



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL NMDA Y LA DESPOLARIZACION POR POTASIO EN LOS NIVELES DE RNA MENSAJERO DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASA EN NEURONAS CULTIVADAS

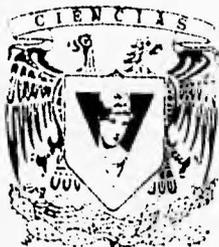
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

ANDREA CABALLERO BENITEZ



TESIS CON 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
EFECTO DEL NMDA Y LA DESPOLARIZACION POR POTASIO EN LOS NIVELES
DE RNA MENSAJERO DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASA EN NEURONAS CULTIVADAS
realizado por ANDREA CABALLERO BENITEZ

con número de cuenta 8524791-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario DR. JULIO MORAN ANDRADE
Propietario M. EN C. SILVESTRE ALAVEZ ESPIDIO
Propietario M. EN C. LAILA GUTIERREZ KOBEH
Suplente DRÁ. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ
Suplente BIOL. GUADALUPE DOMINGUEZ MAGUIZET

[Handwritten signatures]
Laila Gutierrez K
Edna M. Suarez D.
Dominguez

[Handwritten signature]
COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

A mis padres y hermanas, por toda su confianza, apoyo y cariño, gracias por creer en mí. A Car y Lourdes, por infundirme ánimos y por ser mis grandes amigas.

A Silver, por todas las cosas que he aprendido de ti, por tu tiempo, tu apoyo, tus consejos y tus palabras de aliento en todo momento, por creer en mi y por tu amor a la vida.

A Julio, por permitirme regresar y continuar, por tu invaluable apoyo y por ser el jefe más agradable del mundo. Mil Gracias!

A Paty, Silvia y Pedro, por permitirme vivir momentos emocionantes y llenos de sonrisas y alegría. Siempre serán parte de mi.

A Edna, por compartir conmigo parte de tu vida. Gracias por todos esos momentos tan especiales y por dejarme seguir a tu lado.

A Tamara y Román, amigos para toda la vida, por hacer mi vida académica mucho más agradable.

A Tamarita, por sus palabras de aliento y por su confianza.

A Lupita, Clau, Dany, Ana, Toño y Alette por su, alegría, entusiasmo y por estar cerca de mí.

Agradezco a mis sinodales: Dr. Julio Morán Andrade, M. en C. Silvestre Alavez Espidio, M. en C. Laila Gutierrez Kobeh, Dra. Edna Suárez Díaz, Biol. Guadalupe Domínguez Macouzet, por su valiosa contribución y asesoría.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 224-N del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade, con el apoyo de la D.G.A.P.A., UNAM.

INDICE

I) INTRODUCCION	1
1) ASPECTOS BASICOS	1
1.1) Desarrollo del cerebelo	3
1.2) Histogénesis del cerebelo	6
2) RECEPTORES A AMINOACIDOS EXCITADORES	10
2.1) Características de los receptores	11
2.1.1) Receptores tipo NMDA	11
2.1.2) Receptores tipo no-NMDA	13
3) METABOLISMO DE LOS AMINOACIDOS EXCITADORES	15
3.1) Reacciones catalíticas	17
3.1.1) Glutamato deshidrogenasa (GLDH)	17
3.1.2) Glutaminasa activada por fosfatos (GAF)	17
3.1.3) Aspartato aminotransferasa (AAT)	18
4) FACTORES TROFICOS	18
5) REGULACION GENICA	21
II) ANTECEDENTES	24
III) OBJETIVOS	29
IV) MATERIAL Y METODOS	30
V) RESULTADOS	38

VI) DISCUSION	43
VII) CONCLUSIONES	49
VIII) ABREVIATURAS Y SIGLAS	50
X) BIBLIOGRAFIA	53

I) INTRODUCCION

1) ASPECTOS BASICOS

El cerebelo constituye sólo el 10% del volumen total del cerebro, sin embargo contiene más de la mitad de las células neuronales. Es una estructura muy importante desde el punto de vista estructural y funcional, contiene una diversidad característica de células neuronales que se interconectan con otras áreas del cerebro a través de circuitos neuronales complejos con vías de entrada y salida, que corresponden a las de un órgano de coordinación de impulsos motores que emanan del cerebro. Recibe información sobre la planeación del movimiento que procede de estructuras cerebrales concernientes a la programación y ejecución del movimiento, esto a través de las neuronas de las cortezas motora y premotora que proyectan sus axones a diferentes regiones del cerebelo. También está involucrado en el control de señales de neuronas motoras, de neuronas contralaterales y propioespinales y también de interneuronas que integran información de la médula espinal.

El cerebelo es una estructura que ha mostrado ser un excelente modelo de estudio en el campo de la neurobiología, dadas sus características estructurales, su localización en el SNC, su arquitectura laminar y los tipos celulares que lo conforman.

Las complejas y diversas funciones que lleva a cabo el SN maduro, dependen de las interconexiones precisas formadas por miles de tipos celulares neuronales. El establecimiento de los patrones de madurez de estas conexiones neuronales, es un

proceso gradual en el que pueden destacarse 5 eventos:

1) Proliferación. Una población de células precursoras neuronales, inducida del ectodermo indiferenciado por señales que proceden del mesodermo, comienza a proliferar dando lugar a una enorme cantidad de células neuronales aún indiferenciadas.

2) Migración. Las células neuronales comienzan a diversificarse, dando lugar a las células gliales y a las neuronas inmaduras. Estas células comienzan a migrar de las zonas germinales a sus destinos finales.

3) Diferenciación. Desde que comienza el fenómeno de migración, las células reciben señales a lo largo de su camino que les indican cuál será su destino. Así, comienzan a adquirir las características fisiológicas y morfológicas del que será su fenotipo neural definitivo.

4) Formación y establecimiento de procesos. Las neuronas comienzan a extender sus axones, proyectándose a las vecindades de sus blancos eventuales dando lugar a los grandes circuitos neuronales.

5) Muerte Celular. Este proceso ocurre en realidad, una vez que comienza el desarrollo, y se calcula que alrededor del 50% de las neuronas producidas durante la fase explosiva de proliferación, muere, aparentemente, de manera programada. Los factores tróficos, que juegan un papel muy importante a lo largo del desarrollo, parecen tener también un papel preponderante en este proceso.

Ya que todos estos fenómenos se dan para cada tipo celular, se obvia que en una región del cerebelo, la población total de un tipo celular puede estar pasando por más

de uno de estos eventos, en donde además intervienen dos mecanismos muy importantes: la influencia del medio externo y la expresión y represión de genes. Ellos determinan en gran parte, las características de las células neuronales maduras y regulan estos eventos en el tiempo y en el espacio.

1.1 Desarrollo del cerebelo.

El cerebelo se deriva de la tercera vesícula cerebral, el rombencéfalo, resultante del engrosamiento que sufre el tubo neural una vez que se ha cerrado el neuroporo anterior (cuadro I). Esta vesícula a su vez da origen al metencefalo y al mielencéfalo. En el sistema nervioso maduro, el cerebelo tiene numerosas subdivisiones anatómicas y funcionales. Se desarrolla a partir de neuronas inmaduras que proceden de los labios rómicos, una región especializada de la placa alar de la porción metencefálica del tubo neural. Los labios rómicos se localizan en la región dorsolateral del metencéfalo, e inicialmente se encuentran ampliamente separados uno del otro. Estas dos regiones dorsolaterales contienen células que están proliferando, hasta que en la parte media, los labios se fusionan gradualmente a lo largo de la línea media dorsal con un gradiente rostro-caudal, formandose así el vermis del cerebelo. Esta región está más relacionada con el control del balance y la postura. Más tarde, comienza el desarrollo de las fisuras. La más prominente está orientada de la región media a la región lateral, y divide al cerebelo en tres lóbulos: el anterior, el posterior y el floculonodular (fig.1).

Ya que el cerebelo se desarrolla a partir de células neuronales precursoras que

CUADRO I

Vesículas cerebrales primarias	Vesículas cerebrales secundarias	Encéfalo desarrollo
Prosencéfalo	Telencéfalo	Hemisferios cerebrales -Sistema olfatorio -Cuerpo estriado -Pallio -Sustancia cerebral blanca
	Diencéfalo	-Tálamo epi, hipo, subtálamo
Mesencéfalo	Mesencéfalo	-Cerebro medio
Rombencéfalo	Mielencéfalo	-Corteza del cerebelo -Bulbo raquídeo
	Metencéfalo	-Protuberancia -Puente -Cerebelo

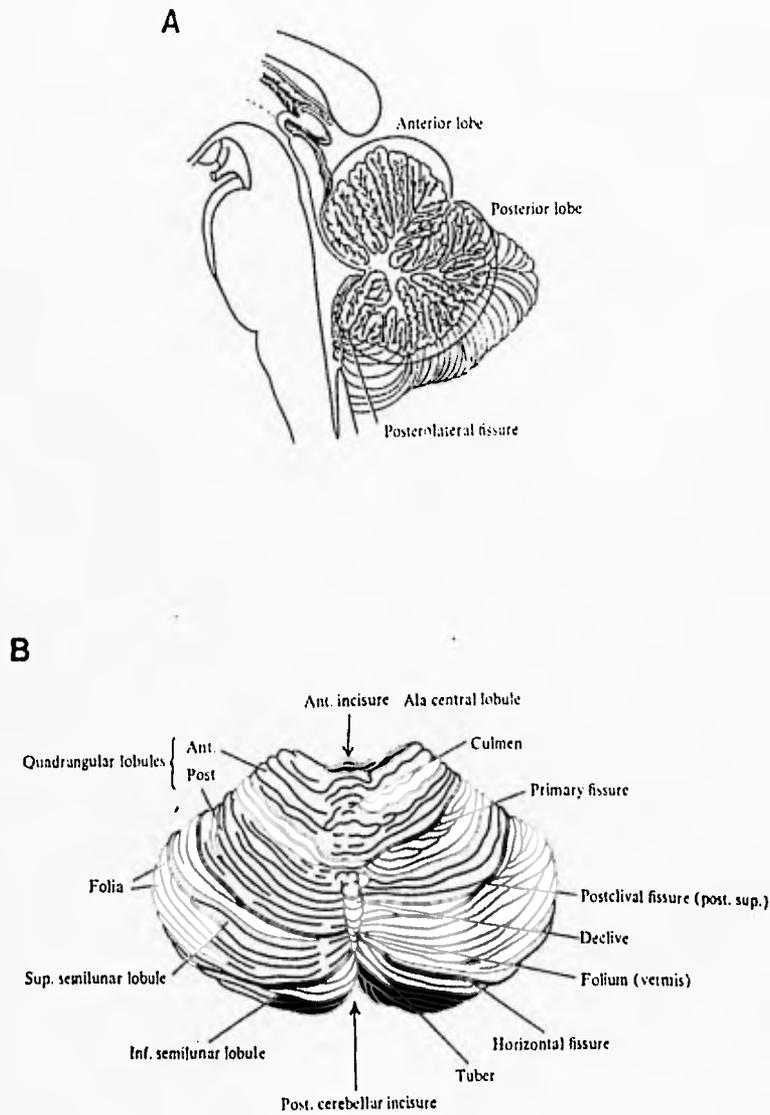


Fig.1 Cerebelo. A) Parte medial del lado derecho; B) parte posterior-superior.

migran desde la placa alar, los axones de las neuronas del núcleo del tallo cerebral son enviadas al cerebelo, y también se desarrollan a partir de la placa alar. Sin embargo, éstas neuronas inmaduras, migran de la región ventral del tallo cerebral.

La corteza cerebelar es una estructura formada por tres capas que contienen cinco tipos celulares neuronales: las células estrelladas, las células en canasta, las células de Golgi, las células de Purkinje y las células granulares (Fig. 2). La capa externa o capa molecular, se compone principalmente de axones de células granulares que se conocen como fibras paralelas, pues corren de manera paralela al eje longitudinal del folium (éste último se encuentra debajo de la corteza cerebelosa). También contiene células estrelladas y células en canasta, en menor cantidad, que funcionan como interneuronas, así como las dendritas de las células de Purkinje.

Debajo de la capa molecular se encuentra la capa de las células de Purkinje, que contiene los cuerpos celulares de éstas neuronas (aproximadamente de 50 a 80 μm). Estas células se rearreglan de lado a lado en una sola capa, tienen árboles dendríticos muy grandes que se extienden dentro de la capa molecular en un sólo plano perpendicular al eje principal del folium. Las células de Purkinje envían sus axones fundamentalmente a la materia blanca. Estas neuronas son inhibitorias, utilizan al ácido gamma-aminobutírico (GABA) como su neurotransmisor y constituyen la única vía de salida de ésta estructura.

La siguiente es la capa granular, que contiene un gran número de paquetes densos de pequeñas neuronas, las células granulares, su número es de aproximadamente 10^{11} . Hay también una pequeña cantidad de células de Golgi que se encuentran en

el borde externo. La capa granular contiene pequeños espacios llamados glomérulo cerebelar, en donde las células forman contactos sinápticos complejos con las fibras aferentes de las células musgosas.

Las fibras musgosas se originan de uno de los núcleos pontinos y de neuronas de la médula espinal. Estas fibras tienen influencia sobre las células de Purkinje a través de las sinapsis que establecen con las células granulares; estas células son interneuronas excitadoras del glomérulo cerebelar. Sus axones suben a través de la capa molecular, haciendo poderosas conexiones excitadoras, a lo largo de su camino, con las células de Purkinje. En esta misma capa, los axones de las células granulares se bifurcan, dando origen a las fibras paralelas, que se extienden varios milímetros a lo largo del eje de la folia cerebelar. Las fibras paralelas intersectan con dendritas de algunas células de Purkinje, las cuales se orientan perpendicularmente a las fibras paralelas. Cada célula de Purkinje recibe información de aproximadamente 200,000 fibras paralelas de las células granulares, y cada célula granular recibe información de muchas fibras musgosas.

Las trepadoras, son otras fibras excitadoras que se originan de un sólo lugar de la médula, el núcleo olivar inferior. Son llamadas fibras trepadoras por la morfología de sus terminaciones sinápticas en las células de Purkinje. Todas sus sinapsis son excitadoras.

