

170
2e



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

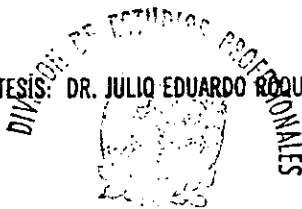
PARTICIPACION DE LOS RECEPTORES COLINER- GICOS EN LA SOBREVIVENCIA Y DIFERENCIACION DE NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO

T E S I S
Que para obtener el título de
B I O L O G O
p r e s e n t a
ANTONIO VALENCIA PEREZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORAN ANDRADE



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

México, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

262652



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" Participación de los receptores colinérgicos en la sobrevivencia
y diferenciación de neuronas granulares en cultivo "

realizado por Antonio Valencia Pérez

con número de cuenta 8605996-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. en I.B.B. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Propietario Dr. en I.B.B. Octavio Quesada García

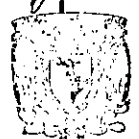
Propietario Q. Silvestre Alavez Espidio

Suplente Dra. en I.B.B. Ana B. Clorinda Arias Alvarez

Suplente Dra. en I.B.B. Martha L. Escobar Rodríguez

[Handwritten signatures and initials]

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Consejo Departamental de Biología
Edna M. Suarez D.
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Antonio y Margarita por su cariño, comprensión y apoyo incondicional. A mis hermanos Ricardo y Laura por su compañía y solidaridad. Con todo el amor para ustedes.

A mi esposa Adriana...por toda la vida.

Al Dr. Rafael Reyes Vázquez y al amigo Rafael, por tu valiosísimo apoyo profesional y personal.

A Julio Morán por haberme dado una oportunidad más...y por tu buena amistad.

A la familia Donohué Cornejo, Argueta Donohué, Donohué Nieto y a la tía Chuy por su invaluable afecto, paciencia y apoyo.

A José Luis Rodríguez Bazán, por que tu vida ha sido más que un ejemplo para mi y por tu amistad incondicional.

A mis buenos amigos y excelentes compañeros Alette Ortega, Andrea Caballero, Daniela Pedroza, Guadalupe Domínguez, Claudia Rodríguez, Silvestre Alavéz y Julio Morán.

A Guadalupe Domínguez y Claudia Rodríguez por su importante participación en el cultivo.

A mis sinodales Dr. Julio Morán, Dr. Octavio Quesada, Q. Silvestre Alavéz, Dra. Clorinda Arias y Dra. Martha Escobar, por su disponibilidad y valiosas observaciones en este trabajo.

A mis amigos Katja, Daniel, Gustavo, Víctor, Jorge, Alejandro, Marcela, Sandra, Xavier, Oscar y Magdalena.

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

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1. Desarrollo del sistema nervioso central..... | 1 |
| 1.2. Cerebelo..... | 4 |
| 1.2.1. Desarrollo del cerebelo..... | 6 |
| 1.2.2. Histogénesis del cerebelo..... | 10 |
| 1.3. Neurotransmisores y receptores en células granulares..... | 13 |
| 1.4. Transmisión colinérgica..... | 16 |
| 1.4.1. Receptores colinérgicos..... | 18 |
| 1.4.1.1. Receptores nicotínicos..... | 19 |
| 1.4.1.2. Receptores muscarínicos..... | 21 |
| 1.4.1.3. Proteínas G y efectores acoplados a receptores muscarínicos..... | 23 |
| 2. Antecedentes..... | 25 |
| 2.1. NMDA y Potasio en procesos de diferenciación y supervivencia en células granulares..... | 25 |
| 2.2. Acetilcolina en procesos de diferenciación y supervivencia..... | 26 |
| 2.3. Acetilcolina en células granulares..... | 27 |
| 3. Objetivos..... | 29 |
| 4. Metodología..... | 30 |
| 4.1. Obtención de cultivos primarios neuronales..... | 30 |
| 4.2. Tratamiento de las neuronas..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3. Evaluación de la actividad enzimática de la PAG..... | 31 |
| 4.4. Evaluación de la actividad enzimática de la AAT..... | 32 |
| 4.5. Evaluación de la actividad enzimática de la LDH..... | 33 |
| 4.6. Evaluación de la sobrevivencia neuronal por el método MTT..... | 34 |
| 4.7. Cuantificación de proteína por el método Bradford..... | 35 |
| 4.8. Evaluación morfológica..... | 35 |
| 4.9. Análisis estadístico..... | 35 |
| | |
| 5. Resultados..... | 36 |
| 5.1. Morfología..... | 36 |
| 5.2. Sobrevivencia neuronal..... | 40 |
| 5.3. Actividad de la PAG..... | 46 |
| 5.4. Actividad de la AAT..... | 48 |
| 5.5. Actividad de la LDH..... | 50 |
| | |
| 6. Discusión..... | 51 |
| | |
| 7. Conclusiones..... | 57 |
| | |
| 8. Abreviaturas..... | 58 |
| | |
| 9. Referencias..... | 60 |

1. INTRODUCCIÓN

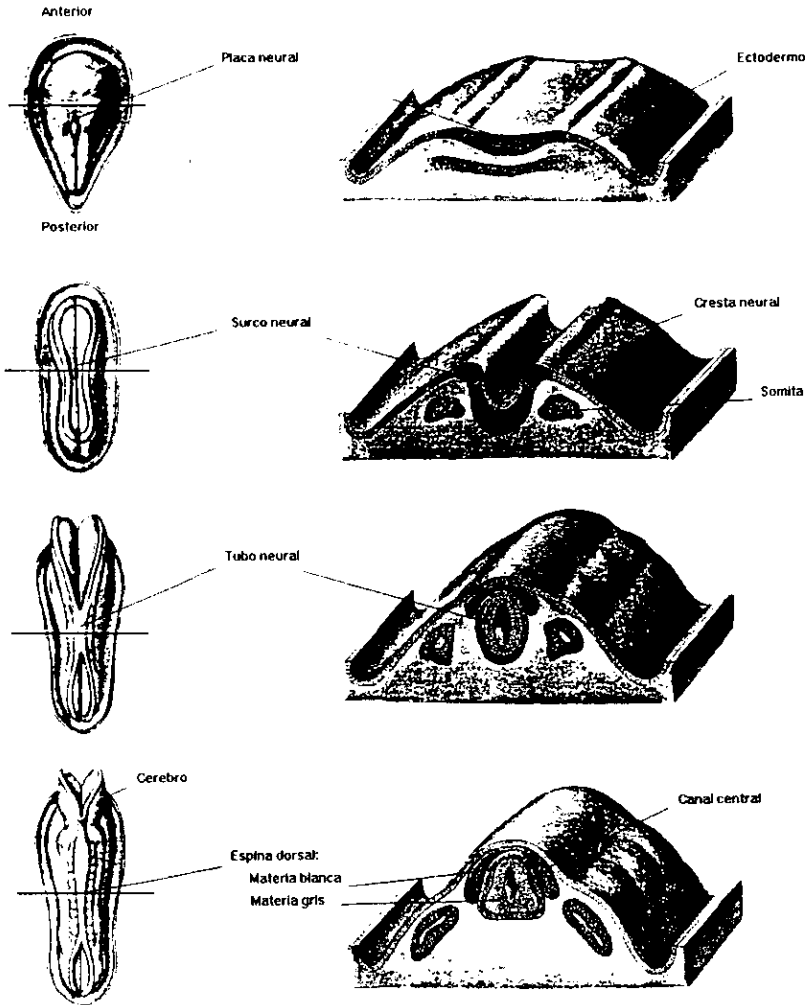
1.1. Desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)

Con la formación del huevo o cigoto comienza el desarrollo de un nuevo organismo. Esta célula prolifera para formar una serie de estructuras que llevan al estadio de gástrula, donde se establecen tres capas germinales embrionarias: el endodermo, que da origen a vísceras como intestinos, pulmón, hígado; la capa intermedia llamada mesodermo, que origina al tejido muscular, conectivo y al sistema vascular; y finalmente el ectodermo, del cual se originan el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP).

El ectodermo se modifica morfológicamente y forma una muesca, la cual se ensancha de tal forma hasta formar la placa neural. Después, esta placa comienza a plegarse formando el surco neural. El crecimiento de la cresta neural sigue hasta que el surco invade el cuerpo del embrión casi al mismo tiempo que las crestas se fusionan para formar el tubo neural, que ya establecido corre a lo largo del cuerpo con una localización dorsal en el embrión. A este proceso en general se le conoce como neurulación (figura 1).

El tubo neural, comienza a ensancharse originando tres vesículas conocidas como prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. El prosencéfalo y rombencéfalo se subdividen más adelante, dando como resultado cinco regiones del ya establecido SNC maduro: el telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, mielencéfalo y metencéfalo. El cerebelo se forma a partir del metencéfalo (tabla 1).

Las células de la cresta neuronal forman la región dorsal del tubo neural poco antes de su formación. Posteriormente migran para formar diferentes tejidos neurales del SNP, incluyendo neuronas sensoriales y autónomas.



Figural. Proceso de neurulación durante el desarrollo del organismo. Formación del tubo neural a partir de la placa neural, y finalmente la formación del cerebro y el resto del sistema nervioso central. (Modificado de Martin, J.H., *Neuroanatomy*, 1989).

TABLA 1

**DIVISIONES DEL SISTEMA NERVIOSO EMBRIONARIO Y ESTRUCTURAS
RESULTANTES EN ESTADO ADULTO**

| Vesículas cerebrales primarias | Vesículas cerebrales secundarias | Estructuras desarrolladas |
|---------------------------------------|---|--|
| Prosencéfalo | Telencéfalo | - Hemisferios cerebrales - Sistema olfatorio - Cuerpo estriado - Paliocorteza - Sustancia blanca |
| | Diencefalo | - Tálamo, epitálamo, hipotálamo y subtálamo. |
| Mesencéfalo | Mesencéfalo | - Cerebro medio |
| Rombencéfalo | Mielencéfalo | - Corteza del cerebelo - Bulbo raquídeo |
| | Metencéfalo | - Protuberancia - Puente - Cerebelo |

La cavidad del tubo neural forma el sistema ventricular del SNC, y conforme las células precursoras se van dividiendo en la zona ventricular van migrando hacia capas más superficiales para formar la citología del SNC maduro. Las células presentes en etapas tempranas del neuroepitelio del SNC generan neuroblastos que se diferencian en la parte interna del tubo neural, también se generan neuronas y células gliales del cerebro y médula espinal, y por otro lado, se originan células migratorias de la cresta neural.

De esta manera queda constituido el SNC maduro, formado por el encéfalo, el tallo cerebral y la médula espinal. Por otro lado el SNP queda establecido con todas sus conexiones formando la red informativa que lleva información al cerebro y viceversa.

1.2.Cerebelo

El cerebelo participa en varias actividades que incluyen funciones motoras y de equilibrio. Constituye el 10% del volumen total del cerebro, pero presenta más de la mitad del total de células nerviosas. Tiene una gran diversidad de interconexiones nerviosas tanto de entrada como de salida.

La compleja funcionalidad del sistema nervioso, incluyendo al cerebelo, depende en gran medida de la cantidad y variedad de interconexiones que se establecen entre las neuronas. El establecimiento de estas complejas redes de información son el resultado de una serie de procesos finamente regulados durante periodos críticos en el desarrollo del individuo. Entre éstos, es importante destacar cinco eventos principales:

Proliferación. Ocurre en un tiempo muy preciso del desarrollo (primeros días de la formación del embrión) y esta controlada por señales entre las capas germinales que inducen una división celular que da origen a un gran número de células en estado indiferenciado.

Migración. Las células formadas en la etapa anterior, comienzan un proceso migratorio desde las capas germinales hasta donde están destinadas a establecerse. Este proceso está mediado por moléculas de la matriz extracelular y por agentes tróficos que estimulan la dirección del crecimiento de las neuronas. En esta etapa las células gliales tienen un papel fundamental sirviendo como guías para el trayecto de las neuronas que migran.

Diferenciación. Al mismo tiempo que las células comienzan su migración, reciben señales constantes que les marcan su destino y simultáneamente inducen la expresión de las características morfológicas y fisiológicas que les darán una identidad particular en el organismo adulto, como la activación de genes, enzimas, producción de proteínas, neurotransmisores, etc.

Formación y establecimiento de procesos. Las prolongaciones (neuritas) de las neuronas comienzan su crecimiento con el objetivo de establecer circuitos informativos con sus células blanco correspondientes, que dependerán de su localización e identidad fisiológica y morfológica. Estas conexiones se establecen gracias a señales químicas que los axones en crecimiento detectan.

Muerte celular. Es un proceso natural que ocurre en las primeras fases del desarrollo del SN. Se sabe que alrededor del 50% de la población neuronal muere durante este proceso. Dicha muerte está programada en la información genética y parece estar modulada por factores tróficos que junto con el resto de la fisiología celular dictan la orden de muerte. Este proceso de muerte programada parece ser de tipo apoptótico.

Como el cerebelo tiene diversos tipos celulares tanto neuronales como gliales, es fácil deducir que habrá células que pasen por los procesos arriba mencionados en un mismo tiempo. Es importante mencionar que la información genética junto con la relación de las células con el exterior y la actividad de los

factores tróficos son determinantes para la activación y modulación de los eventos antes explicados.

1.2.1.Desarrollo del cerebelo

El cerebelo ocupa la mayor parte de la fosa craneal posterior. Está constituido por la corteza cerebelar, una capa interna y tres pares de núcleos internos cuyas proyecciones van hacia el exterior. Se desarrolla a partir de neuronas inmaduras de los labios rómbicos de una región metencefálica del tubo neural llamada placa alar. Los labios rómbicos se localizan en la región dorsolateral del metencéfalo y se encuentran inicialmente separados. En estas áreas se localizan células con actividad proliferativa y en la zona media de los labios se fusionan a lo largo de la línea media dorsal con un gradiente antero-posterior, para que finalmente se desarrolle y establezca el vermis cerebeloso.

Histológicamente la corteza del cerebelo se divide en tres capas que están constituidas por cinco tipos celulares; las células estrelladas, las células en canasta, las células de Golgi, las células de Purkinje y las células granulares.

La capa más externa, llamada también capa molecular, está compuesta principalmente por axones de las células granulares conocidas como fibras paralelas, ya que se distribuyen de manera paralela al eje longitudinal del folium, que es una estructura localizada por debajo de la corteza cerebelosa (figura 2). En esta capa molecular se encuentran también células estrelladas y células en canasta que funcionan como interneuronas, también se localizan dendritas de las células de Purkinje. Existen otro tipo de fibras, las fibras trepadoras de características excitadoras que se originan en la médula espinal.

Después de la capa molecular se localiza la capa de células de Purkinje, donde son evidentes los somas por su gran tamaño en relación a los demás tipos

neuronaes. Los axones de estas células son proyectados principalmente a la sustancia blanca.

Por debajo de la capa de células de Purkinje se encuentra la capa granular donde se localizan algunas células de Golgi y las células granulares en gran abundancia (alrededor de 10^{11} en el cerebello de humano; -Ito, 1984-).

