70 mV	Positivo a -20 mV	Positivo a -10 mV
Rango de inactivación (para 10 Ca)	-100 a 60 mV	-120 a -30 mV	-60 a -10 mV
Velocidad de inactivación (0mV, 10 Ca o 10 Ba)	Rápida (tau 20-50 ms)	Moderada (tau 50-80 ms)	Muy lenta (tau >500 ms)

Cuadro 1. Propiedades eléctricas y farmacológicas de los tres tipos de canales de calcio en vertebrados ( Tsien, R.W., et al, 1988).



### 2.5.3 . Sistemas de regulación de calcio intracelular.

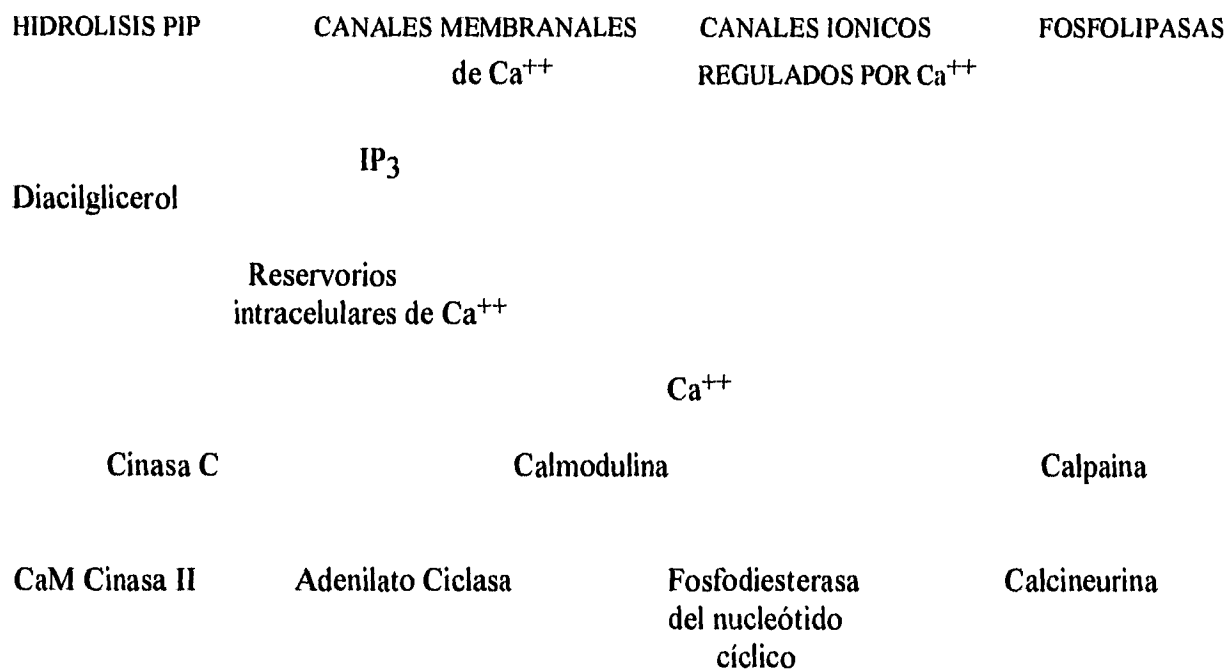
La regulación de los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular es sumamente importante principalmente por dos razones: primero, desde un punto de vista fisiológico, el control de  $\text{Ca}^{++}$  citoplásmico juega un papel clave en las características espaciales y temporales de los mensajes intracelulares y, segundo, desde un punto de vista patofisiológico, es importante porque permite mantener una homeostasis de los procesos dependientes de calcio que se encuentran íntimamente ligados a la génesis de algunos desordenes degenerativos del SNC.

Existen una serie de mecanismos que permiten modular los niveles intracelulares de calcio que incluyen principalmente: captura dentro de la mitocondria, recaptura dentro del retículo endoplásmico, unión citoplásmica por proteínas y transporte a través de la membrana citoplásmica.

En algunos experimentos realizados por Lehninger, Carafoli y otros, se ha demostrado que las mitocondrias aisladas poseen una habilidad considerable para acumular y liberar  $\text{Ca}^{++}$ . El sistema de recaptura mitocondrial tiene una afinidad aparente por el calcio de 1-10  $\mu\text{M}$  y es un proceso dependiente de energía.

El hecho de encontrar cisternas del RE en neuronas cerebelares caracterizadas por una estructura membranal inusual, y una localización inmediata debajo del plasmalema, han demostrado que este es el reservorio interno primordial en cuanto a regulación de calcio intracelular se refiere, ya que se tenían evidencias de que el inositol trifosfato liberaba calcio a partir de una estructura interna que poseía estas características (Meldolesi, et al, 1990), aunque en la actualidad, no se sabe con exactitud cual es la afinidad del RE por el  $\text{Ca}^{++}$  en neuronas.

Dentro de las proteínas que se encargan de regular calcio se encuentran principalmente la calmodulina, la proteína cinasa-c (una proteasa dependiente de calcio) y la calpaina (Fig 10).



**Fig. 10 Principales proteínas involucradas en la regulación de calcio en neuronas.** La concentración de calcio intracelular se eleva cuando este penetra a través de los canales que se encuentran en la membrana, o cuando es liberado de reservorios intracelulares en respuesta al IP<sub>3</sub>. Las proteínas de membrana que se encuentran directamente reguladas por este incremento de Ca<sup>++</sup> interno, incluyen varios canales iónicos regulados por calcio, la fosfolipasa C y la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Las proteínas citosólicas son la calmodulina, cinasa C y la calpaina. Cuando la calmodulina se encuentra con todos sus sitios de unión ocupados, se une a otras proteínas pudiéndolas activar (Kennedy, M., 1989).

La calmodulina (CaM), es una proteína cuyo peso molecular es de 15 kDa, está presente en las dendritas y en el citosol de muchas neuronas, pero no en los axones o en las terminales presinápticas. En el citosol, su concentración es de 30 a 50  $\mu\text{M}$ . Cada molécula tiene cuatro sitios de unión con constantes de disociación del orden micromolar. Cuando las concentraciones de calcio son normales ( $10^{-8} \text{ M}$ ), la cantidad de calcio que se une a la CaM es muy poco, sin embargo, cuando las concentraciones de este ión aumentan a un nivel micromolar, los cuatro sitios de unión se ocupan de manera sucesiva, confiriéndole ser a esta proteína un activador multifuncional sumamente importante.

Las proteasas son una familia de cinasas de 83 kDa que son activadas sinérgicamente por calcio y diacilglicerol (DAG) producto de la hidrólisis del fosfatidil inositol. En su estado activado las cinasas-c citosólicas se mueven hacia la membrana donde pueden fosforilar y regular ciertas proteínas de membrana. En las neuronas, las cinasas-c regulan la excitabilidad eléctrica fosforilando ciertos canales iónicos. Además pueden modular la eficiencia sináptica y parecen jugar un papel crucial en el inicio y mantenimiento del LTP.

Las calpainas son un grupo de proteasas neutras que se activan directamente por calcio, tienen una distribución muy amplia encontrándose presentes en la membrana y el citosol. Estas se encuentran implicadas en la regulación de las proteínas de la membrana y del citoesqueleto en muchas células incluyendo las neuronas.

#### 2.5.4 Liberación de calcio a partir de reservorios intracelulares.

Se han descrito dos mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la liberación de calcio de reservorios intracelulares unidos al citoplasma, uno involucra la unión de inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ), a receptores  $IP_3$  específicos que se encuentran sobre la superficie de vesículas intracelulares e inducen un aumento en el flujo de  $Ca^{++}$  (Berridge and Irvine, 1984; Bezprozvanny, et al, 1991). El otro mecanismo involucra la activación de un canal de  $Ca^{++}$  inducido por calcio citoplásmico (Endo, Tanaka and Ogawa, 1970; Smith, Imagawa. Ma. Fill. Campbell and Coronado, 1988). Existen algunos tejidos en los cuales los dos mecanismos funcionan en pozas separadas dentro de la misma célula. Por ejemplo, en neuronas de hipocampo en cultivo la activación de receptores metabotrópicos glutamatérgicos por quisqualato no depletan las pozas de  $Ca^{++}$  sensibles a cafeína. Como se sabe, la cafeína es un activador de los reservorios que liberan  $Ca^{++}$  activados por  $Ca^{++}$  (Thayer, Hirning and Miller, 1989). En otros tejidos incluyendo una gran variedad de células musculares, parece haber una sólo vía de liberación funcional que posee ambos mecanismos ( Vites and Pappano, 1990).