La actividad de las células de Purkinje está modulada por tres tipos de interneuronas que son inhibitorias: las células estrelladas y las células en canasta, que se encuentran en la capa molecular y que establecen conexiones excitadoras con

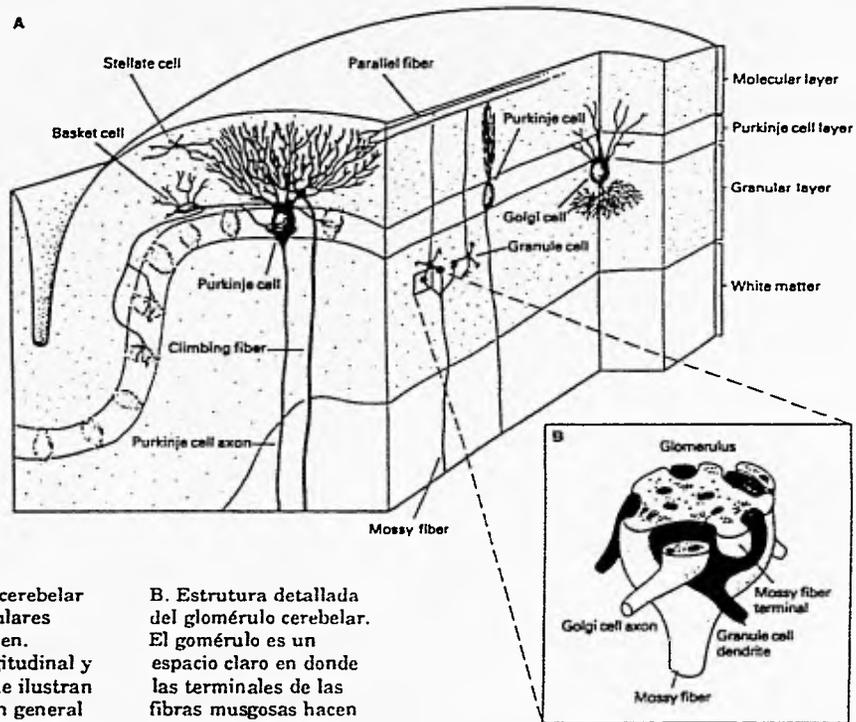


Fig.2 Corteza cerebelar y los tipos celulares que la componen. A. Planos longitudinal y transversal que ilustran la organización general de la corteza cerebelar.

B. Estructura detallada del glomérulo cerebelar. El gomérulo es un espacio claro en donde las terminales de las fibras musgosas hacen contactos sinápticos con los axones de las células graulares y de las células de Golgi.

las fibras paralelas, y las células de Golgi de la capa granular. Las células de Golgi, tienen elaborados árboles dendríticos en la capa molecular y también reciben información de las fibras paralelas. Estas células utilizan al GABA como neurotransmisor.

1.2) Histogénesis del cerebelo.

Durante su diferenciación se observa que de la capa del manto se producen dos migraciones celulares, la primera integra la capa granulosa externa, que es un centro de multiplicación celular, y la segunda origina células que migran menos superficialmente, las cuales se diferenciarán en células de Purkinje. Cuando éstas ocupan su sitio definitivo, las de la granulosa externa se profundizan para constituir la granulosa interna, en donde se diferencian en células de Golgi y en células granulares; de los neuroblastos formados de la primera migración derivan las células en canasta y las estrelladas. A medida que las células granulares se sitúan en su posición definitiva, sus axones en "T" forman, en la capa molecular las fibras paralelas. La migración de las granulares concluye postnatalmente, y de esta manera la corteza cerebelosa queda constituida por una capa molecular superficial, la de las células de Purkinje y la granulosa interna.

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

Células de Purkinje:

Las células de Purkinje maduran en tres fases:

En una primera etapa, las pequeñas células fusiformes se distribuyen en capas múltiples, más tarde adquieren forma estrellada o multipolar y forman una sola hilera de células; finalmente, los procesos somáticos maduran gradualmente y las dendritas se rearreglan en un plano perpendicular a lo largo del eje de las placas.

La duración de cada estado es constante para cada especie, sin embargo puede ser muy diferente entre las distintas especies.

Células de Golgi:

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

Células en Canasta:

Se diferencian de la capa germinal externa en los días 6 a 7 postnatales. Se conoce poco sobre los procesos de diferenciación de estas células, es probable que durante la división mitótica, el neuroblásto atraviese por una represión irreversible del DNA genómico (Eccles, 1970). El DNA activo restante, puede ser diferente para cada tipo de neurona, dándoles así diferentes propiedades químicas.

Células Estrelladas:

Estudios autorradiográficos con timidina tritiada indican que este tipo de células se diferencian entre los días 8 a 11 postnatales en la rata (Altman, 1972).

Células Granulares:

La capa germinal externa consta de dos zonas: una zona superficial de proliferación

y una zona basal premigratoria. En la rata, las células granulares se originan de la capa germinal externa durante las primeras 2-3 semanas postnatales, pasan a la zona basal durante su primer día de vida, y a los 13 días alcanzan la capa granular. La zona proliferativa tiene un grosor de 4 a 5 células en ratas recién nacidas. Durante varios días, la zona proliferativa tiene debajo una zona subproliferativa o premigratoria de 2 a 3 células de grosor y que crece en profundidad entre los días 7 y 10 después del nacimiento. Para el día 11, la zona proliferativa ha disminuido en grosor, le sigue un adelgazamiento en la zona premigratoria, para el día 19 la zona proliferativa ya no presenta ni siquiera una hilera continua de células (fig. 3).

Las células de la capa granular migran del tubo neural a través de la capa molecular y comienzan a enviar sus proyecciones axónicas a los cuerpos celulares que se encuentran en la capa granular (Altman, 1982). Así, la capa más externa queda como capa molecular, conteniendo dichos axones (fibras paralelas) y células de tipo interneuronas o neuronas de "relevé" (estrelladas y de canasta). La capa interna o capa granular, se forma durante la segunda semana de vida postnatal. El cerebelo adulto de la rata posee alrededor de 1.1×10^8 células granulares, cuyos somas miden entre 5 y 10 μ de diámetro. Las fibras paralelas tienen un diámetro de alrededor de 0.2 μ .

Durante la migración, las células granulares establecen una estrecha relación con los procesos (extensiones) de las células gliales de Bergman. Dado que este proceso es complejo y muy preciso en estadios tardíos del desarrollo del cerebelo, se ha propuesto que la migración podría darse mediante el reconocimiento de componentes

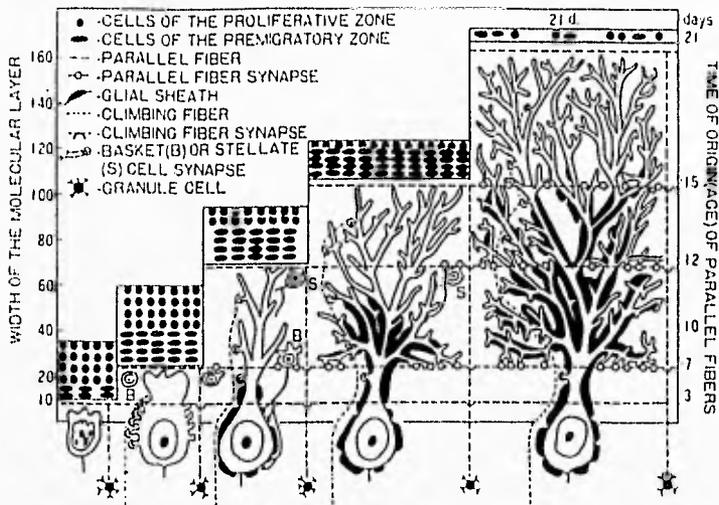


Fig.3 Diagrama que ilustra algunos de los eventos más importantes que tienen lugar durante la maduración de las células que conforman al cerebelo.

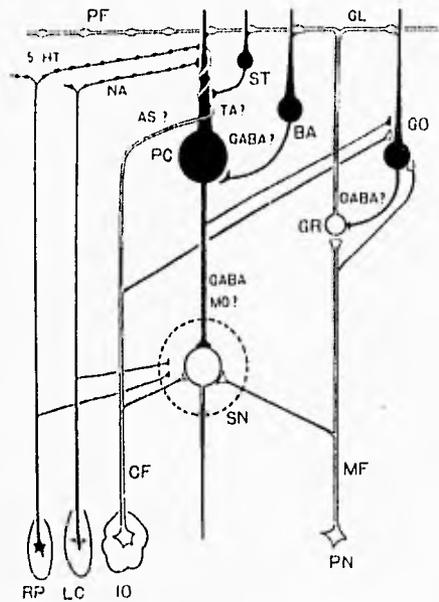


Fig.4 Tipos celulares presentes en el cerebelo adulto y el neurotransmisor que utilizan.

de la matriz extracelular entre ambos tipos celulares.

La formación de las sinapsis constituye uno de los procesos finamente regulados durante el desarrollo, siendo la comunicación neuronal una de las funciones más importantes de las neuronas. Previo a ello, se lleva a cabo el retraimiento de muchos procesos que no alcanzaron el destino correcto o que no se desarrollaron totalmente. Todos estos eventos están directamente relacionados con una serie de estímulos macro y microambientales, siendo éstos a la vez producto de la información genética y de estímulos externos. Se sabe que las células granulares presentan pequeños árboles dendríticos y las primeras innervaciones que reciben durante el desarrollo son de las fibras musgosas excitadora que provienen del puente y de la médula espinal (Altman, 1982). Esto ocurre en el quinto día postnatal. Las fibras musgosas hacen contactos con las dendritas de las células granulares, y poseen varicosidades llenas de vesículas. Estos sistemas se conocen como glomérulos (Burgoyne y Cambray, 1988). Se ha sugerido que las fibras musgosas ejercen un efecto neurotrófico en dichas células. En el glomérulo también hacen sinapsis las células inhibitoras de Golgi; a su vez, las células granulares tienen su principal grupo de células blanco en las células de Purkinje, y parece ser que la sinapsis con dichas células juega un papel muy importante en la sobrevivencia de las células granulares (Sotelo y Changeux, 1974; Burgoyne y Cambray, 1988). Estas sinapsis se establecen alrededor del día 12 postnatal.

Durante la diferenciación, todos los tipos celulares mencionados van adquiriendo su fenotipo neural definitivo que les conducirá a un estado especializado, ampliando

así la expresión de ciertas características, tanto estructurales como metabólicas. Durante este proceso, las células definen el neurotransmisor a utilizar durante el estado maduro, lo cual conlleva a la expresión de la maquinaria bioquímica para la síntesis, liberación y captura del neurotransmisor, y finalmente, sólo un pequeño número de células, queda como unidad estructural y funcional del individuo adulto (fig. 4).

2) RECEPTORES DE AMINOACIDOS EXCITADORES

Un neurotransmisor es una sustancia liberada de las terminales sinápticas como respuesta a una señal específica y que se origina en la neurona presináptica, produciendo ciertos cambios en la permeabilidad iónica de la neurona postsináptica. Algunos otros desencadenan efectos a través de segundos mensajeros.

Existe una gran variedad de compuestos considerados como neurotransmisores en el SNC. El aminoácido excitador glutamato es de los más abundantes y es mediador en la mayoría de las sinapsis excitadoras en el cerebro. Se presenta en altas concentraciones en el SNC y su liberación es una respuesta a la despolarización, de manera dependiente de Ca^{2+} (estimulación directa *in vivo*).

Si bien es cierto que este aminoácido participa en procesos del metabolismo intermedio, las evidencias muestran que funciona como neurotransmisor, entre ellas se puede mencionar el hecho de que está ampliamente distribuido en el tejido cerebral, y está más concentrado que cualquier otro aminoácido; los estudios electrofisiológicos y farmacológicos han demostrado que este compuesto cumple con

los criterios requeridos para ser considerada como neurotransmisor.

En estos estudios se ha encontrado una gran variedad de receptores sinápticos a glutamato, los cuales se clasifican de acuerdo al tipo de respuesta que desencadenan como ionotrópicos o metabotrópicos. De acuerdo a su sensibilidad farmacológica selectiva se les ha dividido en dos subtipos principales: los que reconocen específicamente al aminoácido exógeno como el N-metil-D-aspartato (NMDA), que son los de tipo NMDA, y los del tipo no-NMDA, que a su vez se subdividen en tres clases de acuerdo a su agonista preferencial y a su mecanismo de acción (cuadro II), estos son: los receptores de ácido kaínico y de AMPA, cuyo mecanismo de acción es ionotrópico y los metabotrópicos, que utilizan un sistema de segundos mensajeros para llevar a cabo los cambios iónicos producto de su estimulación (Fig. 5). Se tienen evidencias de que existen por lo menos dos subtipos de receptores metabotrópicos a glutamato, uno que responde a L-AP4 y que está involucrado con una fosfodiesterasa, y otro que responde a ACPD y que está involucrado con la fosfolipasa C.

2.1) Características de los receptores.

A continuación se muestran las características de estos receptores:

2.1.1) Receptores tipo NMDA:

Este receptor tiene al menos 5 sitios distintos de acoplamiento a ligandos endógenos, los cuales aumentan la probabilidad de apertura de los canales iónicos. Estos consisten en dos sitios diferentes de reconocimiento a los agonistas glutamato y glicina, y un sitio regulador para poliaminas que promueve la activación del

CUADRO II

RECEPTORES A AMINOACIDOS EXCITADORES (SNC DE MAMIFEROS)

AGONISTAS

Receptores	NMDA	K	AMPA	METABOTROPICO
Especificos	NMDA ACED	K	AMPA ATPA	
Preferenciales	D-HCSA HQA CPG	K Domato Acromelato	Q ODAP	ACPD (2S, 3S, 4S)CPG Q Ibotenato
Endogenos	L-Glu L-Asp L-SCA		L-CA L-HCSA L-HCA Quinol	

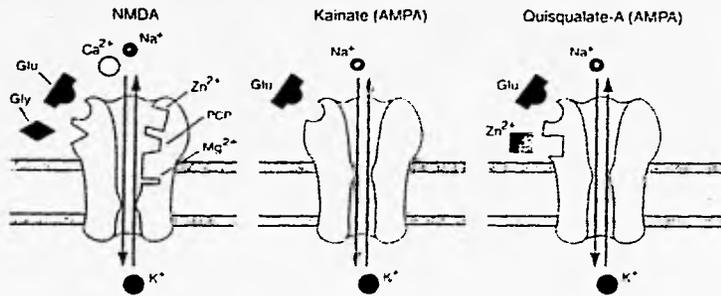
POTENCIADORES Gly, D-Ser

ANTAGONISTAS

Comp. Esp. (Sitio de reconocimiento del agonista)	D-CPP D-AP5 D-AP7		NBQX	
Otros			CNQX DNQX	L-AP3
			Toxina de araña y avispa, pCB-PzDA pBB-PzDA, tDGG, GAS KYN	
Especificos no competitivos (a nivel de canal)	Mg MK-801 PCP Quetamina			

Antipotenciadores HA-966, 7-CIKyn, 5,7-DCK

A.Receptores tipo NMDA y no NMDA



B.Receptores metabotrópicos

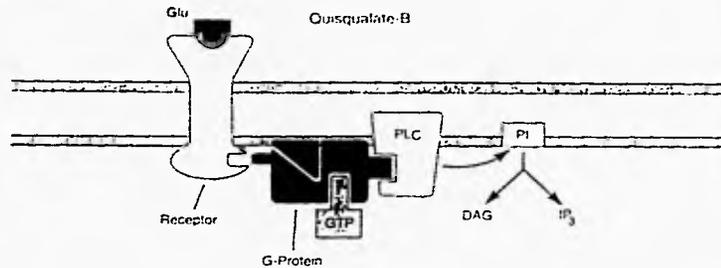


Fig.5 Tipos de receptores a glutamato. A.Receptor tipo NMDA, tiene acoplado un canal permeable a Ca^{2+} , a Na^+ y a K^+ y varios sitios de unión a glicina, Zn^{2+} , PCP, MK801 y Mg^{2+} ; estos compuestos funcionan regulando el canal en diferentes vías. El receptor de ácido kaínico une AMPA un agonista del glutamato y regula un canal permeable a Na^+ y K^+ . El receptor a quisqualato tipo A, también une AMPA y regula un canal de Na^+ - K^+ , de manera similar a como actúa el receptor-canal activado por ácido kaínico. B.Receptor a quisqualato tipo B. Este tipo de receptor induce la activación de una cascada de segundos mensajeros tales como el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), el diacil glicerol (DAG) y el fosfatidil inositol-4,5-bifosfato (PIP2).

receptor; también tiene dos sitios separados de reconocimiento para magnesio y zinc, los cuales actúan inhibiendo el flujo iónico a través del sitio de unión al agonista aún cuando el receptor esté estimulado. La inhibición provocada por el magnesio se bloquea cuando se aumenta el voltaje de las membranas y éste sale del canal; es decir, la activación del receptor es dependiente del voltaje, la corriente es regenerativa y se incrementa con la despolarización (Cotman e Iversen, 1987).

