



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

DIVISION DE ESTUDIOS

DE POSGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"Efecto del NMDA (N-Metil Aspartato) en la
ultraestructura de las células granulares en cultivo"**

TESINA

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIZACIÓN EN MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A

Biol. Claudia Rodríguez Rangel

**DIRECTOR DE TESINA: Dr. Julio Eduardo Roque Morán
Andrade**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MÉXICO, D.F.

Marzo 2006

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO A CARGO DE LA DRA OLGA MARGARITA ECHEVERRIA.

LOS ASPECTOS CORRESPONDIENTES A LA FISIOLOGIA DE LAS CELULAS GRANULARES DEL CEREBELO CORRIERON BAJO LA DIRECCION DEL DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORAN ANDRADE, MIENTRAS QUE LOS ASPECTOS TECNICOS EN EL AREA DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA ESTUVIERON BAJO LA DIRECCION DEL M. EN C. MARCO ANTONIO GONZÁLEZ A QUIENES AGRADEZCO PROFUNDAMENTE SU INTERES PARA EL DESARROLLO DE ESTA TESINA.

*... "Qué sería de tu felicidad
si no tuvieras aquellos
para los que brillas" ...*
NIETZCHE

AGRADECIMIENTOS:

**CON TODO MI AMOR AL COMPAÑERO DE MI VIDA C.D ADRIAN ANDRADE
CAMPUZANO QUIEN SIEMPRE ESTA A MI LADO IMPULSANDOME A SER
ALGUIEN MEJOR...**

.....A MI ANGEL: SARA

.....A MI AMIGA. SELMA

.....A MI ENTRAÑABLE HERMANA: MÓNICA

.....A MIS AMORES: ANDREA Y RAUL

.....A MI INVALUABLE APOYO: JOSEFINA

.....A MI FAMILIA: SALVADOR Y EUGENIO

.....A MI QUERIDA ROX

....GRACIAS DIMITRIS

A los sinodales que se tomaron el tiempo para revisar escrupulosamente este trabajo.

INDICE

Pagina

5

RESUMEN

6

I INTRODUCCION

- EL CEREBELO
- DESARROLLO DEL CEREBELO
- FACTORES TROFICOS
- GLUTAMATO EN EL CEREBELO
- RECEPTORES AL GLUTAMATO.
- PAPEL DE LA DESPOLARIZACION EN LA DIFERENCIACION DE LAS CELULAS GRANULARES.

14

II OBJETIVOS

15

III MATERIALES Y METODOS

18

IV RESULTADOS

44

V DISCUSION

45

VI CONCLUSIONES

46

VII BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

El cerebelo ha sido considerado un sistema ideal para llevar a cabo estudios concernientes a los eventos dinámicos que controlan el desarrollo neuronal, ya que el número limitado de tipos celulares que caracterizan su organización estructural, ha permitido profundizar en el estudio de la morfogénesis y de los procesos de migración celular que ocurren durante el desarrollo. Particularmente, las células granulares por sus características y accesibilidad, representan un modelo útil para el conocimiento de estos aspectos. En este trabajo se estudió la ultraestructura de las células granulares del cerebelo en cultivo y buscando establecer si las estructuras intracelulares expresan diferencias en las estructuras celulares debido al efecto trófico, ya conocido, potasio y aspartato, y de ser así analizar dichos cambios. El estudio de la ultraestructura del Sistema nervioso Central implica dificultades en la fijación del tejido, las células en cultivo son de manejo muy delicado y tuvimos que intentar varios procesos hasta lograr la buena conservación del material como se observa en las micrografías que mostramos como ejemplo para cada una de las condiciones experimentales.

La preparación de células granulares en cultivo se efectuó por vía enzimática además de disociación mecánica del cerebelo. En las células del grupo control se observaron características típicas de las células granulares como el soma reducido y un gran núcleo oval. Pude concluir de estas observaciones cualitativas que en los núcleos de las células tratadas con potasio y con aspartato los cúmulos de cromatina densa no muestran un cambio importante. Sin embargo, el cambio más notorio ocurre a nivel del soma, el incremento en la estructuras citoplásmicas es más evidente en el grupo de células tratadas con aspartato. Estos resultados sugieren que tanto la activación del receptor de aspartato como la despolarización por potasio de células granulares de cerebelo podrían inducir cambios morfológicos a nivel ultraestructural que coinciden con un efecto trófico de maduración tanto bioquímica como morfológica.

I INTRODUCCION

El sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos está compuesto por un número heterogéneo de células que se asocian en grupos celulares que presentan diversos niveles de complejidad en su organización y funcionalidad (Dreyfus y Black, 1990).

Especialmente el cerebelo ha sido considerado un sistema ideal para llevar a cabo estudios concernientes a los eventos dinámicos que controlan el desarrollo neuronal, ya que el número limitado de tipos celulares que caracterizan su organización estructural, ha permitido profundizar en el estudio de la morfogénesis y de los procesos de migración celular que ocurren durante el desarrollo (Burgoyne y Cambay, 1988). Particularmente, las células granulares por sus características y accesibilidad, representan un modelo útil para el conocimiento de estos aspectos.

EL CEREBELO:

Anatómicamente, el cerebelo maduro está compuesto por una corteza externa, sustancia blanca interna y tres pares de núcleos cerebelares profundos. La corteza cerebelar se caracteriza por su bien conformada estructura laminar, constituida por cinco tipos neuronales: células estrelladas, en canasta, Purkinje, Golgi y células granulares. Esta organización estructural se establece en tres estratos (Tach, 1980):

- 1) Capa molecular externa: Esta capa está constituida por los axones de las células granulares, los cuales se bifurcan en forma de "T" y recorren grandes distancias paralelamente a la superficie cerebelar, por lo que se les denomina fibras paralelas. También forman parte de esta capa otros dos tipos neuronales que son las células estrelladas y las células en canasta.
- 2) Capa de células de Purkinje: Formada por los somas de este tipo neuronal, los cuales hacen numerosos contactos sinápticos con las fibras paralelas que atraviesan la arborización de las células de Purkinje en ángulos rectos (Palay, 1982).
- 3) Capa granular interna: En ella se localizan las células de Golgi y los somas de las células granulares, cuyas dendritas reciben entradas de las fibras musgosas, una de las tres vías de entrada al cerebelo. Las células granulares hacen contactos excitadores con las dendritas de las células de Purkinje, por vía de las fibras paralelas, las cuales liberan glutamato. (Fig. 1)

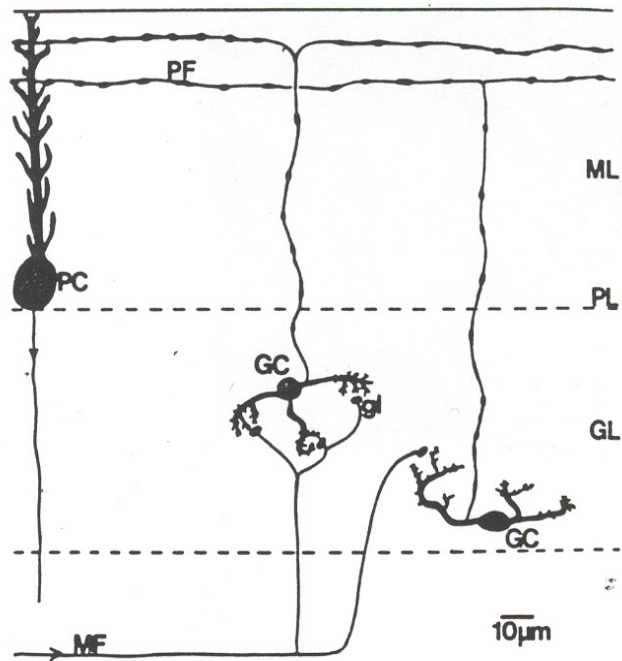


FIGURA 1. DISTINTAS CAPAS DEL CEREBELO.

(Tomado de Burgoyne y cols. 1988)

GC. Células Granulares

GL. Capa de Células Granulares

ML. Capa Molecular

PF. Fibras paralelas

Pc. Células de Purkinje

MF. Fibras musgosas

gl. Glomerulos

PL. Capa de células de Purkinje.

La conexión interneuronal en el cerebelo está muy bien delimitada. La corteza cerebelar tiene sólo tres vías de entrada y una sola vía de salida. Una de estas tres vías de entrada es la que

establecen las fibras musgosas, cuyos somas están localizados en el tallo cerebral. Dichas fibras tienen terminales en unos complejos dendríticos especializados denominados glomérulos.

La segunda vía de entrada se lleva a cabo mediante las fibras trepadoras, cuyos somas se encuentran en su mayoría en la oliva inferior del tallo cerebral, y cuyos axones terminan directamente en las células de Purkinje.

La tercera vía de entrada moduladora se deriva de las neuronas del *locus coeruleus* y del núcleo de raphe que termina, predominantemente, en las células de Purkinje.

La vía de salida se deriva de las células de Purkinje, cuyos axones se proyectan al tallo cerebral y al núcleo cerebelar profundo.

Las vías de entrada al cerebelo (las fibras trepadoras y las fibras musgosas) son de tipo excitador (Rossy cols. 1990), mientras que la vía de salida es de naturaleza inhibitoria.

DESARROLLO DEL CEREBELO:

Las células corticales del cerebelo se originan de dos zonas independientes:

- 1) La matriz ventricular de las placas cerebelares que da origen a las células de Purkinje, las células de Golgi y parte de las células gliales.
- 2) De la capa germinal externa (CGE) se derivan las células granulares, las células en canasta y las células estrelladas (Ito, 1984).

La CGE consta de dos zonas, una superficial proliferativa y una zona basal premigratoria. Las células que constituyen la CGE son las precursoras de las células granulares, las cuales comprenden el 90% de todas las neuronas cerebelares. En la rata, los eventos de proliferación, migración y diferenciación que darán origen a las células granulares, ocurren alrededor de las tres primeras semanas postnatales (Burgoyne y Cambray, 1988).

Durante las dos primeras semanas las células granulares retienen su capacidad mitótica y se dividen nuevamente. Entonces comienza un proceso de migración que culmina al constituirse las capas molecular externa y granular interna.

Las primeras entradas sinápticas que reciben las células granulares son las de las fibras musgosas excitadoras alrededor de quinto día postnatal (Altman, 1982). Liesi (2003) demostró que estas fibras musgosas invaden transitoriamente la capa granular externa en las primeras fases de la migración. Como se verá mas adelante, estas influencias de las fibras musgosas son fundamentales para el desarrollo y sobrevivencia de las células granulares y además proveen la señal de inicio de la migración vertical de las células granulares y también pueden actuar como una barrera inhibitoria para el movimiento tangencial. También

se sabe que los contactos sinápticos inhibitorios que recibe de las células de Golgi se realizan a partir del día doce postnatal, y es al mismo tiempo cuando las células granulares establecen a su vez los contactos sinápticos excitadores con las células de Purkinje (Fig.2). Esto último es necesario para la supervivencia de las células granulares (Landis, 1971).