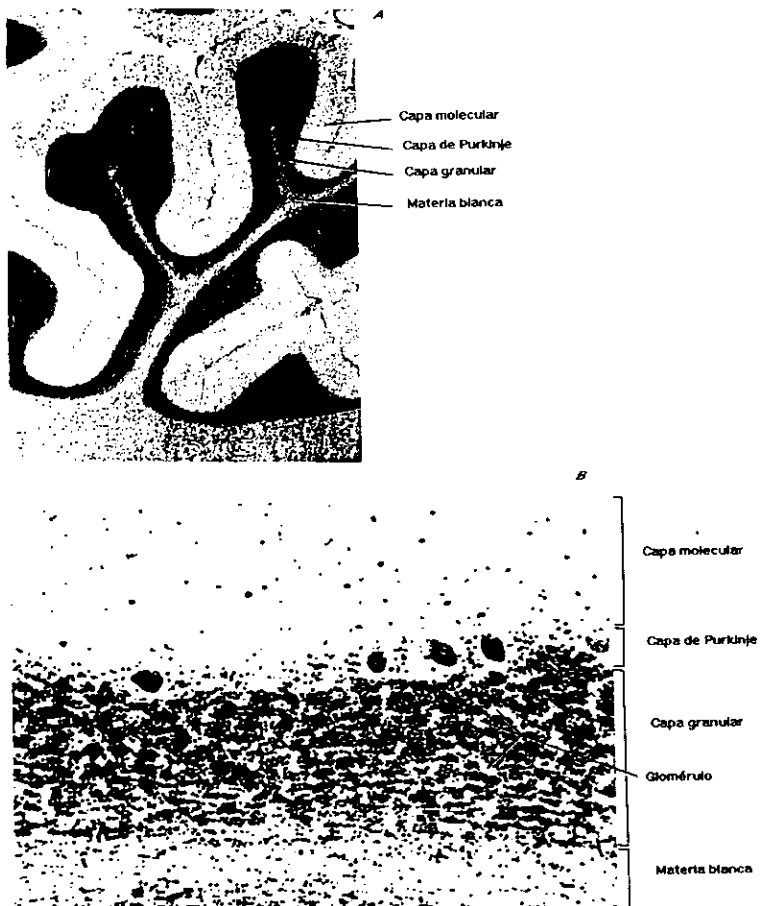


Figura 2. Esquema de un corte transversal de la corteza cerebelar, en la que se identifican algunos tipos celulares y las secciones en las que se encuentran. A, menor aumento y B, mayor aumento del corte. (Modificado de Martin, J.H., *Neuroanatomy*, 1989).

En la capa granular es donde se localizan los llamados glomérulos cerebelosos, que son estructuras donde se establecen complejos circuitos entre células de la capa granular y las fibras musgosas provenientes de los núcleos pontinos y de la médula espinal. Las fibras musgosas tienen una identidad excitadora, siendo la acetilcolina el neurotransmisor más abundante en estas estructuras, conteniendo también una pequeña contribución glutamatérgica. Tienen influencia sobre las células de Purkinje a través de las sinapsis que establecen con las células granulares (figura 3).

Los axones de las células granulares se proyectan dicotomizándose dando origen a las fibras paralelas, que se conectan con dendritas de las células de Purkinje. Se ha calculado que cada célula de Purkinje recibe 200,000 fibras paralelas de las células granulares. A su vez cada célula granular es blanco de diversas fibras musgosas.

La actividad de las células de Purkinje esta modulada por tres tipos de interneuronas inhibitorias, las células estrelladas, en canasta y las células de Golgi. Este último tipo celular tiene árboles dendríticos muy desarrollados que se encuentran en la capa molecular y que también reciben información de las fibras paralelas.

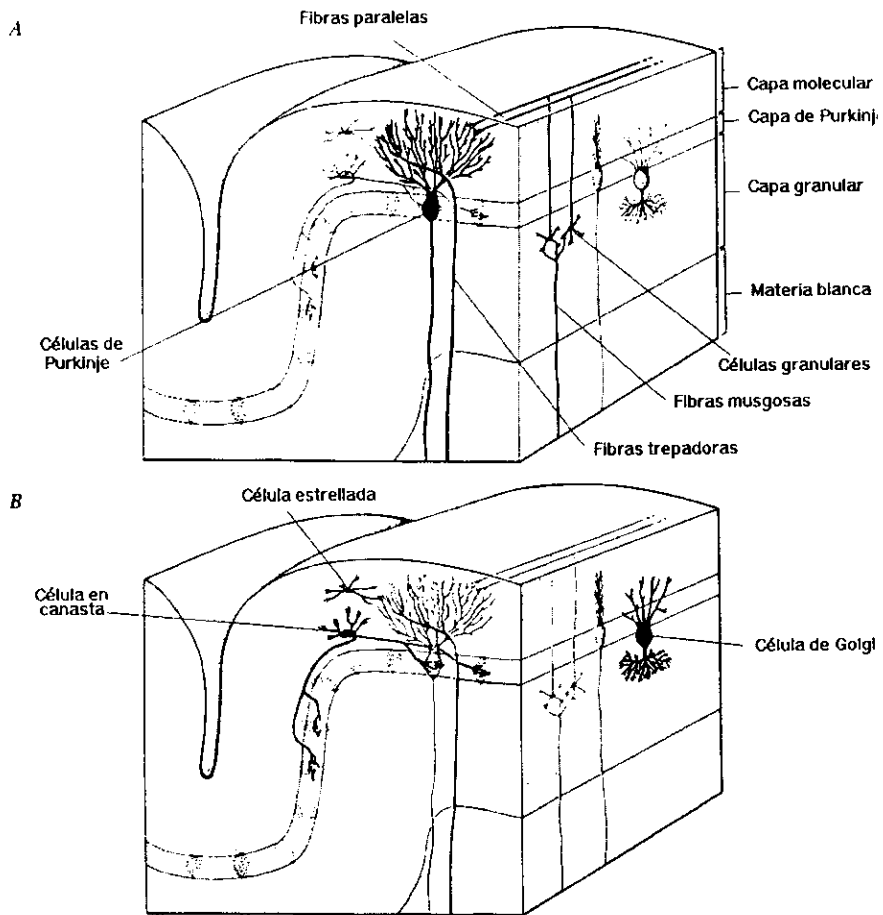


Figura 3. En la figura se ilustra el circuito cerebelar en dos fases. *A*, muestra las dos entradas más importantes de carácter excitador a las neuronas de Purkinje, que son las fibras trepadoras, y la entrada vía fibras musgosas-fibras paralelas. *B*, enseña las interneuronas inhibitorias. (Modificado de Martin, J.H., *Neuroanatomy*, 1989).

1.2.2.Histogénesis del cerebello

Tanto los procesos de proliferación como de migración neuronal en el cerebello de la rata ocurren alrededor de las tres primeras semanas después del nacimiento. Se han determinado dos procesos migratorios diferentes: uno de la capa granular externa donde los procesos de división celular son abundantes, y otra donde la migración es más superficial y que da origen a las células de Purkinje. Las células de la capa granular externa se internaliza para constituir la granular interna, de donde se originan las células de Golgi y las granulares. Al mismo tiempo que las células granulares van migrando hacia su destino final, éstas van desarrollando las fibras paralelas.

Las **Células de Purkinje** maduran en general en cinco fases, la primera es embrionaria y las restantes postnatales. En la fase embrionaria estas células se originan de la zona germinal ventricular y migran para formar las primeras neuronas en la placa cerebelar. El crecimiento de los axones ocurre durante el proceso de alineamiento y forman conexiones sinápticas con neuronas en el núcleo cerebelar.

Las **Células de Golgi** provienen de la matriz ventricular al igual que las de Purkinje. Normalmente se forman luego del nacimiento y terminan su establecimiento a las dos semanas postnatales. Sus dendritas reciben información de las fibras paralelas, mientras que sus axones se conectan en los glomérulos cerebelosos.

Las **Células en canasta** se originan en la capa germinal externa alrededor de los días 6 y 7 postnatales en la rata y su establecimiento se prolonga hasta los 8 días después del nacimiento. Hacen sinápsis con las células de Purkinje.

Las **Células estrelladas** se establecen alrededor de los 8-11 días luego del nacimiento de la rata. Como ya se dijo, provienen de la capa germinal más

externa. Se encuentran dispersas a lo largo de la capa molecular y funcionan como interneuronas.

Las **Células granulares** son las células más pequeñas del cerebelo pero también las más numerosas. Se localizan en la capa granular de la corteza del cerebelo y comprenden la mayor población neuronal de este tejido. Tienen una identidad excitadora siendo su neurotransmisor el L-glutamato.

Las células granulares en la rata se forman durante las 2 y 3 primeras semanas postnatales; durante su primer día pasan a la zona basal y a los 13 alcanzan la capa granular.

Las células granulares reciben conexiones de las fibras musgosas y a su vez las células granulares excitan otras células de la corteza cerebelosa, dichas conexiones se establecen desde la primera hasta la tercera semana luego del nacimiento. Los somas de estas células miden entre 5 y 8 μm de diámetro. Cada célula tiene entre 2 y 7 dendritas de 4.17 μm de largo en promedio y muchas más de un promedio de 30 μm de largo. Estas dendritas se conectan a las fibras musgosas en el glomérulo cerebeloso. En el humano se reporta un número de células granulares en el cerebelo alrededor de 10^{11} y en la rata de aproximadamente 2.2×10^9 (Ito, 1984).

Los axones de las células granulares se dividen en dos formando una "T" y se conocen como fibras paralelas, éstos son desmielinizados y pasan haciendo conexiones a través de la capa de Purkinje.

Durante una etapa temprana del desarrollo, algunas células de la matriz del tubo neural se diferencian en neuroblastos, los cuales pierden la capacidad de replicar de su material nuclear (ADN), entonces migran fuera de la capa de la matriz y se acumulan en la capa del manto del tubo neural.

A los 13-16 días embrionarios de la rata las células granulares cubren la superficie del cerebelo en la etapa proliferativa de las células. Después del

nacimiento la producción de neuroblastos es una actividad asociada a una invasión masiva de células de la capa granular externa a la interna. En el ratón se sabe que el 50% de las células en la capa granular son producidas 10 días después del nacimiento y alrededor del 90% se generan en los primeros 15-17 días.

En ratas recién nacidas, la capa granular externa consiste de una zona proliferativa de alrededor de 4 a 5 células de grosor. Debajo de ésta, se encuentra la zona subproliferativa, también conocida como premigratoria, que abarca de 2 a 3 células de grosor; esta zona crece entre los días 7 y 10 postnatales a 4 a 6 células de grosor. Entre los días 16 y 19 postnatales, la capa premigratoria decrece de 4 a 3 células de grosor, mientras que la proliferativa no es más que de una célula de grosor, que coincide con una alta actividad bioquímica considerada como una característica de diferenciación bioquímica y/o fisiológica. La población de células de la capa granular interna se establece hasta la segunda semana después del nacimiento (figura 4).

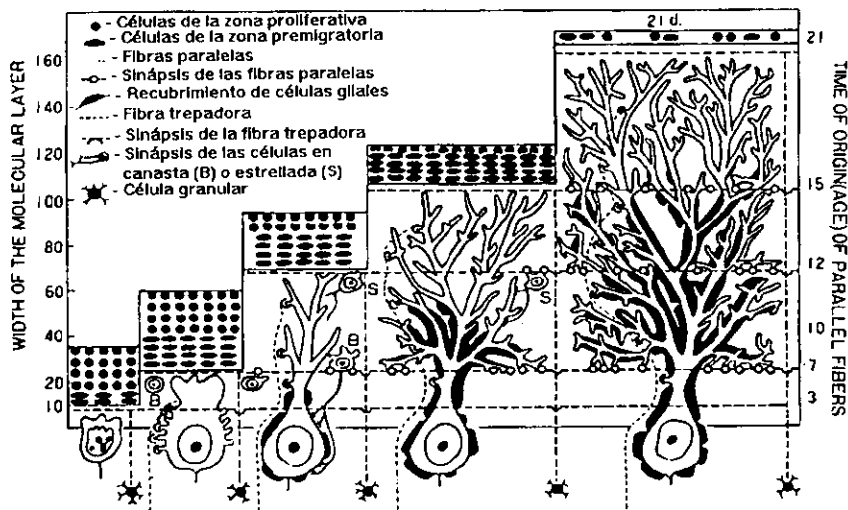


Figura 4. Desarrollo de las neuronas del cerebelo. Formación de sinápsis y crecimiento de las capas celulares a través del tiempo. (Modificado de Ito, M., *The cerebellum and neural control*, 1984).

En la etapa de migración las células granulares establecen estrechas relaciones con las células gliales, lo que indica la importancia de la matriz extracelular en la modulación de este proceso de migración.

Para la tercera semana, las fibras paralelas establecen sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje. Las sinápsis de las fibras paralelas se forman primero con las espinas sinápticas en la mitad inferior de la capa molecular, y la sinaptogénesis asciende de manera progresiva. Las sinápsis glomerulares entre las fibras musgosas y las dendritas de las células granulares se establecen a lo largo de la segunda semana y al comienzo de la tercera después del nacimiento; los procesos siguen hasta el día 30 aproximadamente.

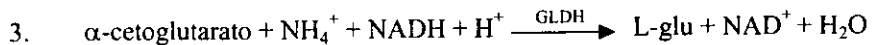
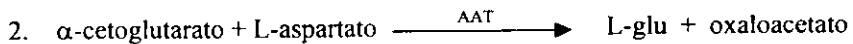
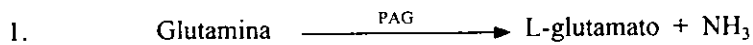
Las células granulares se han utilizado ampliamente como modelo para el estudio de la fisiología neuronal, esto se debe a una serie de ventajas que proporcionan para su estudio tanto *in vivo* como *in vitro*. Una ventaja importante, es que las células granulares son muy abundantes en el cerebelo y son relativamente fáciles de cultivar. Los cultivos que se obtienen con estas células son muy puros (< 90% de neuronas). Otra ventaja, es que estas células se desarrollan postnatalmente y esto proporciona la posibilidad de medir o estudiar procesos de diferenciación, migración y sobrevivencia que ocurren *in vivo* y que se reflejan en el cultivo.

1.3. Neurotransmisores y receptores en células granulares

Como ya se mencionó, el L-glutamato es el neurotransmisor de las células granulares del cerebelo. Estudios con precursores radiactivos han determinado que la principal vía de síntesis de este aminoácido como neurotransmisor, es a través de la glutaminasa activada por fosfato (PAG), la cual convierte la glutamina en ácido glutámico (reacción 1). Otra vía de síntesis del L-glutamato es por una transaminación del L-aspartato al α -cetoglutarato catalizada por la aspartato

aminotransferasa (AAT) (Palaiologos, et.al., 1988, 1989) (reacción 2). Se ha propuesto que la glutamina que se exporta de las células gliales hacia el interior de las células granulares se transforma en ácido glutámico por acción de la PAG., y junto con el oxaloacetato y por acción de la AAT, en aspartato y α -cetoglutarato. El L-asp se transporta fuera de la mitocondria por el sistema de lanzadera malato-aspartato. En el citoplasma se lleva a cabo la reacción opuesta catalizada por la AAT (reacción 2) para formar glutamato como producto (figura 5).

Finalmente la glutamato deshidrogenasa (GLDH) (reacción 3) puede participar en la síntesis de glutamato a partir de α -cetoglutarato y NADH; sin embargo esta vía parece no alimentar la poza del glutamato como neurotransmisor.



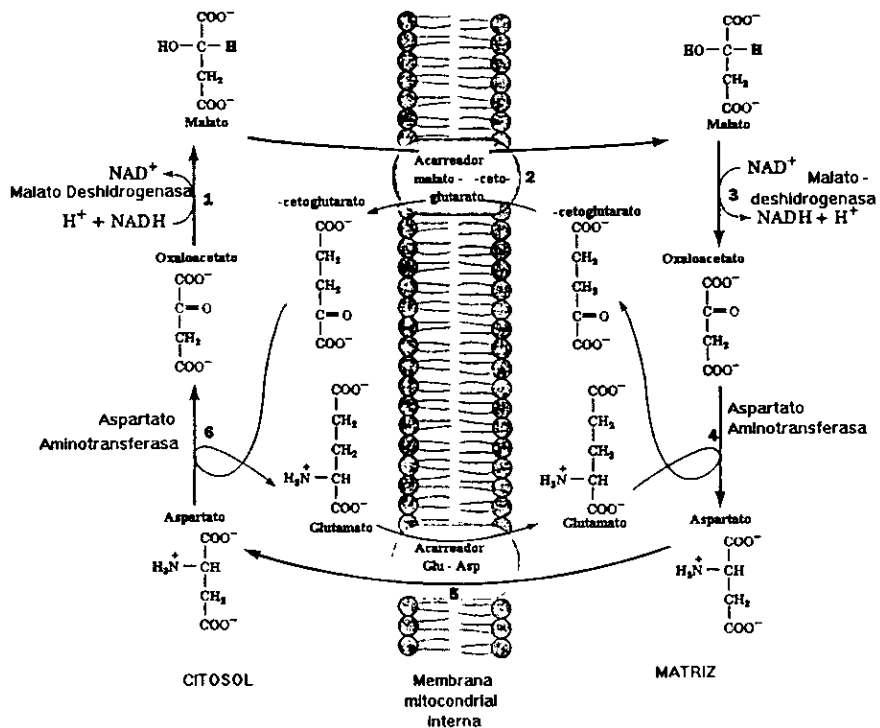


Figura 5. Esquema de las reacciones que se llevan a cabo dentro y fuera de la mitocondria que involucran la síntesis de L-glutamato a partir del α-cetoglutarato y aspartato. (Modificado de Voet and Voet, *Biochemistry*, 1997).