### **3. OBJETIVO**

Dados los antecedentes que se tienen acerca de la acción descrita para el NMDA en células granulares durante el desarrollo, en el presente trabajo se estudió la participación del calcio en el efecto trófico del NMDA, así como el papel del calcio extracelular y del calcio proveniente de los reservorios internos. Para ello, se utilizaron distintos fármacos específicos que afectan los movimientos y niveles de calcio citoplásmico y extracelular y que permiten distinguir el origen de este ión. Estas drogas se probaron sobre el efecto del NMDA en la actividad de la GAF, que como se mencionó, es una enzima marcadora de células glutamatérgicas en el desarrollo.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Cultivos celulares primarios.**

Se obtuvieron cultivos primarios de células granulares (95%) de cerebelos de ratas de la cepa Wistar, mediante la técnica descrita por Patel y Hunt (1985) y Morán y Patel (1989), la cual consiste en disociar el cerebelo de ratas de 8 días postnatales de manera mecánica y utilizando tripsina (0.025%). Posteriormente las células se sembraron en un medio basal de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (GIBCO), 2mM de glutamina y penicilina-estreptomicina 50 U/ml y 50µg/ml respectivamente y KCl 5 mM.

Las células se sembraron en cajas de Petri de 35 mm de diámetro tratadas previamente durante 24 horas con 5 µg/ml de poli-L-lisina para permitir la adherencia neuronal. Las células se sembraron a una densidad de  $1.5 \times 10^6$  células por ml; aproximadamente 20 horas después se le agregó citosina arabinosa 10 µM para evitar la proliferación de otro tipo de células, principalmente astrocitos (Bálazs et al, 1988). Las células se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (4.5%) y aire saturado con vapor de agua (95%) (Morán y Patel, 1989).

A los dos días *in vitro* (DIV) las neuronas se trataron con diferentes drogas por espacio de 72 horas. A los 5 DIV las células se lavaron con un amortiguador de fosfatos de sodio (PBS) 10 mM a 38°C y se congelaron a -70°C.

#### 4.2. Cuantificación de la actividad de la GAF.

Al momento de realizar el ensayo, las células se descongelaron y se sonicaron en 75  $\mu$ l de buffer de imidazol durante 5 segundos. La actividad de la GAF se midió mediante la técnica descrita por Kvamme y Olsen (1980) y modificada por Patel (1988) en una solución de ensayo que contenía:  $\text{Na}(\text{PO}_4)$  20 mM; debido a que esta enzima es activada por fosfato, NaCl 90 mM; KCl 56 mM; Manitol 100 mM y Sacarosa 30 mM para mantener la fuerza iónica y osmótica del medio; HEPES 4 mM para mantener el pH;  $\text{MgCl}_2$  5 mM, oligomicina 200  $\mu\text{g/ml}$ ; antimicina 12  $\mu\text{g/ml}$ ; glutamina 0.46 mM  $\text{U-C}^{14}$ ; 50 mCi/ml.

##### *Procedimiento*

A 80  $\mu$ l de la solución de ensayo se le adicionaron 20  $\mu$ l de tejido y se incubaron con agitación durante 20 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo 1 ml de agua fría e inmediatamente la muestra se pasó por una columna de intercambio aniónico con una apertura de malla de 100-200 (AG1-X8, BIO-RAD) que se lavó con 5 ml de agua, 6 ml de ácido acético 0.005 M y 6 ml de ácido acético 0.5 M. De esta última muestra se tomó una alícuota de 1 ml a la cual se le adicionaron 10 ml de líquido de centelleo. Para determinar la transformación espontánea de glutamina se utilizaron dos blancos, que contenían en lugar de la muestra de tejido, 20  $\mu$ l de agua. La actividad final de la enzima se expresó como nmolas/hora/mg de proteína.

#### 4.3. Medición de la sobrevivencia celular mediante la técnica de reducción del MTT.

Tanto la integridad celular como la sobrevivencia se midieron cuantificando la transformación por las células del colorante bromuro de 3(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a un producto insoluble, el azul de formazán, al recibir electrones desde el citocromo c1 (Slater et al, 1963) ,por lo que cuando las células se encuentran en buen estado se produce una sal reducida de color azul que puede ser leída espectrofotométricamente a 570 nm. Esta técnica se fundamenta en el hecho de que las células con una cadena respiratoria integra y funcional tienen una mayor capacidad de transformar el MTT que aquellas que no están transfiriendo electrones en las mitocondrias.

A los cultivos celulares se les adicionó el MTT (Sigma Chemical Company) a una concentración de 144  $\mu$ M. Una hora después se lavó el medio, mediante succión por medio de vacío y se solubilizó el formazán con isopropanol anhidro con HCl 0.04 N. Posteriormente, el producto se cuantificó espectrofotométricamente a 570 nm (Mosmann, 1983).

Es importante aclarar que ninguno de los fármacos utilizados en este trabajo interfiere con la reducción del MTT, ya que éstos son insolubles en el isopropanol ácido, no afectando así, los valores de absorbancia.



#### 4.4 Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.

El método de Bradford utiliza la espectrofotometría para medir la cantidad de proteína que existe en un tejido. Su sensibilidad es hasta 10  $\mu\text{g}$  de proteína/ml.

El reactivo de Bradford se preparó disolviendo 100 mg de Azul de Coomassie en 50 ml de etanol al 95%; posteriormente se añadieron 100 ml de ácido fosfórico al 85 %, se aforó a un litro con agua destilada y por último se filtró.

En primer lugar se trazó una curva estándar utilizando soluciones preparadas de la misma manera que las muestras, esto es, se colocó albúmina en unos tubos de ensayo (máximo 5  $\mu\text{g}$ ), posteriormente se llevó hasta un volumen de 50  $\mu\text{l}$  con agua destilada agregando 1 ml de reactivo de Bradford, se esperaron 5 minutos y se leyeron las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Para preparar la curva estándar, se utilizaron las siguientes concentraciones de albúmina: 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 y 17.5  $\mu\text{l}$  las cuales se tomaron a partir de un stock de albúmina (1 mg/ml de agua). Es necesario señalar que para obtener una lectura más precisa de la curva se añadió a las muestras de la curva 5  $\mu\text{l}$  de buffer de imidazol (Bradford, M., 1976; T. Spector, 1978).

#### 4.5 Análisis estadístico.

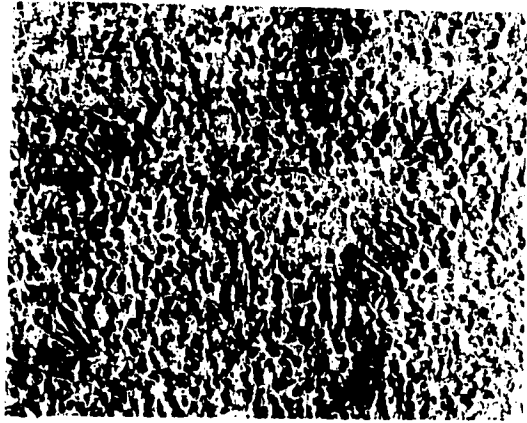
Para analizar los resultados se utilizó el análisis de varianza ANOVA, seguido de la prueba de Fisher; la probabilidad (P) debió ser menor o igual a 0.05 para que la diferencia fuera considerada como significativa. En todos los casos se graficó el valor medio  $\pm$  el error estándar.

## 5. RESULTADOS

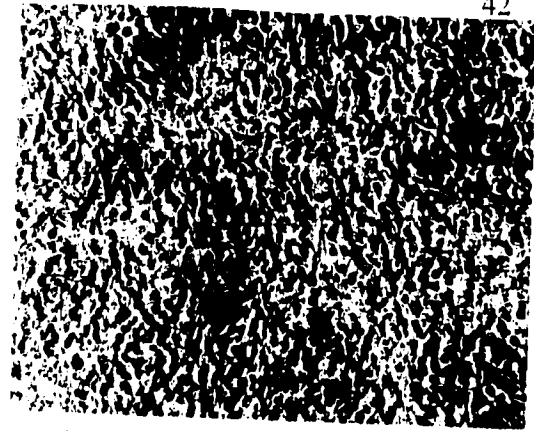
### 5.1. Efecto del NMDA sobre células granulares.

#### 5.1.1 Efecto en la morfología.

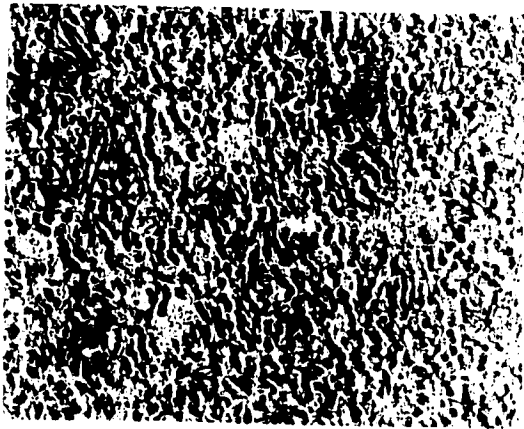
Todas las observaciones morfológicas se realizaron a los 5 DIV y, como se mencionó anteriormente, los cultivos se trataron a los 2 DIV con las diferentes drogas. El tratamiento con NMDA (150  $\mu$ M) produjo un efecto significativo en algunas de las características morfológicas del cultivo (Fig. 11). Bajo estas condiciones, las neuronas desarrollaron un mayor número de prolongaciones. Los somas neuronales aumentaron ligeramente de tamaño y presentan un aspecto más oscuro con respecto al control. Además, se observó una mayor tendencia a la formación de cúmulos que en las células no tratadas. En cultivos hermanos se observó un efecto similar al observado con NMDA cuando las células se trataron durante las últimas 72 h con KCl 25 mM.