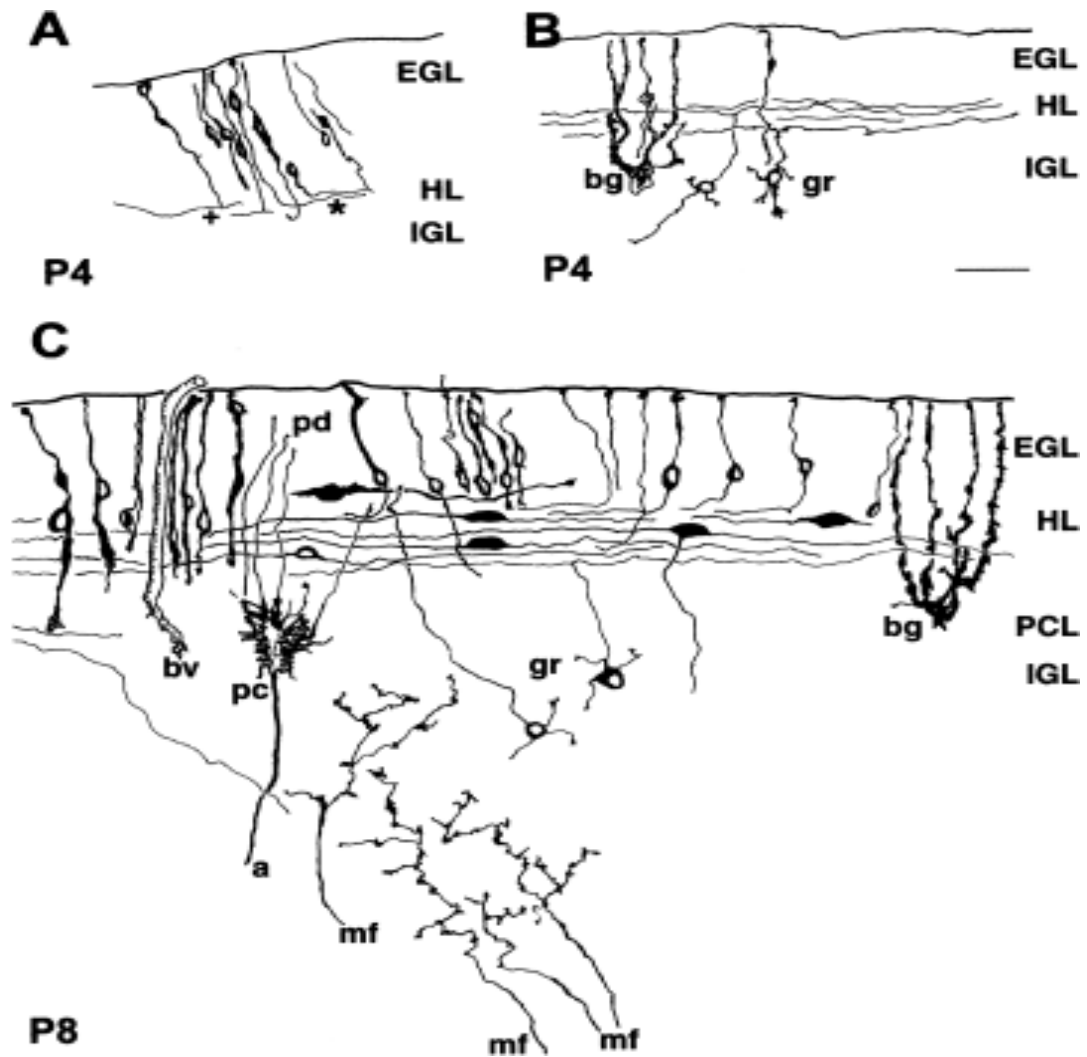


FIGURA 2. MIGRACION DE LAS CELULAS GRANULARES

(Tomado de Liesi et al, 2003. J. Neurosci. Res. Vol.72, 3.)

EGL. Capa granular externa.

IGL. Capa granular interna

PCL. Capa de las células de Purkinje

HL. Capa horizontal

mf. Fibras musgosas

bg. Cels inmaduras de la glía de Bergmann

gr. Células Granulares

bv. Vaso sanguíneo.

pd. Protodendritas

a. axón de célula de Purkinje.

A. Cuarto día Postnatal (P4).

B. Cuarto día Postnatal (P4). Se muestra la migración vertical de algunas células granulares hacia la IGL (Capa granular Interna).

C. Octavo día Postnatal. Se esquematizan a escala 4 secciones que muestran migraciones tanto verticales como horizontales. Las que migran de forma vertical, pueden seguir ya sea a un vaso sanguíneo (bv) o a protodendritas de las células de Purkinje.

La posición de las células durante el desarrollo es fundamental, ya que la diferenciación de éstas está dictada en gran medida por su ubicación. La localización final de las neuronas tiene particular importancia, ya que la funcionalidad de estas células, depende de la precisión de las conexiones interneuronales que se establezcan. Se ha propuesto que las neuronas granulares migran en dos diferentes vías que involucran la extensión de neuritas y la translocación del núcleo de la fibra preformada. (Liesi 2003)

Cabe señalar también que la muerte celular juega un papel importante durante el desarrollo. Esta estrategia parece estar dirigida para regular el número adecuado de células y lograr el establecimiento preciso de los contactos neurales. (Purves, 1985)

FACTORES TROFICOS

Existen evidencias de que hay moléculas en el medio extracelular que actúan de forma definitiva en la sobrevivencia neuronal, el desarrollo de neuritas, la diferenciación morfológica y funcional así como el establecimiento de contactos sinápticos.

En las células granulares no se ha determinado aún cuales son específicamente esos factores tróficos, pero indudablemente se incluyen dentro de éstos a hormonas (las hormonas tiroideas T₃ y T₄) (Burgoyne y Cambray, 1988), moléculas específicas que regulan el crecimiento (factor de crecimiento neural, NGF) y algunos neurotransmisores.

Entre los neurotransmisores que ejercen una acción trófica en las células granulares está el GABA (ácido gamma-aminobutírico), un aminoácido inhibitorio, que induce un incremento en la formación de neuritas y un aumento en la síntesis de proteínas en las células granulares (Hansen, 1987).

Estudios sobre el efecto de otros neurotransmisores en las células del cerebro, tales como la serotonina (Narumi y cols. 1978), dopamina (Lauder y cols. 1983) y noradrenalina (Konin y cols. 1986), han demostrado que éstos también ejercen un papel regulador importante durante el desarrollo del SNC. Sin embargo, de los neurotransmisores estudiados, el ácido glutámico es el que ha demostrado influir más en el desarrollo de estas células (Fonnum, 1984). Este neurotransmisor puede llevar a cabo una función trófica en el desarrollo y neurotóxica en el SNC maduro.

GLUTAMATO EN EL CEREBELO.

Como ya se mencionó anteriormente, las células granulares comprenden aproximadamente el 90% del total de las neuronas cerebelares y utilizan un neurotransmisor de tipo excitador. Las células granulares poseen además, receptores al glutamato del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), kainato y quisqualato. Se ha sugerido que los receptores a NMDA juegan algún papel en el desarrollo, ya que éstos se presentan en gran número de células granulares inmaduras, mientras que su densidad disminuye sensiblemente en células de cerebelo adulto (Garthwaite y cols. 1986). Se ha observado en células en cultivo, que el desarrollo de neuritas se inhibe al agregar antagonistas del receptor a glutamato, lo cual sugiere que la liberación de glutamato estimula el crecimiento de neuritas de las células granulares en cultivo. Esto implica que el glutamato juega un papel importante en el control de la diferenciación de las células granulares (Burgoyne y Cambray, 1988).

RECEPTORES AL GLUTAMATO.

Se sabe que una gran variedad de receptores que reconocen de igual forma al glutamato como neurotransmisor. En general, los receptores se han clasificado en: Los del tipo No NMDA (N-metil-D-aspartato), y los del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato),

a) Los del tipo no NMDA (N-metil-D-aspartato), se subdividen en dos clases:

- De tipo ionotrópico: Acido kaínico

Acido α -amino 3, hidroxil-5 metil isoxazolepropiónico (AMPA).

- De tipo metabotrópico: Que se sabe actúa a través del sistema de inositol fosfato (PI) y moviliza calcio intracelular.

b) Receptor del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato),:

Como su nombre lo indica el agonista específico a este tipo de receptor es el ácido N-metil-D-aspartico. Este tipo de receptor es particularmente permeable al calcio, su activación es dependiente de voltaje mediada por magnesio y se incrementa con la despolarización (Cotman e Inversen, 1987). Se sabe que la glicina actúa como un neuromodulador de la actividad de este receptor.

La excesiva entrada de calcio a través de los receptores a NMDA ha sido implicada en la neurotoxicidad de una variedad de padecimientos en el sistema nervioso, entre los que se incluyen la anoxia y la hipoglicemia, donde los niveles de glutamato son muy elevados por tiempos prolongados. La muerte neuronal, en este caso, puede prevenirse mediante bloqueadores de los receptores a NMDA (Balázs y cols. 1988).

PAPEL DE LA DESPOLARIZACION EN LA DIFERENCIACION DE LAS CELULAS GRANULARES.

Hay suficientes evidencias que indican que la actividad bioeléctrica influye definitivamente en la sobrevivencia de las células nerviosas durante ciertas etapas del desarrollo (Gallo, 1987). En particular se sabe que en cultivos primarios de células granulares mantenidos a una concentración despolarizante de potasio o en condiciones de estimulación del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), es posible prolongar la sobrevivencia neuronal. Se ha propuesto que tal efecto está mediado por un incremento en la concentración de calcio intracelular (Balázs, 1988). También se sabe que esta dependencia de despolarización ocurre sólo en algún momento del desarrollo de las células granulares. Esto coincide en los tiempos en los que ocurren la inervación y consecuente diferenciación de las células granulares postmitóticas *in vivo*.

Además del efecto que se sabe ejercen el alto potasio y el NMDA en la sobrevivencia de las células granulares, se ha comprobado también que estas condiciones tienen un efecto sobre la maduración bioquímica de estas células como quedó demostrado con los experimentos de Morán y Patel (1989) en donde la diferenciación bioquímica se evaluó usando enzimas marcadoras, como es el caso de la enzima GAF (glutaminasa activada por fosfato). Se ha propuesto que esta es una enzima catalizadora de la síntesis de glutamato, relacionándola con la diferenciación de estas células y con el establecimiento de vías glutamatérgicas (Patel y cols, 1990). Posteriormente, evaluando otra enzima marcadora del desarrollo, la aspartato-amino-transferasa (AAT), la cual también está asociada con la síntesis del glutamato utilizado como neurotransmisor, quedó demostrado que tanto el NMDA (N-metil-D-aspartato), como la despolarización por potasio inducen un incremento en la actividad enzimática de la AAT en cultivos de células granulares (Morán y Rivera, 1992), y que estas condiciones son resultado de un aumento de la cantidad de enzimas y de su RNA mensajero (Alavez y cols. 1996). De hecho, se ha propuesto que la acción trófica del NMDA o del potasio a través de la activación de la AAT o de la GAF pudiera constituir un mecanismo que provee energía adicional necesaria para facilitar los procesos de desarrollo en la maduración de las células granulares del cerebelo (Caballero-Benítez y cols. 2004).