Las células granulares reciben información sináptica a través de una gran diversidad de receptores que responden a distintos neurotransmisores liberados por las células presinápticas. Entre los principales receptores se encuentran los receptores glutamatérgicos en éstas neuronas, que se dividen en receptores del tipo NMDA, no-NMDA y los metabotrópicos. Otros receptores incluyen a los serotoninérgicos (5-hidroxi-triptamina de los subtipos 5HT_{1A} y 5HT_{1C}), a los adrenérgicos (β_2), receptores a la triptamina, al ácido γ -aminobutírico (GABA) y hormonas como la epinefrina y para una gran variedad de factores de crecimiento

(Didier et.al. 1995; Xu y Chuang 1987; Ishitani et.al. 1994). Además de los mencionados otros receptores presentes en las células granulares son los receptores colinérgicos muscarínico M_2 y M_3 que tienen características metabotrópicas, y al nicotínico sensible a la α -bungarotoxina o tipo neuronal (n_2) de características ionotrópicas (Howard et.al. 1994).

Debido a la conexión de fibras musgosas de identidad colinérgica con las células granulares en el glomérulo cerebeloso a lo largo de la segunda semana postnatal, un periodo crítico para las neuronas del cerebelo, no es extraño pensar que la acetilcolina pueda intervenir en los procesos de diferenciación y sobrevivencia mencionados antes.

1.4. Transmisión colinérgica

La acetilcolina (Ach), como muchas otras moléculas, es bien conocida como partícipe en las redes neuronales de información. En la placa neuromuscular es el principal neurotransmisor regulando la actividad de las fibras musculares. En el sistema nervioso central es muy abundante, y tiene un papel importante en las vías que regulan funciones motoras; se localiza en la corteza cerebral, en el cerebro anterior, hipocampo, cerebelo, tallo cerebral y otras estructuras más.

La Ach se sintetiza en las terminales nerviosas tomando como precursores la colina y la acetil-coenzima A (AcCoA), esta reacción se efectúa gracias a la enzima acetil colín transferasa (CAT o ChAT) que se encuentra en el citoplasma. La Ach se degrada en acetato y colina através de una reacción catalizada por la enzima acetilcolinesterasa (AchE), la cual esta presente en diferentes formas moleculares que determinan su capacidad catalítica particular (reacción 4) (Cooper, 1994; Rylett, et.al.1993).



La AcCoA utilizada para la síntesis de Ach proviene de la acción de la citrato liasa sobre el citrato, es formada y expulsada de la mitocondria. La colina esta presente en el plasma a una concentración de 10 μM . Para integrar la colina a la célula existen dos sistemas, uno de alta afinidad dependiente de Na^+ con una K_m de 1 a 5 μM , y otro de baja afinidad con una K_m de 10 a 100 μM . Como las neuronas no pueden sintetizar colina *de novo*, la utilizada en la síntesis de Ach proviene en su mayoría de la dieta, por lo que al menos la mitad de la colina utilizada para la síntesis de Ach es proveniente del reciclamiento en la degradación de Ach por la AchE. Otra fuente de colina proviene del rompimiento de la fosfatidilcolina la cual se ve incrementada en respuesta a una liberación local de Ach, y es una vía que proporciona colina en menor grado para la síntesis del neurotransmisor (Lee, et.al. 1993).

La liberación de Ach depende de la presencia de Ca^{2+} que entra en la neurona luego de ser despolarizada. Se sabe que a medida que el Ca^{2+} intracelular se incrementa se produce una mayor liberación de Ach en la terminal nerviosa. Cuando la Ach se sintetiza, se internaliza en vesículas sinápticas, las cuales se unen a la membrana para verter su contenido en el espacio sináptico (figura 6). Se conocen dos tipos de pozas intracelulares de Ach y solo una de ellas se considera lista para su liberación, mientras que el otro tipo se mantiene en la terminal del axón como reserva.

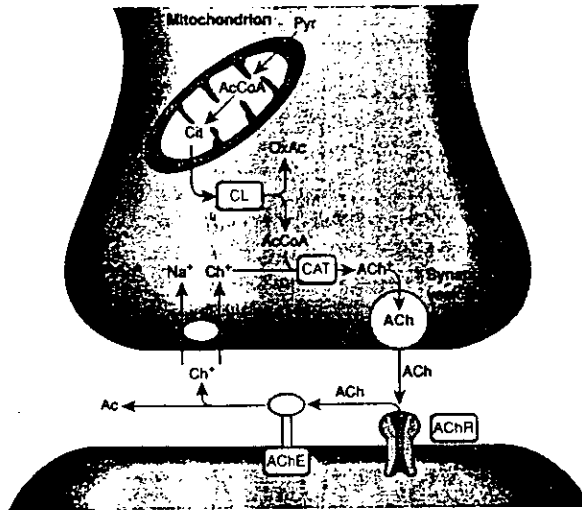


Figura 6. Se muestran las posibles vías del metabolismo de la ACh. El piruvato (Pyr) proveniente de la glicólisis genera acetil-coenzima-A (AcCoA) dentro de la matriz mitocondrial. Ésta es convertida en citrato (Cit) por la vía del ciclo del ácido cítrico. Ya fuera de la mitocondria, por la citrato-licasa (CL) se forma oxaloacetato (OxAc) y AcCoA. La AcCoA y la colina (Ch^+) forman ACh en el citoplasma vía acetil colintransferasa (CAT). La Ach es internalizada en vesículas. Luego de su liberación y unión a los receptores a Ach, ésta es degradada por la acetilcolinesterasa (AChE). (Modificado de Nicholls, D.G., *Protein, transmitters and synapses*, 1994).

1.4.1.Receptores colinérgicos

Se conocen dos tipos generales de receptores para la ACh, unos de la familia de receptores ionotrópicos conocido como receptor nicotínico y otro grupo de receptores de la familia de los metabotrópicos llamado receptor muscarínico. Ambos tienen como ligando endógeno a la acetilcolina y dentro de estos dos grupos hay tanto inhibidores como excitadores; sus mecanismo de acción dentro del mismo grupo (tanto ionotrópicos como metabotrópicos) son distintos y utilizan diferentes vías de transducción.

1.4.1.1. Receptores nicotínicos

Estos receptores se conocen así porque muchos estudios para su identificación y purificación se realizaron utilizando un alcaloide proveniente del tabaco, la nicotina. La densidad de receptores nicotínicos del órgano eléctrico del pez Torpedo es de aproximadamente 100 pmol/mg de proteína en comparación con los 0.1 pmol/mg de proteína en el músculo esquelético, por lo que dicho pez ha sido muy utilizado para el estudio de este tipo de receptores colinérgicos.

El receptor nicotínico está compuesto por 5 subunidades que presentan una alta homología en su secuencia de residuos de aminoácidos de alrededor de 30 a 40% de identidad entre ellas. Las subunidades son llamadas α de las que hay dos en cada receptor, β , γ y δ , en total un receptor presenta cinco subunidades. En la parte central de ellas se localiza el canal iónico que conduce cationes. El pentámero tiene un peso aproximado de 280 kDa. El canal iónico abierto mide 6.5 Å de diámetro y como ya se dijo, es selectivo para cationes (Na^+ , Ca^{2+}). El sitio de unión del ligando en el receptor se localiza en la subunidad α , y es necesario que ambos sitios en las dos subunidades α estén ocupados para que el receptor pueda activarse y el canal se abra permitiendo el paso de cationes al interior de la célula. Los sitios de unión para los inhibidores no selectivos se localizan a diferentes profundidades del canal iónico.

Para diferenciar en general a los receptores nicotínicos se utiliza una toxina llamada α -bungarotoxina proveniente del veneno de una serpiente de Malasia. Se han distinguido dos tipos de receptores nicotínicos, uno insensible a la α -bungarotoxina o muscular (n_1) y otro sensible a la α -bungarotoxina o neuronal (n_2) (Didier, et.al.1995).

Como agonistas generales del receptor nicotínico muscular se conocen a la Ach, el carbacol y la nicotina, y como agonista específico el feniltrimetilamonio. Un antagonista de este tipo de receptor es la d-tubocurarina. En el caso del

receptor nicotínico neuronal se conocen los mismos agonistas generales que para el tipo muscular, y como agonista específico para el tipo neuronal se utiliza un compuesto llamado 1,1-dimetil-4-fenilpiperazinium. Los antagonistas para este tipo de receptor son el trimetafan y hexametonium (tabla 2).

TABLA 2

AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES COLINÉRGICOS

| RECEPTOR | AGONISTAS | ANTAGONISTAS |
|-----------------|---|--------------------------------|
| n_1 | Feniltrimetilamonio, carbacol, Ach, nicotina | d-Tubocurarina |
| n_2 | 1,1-dimetilpiperazinium, carbacol, Ach, nicotina | Trimetafan |
| M_1 | Oxotremorina, carbacol, Ach, muscarina | Pirenzepina Atropina |
| M_2 | Oxotremorina, carbacol, Ach, muscarina | Galamina, AFDX-116 Atropina |
| M_3 | Oxotremorina, carbacol, Ach, muscarina | 4-DAMP Atropina |
| M_4 | Oxotremorina, carbacol, Ach, muscarina | Himbicina Atropina |
| M_5 | Oxotremorina, carbacol, Ach, muscarina | Himbicina Atropina |

1.4.1.2. Receptores muscarínicos

El otro tipo de receptor se conoce como receptor muscarínico debido a la utilización de la toxina muscarina, extraída del hongo *Amanita muscaria* para su estudio. Estos receptores están acoplados a proteínas G, las cuales actúan sobre un efector (enzima) que genera segundos mensajeros (figura 7). Existen cinco tipos de receptores muscarínicos, conocidos como M₁, M₂, M₃, M₄ y M₅. La diferencia entre ellos radica en la actividad de la proteína G a la que están unidos (Sunaga, et.al., 1993). El receptor muscarínico es una proteína membranal que presenta siete pasos transmembranales en su cadena polipeptídica con tres asas intermembranales. La tercer asa intermembranal, tomando como referencia el extremo amino del receptor, es muy grande, tiene alrededor de 154 restos de aminoácidos. Esta asa es la principal diferencia en la estructura entre los diferentes subtipos de receptores; además, es la que esta unida a la proteína G; y la diferencia en afinidad a una serie de moléculas que funcionan como agonistas y antagonistas. Los receptores muscarínicos tienen como principales agonistas a la Ach, el carbacol y la muscarina, mientras que el antagonista no selectivo para los cinco subtipos de receptores muscarínicos es la atropina. Los antagonistas específicos para cada subtipo son la pirenzepina para el M₁, la galamina y el AFDX-116 para el subtipo M₂, el 4-difenilacetoxil-N-metilpiperidina metiodide (4-DAMP) para el subtipo M₃, la himbicina para el M₄ y M₅ (tabla 2) (Michel, et.al. 1990; Alonso, et.al. 1990).

Este tipo de receptores que están acoplados a proteínas G utilizan vías de transducción mediados por segundos mensajeros. Estos mecanismos de comunicación celular normalmente son más lentos que aquellos en donde la vía de comunicación son canales iónicos unidos al receptor, pero tienen una mayor posibilidad de ser regulados a diferentes niveles, desde la proteína (receptor), el

efector, el segundo mensajero y el blanco de éste, aparte de los sitios de interacción del receptor con antagonistas y agonistas del mismo.

RESPUESTAS BIOQUÍMICAS PRIMARIAS MEDIADAS POR RECEPTORES COLINÉRGICOS DE TIPO MUSCARÍNICO

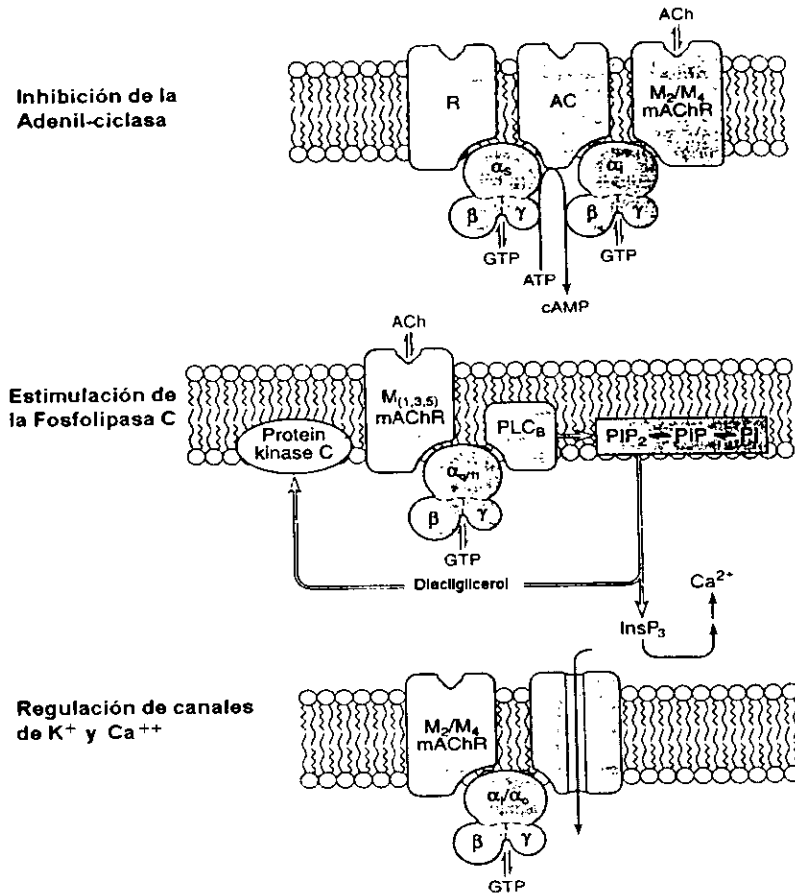


Figura 7. Respuestas bioquímicas principales moduladas por receptores muscarínicos, los cuales están acoplados a diferentes proteínas G que inducen varias respuestas intracelulares, éstas pueden ser la formación de segundos mensajeros (IP₃, DAG, AMPc) y regulación de canales iónicos. (Modificado de Siegel, G., *Basic Neurochemistry*, 1994).

1.4.1.3. Proteínas G y efectores acopladas a receptores muscarínicos

Se ha descrito ampliamente que los receptores muscarínicos metabotrópicos se encuentran unidos a proteínas efectoras a través de proteínas G. Estas proteínas pueden estar acopladas a la adenilciclase (AC) o a la fosfolipasa C (PLC) (Larocca, et.al. 1994). Las proteínas G son trimeros polipeptídicos, los cuales están constituidos por una subunidad α , una β y una γ ; la α es la que le da la diversidad a estas proteínas. Se les llama proteínas G por su capacidad de unir nucleótidos de guanina, el guanosin trifosfato (GTP) y el guanosin difosfato (GDP).

