

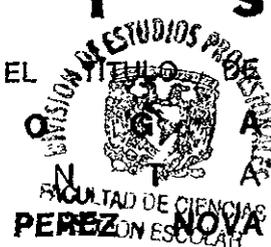


# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PAPEL DE FACTORES SERICOS EN LA ACCION TROFICA DEL NMDA Y KCI EN CELULAS GRANULARES DE CEREBELO.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL  
**B I O L**  
P R E S E  
MARIA ANTONIETA PEREZ NOVA



DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORAN ANDRADE

MEXICO, D. F.

2000

11111



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD FEDERAL  
AZÚCAR  
MEXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Papel de factores séricos en la acción trófica del NMDA y KCl  
en células granulares de cerebelo.

realizado por María Antonieta Pérez Nova

Con número de cuenta 8710696-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis

Propietario Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Propietario Químico Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Propietario Biól. Alette Ortega Gómez

Suplente

Biól. Andrea Caballero Benítez

Suplente

Biól. Claudia Rodríguez Rangel

*Alette Ortega Gómez*

*Andrea Caballero B.*

*Edna María Suárez Díaz*

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Julio Morán Andrade en el departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade.

El proyecto se realizó con el financiamiento aportado por la DGAPA.

*A mis padres José Luis y María Antonieta*

*Halcones cuya fresca unión  
forja un refugio de amor  
que penetra en mi piel  
y oxigena mi sangre.*

*A mis hermanos: Ayelet, José Luis, Samuel y Rickis  
A mi abuelita Luisita y a mis tías Ma. Luisa,  
Anita, Lupita y Esther  
A la memoria de mis abuelitas Luz y Vicentita*

...  
*A mi familia*

*Selva perenne.  
Cálido abrigo de amor  
de suave encanto.*

*A mi maestro y amigo invaluable, el Dr. Julio Morán*

*Águila veloz y  
viento de primavera*

*A mis sinodales y amigos:*

*Julio Morán Andrade*

*Claudia Rodríguez*

*Andrea Caballero*

*Silvestre Alavez*

*Alette Ortega*

*Agradezco tanto la ayuda incondicional como  
la orientación que me brindaron no sólo  
para el desarrollo de este trabajo.*

*A mis amigos, los sempiternos*

*Actos existenciales con los que he compartido,  
de alguna forma y desde siempre,  
una profunda amistad*

Índice temático	Páginas
I Resumen	1
II.1 Antecedentes	2
II.2 Desarrollo del sistema nervioso central	2-5
II.3 Neurobiología del cerebelo	5-7
II.4 Forma y estructura del cerebelo adulto	7-9
II.5 Desarrollo embrionario del cerebelo	9
II.6 Desarrollo postnatal	10-11
II.7 Farmacología de las células granulares de cerebelo	11-12
II.8 Glutamato: Metabolismo, síntesis y mecanismos de liberación	12-15
a) Glutaminasa Activada por Fosfatos (GAF)	14
b) Aspartato Aminotransferasa (AAT)	14
c) Glutamato deshidrogenasa (GLDH)	14-15
II.9 Los Receptores al glutamato y su clasificación farmacológica: Una perspectiva general	15-18
II.10 Cultivos neuronales	18-21
II.11 Dependencia serológica de los cultivos de las células granulares de cerebelo	21-22
II.12 Factores de crecimiento y sus acciones: Una retrospectiva	22-23
II.11 Consideraciones finales y objetivos	23
III Materiales y métodos	24-30
IV Resultados	31-45
IV.1 Actividades enzimáticas	31-33
IV.2 Viabilidad celular mediada por distintos sueros o por algunos de sus componentes	33-45
IV.2.1 Establecimiento de las condiciones de cultivo	33-34
IV.2.2 Sueros	34-37
IV.2.3 Albúmina	38-42
IV.2.3.1 Albúmina bovina	38-41
IV.2.3.2 Albúmina proveniente de diferentes especies	42
IV.2.4 Insulina bovina	42-45
V Discusión	46-50
V.1 Participación del suero en la activación de la GAF y en la promoción de la viabilidad celular	46-47
V.2 Participación de los sueros provenientes de diferentes especies en la viabilidad celular	48
V.3 Participación de la albúmina	48-49
V.4 Papel de la insulina	49-50
VI Conclusiones	51
VII Referencias	52-57
Agradecimientos	58

**Índice de figuras y tablas**

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Transformación de la blástula a gástrula. Blástula de rana (a) y su transformación en gástrula (b-f).	4
2	Gástrula tardía. Vista externa.	5
3	Vías aferentes y eferentes en el cerebelo.	6
4	Diagrama esquemático del folium cerebelar.	7
5	Vías de entrada y de salida y tipos celulares en la corteza cerebelar.	8
6	Clasificación de los Glu-R de acuerdo al tipo de agonista al que responden.	16
Tabla I	Receptores a los AAE en el SNC de mamíferos.	17
Tabla II	Componentes de los medios de cultivo (aminoácidos, vitaminas y otros componentes).	25

## I Resumen

En estudios previos se ha demostrado que la estimulación crónica con alto potasio (HK) o con N-metil-D-aspartato (NMDA), un agonista de los receptores sinápticos del glutamato (Glu), promueven la diferenciación morfológica y bioquímica de las neuronas granulares de cerebelo en cultivo, tomando como parámetro las actividades de la aspartato aminotransferasa (AAT) y la glutaminasa activada por fosfato (GAF), dos enzimas relacionadas con la síntesis del glutamato neurotransmisor.

En este estudio se discute la posible influencia de factores séricos en la sobrevivencia de las células granulares de cerebelo y se analiza la acción trófica promovida por el NMDA y HK a partir de la determinación tanto de la actividad de la GAF como de la viabilidad celular mediante la técnica del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio]. Se encontró que la despolarización generalizada ejercida por el HK y la despolarización específica inducida por el NMDA son necesarias para la activación de la GAF en células crecidas en medios suplementados con suero no así para las células crecidas en un medio químicamente definido. Al evaluar el grado de participación de algunos componentes del suero, como la insulina y albúmina de diferentes especies en la viabilidad celular, se encontró que la primera no tiene efecto por sí misma y que la albúmina bovina completa sí. El efecto trófico de la albúmina puede ser potenciado por HK o NMDA ya que la viabilidad se incrementa. Las albúminas de otras especies no tienen efecto en la viabilidad. Los sueros completos de diferentes especies, a excepción del suero de pollo, son necesarios para promover la sobrevivencia de las células.

## II.1 Antecedentes

La capacidad del sistema nervioso para responder plásticamente ante estímulos externos o ante modificaciones internas del organismo ha hecho que la neurobiología moderna dirija sus estudios para entender la forma en que diversos factores permiten la expresión diferencial de genes, la regulación de la formación de las neuritas y la actividad de los conos de crecimiento axónico. Así mismo, estas investigaciones tratan de esclarecer la forma en que estos factores ejercen cambios adaptativos en las neuronas jóvenes para que migren, formen su geometría dendrítica, sus sinapsis y sus vías de síntesis de neurotransmisores. Se sabe además que su participación aunada a la renovación en el número, tipo, forma y función de las sinapsis que conectan a los circuitos neuronales son fundamentales en la adaptación de los animales a distintas variaciones del medio. Esta plasticidad es máxima durante el desarrollo, pero no es privativa de ella, ya que en el cerebro adulto prosigue a niveles de expresión más bajos y se mantiene durante toda la vida de los vertebrados (Nieto-Sampedro y Cotman, 1988). De esta forma se hace patente que el sistema nervioso tiene su asiento morfofisiológico en la comunicación entre neuronas las cuales forman una red de vías específicas, de tal modo que cada una de estas puede comunicarse sólo con aquellas que formen parte de su vía, es por esto que la distribución de los tipos neuronales en este sistema no puede ser azarosa y debe regirse por moduladores epigenéticos que durante el desarrollo embrionario originen patrones arquitectónicos que conjuguen la participación de distintos factores (como neurotransmisores y glía) que, al realizar movimientos predeterminados de agrupaciones celulares, finalmente logren la construcción del sistema nervioso de un organismo maduro (Saneto, *et al.*, 1989).

## II.2 Desarrollo del sistema nervioso central

El esbozo del SNC humano aparece en el embrión presomítico durante la tercera semana de gestación, para este período, el cigoto ya ha pasado por una serie de divisiones que se inicia con la formación de la blástula, gástrula que por enterocelia (en el caso de

mamíferos) origina al celoma. Este es el momento en que se forman las tres capas blastodérmicas que darán origen al individuo y, si estas son vistas en un corte transversal, corresponderían al ectodermo, mesodermo y endodermo (Sawai, *et al.* 1990; Kato, *et al.*, 1991; Staton, *et al.*, 1992; Swai, *et al.*, 1993; Wakamatsu, *et al.*, 1997).

El sistema nervioso se origina del ectodermo, en particular de la zona más externa denominada neuroectodermo. En este periodo de crecimiento el complejo cordomesodérmico ya ha liberado evocadores que inducen al neuroectodermo a diferenciarse en la placa neural, la cual se encuentra constituida por un epitelio pseudoestratificado que al alcanzar su máximo grosor comienza a invaginarse a lo largo de la línea medio dorsal para formar el surco neural (figura 1).

En la placa pueden distinguirse dos regiones morfológicas, donde el extremo anterior es mucho más ancho que el extremo inferior, la primera región dará origen al encéfalo, en tanto que la más delgada y caudal, formará a la médula espinal. Desde el comienzo del desarrollo, la región encefálica muestra las subdivisiones que originarán a las vesículas encefálicas primarias o vesículas cerebrales primitivas: el prosencéfalo o cerebro anterior, el mesencéfalo o cerebro medio y el rombencéfalo o cerebro posterior. La región prosencefálica se subdividirá en una telencefálica y diencefálica, el mesencéfalo no se divide pero la del rombencéfalo sí, formando el metencéfalo y mielencéfalo. Más tarde la cavidad telencefálica originará los ventrículos laterales y la parte rostral del 3<sup>er</sup> ventrículo, con la cual se comunica por agujeros interventriculares. La región diencefálica formará la mayor parte del 3<sup>er</sup> ventrículo, en tanto que la cavidad mesencefálica al reducirse constituirá el acueducto cerebral, las cavidades del metencéfalo y mielencéfalo, el 4<sup>o</sup> ventrículo y de la parte medular del tubo neural, el epéndimo. Al inicio de la 4a. semana, cuando el embrión tiene 7 pares de somitas, a la altura del cuarto par de somitas, y en dirección céfalo-caudal, se empieza a cerrar la placa neural para formar el tubo neural. Las últimas partes en cerrarse son el neuroporo anterior y neuroporo posterior, y lo harán en las etapas de 20 a 25 somitas. En el tubo se diferencian 6 placas que son: la del techo situada en la línea medio dorsal, la del piso, localizada en la media ventral, dos alares que constituyen la parte dorsal del tubo, laterales al techo y dos basales, ventrales y laterales al piso. Entre las placas alares y las basales se forman (a cada lado) los surcos limitantes,

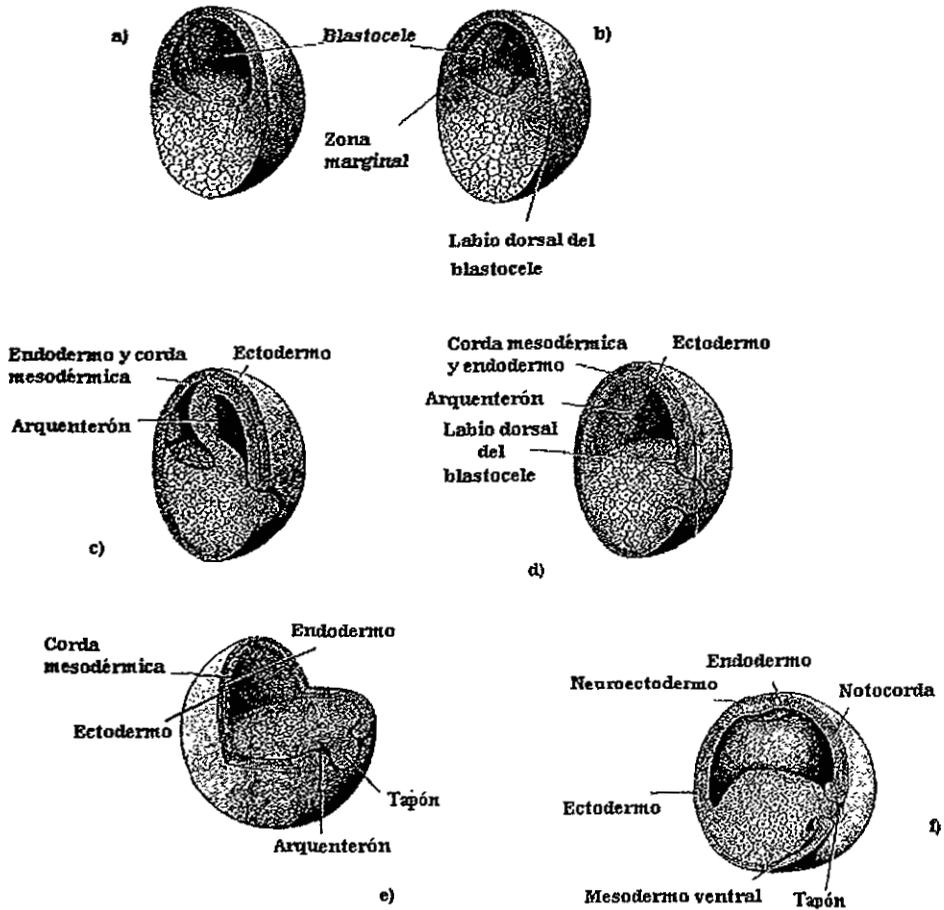


Figura 1. Transformación de la blástula a gástrula. Blástula de rana (a) y su transformación en gástrula (b-f). b, iniciado la gastrulación; c, eliminación del blastocele o segmentación de la cavidad por el gastrocele o arquenterón; d, gástrula completa temprana; e) Vista externa de la gástrula temprana y f) gástrula tardía.

llamados así por separar anatómicamente a las placas alares (las que originan estructuras sensitivas) de las placas basales (las que originan estructuras motrices). Actualmente es comúnmente aceptado que el patrón inicial del tubo neural se establece al mismo tiempo que la gastrulación (Doniach, 1993; Ruiz y Altaba, 1993, figura 2).

### II.3 Neurobiología del cerebelo

Como parte del sistema nervioso central y desde el punto de vista funcional el cerebelo es una estructura que se encarga del control de la postura y del tono muscular, la coordinación de los movimientos dirigidos (rápidos o lentos), además se encuentra relacionado con el vestibulo, la médula espinal, los núcleos pontinos los rojos y los cuneiformes accesorios, el tálamo, el complejo olivar, la formación reticular, la corteza motora y la de asociación.

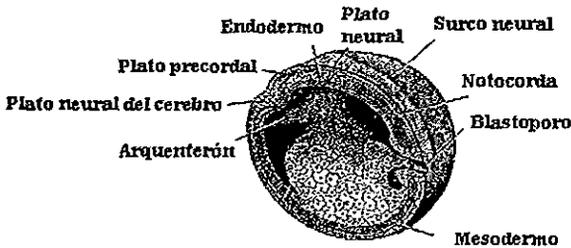


Figura 2. Gástrula tardía. Vista externa

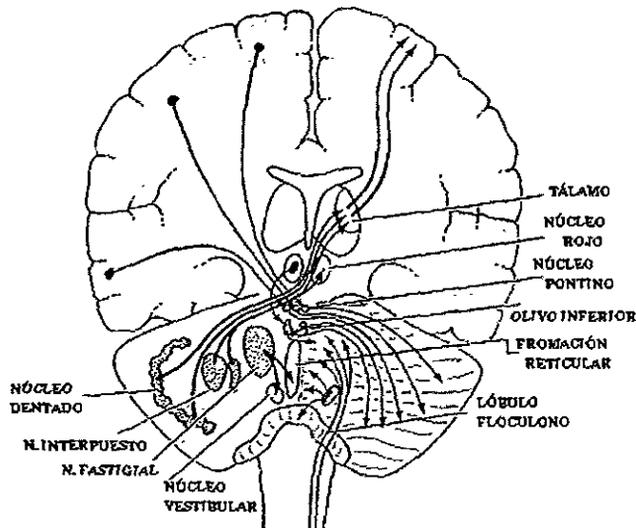


Figura 3. Vías aferentes y eferentes en el cerebelo. En esta figura se observa la superficie del cerebelo (derecha) y los núcleos cerebelares (izquierda). Las vías de salida del cerebelo (representado por las líneas más negras del lado izquierdo) se dan a través del núcleo dentado, del núcleo interpuesto y del núcleo fastigial. Las vías de entrada a este órgano (líneas claras en el lado derecho) se dan en la zona lateral de los hemisferios del cerebelo y provienen de la corteza cerebral a través de los núcleos pontinos. En la figura también se muestran las entradas que recibe el cerebelo del tracto espinocerebelar.