II OBJETIVOS:

- Obtener células integra aptas para su observación: Tomando en consideración que en los estudios ultraestructurales del Sistema Nervioso Central de los mamíferos constituye un reto la conservación de las células que lo integran, uno de los objetivos de este trabajo es el desarrollo de técnicas de Microscopía Electrónica que nos permitan la observación del material de interés, en este caso las células Granulares de Cerebelo de rata, para así poder efectuar un estudio comparativo de la estructura de estas neuronas.
- Comparar cualitativamente la ultraestructura de las células del grupo control y los grupos experimentales: Ha sido demostrado que la despolarización por potasio y NMDA (N-metil-D-aspartato), influye directamente sobre la maquinaria bioquímica, la diferenciación y la sobrevivencia de las células granulares de cerebelo mantenidas en cultivo, por lo que en este estudio nos proponemos establecer si las estructuras intracelulares expresan diferencias por acción del tratamiento crónico.

III MATERIALES Y METODOS

CULTIVOS PRIMARIOS:

La preparación de células granulares en cultivo se efectuó tomando como base la técnica descrita por Morán y Patel (1989), cuyo fundamento es la disociación mecánica del tejido de un lote de 8 cerebelos por vía enzimática, mediante el uso de tripsina (0.025%)(SIGMA T-9003), en un medio Krebs normal.

Las células de cerebelo de ratas Wistar de 7-8 días postnatales (P7-P8) tiempo al que otros tipos de neuronas cerebelares ya se han diferenciado, se sembraron a una densidad de 225 x 10³ células / cm² en cajas de Petri de polipropileno de 35mm de diámetro, tratadas previamente con poli-L-lisina (5µg / ml), que sirvió como sustrato.

El medio de cultivo con el que se mantuvieron las células fue en medio basal Eagle (SIGMA B-1522), suplementado con suero fetal bovino GIBCO (10%), 2mM de glutamina y antibiótico (penicilina / estreptomina, 50 UI / ml y 50µg / ml; respectivamente).

Las células se incubaron en una atmósfera húmeda 5% de CO₂ y 5% de aire a 37°C. Transcurridas entre 18 y 22 horas de sembrado se agregó a los cultivos citosina arabinosa (10µM) para evitar la proliferación de las células gliales. Las células se trataron con NMDA (N-metil-D-aspartato), y cloruro de potasio después de 2 días *in vitro* (DIV). Bajo estas condiciones las células se mantuvieron hasta los 5 días *in vitro* (DIV) y entonces se procesaron para su observación.

PREPARACION PARA LAS OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO ELECTRONICO:

FIJACION:

Los cultivos primarios de células granulares se fijaron *in situ* con glutaraldehído 3% en buffer de fosfatos a un pH de 7.2-7.3 a 4°C durante 2 horas. Posteriormente, las cajas se lavaron con 1ml de buffer de fosfatos 3 veces.

La monocapa de células se raspó en 1ml de solución buffer y la suspensión celular extraída se centrifugó a 1500 rpm por espacio de 30 minutos. El botón obtenido se lavó con buffer de fosfatos 0.16 M, pH 7.4 a 4°C durante media hora; se llevaron a cabo dos cambios de 15 minutos cada uno.

POSTFIJACION:

El botón de células se postfijó con tetraóxido de osmio 1% en buffer de fosfatos 0.16 M por una hora, e inmediatamente después se lavó con buffer de fosfatos tres veces durante 15 minutos.

DESHIDRATACION:

Debido a que los materiales que se usan para infiltrar el tejido no son miscibles con agua, la deshidratación se efectuó de manera gradual mediante distintas concentraciones de etanol a partir de 30% pasando por 50%, 70%, 80%, 96% dejando el botón de células durante 10 minutos en cada uno, hasta llegar al etanol puro (100%) donde se efectuaron tres cambios de 10 minutos cada uno.

El material se colocó en óxido de propileno, para facilitar la penetración de la resina, efectuándose tres cambios de 5 minutos cada uno.

PREINCLUSION

Después de haber colocado las muestras en el óxido de propileno puro, se pasaron a una mezcla homogénea de óxido de propileno - resina epóxica (EPON) en proporción de 1:1, dejándose a temperatura ambiente durante 12 hrs.

INCLUSION:

Posteriormente se colocaron en moldes con EPON puro en una estufa a 60°C durante 24 horas para que se polimerizara la resina, la cual da firmeza al tejido y minimiza el daño que puede ocasionar el corte.

CORTE:

El material se liberó de la mayor cantidad de resina utilizando una navaja de rasurar y al tejido incluido se le dio forma de pirámide trunca para facilitar el corte en el ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT2. Los primeros cortes se realizan con una cuchilla de vidrio, fueron semifinos de 0.5µm de espesor para observar la conservación y el estado de las muestras en general con el microscopio de luz. Una vez verificada la calidad de la muestra y elegida la zona de interés, se elimina el resto manteniéndola forma de pirámide trunca. Los cortes ultrafinos de 60 a 90 nm de espesor se montaron sobre rejillas de cobre.

CONTRASTE:

Las rejillas se contrastaron por flotación, con acetato de uranilo al 3% durante 20 minutos, protegiéndolos de la luz. Después de lavarlas por goteo continuo con agua bidestilada, se contrastaron también por flotación, con citrato de plomo al 0.3% durante 10 minutos en una cámara húmeda que contenía hidróxido de sodio para evitar la precipitación.

OBSERVACION:

Las rejillas se observaron en el microscópio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM 10 operando a 80Kv.

IV RESULTADOS.

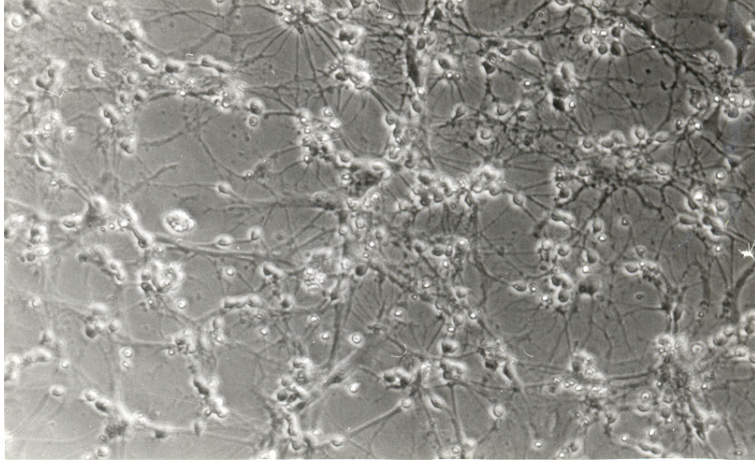
Al examinar el efecto del NMDA (N-metil-D-Aspartato) y del alto potasio en distintos sustratos, se encontró que tanto la laminina ($1 \times 10^{-7} M$) como la fibronectina ($2 \times 10^{-8} M$) no permitieron la adhesión de las células ya que sólo fue posible mantenerlas hasta el tercer día *in vitro* (3DIV) y después de ese tiempo se presentó desprendimiento de células en áreas grandes de las cajas de cultivo (resultados no mostrados).

Hicimos observaciones sin registros fotográficos, en cultivos celulares sembrados sobre laminina, notamos que las células del grupo control sembradas en este sustrato crecían en cúmulos al igual que las células del grupo tratado con NMDA,

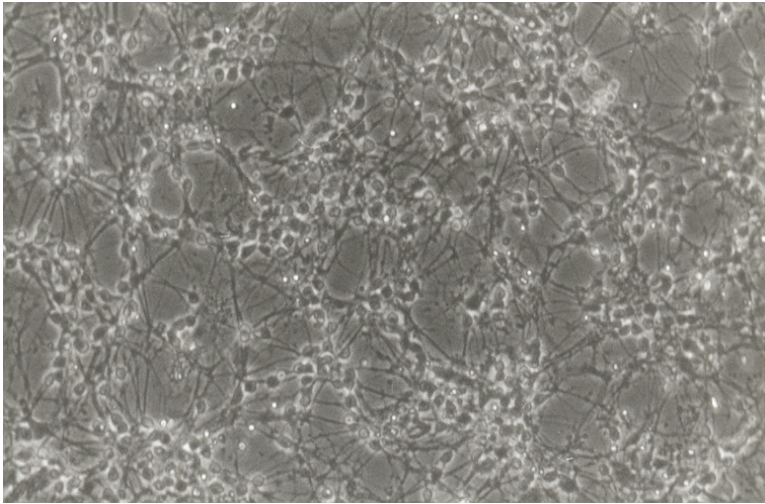
En cultivos que tuvieron fibronectina como sustrato, las células del grupo control crecían sobre cúmulos, mientras que las células tratadas con NMDA presentaron un patrón de distribución más disperso y una población de células de mayor número.

El sustrato que permitió una mayor sobrevivencia de las células granulares en cultivo fue la poli-L-lisina. Las células provenientes de cultivos sobre este sustrato mostraron crecer dispersas a lo largo de la caja de sembrado, solo que en esta fase del desarrollo (3DIV) no notamos diferencia alguna entre las células del grupo control y las del grupo tratado con NMDA (N-metil-D-aspartato),

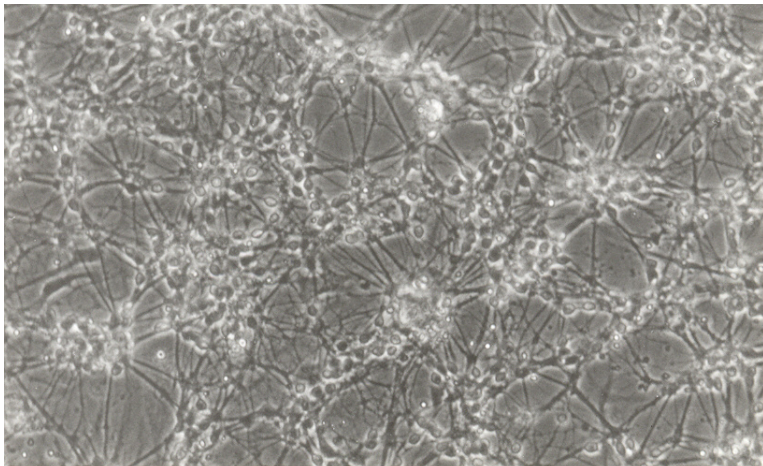
La figura 3 muestra, en fotografías tomadas con microscopía de luz, el efecto de los tratamientos durante 72 hrs. con potasio y NMDA (N-metil-D-aspartato), en las células granulares de cerebelo en cultivo de 6 DIV (días *in vitro*) sembradas sobre poli-L-lisina. Como puede notarse, ambos tratamientos, NMDA $150 \mu M$ y potasio $25 mM$ tienen un efecto tanto en la morfología como en la sobrevivencia en comparación con las células del grupo control. Los cambios más evidentes en relación al control comprenden un incremento en el tamaño de los somas, un engrosamiento de los procesos neurales formando cables más gruesos y la formación de cúmulos de células que reportan la consecuencia de una actividad migratoria importante.



A



B



C

FIGURA 3. FOTOGRAFÍAS DE CULTIVOS CELULARES DE NEURONAS GRANULARES (6 DIV). **A** GRUPO CONTROL. **B** GRUPO TRATADO CON NMDA 150 μ M. **C** GRUPO TRATADO CON POTASIO.