La dinámica en la activación de la proteína G, consiste en la estimulación del receptor, lo que constituye una señal para que se una la proteína G al receptor, dando como resultado la disociación de la subunidad α de la β y γ ; entonces la subunidad α se une a un efector, que puede ser la AC o la PLC (figura 7). La unión de la subunidad α al efector dispara su actividad generando la síntesis de segundos mensajeros: la AC forma AMPc, y la PLC forma IP_3 y DAG. En los casos del AMPc y el DAG, pueden activar proteína-cinasas directamente, las cuales a su vez tienen como objetivo fosforilar otras proteínas y enzimas. En el caso del IP_3 , este se unirá a un receptor conocido como receptor a IP_3 en el retículo endoplásmico que libera Ca^{2+} al citoplasma el cual puede a su vez activar enzimas y proteínas (Hynie, et.al. 1989; Irving, et.al., 1992).

Los agonistas muscarínicos estimulan la hidrólisis de fosfoinosítidos por la activación de la PLC. El resultado de la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), como ya se dijo, resulta en la producción de segundos mensajeros como el IP_3 y DAG (figura 8). Se sabe que como resultado de la activación de los receptores muscarínicos ocurre una activación de cinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina y de proteína-cinasa C (PKC). Por otro lado también se puede

activar la fosfolipasa D (PLD) que hidroliza fosfatidilcolina en una respuesta a la activación de la PKC.

Los receptores muscarínicos presentan una gran diversidad de respuestas dependiendo del tipo de proteína G a la que este asociado, por esta razón, la cantidad de procesos y actividades que puede desencadenar la unión de la acetilcolina *in vivo* resulta de gran importancia para la fisiología de la célula que los contenga.

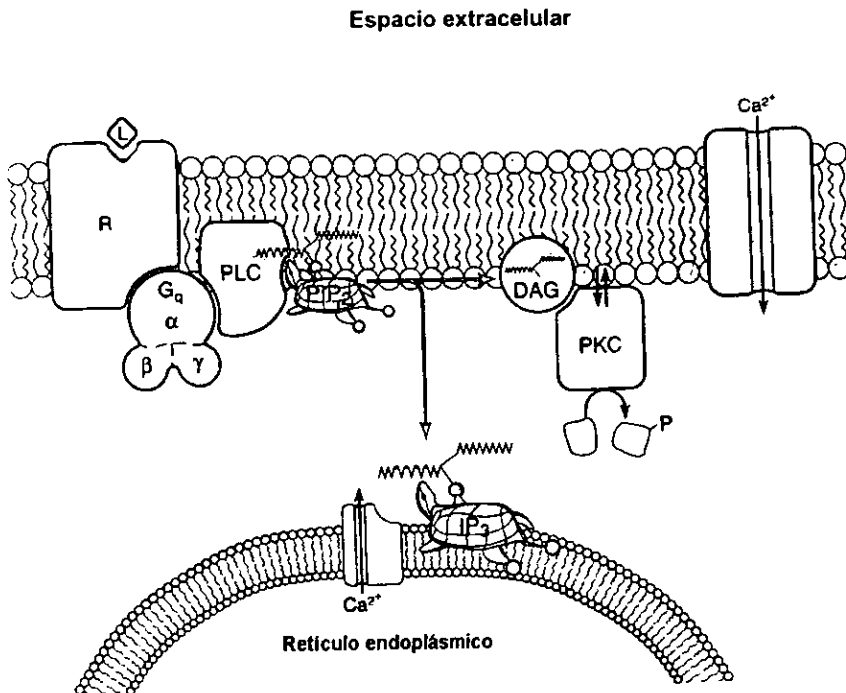


Figura 8. Sistema de transducción de receptores acoplados a proteínas G_q . La hidrólisis de fosfoinosítidos resulta en la formación de IP_3 , el cual se une a un receptor en el retículo endoplásmico y libera Ca^{++} . Por otro lado, se forma DAG, que induce una activación de la proteína-quinasa C, que tiene como función fosforilar proteínas. (Modificado de Siegel, G., *Basic Neurochemistry*, 1994).

2. ANTECEDENTES

2.1. NMDA y Potasio en procesos de diferenciación y supervivencia en células granulares

Se sabe que la activación de al menos un subtipo de receptor de L-glutamato, el NMDA, juega un papel importante en algunos de los eventos del desarrollo de las células granulares del cerebelo. La activación de los receptores de tipo NMDA y la despolarización por potasio afecta los procesos de migración de estas neuronas (Rossi, et.al., 1993; Hockberger, et.al., 1987). También, contrario a lo que ocurre en neuronas maduras, la estimulación de células granulares con NMDA y altas concentraciones de cloruro de potasio (KCl) promueven la supervivencia en cultivo (Gallo et.al., 1987; Balázs et.al., 1988).

En un estudio previo, demostramos que en neuronas granulares de cerebelo el NMDA (150 μ M) y KCl (40 y 25 mM) promueven la activación de la PAG a los 3 - 5 DIV (Morán et.al., 1992). Este efecto fue dependiente de la edad del cultivo y de la concentración de las drogas y fue específico para enzimas relacionadas con la síntesis de L-glutamato como neurotransmisor, ya que otras enzimas no modificaron su actividad como la LDH y la GLDH. Otra enzima involucrada en la síntesis de glutamato como neurotransmisor, la AAT, también incrementa sus niveles de actividad si las células se estimulan con NMDA y KCl (Morán, et.al., 1992). Recientemente hemos encontrado que el aumento en la activación de esta enzima es el resultado de un aumento en la cantidad de la misma y de su ARNm, indicando que la influencia trófica afecta directamente la expresión génica de estas células (Alavez, et.al., 1996)

Existen múltiples estudios que han demostrado que para promover la supervivencia y la diferenciación de estas células se requiere de un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} (Balázs, et.al., 1987, 1988 1989 y 1992; Gallo,

et.al., 1987; Irving, et.al., 1992; Morán, et.al., 1989; Collins, et.al., 1991) sin que se conozca exactamente el mecanismo a través del cual el Ca^{2+} participa en los mecanismos de la muerte programada y de la diferenciación neuronal.

Esta serie de estudios sugiere que durante el desarrollo *in vivo* de las células granulares la activación de los receptores de glutamato tipo NMDA representa una señal trófica que promueve la sobrevivencia y maduración. Esta idea esta apoyada por el hecho de que los períodos críticos observados en la acción del NMDA en cultivo coinciden muy cercanamente en tiempo con los procesos de innervación de estas células por las fibras musgosas.

2.2. Acetilcolina en procesos de diferenciación y sobrevivencia

Se ha demostrado en distintos tejidos que la ChAT y AChE pueden participar en el desarrollo. Tal es el caso del epitelio pigmentado retinal (REP), en el cual, durante el desarrollo se observa un importante incremento en la densidad de receptores nicotínicos y muscarínicos M_1 muestran que la privación de este neurotransmisor afecta el desarrollo de estas células (Salceda, 1994; Osborne, et.al., 1991; Sugiyama, et.al., 1997 & Stroeve, et.al., 1983).

En el cerebelo, las células de Purkinje muestran una actividad importante de ChAT durante el desarrollo postnatal. Se ha observado en cultivos disociados de cerebelo embrionario que hay una producción importante de acetilcolina (ACh) durante la primer semana en cultivo. La presencia de carbacol 10 μM en estos cultivos de células de Purkinje induce un aumento del número de neuronas (Howard, et.al. 1994 & Cohen-Cory, et.al. 1991). La activación de estos receptores tiene un efecto selectivo en las células de Purkinje, lo que sugiere que la acetilcolina es indispensable durante su desarrollo (Howard, et.al. 1994 &

Cohen-Cory, et.al. 1991). Este efecto se bloquea con antagonistas muscarínicos como la atropina, pirenzepina y metoctramina.

2.3. Acetilcolina en células granulares

Varios trabajos en los últimos años, han encontrado una serie de respuestas de las células granulares luego de ser tratadas con acetilcolina o agonistas de este neurotransmisor.

Algunos trabajos se concentraron en medir la hidrólisis de fosfoinosítidos luego de estimular neuronas granulares con carbacol. Se observó un incremento de IP₃ en un 600% de su valor basal, lo que trae como consecuencia un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular. Además se ha descrito que una estimulación constante de los receptores induce una respuesta persistente hasta de días en el incremento de este segundo mensajero y por tanto en los niveles de calcio intracelular (Xu & Chuang, 1987; Hynie, et.al., 1989; Simpson, et.al., 1994, Fukamauchi, et.al., 1993; Del Río, et.al., 1994; Gray, et.al., 1995).

En 1991 se demostró la existencia de receptores muscarínicos del tipo M₂ y M₃ en las neuronas granulares de cerebelo de rata (Fukamauchi, et.al., 1991), además de que la actividad de estos receptores se ve modificada por la edad de las neuronas (Alonso, et.al., 1990).

También se ha descrito, que la estimulación de los receptores a acetilcolina induce una movilización Ca²⁺ de la misma poza intracelular que lo hace el glutamato luego de estimular los receptores tipo NMDA y no-NMDA, lo que indica que son procesos que muchas veces están cooperando en un mismo sistema (Irving, et.al. 1992).

Por otro lado, de trabajos relacionados con muerte neuronal, se ha encontrado que la tetrahidroaminoacridina (THA; sustancia antidemencial) provoca una disminución en la muerte programada de estas neuronas (Sunaga,

et.al., 1993). Al mismo tiempo de disminuir la muerte neuronal, induce un aumento en la expresión de receptores muscarínicos, lo cual abre la posibilidad de que este fármaco no tenga un efecto directo en la sobrevivencia, sino que aumente la síntesis de receptores muscarínicos y que a través de éstos se induzca esa respuesta de prevenir o retardar la muerte. Esto se debe, a que a pesar de existir receptores a THA en las neuronas granulares, se sabe que estos aumentan de manera significativa con la edad, pero en momentos críticos en el desarrollo de las neuronas, los receptores muscarínicos se expresan de manera más significativa y realmente son los involucrados en el incremento de la sobrevivencia (Sunaga, et.al., 1993).

Finalmente, trabajos más recientes sobre muerte apoptótica, se señala la participación de los receptores muscarínicos en la prevención de la muerte neuronal. Los receptores involucrados en este efecto sobre la muerte resultaron ser del tipo metabotrópico, ya que la nicotina y agonistas específicos para los receptores ionotrópicos no tuvieron tal efecto (Yan, et.al., 1995).

Estos antecedentes dan una clara idea de que los receptores muscarínicos tienen efectos diversos en etapas tempranas del desarrollo de neuronas granulares. Además, las vías colinérgicas representan una importante fuente de aferencia sobre estas neuronas, a través de las fibras musgosas en los días críticos del desarrollo neuronal.

Considerando los antecedentes previamente revisados, en el presente estudio se plantean los siguientes objetivos, a ser alcanzados en un sistema *in vitro*: las células granulares de cerebelo de rata en cultivo.

3. OBJETIVOS

- Establecer si el desarrollo morfológico de las células granulares de cerebelo de rata en cultivo se modifica por la estimulación con un agonista colinérgico.
- Cuantificar el efecto de estos fármacos sobre la sobrevivencia neuronal en células granulares de cerebelo de rata en cultivo a diferentes edades en respuesta a la estimulación con un agonista colinérgico.
- Determinar el efecto de la estimulación de los receptores de la acetilcolina en la actividad de la glutaminasa activada por fosfato (PAG) y de la aspartato-amino-transferasa (AAT), como indicadores de diferenciación bioquímica en células granulares de cerebelo de rata en cultivo a diferentes edades.

Considerando los antecedentes previamente revisados, en el presente estudio se plantean los siguientes objetivos, a ser alcanzados en un sistema *in vitro*: las células granulares de cerebelo de rata en cultivo.

3. OBJETIVOS

- Establecer si el desarrollo morfológico de las células granulares de cerebelo de rata en cultivo se modifica por la estimulación con un agonista colinérgico.
- Cuantificar el efecto de estos fármacos sobre la sobrevivencia neuronal en células granulares de cerebelo de rata en cultivo a diferentes edades en respuesta a la estimulación con un agonista colinérgico.
- Determinar el efecto de la estimulación de los receptores de la acetilcolina en la actividad de la glutaminasa activada por fosfato (PAG) y de la aspartato-amino-transferasa (AAT), como indicadores de diferenciación bioquímica en células granulares de cerebelo de rata en cultivo a diferentes edades.

4. METODOLOGÍA

En este trabajo se utilizaron técnicas espectrofotométricas para determinar actividad enzimática, viabilidad celular y cuantificación de proteínas, así como radioisotópicas para determinación de actividades enzimáticas.

4.1. Obtención de cultivos primarios neuronales

Se obtuvieron cultivos primarios de neuronas extraídas de cerebelo de rata de la cepa Wistar de 7-8 días posnatales; se siguió la técnica descrita por Patel y Hunt (1985), y Morán y Patel (1989).

La técnica consiste en separar el cerebelo de manera mecánica, después utilizando tripsina al 0.025% se trata el tejido para disociar bien las neuronas. Las células se sembraron a una densidad de 1.5×10^6 cel/ml en platos de cultivo, tratados previamente durante 24 horas con 5 μ g/ml de poli-L-lisina para permitir la adhesión de las neuronas al sustrato. Las células se cultivaron en un medio basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (GIBCO), 2 mM de glutamina, penicilina y estreptomycin 50 U/ml y 50 μ g/ml respectivamente, y KCl 10 mM. A las 24 horas se les adicionó citosina arabinosa (10 μ M) para evitar la proliferación de células no neuronales como astrocitos (Balázs et al., 1988). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de 4.5% de CO₂ y aire saturado de vapor de agua (Morán y Patel, 1989).

4.2. Tratamiento de las neuronas

Las células se trataron con KCl 25 mM, NMDA 150 μ M, MK-801 0.1 μ M de acuerdo con estudios previos en estas neuronas (Morán y Patel, 1989) al 1 DIV.

Se utilizó carbacol como agonista de la acetilcolina, inicialmente se construyó una curva contra concentración y edad celular para determinar las etapas críticas del efecto de esta droga en las neuronas granulares. De esta manera, se trataron las células con concentraciones de 10 mM, 1 mM, 100 μ M, 10 μ M y 1 μ M a diferentes edades que van de los 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10 y 13 DIV (Didier et.al., 1995; Hynie et.al., 1989). En la mayoría de los casos se utilizó de esta droga una concentración de 100 μ M al 1 DIV.

La acetilcolina se usó a una concentración de 1 μ M a diferentes edades. Con base a estudios anteriores, los antagonistas de la acetilcolina utilizados, galamina y atropina se utilizaron a una concentración de 100 μ M, mientras que el 4-DAMP y la tubocurarina 10 μ M, todos al 1 DIV. En todos los experimentos las células control se trataron con el mismo vehículo que los experimentales.

Se prepararon soluciones de KCl 25 mM, atropina 100 μ M, carbacol 100 μ M, MK-801 0.1 μ M, NMDA 150 μ M, tubocurarina 10 μ M y acetilcolina 1 μ M (concentraciones finales en el cultivo) todos de SIGMA; además de la galamina 100 μ M y 4-DAMP 10 μ M de RBI. Las células se mantuvieron en cultivo después de 5 - 13 DIV, entonces se lavaron con buffer de fosfatos (100 mM) a 37°C y se homogenizaron para su uso o bien se congelaron a -20°C para los ensayos de actividad enzimática.

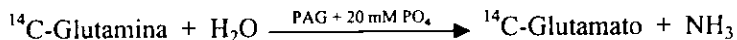
4.3. Evaluación de la actividad enzimática de la PAG

La técnica fue descrita por Kvamme y Olsen en 1980 y modificada por Patel en 1988. Se basa en una técnica radioisotópica y de cromatografía de intercambio iónico (aniónico).