La organización neuronal general y los patrones de interconexión en el cerebelo maduro ha sido estudiada a gran detalle por una gran cantidad de investigadores, así mismo, ha sido documentada su ultraestructura (Gray, 1961). La organización laminar del cerebelo (figuras 3 y 4), ha permitido que el mismo sea un modelo muy utilizado para estudiar el desarrollo neuronal (Gray, 1961; Altman, 1982; Burgoyne y Cambrey-Deakin, 1988). Uno de los grandes avances en el estudio de este órgano ha sido la identificación y aislamiento de factores neurotróficos que estimulan la diferenciación y sobrevivencia neuronal (Burgoyne, *et al.*, 1993).

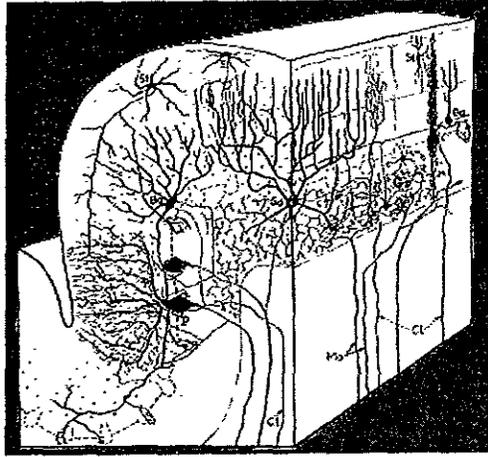


Figura 4. Diagrama esquemático que representa parte del folium cerebelar en donde se muestra los cinco tipos neuronales, su localización y las conexiones de las fibras nerviosas (Modificado de Kandel y Schwartz, 1985. Fibras trepadoras (CI), fibras muscosas (Mo), células granulares (Gr), neuronas de Purkinje (P), por último las interneuronas estrelladas (St), en canasta (Ba) y de Golgi (Go).

#### II.4 Forma y estructura del cerebelo adulto

El cerebelo está constituido por los hemisferios derecho e izquierdo y por el vermis central que está dividido en lóbulos por cisuras transversales. La sustancia gris del cerebelo se sitúa en la superficie como una corteza delgada que cubre la sustancia blanca central donde se localizan cúmulos pequeños de neuronas en las partes centrales o núcleos cerebelosos (Leeson y Leeson, 1985). La organización cerebelar incluye a cinco tipos neuronales (las células estrelladas, en canasta, Purkinje, Golgi y granulares) organizadas en tres capas. La más externa o molecular está constituida por axones de las células granulares o fibras paralelas amielínicas, por interneuronas (células en canasta y estrelladas), por las dendritas de las células de Purkinje, Golgi y por las terminales de las fibras trepadoras. La siguiente es una monocapa constituida por somas de las células de Purkinje; por último, la

capa más interna (también llamada capa granular interna), se encuentra formada por somas de las células granulares y de Golgi (figura 5).

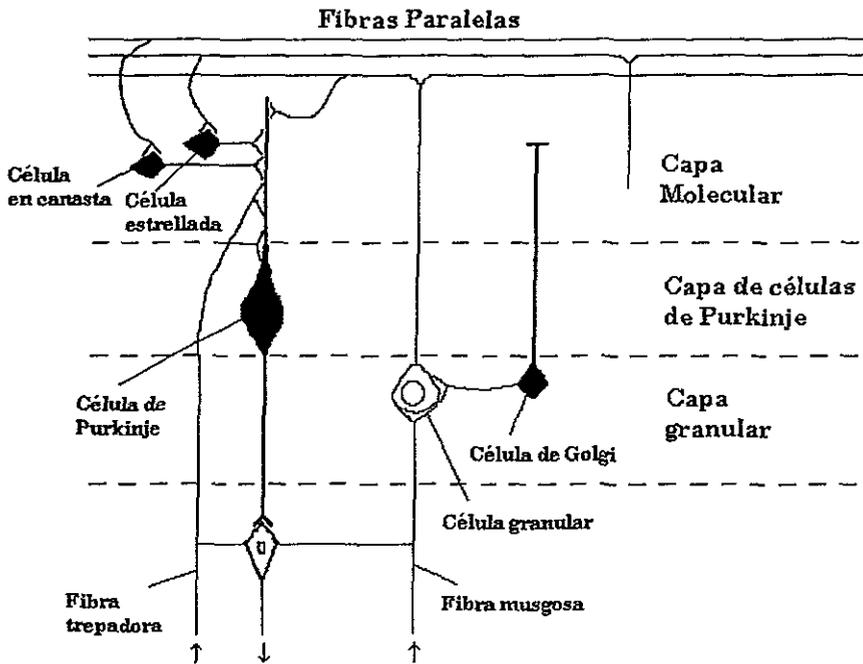


Figura 5. Vías de entrada y de salida y tipos celulares en la corteza cerebelar. Las células en claro marcan las conexiones sinápticas excitadoras y las células en negro marcan las conexiones inhibitorias. Las fibras trepadoras y las musgosas establecen contactos excitadores con los núcleos cerebelares.

Las células granulares forman una capa de células compactas, pequeñas y pobres en citoplasma, pero con un núcleo abundante en cromatina, tienen de 3 a 6 dendritas cortas y un axón amielínico que asciende a la capa molecular donde se bifurca (Leeson y Leeson, 1985). Las células de Golgi que ocupan un lugar dentro de esta capa, son menos numerosas, y pueden diferenciarse de las granulares por su gran tamaño y por sus dendritas muy arborizadas. En la corteza también hay terminaciones de las fibras musgosas y trepadoras que pasan a la corteza cerebelosa a partir de la sustancia blanca del tallo o puente cerebral y

la médula espinal (Leeson y Leeson, 1985). Las fibras musgosas son gruesas y hacen sinapsis con las células granulares mientras que las fibras trepadoras se conectan con las espinas dendríticas de las células de Purkinje y con las dendritas de las células en canasta y de Golgi (Tranch, 1988; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988). El cerebelo de rata adulta posee cerca de  $1.1 \times 10^8$  células granulares con somas de 5 a 6  $\mu$  de diámetro.

## II.5 Desarrollo embrionario del cerebelo

A nivel metencefálico, la placa del techo se engrosa a dos niveles para constituir los velos medulares: el nivel superior queda en el fondo del itismo (en el límite del metencéfalo y mesencéfalo) y el posterior permanece detrás del cerebelo, pero cuando se inicia el desarrollo de la corteza cerebelosa ambos velos casi se tocan. De las placas alares se forman dos áreas dorsales denominadas labios rómbicos o placas cerebelosas (de las cuales se diferenciará el cerebelo), y dos áreas laterales (laterales a las placas basales y a los surcos limitantes) cuyas células migran ventralmente hacia la capa marginal constituyendo (junto con las células provenientes del mielencéfalo) los núcleos pontinos. Estos reciben fibras corticopontinas (o pontocerebelosas) que ascienden por los pedúnculos cerebelosos medios a la corteza cerebelosa. Estas fibras también son llamadas musgosas, y transmiten señales excitadoras a las células granulares (a su vez, transmiten el mismo tipo de señal a las demás células de la corteza cerebelosa y a corto plazo inhiben la descarga de las células de Purkinje, ayudando así, a la coordinación de los movimientos voluntarios).

Al principio de la diferenciación del cerebelo, la mayor parte de los labios rómbicos se localiza en el interior del IV ventrículo. Mientras estos permanecen en la cavidad, se fusionan a nivel de la línea media para formar el esbozo del cerebelo, es decir los lóbulos laterales, pero antes de finalizar el tercer mes fetal, la parte extraventricular se hace más voluminosa y se proyecta fuera del tercer ventrículo, a este fenómeno se le denomina *eversión del cerebelo*.

## II.6 Desarrollo postnatal

El tipo celular predominante en el cerebelo está constituido por las células granulares y debido a que son objeto de este estudio, se abordará su desarrollo postnatal.

En la rata la mayoría de las células granulares se generan postnatalmente por una división en la capa germinal externa (EGL), la región específica de división se localiza en la zona superficial de proliferación que persiste hasta el día 21 postnatal (etapa de proliferación). Las células granulares inmaduras migran de la zona premigratoria que se encuentra en la superficie del cerebelo hacia su posición final en la capa granular interna (IGL) localizada en la parte rostral del lóbulo róbico, esto ocurre a partir del sexto día postnatal. Ramón y Cajal (1929) fue el primero en describir esta migración que, en el caso del ratón, puede durar 3 días, posteriormente, el desplazamiento neuronal que ocurre a través de la capa molecular y de las células de Purkinje (Jacobson, 1991) fue evidenciado por Miele y Sidman (1961) al utilizar  $^3\text{H}$ -timidina. Los procesos de proliferación y migración ocurre en las primeras 3 semanas (Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988).

Durante el período de migración, las granulares establecen contactos con procesos de las células gliales de Bergman y con procesos de las células de Golgi (Rakic, 1971), sin embargo la adhesión a estos procesos sólo es transitoria ya que después pierden su afinidad y establecen contactos entre ellas mismas, entre astrocitos y otros tipos celulares (figura5). Las primeras entradas sinápticas que reciben las células granulares provienen de las fibras musgosas, sinapsis que en rata han sido observadas en cortes histológicos obtenidos y procesados a partir del quinto día postnatal (Arsenio-Núñez y Sotelo, 1985), pero no es sino hasta el día 10 o 12 postnatal cuando la sinapsis es funcional, esto ocurre justo en el momento en que se inician los contactos inhibitorios dados por las células de Golgi hacia las células granulares en los glomérulos de las fibras musgosas (Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988). Cabe resaltar que la migración neuronal se encuentra mediada por los receptores a N-metil-D-aspartato (Rakic, 1971; Sievers *et al.*, 1987; Fishell, y Hatten, 1991; Kumoro y Rakic, 1992; Hatten, 1993; Kumoro y Rakic, 1993).

En estadios tempranos del desarrollo, las dendritas cortas de estas células están localizadas en la capa molecular en donde reciben entradas sinápticas de las fibras

musgosas (una de las dos principales vías de entrada al cerebelo) mientras que los axones llegan hasta la capa molecular en donde se bifurcan y dan lugar a las fibras paralelas (vía de salida del cerebelo) las que establecen contactos sinápticos con espinas dendríticas de las dendritas de las células de Purkinje, de las células en canasta y de Golgi (Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988). La formación de contactos sinápticos de las células granulares sobre las dendritas de las células de Purkinje en particular parece ser necesario para la sobrevivencia de las células granulares (Sofelo y Changeux, 1974).

## II.7 Farmacología de las células granulares de cerebelo

Se ha mencionado que las células granulares reciben entradas sinápticas excitadoras de las fibras musgosas provenientes del puente y de la médula, donde una parte de la población es colinérgica (Kasa y Silver, 1969) y la otra, que por cierto es muy numerosa, está constituida por fibras que utilizan glutamato como neurotransmisor (Fonnum, 1984; Garthwaite y Garthwaite, 1986) que cuando es liberado, interacciona con los receptores sinápticos localizados en las células granulares (Hudson, *et al.*, 1976); en esta transmisión sináptica se utiliza preferencialmente los receptores que son del tipo NMDA (NMDA-R), un receptor subtipo al glutamato (Garthwaite y Brodbelt, 1989; Cambray-Deakin, 1990b). El NMDA es uno de los receptores más concurridos dentro de los aminoácidos excitadores (AAE), su efecto es mediado por el canal acoplado al receptor y su activación involucra cambios en los niveles de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), la activación de proteínas y la expresión de genes tempranos (Burgoyne, *et al.*, 1988; Cambray-Deakin, *et al.*, 1990; Szekely *et al.*, 1990). Trabajando con rebanadas de hipocampo Kater propuso que la entrada de calcio vía NMDA-R, modula el crecimiento de las neuritas (Kater, *et al.*, 1988); no obstante, los axones y neuritas de algunas células pueden crecer en ausencia de filamentos de actina y bajos niveles de calcio, y esto se debe a la inducción de genes estructurales como la  $\beta$  tubulina clase II (Cambray-Deakin, *et al.*, 1991; Rashid y Cambray-Deakin, 1992). Estos y otros resultados sugieren que el glutamato vía NMDA-R tiene un papel neurotrófico importante sobre este tipo celular, pues cuando su acción es bloqueada por

antagonistas como el APV o cuando el glutamato endógeno es removido, el crecimiento de las neuritas se reduce (Pearce, *et al.*, 1987). Por último, la presencia del NMDA estimula la expresión de proteínas del citoesqueleto que a su vez permite una direccionalidad en el crecimiento de las neuritas con rangos de crecimiento que van de 12  $\mu$ /h (controles) a 50  $\mu$ /h (Cambray-Deakin, *et al.*, 1992).

## II.8 Glutamato: Metabolismo, síntesis y mecanismos de liberación

El glutamato (Glu) es tanto un elemento estructural de proteínas como un intermediario en el metabolismo celular estas características lo hacen único dentro de la neurobiología. En el sistema nervioso y en particular en el sistema nervioso central de mamíferos, este aminoácido tiene un papel fundamental en la neurotransmisión excitadora o positiva, no obstante su participación también se ha asociado al desarrollo de algunos desórdenes neurológicos entre los que se incluyen el mal de Alzheimer, el de Parkinson y en la epilepsia. (Fonnum, 1985; Rotman, *et al.*, 1987; Choi, 1988; Choi, y Rotman, 1990; Meldrum B. y Garthwaite, 1991). La gran variedad de funciones asociadas al glutamato nos habla a su vez de las múltiples vías de síntesis para este aminoácido y, si además le añadimos la compartimentalización anatómica de estos sitios, nos dará como resultado una especialización metabólica de los compartimentos celulares y una interdependencia metabólica entre los tipos celulares (Fonnum, 1991. Cap. 15).

Con objeto de presentar un panorama general de la participación de este aminoácido, a continuación se enlistan las funciones que se le asocian: 1) en el metabolismo energético general, localizado en mitocondria (Ottersen, *et al.*, 1992; Ottersen y Storm-Mathisen, 1985); 2) en la glía, como fijador de iones amonio a través de la glutamina sintetasa (Martínez-Hernández, *et al.*, 1977); 3) en la transmisión sináptica donde la liberación del glutamato transmisor se da en las vesículas de manera dependiente de  $Ca^{2+}$  (Naito y Ueda, 1985; Fonnum, *et al.*, 1992); 4) como precursor del ácido  $\gamma$ -aminobutírico o GABA en neuronas GABAérgicas (Fonnum *et al.*, 1970; Ribak *et al.*, 1976).

El glutamato, al igual que el aspartato, es un aminoácido que no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que las neuronas deben sintetizarlo a partir de precursores como la glucosa. Las enzimas que se encargan de la síntesis y metabolismo del glutamato se localizan en dos compartimentos cerebrales que constituyen a las células gliales y nerviosas, de tal forma que la síntesis y en general el metabolismo de los aminoácidos transmisores (Glu, GABA, etc.), dependen de la interacción entre las terminales nerviosas y las células gliales que sintetizan y metabolizan a otros grupos de transmisores. (Fonnum, 1991, Cap.15; Siegel, 1994. Cap. 17). Sólo como dato adicional mencionaremos que la concentración del glutamato en el cerebro es de alrededor de 10 mM y la concentración de glutamina es de 7 mM. (Engelsen, *et al.*, 1985). En estudios inmunohistoquímicos se ha demostrado que la concentración de glutamato en las terminales glutamatérgicas del cerebelo (fibras paralelas, trepadoras y en las terminales de las fibras trepadoras) es de 20 a 30 mM (Ottersen, *et al.*, 1985.)

Se propone que el glutamato neurotransmisor en las *granulares de cerebelo*, es sintetizado a partir de glutamina por una reacción catalizada por la glutaminasa activada por fosfato (GAF) (Hamberger *et al.*, 1979; Hertz y Schousboe, 1987), a partir de L-aspartato (L-Asp) y  $\alpha$ -cetoglutarato por una transaminación catalizada por la aspartato aminotransferasa (AAT) (Altschuler *et al.*, 1985; Wenthol *et al.*, 1986; Palailogos *et al.*, 1989), o a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato mediante una reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GLDH), (Patel *et al.*, 1982; Wolf y Schünzel, 1987). Los cambios histológicos y la actividad de enzimas como la GAF y AAT correlacionan con la información hasta ahora conocida sobre la formación de células y vías glutamatérgicas en el cerebro, por lo cual, se les ha considerado como marcadores apropiados de las células granulares; así mismo, estas enzimas actúan de manera sinérgica, pues la síntesis neta del glutamato se da por una transaminación del aspartato mediante la acción de la AAT, mientras que la GAF provee la formación de glutamato a partir de glutamina proveniente de astrocitos. (Palailogos *et al.*, 1989).

a) Glutaminasa Activada por Fosfatos (GAF)

La GAF es una enzima mitocondrial que se encarga de la síntesis del neurotransmisor glutamato, es activada por fosfatos y algunos ácidos carboxílicos y es inhibida por el glutamato, por iones amonio y protones. Su reacción es irreversible (Benjamin, 1981; Kvamme *et al.*, 1983; Kvamme, *et al.*, 1991). Esta enzima no presenta una distribución regional (McGeer and McGeer, 1979) ya que se encuentra tanto en la glía como en las neuronas (Altschuler, *et al.*, 1985; Donnogue y Wenthold 1985; Wenthold *et al.*, 1986).