Los agonistas de este tipo de receptores, son cadenas sencillas de aminoácidos dicarboxílicos tales como el glutamato, el aspartato y el NMDA. El glutamato es el agonista endógeno más potente en el cerebro de los mamíferos, seguido por el homocisteato, el aspartato, el cisteinsulfonato y el quinolinato. Los ensayos electrofisiológicos muestran que el NMDA es, en sí mismo, un agonista selectivo para este tipo de receptor, y es menos potente que el glutamato. Este receptor posee también un canal permeable a Na^+ y también a Ca^{2+} , a diferencia del resto de los receptores conocidos. Dentro de dicho canal se encuentra el sitio que une al Mg^{2+} de manera dependiente de voltaje.

Otros bloqueadores del canal del receptor incluyen al MK-801, la quetamina y la fenciclidina (PCP). Estos bloqueadores, junto con el (Mg^{2+}), presentan dependencia de voltaje en grado variable, y es probable que reconozcan algunos dominios diferentes en el canal. El Zn^{2+} , que es también un bloqueador pero endógeno, es independiente de voltaje.

La habilidad del glutamato y de la glicina para activar los receptores tipo NMDA, está enormemente influenciada por el pH extracelular y por el estado de fosforilación

del receptor. Los pH alcalinos (de 6.8 a 8.4), aumentan la frecuencia de apertura del canal en presencia de agonistas.

También existen fármacos que actúan a este nivel como antagonistas tales como los compuestos bicíclicos y derivados del ácido quinurénico o del ácido quinoxalinedicarboxílico, que son antagonistas competitivos del sitio de unión a la glicina. También están el HA-966, el ácido 7-Cl-Kyn y el 5,7-DCK.

Se ha encontrado un sitio modulador más que una poliaminas tales como la espermina y la espermidina. La ocupación de estos sitios no requiere necesariamente que se active el receptor, pero bajas concentraciones (micromolares) de poliaminas, incrementan la habilidad del glutamato y de la glicina para abrir canales individuales. Sin embargo, las altas concentraciones de poliaminas producen un bloqueo dependiente de voltaje del canal iónico inhibiendo así la activación del receptor. La espermicina y la espermidina se sintetizan intracelularmente, y el corto tiempo de acción de las mismas sugiere que sus sitios de acoplamiento se sitúan en la parte del receptor que mira hacia dentro de la célula. En cerebelo, se encuentra principalmente en la capa granular y casi siempre está asociado a zonas con alta densidad de sitios que unen AMPA y a veces con sitios que unen kaínico.

2.1.2) Receptores tipo No-NMDA:

Receptor del ácido kaínico:

El receptor de ácido kaínico tiene como agonistas al KA, al domoato y al acromelato, además del endógeno Glu. Los antagonistas son GAMS, pCBP2DA, DNQX Y CNQX. Se ha demostrado que el receptor es permeable a Na^+ y a K^+ y

también a iones divalentes como el Ca^{2+} (Miller, 1991). En el cerebelo, tanto los sitios de NMDA como los de kaínico, son más densos en la capa granular que en la molecular (Cotman et al., 1987).

Receptor de AMPA:

Esta segunda clase de receptores ionotrópicos median transmisiones sinápticas excitadoras rápidas mediante el glutamato. Estos receptores se distinguen de los del tipo NMDA por los agonistas selectivos (AMPA para los receptores a AMPA y aspartato y NMDA para receptores a NMDA). Los antagonistas selectivos para los receptores de AMPA son algunas quinoxalinedionas, principalmente el NBQX, que es un potente y selectivo antagonista de este tipo de receptores que puede tener un débil efecto sobre otros receptores. Es probable que, excepto el NBQX, muchas de las quinoxalinedionas tengan alguna afinidad al sitio de la glicina en el receptor tipo NMDA.

Las corrientes de flujo a través de este tipo de receptores se mantiene mediante los movimientos de Na^+ de la parte extracelular al compartimento intracelular. Las medidas del potencial de inversión indican un incremento no específico en la permeabilidad a cationes monovalentes, además de que éste potencial de inversión tiene una corriente de flujo (a través de estos canales) cercana a 0 mV. Los flujos de corrientes iónicas hacia fuera de la célula mediante el K^+ , balancean los flujos de corriente hacia dentro mantenidos por Na^+ . La activación de los receptores AMPA requieren de su interacción con el glutamato, aumentando así la probabilidad de apertura de los canales iónicos.

Receptores metabotrópicos:

Este tipo de receptores a glutamato, una vez que han sido activados producen, en diferentes tipos de células, un incremento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} mediante la hidrólisis de los fosfoinosítidos, la liberación de ácido araquidónico mediada por la activación de la fosfolipasa D, y el incremento o decremento en los niveles de AMPc. Los receptores metabotrópicos ejercen una amplia variedad de efectos que modulan la transmisión sináptica, tanto excitadora como inhibitoria. En células granulares de cerebelo, se incrementa la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de K^+ , reduciendo así la excitabilidad. Los segundos mensajeros y las enzimas responsables de varios de los efectos de los receptores metabotrópicos, aún no se conocen con exactitud.

3) METABOLISMO DE LOS AMINOACIDOS EXCITADORES

La síntesis del glutamato y del aspartato se efectúa a partir de la glucosa y de otros precursores mediante el ciclo de los ácidos tricarbónicos por reacciones de transaminación, o bien a partir de la glutamina, por la acción de la enzima glutaminasa; ésta parece ser la principal vía de síntesis del glutamato, ya que la glutaminasa se encuentra en altas concentraciones en las terminales nerviosas; el glutamato es liberado de las terminales nerviosas y es tomado por las células gliales en donde es convertido a glutamina, la cual regresa a la terminal nerviosa, en donde participará nuevamente en el llenado de "pozas" para la síntesis de glutamato y

GABA.

Las células gliales poseen un sistema muy activo para transformar glutamato en glutamina por medio de la enzima glutamino sintetasa, de ahí que se haya sugerido que son éstas las células en las que el proceso se lleva a cabo. Así, la síntesis y el metabolismo del glutamato dependen de la interacción entre las terminales nerviosas y las células gliales.

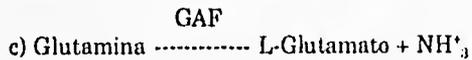
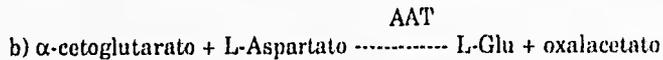
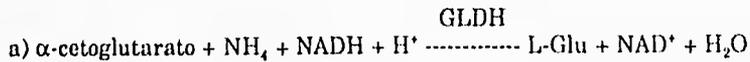
Una vez que el glutamato se ha sintetizado, es empaquetado y guardado en altas concentraciones dentro de vesículas sinápticas, las cuales están listas para ser liberadas e iniciar un nuevo "ciclo" de síntesis.

El ácido glutámico es el principal neurotransmisor en el SNC. De ahí el gran interés que ha despertado su metabolismo, ya que no sólo funciona como neurotransmisor, sino que también participa en vías secundarias, pues forma parte de proteínas, es precursor del GABA, como mencionamos anteriormente y participa en procesos de detoxificación por amonio.

En este trabajo, es muy importante hacer énfasis en la actividad de las enzimas que sintetizan al glutamato como neurotransmisor. Las reacciones de mayor importancia en este sentido son las catalizadas por la glutamato-deshidrogenasa (Wolf y Schunzel, 1987), la glutaminasa activada por fosfatos (GAP) (Hamberger et al., 1979) y la aspartato aminotransferasa (AAT) (Altschuler et al., 1985).

3.1) Reacciones catalíticas.

La reacción catalizada por cada una de ellas es:



3.1.1) Glutamato deshidrogenasa (GLDH):

El glutamato es oxidativamente desaminado en la mitocondria por la glutamato deshidrogenasa (GLDH). La oxidación ocurre con la transferencia de un ión hidrógeno del carbono α del glutamato a NAD(P)', formando así α -iminoglutarato, que es hidrolizado a α -ketoglutarato y amonio.

La GLDH es inhibida por GTP y activada por ADP in vitro; se ha sugerido que estos nucleótidos regulan la enzima in vivo.

Los cambios en la actividad de la GLDH inducidos por interacciones alostéricas, suelen ser difíciles, esto se debe a los cambios de flujo, el cual, muy probablemente esta controlado por las concentraciones de los sustratos y productos.

3.1.2) Glutaminasa activada por fosfatos (GAF):

La GAF utiliza a la glutamina como sustrato y por medio de una desaminación produce glutamato. Algunos estudios apoyan la importancia de GAF en la síntesis del Glu como neurotransmisor (Bradford et al., 1979; Patel et al., 1982). Los cambios regionales de la actividad de esta enzima durante el desarrollo correlacionan con la información conocida sobre la formación de células y vías glutamatérgicas en el

cerebro, por lo que se ha considerado un marcador apropiado del desarrollo y de células glutamatérgicas.

3.1.3) Aspartato amino transferasa (AAT):

Se ha propuesto que la AAT es una de las enzimas clave en la síntesis del transmisor glutamato (Wenthold et al., 1986; Hertz y Schousboe, 1987; Palaiologos et al., 1988, 1989). Se ha sugerido que la síntesis neta de glutamato se daría por una transaminación de aspartato y glutamato catalizada por la AAT en mitocondria y citoplasma, respectivamente, con la participación del complejo malato-aspartato (Fig. 6) (Le Noué y Schoolwerth, 1979; Palaiologos et al., 1989; Hertz y Schousboe, 1987). De cualquier manera esta última posibilidad requeriría de la participación de la GAF en la formación de glutamato a partir de glutamina en la mitocondria (Hertz y Schousboe, 1987).

4) FACTORES TROFICOS

Uno de los eventos más importantes a lo largo del desarrollo de las células neuronales es la muerte celular. La influencia del medio externo juega un papel muy importante en el proceso del desarrollo, y es un fenómeno que junto con la expresión secuencial de genes y represión de algunos otros, determina en gran parte la sobrevivencia de las células, de cuántas llegarán al estado último de diferenciación, y determinan también cuántas han de morir en forma programada. La ausencia de factores tróficos

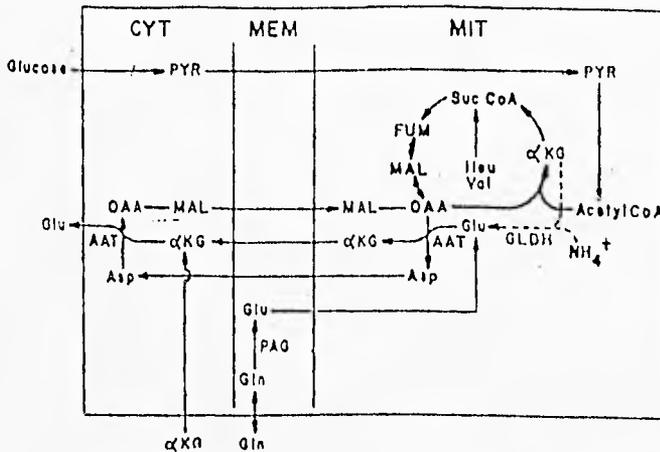


Fig.6 Reacciones citoplásmicas y mitocondriales relacionadas con la biosíntesis del neurotransmisor glutamato. En este esquema se muestran los mecanismos enzimáticos de la AAT y la GAF, las cuales funcionan de manera coordinada para sintetizar al glutamato como neurotransmisor liberable.

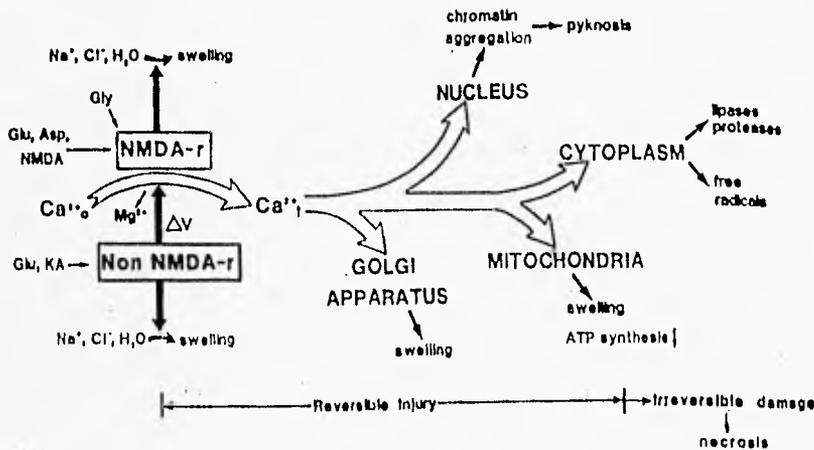


Fig.7 Esquema que muestra el daño neuronal irreversible provocado por la entrada masiva de calcio después de la activación de los receptores tipo NMDA y su potenciación provocada por un estímulo despolarizante a través de los receptores tipo no NMDA.

puede ocasionar un proceso metabólico activo, actuando como represores de genes maestros que si se activan, generan toda una serie de actividades cuyo fin último es la muerte de las células.