La reacción se inició añadiendo 20 μ l del tejido (las cajas de cultivo de 35 mm se rasparon en 150 μ l de buffer de fosfatos y se sonicaron por 5 segundos) más 80 μ l de la mezcla de ensayo que lleva el sustrato marcado (14 C-Glutamina

0.46 mM), buffer de la mezcla (NaCl 90 mM, KCl 56 mM, D-Mannitol 100 mM, Sacarosa 30 mM, HEPES 4 mM, MgCl₂ más 5 ml de buffer de fosfato de sodio 200 mM a pH 7.4), glutamina 4.5 mM, oligomicina 10 mg/ml y antimicina 0.6 mg/ml. Se incubó por 20 minutos con agitación a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo 1 ml de agua fría, e inmediatamente después se pasó la muestra por una columna de intercambio iónico (Dowex-AG-1-X8, BIORAD). La columna se lavó con agua bidestilada y ácido acético 0.005 M. Finalmente el glutamato ¹⁴C se recuperó con 6 ml de ácido acético 0.5 M. De esta última fracción se tomó 1 ml, se le añadió 10 ml líquido de centelleo y se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

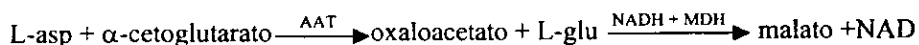
La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Los resultados se expresan como nanomoles por hora por miligramo de proteína (nmol/h/mg prot).

4.4. Evaluación de la actividad enzimática de la AAT

La técnica fue descrita por Lai, et. al. (1989) y consiste en medir la actividad de la AAT por medio de una reacción acoplada en la cual, se utiliza el oxaloacetato producido por la acción de la AAT como sustrato de una nueva reacción enzimática catalizada por la malato deshidrogenasa (MDH), la cual consume NADH (midiendo su desaparición por espectrofotometría) que refleja la actividad de la AAT de una manera indirecta:



Se utilizaron dos soluciones para llevar a cabo la reacción: la solución A contiene NADH (5.7 mg), malato deshidrogenasa (MDH; 17 UI/ml = 54.75 μ l), Tritón X-100 (59.5 μ l), todo disuelto en 35 ml de buffer de HEPES-Tris 90 mM a pH 7.4. La solución B se compone de α -cetoglutarato (49.7 mg), L-asp (92.05 mg), todo disuelto en 3.5 ml de buffer HEPES-Tris 90 mM a pH 7.4.

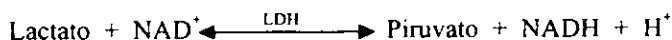
Se colocó en una celda de cuarzo 850 μ l de la solución A y 50 μ l de tejido y se deja que la muestra alcance los 37°C (aproximadamente 2 minutos), después se agrega la solución B (100 μ l) y se lee en el espectro a 340 nm la desaparición de NADH. Los resultados se expresan como unidades de densidad óptica por minuto (UDO/min), y también en micromoles por hora por miligramo de proteína (μ mol/h/mg prot).

4.5. Evaluación de la actividad enzimática de la LDH

Para verificar si el metabolismo celular de las neuronas se modificaba con los tratamientos antes descritos, se evaluó la actividad de una enzima involucrada en dicha fase celular, la deshidrogenasa láctica.

La técnica fue descrita por Bergmeyer et al. (1968) y consiste en proporcionar a la célula un sustrato de la LDH, para que se detecte su actividad por la oxidación del NADH por medio del espectrofotómetro.

Se utilizó un buffer de KH_2PO_4 (0.05 M) a pH 7.5, una solución de piruvato de sodio (20 mM) y NADH (9.4 mM). La reacción es la siguiente:



Se añadió el buffer, la solución de NADH y la muestra del tejido en una celda de cuarzo en el espectrofotómetro dos minutos hasta que la temperatura alcanza los 37°C, inmediatamente después se agregó la solución de piruvato de sodio y se leyó a 340 nm por espacio de 5 minutos. La actividad se expresa como micromoles por hora por miligramo de proteína ($\mu\text{mol/h/mg prot}$).

4.6. Evaluación de la sobrevivencia neuronal por el método MTT

La evaluación de la sobrevivencia de las neuronas en cultivo, se basa en una técnica colorimétrica descrita por Mossman (1983) que mide la transformación de MTT {3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolio}. Esta técnica consiste en medir la viabilidad neuronal, evaluando la actividad de la cadena respiratoria de las mitocondrias de las células. El MTT se incorpora a las células (mitocondrias) y allí se reduce y se transforma en un producto colorido e insoluble de color azul, llamado azul de formazán. Para el ensayo se utilizaron multicajas de 24 pozos. A cada pozo se le agregó 50 μl de la solución MTT y se incubaron a 37°C en una atmósfera saturada de vapor de agua y CO_2 por espacio de 50 minutos a 1 hora. Pasado este tiempo, se aspiró el medio y se agregó 1 ml de isopropanol ácido (stock hecho con HCl -0.93 ml- aforado a 500 ml con 2-propanol o isopropanol). Esta muestra, que toma un color azul, se lee en el espectrofotómetro a 570 nm restándole la lectura de fondo a 630 nm. Los resultados se expresan como valores relativos al control.

Es importante aclarar que ninguna de las drogas que se utilizaron para estimular las neuronas es capaz de reducir al MTT, por lo tanto no interfiere en las lecturas de absorbancia obtenidas.

4.7. Cuantificación de proteína por el método Bradford

La cuantificación de proteína de las muestras de los cultivos neuronales se llevó a cabo mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976 y Spector, 1978), utilizando una curva estándar de albúmina bovina.

Las células se rasparon con buffer de imidazol 10 mM frío y se sonicaron por un periodo de 5 segundos para homogenizar el tejido; se agrega la muestra del tejido y el colorante. La lectura en el espectrofotómetro es a 595 nm. Los resultados se expresan en miligramos de proteína por mililitro de tejido homogenizado (prot. mg/ml).

4.8. Evaluación morfológica

Los cultivos de las neuronas granulares se evaluaron morfológicamente de acuerdo a varios parámetros que indican el estado de la célula. De esta forma, se analizó el número relativo de células, sus somas, el grado de turgencia y tamaño de los mismos, las neuritas (grosor, empaquetamiento o adhesión con otras neuritas vecinas) y el grado de acumulación de las neuronas. Esta evaluación se realizó en cada uno de los cultivos utilizados para medir la sobrevivencia y las actividades enzimáticas; la observación se realizó solamente por una persona por microscopía de contraste de fases y justo antes de cada experimento.

4.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la aplicación de una análisis de varianza de diseño aleatorio con experimentos completamente independientes (ANOVA) con una $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

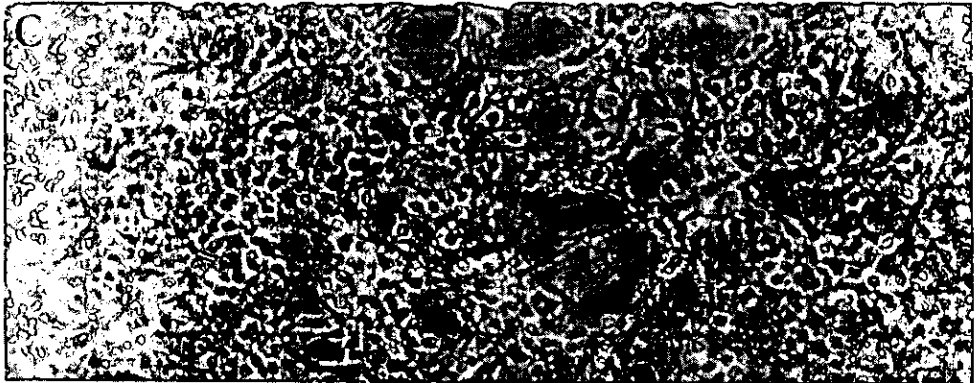
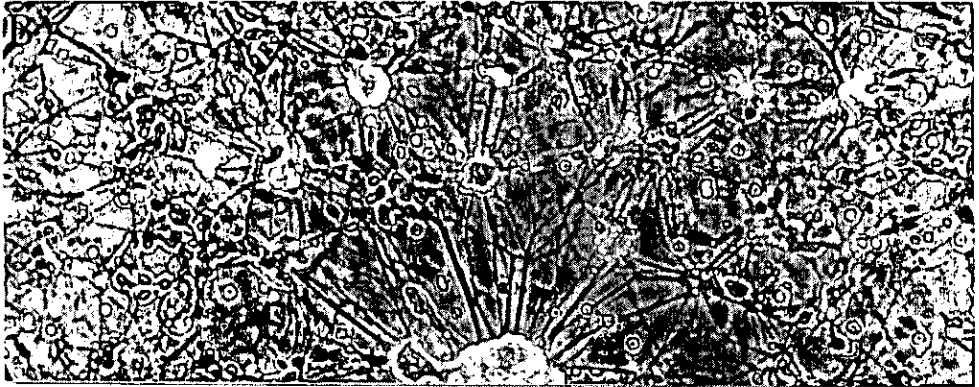
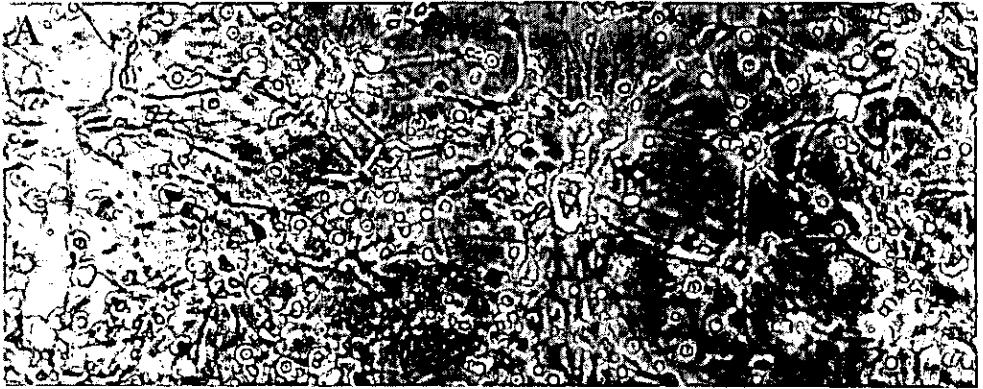
5.1. Morfología

La morfología de las células se revisó por microscopía de contraste de fases a diferentes edades, y se evaluaron varias características para su evaluación.

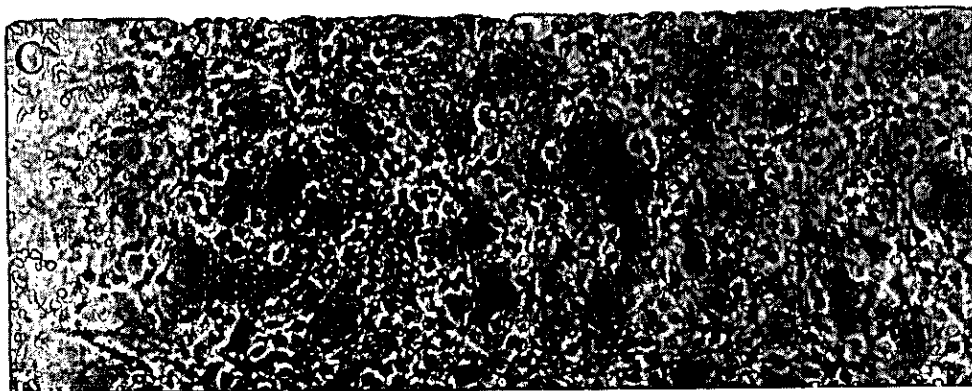
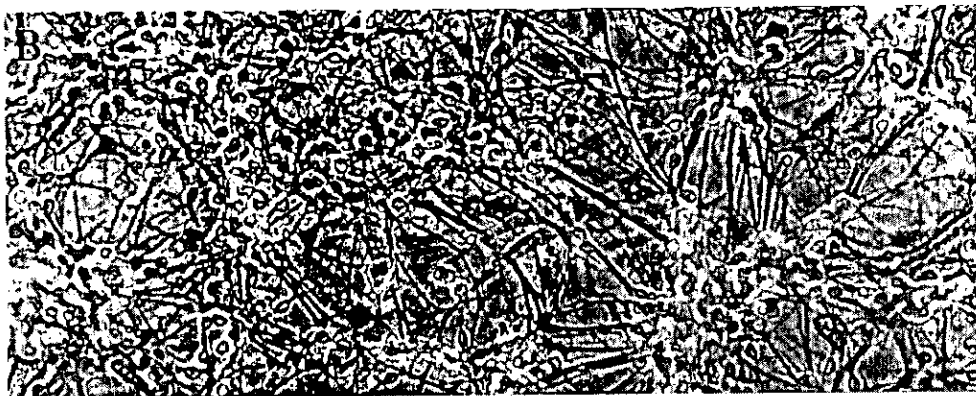
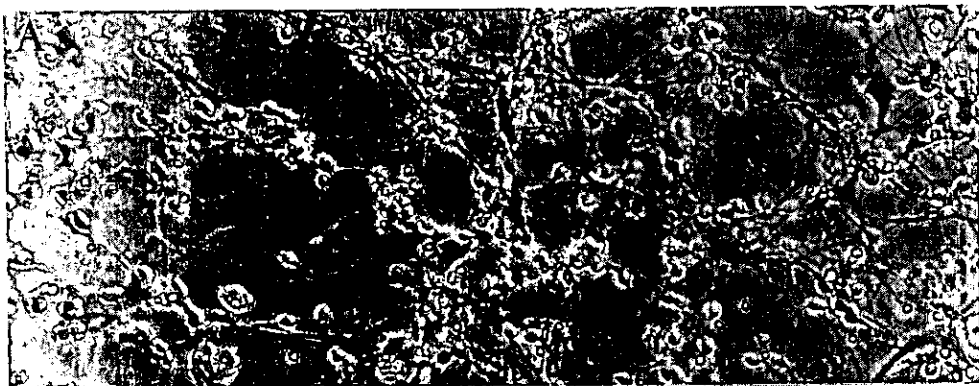
Las células control, luego de 5 días en incubación presentan somas turgentes y cúmulos de neuronas, además sus procesos son evidentes, y hay una tendencia a agruparse (fotografía 1A). A los 8 días las células están menos turgentes, sus procesos son más delgados, los cúmulos están integrados por menos células y son menos frecuentes (fotografía 2A). A los 10 DIV las células están muertas en su mayoría, y las que sobreviven son pequeñas y sus procesos son delgados (fotografía 3A).

Con respecto a las células tratadas con potasio, a los 5 días presentan algunos cambios con respecto al control (fotografía 1C), hay más neuronas, están agrupadas y sus procesos son gruesos. A los 8 y 10 DIV los somas son muy grandes y turgentes, los procesos son gruesos y con un alto grado de agrupación, además los cúmulos están formados por un gran número de neuronas (fotografías 2C y 3C). El número de células es mucho mayor con respecto a los cultivos control a la misma edad.