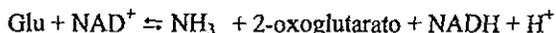


b) Aspartato Aminotransferasa (AAT)

La AAT cataliza la reacción: Asp + 2-oxoglutarato  $\rightleftharpoons$  Glu + Oxaloacetato. No presenta una localización específica en el cerebro (Benuck, *et al.*, 1972). La AAT presenta dos isoenzimas que se localizan en compartimentos diferentes y además presentan propiedades cinéticas diferentes. Ambas isoenzimas son reguladas de diferente forma por el substrato (Fonnum, 1968; Magee y Phillips 1971).

c) Glutamato deshidrogenasa (GLDH)

La GLDH es una enzima que cataliza una reacción reversible, en donde la concentración de los substratos determina la dirección de la misma reacción:



es una enzima mitocondrial encargada de la desaminación oxidativa, forma iones amonio ( $\text{NH}_3$ ) y cicla el glutamato a partir del  $\text{NAD(P)}^+$  (Aoki *et al.*, 1987). Algunos de esos iones amonio son utilizados en la biosíntesis de aminoácidos, mientras que el exceso es eliminado. En vertebrados terrestres los iones  $\text{NH}_4^+$  son convertidos a urea en el hígado para ser excretados. (Voet y Voet. 1994).

La GLDH en un inicio no parecía presentar una distribución regional distinta, a no ser por encontrarse en mayor concentración en sustancia gris en relación con la sustancia blanca (Leong *et al.*, 1984), pero estudios inmunohistoquímicos realizados por Wurdy en 1991 indican una localización preferencial en células gliales y en cerebelo (Wurdi y

Kugler, 1991).

## II.9 Los Receptores al glutamato y su clasificación farmacológica: Una perspectiva general

Las características funcionales y farmacológicas de los sitios que reconocen al glutamato son la base para dar una división de clases y subtipos de receptores a este neurotransmisor (Glu-R). Los Glu-R han sido clasificados como ionotrópicos ( $i$ Glu-R) y como metabotrópicos ( $m$ Glu-R). Los receptores son proteínas transmembranales con un sitio de reconocimiento a diferentes agonistas (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993). Se conocen como receptores ionotrópicos a aquellos cuyo ligando activa canales iónicos de permeabilidad selectiva, para el caso específico del glutamato estos receptores farmacológicamente son divididos de acuerdo a su activación preferencial, de esta forma se encuentran los receptores que son del tipo N-metil- D aspartato (NMDA-R) (Watkins, 1962, 1980 y 1989; Garthwaite y Garthwaite, 1986; Barnard y Henley, 1990; Cull-Candy *et al.*) y a los receptores a AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato), que en ocasiones es reemplazado por el agonista quisqualato (QQ) o por el ácido kaínico (KA). Todos ellos están ligados a canales catiónicos que permean  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula y liberan  $\text{K}^+$ . Estos receptores se relacionan con la neurotransmisión rápida (Watkins y Evans, 1981; Monaghan, *et al.*, 1989; Watkins *et al.*, 1990). Los  $m$ Glu-R se caracterizan por estar acoplados a proteínas, que a su vez se asocian a los procesos metabólicos celulares, su clasificación, al igual que en el caso anterior, se da en base al tipo de agonista al que responde: el QQ es el agonista más selectivo para un grupo, mientras que para el grupo del ácido trans-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico (t-ACPD) el agonista más potente es el ácido (1S,3R)-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico, en el tercer grupo se encuentran los receptores subtipos que prefieren al L-AP4 (ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico). Los receptores que prefieren al QQ están unidos a la formación del inositol trifosfato y los receptores que prefieren al t-ACPD y al L-AP4 están unidos negativamente a la formación de adenosina 3'5'-monofosfato o AMP<sub>c</sub> (Nakanishi, 1992; Schoepp y Conn, 1993; Schoepp, 1994). Un nuevo sitio se puso en evidencia al estudiar los

subtipos QQ y L-AP4 en tejidos neuronales, este nuevo receptor al Glú se le ha denominado ácido L-2-amino-6-fosfonohexanoico y su función aún no es clara (Harris *et al.*, 1987; Schulte *et al.*, 1994. Figura 6).

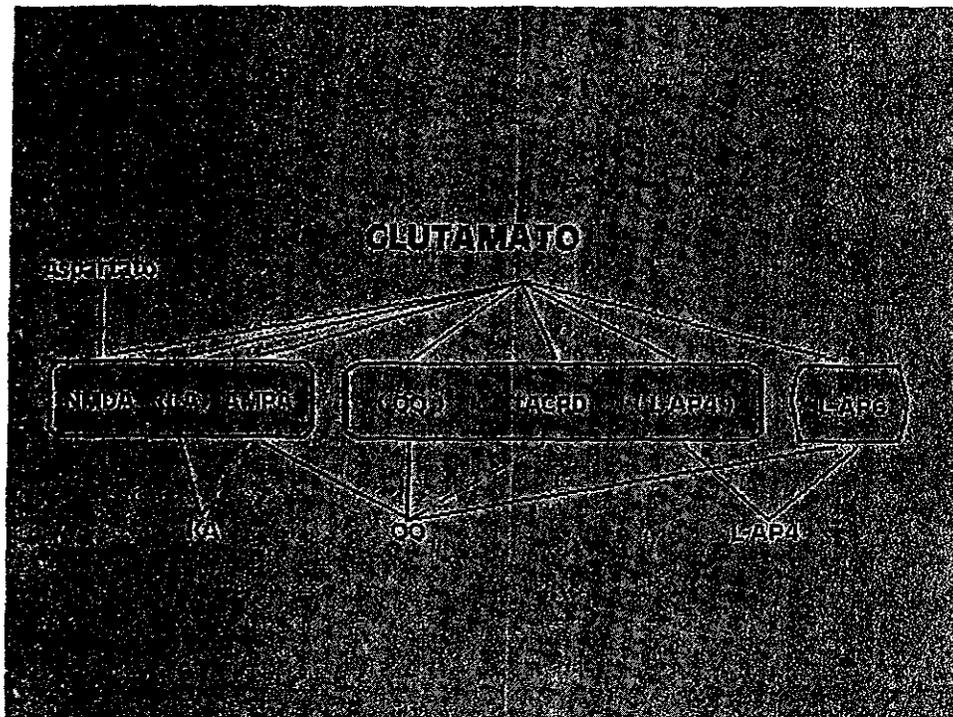


Figura 6. Clasificación de los Glu-R de acuerdo al tipo de agonista al que responden.

La amplia distribución y contribución en el SNC de mamíferos de un receptor subtipo al glutamato ha llevado a clasificar a los receptores del glutamato en dos tipos: los que son del tipo N-metil- D aspartato (NMDA-R) (Garthwaite y Garthwaite, 1986; Barnard y Henley, 1990; Watkins, 1962,1980 y 1989; Cull-Candy *et al.*), y los que no son del tipo NMDA (no NMDA-R) entre los que se encuentran el AMPA, Acido Káinico (Barnard y Henley, 1990; Watkins, 1989) y el L-AP4 (Monhagan y Ganong, 1988; Watkins, 1980 y 1989. Tabla I).

AGONISTA	ANTAGONISTA	NMDA	Kainato	AMPA	mGluR (4)
AGONISTAS	Específicos (1)	N-metil-D-aspartato ácido 6-metano glutámico	ácido kainico ácido domoico	AMPA 3-ácido Willardina	(RS)-R-ACPD (S,S)-ACPD L-CCG-I ácido L-2-Amino-4- fosfonobutírico
	ómnis (2)	n-CCG-II L-CCG-IV (R,R)-ACPD	5-ácido Willardina	Ácido quisqualico	ácido quisqualico ácido iboténico
	Endógenos (3)	L-glutamato, L-aspartato	L-GA, L-HCSA	L-HCA, Quin	
ANTAGONISTAS	Específicos compañeros	Clonazepam CPP-D-AP5 GCS-19765 GCP-37349, D-AP7		NEOX	(-)-MCPG (S)-CPG (S)-ACPHG
	Específicos que no son compañeros	Magnesio MK-801 PCP TCP Guanitina 5,7-dicloro-2,4,6-tri- nitroacetofenona (parcial)			
	Preferencial				
	K/AMPA > NMDA NMDA > K/AMPA		Glyc, Kyn, HDC, GYCA		

Tabla I. Receptores a los AAE en el SNC de mamíferos. (1) No es absolutamente necesario. (2) Algunos no han sido suficientemente investigados. (3) Transmisores; su preferencia por algún receptor específico no es claro. (4) La especificidad de estos subtipos está en investigación. (Nakanishi, 1992).

Los NMDA-R son ionotrópicos y se encuentran dentro de los receptores más regulados. Hay no menos de 5 sitios a ligandos endógenos que incrementan o no la probabilidad de que el canal acoplado se abra. Estos cinco sitios de regulación son los siguientes: a) 3 sitios donde se lleva a cabo una modulación positiva: i) un sitio que reconoce al glutamato, su agonista endógeno (Olverman et al., 1984), ii) un sitio de unión al coagonista glicina, este sitio es insensible a estircinina (antagonista de los receptores a

glicina) y no es activado por  $\beta$ -alanina, esta zona es considerada como un sitio alostérico pues al unirse la glicina junto con el ácido-1-carboxílico (ACC) se induce la apertura del canal (Mayer, 1984; Cull-Candy y Ogden, 1985; Jhonson y Ascher, 1983; Kleckner y Dingledine, 1988), y *iii*) un sitio regulatorio por poliaminas (*espermina* y *espermidina*) que promueven la activación del receptor (Williams, et al., 1991; Rock y Macdonald, 1991), su acción es bloqueada por ciertas triaminas como la dietilenetriamina. b) 2 sitios donde se lleva a cabo la modulación negativa: *i*) un sitio dentro del canal que es bloqueado por  $Mg^{2+}$  y que regula el influjo de iones (Nowak et al., 1984) y *ii*) un sitio de unión fuera del canal para  $Zn^{2+}$  que evita la activación del canal (Mayer y Westbrook, 1987). Además se presenta un sitio donde el canal une drogas como la Fenilciclidina (PCP), el MK-801 y la Ketamina.

Las propiedades del receptor tipo NMDA son: a) Su alta permeabilidad al calcio (MacDermot et al., 1986; Mayer et al., 1987), b) su bloqueo por magnesio dependiente de voltaje (Nowak et al., 1984), d) su modulación por glicina (Mayer, 1984; Cull-Candy y Ogden, 1985; Jhonson y Ascher, 1983) y e) su alta afinidad (en el orden micromolar) por L-glutamato (Olverman et al., 1984). Todos estos sitios modulan la apertura del canal asociado que permea  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  (Pumain y Heinemann, 1985).

La acción del Glu mediada por los NMDA-R tiene la característica de modular una gran variedad de procesos relacionados con la plasticidad neuronal en cerebros adultos o en desarrollo, esta acción puede ser *neurotrófica* o *neurotóxica* dependiendo de la región cerebral y/o estado fisiológico del organismo (Milani et al., 1991; Balázs, et al., 1988; Burgoyne et al., 1993).

## II.10 Cultivos neuronales

El análisis y caracterización de los eventos que se presentan en etapas puntuales del desarrollo ha incrementado el interés por entender las bases moleculares, genéticas y epigenéticas que controlan los eventos relacionados con los procesos de proliferación, migración, establecimiento de sinapsis, diferenciación y muerte de los distintos tipos neuronales. Tratar de estudiar todos estos procesos dentro de sistemas completos sería muy

complicado y no muy ventajoso. Las razones anteriores hacen de los cultivos de tejidos un método muy recurrido en la actualidad ya que permiten la sobrevivencia preferencial de algún tipo neuronal en un determinado estado y tiempo del desarrollo, además se puede modular los procesos que ocurren normalmente en las células.

Los estudios realizados con esta técnica han sugerido que las células granulares del cerebelo tienen requerimientos voltaje dependientes (Balázs, 1990). Balázs y Hack en 1990, además de Kingsbury y Gallo en 1985, analizaron en experimentos *in vitro* la despolarización crónica incrementando la concentración del  $K^+$  en el medio, sobre los niveles fisiológicos ( $>20\text{mM}$ ) (Chalazonitis y Fishbach, 1980; Nishi y Berg, 1981). Antes del tercer día postnatal cuando apenas inicia la maduración biológica de estas células, su desarrollo no se ve afectado por la presencia o ausencia de  $K^+$ , lo que indica que la dependencia de condiciones despolarizantes se desarrolla paralelamente con la expresión de las características propias de la diferenciación de estas células como es el desarrollo del soma y las dendritas, además de existir la dependencia de altas concentraciones de calcio intracelular para el crecimiento de las neuritas (Cambray-Deakin and Burgoyne, 1992; Burgoyne *et al.*, 1988), en correlación con la activación de la proteína cinasa C (Cambray-Deakin *et al.*, 1990a); también se tiene documentado que la estimulación con NMDA involucra cambios en la organización del citoesqueleto, cambios que se requieren para la extensión de las neuritas (Rashid and Cambray-Deakin, 1992; Bigot *et al.*, 1991).

Basándose en estos hallazgos se ha propuesto la hipótesis de que el efecto de altos niveles de  $K^+$  *in vitro* mimetiza la influencia que tienen las primeras inervaciones que reciben las células granulares durante sus primeros estadios postmigratorios provenientes de las células musgosas (Balázs y Jorgensen, 1987). Muchas de estas fibras son glutamatérgicas con alta afinidad por su sustrato (Olverman *et al.*, 1984) y permean  $Ca^{2+}$  (Mayer *et al.*, 1987). Se ha observado que puede incrementarse la sobrevivencia de las células granulares en cultivo por tratamientos con NMDA (N-metil D-aspartato) (Balázs *et al.*, 1988c). Por tanto dicha hipótesis sugiere que la influencia ejercida por la inervación de las células musgosas es mediada por la conducción de  $Ca^{2+}$  vía el receptor tipo NMDA (Balázs y Hack, 1990), debido a estas propiedades se ha considerado a los receptores tipo NMDA de gran importancia en los procesos de plasticidad sináptica. (Collingridge y Bliss,

1987; Balázs *et al.*, 1988a y 1988b).

Estudios farmacológicos han demostrado de manera muy clara la participación de este receptor en la inducción de la sobrevivencia en cultivo. Antagonistas selectivos que actúan como inhibidores competitivos (APH, APV) y no competitivos (MK 801) del receptor bloquean el efecto trófico del NMDA en células granulares (Olverman *et al.*, 1984). Como se mencionó, el receptor tiene un sitio que une glicina, pero este sitio es insensible a estricnina, fármaco que normalmente se usa como antagonista de los receptores a glicina. En este caso la glicina parece potenciar el efecto del NMDA, aumentando la afinidad, de hecho se ha propuesto que el sitio de la glicina en el receptor debe estar ocupado para que el NMDA ejerza su efecto (Jhonson y Ascher, 1987), además, se ha demostrado que el anticonvulsivo MK 801 igualmente antagoniza de manera no competitiva, las respuestas despolarizantes al receptor NMDA, no así al receptor a Káinico y el de AMPA (Wong *et al.*, 1986).

La activación del receptor tipo NMDA puede contribuir a la sobrevivencia de las células granulares *in vitro*, como se ha venido discutiendo, sin embargo, se ha visto que un incremento prolongado en la entrada de calcio puede ocasionar daño neuronal (Siesgo, 1981). El Glu a través de sus receptores puede originar ciertos desórdenes mediados principalmente por los NMDA-R, en periodos prolongados de anoxia que traen como consecuencia daño neuronal y neurotoxicidad. La falta de oxígeno hace que los niveles de energía caigan, lo cual produce acidosis y liberación de radicales libres; por tanto, esta falta de energía afecta el metabolismo y al potencial de membrana. La despolarización consecuente de las células es inevitable, generando potenciales de acción para liberar al neurotransmisor glutamato de las terminales presinápticas. La liberación de este neurotransmisor activa a los receptores postsinápticos que permean  $Ca^{2+}$ , incrementando así sus niveles intracelulares. Los niveles de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) desencadenan un sistema de segundos mensajeros que amplifican y prolongan el estímulo aún cuando éste haya sido eliminado. (Siegel, 1994).