Debido a estos resultados la comparación ultraestructural de células de más de 5 DIV (días *in vitro*) y tratadas con las distintas condiciones se efectuaron usando PLL como sustrato (Fig. 4). Las observaciones se hicieron de tres experimentos diferentes entre sí y se tomaron al azar los campos en las rejillas para realizar las micrografías que ejemplifican cada una de las diferentes condiciones experimentales.

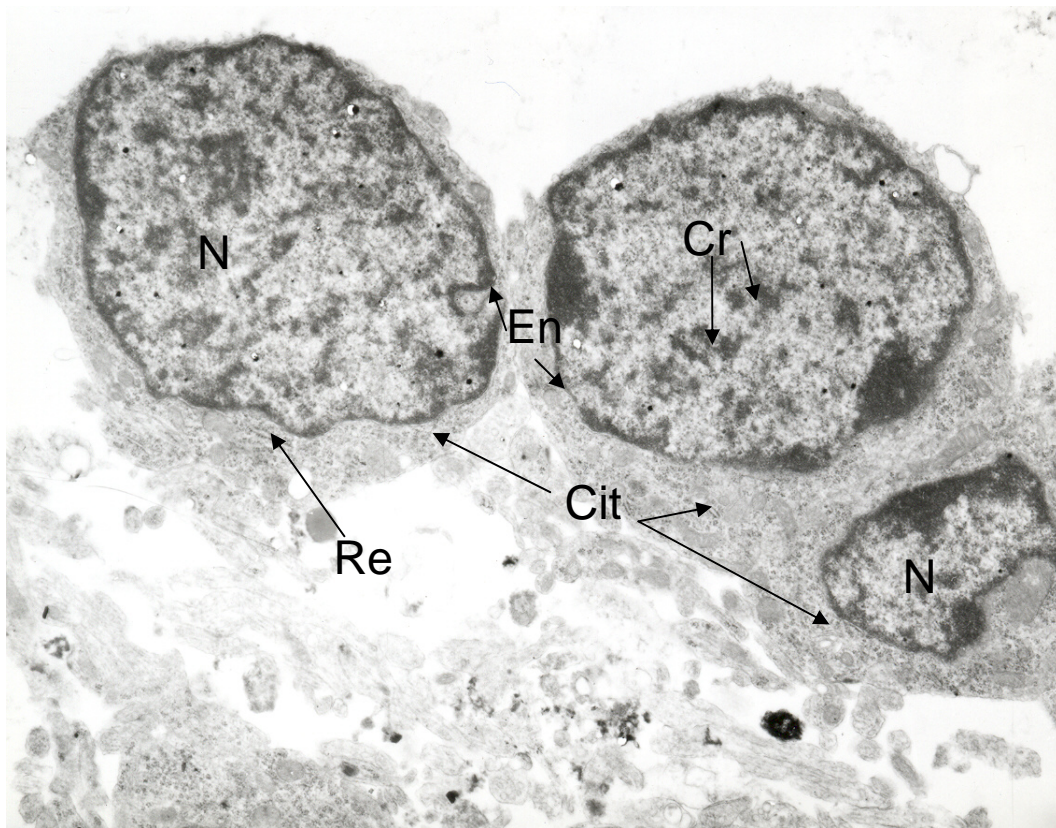


FIGURA 4. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE UN CÚMULO DE CELULAS GRANULARES EN CULTIVO DE 6 DIV (días *in Vitro*) DEL GRUPO CONTROL SEMBRADA SOBRE POLI-L-LISINA.

OBSERVAMOS:

EL CITOPLASMA (Cit)

RETICULO ENDOPLASMICO (Re)

EL NUCLEO (N)

ESCASOS CUMULOS DE CROMATINA DENSA (Cr)

LA ENVOLTURA NUCLEAR (En).

TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO). 7,000X A 80 KV.

En la figura 4 observamos el buen estado de conservación del material ya que podemos notar las membranas citoplásmicas bien definidas delimitando cada una de las células que se observa en esta micrografía.

GRUPO CONTROL:

En las figuras 5, 6 y 7 se muestra la ultraestructura de células granulares del grupo control de 6DIV (días *in Vitro*) sembradas sobre poli-L-lisina (PLL). En éstas se advierten características típicas de las células granulares como son: el tamaño reducido del soma, el cual mide entre 5 y 8µm de diámetro. En la figura 5 observamos también un gran núcleo oval (N) que contiene escasos y pequeños cúmulos de cromatina densa (Cr), distribuidos a lo largo de la envoltura nuclear (En) así como el citoplasma escaso (Cit).

En la figura 6 vemos la doble membrana de envoltura nuclear, en el citoplasma se encuentran los organelos involucrados en la síntesis y metabolismo de macromoléculas tales como lo son el retículo endoplásmico con polisomas adosados y las mitocondrias. En las prolongaciones citoplásmicas sin embargo, no se encuentran la mayoría de los organelos y sólo pueden observarse neurotúbulos (NT), vesículas (VE) y mitocondrias (Mit), tal como se ve en los cortes transversales de las prolongaciones en la figura 7. En esta figura los ribosomas se observan esparcidos, y aparecen de forma libre o pegados a la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RE). O como cuerpos de Nissl, o polisomas (po) en conjuntos de 5 ó 6 ribosomas adosados a las membranas.

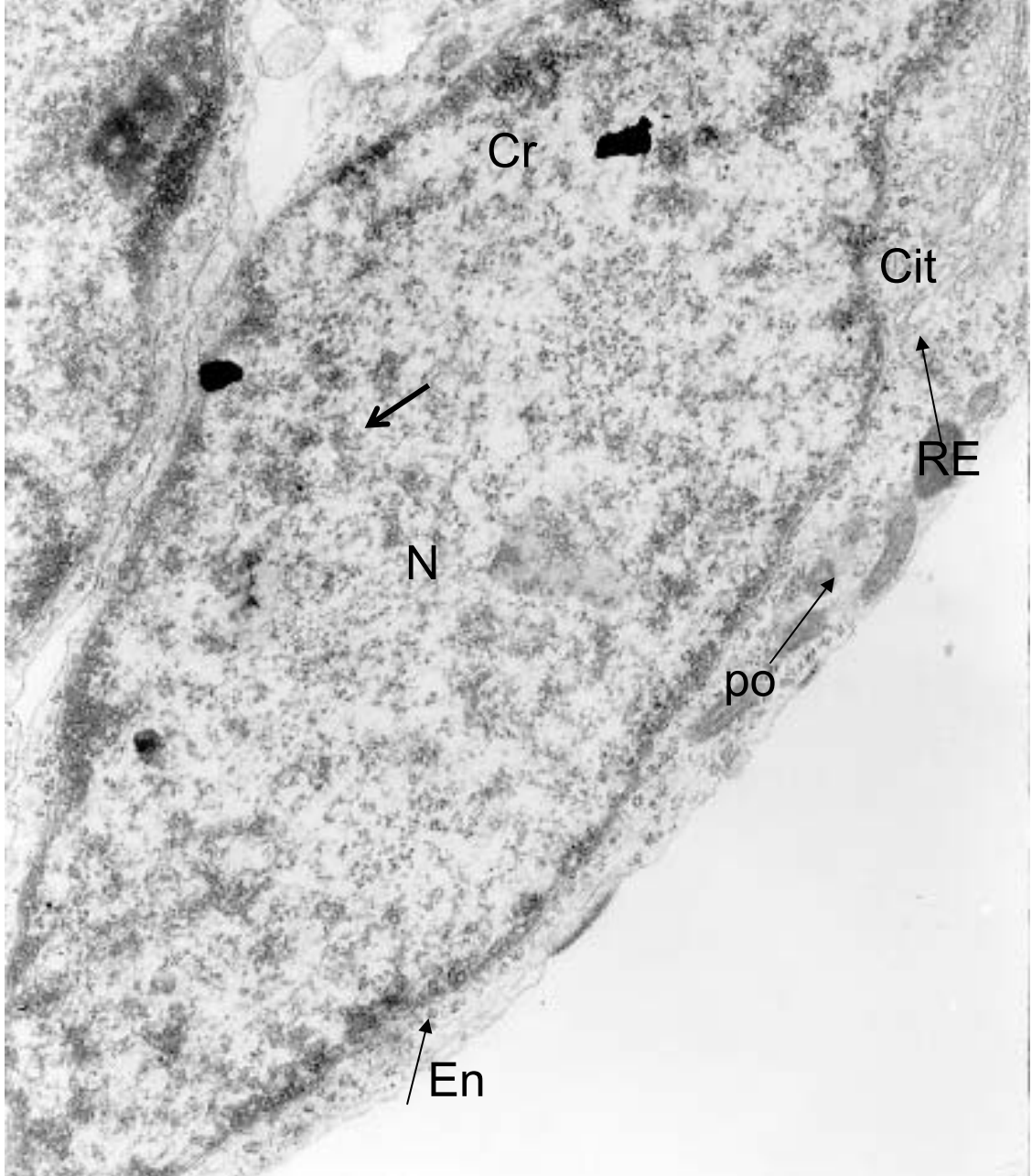


FIGURA 5. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE UNA CELULA GRANULAR DE CEREBELO EN CULTIVO DE 6 DIV (días *in Vitro*) DEL GRUPO CONTROL, SEMBRADA SOBRE POLI-L-LISINA. SE APRECIAN MITOCONDRIAS (Mit) Y ESTRUCTURAS COMO EL RETICULO ENDOPLASMICO (RE), ASI COMO POLISOMAS (po) DISPERSOS EN EL CITOPLASMA (Cit) Y EN EL NUCLEO (N) ESCASOS CUMULOS DE CROMATINA Densa (Cr) RODEANDO LA ENVOLTURA NUCLEAR (En). TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO). 10,000 AUMENTOS A 80 KV