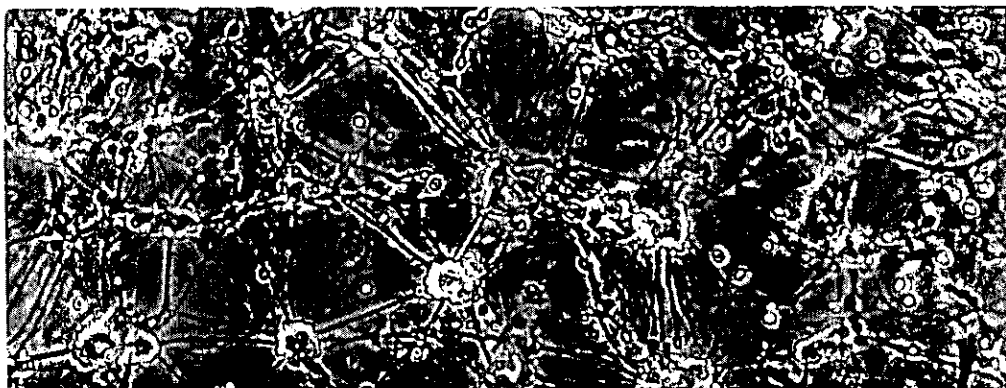
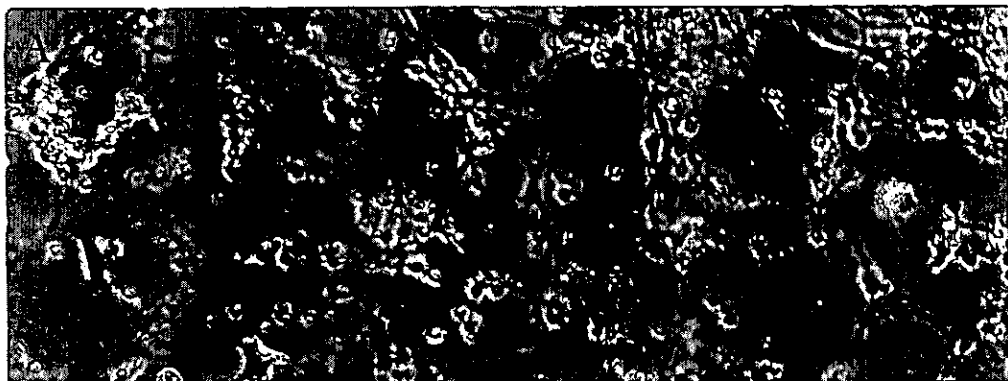
Las neuronas tratadas con carbacol a los 5 DIV no muestran diferencias importantes con respecto al control (fotografía 1B), sin embargo, a los 8 DIV se observan diferencias importantes relacionadas al número de células y al grosor de los procesos (fotografía 2B). A los 10 DIV han degenerado pero en menor proporción que las células control (fotografía 3B).



Fotografía 1. *A*, células control. *B*, células tratadas con carbacol 100 μM a 1 DIV. *C*, células tratadas con KCl 25 mM a 1 DIV. Fotografiadas a los 5 DIV.



Fotografía 2. *A*, células control. *B*, células tratadas con carbacol 100 μ M a 1 DIV. *C*, células tratadas con KCl 25 mM a 1 DIV. Fotografiadas a los 8 DIV.



Fotografía 3. *A*, células control. *B*, células tratadas con carbacol 100 μM a 1 DIV. *C*, células tratadas con KCl 25 mM a 1 DIV. Fotografiadas a los 10 DIV.

5.2. Sobrevivencia neuronal

En este estudio los resultados de los experimentos de sobrevivencia neuronal demuestran que la despolarización crónica por potasio induce un incremento en la sobrevivencia de células granulares de cerebelo (CGC), como se ha probado en otros trabajos. Este efecto se ve claramente a partir de los 5 DIV, el cual se prolonga hasta los 14 DIV (Morán, et.al., 1989; Balázs, et.al., 1988).

Para determinar el efecto del carbacol en los cultivos de células granulares de cerebelo de rata en cultivo, se realizaron experimentos de viabilidad con diferentes concentraciones de carbacol, así como a diferentes edades de tratamiento. De estos experimentos se desprende que las CGC respondían incrementando la sobrevivencia a los 8 DIV con un tratamiento de carbacol de 100 μM al 1 DIV (gráfica 3). El efecto del carbacol en la sobrevivencia de las células granulares en cultivo no parece ser tan potente como el inducido por potasio. Este efecto del carbacol se hace más evidente a los 8 DIV, lo que difiere al inducido por el KCl el cual incrementa la sobrevivencia a partir de los 5 DIV (gráfica 2).

En la gráfica 1 se muestra el resultado de células de 3 DIV de edad tratadas con potasio y carbacol. Ninguno de los tratamientos anteriores tiene efecto en la sobrevivencia de las neuronas con respecto al control.

Cuando las células se trataron al 1 DIV con carbacol y potasio, se midió la sobrevivencia con MTT a los 5 DIV resultando que el tratamiento con potasio induce un incremento en la sobrevivencia neuronal de un 80%, mientras que el carbacol no tiene efecto (gráfica 2). Sin embargo, las células tratadas con carbacol, a los 8 DIV produce un incremento en la sobrevivencia celular de un 60% (gráfica 3).

El efecto observado con el carbacol desaparece cuando se mide la sobrevivencia neuronal a los 10 DIV, cuando el potasio induce una sobrevivencia

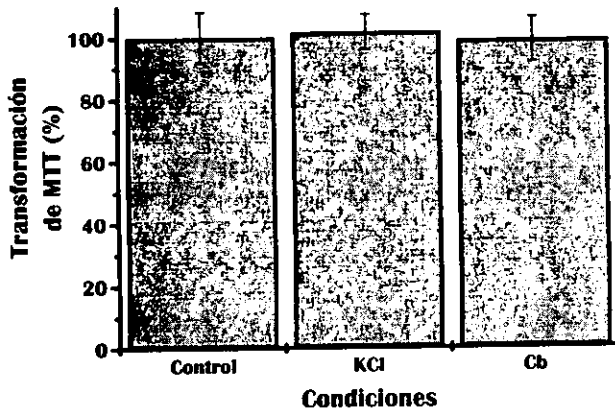
del 150% en relación al control (gráfica 4). Sin embargo es importante mencionar que la morfología de las neuronas a esta edad en el cultivo sí difiere del control (fotografías 3A y 3B).

En la gráfica 5 se resumen los resultados de la medida de sobrevivencia celular en cultivos de 8 DIV de edad con diferentes tratamientos. Se observa que el KCl y el carbacol incrementan la sobrevivencia de las neuronas en cultivo en un 150 y 50% respectivamente. El efecto del carbacol no se modificó en presencia de un antagonista selectivo para los receptores tipo NMDA (gráfica 5), lo cual elimina la posibilidad de que los receptores de NMDA estén involucrados en la respuesta sobre la sobrevivencia inducida por carbacol.

La gráfica 6 muestra el efecto de antagonistas muscarínicos y nicotínicos en la sobrevivencia inducida por carbacol. El antagonista nicotínico tubocurarina no modificó el efecto el carbacol, mientras que la atropina y el 4-DAMP inhibieron tal efecto. La galamina que actúa sobre los receptores tipo M_2 no modificó el efecto inducido por carbacol, lo que sugiere que los posibles receptores involucrados en esta respuesta son del tipo M_3 .

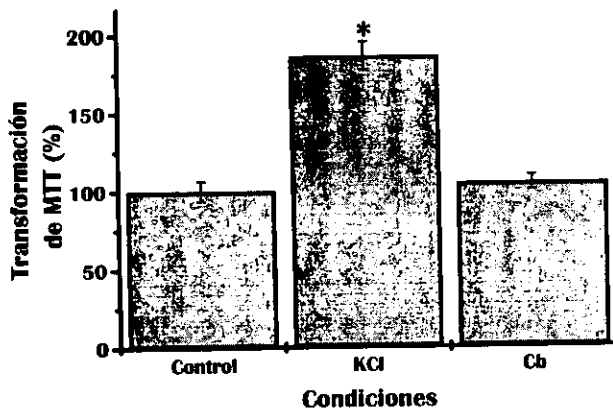
Para verificar que un estímulo continuo de los receptores colinérgicos es necesario para inducir la respuesta de sobrevivencia, se trataron células con acetilcolina a diferentes tiempos, resultando en un aumento de la sobrevivencia en aquellas que fueron tratadas periódicamente, en comparación con las que sólo recibieron el estímulo una o dos veces (gráfica 7).

SOBREVIVENCIA CELULAR EN NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO



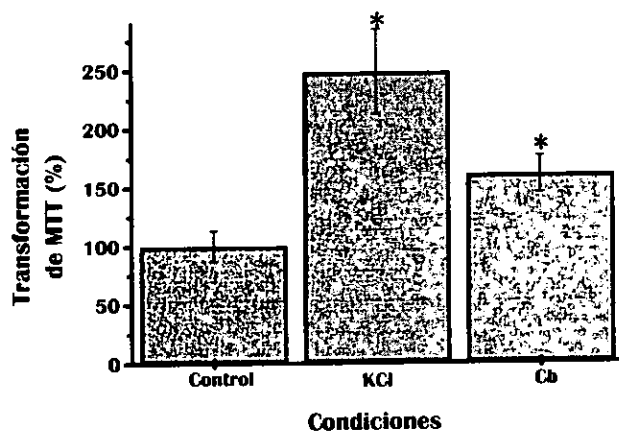
Gráfica 1. Células tratadas con KCl 25 mM y carbacol (Cb) 100 μ M a 1 DIV. Se evaluó la sobrevivencia a los 3 DIV. ANOVA, n=6.

SOBREVIVENCIA CELULAR EN NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO



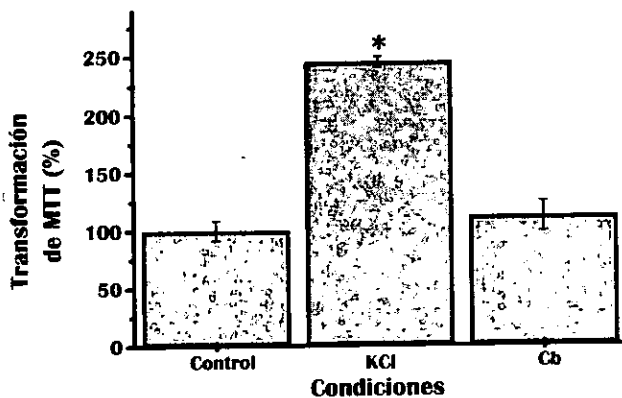
Gráfica 2. Células tratadas con KCl 25 mM y carbacol (Cb) 100 μ M a 1 DIV. Se evaluó la sobrevivencia a los 5 DIV. ANOVA, n=6. (*) es diferencia significativa con respecto al control.

SOBREVIVENCIA CELULAR EN NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO



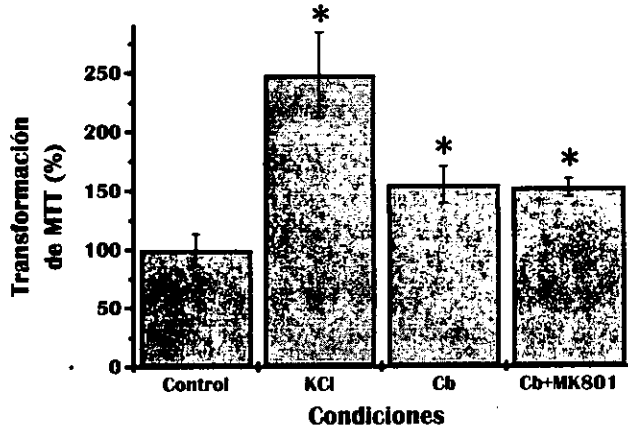
Gráfica 3. Células tratadas con KCl 25 mM y carbacol (Cb) 100 μ M a 1 DIV. Se evaluó la sobrevivencia a los 8 DIV. ANOVA, n=6. (*) es diferencia significativa con respecto al control.

SOBREVIVENCIA CELULAR EN NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO



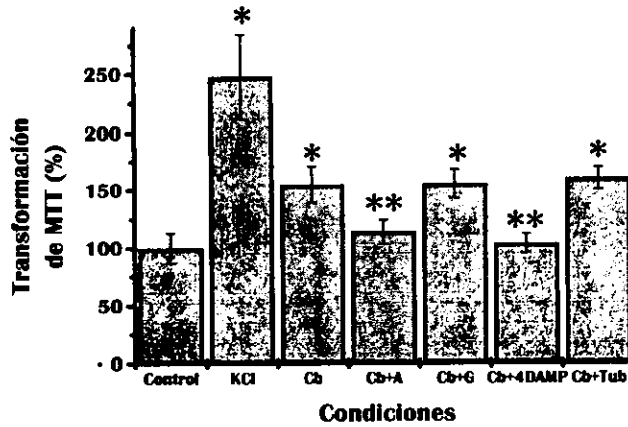
Gráfica 4. Células tratadas con KCl 25 mM y carbacol (Cb) 100 μ M a 1 DIV. Se evaluó la sobrevivencia a los 10 DIV. ANOVA, n=6. (*) es diferencia significativa con respecto al control.

SOBREVIVENCIA CELULAR EN NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO



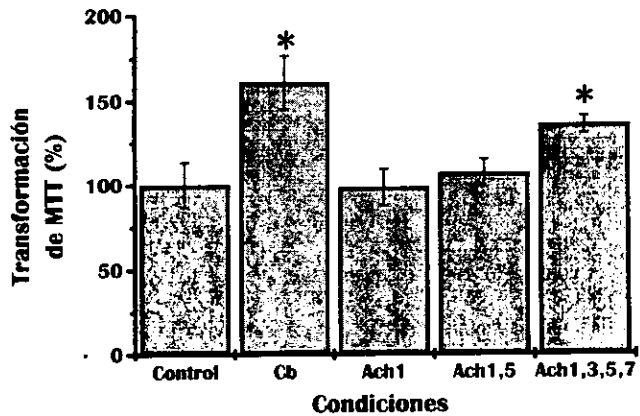
Gráfica 5. Células tratadas con KCl 25 mM, carbacol (Cb) 100 μ M y MK-801 0.1 μ M a 1 DIV. Se evaluó la sobrevivencia a los 8 DIV. ANOVA, n=6-8. (*) es diferencia significativa con respecto al control.

SOBREVIVENCIA CELULAR EN NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO



Gráfica 6. Células tratadas con KCl 25 mM, carbacol (Cb) 100 μ M, Galamina, Atropina 100 μ M, 4-DAMP 10 μ M y Tubocurarina 10 μ M a 1 DIV. Se evaluó la sobrevivencia a los 8 DIV. ANOVA, n=6-10. (*) es diferencia significativa con respecto al control y (**) es diferencia significativa con respecto al carbacol.

SOBREVIVENCIA CELULAR EN NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO



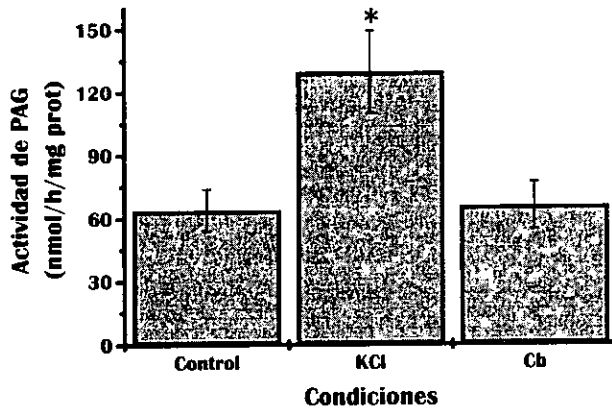
Gráfica 7. Células tratadas con KCl 25 mM, carbacol (Cb) 100 μ M a 1 DIV, Acetilcolina 1 μ M a 1,3,5,7 DIV, como se indica en la gráfica al pie de las condiciones. Se evaluó la sobrevivencia a los 8 DIV. ANOVA, n=6-9. (*) es diferencia significativa con respecto al control.

5.3. Actividad de la PAG

Esta enzima, como ya se mencionó, sirve como un marcador de diferenciación en células granulares en cultivo. Cuando estas neuronas se tratan con KCl o NMDA se induce una activación significativa en la PAG, proceso asociado a la diferenciación neuronal (Balázs et.al., 1988; & Morán et.al. 1992; Patel et.al. 1990).

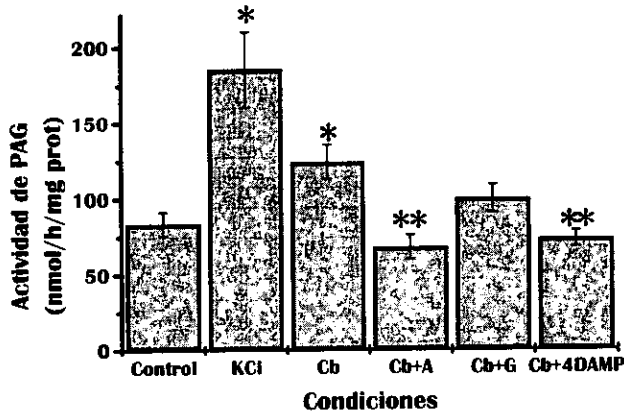
En este estudio, las células se trataron con carbacol 100 μ M a 1 DIV y se evaluó la actividad de la enzima a dos diferentes edades. La gráfica 8 muestra que células de 5 DIV tratadas con KCl incrementan la actividad de la PAG en un 100% con respecto al control, mientras que el carbacol no mostró ningún efecto (gráfica 8). Sin embargo en células de 8 DIV tratadas con carbacol se induce un incremento en la actividad de la PAG de un 40% con respecto al control (gráfica 9). Las células tratadas con carbacol y atropina o 4-DAMP mostraron una reducción significativa en la actividad de la enzima con respecto al carbacol solo, mientras que la galamina sólo redujo marginalmente de forma no significativa el efecto del carbacol (gráfica 9).