Con estas evidencias se observa que la prolongada activación del receptor tipo NMDA provoca fenómenos de potenciación excesivos que resultan en la degeneración o muerte celular, esta toxicidad puede ser prevenida completamente utilizando antagonistas a

este receptor (Eimerl y Schramm, 1991). También se ha observado que el glutamato puede provocar neurotoxicidad cuando los niveles de glucosa y/o  $Mg^{2+}$  son disminuidos (Novelli et al., 1988).

## II.11 Dependencia serológica de los cultivos de las células granulares de cerebelo

El sistema nervioso central de los mamíferos requiere necesariamente la presencia de factores tróficos para su desarrollo, mantenimiento o sobrevivencia (Levi-Montalcini, 1987; Barde, 1989; Ferrari et al., 1989; Maisonpierre et al., 1990; Knusel et al., 1990). Muchos de estos factores se encuentran en el suero por lo que este representa un medio útil para el cultivo de células neuronales. De entre todos los sueros, el representante más utilizado como suplemento para el crecimiento de los cultivos de tejidos es el fetal bovino (SFB). Según un estudio de Andrews (1981), se determinó que el componente principal del suero es la albúmina (>50%) siguiéndole en orden decreciente de importancia la  $\alpha$ -globulina,  $\beta$ -globulina y la  $\gamma$ -globulina. Al compararse el SFB con suero que no es fetal, se encontró que los componentes, según un perfil electroforético, son diferentes (Andrews, 1981).

En el caso particular de las células granulares de cerebelo, se han obtenido datos que relacionan los cambios morfológicos y bioquímicos con el contenido del suero en el medio de cultivo en el que son sembradas (Kingsbury y Gallo 1985) observándose que este efecto es potenciado por el suero y que él mismo se ve disminuido en un medio que carece de suero.

Se ha visto que las células cultivadas en medio químicamente definido (CDM) pueden permanecer vivas en el cultivo durante varias semanas y las que son sembradas en medio suplementado con suero (SCM) tienden a organizarse en cúmulos y a crear conexiones (Kingsbury y Gallo, 1985). La migración de células y el desarrollo de las neuritas, da como resultado la formación de pequeños cúmulos que gradualmente van incrementando en talla además de su interconexión, esto ocurre a los 7 días *in vitro* (DIV) en neuronas de mamífero (Kings et al., 1985). Así mismo, hay datos que ponen en evidencia

el efecto tóxico del suero en cultivos de 14 a 19 DIV. Estos resultados revelan la presencia de elementos en el suero que potencian el efecto tóxico dado por los receptores tipo NMDA y por los no NMDA-R (Eimerl y Schramm, 1991; Schramm *et al.*, 1990).

La organización de los cultivos en CDM es diferente a las células crecidas en presencia de suero (Gallo *et al.*, 1985): la formación de cúmulos, prolongación de neuritas y migración de células se encuentra limitada pero permanecen en mejor estado durante periodos de incubación más prolongados (de 3 a 4 semanas).

## II.12 Factores de crecimiento y sus acciones: Una retrospectiva

Los factores de crecimiento se caracterizan por ser: 1) factores que previenen la muerte celular natural y/o promueve la sobrevivencia neuronal (Sporn and Roberts, 1990), 2) Factores que inducen el crecimiento de las neuritas y 3) Factores que inducen la diferenciación del fenotipo neuronal (Schwartz, 1993).

Estos factores se distinguen de las clásicas hormonas endócrinas como la insulina o la hormona del crecimiento en dos aspectos importantes: a) las hormonas endócrinas son sintetizadas en glándulas especializadas como el páncreas y la glándula pituitaria, respectivamente, b) las clásicas hormonas endócrinas son liberadas de su sitio de síntesis para ser transportadas, vía torrente sanguíneo, a sus células blanco mientras que los factores de crecimiento, en la mayoría de los casos, actúan localmente en los sitios donde fueron sintetizados, es por esto por lo que generalmente no se les puede detectar en sangre o en otros fluidos. A pesar de estas diferencias los factores de crecimiento y las hormonas pueden tener efectos análogos, es decir, los primeros pueden tener efectos semejantes a las hormonas endócrinas (al actuar sobre células blanco específicas) mientras que las segundas pueden promover el crecimiento o la actividad mitótica en las células (Cross, y Dexter, 1991; Sporn y Roberts, 1990).

A continuación se presenta la clasificación de los factores de crecimiento en la que se incluyen 5 familias: 1) La familia del factor de crecimiento derivado de platos o PDGF (del inglés platelet-derived growth factor) (Balk, 1971; Ross *et al.*, 1986). 2) La familia del

factor de crecimiento epidérmico o EGF (epidermal growth factor) (Savage, 1972; Carpenter y Cohen, 1979). 3) La familia del factor de crecimiento fibrilar o FGF (fibroblast growth factor). 4) La familia de los factores de crecimiento semejantes a la insulina o IGFs (insuline like-growth factors) y 5) La familia del factor de crecimiento transformante o TGF (transforming growth factor).

## II.13 Consideraciones finales y objetivos

Todas estas evidencias manifiestan la presencia de factores permisivos en el suero que promueven ciertos fenómenos durante el desarrollo (Jessell, 1988; Oppenheim 1989; Maissnpierre, 1990), estos factores, aunados a la expresión temprana y diferencial de neurotransmisores y neuropéptidos, favorecen tanto la división como la sobrevivencia neuronal, crecimiento de neuritas y de conos, incrementan la motilidad celular y son capaces de inducir cambios en el fenotipo neuronal y glial (Burgoyne, *et al.*, 1993). La participación puntual en procesos específicos del desarrollo permite plantear que las funciones tróficas a corto o largo plazo de estas neurotrofinas es intermediaria de la plasticidad neuronal como actividad dependiente de la estabilización y/o rearrreglo de las sinapsis.

Con el propósito de evaluar esta hipótesis, se analiza el efecto de sueros de distintas especies y de algunos de sus componentes para conocer su posible participación como factores tróficos o como moduladores del desarrollo de las neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivos primarios. Para esto se midió:

- a) la actividad enzimática de la glutaminasa activada por fosfato
- b) la viabilidad neuronal influenciada tanto por factores séricos como por el NMDA y el alto potasio (HK).

La evaluación del grado de veracidad y validez de los resultados se logró con la obtención del error experimental (Ee).

### III Materiales y Métodos

Los medios modificados (Dulbecco's modified Eagles medium o DMEM) y los sueros (fetal bovino, ternera, caballo, etc) fueron obtenidos de Gibco, las enzimas fueron obtenidas de Boehringer y los demás reactivos se obtuvieron de Sigma. Todas las drogas se utilizaron a dosis efectivas medias.

#### III.1 Cultivos celulares

Se establecieron cultivos neuronales de células granulares provenientes de cerebelo de ratas Wistar de 8 días de nacidas (8P) (Morán y Patel, 1989) en medios químicamente definidos (CDM) o suplementados con suero (SCM), los cuales se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad en una incubadora a temperatura constante (37°C) y a una atmósfera con aire saturado con vapor de agua y 4.6% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se realizaron en cajas de 20 mm de diámetro o en multipozos a una densidad celular de 1.25 – 1.5 x10<sup>6</sup> células por mililitro con un periodo de incubación de 3 a 6 días *in vitro* (DIV). Después del primer DIV los cultivos fueron tratados con citosina arabinosa para evitar el crecimiento de células no neuronales y en el 2 DIV se trataron con KCl o NMDA, los demás factores (albúmina, insulina) se añadieron a distintos DIV (ver resultados). Se anotaron las condiciones morfológicas de las células en el día en que se realizó la cuantificación de la actividad de la GAF o la viabilidad celular. Se anexa una tabla (Tabla II) que describe los componentes particulares de los medios de cultivo.

#### III.2 Actividad enzimática y medición de proteína

Después de 5 DIV las cajas fueron lavadas con PBS a 37°C y el tejido fue homogenizado en buffer de Imidazol 10 mM, pH 7.2 a una temperatura de 4°C. Este homogenizado se utilizó para los ensayos respectivos de actividad de la GAF y para la cuantificación de proteína.

TABLA II  
Componentes de los medios de cultivo (aminoácidos, vitaminas y otros)

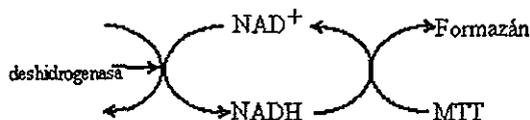
	SCM	CDM
<i>Aminoácidos (mg/ml)</i>		
L-Arginina-HCl	--	84.0
L-Arginina	17.4	--
L-Cisteína	12.0	48.0
L-Glutamina	292.0	584.0
L-Glicina	--	30.0
L-Histidina HCl·H <sub>2</sub> O	--	42.0
L-Histidina	8.0	--
L-Isoleucina	26.0	105.0
L-Leucina	26.0	105.0
L-Lisina HCl	--	146.0
L-Lisina	29.2	--
L-Metionina	7.5	30.0
L-Fenilalanina	16.5	66.0
L-Serina	--	42.0
L-Treonina	24.0	95.0
L-Triptofano	4.0	16.0
L-Tirosina	18.0	72.0
L-Valina	23.5	94.0
<i>Vitaminas (mg/ml)</i>		
Biotina	1.0	--
D-Ca pantotenato	1.0	4.0
Clruo de colina	1.0	4.0
Ácido fólico	1.0	4.0
<i>i</i> -inositol	2.0	7.2
Nicotinamida	1.0	4.0
Piridoxal-HCl	1.0	4.0
Riboflavina	0.1	0.4
Tiamina-HCl	1.0	4.0
<i>Otros</i>		
Suero fetal bovino inactivo	0.1 ml	--
Penicilina/estreptomicina	0.01 ml	.01 ml
Insulina	--	0.11883 UI
Progesterona	--	6.3E-14 (mg/ml)
Transferrina humana	--	0.1 (mg/ml)
Putrescina	--	0.016 (mg/ml)
Selenio	--	6.9E-11 (mg/ml)

La reacción se inició al añadir 20 µl del tejido a 80 µl de la mezcla de ensayo (la cual tiene 0.46 mM de  $^{14}\text{C}$ -Gln al inicio de la reacción) los blancos manejados (de 2 a 3 repeticiones) en vez de tejido tenían 20 µl de agua (Kvamme and Olsen, 1980). Todos estos fueron incubados por 20 minutos a 37°C y siempre se realizaron duplicados. La reacción se detuvo al añadir 1 ml de agua fría e inmediatamente se pasó por la columna de intercambio iónico. Se realizaron 3 lavados a la columna. En la primera elución se usó 5 ml de agua destilada la que fue colectada y llevada a los desechos radiactivos (contiene la  $^{14}\text{C}$ -Glutamina no usada). Posteriormente se lavó con 6 ml de ácido acético 5 mM se colectó y se desechó. Por último se lavó la columna con ácido acético 0.5M y se colectó 1 ml de la fracción 3, a la que se le añadió 10 ml de Tritosol.

La medición de la proteína se realizó según el método Bradford (Bradford, 1976), para lo cual se utilizó como máximo 10 µg/ml de proteína en tubos de ensayo, la muestra (por duplicado) fue llevada a un volumen final de 100 µl con agua destilada. Se agregó 1 ml del reactivo Bradford y se cuantificó la proteína después de 5 minutos y hasta 60 minutos a una  $\lambda$  de 595 nm.

### III.3 Determinación de la viabilidad celular

Se utilizó la técnica del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio] que ha servido para medir la proliferación y sobrevivencia en cultivos celulares (Mosman, 1983; Manthorpe et al., 1986; Edmonson et al., 1988) incluyendo cultivos de células granulares de cerebelo (Balázs et al., 1988). El método se basa en cuantificar la conversión del MTT en un producto insoluble en agua llamado azul de formazán y que es catalizada por deshidrogenasas de células viables de acuerdo a la siguiente reacción:



Vía de acción propuesta para la formación de azul de formazán

donde el hidrógeno liberado se combina con la sal de tetrazolio (MTT) para formar una sal de formazán.

### III.3 Métodos estadísticos utilizados para el análisis de los resultados

El uso de métodos estadísticos pretende interpretar de la manera más eficiente los resultados con el objeto de producir conclusiones válidas, y esto se debe a que la metodología estadística es la única forma de analizar problemas que involucran datos sujetos a errores experimentales. El método de análisis de los resultados depende directamente del diseño empleado, por lo que desde la planeación de los experimentos se tomó como base el modelo de efectos fijos, en donde la aleatorización de las condiciones y la obtención de réplicas de cada una de ellas fue un punto importante para obtener una estimación del error experimental. El error experimental es la unidad básica para determinar si las diferencias observadas en los datos son *estadísticamente significativas*, mientras que el uso de réplicas permite calcular una estimación más precisa del efecto de un factor en el experimento, si se

usa la media de la muestra (por ejemplo  $\bar{y}$ ) como una estimación de dicho efecto. Por otra parte, la aleatorización implica que tanto la asignación de material experimental como el orden en que son realizadas las pruebas individuales se determina en forma azarosa. La consecuencia inevitable de la aleatorización adecuada es la “cancelación” de los efectos extraños que pudieran estar presentes en el experimento.

Los métodos estadísticos *per se* no pueden probar que un factor (o factores) tienen un efecto particular, sólo proporcionan directrices para medir la veracidad y validez de los resultados. De esta forma, al ser aplicados adecuadamente no sólo permiten probar algo, sino que también hacen posible obtener el probable error de una conclusión, o mejor aún, permiten asignar un nivel de confiabilidad de los resultados agregando objetividad al proceso de toma de decisiones. Para corroborar que el modelo fuese el adecuado, se consultó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) en el que se reporta la magnitud de ajuste de los datos al modelo propuesto. La  $R^2$  obtenida en todos los experimentos siempre fue mayor al 90% lo que nos indicó que más del 90% de la variabilidad en la viabilidad y/o actividad enzimática es explicada por el factor o tratamiento.

A continuación se definen las variables utilizadas y se describe el modelo utilizado.

- *Variables*

X = Tipo de tratamiento: variable *nominal cualitativa* y define los tratamientos (variable independiente): sin tratamiento o control (CTRL), con potasio 40 mM (HK), con NMDA 150 $\mu$ M, con albúmina bovina completa, (ABC), Albúmina bovina libre de ácidos grasos (AB- ác. grasos), albúmina bovina libre de globulinas (AB- glob), albúmina de otras especies, con suero de diversas especies, o con insulina bovina a distintos niveles o concentraciones.

Y = Unidades de absorbancia: Variable *cuantitativa continua* y define a la variable de respuesta (variable dependiente).

- *Modelo*

Se utilizó el modelo de efectos fijos para el análisis de los datos. El modelo es el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

donde

$y_{ij}$  = es la  $i$ ésima observación del  $j$ -ésimo tratamiento

$\mu$  = es un parámetro común a todos los tratamientos denominado *media global*.

$\tau_j$  = es un parámetro único para el  $j$ -ésimo tratamiento llamado *efecto del tratamiento  $j$ -ésimo*.

$\varepsilon_{ij}$  = es la componente aleatoria del error.

$i = 1, \dots, k$  (número de observaciones)

$j = 1, \dots, n$  (número de tratamientos)

- *Estadística descriptiva*

Se presentan gráficas que describen (en por ciento de su control) el comportamiento de las células ante los diferentes tratamientos. En algunos casos se presentan las gráficas *Unidades de Absorbancia vs Condiciones* en las que se observa y describe la variación de los datos de cada tratamiento, dando un índice de dispersión de los datos dentro de cada tratamiento o entre ellos. En este tipo de gráficas se visualiza en forma *a priori*, si hay o no diferencias significativas entre las medias  $\mu_i$  vs  $\mu_j$  con  $i \neq j$ . Una de las ventajas de estas gráficas es que en ellas puede observarse la presencia de datos extremos, es decir datos que se alejan demasiado de los demás y que deben ser tomados en cuenta para análisis posteriores, pero sobre todo, en ellas puede observarse la desviación estándar de cada tratamiento.

- *Análisis de varianza*

Se realizó una comparación múltiple de las medias utilizando la prueba asociada al análisis de varianza. Éste análisis es una prueba exacta para la hipótesis de igualdad en las medias de los tratamientos y puede aplicarse si los supuestos para la prueba se cumplen (homogeneidad de varianzas, independencia de los residuos y normalidad de los residuos  $\varepsilon_{ij}$ ).

En la tabla de Análisis de varianza (ANOVA ) se prueba:

$$H_0: \tau_j = 0 \quad \forall j$$

$$H_1: \tau_j \neq 0 \quad p.a. j \text{ con } j=1,2,3$$

En términos de medias:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_j$$

$H_1$ : Al menos una media es diferente

Se consideró un  $\alpha = 0.05$  y si el *p-value* era mayor a 0.05, no rechazábamos  $H_0$  ya que existe evidencia de que  $\tau_j = 0 \quad \forall j$ , o bien de que  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_j$ , es decir, que no existe diferencia significativa entre los tratamientos o bien, que las medias de los tratamientos no son significativamente diferentes entre sí.