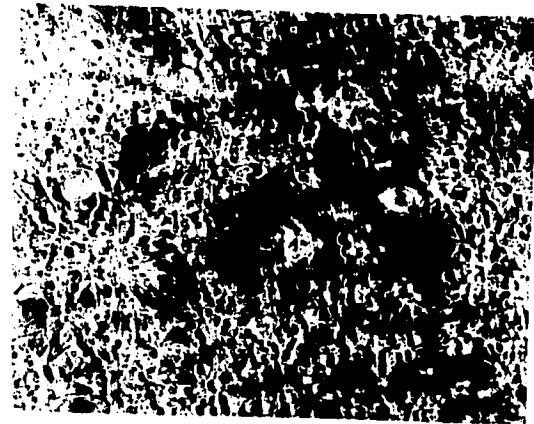
CONTROL



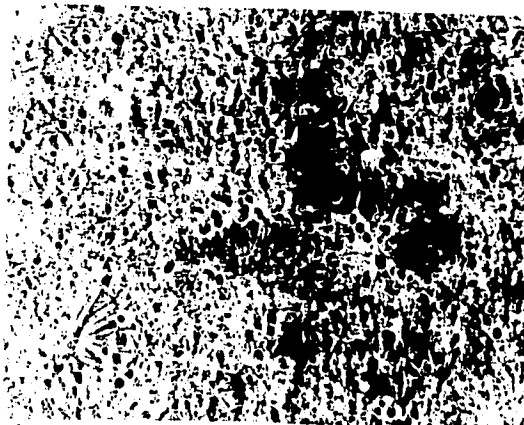
a)



b)



c)



d)

Fig. 11 Aspecto de las células granulares de cerebelo tratadas con: a) NMDA 150  $\mu$ M, b) KCl 40mM; c) EGTA 1mM y d) BAPTA 1.25 mM. Observaciones realizadas a los 5 DIV.

### 5.1.2 Efecto del NMDA en la actividad enzimática.

Como se ha demostrado en estudios anteriores, la estimulación con NMDA 150  $\mu$ M durante las últimas 72 h y la despolarización por KCl en cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata, indujo un incremento en la actividad de las enzimas que se encargan de la síntesis del glutamato, AAT y GAF. Las células se sembraron en 10 mM de KCl, en un medio de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino durante 2 DIV y posteriormente se trataron con NMDA 150  $\mu$ M y KCl 40 mM. A los 5 DIV se midió la actividad de las enzimas. Mientras que el incremento para el caso de la GAF es de aproximadamente un 75 % con respecto al control, la actividad de la GLDH, una enzima que sintetiza glutámico que no es utilizado como neurotransmisor, no sufre un incremento significativo. De manera similar, la actividad de la LDH, que participa en el metabolismo general de la célula, tampoco se afecta cuando las células se tratan con NMDA o KCl (Tabla 1).

TABLA 1. Efecto del KCl y NMDA sobre la actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis del glutamato.

Condición	Actividad (% del control)				
	AAT	GAF	LDH	GLDH	Proteína
Control	100	100	100	100	100
KCl 40 mM	170.4 $\pm$ 5*	258.8 $\pm$ 18*	91.7 $\pm$ 8.6	116.0 $\pm$ 6.3	104.2 $\pm$ 1.8
NMDA 150 $\mu$ M	162 $\pm$ 15**	227 $\pm$ 11.3**	94.7 $\pm$ 7.4	112.3 $\pm$ 5.2	109.8 $\pm$ 1.9

Las células se cultivaron en 10mM de KCl , en un medio Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino durante 2 DIV, y posteriormente, se trataron con NMDA 150 $\mu$ M. Después de 5 DIV, las células se congelaron y se midió la actividad de las enzimas como se especificó en la metodología. Los resultados mostrados en esta gráfica son el promedio de 6 experimentos y muestran diferencias significativas con respecto al control \*P<0.05 (ANOVA-Fisher).

Los incrementos observados en la actividad de la GAF no son el resultado de cambios generales en el contenido de proteína, ya que se observa en la tabla 1 que los niveles de proteína no tienen un incremento significativo cuando las células son tratadas con diferentes condiciones.

## 5.2 Dependencia del $\text{Ca}^{++}$ en el efecto del NMDA.

### 5.2.1 Efecto de quelantes de $\text{Ca}^{++}$ extracelular.

Con el objeto de probar la dependencia de calcio extracelular en el efecto del NMDA y KCl sobre la actividad de la GAF en células granulares de cerebelo de rata, se utilizaron dos diferentes quelantes de calcio extracelular, EGTA y BAPTA. Los cultivos tratados durante 72 h con EGTA y BAPTA (1 mM y 0.5-1.25 mM respectivamente) en presencia de NMDA 150  $\mu\text{M}$ , mostraron una notable disminución en la actividad de la GAF del 55% y 78% respectivamente (\* $P < 0.05$ , ANOVA-Fisher) con respecto al control (Fig 12). Cabe mencionar que las concentraciones utilizadas de estas drogas no tuvieron efecto significativo sobre la actividad basal de esta enzima, ni sobre el aspecto morfológico de las células .

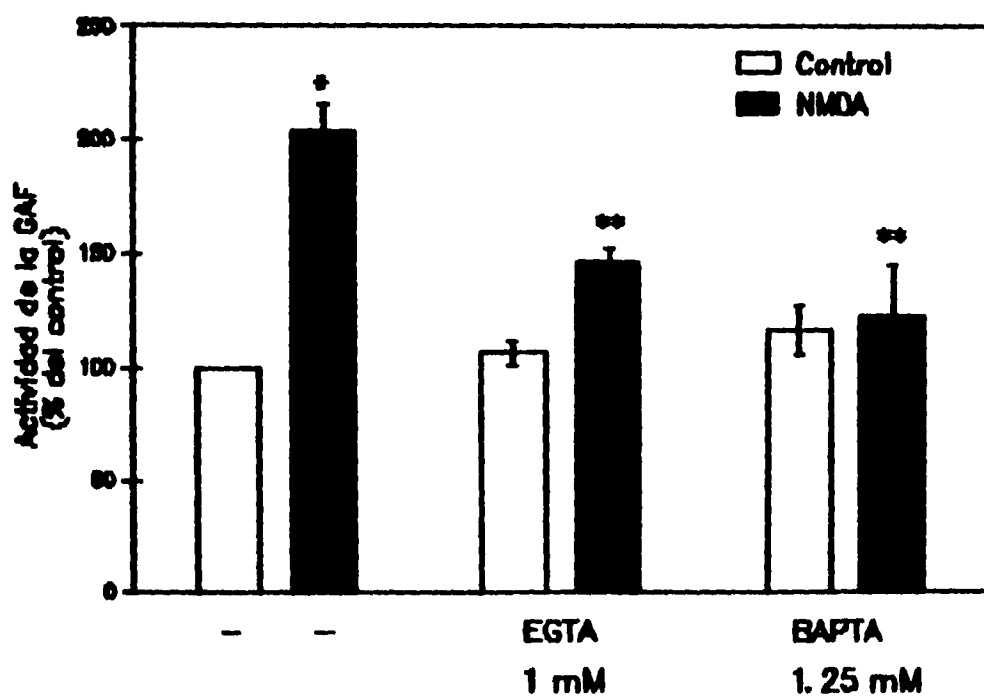


Fig 12 Efecto de los dos quelantes de calcio extracelular (EGTA 1mM y BAPTA 1.25 mM) sobre la actividad de la GAF inducida por NMDA 150 $\mu$ M. Los resultados se expresan como porcentaje del control  $\pm$ ES de 4-6 experimentos diferentes. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (\* P < 0.05) y con respecto al NMDA (\*\* P < 0.05) (ANOVA-Fisher).

### 5.2.2 Efecto de concentraciones altas de $\text{Ca}^{++}$ extracelular.

Dado que el calcio extracelular parece jugar un papel importante en la acción del NMDA, se cultivaron neuronas en presencia de concentraciones altas de calcio (12mM) con el fin de mimetizar el efecto trófico del NMDA. Bajo estas condiciones, sin embargo, no se observó ningún incremento significativo en la actividad de la glutaminasa cuando la comparamos con respecto al NMDA (Fig. 13). La respuesta del NMDA en células crecidas con  $\text{Ca}^{++}$  12 mM tampoco se modificó cuando se le compara con concentraciones normales de este catión. La organización morfológica del cultivo tampoco se vió afectada significativamente bajo ninguna de estas condiciones.