Existe una gran cantidad de moléculas tróficas tales como el Factor de Crecimiento Neural (NGF), que estimula a neuronas simpáticas y a otras neuronas sensoriales (Barde, 1989) a dividirse y diferenciarse, el Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro (BDNF), que puede rescatar neuronas motoras fetales de la muerte celular espontánea e inducida, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), que también ayuda a la sobrevivencia de neuronas motoras así como el CNTF (Factor Neurotrófico Ciliar), las neurotrofinas (NT)-3, que ayuda a la sobrevivencia de neuronas viscerales que no responden a NGF, y (NT)-4. Para cada una de ellas existen receptores específicos.

Actualmente se considera al Glu como un posible candidato a neurotransmisor de las células granulares, ya que estas células poseen receptores a aminoácidos excitadores que incluyen a los del tipo NMDA en altas concentraciones cuando las células son inmaduras y en bajas concentraciones en el cerebelo adulto (Garthwaite et al., 1986), esto sugiere que estos receptores pueden tener un papel importante durante el desarrollo de estas células. Burgoyne y Cambray, (1988) y Balász y col. (1988) sugieren que el NMDA previene la muerte de células granulares que normalmente se observa en cultivos en un medio con suero. Ellos han estudiado el efecto de la despolarización por KCl en la sobrevivencia de estas células y proponen que esta despolarización mimetiza de algún modo la acción que ejercen las fibras

musgosas en un estado temprano del desarrollo de las células granulares *in vivo* (Gallo et. al., 1987). También concluyen que el efecto trófico de la despolarización por KCl está mediado por un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, que ingresa a la célula a través de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. Así, es posible que el NMDA produzca una despolarización similar al potasio, a través del canal de Ca^{2+} acoplado a este receptor. Se sabe también que las células granulares requieren de dicha despolarización sólo durante un tiempo muy corto, tiempo que coincide con la actividad de las fibras musgosas sobre dichas células, *in vivo* (Balázs et. al., 1988).

Se sabe sin embargo que la aplicación focal de pequeñas cantidades de aminoácidos excitadores o sus análogos en un estadio determinado del desarrollo es neurotóxico. Se ha sugerido que la isquemia, hipoxia e hipoglucemia tienen como resultado la liberación masiva de aminoácidos excitadores que sobreestimula a las neuronas y puede ocasionar convulsiones epilépticas sostenidas (Balázs, 1988). Se propone que ambos efectos, trófico y tóxico del NMDA, están mediados por el mismo mecanismo, que es un incremento notable en el flujo de Ca^{2+} (Fig. 7). Esta acción bipotencial de los aminoácidos excitadores (el glutamato, específicamente el NMDA) como sustancias tróficas y tóxicas, los convierten en agentes especialmente importantes en el control del desarrollo neuronal. El fenómeno de muerte juega un papel muy importante en el desarrollo de muchos tejidos (ontogenia), y en muchos casos continua en muchos otros a través de la vida del individuo. Este evento conocido como muerte celular programada, es particularmente común en el desarrollo del SNC. Existen evidencias

de que, a lo largo del proceso de muerte las células requieren de ciertas moléculas específicas por las que compiten las terminales nerviosas (factores tróficos).

5) REGULACION GENICA

El cerebro humano contiene aproximadamente 10^{11} células neuronales. Cada neurona es única y presenta un tamaño, una forma y una posición diferente, con patrones únicos de conexión, transmisión y respuesta a los diferentes fenómenos químicos y eléctricos. En el cerebro, se mantiene una estrecha relación entre la expresión génica y el medio ambiente para la determinación del fenotipo, y es en este órgano en donde la regulación de los genes es mucho más compleja que en cualquier otro.

El dogma central de la biología molecular establece que la información fluye de DNA a RNA y de ahí a proteínas. Las células copian la información contenida en la secuencia de nucleótidos del DNA dentro de los nucleótidos correspondientes del RNA. Los genes estructurales (extensas cadenas de DNA que codifican para proteínas), son transcritos al RNA mensajero (RNAm). En los eucariontes, el RNAm se produce en el núcleo y viaja al citoplasma, en donde dirige la síntesis de un sólo tipo de cadena polipeptídica (con la ayuda de la maquinaria sintética y los ribosomas) para formar proteínas en un proceso que se conoce como traducción. Cada RNAm contiene codificada la información que especifica la secuencia de residuos aminoácidos para un tipo de cadena polipeptídica específica. El producto de la transcripción es el llamado RNA heterogéneo nuclear que contiene la secuencia de bases en las que está codificada la serie de aminoácidos de la proteína y además, otras secuencias que no están

presentes en el RNAm. El RNA heterogéneo nuclear se une a proteínas desde el momento de su síntesis para formar partículas ribonucleoproteicas. En esas partículas el RNA sufre varios cambios químicos que en su conjunto se denominan "procesamiento postranscripcional" y que lo transforman en el RNAm maduro, listo para salir al citoplasma, donde al unirse a los ribosomas, será traducido a proteínas; las principales modificaciones que sufre el RNA premensajero son: a) la adición de 7-metilguanósina unida a la primera base del extremo 5' del RNA premensajero por un puente trifosfato tendido entre ambos extremos 5' ("cap"); b) la supresión de las regiones intercaladas que no contienen información sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína (intrones) y el empalmado de alta precisión de las regiones que contienen dicha información (exones); c) la adición en el extremo 3' de 200 a 300 adeninas (poli-A) (fig.8).

El RNAm maduro, como ya se ha mencionado, se traduce dentro de una cadena polipeptídica. Sin embargo, la célula puede seguir regulando las características y la cantidad de la actividad biológica del producto del gene. Es decir, sufren modificaciones postranscripcionales las cuales incluyen modificaciones covalentes y la asociación de un polipéptido con él mismo o con otras proteínas para formar homó- o hetero-oligómeros. Las modificaciones postraduccionales específicas son el resultado de la acción de señales extracelulares, tales como los factores de crecimiento y los neurotransmisores que actúan a través de segundos mensajeros, tales como el AMPc, el Ca^{2+} o el diacil glicerol.

Existen también familias multigénicas cuyas características incluyen: a) copias

múltiples, b) secuencias emparentadas, c) funciones paralelas del producto de los genes y d) patrones distintos en la regulación del desarrollo para los miembros individuales de la familia. Estas familias multigénicas surgen de la duplicación de genes y de secuencias divergentes. En el SN existen muchos ejemplos de tales familias cuyos miembros difieren en sus funciones o en su regulación. Muchas familias multigénicas son también importantes en la determinación de las características de los diferentes tipos de neuronas.

Existen muchas evidencias que muestran la complejidad de la expresión génica del cerebro (el cual contiene aproximadamente dos o tres veces más información en el RNAm que cualquier otro tejido), ya que éste utiliza muchos mecanismos que no son utilizados por otros tejidos. El tamaño promedio de los RNAm específicos del cerebro es de 5 kilobases (KB), dos o tres veces el tamaño promedio de los abundantes RNAm expresados en otros tejidos (fig. 9). Todos estos procesos son de vital importancia para el conocimiento de la regulación génica en los mamíferos. Los complejos patrones de regulación que controlan la expresión génica, son la base para el entendimiento del desarrollo del SN y los cambios plásticos que se dan en respuesta a todas las variaciones que se presentan a lo largo de la vida del individuo.

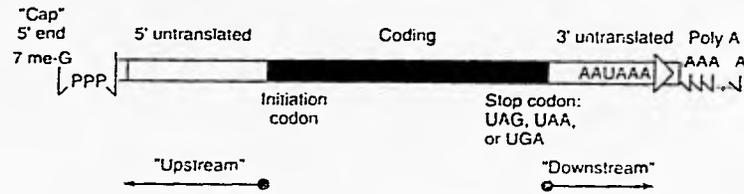


Fig.8 Estructura de un RNAm eucariótico. La región 5' que no se traduce tiene usualmente de 10 a 200 bases de longitud, y la región 3' no traducida tiene de 50 a 2,000 bases de longitud. El tamaño promedio de la región codificadora en los RNAs mensajeros abundantes es de 1,500 bases.

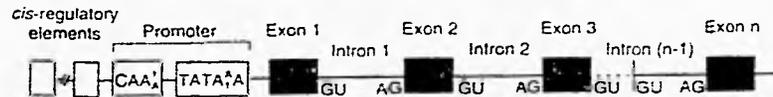


Fig.9 Estructura de un gene eucariótico.

II) ANTECEDENTES

Como mencionamos anteriormente las células neuronales a lo largo de su desarrollo, migran y atraviesan por una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que llevan al establecimiento de una compleja organización funcional y estructural del cerebro. La expresión génica y el medio ambiente juegan un papel preponderante en este proceso de diferenciación. También reafirmamos la importancia de los factores tróficos, los cuales gobiernan todos los cambios plásticos por los cuales atraviesan las células; de ellos depende en gran parte que estas células sobrevivan. Algunos neurotransmisores clásicos se consideran actualmente como parte de estos factores tróficos, tal es el caso del glutamato.

El empleo de sistemas *in vitro*, particularmente de cultivos primarios de células del SN, ha permitido estudiar con cierto detalle los mecanismos básicos de este fenómeno. Esta preparación refleja en gran medida los fenómenos que ocurren durante el desarrollo *in vivo*. Los cultivos de células neuronales constituyen una preparación aislada y homogénea en la que se puede seguir con exactitud el grado de maduración celular y permite el control farmacológico de algunos eventos fisiológicos como la actividad sináptica neuronal.

Uno de los modelos que más se ha estudiado en este sentido es el de las células granulares de cerebelo (CGC). Estas células en cultivo requieren la presencia de concentraciones elevadas de KCl en el medio para sobrevivir (25-40 mM). El efecto del KCl en la sobrevivencia es dependiente del Ca^{2+} extracelular. La acción de los

efectos despolarizantes sobre la sobrevivencia neuronal está determinada por su edad. Las células granulares inician así su dependencia de KCl para sobrevivir alrededor del 5 día *in vitro* (DIV). Este tiempo coincide con el tiempo en el que las células granulares reciben la invasión de las fibras presinápticas musgosas. Así, la despolarización, inducida por el KCl, mimetiza las influencias tróficas ejercidas *in vivo* por dichas fibras, las cuales utilizan al glutamato como neurotransmisor.

Las células granulares poseen los receptores sinápticos para el glutamato, incluyendo los del tipo sensible a NMDA. De esta forma se predice que la estimulación de los receptores de NMDA debe inducir la sobrevivencia de las células granulares mantenidas en un medio con concentraciones fisiológicas de potasio (5 mM), que normalmente lleva a una degeneración celular después de 5 DIV. Se ha sugerido también que durante el desarrollo *in vivo*, éstas células son insensibles al glutamato hasta que finaliza la migración (equivalente al 4 día en cultivo). Una vez completando este evento, las células comienzan a diferenciarse y a requerir de la influencia trófica de las fibras presinápticas mediada por el glutamato (del día 5 al día 10 aproximadamente). Se sabe además que el glutamato es el aminoácido excitador al que más acciones tróficas se le atribuyen, ejerciendo sus efectos casi exclusivamente a través de uno de sus 4 receptores sinápticos, el del tipo NMDA.

En general, se acepta la idea de que la sobrevivencia o el control de la muerte neuronal programada, está regulada por la actividad bioeléctrica y por agentes tróficos derivados de células neuronales. La actividad bioeléctrica no sólo controla la sobrevivencia neuronal sino que también induce la diferenciación de neuronas en

distintas regiones del SN. Las CGC cultivadas en un medio no despolarizante, presentan un retraso significativo en la madurez fenotípica, el cual se manifiesta por la ausencia de acarreadores de aminoácidos, por una deficiencia en la liberación estimulada del transmisor y por la síntesis de proteínas específicas de adhesión, así como en un retraso marcado en la expresión de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje y del receptor sináptico del glutamato. Sin embargo, estas deficiencias se corrigen al despolarizar o estimular al receptor sináptico de glutamato con su análogo, el NMDA.

Diferentes estudios reportan también que la activación de los receptores a NMDA en CGC, promueve la diferenciación bioquímica (Morán y Patel, 1989a,b; Cox et al., 1990). Estos estudios sugieren que el agonista glutamatérgico NMDA y el KCl inducen diferenciación en estas células aumentando la actividad de las enzimas que sintetizan al glutamato como neurotransmisor sin afectar a otras enzimas del metabolismo general de la célula. Las enzimas que intervienen en el metabolismo del ácido glutámico y que son activadas específicamente por NMDA y KCl, son la aspartato aminotransferasa (AAT) y la glutaminasa activada por fosfatos (GAF). La AAT tiene una localización mitocondrial y citoplásmica (Palaiologos, 1989); la GAF se localiza en mitocondria (Bradford, H.F. y Wwrd, H.K., 1976; Nimmo, G.A. y Tripton, K.F., 1979; Kvamme, E. et al., 1982). Se sabe que ambas enzimas participan directamente en la síntesis del glutamato como neurotransmisor actuando de manera coordinada en el metabolismo de este aminoácido.

El efecto del NMDA y del KCl es específico sobre la activación de la AAT y GAF, ya que otras enzimas que incluso participan en el metabolismo del glutamato, no se

ven afectadas por estas condiciones. Estudios realizados en CGC muestran que el KCl (40 mM) y el NMDA (150 μ M), incrementan la actividad de la AAT en aproximadamente un 75% en un período de 48-72 horas (Morán J., Rivera-Gaxiola, 1992) y de un 100-150% en la GAF (Morán J., A.J. Patel, 1988a,b). Este efecto es dependiente de la concentración y de la edad del cultivo. El efecto del NMDA y del KCl sólo se observó en estas células y no en astrocitos o neuronas corticales. El efecto del KCl no estuvo mediado por la activación de los receptores a aminoácidos excitadores, y fué dependiente de Ca^{2+} , en tanto que los efectos del NMDA fueron bloqueados completamente por el magnesio y por antagonistas del receptor. Sin embargo, la cicloheximida y la actinomicina D (Act D) bloquearon el efecto de ambos (KCl y NMDA). Esto sugiere que debe existir una síntesis de novo de protefna y de RNAm para estas enzimas inducida por NMDA y KCl.

Se desconocen los mecanismos que regulan los cambios inducidos por el NMDA y el KCl en estas células. Se ha estudiado la posibilidad de que ambos aumenten la actividad de estas enzimas modificando su síntesis. Para explorar esta posibilidad se realizaron algunos experimentos en los que, bajo estas mismas condiciones, se analizaron los parámetros cinéticos de estas enzimas, observandose un incremento significativo en la V_{max} , sin afectar la K_m , sugiriendo que los cambios observados están mediados por un aumento en la cantidad de estas enzimas, coincidiendo con los resultados obtenidos en presencia de cicloheximida. La cantidad de las diferentes enzimas presentes en las células, detectada mediante Western blot (réplias tipo Western) y cuantificada por densitometría, también correlacionó con el análisis de los

parámetros cinéticos de estas enzimas (Alavez, et al., en prensa).