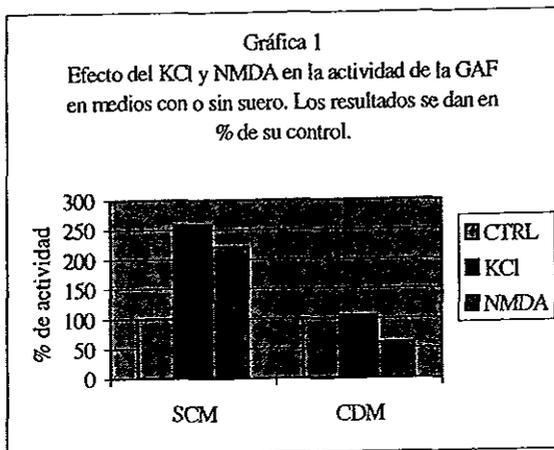
En el análisis de los datos, siempre se verificó que los supuestos de la ANOVA (homogeneidad de las varianzas, independencia y normalidad de los residuos) se cumplieran.

## IV Resultados

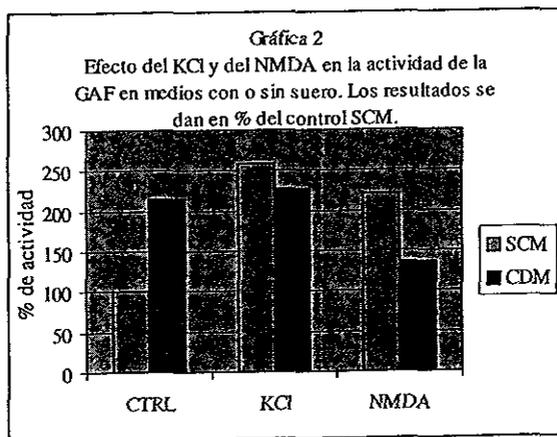
### IV.1 Actividades enzimáticas

En estudios previos se ha demostrado que el agonista glutamatérgico NMDA y el HK inducen un incremento en las actividades tanto de la AAT como de la GAF, no así de la GLDH. Las dos primeras son consideradas como enzimas *marcadoras del diferenciación de las células* en este estudio. Estas mismas condiciones también inducen un incremento específico en los niveles de Glu y Asp (datos no publicados). Una vez establecido que el efecto se encuentra mediado por los receptores del tipo NMDA, el siguiente paso fue estudiar el efecto del HK y del NMDA en medios suplementados con suero (SCM) o en medios químicamente definidos (CDM). La actividad de GAF en células mantenidas en un CDM por 5 DIV corresponde a un  $215.1\% \pm 40\%$  con respecto a la actividad en células control cultivadas en un SCM. La actividad de la GAF en células crecidas en un SCM se incrementó  $158.1 \pm 7\%$  ó  $220.6 \pm 7\%$  en presencia de HK o NMDA, respectivamente, en relación al control ( $100 \pm 14.8\%$ ). En contraste, cuando las células se cultivan en un CDM la actividad de la GAF no se modifica significativamente con HK e incluso se observa una *inhibición* con NMDA (Gráfica 1). Sin embargo, al comparar la actividad de la GAF inducida por HK o NMDA, ésta es mayor ( $226.7 \pm 7.7\%$  y  $136 \pm 3.4\%$ , respectivamente) en relación al las mismas condiciones en SCM (Gráfica 2).

La diferencia entre las medias que son estadísticamente significativas (tomando un valor de significancia de 0.05) se dan para las condiciones siguientes: CDM control vs CDM NMDA, SCM control vs todas las condiciones y esto se verifica en la gráfica 3.

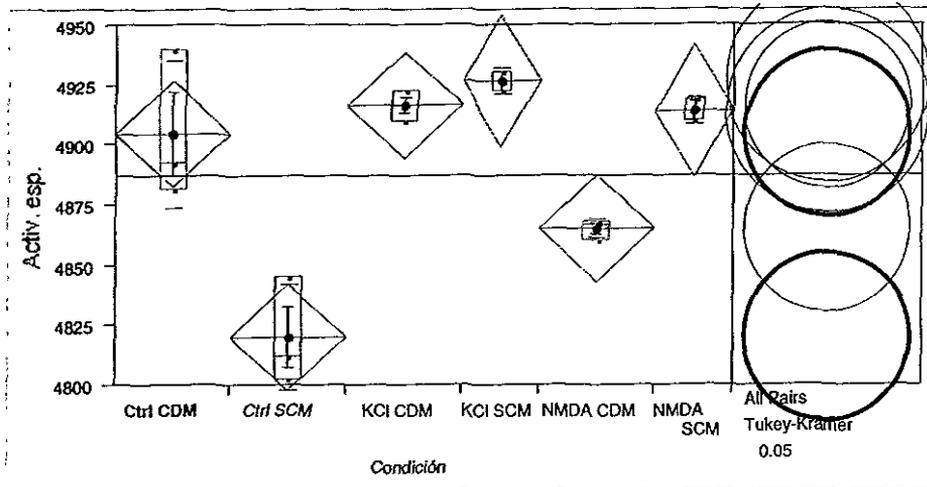


La actividad enzimática (en % del control SCM o CDM) se midió el 5 DIV. Las drogas fueron añadidas el 2 DIV y para cada tratamiento se utilizó una n=3. El tiempo total de incubación fue de 5 DIV.



La actividad enzimática (en % del control SCM ) se midió el 5 DIV. Para cada tratamiento se utilizó una n=3. El tiempo de incubación fue de 5 DIV.

Gráfica 3.  
Efecto del HK y del NMDA en la actividad de la GAF.



Gráfica de dispersión de datos en función de la *actividad específica vs condiciones* utilizadas (n=3).

El tiempo de incubación fue de 5 DIV.

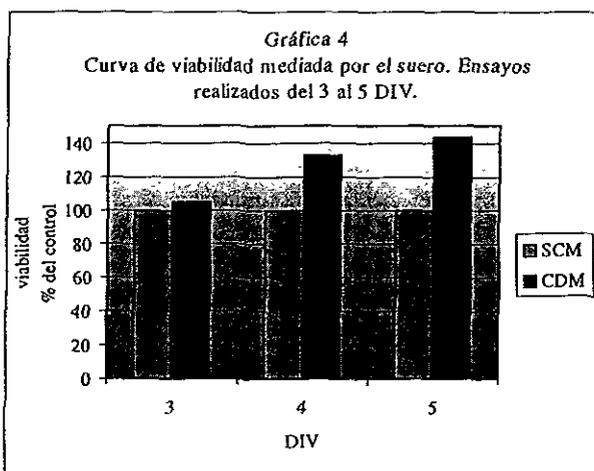
#### IV.2 Viabilidad celular mediada por distintos sueros o por algunos de sus componentes

Los experimentos que a continuación se describen reflejan el grado de sobrevivencia neuronal tomando como parámetro la reducción de la sal de tetrazolio.

##### IV.2.1 Establecimiento de las condiciones de cultivo

Como primera aproximación se cuantificó la viabilidad celular en función del medio utilizado a través del tiempo, por lo que se realizó una curva de viabilidad a distintos tiempos (3, 4 y 5 DIV, gráfica 4) encontrándose que la máxima viabilidad para medios definidos se da en el 5 DIV (43%±5.6% más viables que en SCM). Las diferencias en la viabilidad celular por día de ensayo y para cada cultivo son significativas a un valor de  $\alpha = 0.05$  (a excepción para las condiciones medidas en el 3<sup>er</sup> DIV). Morfológicamente, las células crecidas en un CDM presentan mejor apariencia en relación a las crecidas en un

SCM, lo que concuerda con lo hallado en la actividad de la GAF (gráficas 1,2 y 3) y la viabilidad medida con la técnica del MTT (gráficas 4 y 5). Cuando las células en CDM se tratan con HK o NMDA no se observa ningún efecto significativo en la sobrevivencia. Por el contrario, al añadir HK o NMDA a un SCM se favorece la apariencia física de las neuronas mostrando somas grandes con procesos largos y fuertes, además de presentar cúmulos, lo que no ocurre en los cultivos crecidos en un CDM (en este caso los somas son más pequeños, dispersos y con procesos frágiles).

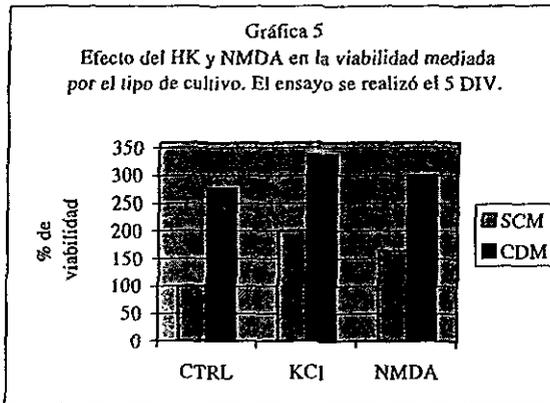


Se utilizó una n=3 para las células crecidas en SCM y para las crecidas en un CDM se usó una n=4.

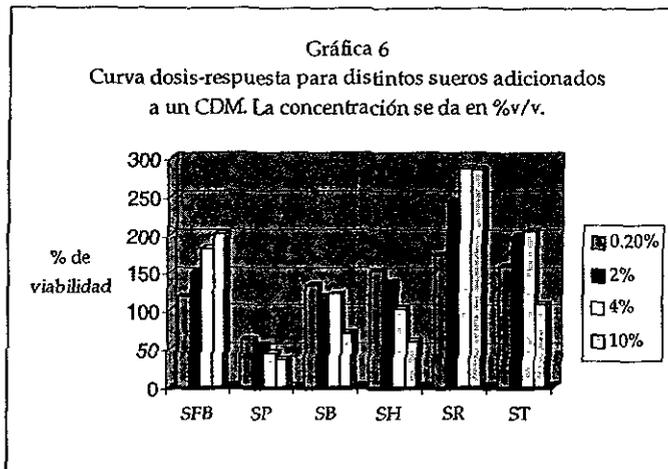
El porcentaje de error experimental o Ee (en términos de la desviación estándar), nunca pasó del 7%. No hay diferencia significativa para las condiciones CDM 4 y 5 DIV.

#### IV.2.2 Sueros

Células crecidas en un CDM fueron incubadas con sueros provenientes de diferentes especies, como el fetal bovino (SFB), pollo (SP), borrego (SB), hamster (SH), rata (SR) y ternera (ST) a concentraciones (%<sub>v/v</sub>) de 0.2, 2, 4 y 10 %, respectivamente. Gráficas 6-9. De estos, sólo el suero de pollo no incrementó la sobrevivencia, sino que por el contrario, disminuyó la viabilidad en más de un 50%.



Las células sembradas en SCM tuvieron una  $n=4$  y las crecidas en CDM una  $n=2$ . El porcentaje de error para el SCM control fue del 18%, para el SCM KCl del 3% y para el SCM NMDA del 8%, mientras que el %Ee para las condiciones CDM nunca pasó del 1%.



La viabilidad se midió el 5 DIV y como parámetro de comparación siempre se tomó al CDM control (sin ningún tratamiento). El tamaño de muestra utilizado por condición y el % de Ee fue: SFB  $n=4$  y 8%Ee, SP  $n=3$  con Ee del 5-29%, SB  $n=3$  con un %Ee no mayor de 10, SH  $n=4$  con Ee del 5 al 13 %, menos para la condición SH al 10%<sub>v/v</sub>, cuyo Ee es del 24% , SR  $n=3$  y Ee del 6-11%, y por último, ST  $n=4$  con un %Ee no mayor a 5%. El tiempo de incubación fue de 5 DIV.

En la tabla 1 se describen las concentraciones a las cuales los sueros de las especies utilizadas tuvieron un efecto máximo en la viabilidad celular.

Tabla 1

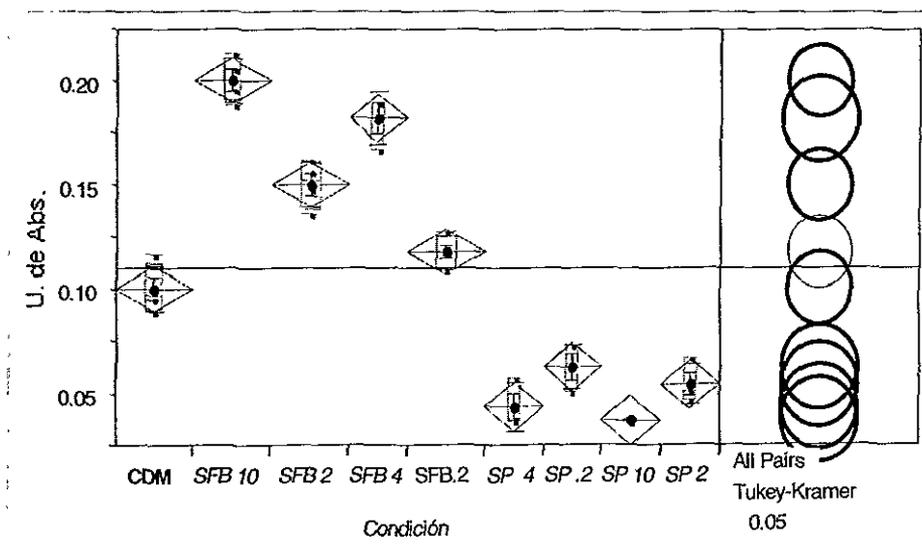
Dosis a las cuales la viabilidad celular mediada por los sueros utilizados es máxima.

Especie	Concentración	Incremento en la viabilidad (en % del control CDM)
Fetal bovino	10 % <sub>v/v</sub>	200.0 ± 6.4%
Borrego	0.2 % <sub>v/v</sub>	132.4 ± 7.6%
Hamster	0.2 % <sub>v/v</sub>	152.2 ± 7.0%
Rata	4.0 % <sub>v/v</sub>	290.0 ± 6.0%
Ternera	2.0 % <sub>v/v</sub>	205.0 ± 3.2%

El panorama general de las tendencias de cada tratamiento es presentado en las “gráficas de dispersión para los sueros” donde se compara el efecto de diversos sueros frente a un CDM control; en estas gráficas se observa una media global y la distribución de los tratamientos en relación a la misma (gráficas 7, 8, y 9).

Gráfica 7

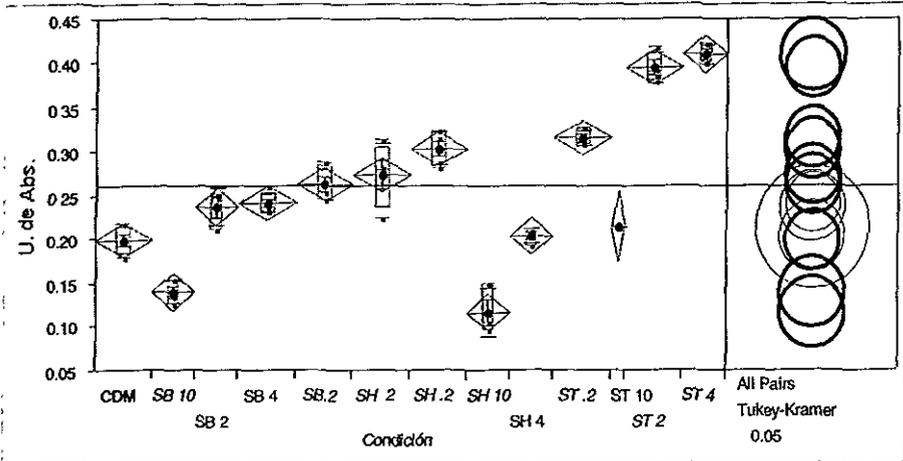
Gráfica de dispersión en donde se comparan las condiciones siguientes: CDM vs Suero fetal bovino (SFB), CDM vs Suero de pollo (SP) a concentraciones de 0.2, 2, 4 y 10 %<sub>v/v</sub>.



En esta figura se grafican las unidades de absorbancia vs condiciones representadas por el SFB (n=4) y el SP (n=3). La viabilidad celular fue medida con la técnica del MTT al 5 DIV.

Gráfica 8

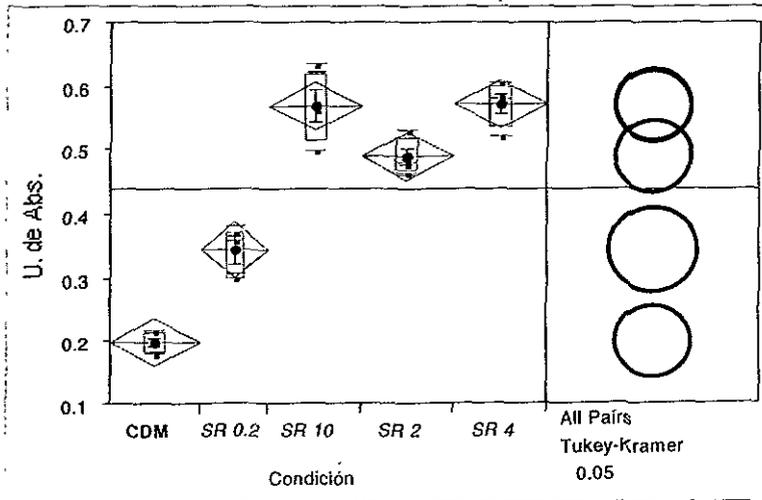
Gráfica de dispersión en donde se comparan las condiciones CDM vs Suero de borrego (SB), CDM vs Suero de Hamster (SH) y CDM vs Suero de ternera (ST) a concentraciones de 0.2, 2, 4 y 10 %<sub>v/v</sub>.