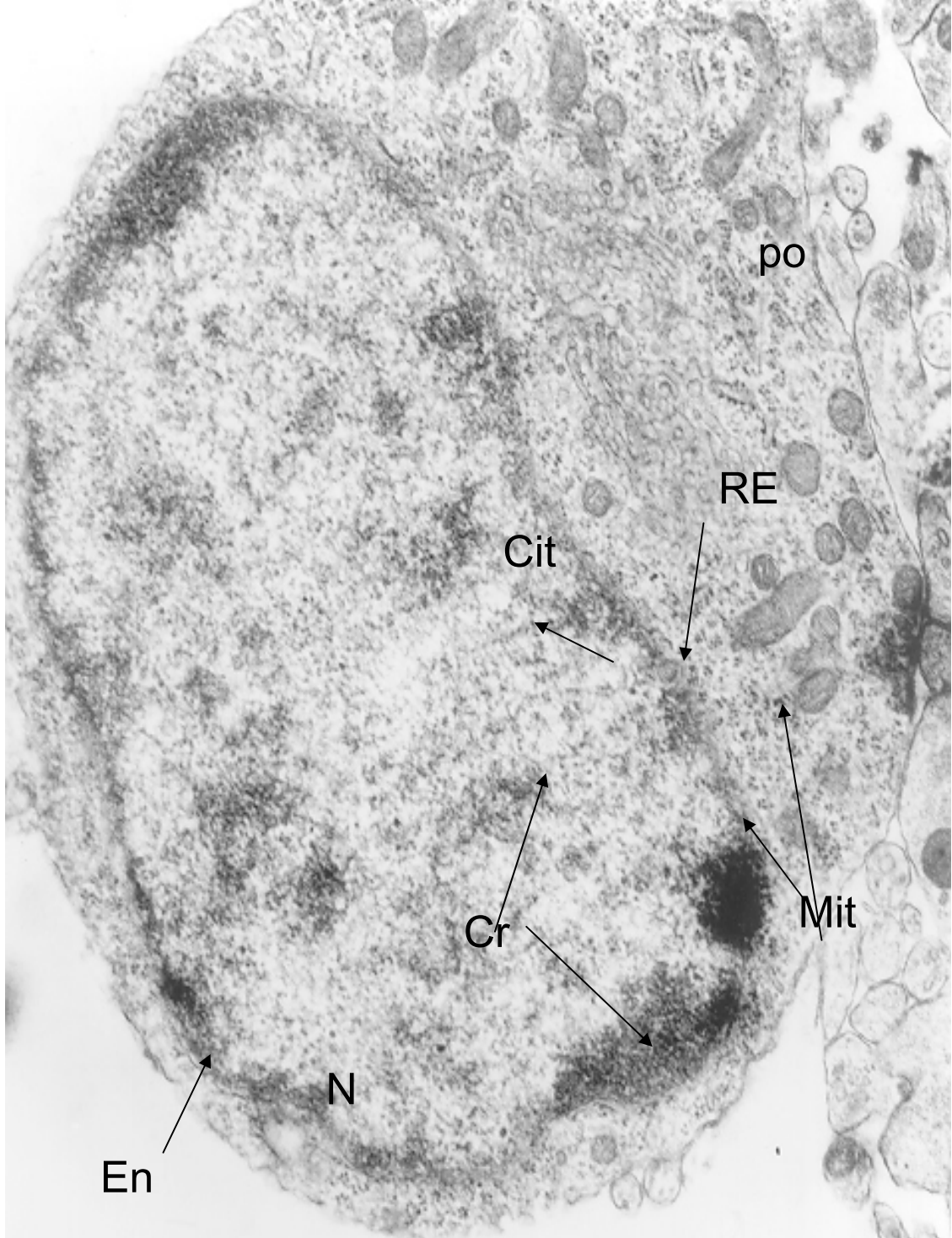
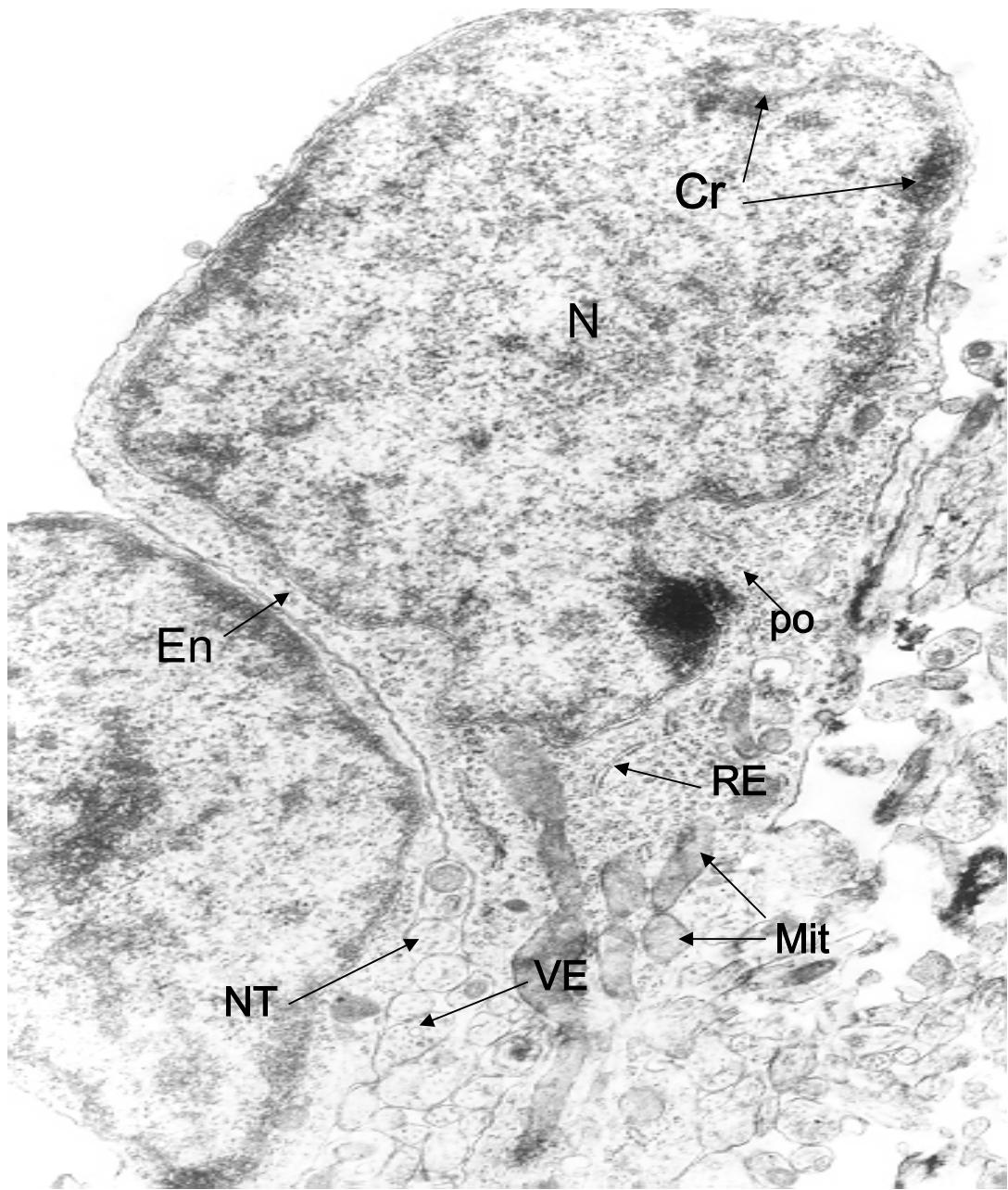


FIGURA 6. ULTRAESTRUCTURA DE UNA CELULA GRANULAR DEL GRUPO CONTROL DE 6 DIV (*días in Vitro*). OBSERVAMOS ESTRUCTURAS EN EL CITOPLASMA (Cit): EL RETICULO ENDOPLASMICO (RE), LOS POLISOMAS (po), MITOCONDRIAS (Mit).NOTAMOS EN EL NUCLEO (N), ESCASOS CUMULOS DE CROMATINA DENSA (Cr) RODEANDO LA ENVOLTURA NUCLEAR (En). TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO). 10,000 AUMENTOS A 80 KV.

FIGURA 7. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE UNA CELULA GRANULAR DEL GRUPO CONTROL. EN LOS CORTES TRANSVERSALES DE LAS PROLONGACIONES CITOPLASMATICAS OBSERVAMOS NEUROTUBULOS (NT), VESICULAS (VE) Y MITOCONDRIAS (Mit). EN EL CITOPLASMA (Cit) VEMOS EL RETICULO ENDOPLASMICO (RE) Y POLISOMAS (po). EN EL NUCLEO (N) DESTACAN LOS CUMULOS DE CROMATINA DENSA (Cr) ALREDEDOR DE LA ENVOLTURA NUCLEAR (En).
TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO).
10,000 AUMENTOS A 80 KV.



EFFECTO DE ALTO POTASIO:

Las figuras 8, 9, 10 y 11 nos muestran micrografías electrónicas de células granulares en cultivo de 6 DIV sembradas sobre PLL como sustrato y sometidas al tratamiento de alto potasio 25mM durante 72 horas (K^+).

En este grupo, como ya habíamos anotado en las observaciones de las células granulares en cultivo con microscopia de luz, vemos un aumento en el tamaño general del soma con respecto a lo que observamos en las células del grupo control aunque podemos notar el aumento del citoplasma en relación al tamaño del núcleo.

En la figura 8 advertimos que los núcleos de estas células presentan la formación de cúmulos de cromatina densa (Cr) rodeando la envoltura nuclear (En), estos cúmulos también se distribuyen dispersos por el núcleo (N). También notamos que las dos células que se observan están bien delimitadas por una bien conservada membrana citoplásmica. En algunas de las células de este grupo podemos observar el nucleolo (NI) (Figs. 8,9 y 10).

La composición citoplasmática, en cuanto a los distintos organelos observados en estas células, es similar a lo que se encontró en las células crecidas a una concentración baja de potasio (5mM). Pero, como vemos en las micrografías de las células con tratamiento crónico con K^+ , una de las diferencias más marcadas con respecto a las células del grupo control, es el aumento en la densidad de organelos laminares y vesiculares como el aparato de Golgi (GI), el cual también se ubica cercano al núcleo como lo vimos en las células del grupo control. Así mismo, se observó un aumento en la presencia de retículo endoplásmico (RE), así como de poliribosomas (po) esparcidos en el citoplasma (Cit) de las células tratadas con alto potasio, como puede verse en la micrografía de la figura 9.

Notamos también, en la ultraestructura de la figura 10, un incremento en la densidad citoplasmática. Observamos que las mitocondrias (Mit) se encuentran disgregadas dentro del citoplasma y en algunas se advierten sus estructuras laminares internas, también se presentan mitocondrias en cortes transversales de prolongaciones citoplásmicas (pCit) que aparecen en contacto. La proporción de mitocondrias (Mit) en el citoplasma de las células de este grupo no varía considerablemente con respecto a lo observado en el grupo control.

Al analizar los cortes transversales de las prolongaciones citoplásmicas (pCit) de la micrografía de la figura 11 notamos vesículas claras (VE), neurotúbulos (NT) y mitocondrias (Mit). Dentro del citoplasma observamos un gran aparato de Golgi (GI) cercano al núcleo (Nu).

FIGURA 8

MICROGRAFIA ELECTRONICA DE CELULAS GRANULARES EN CULTIVO DE 6 DIV (*DIAS IN VITRO*) CON UN TRATAMIENTO CRONICO CON ALTO POTASIO (K⁺). OBSERVAMOS EN EL NUCLEO (N) EL NUCLEOLO (NI) Y CUMULOS DE CROMATINA DENSA (Cr) RODEANDO LA ENVOLTURA NUCELAR (En), EN EL CITOPLASMA (Cit) VEMOS EL APARATO DE GOLGI (GI), EL RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO (RE), POLISOMAS (po) Y LA MEMBRANA CITOPLÁSMICA (mCit).

TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO).
10,000 AUMENTOS A 80 KV.