Estos resultados permiten sugerir que los mecanismos involucrados en el efecto trófico del NMDA, implican la activación de procesos de regulación génica en estas células; sin embargo, tanto los mecanismos involucrados como estos procesos de regulación se desconocen en este modelo, aunque se sabe que el NMDA en cultivos primarios de CGC, actúa a diferentes niveles de regulación génica e induce un aumento en los niveles de RNAm de "Cns-1" (R.F. Bulleit, et al., 1994), un miembro de una familia de genes que codifican para proteínas que regulan la transcripción en células en diferenciación en el SNC y que se les conoce como "POU/homeobox" (Akam, 1978; Scott y Carrol, 1978; Doe et al., 1988a,b; Finney et al., 1988; Ingham, 1988; Way y Chalfie, 1989). En mamíferos, se ha visto que la expresión de estos genes se da en poblaciones de células precursoras y también en células maduras.

Esto indica que el NMDA puede inducir la activación de mecanismos de regulación génica *in vitro* induciendo así la diferenciación bioquímica y la sobrevivencia de las CGC.

III) OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar los mecanismos involucrados en la acción trófica del NMDA y KCl sobre la activación de la GAF y la AAT en las CGC en cultivo. Dado que el NMDA y el potasio inducen una activación específica de estas enzimas en estas células, se estudiará si dicha activación es el resultado de una regulación específica en los niveles del RNAm de estas enzimas marcadoras de diferenciación.

VI) MATERIAL Y METODOS

CULTIVOS DE CELULAS

Se obtuvieron cultivos primarios de CGC (95%) de ratas Wistar. Las células se obtuvieron por disociación de cerebelos de ratas de 8 días de nacidas (8 DPN) mediante la técnica descrita por Morán y Patel (1989). El medio de cultivo en que se sembraron fué un medio basal de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Microlab), 5 mM de KCl, 2 mM de glutamina y una solución de penicilina-estreptomicina, 50 U/ml y 50 µg/ml, respectivamente. Para permitir la adherencia neuronal, las cajas se trataron previamente con 5 µg/ml de poli-L-lisina durante 24 h. Las células se sembraron a una densidad final de 1.2 a 1.5 x 10⁶ cels./ml; aproximadamente 18 h después, se les agregó una solución de citosina arabinosa 10 µM para evitar el crecimiento de células no neuronales (Balász et al., 1988).

Las células se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO₂ (4.5%) y aire saturado con vapor de agua (95%) (Morán y Patel, 1989). Después de 2 DIV las neuronas se sometieron a diferentes tratamientos por espacio de 72 h. El tratamiento de las células consistió en la adición de alícuotas pequeñas de NMDA (150 µM) y KCl (40 mM).

EXTRACCION DE RNA TOTAL

A los 5 DIV se lavaron las células con PBS a 37°C y se procedió a realizar la extracción de RNA total siguiendo la técnica de Chomezynski y Sacchi (1986). Todos

las soluciones que se utilizaron a lo largo del proceso se prepararon con agua tratada con dietil pirocarbonato (DPC) para inhibir RNAasa y son las siguientes:

- Sol D:

Tiocianato de guanidina 4 M, sarcosil al 0.5%, citrato de sodio 25 mM pH 7.0, β -mercaptoetanol.

- Buffer de mezcla:

Buffer MOPS 5 x, formaldehido 2.2 M, formamida al 50 %, bromuro de etidio 1 x.

- Buffer de electroforesis 1 x

MOPS pH 7.0, acetato de sodio 40 mM, EDTA 0.5 M pH 8.0.

- Gel de agarosa 1 % desnaturalizado:

Agarosa al 1 %, MOPS al 5 %, formaldehido puro.

- Buffer de carga 10 x:

Glicerol al 50 %, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.4 %, xilen-cianol 0.4 %.

- Buffer SSC 20 x:

NaCl 3.0 M, citrato de sodio 0.3 M pH 7.0

Las células se homogenizaron con 1 ml de Sol. D y se colectaron en tubos Eppendorf de 2.0 ml estériles. A cada muestra se le adicionó 0.1 ml de acetato de sodio 2 M pH 4.0, 1 ml de fenol saturado 1:1 y 0.2 ml de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1. Se agitaron 20 seg. y se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente para completar la mezcla. Se centrifugaron a 10,000 rpm, 30 min. a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a tubos Eppendorf estériles agregando a cada muestra 1 ml de isopropanol para precipitar el RNA durante 2 h a -70°C, después se

centrifugaron y el pellet resultante se resuspendió en 300 µl de Sol. D., después se les agregó isopropanol para precipitarlas por segunda vez. Posteriormente, se centrifugaron y se lavó el pellet de cada muestra con etanol al 75% centrifugando las muestras durante 10 min., se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en agua tratada con DPC.

CUANTIFICACION DE RNA TOTAL Y ELECTROFORESIS

Una vez concluido el proceso de extracción, se determinó la cantidad de RNA de cada muestra espectrofotométricamente a 260 nm y se calculó la concentración de RNA y la pureza del mismo, para ello, se calculó también la relación de las unidades de absorbancia a 260-230, para detectar contaminación por sales, y a 260-280, para detectar contaminación por proteínas. Una vez cuantificada la concentración de RNA, se procedió a realizar la electroforesis en geles de agarosa al 1%; se le adicionó a cada muestra el buffer de mezcla, se calentaron durante 15 min. a 65°C colocándolas inmediatamente después en hielo y se les adicionó el buffer de carga. Se colocó cuidadosamente cada muestra en cada uno de los pocitos del gel y se inició la corrida aplicando un voltaje de 100 mV durante 5 min. para permitir la entrada de las muestras al gel, posteriormente se corrió a 50 mV durante aproximadamente 3 h.

TRANSFERENCIA

La transferencia se realizó en membranas de nylon (Hybond-N Nylon, 0.45 Microm.). Al terminar la electroforesis, se lavo el gel con agua tratada con DPC durante 10 min, y se preparó el sistema de transferencia por capilaridad colocando sobre una placa de vidrio de dimensiones ligeramente mayores a las del gel, 2 hojas

de papel filtro Whatman 3MM humedecidas con buffer SSC 10 x. Se colocó sobre ellas al gel, y sobre éste la membrana de nylon previamente humedecida perfectamente en agua desionizada y en buffer SSC 10 x y cortada a las mismas dimensiones que el gel. Sobre la membrana de nylon se colocaron de 3 a 5 hojas de papel filtro Whatman 3MM y aproximadamente 10 cm. de material absorbente cortados al mismo tamaño del gel. Finalmente se colocó una placa de vidrio y 500 g. de peso con el objeto de asegurar el contacto íntimo entre los diversos elementos del sistema de transferencia por capilaridad. El buffer que se utilizó para llevar a cabo el proceso fue SSC 10 X. La duración de la transferencia fue de 24-48 h, dependiendo del tamaño y grosor del gel.

Al finalizar el período de transferencia, se retiró cuidadosamente el material absorbente dejando al descubierto la membrana de nylon, la cual se despegó del gel y se colocó entre dos hojas secas de papel filtro Whatman 3MM. Se dejó secar a temperatura ambiente. Después se colocó en un transluminador de luz UV de onda corta durante 5-10 min. para permitir la adherencia de los ácidos nucleicos a la membrana de nylon de manera irreversible. Posteriormente, se realizó la hibridación con las sondas de DNA de AAT y GAF. Ambas se obtuvieron comercialmente de American Type Culture Collection (ATCC). El tamaño del inserto para la GAF (glutaminase, phosphate-activated, mitocondrial, aislada de cerebro de rata), es de 0.529 KB, el tamaño del plásmido es de 3.39 KB (nombre del vector pGEM-1) (GeneBank/EMBL:M22586). Para purificar esta sonda, se digirió el DNA con EcoR1 siguiendo la misma metodología que se utilizó para purificar la sonda de

AAT2, la cual se describe a continuación:

El inserto (glutamico-oxalacetico transaminasa 2, mitocondrial, "aspartato aminotransferasa 2", aislada de hipocampo de humano), con un tamaño de 1.3 KB y contenido en un plásmido de 4.3 KB (nombre del vector, pBluescript SK-) (GeneBank/EMBL: M86145), se purificó a partir de bacterias *E. coli* (XL1- Blue), las cuales se crecieron en medio L-Broth líquido (preparado previamente) en agitación a 37°C, aproximadamente 5-6 horas. Se sembraron después 50 µl en agar (medio sólido con ampicilina), y se incubaron toda la noche. Posteriormente, se prepararon para las minipreparaciones de la siguiente manera:

Se colocaron 5 ml del cultivo anterior en un tubo Eppendorf y se centrifugaron durante un 1 min. a 10,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente lo más posible. Las células se resuspendieron en 100 µl de solución I fría:

- Solución I:

sacarosa	15 %
Tris-HCl pH 8.0	25 mM
EDTA	10 mM

Esterilizar en autoclave.

Se incubaron 15 min. a temperatura ambiente. Se les agregó 200 µl de solución II fresca mezclando por inversión:

- Solución II:

NaOH	0.2 N
------	-------

SDS 1.0 %

Se incubaron durante 10 min. en hielo y se les agregó 150 µl de solución III fría mezclando por inversión y se incubaron durante 15 min. en hielo:

- Solución III:

acetato de potasio 5 M 60 ml

ácido acético 11.5 ml

H²O .28.5 ml

Se centrifugaron durante 5 min., se recuperó el sobrenadante y se centrifugó durante 5 min. Se recuperó de nuevo el sobrenadante y se incubó durante 20 min. a 37°C. Se agregó un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante 30 seg. Se recuperó la fase acuosa, se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol y se incubó a -70°C por 5 min. Se centrifugó por 5 min., se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70 %. Se centrifugó de nuevo por 5 min., y el pellet resultante se resuspendió en 20 µl de agua. Se tomaron 10 µl del DNA plasmídico obtenido y se le agregaron 7 µl de agua, 2 µl de buffer de restricción y 1 µl de Eco RI, dejando incubar durante 45-60 min. Posteriormente se corrió en un gel de agarosa 1 % con buffer Tris-boratos al 0.5 % colocándolo en un pozo el producto de la digestión (DNA vector e inserto) y en otro, el marcador de pesos moleculares. Después de aproximadamente 1 h. (tiempo de corrida), se tiñó el gel con bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 10 min. y en agitación, y se lavó con agua durante 10 min. y en agitación. Para visualizar las bandas ya teñidas en un transluminador de luz UV de onda corta. La banda de DNA correspondiente al

inserto, se cortó y se purificó para realizar la hibridización.

Después de cortar la banda correspondiente a ambos insertos (AAT y GAF), se volvió a extraer con fenol/cloroformo-álcohol isoamílico (24:1), posteriormente se precipitó con NaCl 0.5 M (1/25 del volumen total) y con etanol absoluto (3 volúmenes) todo la noche. Para quitar los restos de bromuro de etidio, se utilizó butanol saturado con agua y se lavó con etanol al 70 %. Se guardó a -70°C. Posteriormente, se corrió un minigel de agarosa al 1 % para verificar la pureza del DNA.

Como sonda control, se utilizó la glutamato deshidrogenasa (GLDH), (glutamato dehidrogenase, citosólica, aislada de médula espinal de humano); tiene un tamaño de 1.8 KB, el tamaño del plásmido es de 5 KB (nombre de la clona, pGB2862) (GenBank/EMBL:M17697).

HIBRIDIZACION

Las membranas de nylon se colocaron en bolsas de plástico y se prehibridaron de 6-12 h. aproximadamente y a 40°C con buffer de prehibridización:

- Buffer de prehibridización:

SSC	20 X
reactivo Denhardt	50 X
fosfato de sodio pH 7.0	1 M
Formamida	40 %
DNA de esperma de salmón	10 mg/ml
Agua	

Al concluir el tiempo de prehibridización, se eliminó el buffer y se agregó el buffer

de hibridización a la bolsa; este buffer se prepara igual que el buffer de prehibridización más la sonda marcada con fósforo radiactivo, dCTP-[α^{32} P].

Se utilizó el sistema de Nick Translation en la primera parte de los experimentos, posteriormente se utilizó el sistema de Random Primer, ya que el tamaño de los insertos así lo requerían. Se utilizaron 25 ng de DNA en cada experimento. El tiempo de reacción para marcar la sonda fué de 6 h aproximadamente, posteriormente se midió la concentración de DNA marcado y la cantidad de radiactividad incorporada. El tiempo de hibridización fué de 18-24 h a 40°C. Después se retiró el filtro radiactivo de la bolsa y se colocó en un recipiente con buffer SSC 6 X, SDS 0.5 %. Se lavó 2 veces durante 15 min. cada vez a temperatura ambiente. Después se lavó con buffer SSC 1 X, SDS 0.5 % dos veces durante 15 min. cada vez a 37°C. Se realizaron lavados posteriores cuando la astringencia era muy alta con buffer SSC 0.1 X, SDS 0.5 %, 30 min. a 65°C con el objeto de alcanzar un lavado más severo. Posteriormente y en cuarto oscuro, se colocó al filtro radiactivo lavado sobre una placa virgen de rayos X (Kodak X-Omat XK1) y ésta a su vez, se colocó en un cassette para películas de rayos X y entre dos pantallas intensificadoras de tungstenato de calcio; El cassette se colocó en revco a -70°C para permitir que las pantallas intensificadoras trabajaran óptimamente. La placa autoradiográfica se expuso durante 48 h. Después de la autorradiografía, la placa de rayos X se colocó en revelador Kodak GBX durante 3-5 min. con agitación y se enjuagó 1-2 min. con agua corriente, después se fijó durante 2-3 min. con agitación en fijador Kodak GBX. Después de la autorradiografía, se lavó la película abundantemente con agua y se secó a temperatura ambiente.

V) RESULTADOS

MORFOLOGIA

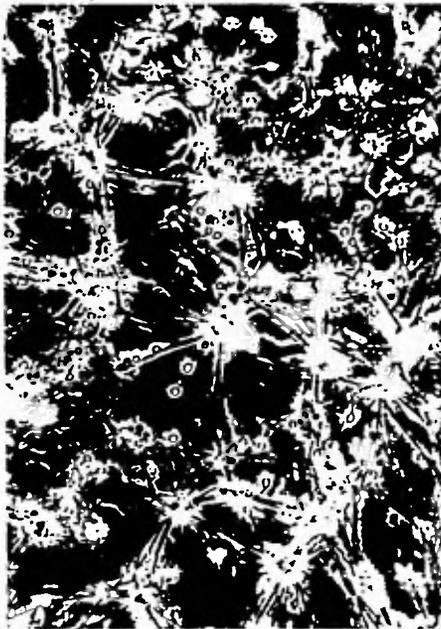
En la figura 10, puede apreciarse el efecto del NMDA (150 μ M) y el KCl (40 mM), sobre la morfología de las CGC a los 5 DIV. Estas células recibieron el tratamiento a los 2 DIV (48 h después de que se han sembrado). En esta figura, pueden apreciarse las diferencias que existen entre las células control (A), y las células tratadas con NMDA (B) y KCl (C); en A, las células se observan dispersas en el medio, con procesos sinápticos débiles, en tanto que en el caso de las células que han sido tratadas con NMDA y con KCl, se observan cúmulos de células con grandes somas y procesos sinápticos fuertes. Se ha visto que después de los 7 DIV las células control degeneran casi en su totalidad, mientras que las células tratadas con NMDA y KCl sobreviven y aún se observan en buenas condiciones.