En esta figura se grafican las unidades de absorbancia vs condiciones representadas por el SB (n=3), SH (n=4) y ST (n=4). La viabilidad celular fue medida con la técnica del MTT a 5 DIV.

Gráfica 9

Gráfica de dispersión en donde se comparan las condiciones CDM vs Suero de rata (SR) a concentraciones de 0.2, 2, 4 y 10 %<sub>v/v</sub>.

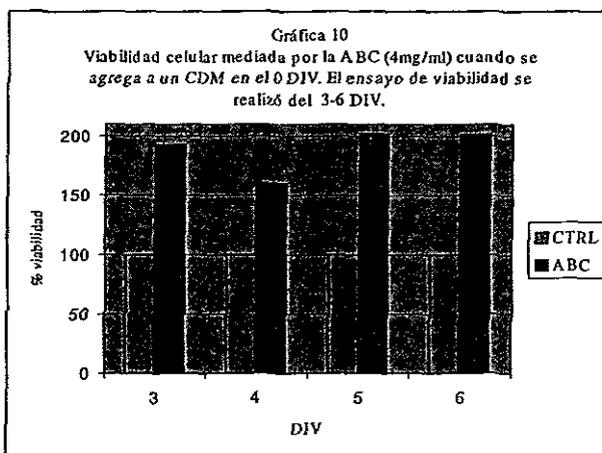


Gráfica de las unidades de absorbancia vs SR (n=3). La viabilidad celular fue medida con la técnica del MTT a 5 DIV.

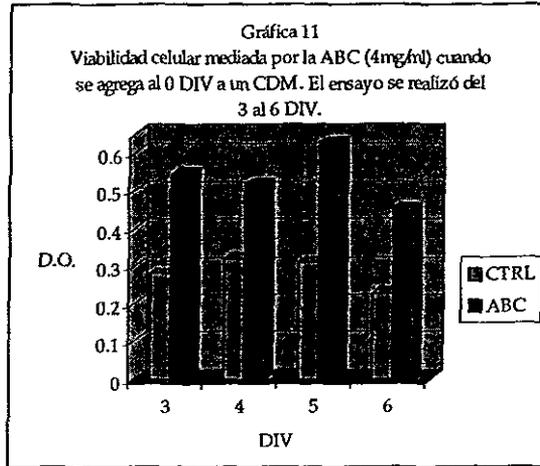
## IV.2.3 Albúmina

### IV.2.3.1 Albúmina bovina

A través de una curva de viabilidad y utilizando medios químicamente definidos (CDMs), se encontró que la albúmina bovina completa (ABC) a una concentración de 4 mg/ml incrementa la viabilidad en todos los días medidos, siendo máxima en los 5 y 6 DIV presentando incrementos respectivos del  $202.7 \pm 1.4 \%$  y del  $201.3 \pm 8.6 \%$  sobre el control, cuyo valor comparativo es del  $100 \pm 7.7\%$  (gráfica 10). En la gráfica 11 puede observarse que las células de los cultivos del 5 DIV son más viables que las de los cultivos del 6 DIV.

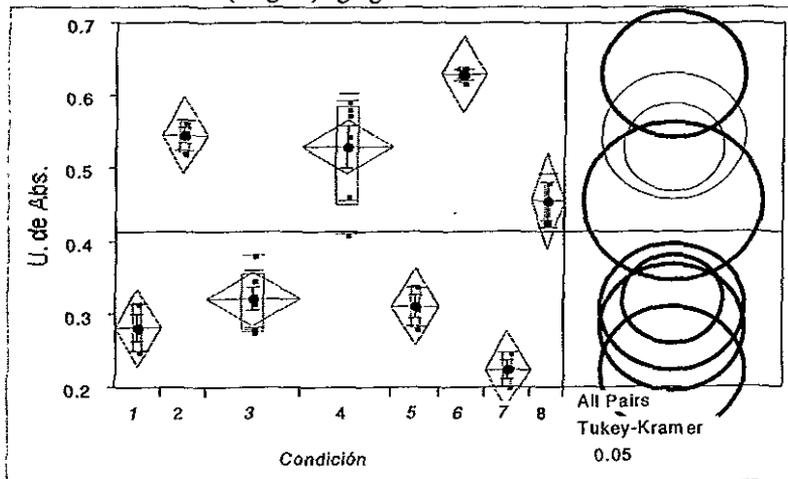


El porcentaje de viabilidad por DIV se proporciona en relación al control CDM respectivo. Los tamaños de muestra utilizados fueron:  $n=3$  en los 3, 5 y 6 DIV,  $n=8$  en el 4 DIV. El %Ee no sobrepasó el 10%.



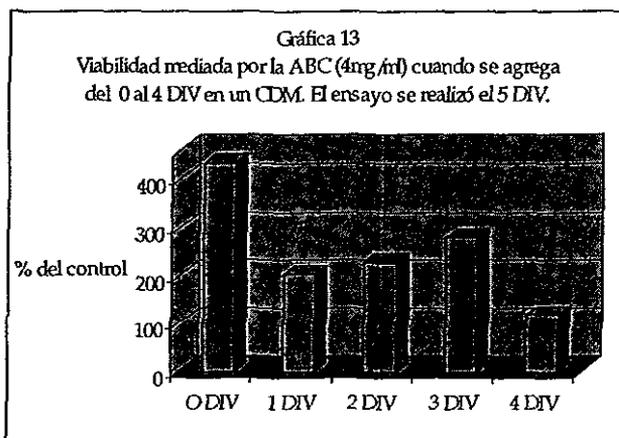
La viabilidad de las células se reporta en unidades de densidad óptica (D.O.). Los tamaños de muestra utilizados y los %Ee nunca sobrepasaron el 10%.

Gráfica 12  
Gráfica de dispersión de datos en donde se observa la viabilidad celular mediada por la ABC (4mg/ml) agregada el día 0 *in vitro*.



En esta gráfica (*Unidades de absorbancia vs Condición*) se presentan los valores de dispersión asociados a estos mismos resultados. Los números 1, 3, 5 y 7 representan a los cultivos crecidos en un medio con suero o SCM y cuya viabilidad se midió en los días *in vitro* 3, 4, 5 y 6, respectivamente. Equivalentemente, las condiciones 2, 4, 6 y 8 indican células crecidas en medios definidos a quienes se les agregó ABC el día 0 *in vitro*, y cuya viabilidad celular fue medida en los DIV 3, 4, 5 y 6.

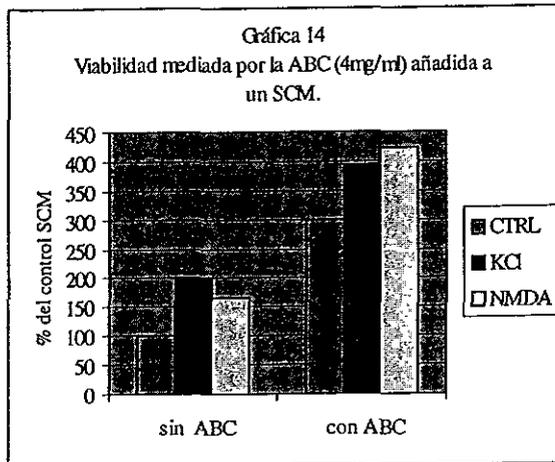
La ABC siempre induce un incremento en la viabilidad celular, pero éste es máximo cuando las células son cultivadas con albúmina desde que se inicia el cultivo. En la gráfica 13 puede observarse que el incremento del que se habla es del  $428.6 \% \pm 7.3 \%$ , o sea que este tratamiento es 4.28 veces más efectivo que la condición control (CDM sin ABC).



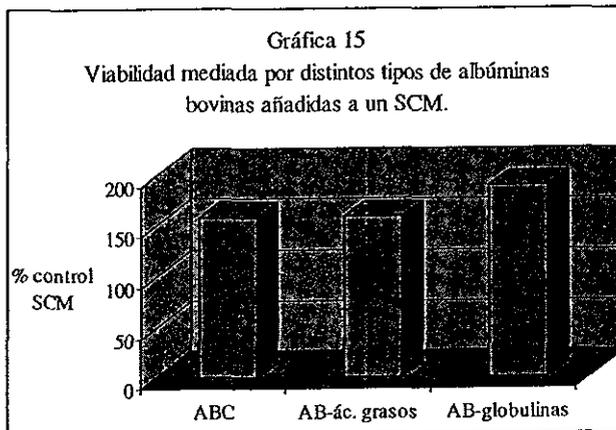
La albúmina se agregó al CDM en los DIV 0-4, utilizándose una  $n=4$  para el control y para la albúmina en el 0 DIV, una  $n=3$  para la ABC añadida en los DIV 1,2 y, por último, una  $n=2$  para la ABC agregada en los 3-4 DIV. El Ee no pasó del 10% en todas las condiciones.

De manera similar, la presencia de la ABC (4 mg/ml) desde el inicio del cultivo en un SCM también induce un aumento significativo en la supervivencia de las neuronas en cultivo (100% control SCM vs 300% ABC en SCM) y la presencia de HK o NMDA no incrementan más esta viabilidad, en términos absolutos. Las diferencias son estadísticamente significativas para un valor de confiabilidad del 95%.

Siguiendo esta misma línea de experimentos, distintas albúminas bovinas incompletas, tal como la albúmina sin ácidos grasos (AB-ác. grasos) o sin globulinas (AB-glob), fueron añadidas a un SCM para estudiar la posible participación de los ácidos grasos o globulinas en la sobrevivencia celular. Se encontró que la viabilidad de las células crecidas con albúmina sin ácidos grasos no es diferente a la observada con ABC en tanto que el incremento en la viabilidad dada por la albúmina sin globulinas, si lo es (gráfica 15).



La ABC se agregó a un SCM en el 0 DIV, el KCl y el NMDA se agregaron el 2 DIV y la viabilidad se midió en el 5 día de incubación. Se utilizó una n=4 para las condiciones sin ABC y una n=3 para las condiciones con albúmina. Los porcentajes de viabilidad se proporcionan en relación al control SCM. y en ambos grupos, el Ee nunca sobrepasó el 9%.



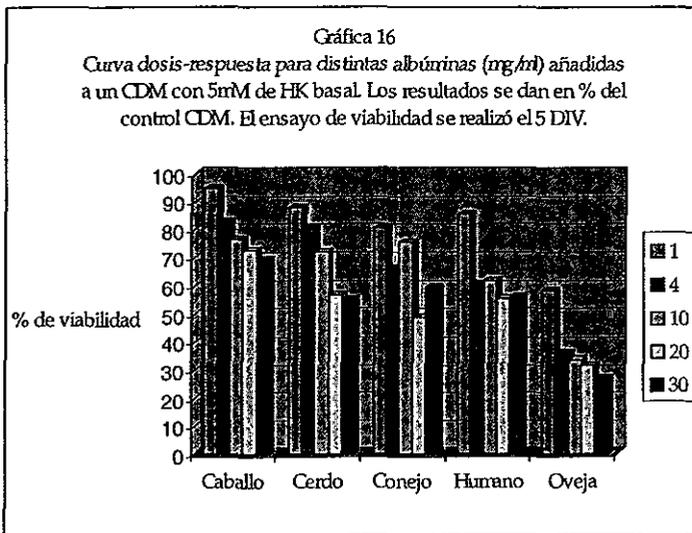
La viabilidad se midió el 5 día de incubación, utilizándose una n=3 para todos los tratamientos menos el control SCM (n=4) contra el cual se realizó todo el análisis. El Ee no pasó del 9%.

#### IV.2.3.2 Albúmina proveniente de diferentes especies

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de las células granulares de cerebelo en cultivo con bajo potasio y en presencia de albúminas provenientes de diferentes especies, se desarrollaron curvas dosis-respuesta para medios definidos. Como se observa en la gráfica 16, ninguna de las albúminas utilizadas favorecen la viabilidad celular, este efecto negativo es estadísticamente significativo para todas las condiciones al utilizar un valor de confiabilidad del 95%.

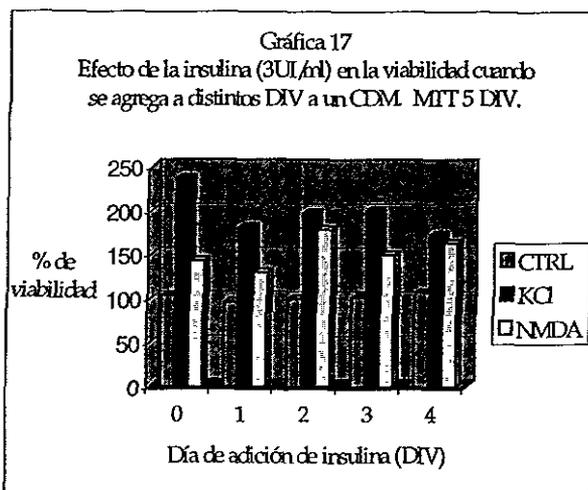
#### IV.2.4 Insulina bovina

La posible acción de la insulina en la viabilidad celular se verificó a través de diseños experimentales que pusieran en evidencia las condiciones que deben cumplir los cultivos para que estos favorezcan el desarrollo más óptimo de las neuronas en cultivo. Para cumplir estos objetivos, se utilizaron medios definidos que, a diferencia de los anteriores, no tenían insulina bovina basal, ya que ésta fue agregada al medio bajo condiciones específicas de trabajo.



Para todas las condiciones se utilizó una n=4 (menos para la albúmina de caballo n=3) y los Ee fluctuaban desde el 5% hasta el 15%.

La determinación del tiempo en que las neuronas deben ser estimuladas con insulina se verificó al ser añadida a los cultivos en los días 0 al 4 DIV, encontrando que la insulina *per se* no altera la viabilidad de las células pero su presencia aunada a la de condiciones de despolarización si se modifica. La gráfica 17 describe que los efectos más favorables en la viabilidad se presentan cuando la insulina se encuentra en presencia HK siendo máximo al añadirse desde el 0 DIV ( $232.6 \pm 3.2$  % sobre el control CDM).



Se utilizó una n=3 para las condiciones 0, 3 y 4 DIV y una n=4 para las condiciones 1 y 2 DIV. Los errores experimentales nunca fueron mayores al 10%.

Un análisis exploratorio de los efectos de tratamiento con sus respectivas incertidumbres es presentado en la gráfica de dispersión *Unidades de Absorbancia vs Tratamiento* (gráfica 18).

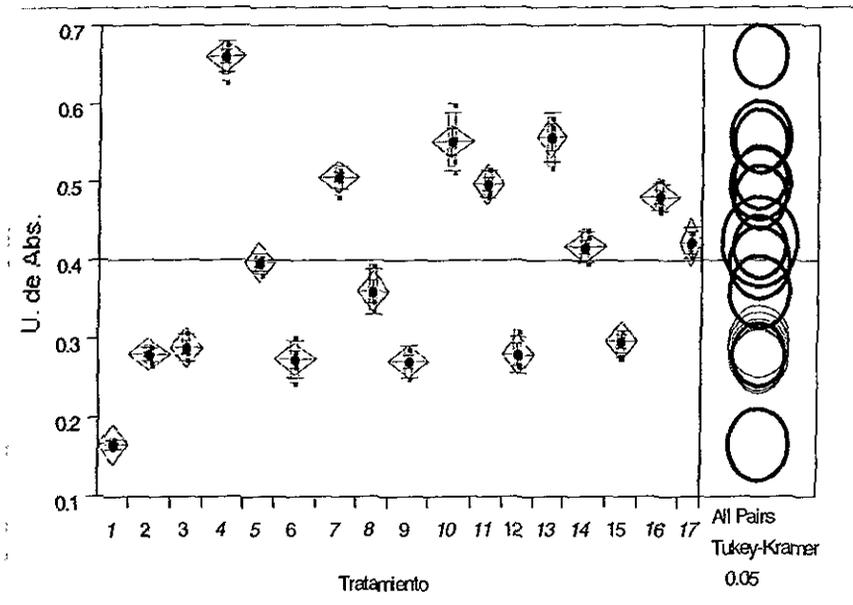
Por otra parte, para evaluar el tiempo en el que las células deben estar bajo la influencia de este componente y para encontrar la concentración óptima que favorezca en mayor medida la viabilidad de las mismas, la insulina fue agregada a los cultivos en el 0 DIV a las concentraciones de 0.03, 0.3, 1 y 3 UI/ml. La viabilidad modificada bajo estas condiciones de trabajo, fue monitoreada a distintos tiempos de incubación, por lo que los ensayos de viabilidad se realizaron en los DIV 3, 4 y 5, observando que el máximo efecto

sobre la supervivencia se tiene en el 4 DIV a la concentración de 0.03uI/ml ( $131 \pm 7.1\%$  contra un  $100 \pm 6.2\%$  del control CDM sin insulina basal, gráfica 19). Para este estudio también se reporta la gráfica de dispersión *Unidades de Absorbancia vs Tratamiento* (gráfica 20).