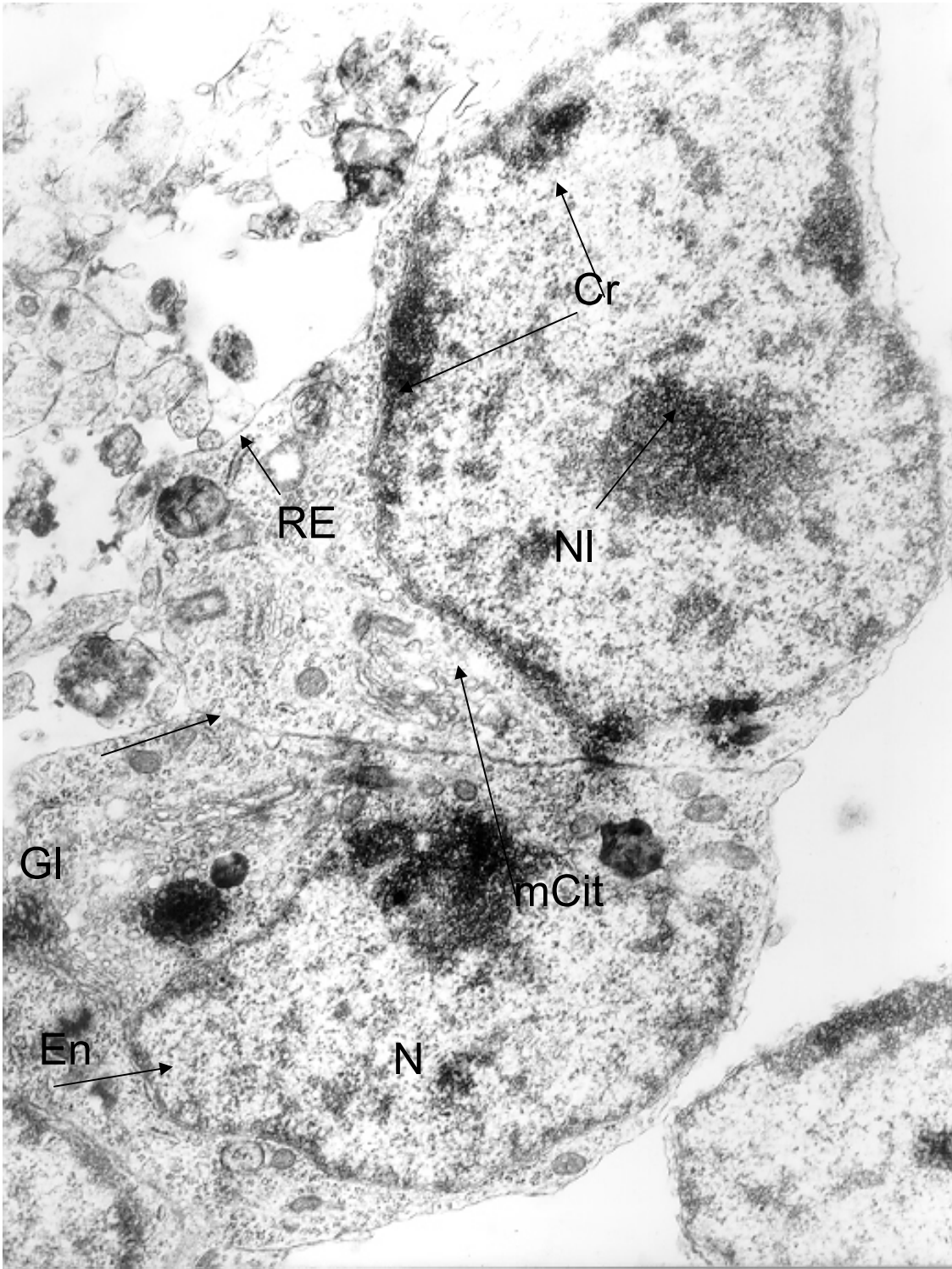
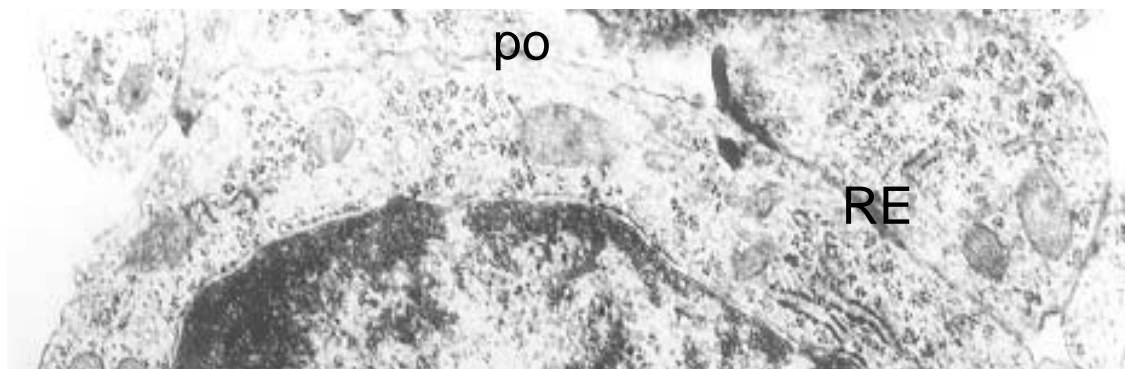


FIGURA 9. ULTRAESTRUCTURA DE UNA CELULA GRANULAR EN CULTIVO DE 6 DIV (*DIAS IN VITRO*) TRATADA CON ALTO POTASIO. SE VE DENTRO DEL NUCLEO (N) AL NUCLEOLO (NI) Y CUMULOS DE CROMATINA DENSA (Cr) RODEANDO LA ENVOLTURA NUCLEAR (En). EN EL CITOPLASMA (Cit) OBSERVAMOS EL AUMENTO EN LA CANTIDAD DE RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO (RE) Y DE POLIRIBOSOMAS (po). NOTAMOS EL APARATO DE GOLGI (GI).

TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO). 10,000 AUMENTOS A 80 KV.



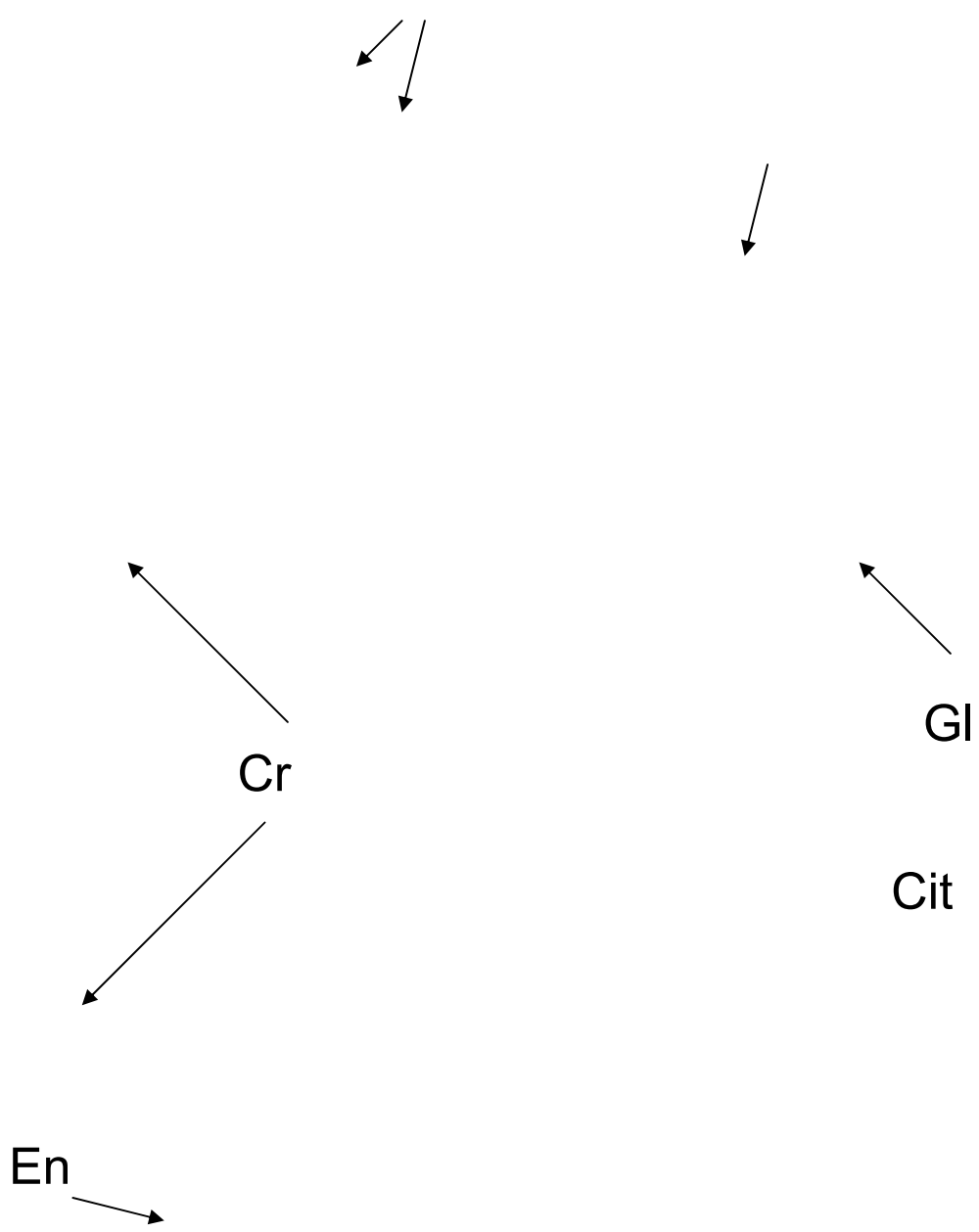
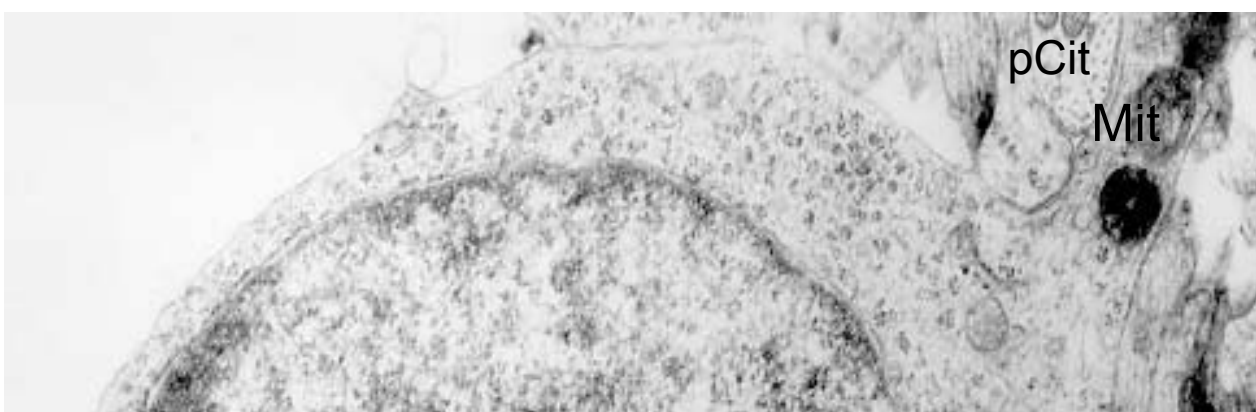


FIGURA 10. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE UNA CELULA GRANULAR EN CULTIVO DE 6 DIV (*DIAS IN VITRO*) TRATADA CON ALTO K+. EN EL CITOPLASMA (Cit) SE OBSERVAN POLIRIBOSOMAS (po), EL APARATO DE GOLGI (GI) Y MITOCONDRIAS (Mit) QUE TAMBIEN SE PRESENTAN EN LAS PROLONGACIONES CITOPLASMATICAS (pCit). EN EL NUCLEO (N) SE OBSERVAN EL NUCLEOLO (NI) Y CUMULOS DE CROMATINA DENSA (Cr) RODEANDO A LA ENVOLTURA NUCLEAR (En).
TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO).
10,000 AUMENTOS A 80 KV.