### 5.2.3 Efecto del ionóforo A23187 sobre la actividad de la GAF.

Con el fin de estudiar si un aumento indiscriminado de calcio interno podría mimetizar la acción del NMDA y KCl, se examinó el efecto de diferentes concentraciones (0.01, 0.1 y 1.0  $\mu\text{M}$ ) del ionóforo de calcio A23187 durante distintos tiempos de exposición y a diferentes edades. La Fig. 13 muestra que la actividad de la GAF basal aumenta con la edad de las células. Esta actividad no se modifica a ninguna edad por acción del ionóforo A23187 usado a distintas concentraciones. Sin embargo, se observa un aumento significativo en células de 3 DIV con la concentración del ionóforo más baja (0.01  $\mu\text{M}$ ) ( Fig. 14).

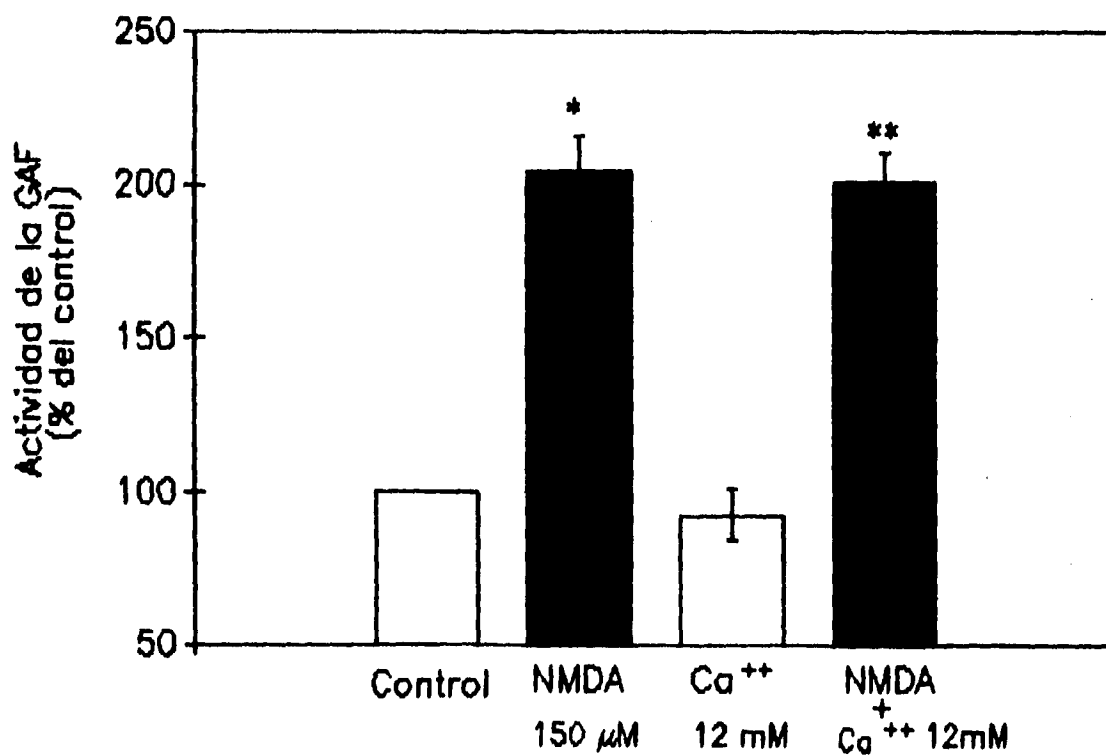


Fig. 13. Efecto del aumento de calcio extracelular (12mM) en presencia de NMDA 150 μM. Las células fueron cultivadas como se indica en la metodología, los tratamientos se aplicaron durante 72 hr. Los resultados se expresan como porcentaje del control, los valores mostrados son el promedio de 4 experimentos ±ES.



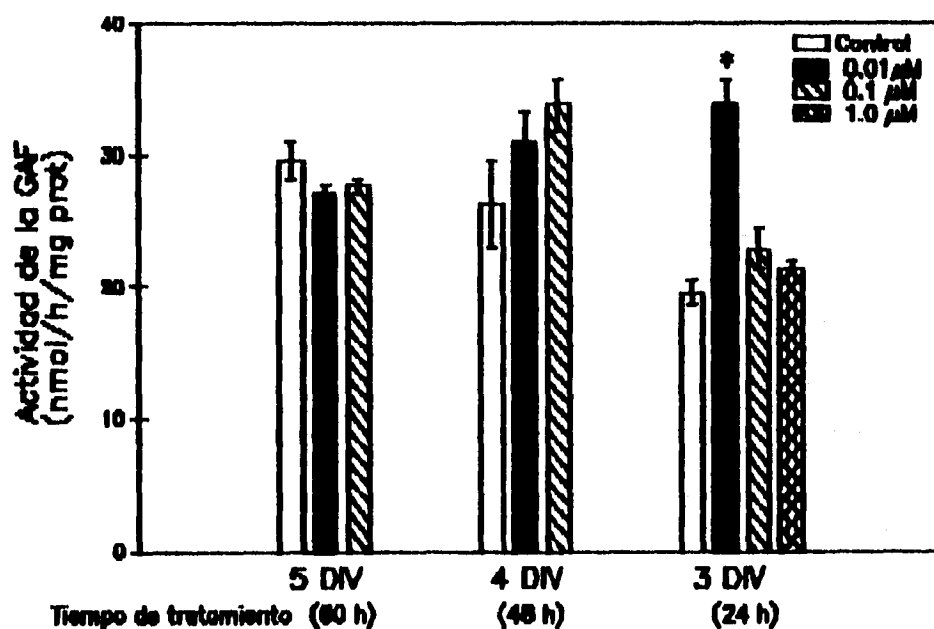


Fig. 14 Efecto del ionóforo *A23187* a diferentes concentraciones y a diferentes edades del desarrollo. (A) Se muestra el efecto del ionóforo a concentraciones de 0.01, 0.1 y 1.0  $\mu$ M, el ensayo se realizó a los 3 DIV, y los cultivos fueron tratados a las 24 h, en esta parte podemos observar que a la concentración más baja del ionóforo se observa una diferencia significativa con respecto al control ( $P < 0.05$ ) (ANOVA-Fisher). (B) Efecto del ionóforo a concentraciones bajas (0.01 y 0.1  $\mu$ M), las células fueron tratadas a las 48 h, y el ensayo se realizó a los 4 DIV, cabe señalar que a una concentración más alta, las células muestran severos deterioros, por lo que el ensayo no se pudo realizar. (C) Observamos que con estas dos concentraciones (0.01 y 0.1  $\mu$ M), las células no muestran ninguna diferencia significativa con respecto al control, las células fueron tratadas a las 60 horas.

#### 5.2.4. Papel de los CCSV en el efecto del NMDA

En la Fig. 15 se muestra el efecto del  $Mg^{++}$  (20 mM) sobre la actividad de la GAF inducida por NMDA 150  $\mu$ M y KCl 40 mM.

Bajo estas condiciones se encontró que tanto la acción del NMDA como la del KCl sobre la actividad enzimática se bloquea casi completamente en presencia de  $Mg^{++}$ . Este efecto inhibitor del  $Mg^{++}$  se observó también sobre la actividad de la AAT (Datos no mostrados).

Se probaron también antagonistas generales de CCSV como el Verapamil y el Lantano, que a una concentración de 10 y 100  $\mu$ M respectivamente no tuvieron ningún efecto sobre la actividad de la glutaminasa inducida por NMDA (Fig. 16). Estas drogas *per se* no afectaron la actividad basal de esta enzima.

Se estudió también el efecto de la nifedipina (0.5  $\mu$ M), que bloquea selectivamente CCSV tipo L. La Fig 17 muestra que no existe una diferencia significativa entre las células tratadas con NMDA y las tratadas con nifedipina y NMDA. Sin embargo, en las células tratadas con alto potasio (40 mM), se observó una marcada inhibición por nifedipina en la actividad de la GAF.

Para poder dar más soporte a esta observación, se realizaron experimentos en los cuales se probó el efecto del Bay-K uno de los agonistas de los CCSV tipo L (Fig. 17b). Esta droga utilizada a una concentración de 0.01  $\mu$ M, indujo por sí sola un incremento en la actividad de la GAF de aproximadamente 100%. En la misma figura se observa que el NMDA y el Bay-K no tuvieron un efecto aditivo sobre la actividad de la GAF.