Gráfica 18

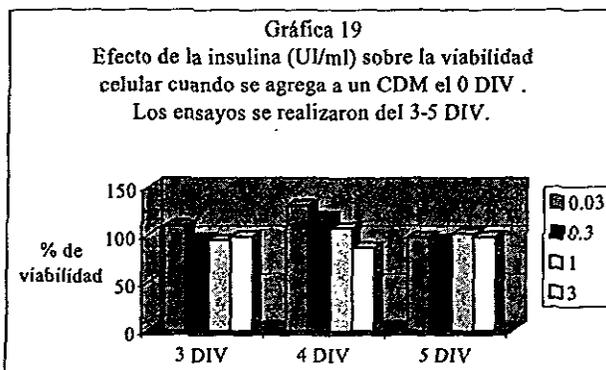
Gráfica de dispersión *Unidades de Absorbancia vs Tratamiento* para la insulina bovina (3UI/ml) agregada del 0 al 4 DIV a un CDM.

El ensayo de viabilidad se realizó el 5 DIV.



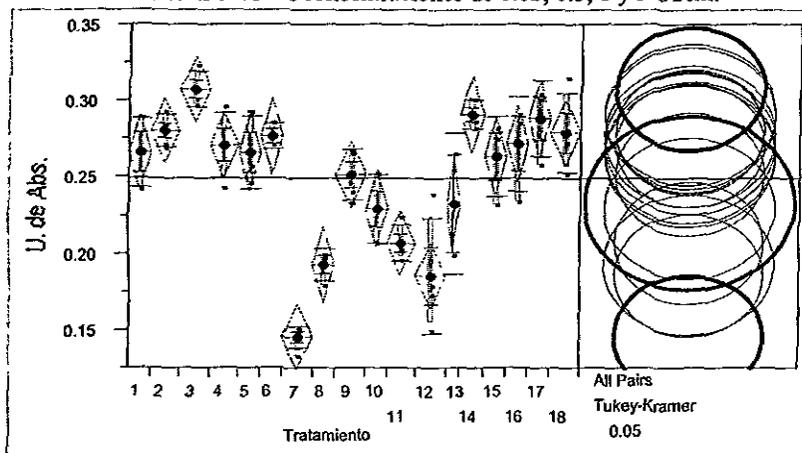
La descripción numérica de las condiciones experimentales utilizadas en esta gráfica es como sigue: controles SCM y CDM sin insulina basal, condiciones representadas por los numerales 1 y 2.

Los números 3, 4 y 5 (que representan al control, HK y NMDA, respectivamente) indican que la insulina se agregó el 0 DIV. Las condiciones representadas por los números 6, 7 y 8 (control, HK y NMDA) fueron suplementados con insulina el 1 DIV. Para las condiciones 9, 10 y 11 (control, HK y NMDA) la insulina fue añadida el 2 DIV. Las condiciones 12, 13 y 14 (nuevamente control, HK y NMDA) tienen insulina agregada el 3 DIV. Por último, a las condiciones 15, 16 y 17 (control, HK y NMDA) se les adicionó insulina el 4 DIV.



Para todos los tratamientos se utilizó una n=4 y el %Ee no fue mayor del 10%.

**Gráfica 20**  
**Tiempo de incubación con insulina bovina y su efecto en la viabilidad celular cuando se añade al 0 DIV a concentraciones de 0.03, 0.3, 1 y 3 UI/ml.**



La descripción numérica de las condiciones experimentales utilizadas en la gráfica 20 es la siguiente: los números 1, 7 y 13 representan a los controles SCM sin insulina basal, las células crecidas bajo este protocolo, se les midió la viabilidad en los DIV 3, 4 y 5, respectivamente, mientras que los números 2, 8 y 14 hacen exactamente lo mismo para el CDM sin insulina basal. Los números 3, 9 y 15 de la gráfica, indican que la viabilidad mediada por la insulina (0.03 UI/ml) fue medida en los DIV 3, 4 y 5, respectivamente. Las condiciones representadas por los números restantes, también describen esta misma situación, la única diferencia es que las concentraciones de insulina son diferentes, es decir, los números 4, 10 y 16, representan a las células crecidas con insulina a una concentración de 0.3 UI/ml y cuya viabilidad fue medida, respectivamente, en el 3, 4 y 5 DIV. La viabilidad modificada por la insulina a la concentración de 1 UI/ml se midió en los DIV 3, 4 y 5, las condiciones están representadas, respectivamente, con los números 5, 11 y 17. Las células crecidas con 3 UI/ml de insulina (condiciones 6, 12 y 18), se les midió la viabilidad en los DIV 3, 4 y 5.

## V Discusión

*El establecimiento de las interconexiones neuronales en el SNC requiere una correcta organización y dirección en la unión de sus procesos. Para entender la base de este proceso es necesario recurrir a la teoría neurotrófica, según la cual la sobrevivencia de las neuronas en desarrollo depende de factores específicos secretados por las células de quienes son inervadas. Esos factores tróficos son liberados en muy pequeñas cantidades y las células que no reciben ese tipo de moléculas mueren (Bulleit *et al.*, 1997; Bulleit *et al.*, 1998). Siguiendo esta línea de investigación, el presente trabajo pretendió establecer algunas de las condiciones requeridas por las células granulares de cerebelo para su desarrollo más óptimo; esto se verificó tanto en términos de actividad de una enzima glutamatérgica (GAF) como en términos de viabilidad celular. Para evaluar lo anterior, fue necesario la utilización de cultivos celulares que ayudaron a definir el papel que juegan los factores tróficos en la sobrevivencia celular en una población específica. La "simplificación" del modelo para tratar de inferir lo que ocurre *in vivo* implica la ganancia de *validez interna*, pero a cambio de esta se pierde *validez externa* (Montgomery, 1998), pues la aplicabilidad y validez de las conclusiones sólo serán para aquellas condiciones que cumplan las especificaciones del protocolo utilizado en el desarrollo de este tipo de experimentos.*

### V.1 Participación del suero en la activación de la GAF y en la promoción de la viabilidad celular

Anteriormente se comentó que el HK y el agonista glutamatérgico NMDA inducen un incremento en las actividades tanto de la AAT como de la GAF, no así de la GLDH, por lo que las dos primeras son consideradas como enzimas marcadoras del desarrollo para las células en estudio, así mismo, las dosis utilizadas de estos fármacos inducen un incremento específico en los niveles de Glu y Asp (datos no publicados). Debido a que el efecto positivo en las

actividades de estas dos enzimas es mediado por los receptores del tipo NMDA, se comparó el grado de activación de la GAF en función del tipo de suero encontrándose que la enzima en un medio químicamente definido ya se encuentra activa, que la presencia de HK no incrementa más la actividad y que el NMDA induce una disminución en la misma. La morfología celular también es diferente a la observada en un SCM por estos tratamientos, ya que las neuritas o conexiones neuronales en los cultivos CDM con HK y NMDA se ven más pequeños y los somas de menor tamaño aunque la viabilidad no se ve comprometida.

De acuerdo a estos resultados puede sugerirse que para que ocurra una activación de esta enzima (o la diferenciación) mediada por la despolarización (HK o NMDA) se requiere la presencia de uno o varios factores presentes en el suero.

Para establecer posibles diferencias entre el comportamiento del medio definido y del medio con suero (se utilizó suero fetal bovino o SFB), se realizó una curva de viabilidad para los días *in vitro* 3, 4 y 5, es decir, las células se mantuvieron en cultivo durante un periodo de tiempo definido y los ensayos de viabilidad se realizaron en el 3°, 4° o 5° día *in vitro* encontrando que el máximo en la viabilidad se produce en el 5° DIV (gráfica 4). Lo anterior se correlaciona con el momento en que se da la maduración bioquímica de las células granulares de cerebelo *in vivo*. Un aspecto importante es que la viabilidad celular es máxima para los medios CDM y que la presencia de HK o NMDA en los cultivos no incrementan más la viabilidad.

Todo esto permite corroborar que existe algo en el suero que en presencia de agentes despolarizantes como el HK y el NMDA promueve por lo menos la maduración morfológica y la activación de la GAF. Debido a que la estimulación de los receptores del tipo NMDA y la estimulación inespecífica del alto potasio conlleva a una entrada de calcio (que puede darse vía el receptor del tipo NMDA o a través de los canales de calcio voltaje dependientes, en el caso del potasio), permite sugerir que el efector es el calcio que desencadena una serie de señales que traen como consecuencia el incremento de la actividad de la GAF o la promoción de la viabilidad celular.

## V.2 Participación del suero proveniente de diferentes especies en la viabilidad celular

Se estudiaron distintos tipos de sueros con objeto de evaluar posibles diferencias entre las especies determinando cuál de estos favorece en mayor medida la viabilidad celular. Los sueros añadidos a un CDM fueron los sueros de rata, de ternera, borrego, hamster, fetal bovino y de pollo. Se observó que la especie que más favorece la viabilidad celular es el suero de rata a la concentración de 4% seguida por el fetal bovino con un incremento máximo a la concentración del 10%. Por otra parte, el suero de ternera también tiene un efecto máximo en la viabilidad a la concentración del 2%, mientras que los sueros de borrego y de hamster ejercen un efecto máximo en la viabilidad a la concentración del 0.2%, observándose un efecto tóxico a la concentración del 10%. Por último, el suero de pollo tiene un efecto tóxico significativo en todas las concentraciones utilizadas.

Según estos resultados, la viabilidad de las neuronas depende de algunos factores presentes en el suero. Esta acción es mayor al utilizar altas concentraciones de suero fetal mientras que, al utilizar sueros de adultos, la concentración requerida por las células en cultivo generalmente es baja (<4 %<sub>v/v</sub>).

## V.3 Participación de la albúmina

Análisis bioquímicos de algunos de los constituyentes del suero ponen en evidencia que el componente principal del suero es la albúmina (Andrews, 1981) y pensando en que ésta puede regular algunos eventos del desarrollo, se evaluó su posible participación mediante ensayos de viabilidad celular. Para este efecto, las células se incubaron con albúmina bovina completa (ABC) añadida a un CDM desde el inicio del cultivo (0 DIV), encontrándose que el pico máximo se presenta en el 5° día de incubación con albúmina (gráficas 10 y 11). La albúmina parece ser la responsable del efecto promotor de la viabilidad celular, ya que si a ésta se le eliminan los ácidos grasos, no se observa ningún efecto aditivo. Por otra parte, si a la albúmina le son eliminadas las globulinas, entonces se observa un incremento significativo en la viabilidad,

lo que sugiere que las globulinas pueden tener una acción directa o indirecta bloqueando a la albúmina o bien ejerciendo un efecto *per se* en la inducción de muerte (gráfica 15).

El diseño para establecer la participación de la albúmina en la viabilidad, no da información acerca de su forma de actuar, y tal como ocurrió en el caso de los sueros, no se sabe si tiene acción directa en la activación de genes tempranos o si participa indirectamente como factor trófico; sólo puede decirse que estos componentes son, por lo menos, indispensable para mantener y promover la viabilidad celular desde que las células dejan de proliferar y se preparan para iniciar su recorrido migratorio a través de la capa molecular. Resulta interesante ahora conocer si el efecto de los sueros es mediado por una acción de la albúmina que los constituyen.

#### V.4 Papel de la insulina

Utilizar insulina bovina como factor de estudio se basa en el hecho de que en el desarrollo postnatal del cerebelo, las células de Purkinje producen IGF-I, lo que sugiere un potencial factor regulador del número de granulares viables. Estudios recientes indican que en la diferenciación de este tipo celular, el crecimiento de las neuritas se ve favorecido por la presencia de IGF-I (Bullei, 1997).

En este estudio se encontró que la insulina *per se* no incrementa la viabilidad celular, independientemente del día en que esta haya sido añadida a los cultivos. Bajo condiciones despolarizantes el panorama cambia. Cuando las células son tratadas con HK, la viabilidad celular tiene un pico máximo en el 0 DIV mientras que en el NMDA ocurre al 2DIV (gráficas 18-19), no obstante, este incremento en la viabilidad puede ser mimetizado por la despolarización ejercida tanto por el HK como por el NMDA. De aquí se desprende que la insulina por sí misma no participa en la promoción de la viabilidad celular sino que promueve la acción de otras condiciones que sí la afectan.

Estudios realizados por Bullei *et al.* (1997), ponen de manifiesto que las granulares de cerebelo provenientes de ratas de 7 días de nacidas al ser estimuladas con IGF-I tienen mejor apariencia que las células crecidas sin IGF-I, además de permitir que las células sigan

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

diferenciándose. En esa misma línea de investigación, Bullei *et al.* (1998) demostró que la despolarización ejercida por el KCl antagoniza la acción mitótica promovida por IGF-I sobre las granulares además de incrementar la expresión de un marcador de diferenciación temprana que se expresa tanto en neuronas postmitóticas premigratorias de la EGL como en células migrantes.

De esta forma, el KCl parece modificar eventos intracelulares que conllevan a la maduración de las neuronas, además de que este parece apresurar el proceso de diferenciación al acelerar, a su vez, la expresión de genes tempranos (Dandennault, *et al.* 1996). Lo Turco *et al.* (1995) sugiere que el mecanismo asociado a la acción del KCl, involucra la activación de canales de calcio voltaje dependientes en las granulares, lo que trae como consecuencia el incremento de calcio intracelular y que se traduce tanto en una inhibición de la actividad mitótica ejercida por la insulina, como un promotor de la diferenciación celular. La participación del NMDA en los eventos de viabilidad celular puede estar mediada (al igual que en el caso del potasio) por un incremento del calcio intracelular.

## VI Conclusiones

- La sobrevivencia celular y la actividad de la GAF se incrementan con HK o NMDA sólo en medios con suero, no obstante, la viabilidad celular y la actividad basal de la GAF son mayores en los cultivos CDM en relación a las células crecidas en SCM.
- Los sueros promueven la sobrevivencia dependiendo de la especie. El orden de eficiencia es el siguiente: rata>> fetal bovino=ternera> hamster ≈borrego.
- La albúmina promueve la sobrevivencia tanto en un SCM como en CDM.
- La albúmina no modifica significativamente el aumento en la sobrevivencia inducido por HK o NMDA por lo que el efecto de la albúmina no está relacionado con los mecanismos involucrados en el efecto trófico del HK y NMDA.
- La albúmina libre de ácidos grasos no tiene un comportamiento significativamente diferente al de la ABC por lo que la albúmina per se es la responsable del efecto promotor de la viabilidad celular.
- La viabilidad celular se incrementa más cuando se utiliza una albúmina libre de globulinas, lo que sugiere que estas moléculas tienen un efecto tóxico.
- La insulina per se no tiene ningún efecto en la viabilidad neuronal.
- Estos resultados sugieren la presencia de factores permisivos (como la albúmina) que promueven la sobrevivencia de las células granulares de cerebelo sugiriendo que ni la albúmina ni la insulina están involucradas en la acción trófica del HK y del NMDA. Se sugiere que el efecto de los distintos sueros medidos sobre la sobrevivencia podría estar mediada por la presencia de albúmina en éstos.