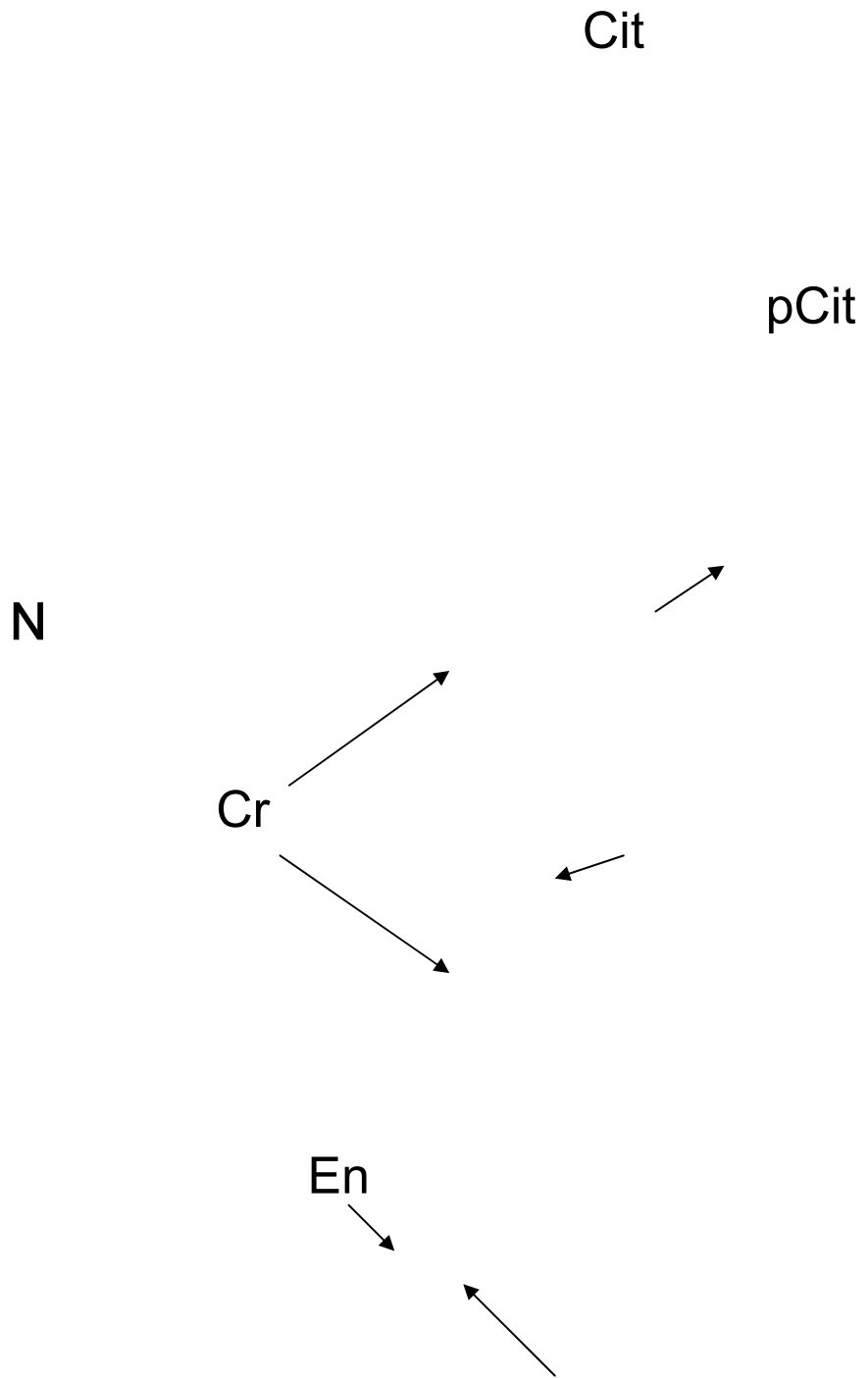
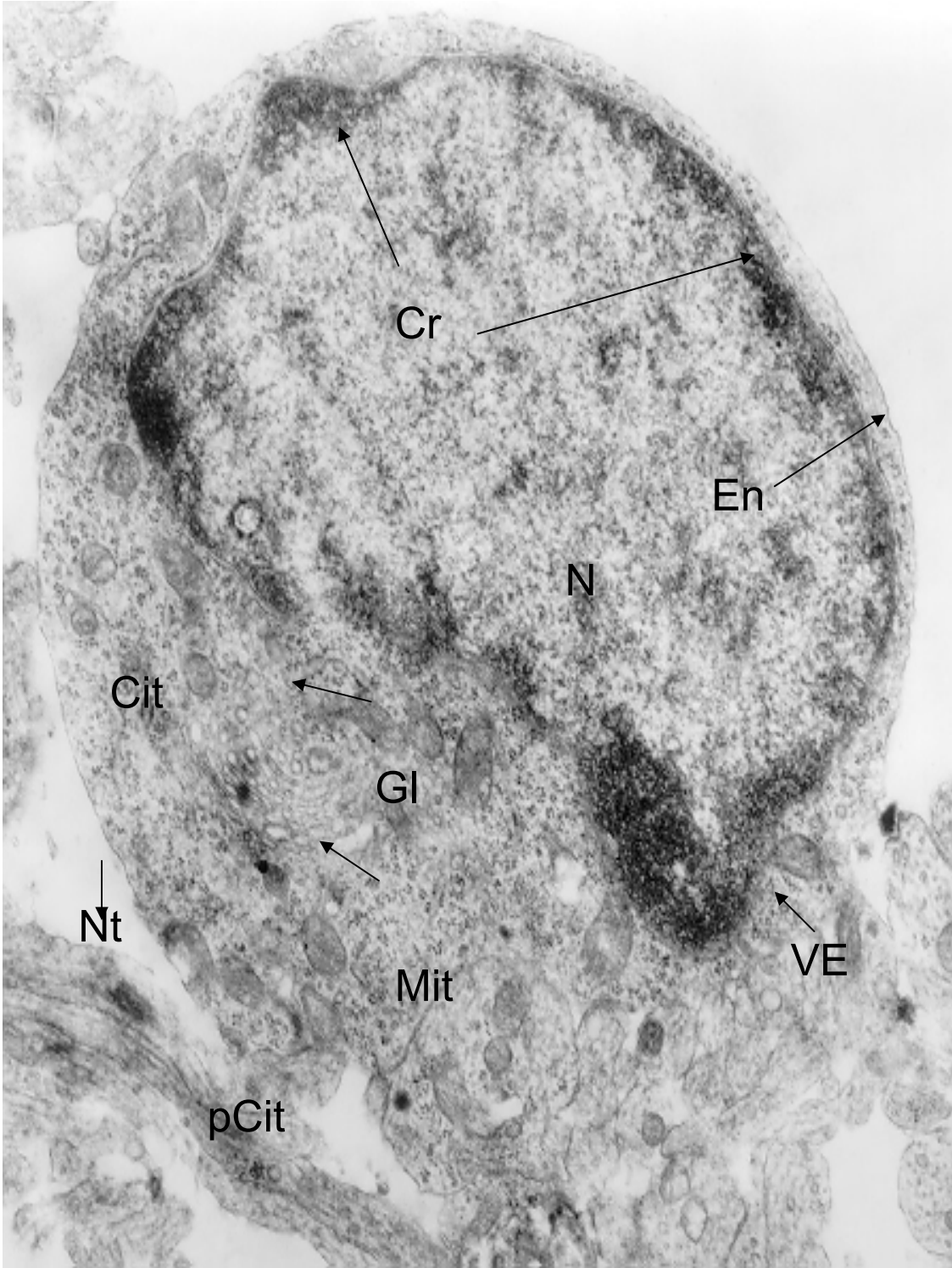




FIGURA 11. MICROGRAFIA DE CELULAS GRANULARES EN CULTIVO DE 6DIV (*DIAS IN VITRO*) ,MANTENIDAS EN CONDICIONES CRONICAS DE ALTO K⁺. AQUÍ OBSERVAMOS CORTES TRANSVERSALES DE PROLONGACIONES CITOPLASMATICAS (pCit), Y PODEMOS DISTINGUIR VESICULAS CLARAS (VE), NEUROTUBULOS (Nt) Y MITOCONDRIAS (Mit). EN EL CITOPLASMA (Cit) SE ADVIERTE UN GRAN APARATO DE GOLGI (Gi) CERCA DEL NUCLEO (N), DONDE OBSERVAMOS CÚMULOS DE CROMATINA DENSA (Cr) RODEANDO A LA ENVOLTURA NUCLEAR (En).
TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO)
10,000 AUMENTOS A 80 KV.



EFEECTO DEL NMDA:

Al evaluar las células del grupo tratado con NMDA (N-metil-D-aspartato) 150 μ M en un análisis ultraestructural (Figs. 12 a 15), observamos un aumento considerable en el tamaño general del soma, y es particularmente notable, el incremento de la proporción del citoplasma.

Estos núcleos periféricos presentan varios conjuntos de cromatina densa (Cr) tanto adosados a la membrana nuclear como diseminados dentro del núcleo. En algunas de estas células también podemos observar claramente su nucleolo (NI) (Figs.14 y 15). En el gran citoplasma de las células tratadas con NMDA podemos advertir un notable incremento en la proporción de estructuras laminares que demuestran una gran actividad de síntesis. Organelos como lo son el aparato de Golgi (GI) (que al igual que en las células de los grupos control y alto potasio lo encontramos cercano al núcleo) y el retículo endoplásmico rugoso (RE). Se encontraron con una mayor densidad y distribuidos ampliamente a lo largo de todo el citoplasma. En particular, el aparato de Golgi es la estructura que aumentó de una manera muy significativa la proporción en la relación citoplasma-aparato de Golgi en las células del grupo control e igualmente se nota este drástico incremento en las observaciones del grupo tratado con alto potasio, como lo vemos en la figura 14.

En las figuras 14 y 15 podemos notar que entre otros constituyentes citoplasmáticos que tienden de forma muy notoria a aumentar su proporción en la densidad, son las mitocondrias (MIT), a algunas de las cuales podemos observarles también sus estructuras laminares.

En las figuras 13-14 notamos un claro aumento en la densidad de los polisomas esparcidos en el citoplasma y también se ve un aumento en la concentración del retículo endoplásmico rugoso en relación a los grupos control y alto potasio. Sin embargo en el retículo endoplásmico, no observamos un incremento tan notorio como en las otras estructuras arriba mencionadas.