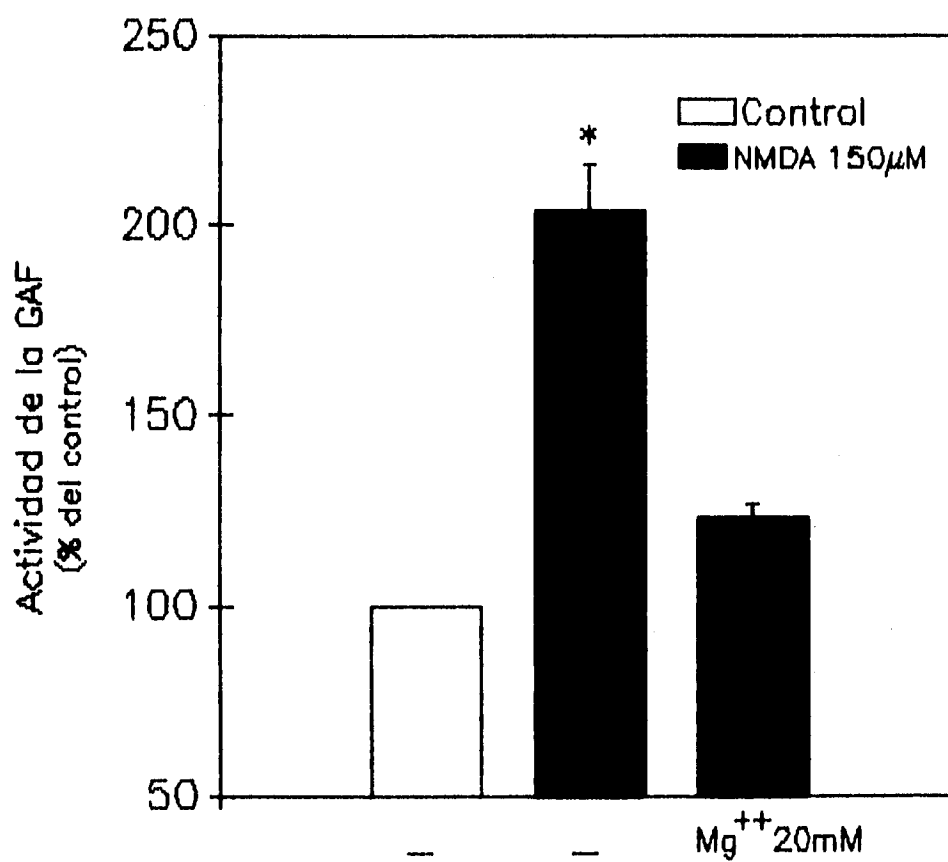


Fig. 15. Efecto del Mg<sup>++</sup> sobre la acción del NMDA y KCl 40 mM en la actividad de la GAF. Se observa que en el caso del NMDA este catión tuvo un efecto estadísticamente significativo con respecto al NMDA y al potasio ( $P < 0.05$ ) (ANOVA-Fisher).

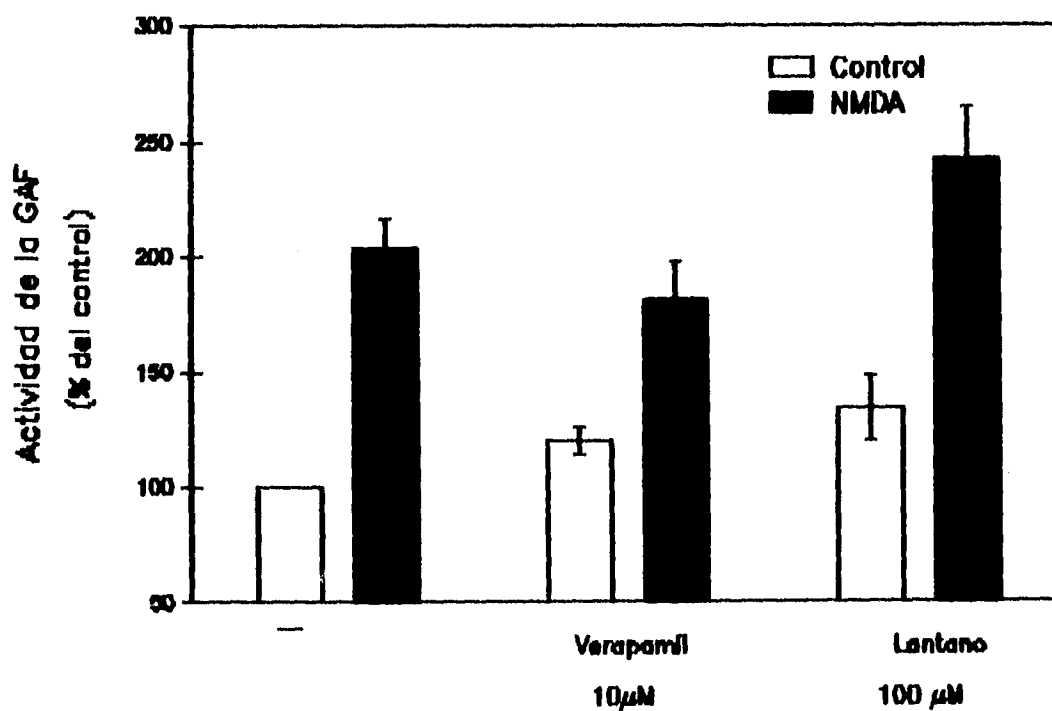


Fig. 16. Efecto del verapamil y lantano en el efecto trófico del NMDA 150 μM. Las diferencias entre NMDA sólo y NMDA más verapamil o lantano no son significativas.

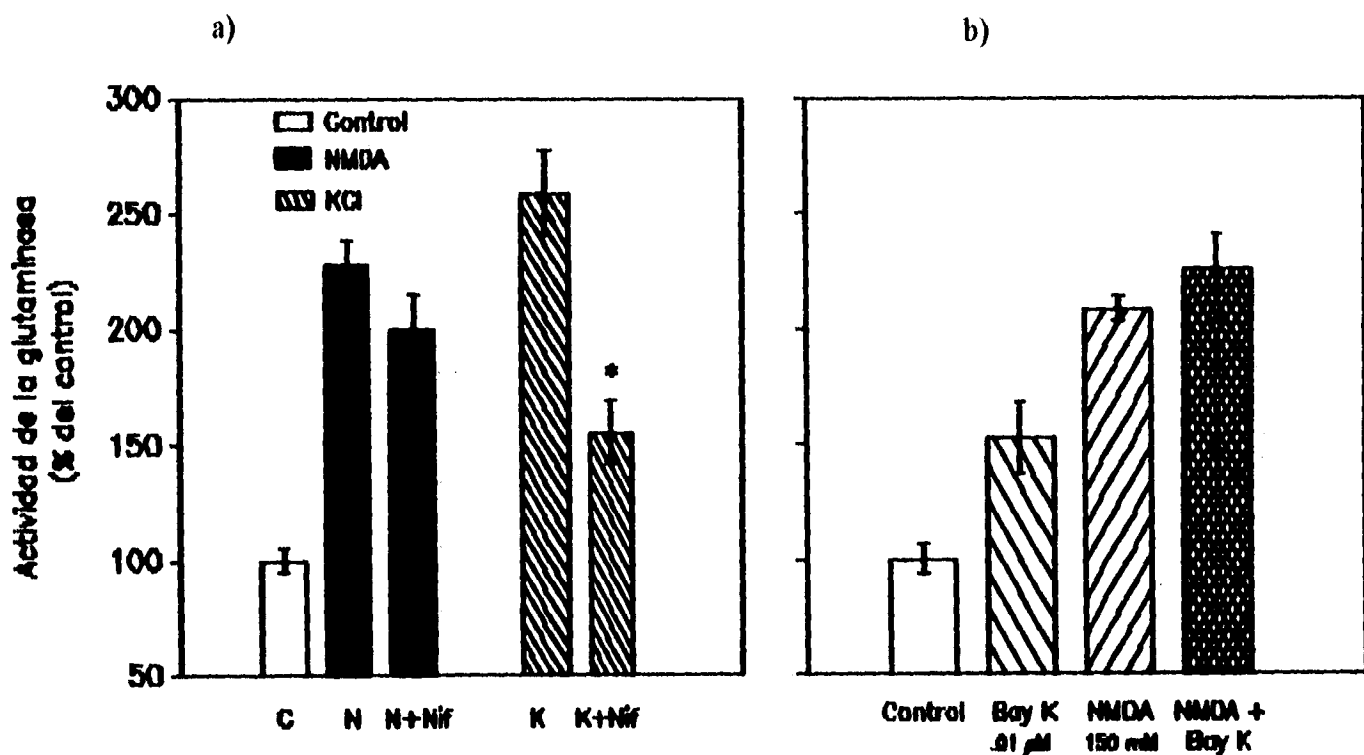


Fig. 17 a) Efecto de la nifedipina (0.5 $\mu$ M) y BAY K (0.01  $\mu$ M) en presencia de NMDA 150 $\mu$ M y K<sup>+</sup> (40mM) sobre la actividad de la GAF. Los resultados se encuentran expresados como por ciento del control de la actividad enzimática y son los promedios de 6-8 experimentos. En a) la diferencia es estadísticamente significativa cuando se la compara con K<sup>+</sup> sólo \*P<0.05 (ANOVA).