ACTIVIDAD Y NIVELES DE AAT Y GAF

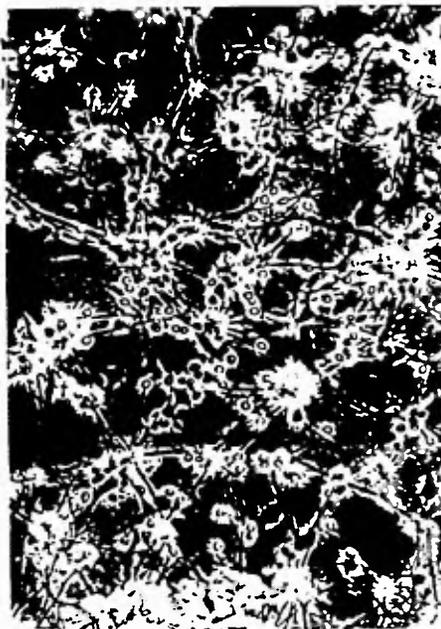
Resultados previos muestran que el NMDA y el KCl inducen la activación de la AAT y la GAF sin modificar a otras enzimas tales como la GLDH (fig 11). Esto indica que estos agentes inducen la diferenciación de las CGC en cultivo. La activación de estas enzimas está mediada por un aumento en los niveles de las mismas (fig. 12). Se ha observado que estos efectos sólo se presentan en las CGC y no en otras células.



A



B



C

Fig.13 Efecto de NMDA y KCl en la morfología de las CGC a los 5 DIV. En B) y C) las células han sido tratadas con NMDA (150 μ M) y KCl (40 mM) a los 2 DIV.

EFFECTO DEL NMDA Y KCl EN LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS PRESENTES EN LAS CGC

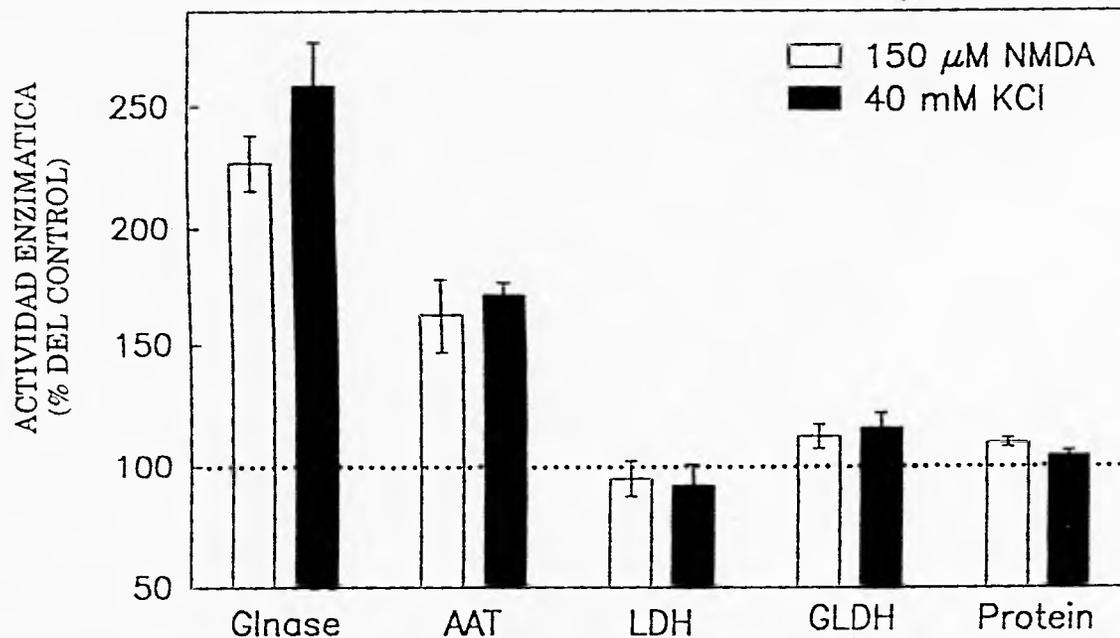
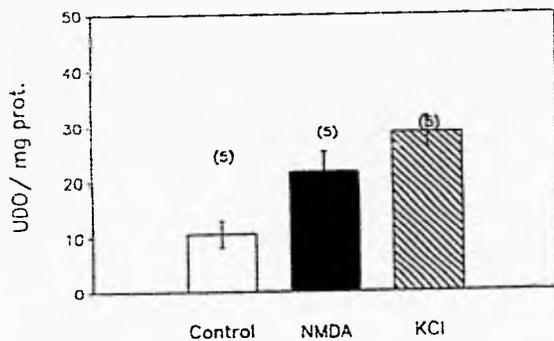
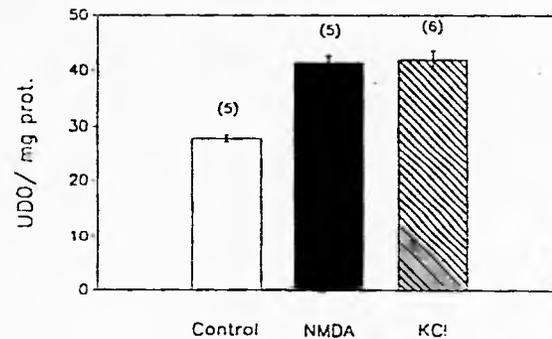


Fig.10 Efecto del NMDA y KCl en la actividad de la glutaminasa activada por fosfatos (GAP) y la aspartato aminotransferasa (AAT) en cultivos de CGC. El NMDA y el KCl aumentan de manera selectiva la actividad de estas enzimas, las cuales actúan de manera coordinada en la síntesis del glutamato como neurotransmisor en estas neuronas, sin alterar a otras proteínas del metabolismo general de la célula.

A EFECTO DE LAS CONDICIONES DESPOLARIZANTES EN LOS NIVELES DE GAF



B EFECTO DE LAS CONDICIONES DESPOLARIZANTES EN LOS NIVELES DE AAT



C EFECTO DE LAS CONDICIONES DESPOLARIZANTES EN LOS NIVELES DE GLDH

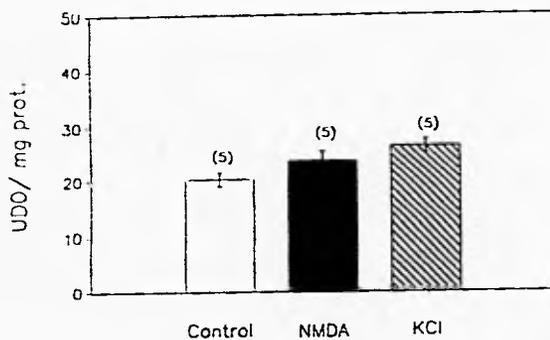


Fig.11 Efecto del NMDA y KCl en los niveles de: A) GAF, B) AAT y C) GLDH en CGC. El aumento en la actividad de la GAF y la AAT, está mediado por un incremento en la cantidad de estas enzimas presente en las CGC bajo las mismas condiciones experimentales.

PURIFICACION Y DIGESTION DE LOS FRAGMENTOS DE DNA DE LAS ENZIMAS

El producto de la purificación y digestión de las enzimas que se utilizaron en los experimentos de hibridación, se muestran en la fig 13. Puede observarse que la digestión de los insertos fué total y sin contaminación por DNA plasmídico.

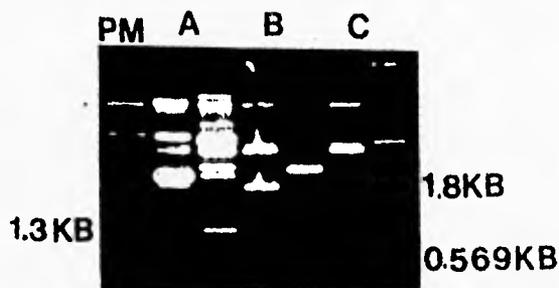


Fig.13 Digestión total del producto de la purificación de las sondas de las enzimas: a) aspartato aminotransferasa (AAT2, mitocondrial, 1.3 KB), b) glutaminasa activada por fosfatos (GAF, citosólica, 0,569 KB), c) glutamato deshidrogenasa (GLDH, citosólica, 1.8 KB). La enzimas de restricción que se utilizó para las digestiones fué EcoR1.

CARÁCTERISTICAS DE LOS INSERTOS

El peso de la AAT2 utilizada en los experimentos es de 1.3 KB; sin embargo, la secuencia reportada hasta el momento en la base de datos consultada (GeneBank) es de 0.3 KB, (fig. 14). Para saber si este fragmento (que es lo que hasta el momento se ha secuenciado) corresponde al gene de la AAT, se alineó con otra secuencia de AAT, también mitocondrial de humano (tabla I). Se buscó también la similitud entre diferentes secuencias de AAT mitocondriales y citosólicas de humano y de rata, y posteriormente se comparó cada una con la AAT2 mitocondrial de humano que se

purificó.

En el caso de la GAF, no fué necesario comparar la secuencia, ya que esta enzima únicamente se localiza en citoplasma. El fragmento con el cual se trabajó, proviene de cerebro de rata, lo cual nos permita sugerir que existe una alta probabilidad de obtener una señal de hibridación en nuestros experimentos (fig. 15 B2) . La GLDH se utilizó como sonda control, ya que no se modifica bajo nuestras condiciones experimentales (fig. 12C).

OBTENCION DE RNA TOTAL

La figura 15, muestra el patrón electroforético del RNA total obtenido a partir de homogenados de células granulares de cerebelo en cultivo a los 5 DIV. En cada uno de los experimentos de hibridación se utilizaron diferentes membranas; A1 corresponde a AAT, A2 a GAF y A3 a GLDH. La cuantificación de RNA total de cada muestra, se hizo por densitometría; posteriormente, se hizo una curva contra concentración con RNA de cerebro para corregir las señales por RNA total. Estos son los resultados finales de 10 experimentos de extracción).

NIVELES DE RNAm DE AAT (REPLICAS TIPO NORTHERN)

La autoradiográfica observada en la figura 15(B1), muestra la banda correspondiente a la AAT2 (el tamaño del RNAm es de 2,000 nt), obtenida después del proceso de hibridación. El peso de la banda es de 1,995 KB, y se determinó midiendo la distancia de migración de los marcadores de pesos moleculares, y midiendo la distancia de la

banda en la autoradiografía con respecto a los RNAs ribosomales. Estos resultados indican que esta banda corresponde al mensajero de la AAT. Puede observarse que la densidad de la misma aumenta en el caso del KCl, en tanto que para el NMDA, no se observan diferencias con respecto al control. Cuando estas bandas se analizaron utilizando un programa computacional (Collage), se encontró que no existen cambios en los niveles de RNA mensajero en células tratadas con NMDA y KCl con respecto al control (fig. 16A). La cantidad de RNAm fué de: 81.87 ± 18.7 en células tratadas con NMDA y 123.97 ± 25.3 en células tratadas con KCl (fig. 17). El aumento en densidad observado en el caso del KCl, puede deberse a que la cantidad de RNA total corrida en el proceso electroforético, sea mayor que en el caso del NMDA y el control.

NIVELES DE RNAm DE GAF (REPLICAS TIPO NORTHERN)

La autoradiografía mostrada en la figura 15(B2), muestran la banda que corresponde a la GAF (el tamaño del RNAm es de 6,000 nt), obtenida después del proceso de hibridación. El peso molecular de la banda es de 5,011 KB, el cual se determinó utilizando el mismo procedimiento seguido en el caso anterior. En este caso puede observarse un aumento en la densidad de las bandas correspondientes al NMDA y al KCl con respecto al control, lo cual se corrobora al analizar los datos computacionalmente (fig. 16B) Los valores de la cantidad de RNAm son de 178 ± 15.3 en el caso del NMDA y de 175 ± 20.2 en el caso del KCl con respecto al control (fig. 17). Esto indica que estos agentes inducen un aumento en los niveles de RNAm en estas células.

NIVELES DE RNAm DE LA GLDH (REPLICAS TIPO NORTHERN)

En la figura 15(B3), muestra la autorradiografía obtenida de los experimentos de hibridación con la sonda de la GLDH, la cual se utilizó como control. La cantidad de RNAm fué de: 114.3 ± 17.1 en el caso del NMDA, y de 133.2 ± 28.6 (fig. 17), en el caso del KCl. Como puede apreciarse, existe una pequeña modificación en los niveles del mensajero, pero no son significativos (fig. 16C).

```

                                /gene="D16S427E";
                                /map="16";
BASE COUNT      106 a      85 c      87 g      82 t
ORIGIN
      1 gaaaccaggc cgcaataagt ctacatgggt agagcagatg gtggttcttt
ccagtgggtg
     61 aagcctgaac ccagctagca gcacgcaaag cctagaatat cctctttcct
ggtagcacc
    121 tgcgccgctg gactcacagt gtgagatgag aggctgcaca ccacattcaa
caaagggagg
    181 aggtccaacc ggcagagac aacatcccaa ctggagaaac ttgcactatc
attcaagagg
    241 atgccgagat aaagtacagt ttctactct cactattct ttgctgaaaa
gggtgagggt
    301 acagcatcag cagaaaatta tgttcttcat tcttaaatta aatctcgata
gggtggagt
//
</PRE>

```

Fig.14 Secuencia de nucleótidos de la enzima aspartato aminotransferasa (AAT2, mitocondrial, purificada a partir de hipocampo de humano, clave de acceso: GeneBank-M86145).