ACTIVIDAD DE LA PAG EN NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO



Gráfica 8. Células tratadas con KCl 25 mM a y carbacol (Cb) 100 μ M a 1 DIV. La evaluación de la PAG se realizó a los 5 DIV. ANOVA, n=7-11. (*) es diferencia significativa con respecto al control.

ACTIVIDAD DE LA PAG EN NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO



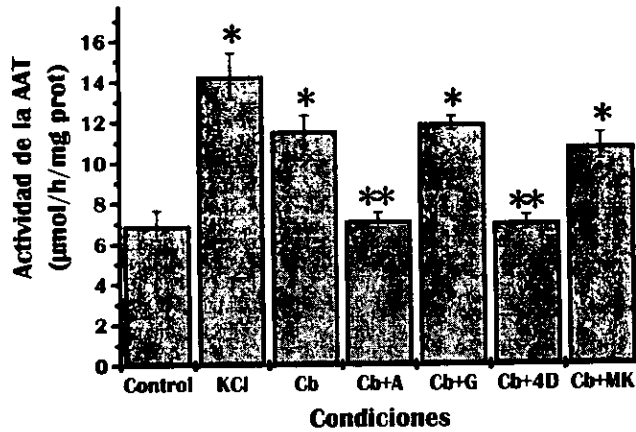
Gráfica 9. Tratamiento de neuronas con KC 25 mM, carbacol (Cb) 100 μ M, Atropina y Galamina 100 μ M y 4-DAMP 10 μ M a 1 DIV. La evaluación de la PAG se hizo a los 8 DIV. ANOVA, n=8-12. (*) es diferencia significativa con respecto al control y (**) es diferencia significativa con respecto al carbacol.

5.4. Actividad de la AAT

Al igual que la PAG, la AAT es otra enzima que se encarga de sintetizar L-glutamato como neurotransmisor, por lo que también se utiliza para determinar el grado de diferenciación en neuronas granulares en cultivo (Morán et.al., 1992). De manera semejante a los experimentos para la PAG, se trataron las células con diferentes drogas, y se midió la actividad de la AAT a los 8 DIV.

En la gráfica 10 se muestran los resultados de células tratadas con KCl 25 mM, carbacol 100 μ M, atropina y galamina 100 μ M y 4-DAMP 10 μ M a 1 DIV. Las células tratadas con potasio inducen un incremento del 100% en la actividad de la AAT con respecto al control. El carbacol indujo un incremento del 70% en la actividad de esta enzima. Las células tratadas con atropina o 4-DAMP, mostraron una disminución significativa en la actividad de la enzima inducida por carbacol, similar a los niveles de las células control, mientras la galamina no modifica este efecto (gráfica 10). El MK-801 tampoco altera la respuesta inducida por el carbacol.

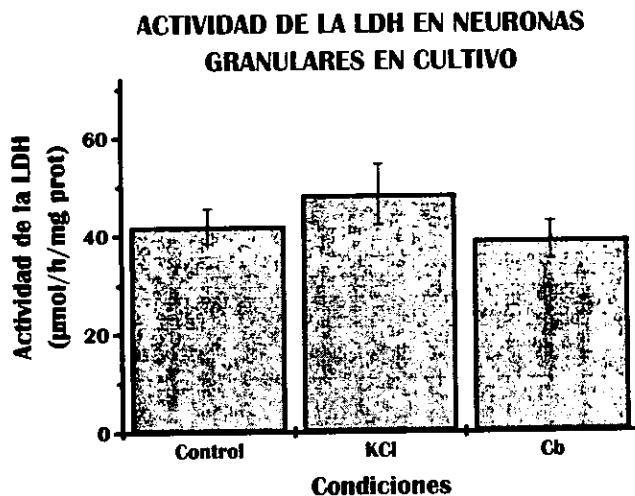
ACTIVIDAD DE LA AAT EN NEURONAS GRANULARES EN CULTIVO



Gráfica 10. Tratamientos con KCl 25 mM carbacol (Cb) 100 µM a 1 DIV, Atropina y Galamina 100 µM, 4-DAMP 10 µM y MK-801 0.1 µM a 1 DIV. La evaluación de la AAT se hizo a los 8 DIV. ANOVA, n=8-11. (*) es diferencia significativa con respecto al control y (**) es diferencia significativa con respecto al carbacol.

5.5. Actividad de la LDH

Para saber si el efecto producido por el carbacol en el aumento en la actividad de PAG y AAT era específico, se realizaron experimentos midiendo la actividad de una enzima involucrada en el metabolismo general de la célula, la deshidrogenasa láctica (LDH). Los resultados de la gráfica 11 muestra que esta enzima no se modifica en células tratadas con carbacol, lo que indica que el efecto generado por este agonista colinérgico es específico para dichos eventos involucrados en la diferenciación (síntesis del L-glutamato como neurotransmisor) y la supervivencia neuronal.



Gráfica 11. Células de 8 DIV de edad. Se trataron con KCl 25 mM y carbacol (Cb) 100 µM al 1 DIV y se midió la actividad de la LDH. Los resultados no muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio sugieren que el carbacol tiene un efecto trófico durante una etapa particular del desarrollo de las neuronas granulares en cultivo. Como ocurre en neuronas tratadas con NMDA y potasio (Morán, et.al., 1989; Balázs, et.al., 1987, 1988 y 1992), las neuronas tratadas con carbacol muestran cambios significativos en su morfología, como la formación de agregados, la agrupación de los procesos, turgencia de los somas, la cantidad de neuronas relativas en el plato de cultivo, etc. Sin embargo, a diferencia del potasio y el NMDA, los efectos inducidos por el carbacol ocurren durante un período de tiempo distinto, esto es, desde los 7 hasta los 10 DIV. El máximo efecto del carbacol sobre las neuronas se observa al 8 DIV. A los 10 DIV, se observa una degeneración neuronal global: las células disminuyen en número, los procesos son cortos y delgados y los somas van perdiendo turgencia. En cuanto a las células tratadas con potasio, éstas mantienen las características morfológicas durante tiempos más largos (i.e. 1-11 DIV), que cubre el total del periodo observado.

Además, la respuesta que induce el carbacol en la sobrevivencia neuronal también ocurre en los días críticos del desarrollo de las neuronas, esto es, a los 8 DIV, cuando se observa el pico máximo en los niveles de la sobrevivencia celular. Este periodo es posterior al encontrado en el mismo modelo pero estimulando los receptores tipo NMDA (Morán, et.al., 1989; Balázs, et.al., 1987, 1988 y 1992; Gallo, et.al., 1987), en donde el incremento en la sobrevivencia de las neuronas granulares en cultivo es evidente entre los 5-7 DIV.

Los resultados obtenidos, coinciden con el trabajo de Yan (1995), quien demostró que las neuronas granulares en cultivo pueden ser rescatadas de la muerte programada luego de estimularlas con un agonista colinérgico por un espacio de 5 a 10 DIV. Dicho protocolo indica, que en células crecidas en

condiciones despolarizantes (KCl 15 mM y 25 mM) la muerte neuronal sobreviene entre los días 8 y 11 en cultivo. Si estas neuronas se estimulan por un espacio de 5 a 10 DIV con carbacol (100 μ M - 1 mM), se induce un incremento en la sobrevivencia celular de hasta un 50%. Las diferencias entre los resultados de Yan y los nuestros, es que ellos evalúan la sobrevivencia en neuronas crecidas en alto potasio, además que lo hacen en tiempos más largos (de 8 a 11 DIV).

Es muy claro que el carbacol, que tiene una vida media mayor que la Ach (hasta por más de 7 días en el cultivo) , induce una respuesta en el incremento de la sobrevivencia en estas neuronas (Fukamauchi, et.al., 1991 y 1993). Los experimentos realizados en este trabajo utilizando Ach demuestran que los receptores colinérgicos necesitan una estimulación constante durante un cierto período de tiempo para tener efecto en la sobrevivencia neuronal. Esto se debe a que en experimentos donde se dan pocos pulsos de Ach, ésta es degradada muy rápido por la AchE, la cual es abundante en células neuronales y gliales, lo que impide que el estímulo sea suficiente para inducir la respuesta de la sobrevivencia celular. En el animal, esto puede ser mucho más claro si se piensa que la fuente de Ach en este circuito cerebelar proviene de las fibras musgosas, las cuales tienen una identidad mayoritariamente colinérgica y que el aporte de este neurotransmisor es constante en las etapas críticas del desarrollo del organismo. El establecimiento de dicha vía se lleva a cabo en un periodo de tiempo desde la primer semana hasta la tercera, alrededor del día 21 luego del nacimiento (Ito, 1984), lo que coincide muy bien con los tiempos en los que se experimentan con las neuronas en el laboratorio. Al mismo tiempo que estas conexiones se establecen, se llevan a cabo procesos de desarrollo intrínsecos a las neuronas, tales como la muerte neuronal, la migración y por supuesto la diferenciación. A estas alturas del desarrollo, las fibras musgosas desarrollan sinápsis con las dendritas de las neuronas granulares, aportando tanto glutamato como acetilcolina. La

diferencia en las respuestas en la sobrevivencia neuronal en cultivo con tratamientos con NMDA y carbacol puede extrapolarse a niveles *in vivo*. En nuestros estudios *in vitro* observamos que primeramente hay una respuesta de las neuronas estimuladas con NMDA y una más tardía en respuesta al carbacol. Esta secuencia en las respuestas a diferentes tiempos por distintos estímulos puede proveer a las neuronas de señales que les permitan llevar a cabo procesos del desarrollo. Fisiológicamente no se ha discriminado hasta ahora si la población de fibras musgosas colinérgicas o glutamatérgicas innervan a diferentes tiempos las dendritas de las células granulares. Existen varias posibilidades para interpretar la acción del L-glu y la Ach *in vivo*. Se puede proponer la existencia de dos poblaciones neuronales (innervadas y no innervadas por las fibras musgosas) que responden de manera diferencial a distintos estímulos (glu y Ach) sobreviviendo o no. Éstas que sobrevivieron, pueden recibir fibras de una identidad específica, que innervan primero a las células granulares y que las provee de un estímulo inicial posiblemente glutamatérgico, que les asegurará responder a los siguientes estímulos a mediano y largo plazo durante su desarrollo y que podría ser de naturaleza colinérgica.

En los experimentos donde se trataron las neuronas con carbacol y tubocurarina (antagonista selectivo para los receptores tipo n_1), no se modificó el efecto inducido por el carbacol solo, lo que indica que la respuesta está mediada por los receptores muscarínicos. Este efecto en el incremento del 50% en la sobrevivencia inducido por el carbacol parece estar modulado por receptores muscarínicos del tipo M_3 , ya que cuando las neuronas se trataron con antagonistas generales para los receptores muscarínicos (atropina) y con el antagonista selectivo para los receptores tipo M_3 (4-DAMP) se abate dicho efecto, mientras que el antagonista selectivo para los receptores tipo M_2 (Galamina) no modifica dicha respuesta. El hecho de comparar ambos receptores muscarínicos, es porque

Gray (1995) y Fukamauchi (1993) demostraron que las neuronas granulares de cerebelo en las primeras semanas luego del nacimiento, solamente expresan receptores nicotínicos tipo n_1 y muscarínicos M_2 y M_3 . Esto indica que cuando el receptor (M_3) es estimulado, el sistema de transducción resulta en el incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular via IP_3 . Este sistema tiene una semejanza con el efecto inducido por la estimulación con NMDA, el cual incrementa también el calcio intracelular, por un aumento en el paso del catión desde el espacio extracelular a través del canal acoplado al receptor. Esto sugiere que el Ca^{2+} puede ser pieza importante en esta señal que previene la muerte programada en este tipo de neuronas.

Con respecto al incremento en los niveles de la actividad de la PAG y AAT (resultando en la síntesis de L-glu como neurotransmisor) el carbacol induce un efecto muy semejante al que se observa con la estimulación con NMDA, como lo han demostrado Morán (1992) y Balász (1992), el cual produce un incremento en la actividad de ambas enzimas en un 60% de la PAG y un 50% de la AAT ; aunque al igual que en el caso de la sobrevivencia, éste se presenta a un plazo más largo. El resultado en el aumento de la actividad de ambas enzimas por la estimulación con carbacol, que induce un incremento del 50% en la PAG y el 70% en la AAT, refleja que estas neuronas responden activamente en su proceso de diferenciación bioquímica por la estimulación de los receptores muscarínicos. Estos datos reflejan una coincidencia en tiempo con respecto al aumento de las actividades enzimáticas y la sobrevivencia celular, lo que indica que la estimulación de los receptores colinérgicos induce tanto un incremento en la sobrevivencia así como en la diferenciación, procesos que posiblemente sean paralelos.

Al igual que en el caso de la sobrevivencia, el factor común en la diferenciación es el Ca^{2+} intracelular, ya que en estudios anteriores se ha

demostrado que el incremento de este catión por la estimulación con agonistas colinérgicos induce respuestas en la sobrevivencia neuronal (Fukamauchi et.al., 1991). Hay antecedentes que el incremento del calcio intracelular induce la diferenciación en diferentes tipos neuronales, tal es el caso de las mismas granulares cuando se tratan con NMDA (Morán, et.al., 1989), también en el caso de las células de la retina, cuando se estimulan los receptores colinérgicos tipo M_1 (Salceda, 1994). Por otro lado, es importante mencionar también el trabajo de Wong (1995), en el que demuestra cómo los cambios en las concentraciones de calcio intracelular inducidas por la liberación del catión del retículo endoplásmico, se deben a la estimulación de los receptores muscarínicos en la retina, que sumándose a las evidencias ya mencionadas, apoyan la participación de este tipo de receptores en la diferenciación bioquímica de algunas células.

En ambos modelos experimentales (estimulación con NMDA y carbacol en células granulares en cultivo), hay semejanzas en los mecanismos que inducen un incremento en la sobrevivencia y diferenciación neuronal, por ejemplo, el NMDA promueve la sobrevivencia y diferenciación de estas neuronas, y este proceso está mediado por un receptor acoplado a un canal iónico permeable al Ca^{2+} , mientras que el efecto resultante por la estimulación con carbacol esta mediado por un receptor acoplado a una proteína G, la cual produce segundos mensajeros por la hidrólisis del PIP_2 , y finalmente el IP_3 libera calcio de una poza intracelular. Por otro lado, coincidiendo los trabajos de Gray (1995) y Fukamauchi (1991), se encontró que un estímulo continuo de los receptores colinérgicos induce un incremento máximo en los niveles de calcio intracelular por acción de la unión de IP_3 en el retículo endoplásmico.

En resumen, en este trabajo demostramos el incremento de la actividad de las enzimas PAG y AAT por la estimulación de las células granulares con carbacol, y bloqueadas con atropina y 4-DAMP. Con relación a la actividad de

PAG, la galamina demuestra una tendencia a disminuir la respuesta inducida por el carbacol, y aunque estadísticamente no hay diferencia entre el efecto de las células control y el efecto del tratamiento de carbacol y galamina, es claro también, que los efectos de este último tratamiento se encuentran cerca a los valores controles; aquí es importante mencionar que la galamina es un antagonista de los receptores M_2 , y se sabe que también es capaz de unirse al receptor tipo M_3 aunque con una menor afinidad, así que esta diferencia entre los tratamientos tal vez se deba a una interacción de la galamina con los receptores M_3 .