### 5.2.5 Calcio intracelular

Para comprobar la dependencia del calcio interno en el efecto trófico del NMDA, se utilizó el BAPTA.AM (10 $\mu$ M), que es un quelante de calcio intracelular. Las células fueron tratadas como se describe en la metodología y se incubaron con el quelante, con o sin NMDA. Como se puede apreciar en la tabla 2, el BAPTA.AM inhibió un 74% la activación por NMDA de la enzima GAF. El BAPTA.AM por sí solo no tuvo ningún efecto sobre la actividad basal de esta enzima.

Tabla 2. Efecto del BAPTA.AM

Condición	Actividad (nmolas/h/mg prot)
Control	27 $\pm$ 1.971
NMDA 150 $\mu$ M	86 $\pm$ 6.21
BAPTA.AM 10 $\mu$ M	31 $\pm$ 0.98
BAPTA.AM+NMDA	41 $\pm$ 2.99*

Se cultivaron células granulares durante 2 DIV, posteriormente se trataron con BAPTA.AM 10 $\mu$ M y con NMDA 150  $\mu$ M. Después de 5 DIV, se realizó la medición de la actividad. Los resultados se expresan como nmol/h/mg prot y son el promedio de 5 experimentos. Las diferencias son estadísticamente significativas \*P<0.05 (ANOVA-Fisher).

### 5.2.5.1 Reservorios de $\text{Ca}^{++}$ sensibles a dantroleno.

Una vez que se comprobó de esta manera la dependencia de calcio intracelular se probó, como se muestra a continuación, la participación de los diferentes reservorios internos que se especuló podían estar directamente relacionados con la acción del NMDA.

Se probó el dantroleno a una concentración de 30 mM y, como se puede observar en la tabla 3, esta droga inhibió un 68.7% la actividad de la GAF inducida por NMDA. La actividad basal de esta enzima no se vió modificada por el dantroleno *per se*. En cuanto a la morfología, la integridad celular de las células, no se vió afectada por este tratamiento.

Tabla 3. Efecto del dantroleno 30 $\mu\text{M}$ .

Condición	Actividad (% del control)
Control	100 $\pm$ 10
NMDA 150 $\mu\text{M}$	199.0 $\pm$ 10*
Dantroleno 30 $\mu\text{M}$	93 $\pm$ 13
NMDA+ Dantroleno 30 $\mu\text{M}$	131 $\pm$ 11**

Tabla 3. Las células se cultivaron como se describió en la metodología. Los resultados son el promedio de 4 experimentos  $\pm$  ES y se expresan como nmol/h/mg prot. Las diferencias son estadísticamente significativas \* $P < 0.05$  (ANOVA-Fischer).

### 5.2.5.2 Efecto de la cafeína.

La cafeína es una droga que depleta calcio a partir de otro tipo de reservorios internos, por lo que con el fin de comprobar un posible efecto tóxico de la cafeína se realizaron estudios de sobrevivencia mediante la técnica del MTT, que se describió en la metodología. La Fig. 18 muestra que la utilización de concentraciones altas comúnmente empleadas en otros modelos experimentales, afecta de manera drástica la integridad de los cultivos. Se decidió utilizar una concentración relativamente baja (100 mM) de cafeína, ya que a ésta las células sobreviven (Fig. 18a). En la Fig. 18 b se observa que la actividad de la glutaminasa, disminuye un 50% con respecto al NMDA. Esta diferencia es estadísticamente significativa \* $P < 0.05$  (ANOVA-Fisher).

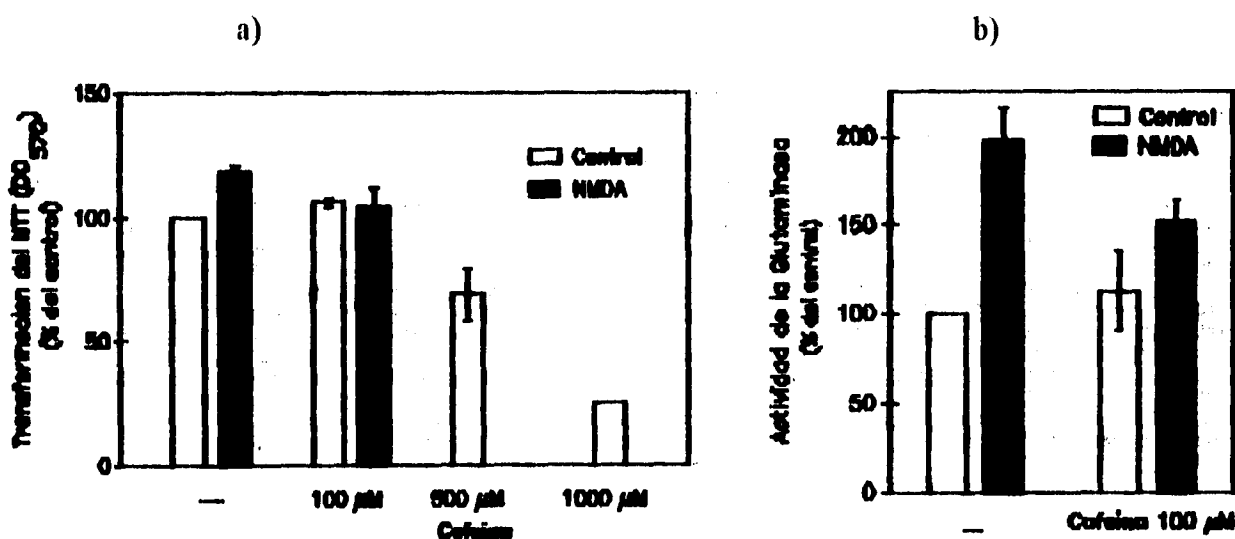


Fig. 18. Efecto de la cafeína a diferentes concentraciones sobre la actividad de la GAF.. a) Se muestra el estudio de sobrevivencia a diferentes concentraciones (100, 500 y 1000mM) en presencia de NMDA 150 mM. En la parte b), se gráfica la actividad de la glutaminasa expresada como porcentaje del control, cuando a las células se les trata con cafeína (100mM), la actividad disminuye de manera estadísticamente significativa cuando se le compara con respecto al NMDA \* $P < 0.05$  (ANOVA-Fischer).



### 5.3 Papel del sistema Calcio-calmodulina.

Se probaron drogas que interfieren con el sistema calcio-calmodulina como la trifluoperazina y el W<sub>7</sub> (0.1 mM y 10 mM respectivamente). Como se puede observar en la Fig. 19, en ningún caso se obtuvo un efecto importante en lo que respecta al comportamiento de la GAF en presencia de NMDA.

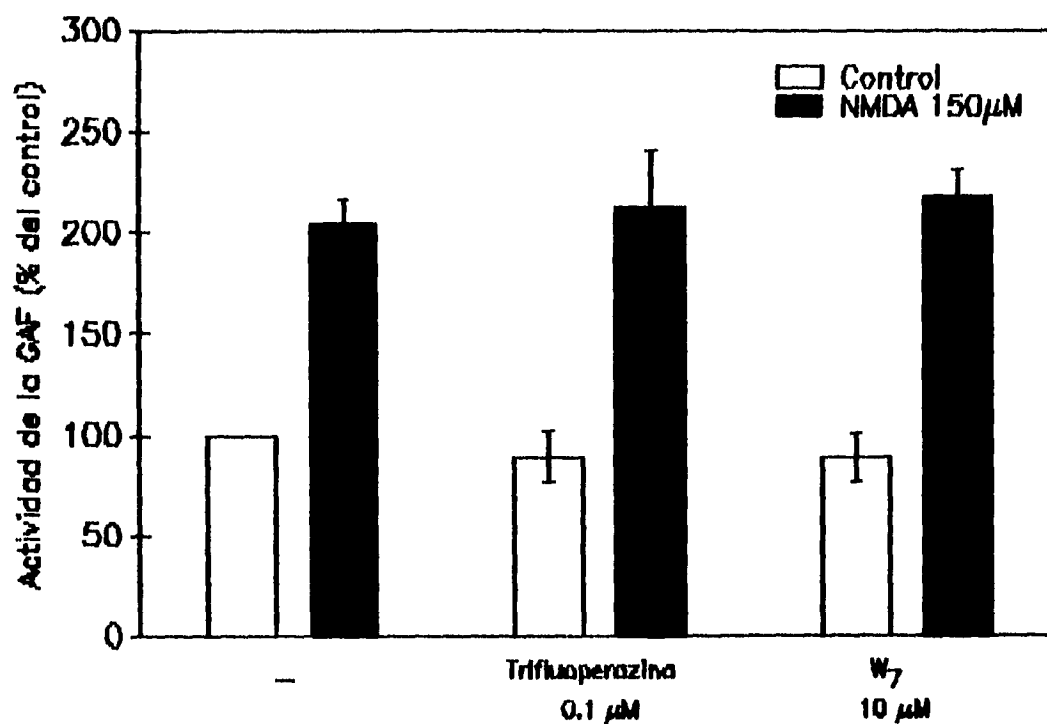


Fig. 19. Efecto de la trifluoperazina y W<sub>7</sub> sobre la actividad de GAF bajo condiciones despolarizantes en presencia de NMDA. Los resultados están expresados como porcentaje del control y son los promedios de 6-8 experimentos. Las diferencias no son estadísticamente significativas.