## VII Referencias

1. Abraham, J., J. Whang, A. Tumulo, *et al.*, Human fibroblastic growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.* 5(1986):2523-2528.
2. Altman. Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. *Experimental Brain Res. Supplement* . 6(1982):8-49;
3. Altschuler, R.A., D.T. Monaghan, W.G. Haser, R.J. Wenthold, N.P. Curthoys and C.W. Cotman. Immunocytochemical localization of glutaminase-like immunoreactivities in the rat and guinea pig hippocampus. *Brain Res.* 330(1985):225.
4. Andrews, A. T. 1981. *Electrophoresis: Theory, techniques and biochemical and clinical applications*. Clarendon Press, Oxford. 10, p 247.
5. Aoki, C., T. Milner, S.B. Berger, K.F.R. Shev, J.P. Blass and V.M. Pickel. Regional distribution of astrocytes with intense immunoreactivity for glutamate deshydrogenase in rat brain: implication for neuron-glia interactions in glutamate transmission. *J. Neurosci.* 7(1987):2214.
6. Balázs, R., Gallo, V. Kingsbury, A. Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Dev. Brain Res.* 40(1988a):269-276
7. Balázs, R., N. Hack and O.S. Jørgensen. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effects on differentiating cerebellar granule cells. *Neurosci Lett.* 87(1988c):80-86.
8. Balázs, R. y N. Hack. 1990. Trophic effects of excitatory amino acids in the developing nervous system. In *Excitatory amino acids and neural plasticity*. Edited by Yehzekel Ben-Ari. Plenum Press, N. Y. 221-234 pags.
9. Balk, S.D. Calcium as a regulator of the proliferation of normal but not transformed chick fibroblasts in plasma containing medium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68(1971):271- 275;
10. Barde, Y.A. Trophic Factors and Neuronal Survival. *Neuron*.2(1989):1525-1534
11. Benjamin, A.M. Control of glutaminase activity in rat brain cortex *in vitro*: influence of glutamate, phosphate, ammonium, calcium and hydrogen ions. *Brain Res.* 208(1981):363.
12. Benuck, M., F. Stern and A. Lajtha. Transamination of amino acids in homogenates of rat brain. *J. Neurochem.* 19(1972):949
13. Bigot, D. Matus, A. and Hunt, S.P. Reorganization of the cytoskeleton in rat neurons following stimulation with EAA *in vitro*. *European J. of Neurosc.* 3(1991):551-558.
14. Brüstle, O., *et al.* Host-Guide Migration Allows Targeted Introduction of Neurons into the Embryonic Brain. *Neuron.* 15(1995):1275-1285
15. Burgoyne and Cambray-Deakin. The cellular neurobiology of neuronal development: The cerebellar granule cell. *Dev. Brain Res.* 3(1988):77-101
16. Burgoyne *et al.* NMDA raises cytosolic calcium concentration in rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosc. Let.* 91(1988):47-52.
17. Burgoyne R.D. and M.A. Cambray-Deakin. *Cell Brain Res. Rev.* 13(1988):77-101.
18. Burgoyne, R.D. Graham and Cambray-Deakin M. Neurotrophic effects of NMDA-R activation on developin Cerebellar Ganulle Cells. *J. of Neurocytology* 22(1993):689-695.
19. Cambray-Deakin and Burgoyne. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and NMDA-stimuled neuritogenesis in rat ccrebellar granule cell cultures. *Dev. Brain Res.* 66(1992):25-32.

20. Cambray-Deakin, M.A. J. ADU and Burgoyne, R.D. Neuritogenesis in cerebellar granule cells in vitro. *Dev. Brain Res.* 37(1990a):40-46.
21. Cambray-Deakin. The expression of excitatory amino acid binding sites during neuritogenesis in the developing rat cerebellum. *Developmental Brain Res.* 54(1990b):265-271.
22. Carpenter, G. and S. Cohen. Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem.* 48(1979):193-216.
23. Collingridge, G.L. and T.V.P. Bliss. NMDA receptors: their role in long-term potentiation. *Trend. Neurosci.* 10(1987):288-531.
24. Cull-Candy S.G. y D.C. Ogden. *Proc. R. Soc. London.* 224(1985):367-373.
25. Choi, D. and S.M. Rotman. Exitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Ann. Rev. Neurosci.* 13 (1990):171
26. Choi, D. Calcium mediated neurotoxicity relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 11(1988):465.
27. Cotman, CW., D.T. Monaghan, and A.H. Ganong. Excitatory Amino Acid Neurotransmission: NMDA Receptors And Hebb-Type Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 11(1988): 61-80.
28. Derynck, R. Transformig growth factor alpha. *Cell.* 54 (1988):593-59
29. Donnogue, J.P., R.J. Wenthold and aspartate aminotransferase-like immunoreactivity in neurons of cerebral cortex. *J. Neurosci.* 5(1985):2597.
30. Eimerl, S. and M. Schramm. Acute glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells: agonist potency, effects of pH, Zn<sup>2+</sup> and the potentiation by serum albumin. *Brain Res.* 560(1991):282-290.
31. Engelsen, B., V. Fosse, E. Myrseth and E. Fonnum. Elevated concentration of glutamate and aspartate in human ventricular cerebrospinal fluid (vCSF) during episodes of increased CSF-pressure and clinical signs of impaired brain circulation. *Neurosci. Lett.* 62(1985):97.
32. Ferrari, G., M.C. Minozzi, G. Toffano, A. Leon and S.D. Skaper. *Dev. Biol.* 133(1989):140-147.
33. Fishell, G. Hatten, M. Astrotactin Provides a Receptor System for Glia-Guided Neuronal Migration. *Development.* 113(1991):755-765
34. Fonnum, F. The distribution of glutamate decarboxylase and aspartate transaminase in subcellular fractions of rat and guinea pig brain. *Biochemistry J.* 106(1968):401
35. Fonnum, F., J. Storm-Mathisen and F. Walberg. Glutamate decarboxylase in inhibitory neurons: A study of the enzyme in Purkinje cell axons and butons in the cat. *Brain Res.* 116(1970):259
36. Fonnum, 1984 Advanced study institute on amino acid as chemical transmitters. Plenum Press, N.Y.
37. Fonnum, F. Determination of neurotransmitter amino acid turnover. *Neuromethods.* 3(1985):201
38. Fonnum, F. Neurochemical studies on glutamate mediated neurotransmission, in *Excitatory Amino Acids.* Meldrum, B.S. F. Meroni, R. P. Simen and J. H. Woods Eds. Raven Press, New York. 1991. Cap. 15.
39. Fonnum, 1991. *EAA.* Raven Press, N.Y. Cap.15. Siegel, 1994. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Raven Press, New York. Cap. 17.

40. Fonnum, F., H. Christesen and E.M. Fykse. The role of synaptic vesicles defining the transmitter pool of amino acids. *Mol. Pharmacol.* 2(1992):589.
41. Fonnum, F., H. Christensen and E.M. Fykse. The role of synaptic vesicles defining the transmitter pool of amino acids. *Mol. Neuropharmacol.* 2(1992):3
42. Garthwaite and Brodbelt. Synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the mossy fibre pathway in adult and immature rat cerebellar slices. *Neurosci.* 29(1989):401-412.
43. Garthwaite G. y J. Garthwaite *Neuroscience.* 17(1986):755-767.
44. Gray. The granule cells, mossy fibres and Purkinje spine synapses of the cerebellum: light and electron microscope observations. *J. of Anatomy.* 95(1961):345-356.
45. Gray, A., T. Dull and A. Ullrich. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128 000 molecular weight precursor. *Nature.* 303(1983):722-725
46. Gregory, H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature.* 257 (1975): 325-327.
47. Handbook of Exp. Pharm. 95/I,II. Berlin: Springer-Verlag Schwartz, J.P Neurotransmitters as Neurotrophic Factors. *International Review of Neurobiol.* 34(1993).
48. Harris, E.W., D.R. Stevens and C.W. Cotman. Hippocampal cells primed with quisqualate are depolarized by AP4 and AP6, ligands for a putative glutamate uptake site. *Brain Res.* 418(1987):361.
49. Hatten, M. The role of migration in central nervous system neuronal development. "Current Opinion in Neurobiology". 3(1993):38-44.
50. Hertz, L. y A. Schousboe. 1987. Primari cultures of GABAergic and glutamatergic neurons as model systems to study neurotransmitter functions. In *Differentiated Cells. In: Model Systems of developmental and agin of the nervous system.* Martinus Nijhoff Publishing. 19-31 pag.
51. Hitoshi Kumoro and Pasko Rakic. Selective Role of N-Type Calcium Channels in Neuronal Migration. *Sci.* 257(1992):806-809.
52. Hong Cui, Robert F. Bulleit. Potassium chloride inhibits proliferation of cebellar granule neuron progenitors. *Dev. Brain Res.* 106(1998):129-135.
53. Hudson, D.B., T. Balcana, G. y P.A. Timiras. *Neurechem. Res.* 1(1976):73-81.
54. Jaye, M., R. Howk, W. Burguess, *et al.*, Human endotelial growth factor; cloning nucleotide sequence and chromosomal localization. *Science.* 233(1986):541-545.
55. Jhonson. J.W. and P. Ascher. *Nature.* 3256(1987):529-531.
56. Kato, K., Kanamori, A., Wakamatsu, Y., Swai, S. and H. Kondoh. Tissue distribution of N-myc expression in the early organogenesis period of the mouse embryo. *Dev. Growth Diff.* 33(1991):29-36.
57. Kingsbury, A., V. Gallo, P. L. Woodhams and R. Balázs. Survival, morphology and adhesion properties of cerebellar interneurons cultured in chemically defined and serum-supplemented medium. *Dev. Brain. Res.* 17(1985):17-25.
58. Knusel, B., P.P. Michel, J.S. Schwaber and F. Hefti. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J. Neurosci.* 10(1990):558-570

59. Kumoro H. and P. Rakic. Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Sci.* 257(1992):806-809.
60. Kumoro, H. y P. Rakic, Modulation of Neuronal Migration by NMDA-Receptors. *Sci.* 260(1993):95-97, 1993.
61. Kvamme, E., G. Svenneby and I.A. Torgner. Calcium stimulation of glutamino hydrolisis in synaptosomes from rat brain. *Neurochem. Res.* 8(1983):25
62. Kvamme, E. I.A. Torgner and B. Roberg. Evidence indicating that pig renal phosphate-activated glutaminase has a functionally predominant localization in the inner mitochondrial membrane. *J. Chem.* 266(1991):13185
63. Leeson y Leeson. 1985 *Histología*.
64. Leong, S.F. and J.B. Clarck. Regional development of glutamate dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem.* 43(1984):106
65. Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor: thirty-five years later *EMBO J.* 6(1987):1145-1154.
66. Lin, Xi, R. F. Bulet. IGF-I is a critical trophic factor for developing cerebellar granule cells *Dev. Brain Res.* 99 (1997)234:242
67. Magee, S.C. and A.T., Phillips. Molecular properties of the multiple aspartate aminotransferases purified from rat brain. *Biochemistry.* 10(1971)
68. Maisonpierre, P.C., L. Belluscio, S. Squinto, N.Y. Ip, M.E. Furth, R.M. Lindsay and G.D. Yancopoulos. *Science.* 247(1990):1446.1451.
69. Martínez-Hernández, A., K.P. Bell and F. Walberg. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Sci.* 240: (1977):1356.
70. Mayer, M.L. 1. *Nature.* 309(1984):261-263.
71. Mayer, M.L. G.L. Westbrook and I.D. Forsythe. 1987. NMDA receptor and Function: Clues from Biophysical Experiments. In *Excitatory Aminoacid transmission*. Proceedings of a Satellite Symposium to 30<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences Held in Banff, Alberta Canada. Alan R. Liss, INC., New York. 1-18 pags.
72. McGeer, E.G. and P. McGeer. Localization of glutaminase in rat neostriatum. *J. Neurochem.* 32(1979):1071
73. Meldrum B. and J. Garthwaite. Excitatory aminoacid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends. Pharmacol. Sci.* 11(1991):81.
74. Milani, D. et al. *J. of Neurosc. Res.* 28(1991):411-434; Balázs, et al., 1988. *Dev. Brain Res.* 40(1988):269-276.
75. Monhagan, D.T. y A.H. Ganong *Ann. Rev. Neurosci.* 11(1988):61-80.
76. Monaghan, D.T., R.J. Bridges and C.W. Cotman. The excitatory amino acid receptors: ther classes, pharmacology and distinct properties in the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 29(1989):365-402.
77. Montgomery, 1998. *Diseño de experimentos. Iberoamérica, México.* 800pp
78. Naito, S. and T. Ueda. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44(1985):99Fonnum, F., H. Christensen and E.M. Fykse. The role of synaptic vesicles defining the transmitter pool of amino acids. *Mol. Neuropharmacol.* 2(1992):3.
79. Nakanishi, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 258(1992):597.
80. Nishi, R. and D. K. Berg. *Dev. Biol.* 87(1981):301-307.

81. Nowak P.G., P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbert, and A. Prochiantz. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307(1984):462-465.
82. Olverman, H.J., A.W. Jones y J.C. Watkins. L-glutamate has higher affinity than other amino acids for [3H]-D-AP5 binding sites in rat membranes. *Nature*. 307(1984):460-462.
83. Ottersen, O.P. and J. Storm-Mathisen. Different neuronal localization of aspartate-like and glutamate-like immunodistribution of  $\phi$ -aminobutyrate. *Neurosci.* 6(1985):589
84. Ottersen, O.P., N. Zhang and F. Walberg. Metabolism compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neurosci.* 4(1992):519.
85. Palailogos G., L. Hertz and A. Schousboe. Evidence that aspartate amino transferase and mitochondrial dicarboxylate transport for release of endogenously and exogenously supplied neurotransmitter in glutamatergic neurons. *Neurochem. Int.* 14(1989):359-366.
86. Pearce, I.A., Cambray-Deakin M.A. and Burgoyne, R.D. Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Let.* 223(1987):143-147.
87. Pumain, R. and U. Heinemann. Stimulus -and amino acid- induced calcium and potassium changes in rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 53(1985):1-16.
88. Rashid and Cambray-Deakin. N-methyl-D-aspartate effects on the growth, morphology and cytoskeleton of individual neurons in vitro. *Dev. Brain Res.* 67(1992):301-308.
89. Ribak, C.E., J.E. Vaughn, K. Silo, K. Karber and E. Roberts. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat substantia nigra. *Brain Res.* 116(1976):28.
90. Ross, R., E. Raines and D. Bowen-Pope. The biology of the platelet-derived growth factor. *Cell* 46(1986):155-169
91. Rotman, S.M. and J.W. Olney. Excitatory and the NMDA receptor. *Trends Neurosci.* 10(1987):299.
92. Savage, C., T. Inagami and S. Cohen. The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 247(1972)
93. Sawai, S., Kato, K., A., Wakamatsu and H. Kondoh. Organization and expression of the chicken N-myc gene. *Mol. Cell. Biol.* 10(1990):2017-2026.
94. Sawai, S., A. Shimono, Y. Wakamatsu, C. Palmes K.Hanaoka and H. Kondoh. Defects of embryonic organogenesis resulting from targeted disruption of the N-myc gene in the mouse. *Development.* 117(1993):1445-1455.
95. Seeburg, P.H. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 14(1993):287
96. Schoepp, D.D. Novel function for subtypes metabotropic glutamate receptors. *Neurochem. Int.* 24(1994):439.
97. Schramm, M., S. Eimerl and E. Costa. NMDA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(1990):1193-1197.
98. Schwartz, J.P. Neurotransmitters as Neurotrophic Factors. *International Review of Neurobiol.* 34(1993):
99. Schulte, M.K., R.J. Roon, D.J. Chalmers, D.C. Sunter and J.F. Koerner. Utilization of the resolved L-isomer of 2-amino-6-phosphohexanoic acid (L-AP6) as a selective agonist for a quisqualate-sensitized site in hippocampal Ca1 pyramidal neurons. *Brain Res.* 649(1994):439.

100. Seeburg, P.H. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 14(1993):287.
101. Shoyab, M., G.D. Plowman, V.L. McDonald, J.G. Bradley and G.J. Todaro. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science.* 243(1989):1074-1076
102. Siegel, 1994. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Raven Press, New York. Cap. 17, págs. 367-387.
103. Sievers, J., B. Mausmann, B. Unsicker and M. Berry. *Neurosci. Lett.* 76(1987):157-162.
104. Sporn, M.B., Roberts, A.B. 1990. Peptide Grow Factors and Their Receptors. *Handbook of Exp. Pharm.* 95/I,II
105. Staton, B. R., Perkins, A. S. Tessarollo, L., Sassoon, D. A. and Parada, L. T. Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev.* 6(1992):12-23.
106. Wakamatsu, Y. *Et al.* Regulation of the neural crest cell fate by N-myc: Promotion of ventral migration and neural differentiation. *Development.* 124(1997):1953-1962.
107. Watkins, J.C. and R.H. Evans. Excitatory amino acid transmitters. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 21(1981):165.
108. Watkins, J.C., P. Krosggaard-Larsen and T. Honoré. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and antagonists. *Trends Pharmacology Sci.* 11(1990)
109. Wenthold, R.J., K.K., Skaggs and R.A., Altschuler. Immunocytochemical localization of aspartate aminotransferase and glutaminase immunoreactivities in the cerebellum. *Brain Res.* 363(1986):371.
110. Wong et al., 1986 *EAA.* cap 17. Raven Press, N.Y. págs. 367-387
111. Wurdí, S. and Y. Kugler. Histochemistry of glutamate metabolizing enzymes in the rat cerebellar cortex. *Neurosci. Lett.* 130(1991):165.

## Agradecimientos

Agradezco el apoyo brindado por los Doctores Julio Morán Andrade y Herminia Pasantes-Morales, así como la supervisión y apoyo técnico de las biólogas Claudia Rodríguez y Guadalupe Domínguez en el desarrollo de los cultivos celulares.

El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo el financiamiento aportado por la DGPA.