Finalmente, los resultados de la actividad enzimática LDH, demuestran que las anteriores respuestas en la modificación de los índices de sobrevivencia y diferenciación son específicas, ya que la LDH, una enzima que está involucrada en el metabolismo general de la célula, no modifica su actividad.

7. CONCLUSIONES

Todas las evidencias presentadas en este trabajo aportan las siguientes conclusiones:

- La morfología y sobrevivencia de las células granulares en cultivo se modifica con el tratamiento con carbacol, induciendo su desarrollo en tiempos más cortos.
- De la misma forma, este estímulo propicia que estas células alcancen más rápido su madurez, es decir, su diferenciación bioquímica.
- Los efectos inducidos por la estimulación con carbacol en los procesos de sobrevivencia y la diferenciación de neuronas granulares en cultivo durante su desarrollo, parecen estar mediados por receptores colinérgicos muscarínicos tipo M_3 y se observan en una etapa crítica durante el desarrollo.
- La secuencia en la respuesta a diferentes estímulos (NMDA y carbacol) puede sugerir procesos de sobrevivencia y diferenciación semejantes a diferentes tiempos en el desarrollo *in vivo* del organismo (glutamato y acetilcolina).
- Un factor común en estas respuestas en el desarrollo de las neuronas es el incremento de la concentración de calcio intracelular, que parece ser una señal fundamental en la célula para iniciar los procesos que llevan a la sobrevivencia y diferenciación celular.

8. ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| AAT | Aspartato Aminotransferasa |
| AC | Adenilato ciclasa |
| Ach | Acetilcolina |
| AchE | Acetilcolinesterasa |
| AcCoA | Acetil coenzima A |
| AMPc | Monofosfato de adenosina cíclico |
| L-asp (Asp) | Ácido aspártico |
| Ca ²⁺ | Calcio (catión divalente) |
| CAT (ChAT) | Colín acetiltransferasa |
| Cb | Carbacol |
| CGC | Células granulares de cerebelo |
| Ch ⁺ | Colina |
| Cit | Citrato |
| CL | Citrato liasa |
| 4-DAMP | 4-difenilacetoxo-N-metilpiperidina metiodado |
| DNA (ADN) | Ácido desoxiribonucleico |
| DIV | Días <i>in vitro</i> |
| DAG | Diacilglicerol |
| L-glu (Glu) | Ácido glutámico |
| Gal | Galamina |
| GLDH | Glutamato deshidrogenasa |
| Gln | Glutamina |
| GTP | Trifosfato de guanidina |
| IP ₃ | Trifosfato de inositol |
| KCl | Cloruro de Potasio |

| | |
|-----------------|---|
| LDH | Deshidrogenasa láctica |
| MDH | Malato deshidrogenasa |
| mM | Milimolar |
| μM | Micromolar |
| MK-801 | (5)-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzol(a,b)cilcohepten-5,10- iminomaleato |
| MTT | 3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolio |
| NADH^+ | Dinucleótido de nicotín amida reducido |
| NMDA | Ácido N-metil-D-aspartato |
| Na^+ | Sodio (catión monovalente) |
| OxAc | Oxaloacetato |
| PAG | Glutaminasa activada por fosfato |
| PIP_2 | Fosfatidil inositol bifosfato |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PLD | Fosfolipasa D |
| PKC | Proteína cinasa C |
| Pyr | Piruvato |
| RNA (ARN) | Ácido ribonucléico |

9. REFERENCIAS

- Alavez, S., L. Gutierrez-Kobeh & J. Morán. *Characterization of the Activation of Glutaminase Induced by N-Methyl-D-Aspartate and Potassium en Cerebellar Granule Cells*. Journal of Neuroscience Research. 54:637-646. 1996.
- Alonso R., M. Didier & P. Soubrie. *[³H]N-Methylscopolamine binding studies reveal M₂ and M₃ muscarinic receptor subtypes on cerebellar granule cells in primary culture*. Journal of Neurochemistry, 55, 1:334-337, 1990.
- Balázs, R.N. & O.S. Jorgensen. *Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells*. Neuroscience Letters, 87:80-86, 1988.
- Balázs, R. Gallo V., Kingsbury A Thangnipon W., Smith R. Atterwill C. & Woodhams P. *factors affecting the survival and maturation of nerve cells in cultures*. Glial-Neuronal Communication in Development and Regeneration. Berlin. 285-302. 1987.
- Balázs, R.N., Gallo V. & Kingsbury A. *Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in cultured*. Development Brain Research. 40:269-279, 1988.
- Balázs, R.N., O.S. Jorgensen, & Hack N. *N-Methyl-D-Aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture*. Neuroscience. 27:437-451, 1988.

- Balázs, R.N., Resink, A., Hack N., Aronica E. & Van der Valk JBF. *Trophic effect of excitatory amino acids on differentiating granule cells: involvement of calcium and other second messengers*. *Molecular Neuropharmacology*. 2:203-206. 1992.
- Bergmeyer, H.U., Bernt E. & Hess B. *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York. 736-741. 1968
- Bradford, M. *Biochemistry*, 72:248. 1976
- Cohen-Cory S., Dreyfus C.F. & Black I.B. *Expression of high-low-affinity nerve growth factor receptors by Purkinje cells in the developing rat cerebellum*. *Exp. Neurol*. 105:104-109. 1989.
- Cohen-Cory S., Dreyfus C.F. & Black I.B. *NGF and excitatory neurotransmitters regulate survival and morphogenesis of cultured cerebellar Purkinje cells*. *Journal Neuroscience*. 11:462-471. 1991.
- Collins, F., Schmidt M.F., Guthrie P.B. & Kater S.B. *Sustained increase in intracellular calcium promotes neuronal survival*. *J. Neurosci*. 11:2582-28-587. 1991.
- Cooper, R.J. *Unsolved problems in the cholinergic nervous system*. *Journal of Neurochemistry*, 63, 2:395-399. 1994.
- Courtney, M.J. Lambert J.J. & Nicholls D.G. *The interaction between plasma membrane depolarisation and glutamate receptor activation in the regulation of*

cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. J. Neurosc. 10:3873-3879. 1990.

- Del Río E., D.G. Nicholls & C.P. Dowens. *Involvement of calcium influx in muscarinic cholinergic regulation of phospholipase C in cerebellar granule cells.* Journal of Neurochemistry. 63(2):535-543. 1994

- Didier, M., S.A. Berman, J. Lindstrom & S Bursztajn. *Characterization of nicotinic acetylcholine receptors expressed in primary cultures of cerebellar granule cells.* Molecular Brain Research, 30:17-28. 1995.

- Fukamauchi, F., Paul A. Saunders, C. Hough & De-Maw Chuang. *Agonist-induced down-regulation and antagonist-induced up-regulation of m_2 - and m_3 - muscarinic acetylcholine receptor mRNA and protein in cultured cerebellar granule cells.* Molecular Pharmacology. 44:940-949. 1993.

- Fukamauchi, F., C. Hough & De-Maw Chuang. *Expression and agonist-induced down-regulation of mRNAs of m_2 - and m_3 - muscarinic acetylcholine receptors in cultured granule cells.* Journal of Neurochemistry. 56(2):716-719. 1991

- Galli, C., Olimpia M., Scorziello A., Wrege T.M., Calissano P. & Schetini G. *Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis.* The Journal of Neuroscience. 15(2):1172-1179. 1995.

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

- Gray, D. W., Emma M. Whitham, R. A. J. Callis & Stefan R. Nahorski. *Muscarinic cholinoreceptor-simulated synthesis and degradation of inositol 1,4,5-triphosphate in the cerebellar granule cell.* Journal of Neurochemistry. 64:1143-1151. 1995.

- Hockberger, P.E., H.Y. Tseng & J.A. Connor. *Immunocytochemical and Electrophysiological differentiation of Rat Cerebellar Granule Cells in explant cultures.* Journal of Neuroscience. 7:1379-1383. 1987.

- Howard, T.J., Mount C.F. & Ira B.B. *Muscarinic stimulation promotes cultured Purkinje cell survival: A role acetylcholine in cerebellar development?* Journal of Neurochemistry. 63(6):2065-2073. 1994.

- Hynie, S., J.T. Wroblewski & E. Costa. *Profile of phosphatidylinositol metabolism stimulated by carbachol and glutamate in primary cultures of rat cerebellar neurons.* Neuropharmacology, 28, 12:1309-1315, 1989.

- Irving A.J., G.L. Collingridge & J.G. Schofield. *L-Glutamate and acetylcholine mobilise Ca^{2+} from the same intracellular pool in cerebellar granule cells using transduction mechanisms with different Ca^{2+} sensitivities.* Cell Calcium, 13:293-301, 1992.

- Ishitani, R., M. Kimura, M. Takeichi & D.M. Chuang. *Tryptamine induces phosphoinositide turnover and modulates adrenergic and muscarinic cholinergic receptor function in cultured cerebellar granule cells*. Journal of Neurochemistry, 63, 6:2080-2085,1994.

- Ito, M. *The cerebellum and neural control*. Raven Press. Ny, U.S.A. 580 pp. 1984.

- Lai, J.C.K., Murthy C.R.K., Cooper A.J.L., Hertz E. & Hertz L. *Diferential effects of ammonia and β -methylene-DL-aspartate on metabolism of glutamate and related amino acids by astrocytes and neurons in primary culture*. Neurochemistry Research, 14:377-389. 1989

- Larocca, N.J., A.G. Rodriguez-Gabin, W.K. Rashbaum, K.M. Weidenheim & W.D. Lyman. *Muscarinic receptor-dependent activation of phospholipase C in the developing human fetal central nervous system*. Brain Research, 653:9-15, 1994.

- Lazareno, S., Kendall D.A. & Nahorski S.R. *Pirenzepine indicates heterogeneity of muscarinic receptors linked to cerebral inositol phospholipid metabolism*. Neuropharmacology. 24:593-595. 1985.

- Lee, H.C., M.P. Fellenez, M. Liscovitch & J.K. Blusztajn. *Phospholipase D-catalyzed hodrolysis of phosphatidylcholine provides the choline precursor for acetylcholine synthesis in a human neuronal cell line*. Proceedings of the National Academy of Science. 90:10086-10090, 1993.

- Martin, S.H. *Neuroanatomy, text and atlas*. Elsevier. U.S.A. 483 pp. 1989.

- Michel D.A., R.E. Delmendo, M. Lopez & L. Whithing. *On the interaction of gallamine with muscarinic receptor subtypes*. *European Journal of Pharmacology*, 182:335-345. 1990.

- Moran, A. & Ambrish J. Patel. *Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development*. *Development Brain Research*, 46:97-105. 1989.

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

- Morán, J. & M. Rivera-Gaxiola. *Effect of potassium and N-Methyl-D-aspartate on the Aspartate Aminotransferase activity in cultured cerebellar granule cells*. *Journal of Neuroscience Research*, 33:239-247, 1992.

- Mount, H.T., Dreyfus y Black I.B. *Purkinje cell survival is differentially regulated by metabotropic and ionotropic excitatory amino acids receptors*. *Journal Neuroscience*. 13:3173-3179. 1993a.

- Mount, H.T., Dreyfus y Black I.B. *Responsivness to NGF during Purkinje cell development: autocrine regulation by acetylcholine?* (Abstr.) *Journal Neurochemistry*. 61 (Suppl.) S163C. 1993b.

- Mount, H.T., Dreyfus y Black I.B. *Differential effects of neurotrophins on Purkinje cell survival*. Soc. Neurosci. Abstr. 19, 661. 1993c.
- Mossman . *Journal Immunology Methods*. 65:55, 1983.
- Nicholls, D. *Proteins, transmitters and synapses*. Blackwell Scientific Publications. NY, U.S.A. 253 pp. 1994.
- Nicoletti, F., Canonico P.L. Favit A., Nicoletti G. & Albanese V. *Receptor-mediated stimulation of inositol phospholipid hydrolysis in human brain*. *European Journal of Pharmacology*. 160:299-301. 1989.
- O'Neill., C., Fowler C.J., Wiehnager B, Alafuzoff Y. & Winbald V. *Assay of phosphatidylinositol biphosphate phospholipase C activity in postmortem human brain*. *Brain Research* 543:307-314. 1991.
- Osborne, N., Fitz N. & Schwartz G. *Muscarinic acethylcholine receptor-mediate phosphoinositide turnover in cultured human retinal pigment epithelium cells*. *Vision Research*. 31:1119-1127. 1991.
- Palaiologos, G., L. Hertz & A. Achousboe. *Evidence that aspartate aminotransferase activity ans ketodicarboxylate carrier function are essential for biosynthesis of transmitter glutamate*. *Journal of Neurochemistry*. 51:317-320. 1988.
- Palaiologos, G., L. Hertz & A. Achousboe. *Role of aspartate aminotransferase and mitochondrial dicarboxylate transport for realease of endogenously and*

exogenously supplied neurotransmitter in glutamatergic neurons. Neurochemistry International. 14:359-366. 1989.

- Patel, J.A. & A. Hunt. *Observations on cells growth and regulation of glutamine synthase by dexamethasone in primary cultures of forebrain and cerebellar astrocytes. Developmental Brain Research, 18:175-184, 1985.*

- Pearson, H., Graham M.E. & Burgoyne R.D. *Relationship between intracellular free calcium concentration and NMDA-induced cerebellar granule cell survival in vitro. European Journal of Neuroscience. 4:1369-1375. 1992.*

- Rossi, D.J. & N.T. Slater. *The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. Neuropharmacology. 32:1239-1248. 1993.*

- Rylett, R. J. & B.M. Schimdt. *Regulation of the synthesis of acetylcholine. Progress in Brain Research, 98:161-166, 1993.*

- Salceda, R. *Muscarinic receptors binding in retinal pigment epithelium during rat development. Neurochemical Research. 19(9):1207-1210. 1994.*

- Siegel, G., Bernard, W., Wayne, A. & Perry B. *Basic neurochemistry. Fifth edition. Raven Press. NY. U.S.A. 1080 pp. 1994.*

- Simpson, P.B., R.A. John Challis & Stefan R. Nahorski. *Cronic activation of muscarinic and metabotropic glutamate receptors down-regulates type I inositol 1,4,5-triphosphate receptor expression in cerebellar granule cells. Journal of Neurochemistry. 63:2369-2372. 1994.*

- Spector, T. *Anal. Biochemistry*, 86:142, 1978.
- Stroeveva, O.G. & Mitashov V.I. *Retinal pigment epithelium: proliferation and differentiation during development and regeneration*. *International Review of Cytology*. 83:221-293. 1983.
- Sugiyama, H., Daniels M. & Nirenberg M. *Muscarinic acetylcholine receptors of the developing retina*. *Proceedings of National Academy of Science. U.S.A.* 74:5524-5528. 1977.
- Sunaga, K, D.M. Chuang & R. Ishitani. *Autoradiographic demonstration of an increase in muscarinic cholinergic receptors in cerebellar granule cells treated with tetrahydroaminoacridine*. *Neuroscience Letters*, 151:45-47, 1993.
- Voet, D & Voet, J. *Biochemistry*. Second edition. John Wiley and sons, inc. NY, U.S.A. 1360 pp. 1995.
- Wong, R.O.L. *Cholinergic regulation of $[Ca^{2+}]_i$ during cell division and differentiation in the mammalian retina*. *The Journal of Neuroscience*. 15:2696-2706. 1995.
- Wood, K.A., Bruno D. & Richard J.Y. *In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum*. *Neuron*. 11:621-632. 1993.

- Xu, J. & D.M. Chuang. *Serotonergic, adrenergic and histaminergic receptors coupled to phospholipase C in cultured cerebellar granule cells of rats.* Biochemical Pharmacology, 36, 14:2353-2358. 1987.

- Xu, J. & D.M. Chuang. *Muscarinic acetylcholine receptor-mediated phosphoinositide turnover in cultured granule cells: desensitization by receptor agonists.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 242:238-244. 1987.