## 6. DISCUSION

Existen muchos estudios que indican que la despolarización con potasio (Balázs, 1987, 1988, 1990) o la estimulación temprana de los receptores a NMDA ( Balász 1988, Morán y Patel, 1989, Morán y Rivera-Gaxiola, 1992) promueven la sobrevivencia y diferenciación de las células granulares de cerebelo en cultivo, lo que se ha considerado como un efecto trófico de estos compuestos.

### A. Efecto del NMDA sobre la actividad de la GAF.

Como se mencionó antes , las células granulares del cerebelo son glutamatérgicas y poseen receptores a aminoácidos excitadores. En estudios previos se ha demostrado que dos enzimas involucradas en la síntesis del glutamato usado como neurotransmisor, la AAT y GAF son marcadoras de la diferenciación bioquímica de este tipo neuronal (Patel, 1987; Morán y Rivera-Gaxiola, 1992). En el presente trabajo se utilizó como parámetro marcador de diferenciación la actividad de la GAF y se encontró que los datos obtenidos coinciden perfectamente con los encontrados en estudios anteriores en lo que concierne al incremento de la actividad de esta enzima en presencia de condiciones despolarizantes por  $K^+$  o de la estimulación temprana por NMDA (Tabla 1) ( Morán y Patel, 1989). Este efecto es específico ya que no se afecta la actividad de otras enzimas como la LDH y GLDH y se apoya también en el hecho de que la cantidad de proteína de éstas tampoco se ve afectada significativamente.

Por otro lado, se ha demostrado que la activación de los receptores a NMDA aumentan la conductancia del  $\text{Ca}^{++}$  (Mayer y Westbrook, 1987), sugiriendo que el canal del receptor no sólo es permeable a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , sino también a este catión (MacDermott and Dale, 1987). También se ha estudiado mediante el uso de los colorantes comúnmente utilizados para determinar las concentraciones internas de calcio que este ión aumenta en el espacio intracelular cuando se activa el receptor a NMDA (Miller, 1991). Estas evidencias sugieren una posible participación del calcio en el efecto trófico del NMDA. Por lo que en este trabajo se estudió el papel del calcio tanto extracelular, como el proveniente de los reservorios internos de la célula, en la activación de la GAF inducida por NMDA y KCl.

#### B. Efecto del calcio extracelular en la acción del NMDA.

Utilizando dos diferentes quelantes, como el EGTA y el BAPTA (1mM y 1.25mM respectivamente), se pudo comprobar que se requiere de la presencia de calcio extracelular para que se lleve a cabo la activación de la GAF por NMDA, ya que en ambos casos, la actividad basal de la enzima disminuyó un 57% con respecto al control cuando las células se incubaron con EGTA y 81.1% con BAPTA. Lo anterior coincide con la dependencia del  $\text{Ca}^{++}$  en el efecto del NMDA sobre la sobrevivencia en estas células (Kingsbury and Balázs, 1987).

La presencia de estos quelantes de  $\text{Ca}^{++}$  no tienen efectos adversos *per se* dados los resultados de viabilidad en MTT obtenidos y el estado morfológico. Es interesante mencionar que la actividad de la GAF inducida por NMDA, no disminuye totalmente en presencia de estos quelantes, lo que sugiere la participación de calcio proveniente de otras fuentes, como serían los reservorios internos.

Por otra parte, cuando a los cultivos celulares se les ha tratado con una concentración alta de  $\text{Ca}^{++}$  (12mM), se observa claramente que no modifica la actividad de la glutaminasa inducida por NMDA (Fig 13), lo cual sugiere que la concentración de calcio externo necesario es equivalente a las concentraciones fisiológicas de la célula (i.c. 1-2 mM).

Dado que se sugiere que es necesario un incremento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular en el efecto del NMDA y el KCl, se intentó simular un incremento de  $\text{Ca}^{++}$  utilizando el ionóforo selectivo de  $\text{Ca}^{++}$ , el A23187. Bajo estas condiciones la incubación con el ionóforo no tuvo ningún efecto *per se* sobre la actividad de la GAF, excepto cuando el compuesto se incubó por tiempos cortos y concentraciones muy bajas. Esto sugiere que aunque el calcio extracelular es importante para que el NMDA y KCl ejerza un efecto trófico probablemente sea necesario que exista una modulación tanto temporal como espacial, más que un incremento indiscriminado de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular ; o bien que el incremento de calcio debe ir acompañado de alguna señal disparada por la despolarización con NMDA o KCl.

Por último, se probó el efecto de dos diferentes tipos de drogas que antagonizan la entrada del  $\text{Ca}^{++}$  , estas son: el verapamil (10 $\mu\text{M}$ ) y el lantano (100 $\mu\text{M}$ ), en ambos casos no se observó ninguna disminución en la actividad de la glutaminasa que sea significativo; en el caso del verapamil, sólo se observa una ligera tendencia a disminuir la actividad en un 23% con respecto al NMDA, sin que esta diferencia sea estadísticamente significativa.

### C. Papel de los Canales de Calcio Sensibles a Voltaje en el efecto del NMDA.

Las vías de entrada de calcio inducidas por NMDA y KCl son distintas. Una es a través de los CCSV que se abren por una despolarización directa inducida por KCl o indirectamente por NMDA.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Existen numerosos estudios en los que se ha demostrado la presencia de los CCSV en neuronas granulares de cerebelo de rata (Carboni and Wojcik, 1988; Slesinger and Landsman, 1991; Morán et al., 1991), por lo que algunos investigadores han estudiado su participación en las células granulares, por ejemplo, Kingsbury y R: Balázs estudiaron el efecto de algunos agonistas y antagonistas de estos canales de  $Ca^{++}$ , demostrando que bajo condiciones despolarizantes de alto potasio, la entrada de este catión se dá mediante los CCSV. Los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con el hecho de que cuando se despolarizan las células por medio de NMDA, la entrada de calcio se lleva a cabo principalmente a través de los CCSV, ya que en presencia de nifedipina 0.5mM (un antagonista de los CCSV tipo "L"), la actividad de la GAF no se afecta. Por otra parte, si la activación de la glutaminasa se lleva a cabo en presencia de KCl (40 mM), la actividad de la enzima disminuye en presencia del mismo antagonista, sugiriendo en este caso, que la intervención de los CCSV son importantes cuando la despolarización se lleva a cabo con potasio.

Para comprobar una posible entrada de calcio a través de los CCSV, se utilizó un agonista de los ccsv tipo L, el Bay-K (0.01mM). En estudios anteriores se ha demostrado que cuando se utiliza este agonista, los canales de  $Ca^{++}$  permanecen abiertos más tiempo, produciendo así modificaciones en cuanto a la sobrevivencia de algunos tipos celulares. En este estudio, dicho fármaco no potenció de manera alguna el efecto de la actividad de la glutaminasa inducida por NMDA, pero sí incrementó significativamente la actividad enzimática *per se*, apoyando una vez más la idea de que la entrada de calcio en el caso del NMDA es mediante el ionóforo acoplado a su receptor, y que la entrada de  $Ca^{++}$  por CCSV es capaz de inducir el mismo efecto que el NMDA y KCl.

Los ensayos realizados con concentraciones altas de  $Mg^{++}$  apoyan la idea anterior. El  $Mg^{++}$  a esas concentraciones es capaz de bloquear el ionóforo acoplado al NMDA de una forma dependiente de voltaje. Por otro lado el  $Mg^{++}$  también puede antagonizar el transporte de  $Ca^{++}$  a través de los CCSV inducido por concentraciones elevadas de potasio.

#### D. Intervención de los reservorios internos en el efecto del NMDA.

Dado que el bloqueo de las vías de  $\text{Ca}^{++}$  y de los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular no son suficientes para abolir completamente los efectos del NMDA y de KCl, se estudió la posibilidad de que los reservorios intracelulares de calcio estén participando en este fenómeno.

Esta sugerencia se apoya en el hecho de que el dantroleno (una droga que inhibe los reservorios de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular disminuye aproximadamente un 30% la actividad de la glutaminasa cuando esta se activa por NMDA, así mismo, la Rianodina, otra droga que inhibe la liberación de calcio a partir de los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$  interno activados por cafeína, disminuyó aproximadamente un 20% la actividad de la enzima (datos no mostrados).

Otra de las evidencias experimentales que apoya la participación de los reservorios de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular son los resultados obtenidos con células tratadas con cafeína. Esta droga depleta calcio intracelular. En los cultivos de células granulares de cerebelo de rata, las concentraciones usadas normalmente en otras células resultaron tóxicas, sin embargo a concentraciones bajas (100 mM) la cafeína inhibió la activación de la GAF en una proporción similar a la ejercida por el dantroleno.