TABLA I

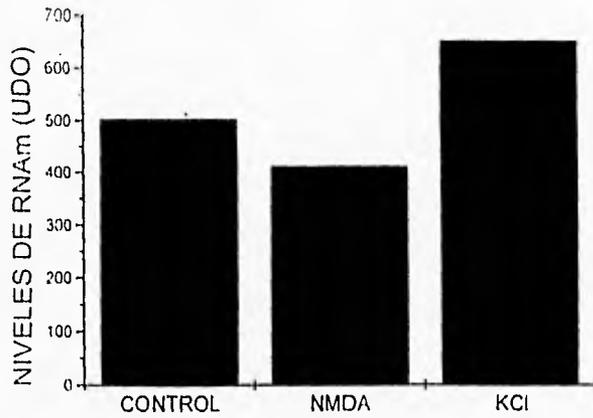
ORGANISMO	PURIFICADA A PARTIR DE:	CLAVE DE ACCESO (GeneBank)
Humano	Hipocampo (Mitocondrial)	M86145
Humano	Hígado (Mitocondrial)	M22632
Humano	Hígado (Citoplásmica)	M37400
Rata	Hígado (Citoplásmica)	D00252
Rata	Hígado (Mitocondrial)	M18467

SIMILITUD E IDENTIDAD (%)

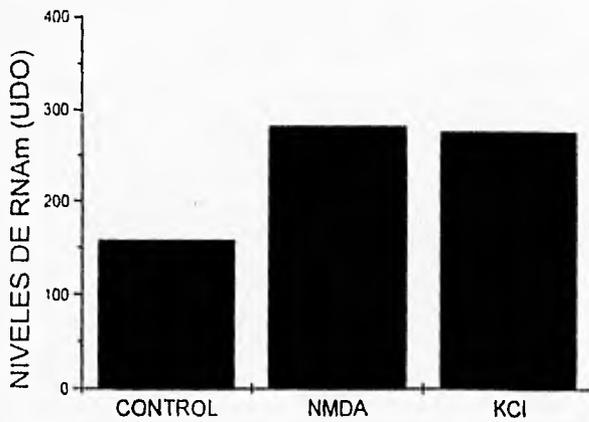
M86145	M22632	- 98.63
M22632	M37400	- 47.28
M22632	D00252	- 50.60
M22632	M18467	- 81.00

Tabla I. En esta figura se muestran las características de la enzima aspartato aminotransferasa (AAT) de diferentes organismos. Se muestran también los porcentajes de similitud e identidad que existe entre las secuencias de nucleótidos arriba descritas comparadas con la AAT2 (M86145) obtenida comercialmente de "American Type Culture Collection". El primer apareamiento se hizo con esta secuencia (que tiene un tamaño en KB de 1.3, de los cuales sólo se han secuenciado 0.3 KB), con M22632; dado que la similitud es muy alta (98.63%), se tomó esta última como referencia para aparear el resto de las secuencias.

A EFECTO DEL NMDA Y KCl EN LOS NIVELES DE RNAm PARA LA AAT EN CULTIVOS DE CGC



B EFECTO DEL NMDA Y KCl EN LOS NIVELES DE RNAm PARA LA GAF EN CULTIVOS DE CGC



C EFECTO DEL NMDA Y KCl EN LOS NIVELES DE RNAm
PARA LA GLDH EN CULTIVOS DE CGC

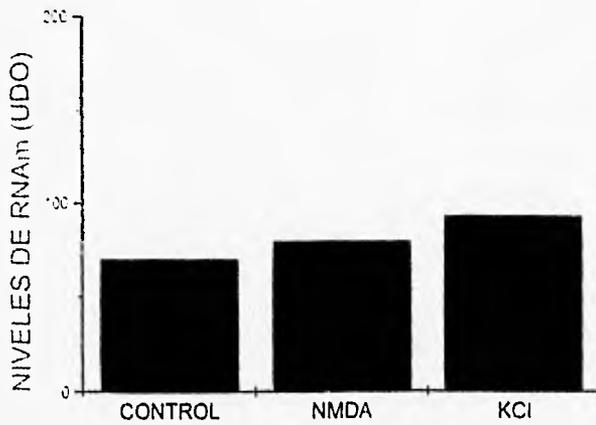


Fig.16 Efecto de NMDA y KCl en los niveles de RNAm de: A) AAT, B) GAF y C) GLDH. Los resultados se expresan como unidades de densidad óptica.

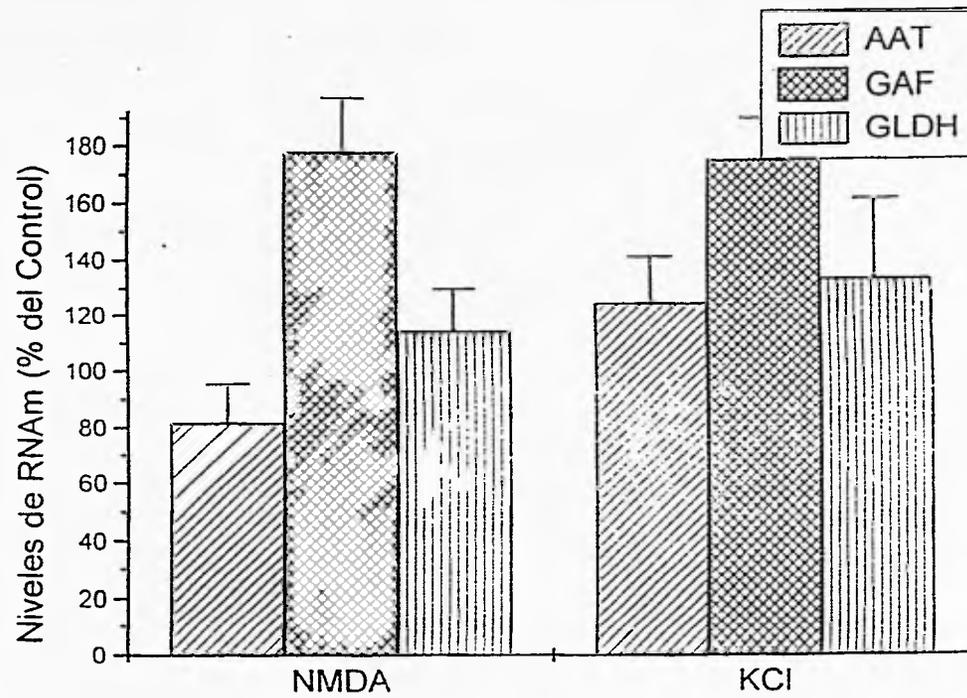
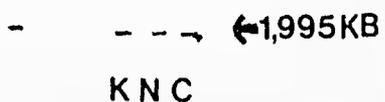


Fig.17 Comparación del efecto de NMDA y KCl sobre los niveles de RNAm para AAT, GAF y GLDH en CGC en cultivo. Los valores se expresan como RNAm/RNAL.

A1



B1



A2



B2



A3



B3

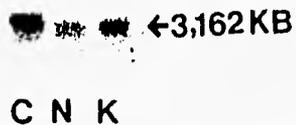


Fig.15 Patrón electroforético de RNA total y autorradiografías obtenidos a partir de CGC en cultivo de 5 DIV. Membranas correspondientes a: A1) AAT, A2) GAF, A3) GLDH. Northern blots (réplicas tipo Northern) correspondientes a: B1) AAT, B2) GAF, B3) GLDH. Las placas autorradiográficas se expusieron 48 h.

VI) DISCUSION

Existen evidencias de que el NMDA y el KCl, promueven la diferenciación de las CGC en cultivo, utilizando como marcadoras de este proceso la actividad de la AAT y la GAF, como enzimas marcadoras (Morán, J., Rivera-Gaxiola, 1992; Morán, J., A.J., Patel, 1988a,b).

En el presente trabajo, se estudió el efecto de estos agentes sobre la activación de la AAT y la GAF, evaluando algunos de los mecanismos involucrados en los procesos tróficos que se ejercen en estas células en cultivo. Se sabe que la activación de estas enzimas, inducida por el NMDA y el KCl, son el resultado de un aumento en los niveles de las mismas (fig. 11); para conocer los procesos que desencadenan estos fenómenos de diferenciación, se planteó la posibilidad de que estas condiciones indujeran la activación de mecanismos de regulación génica específica a nivel transcripcional. Para ello, se midieron los niveles de RNAm de ambas enzimas.

En el caso de la GAF, los resultados muestran que existe un aumento en mensajero de esta enzima en células tratadas con NMDA (150 μ M) y KCl (40 mM) con respecto al control (fig. 16B). La autorradiografía muestra una hibridación inespecífica; sin embargo, en la señal que se tomó como referencia para realizar los cálculos, es la banda que corresponde al mensajero de la GAF y es también, la banda con mayor densidad óptica. En el caso de la AAT, los niveles de su RNAm parecen no modificarse bajo estas mismas condiciones, aunque tanto el NMDA como el KCl inducen su activación y aumentan sus niveles (fig. 16A).

Estos resultados reflejan la activación de mecanismos de regulación génica, la cual puede darse a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional o postraduccional. Es bien sabido que la expresión génica no es un proceso automático, es un fenómeno que está sujeto a una gran cantidad de modificaciones. Los promotores de las células eucarióticas contienen secuencias específicas para la unión de factores de transcripción (proteínas reguladoras), los cuales a su vez se pueden unir a otros elementos regulatorios, o pueden interactuar con diferentes tipos de ligandos. Estos factores pueden sufrir modificaciones covalentes que afectan su actividad y su localización; la unión de todos estos elementos puede afectar la transcripción ya que pueden aumentar o disminuir la probabilidad de que la RNA pol se active. Esto a la vez, puede alterar la velocidad de la transcripción; como ya se mencionó, existen también eventos postranscripcionales que modifican al transcrito primario una vez que el proceso de transcripción ha terminado; las modificaciones postranscripcionales incluyen no sólo modificaciones a nivel nuclear, sino también citoplásmicas, tales como la degradación del RNAm maduro. Este proceso degradativo es también un mecanismo regulatorio, y existen muchos factores intra y extracelulares que pueden modificarlo, induciendo un cambio en su estabilidad diferencial (vida media), y en su recambio (velocidad de síntesis). Otro nivel de regulación de la expresión génica es controlar el recambio del RNAm, aquí está involucrada su estabilidad diferencial bajo diferentes condiciones. Existen una gran cantidad de factores que alteran la velocidad de degradación de los RNAs mensajeros de varias proteínas (Block, M.L. and Shapiro, D.J., 1983; Alterman, R-B, et al, 1984;

Baumbach, L.L, Stein, G.S, y Stein, J., 1987). Es probable que en el RNAm de la GAF, esté sufriendo una modificación de este tipo, inducida por el NMDA y el KCl, que se refleja en el aumento observado en sus niveles; el NMDA y el KCl, podrían estar modificando la velocidad de recambio de este mensajero, es decir, su velocidad de síntesis; dado que el efecto del NMDA es dependiente de Ca^{2+} (el cual se considera como un segundo mensajero), es muy probable que éste estimule la activación de proteínas que a su vez induzcan la fosforilación de otras proteínas celulares que podrían funcionar como factores de transcripción y modificar así la velocidad de recambio del mensajero de esta enzima. No es difícil suponer que exista una alta probabilidad de que esto suceda en nuestro modelo, ya que existen algunos ejemplos que indican que el NMDA puede inducir la activación de mecanismos de regulación génica *in vitro* induciendo así la diferenciación bioquímica y la sobrevivencia de las células granulares (Bulleit, F.R., Cui, H., Wang, J. and Lin X., 1994). También se ha visto que el NMDA y el KCl, aumentan los niveles de los RNAs mensajeros de algunos genes de respuesta temprana tales como c-fos, c-jun y zif/268 durante el desarrollo de estas células *in vitro* (Copani, A., et al, 1994).

En cuanto a la AAT, dado que su RNAm no se modifican bajo estas mismas condiciones (fig. 16A), aunque sí existe un aumento significativo tanto en su actividad como en sus niveles inducido por el NMDA y KCl, se podría sugerir que estas condiciones podrían promover un aumento en la estabilidad del RNAm. Este fenómeno de regulación, está relacionado con los procesamientos que sufre el RNA antes de salir al citoplasma, tales como la adición de una cola de adeninas en su

extremo 3'. Aunque los mecanismos de adición de adeninas (poli-A) de muchos RNAs mensajeros recién sintetizados ya se han caracterizado, se desconocen aún muchas de las funciones de esta poliadenilación. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que podría estar involucrada en varios procesos de regulación, tales como el procesamiento nuclear del RNAm y su transporte al citoplasma, modulación de la traducción y recambio del mismo (Brawerman, G., 1981); también se sugiere que la poliadenilación protege a muchos RNAs mensajeros de una rápida degradación citoplásmica (Nepveu, A., et al 1987). Las moléculas con 32 o más residuos de poli-A, tienen una velocidad de recambio menor que aquellos que tienen menos de 30 residuos, los cuales son aproximadamente 10 veces menos estables (Mercer, J.F.B., Wake, S.A, 1985). Se sabe también que los RNAs mensajeros de los genes de respuesta temprana, tienen pocos residuos de poli-A y su degradación es muy rápida (Swartout, S.G., Kinniburgh, A.J., 1989; Wilson, T, Treisman, R., 1988).

Existen moléculas que inducen la elongación de los residuos de poli-A aumentando así la estabilidad de algunos mensajeros, esto sugiere que existen mecanismos de regulan la remoción y adición de poli-A, y como consecuencia de ello, alteran la velocidad de recambio del RNAm. Es probable que el NMDA y el KCl, actúen de manera parecida a los glucocorticoides o a otros agentes, promoviendo la elongación de las poli-A, o bien promoviendo la unión de alguna proteína reguladora a la cola de poli-A, aumentando así la estabilidad del mensajero.

Una posibilidad alterna que explicaría la incongruencia entre un aumento en la actividad y en los niveles de AAT, y la ausencia de un cambio en los niveles de

RNAm, podría relacionarse con la sonda de AAT utilizada en este estudio. El tamaño del inserto en kilobases es de 1.3 (esta sonda se obtuvo comercialmente de ATCC y se purificó a partir de hipocampo de humano); la secuencia reportada en la base de datos utilizada (GeneBank), es de 0.3 KB (fig.14). Los resultados de las comparaciones de similitud (las secuencias que se compararon corresponden a secuencias de nucleótidos de AAT tanto mitocondrial como citoplásmica de humano y de rata, ya que el material molecular con el cual se trabajó, procede de estos organismos) muestran que este fragmento corresponde al gene de la AAT (Tabla I). La similitud que existe entre secuencias de AAT mitocondrial de diferentes organismos (humano y rata) es muy grande, en tanto que la que existe entre las secuencias de AAT citoplásmica, es baja. Las diferencias de similitud entre estas secuencias podría indicar que esta proteína es codificada por dos genes diferentes, el producto proteico de uno de estos genes, se translocará a la mitocondria en tanto que el producto del otro gene, tendrá una localización citoplásmica; o bien, podrían ser el producto de un mismo gene y modificarse una vez que el transcrito primario se ha sintetizado (procesamiento nuclear del RNAm), es decir, podría tener un tipo de "splicing" alternativo. Aunque muchos genes producen un sólo transcrito primario y un único RNAm maduro, otros genes producen muchas formas alternativas de transcritos primarios y RNAs mensajeros maduros. Los transcritos primarios podrían iniciar o terminar en diferentes sitios y podrían tener más de un sitio de adición de poli(A), y los diferentes eventos de "splicing" podrían inducir el alineamiento de diferentes subgrupos de exones de un sólo transcrito primario, en tal caso, el exon de

un RNAm sería el intron de otro RNAm. Una sola cadena de DNA podría así codificar para diferentes polipeptidos.

Algunas veces, una sola célula puede simultáneamente expresar estos diferentes polipeptidos; en otros casos, el patrón de transcripción y de "splicing" está sujeto a eventos de regulación que se presentan durante el desarrollo. Subsecuentes experimentos de expresión génica concluyen que un gene puede codificar para muchas cadenas polipeptídicas diferentes que pueden tener funciones divergentes.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en este trabajo, nos permiten sugerir que el NMDA y el KCl promueven la diferenciación de las CGC en cultivo, induciendo la activación de mecanismos de regulación génica, a nivel transcripcional y postranscripcional. Es muy probable también que estos agentes activen mecanismos regulatorios postraduccionales, los cuales se desconocen hasta el momento en este modelo.

VII) CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que el NMDA y el KCl, modifican diferencialmente la expresión de los RNAs mensajeros de la GAF y la AAT en CGC en cultivo. Este efecto podría estar relacionado con mecanismos de regulación génica que a su vez, modifican la actividad de las enzimas que sintetizan al glutamato como neurotransmisor. Estos agentes promueve la sobrevivencia y la diferenciación de estas células, induciendo un efecto trófico en las primeras etapas del desarrollo.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AAT	Aspartato aminotransferasa.
ADP	Difosfato de adenosina.
Act. D	Actinomicina D.
Asp (L-Asp.)	Acido aspartico.
AMPA	Acido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolepropiónico.
AMPc	Adenina monofosfato, cíclico.
APV	Acido fosfonaléxico (Acido fosfonopentanoico).
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro.
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona.
Ca ²⁺	Calcio (catión divalente).
Cl	Cloro (anión monovalente).
CSC	Células granulares de cerebello.
CNTF	Factor neurotrófico ciliar.
DNA	Acido desoxiribonucleico.
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona.
DIV	Días <i>in vitro</i> .
DAG	Diacilglicerol.
5,7 DCK	Acido dicloroquinurénico.
Glu (L-Glu)	Acido glutámico.
GAMS	Acido τ -D-glutamylaminometil sulfónico.
Gly	Glicina.
GABA	Acido gamma-aminobutírico.
GO	Golgi (células de...).
GLDH	Glutamato deshidrogenasa.
GS	Granulares (células).
GAP-GAF-PAG	Glutaminasa activada por fosfatos.
Gln	Glutamina.
GTP	Trifosfato de guanidina.
HQA	Acido homoquinolínico.
HA-966	1-hidroxi-3-amino-prolidín-2-ona.
HK	High potassium (alto potasio).

IP3	Trifosfato de inositol.
Ileu	Isoleucina.
KA	Kainic acid (Acido kaínico).
K ⁺	Potasio (catión monovalente).
KCl	Cloruro de potasio.
Kyn	Acido quinurénico.
αKG	α-ceto glutarato.
LDH	Lactato deshidrogenasa.
Mal	Malato.
MF	Mossy fibers (fibras musgosas).
mM	Milimolar.
μM	Micromolar.
Mg ²⁺	Magnesio (catión divalente).
MDH	Malato deshidrogenasa.
Mem	Membrana.
MK-801	(5)-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzol (a,b) ciclohepten-5,10-imino maleato.
MOPS	3-(N-morfolino)acido propanesulfónico.
Na ⁺	Sodio (catión monovalente).
NADH	Dinucleótido de nicotín amida reducido.
NMDA	Acido N-metil-D-aspartato.
NBQX	6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinoxalina-2,3-diona.
NGF	Factor de crecimiento neural.
NH ₄ ⁺	Ión amonio.
OAA	Acido oxalacético.
pCBP2DA	Acido 1-(p-clorobenzoil)piperazín-2,3-dicarboxílico.
PN	Pons (puente).
PF	Parallel fibers (fibras paralelas).
RNA _m	Acido ribonucleico (mensajero).
Q=QA	Acido quiscuálico.

Ser	Serina.
ST	Estrelladas (células).
SucCoA	Succinil Coenzima A.
SN (SNC)	Sistema Nervioso (Sistema Nervioso Central).
SNP	Sistema Nervioso Periférico.
Val	Valina.
VSCC	Canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje.

BIBLIOGRAFIA

Abe K. and Saito H., 1992. Protective effect of epidermal growth factor on glutamate neurotoxicity in cultured cerebellar neurons. *Neurosci. Res.* 14:117-123.

Abigail M. and Snyder-Keller, 1991. Striatal C-fos induction by drugs and stress in neonatally dopamine-depleted rats given nigral transplants: importance of NMDA activation and relevance to sensitization phenomena. *Exp. Neurology.* 113:155-165.

Adams D.M., Dubnick M., Kerlavage R.A., Moreno R., Kelley J.M., Utterback T.R., Nagle J.W., Fields Ch and Venter J.C., 1992. Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature.* 355:632-634.

Altschuler R.A., Monaghan D.T., Haser W.G., Wenthold R.J., Curthoys N.P. and Cotman W., 1985. Immunocytochemical localization of glutaminase-like and aspartate aminotransferase-like immunoreactivities in the rat and guinea pig hippocampus. *Brian Res.* 330:225-233.

Baer B.W. and Kornberg R.D., 1983. The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A) ribonucleoprotein. *J. Cell Biol.* 96:717-721.

Balázs R, Hack N, Jorgensen OS (1988c): Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 87:80-86.

Balázs R, Gallo V, Kingsbury A (1988a): Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Dev. Brain Res.* 40:269-279.

Balázs, R., (1992): NMDA treatment and K⁺- induced depolarization selectively promote the expression of an NMDA-preferring class of the ionotropic glutamate receptors in cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* 137:109-113.

Balázs R, Hack N, Jorgensen OS (1990): Interactive effects involving different classes of excitatory amino acid receptors and the survival of cerebellar granule cells in culture. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8:347-357.

Banner C., Hwang J.-J., Shapiro R.A., Wenthold R.J., Nakatani Y., Lampel K.A., Thomas J.W., Huie D., Curthoys N.P., 1988. Isolation of a cDNA for rat brain glutaminase. *Mol. Brain Res.* 3:247-254.

Bessho Y, Nawa H. and Nakanishi S., (1994). Selective up-regulation of an NMDA receptor subunit mRNA in cultured cerebellar granule cells by K⁺-induced

depolarization and NMDA treatment. *Neuron*. 12:87-95.

Black, I. B., (1978). Regulation of autonomic development. *Annu. Rev. Neurosci.* 1:182-214.

Block M.L. and Shapiro D.J., 1983. Estrogen regulates the absolute rate of transcription of the *Xenopus laevis* vitellogenin genes. *J. Biol. Chem.* 258:5449-55.

Bradford H.F. and Ward H.K., 1976. On glutaminase activity in mammalian synaptosomes. *Brain Res.* 110:115-125.

Bradford HF, Ward H.K. and Thomas A.J., (1979). Glutamine as a major substrate for nerve-endings. *J. Neurochem.* 30:1453-1459.

Brawerman G., 1981. The role of poly(A) sequence in mammalian messenger RNA. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 10:1-38.

Brenneman D.E., Yu Ch, Nelson P.G., (1990): Multi-determinate regulation of neuronal survival: neuropeptides, excitatory amino acids and bioelectric activity. *Int. J. Dev. Neuroscience.* 8:371-378.

Brock M.L. and Shapiro D.J., 1983. Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation. *Cell.* 34:207-214.

Bulleit R.F., Cui H, Wang J.C. and Lin X., (1994). NMDA receptor activation in differentiating cerebellar cell cultures regulates the expression of a new Pou gene, CNS-1. *J. Neurosci.* 14:1584-1595.

Burgoyne R.D., Graham M.E. and Cambray-Deakin M.A., 1993. Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *J. Neurocyt.* 22:689-695.

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

Chomczynski P. and Sacchi N., 1986. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Bio.* 162:156-159.

Copani A., Bruno V., Dell'Albani P., Battaglia G., Barresi V., Caruso A., Nicoletti F. and Condorelli D.F., 1995. Growth conditions differentially affect the constitutive expression of primary genes in cultured cerebellar granule cells. *Neuroc. Res.* 20(5):611-616.

Dani C., Metchi N., Piechaczyk M., Lebleu B., Jeanteur P. and Blanchard J.M., 1985.

Increased rate of degradation of c-myc mRNA in interferon-treated Daudi cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:4896-99.

Didier M, Roux P, Piechaczyk M, Mangeat P., (1992). Long-term expression of the c-fos protein during *in vitro* differentiation in cerebellar granule cells induced by potassium or NMDA. Mol. Brain Res. 12(1-3):249-258.

Didier M., Roux P., Piechaczyk P., Mangeat P., Devilliers G., Bockaert J. and Pin J.-P., 1992. Long-term expression of the c-fos protein during the *in vitro* differentiation of cerebellar granule cells induced by potassium or NMDA. Mol. Brain Res. 12:249-258.

Drejer J., Larsson O.M., Kvamme E., Svenneby G., Hertz L. and Schousboe A., 1985. Ontogenetic development of glutamate metabolizing enzymes in cultured cerebellar granule cells and in cerebellum *in vivo*. Neuroch. Res. 10(1):49-62.

Ferry R.C., Unsworth Ch.D., Artymyshyn R.P. and Molinoff P.B., 1994. Regulation of mRNA encoding 5-HT_{2A} receptors in P11 cells through a post-transcriptional mechanism requiring activation of protein kinase C. J. Bio. Chem. 269(50):31850-857.

Fukumauchi F., Saunders P.A. and Hough C., 1993. Agonist-induced down-regulation and antagonist-induced up-regulation of m₂- and m₃-muscarinic acetylcholine receptor mRNA and protein in cultured cerebellar granule cells. Mol. Pharm. 44:940-949.

Gallo V, Kingsbury A, Balázs R, Jorgensen O.S., (1987). The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. J. Neurosci. 7:2203-2213.

Grayson D.R., Szekely A.M., Costa E., (1990). Glutamate-induced gene expression in primary cerebellar neurons. In Guidotti A (ed): "Neurotoxicity of Excitatory Amino Acids", New York: Raven Press. 185-202.

Greenberg M.E., Hermanowski A.L. and Ziff E.B., 1986. Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-jun and actin gene transcription. Mol. Cell. Biol. 6:1050-57.

Hatten M.E., 1993. The role of migration in central nervous system neuronal developmental. Current Opinion Neuro. 3:38-44.

Jones T.R. and Cole M.D., 1987. Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of 3'untranslated sequences. Mol. Cell Biol. 7:4513-21.

Lee W.M.F., Lin C. and Curran T., 1988. Activation of transforming potential of the human fos proto-oncogene requires message stabilization and results in increased

amounts of partially modified fos protein. *Mol. Cell. Biol.* 8:3574-78.

Kingsbury A, Gallo V, Woodhams PL, Balázs R., (1985). Survival, morphology and adhesion properties of cerebellar interneurons cultured in chemically defined and serum-supplemented medium. *Dev. Brain Res.* 17:17-25.

Komuro H. and Rakic P., (1993). Modulation of Neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 260:95-97.

Komuro H. and Rakic P., (1992). Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science.* 257:806-809.

Kvamme E. and Olsen B.E., (1980). Substrate mediated regulation of phosphate-activated glutaminase in nervous tissue. *Brain. Res.* 181:228-233.

Laemmli U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature.* 227:680-685.

Lasher J. and Zagon R., (1972). The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *Brain Res.* 7:761-760.

Margulies J.E., Cohen R.W., Levine M.S., Watson J.B., 1993. Decreased GluR2(B) receptor subunit mRNA expression in cerebellar neurons at risk for degeneration. *Dev Neurosci.* 15:110-120.

Mattson M.P. and Hauser K.F., (1991). Spatial and temporal integration of neurotransmitter signals in the development of neural circuitry. *Neurochem. Int.* 19:17-24.

Meier, E., Hertz, L. and Schousboe, A. (1991). Neurotransmitters as developmental signals. *Neurochem. Int.* 19(12):1-15.

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

Morán J. and Rivera-Gaxiola M., (1992). Effect of potassium and NMDA on the aspartate aminotransferase activity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 33:239-247.

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

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

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

Palaiologos G., Hertz L. and Schousboe A., 1988. Evidence that aspartate aminotransferase activity and ketodicarboxylate carrier function are essential for biosynthesis of transmitter glutamate. *J. Neurochem.* 51(1):317-320.

Patel A.J., Hunt A., Jacques-Berg W., Kiss J. and Rodriguez J., 1995. Effects of protein kinase C modulation on NMDA receptor mediated regulation of neurotransmitter enzyme and c-fos protein in cultured neurons. *Neurosci. Res.* 20(5): 561-569.

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

Patel A.J., Hunt A. and Sanfeliu C., (1990). Cell-type specific effects of N-methyl-D-aspartate on biochemical differentiation of subcortical neurons in culture. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8:379-389.

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

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

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

Polymeropoulos M.H., Xiao H., Sikela J.M., Adams M., Venter J.C. and Merrill C.R., 1993. Chromosomal distribution of 320 genes from a brain cDNA library. *Nat. Gen.* 4:381-386.

Rashid N.A. and Cambray-Deakin M.A., 1992. N-Methyl-D-aspartate effects on the growth, morphology and cytoskeleton of individual neurons in vitro. *Dev. Brain Res.* 67:301-308.

Ruitjer J.M., Baker R.E., (1990). The effect of potassium-induced depolarization, glutamate receptor antagonist and N-methyl-D-aspartate on neuronal survival in cultured neocortex explants. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8:361-370.

Sakurai H., Kurusu R., Sano K., Tsuchiya T. and Tsuda M., (1992). Stimulation of cultured cerebellar granule cells via glutamate receptor induces TRE- and CRE-binding activities mediated by common DNA-binding complexes. *J. Neurochem.* 59:2067-2075.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning (second edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA., vol. I, II, III.

Schwartz J.P. (1992). Neurotransmitters as neurotrophic factors: a new set of functions. *Int. Rev. Neurobiol.* 34:1-3.

Seiser C, Teixeira S, Kühn L.C., (1993). Interleukin-2-dependent transcriptional and post-transcriptional regulation of transferrin receptor mRNA. *J. Biol. Chem.* 268:13074-080.

Sheng M. and Greenberg M.E., 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 4:477-485.

Thomas J.W., Novelli A., Tao-Cheng J.-H, Henneberry R. Smith H.H. and Banner C., 1989. Developmental induction of glutaminase in primary cultures of cerebellar granule cells. *Mol. Brain Res.* 6:47-54.

Wilson M.C. and Darnell J.E., 1981. Control of messenger RNA concentration by differential cytoplasmic high-life. *J. Mol. Biol.* 148:231-251.

Yoneda Y., Ogina K., Inoue K., Mitani A., Zhang L., Masuda S., Higashihara M. and Kataoka K., 1994. Rapid potentiation of DNA binding activities of particulate transcription factors with leucine-zipper motifs in discrete brain structures of the gerbil with transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 667:54-66.