#### E. Sistema calcio-calmodulina.

Finalmente, dado que el efecto del NMDA observado es dependiente de calcio intracelular, en este estudio se exploró, de manera preliminar, la posibilidad de que el sistema calcio-calmodulina estuviera involucrado en este fenómeno. En un estudio realizado por Balász, sugiere que esta vía de segundos mensajeros pudiera estar involucrada en el efecto del NMDA en la sobrevivencia de las células en cultivo. En nuestro trabajo sin embargo, ninguna de las drogas que interfieren con el sistema Ca-calmodulina como la trifluoperazina y el W7 (10mM), afectaron la activación de la glutaminasa inducida por NMDA. Por lo tanto, es posible que el calcio participe en la activación de la enzima por otra vía diferente a la de este sistema de segundos mensajeros.

## 7. CONCLUSIONES.

1) El efecto del NMDA y KCl en la activación de la glutaminasa requiere de un incremento de calcio intracelular.

2) El  $\text{Ca}^{++}$  que se requiere para que se lleven a cabo los efectos estudiados en este trabajo, proviene tanto del medio extracelular, como del interior de la célula.

3) Aunque el efecto del NMDA es dependiente de calcio, un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  *per se* no es suficiente para mimetizar la acción de estos agentes sobre la actividad de la GAF.

4) En el caso del NMDA, el calcio parece entrar a la célula a través del ionóforo acoplado al receptor, más que a través de los Canales de Calcio Sensibles a Voltaje, mientras que para el KCl el calcio entra exclusivamente por estos canales sensibles a voltaje.

5) Las fuentes de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular parecen jugar un papel importante en la acción del NMDA sobre la actividad de la Glutaminasa activada por fosfato. Probablemente el calcio que entra por el canal acoplado al receptor de NMDA induce la liberación de calcio de un sitio sensible a calcio.

6) El mecanismo de acción del  $\text{Ca}^{++}$  en la GAF no involucra al sistema calcio-calmodulina, se sugiere que el mecanismo podría estar relacionado con otro sistema de segundos mensajeros.

## **8 REFERENCIAS CONSULTADAS.**

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 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 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 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.

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

Balázs, R., N. Hack and 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.

Balázs, R. O.S. Jorgensen and N: Hack., 1988. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neurosci.* 27: 437-451.



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.

Balász R., N. Hack and O.S. Jorgensen., 1990. Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of the cerebellar granule cells in culture: effect of kainic acid. *Neurosci.* 37(1): 251-258.

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

Barde, Y:A., 1989. *Neuron*. 2: 1525-1534.

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

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

Carboni E., W.J. Wocjik., 1988. Dihydropyridine binding sites regulate calcium influx through specific voltage-sensitive channels in cerebellar granule cells. *JNeurochem* 50: 1279-1286

Choi, D:W, 1987, Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. of Neurosci.* 7: 357-358.

Choi, D:W., Malucci-Gedde, M.A., and Kreigstein, A.R., 1987. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. of Neurosci.* 7: 369-379.

Choi, D:W., 1988. Calcium-mediated neurotoxicity : relationship to specific channel types and role of ischemic damage. *TINS* 11:465-469.

Cotman C. W. and Iversen L. L., 1987. Excitatory aminoacids in the brain - focus on NMDA receptors. *TINS* 10(7): 263-265.

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

Fonnum F., 1984. Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42: 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.

Garthwaite, J., G. Garthwaite and F: Hajos., 1986. Aminoacid neurotoxicity : relationship to neural depolarization in rat cerebellar slices. *Neurosci* 18: 449-460.

Hamberger, A., Chiang G:H., Nylén 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. \*\*\*\*\*

\*\*\*\*\*

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

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

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

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

Johnson J. W. and Asher P., 1987. Glycine potentiates the NMDA responses in cultured mouse brain neurons. *Nature* 235: 529-531.

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

Kasa P. and Silver A., 1969. *J. Neurochem.* 16: 389-396.

Kemp, J:A., Alan C:F., Erick H:F:W., 1987. Non-competitive antagonists of excitatory aminoacid receptors. *TINS* 10(7):294-298.

Kennedy, M., 1989. Regulation of neural function by calcium. *Trends in Neurosci.* 12: 417-420.

Kingsbury, A., R. Bálasz, 1987. Effect of calcium agonists and antagonists on cerebellar granule cells. *Eur. J. Pharmacology.* 140: 275-283.

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

Langman J. "Embriología médica". Ed. Interamericana, México, 1984.

Larsell O., 1967. "The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum from Monotremes through Apes". Vol. 1, edited by J. Jansen. University of Minnesota Press, Minneapolis.

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.

Lodge, D. and K.M. Johnson, 1990. Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *TIPS.* 11: 81-86.

López-Colomé, A. M., 1983. Acido glutámico y aspartático. En "Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas". (Pasantes M. H. y Arechiga H. eds.). UNAM; México.

Mac Dermott, A.B. and N: Dale., 1987. Receptors, ion channels and synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory aminoacids. *TINS* 10(7): 280-283.

Mayer, M.L. and Westbrook, G.L., 1987. The physiology of excitatory aminoacids in the vertebrate central nervous system. *Prog NeuroBiol.* 28:197-276

Meldolesi, J, P:Volpe and T: pozzan, 1988. The intracellular distribution of calcium .*TINS.*11(10): 249-252.

Miller, R.J., 1991. The revenge of kainate receptor. *TINS* 14(11): 477-479.

Monaghan D. T., Bridges R. J. and Cotman C. W., 1989. The excitatory amino acids receptors: their classes, pharmacology and distinct properties and function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 365-402.

Morán J. and A: Patel., 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activate glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev. Brain Res.* 46: 97-105.

Morán J. and M. Rivera.-Gaxiola,1992. Potassium and N-Methyl-D-Aspartate on the Aspartate Aminotransferase activity in cultured cerebellar granule cells. *J. of Neurosci. Res* 33: 239-247.

Morán O., Lin, O. Zegarra-Morán and Sciancalepore., 1991. Voltage dependent calcium channels in cerebellar granule cells primary cultures. *EurBiophysJ* 20: 157-164.

Mossman T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and citotoxic assays. *J. Immunol.Meth.*65:55-63.

Nicoletti, F., J.T. Wroblewski; A. Novelli., H. Alho; A. Guidotti and E. Costa., 1986. The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 6:1905-1911.

Lehmann, J., J.C.R. Randle and J. Reynolds, 1990. Excitatory amino acid receptors: NMDA modulatory sites, kainate cloned and a new role in AIDS. *TIPS.* 11:1-3.

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

Palaiologos, G., L. Herz and 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. C., Zinkand C. W., Thompson C., Keith R. and Salama A., 1990. Role of glycine in the N-methyl-D-Aspartate mediated neuronal cytotoxicity. *J. Neurochem.* 54(3): 849-854.

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

Patel A., A. Hunt A, 1985. Observations on cell growth and regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in primary cultures of forebrain and cerebellar astrocytes. *Dev. Brain.Res.* 18: 175-184.

Plaitakis A., Berl., and Yahr M.D., 1982. Abnormal Glutamate metabolism in adult-on set 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.

Reynolds J. I. and Miller R. J., 1988. Multiple sites for the regulation of the N-methyl-D-Aspartate receptor. *Mol. Pharmacol.* 33: 581-584.

Rothman, S:M, 1985. The neurotoxicity of excitatory amino acid is produced by passive chloride influx. *J. of Neurosci.* 5: 1483-1489.

Rothman, S:M: and J:W Olney, 1988. Neurotoxicity of excitatory aminoacid receptor agonists in rat cerebellar slices: dependence on calcium concentration . *Neurosci Lett.* 66: 193-198.

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

Serafian, T. and Verity ,M:A:, 1986. Influences of thyroid hormones on rat cerebellar cell agregation and survival in culture . *Dev. Brain. Res.* 26: 261-270.

Simon,R:P., J.H. Swan, T. Griffiths and Meldrum, B:S., 1984. Science. 226: 850-852.

Slater T.F.,B. Sawyer; U. Stràuli , 1963. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. Biochem.Biophys.Acta . 77: 383-393.

Slesinger P.A., J.B. Landsman., 1991. Inactivation of calcium currents in granule cells cultured from mouse cerebellum. JPhysiol 435: 101-121.

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

Stryer, L., 1988. Biochemistry. Neww York. W:H: Freeman Eds.

Tsien, R:W; D: Lipscombe, D.V. Madison; K.R. Bley and A.P. Fox, 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation.TINS.11(10): 431-437.

Vazquez Nin, G:H:, Guadalupe Zavala ., 1991. Ontogenia neural. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. UNAM. Coordinación de la investigación Científica.p. 15-42.

Watkins J. C., Krogsgard-Larsen P and Honoré T., 1990. Specific activity relationship in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonist. TIPS 11: 25-33.

Young J. Z., 1975. "The Life of Mammals". 2nd. ed. Clarendon Press. Oxford, 528 pp.



**Young A. B. and Fagg G. E., 1990. Excitatory aminoacid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. EAA Pharmacol. 42-48.**