FIGURA 12. ULTRAESTRUCTURA DE UNA CELULA GRANULAR DE 6 DIV (DIAS *IN VITRO*) CON UN TRATAMIENTO CRONICO DE NMDA 150 μ M. SE NOTA UN GRAN NUCLEO (N) Y CROMATINA DENSA (Cr) RODEANDO LA ENVOLTURA NUCLEAR (En). EN EL CITOPLASMA (Cit) OBSERVAMOS ESTRUCTURAS COMO LAS MITOCONDRIAS (Mit), EL APARATO DE GOLGI (GI), Y EL RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO (RE). SE APRECIA UNA GRAN CANTIDAD DE POLISOMAS (po). TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO) 10,000 AUMENTOS A 80 KV.

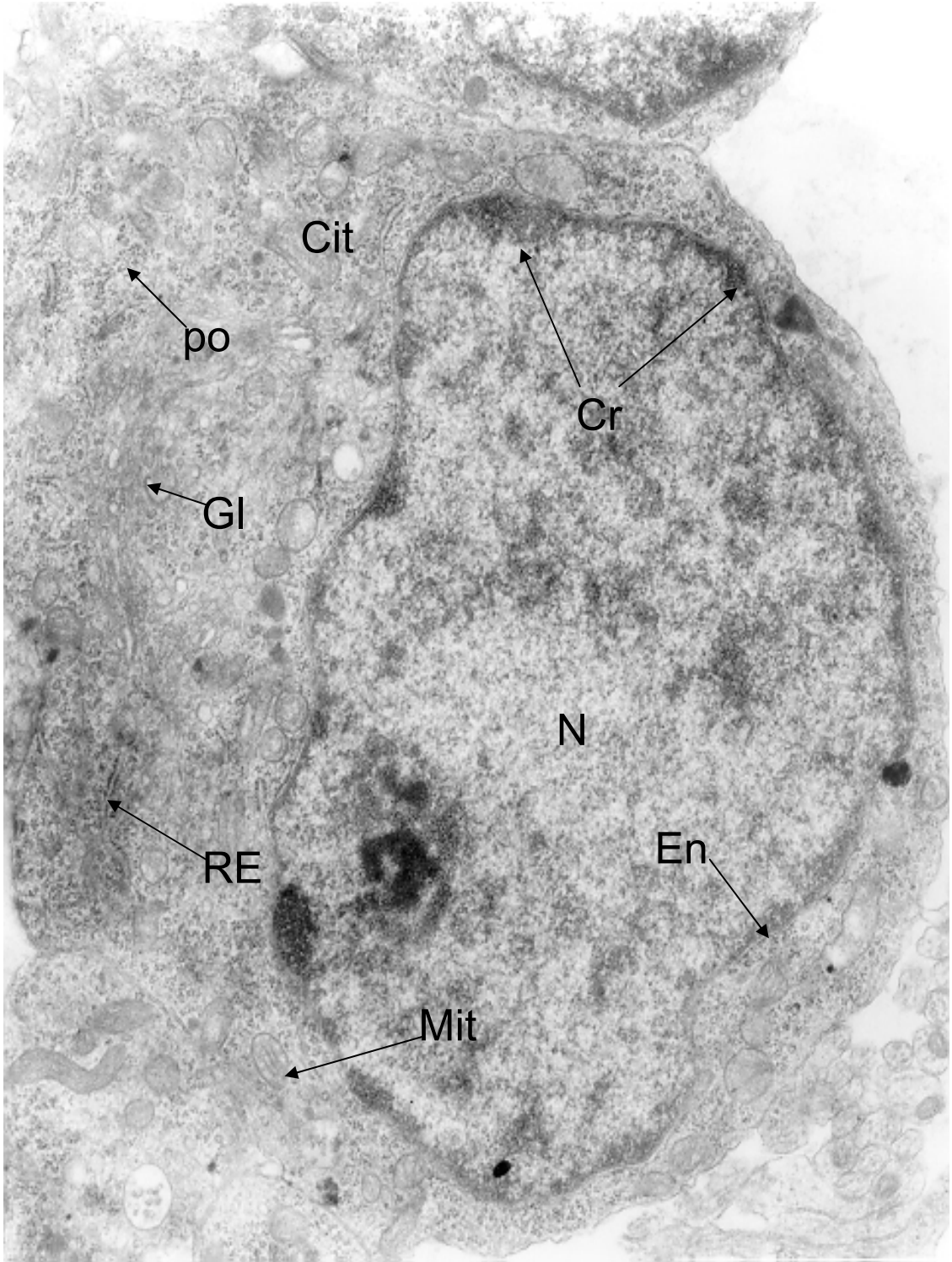


FIGURA 13. CELULA GRANULAR DE 6 DIV (DIAS *IN VITRO*) DEL GRUPO TRATADO CON NMDA. OBSERVAMOS EN EL NUCLEO (N) CUMULOS DE CROMATINA DENSA (Cr) RODEANDO LA ENVOLTURA NUCLEAR (En) Y EN EL CITOPLASMA (Cit) UN APARATO DE GOLGI (G) MUY DESARROLLADO, POLISOMAS (po) DISGREGADOS O ASOCIADOS AL RETICULO ENDOPLASMICO (RE) Y UNA GRAN CANTIDAD DE MITOCONDRIAS (Mit). TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO). 10,000 AUMENTOS A 80 KV.

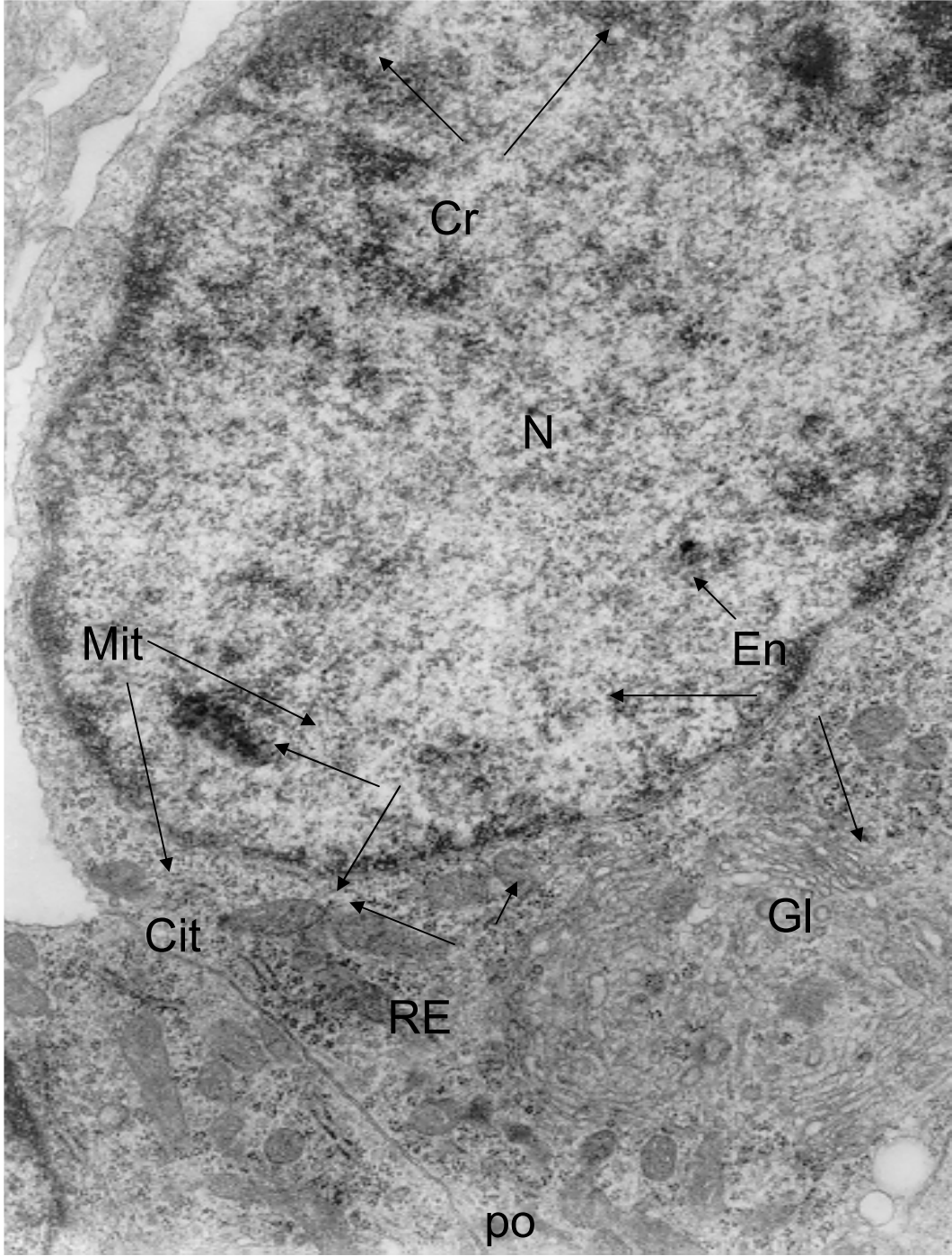
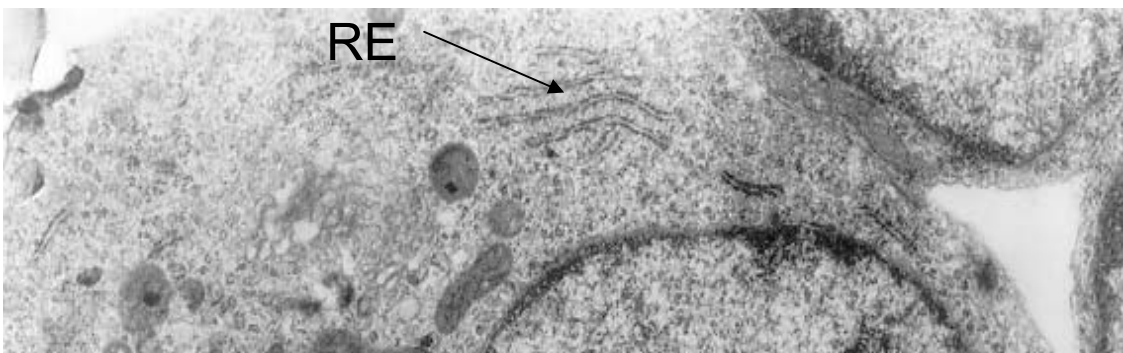


FIGURA 14. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE UNA CELULA GRANULAR EN CULTIVO DE 6 DIV (*DIAS IN VITRO*) DEL GRUPO TRATADO CON NMDA. EN EL CITOPLASMA (Cit) SE ADVIERTE EL INCREMENTO DE LA DENSIDAD DE LAS MITOCONDRIAS (Mit), EL RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO (RE) Y DE LOS POLISOMAS (po). OBSERVAMOS TAMBIEN EL APARATO DE GOLGI (GI) , MIENTRAS QUE EN EL NUCLEO (N) NOTAMOS VARIOS CUMULOS DE CROMATINA DENSA (Cr) RODEANDO LA BIEN CONSERVADA ENVOLTURA NUCLEAR (En). TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO) 10,000 AUMENTOS A 80 KV.



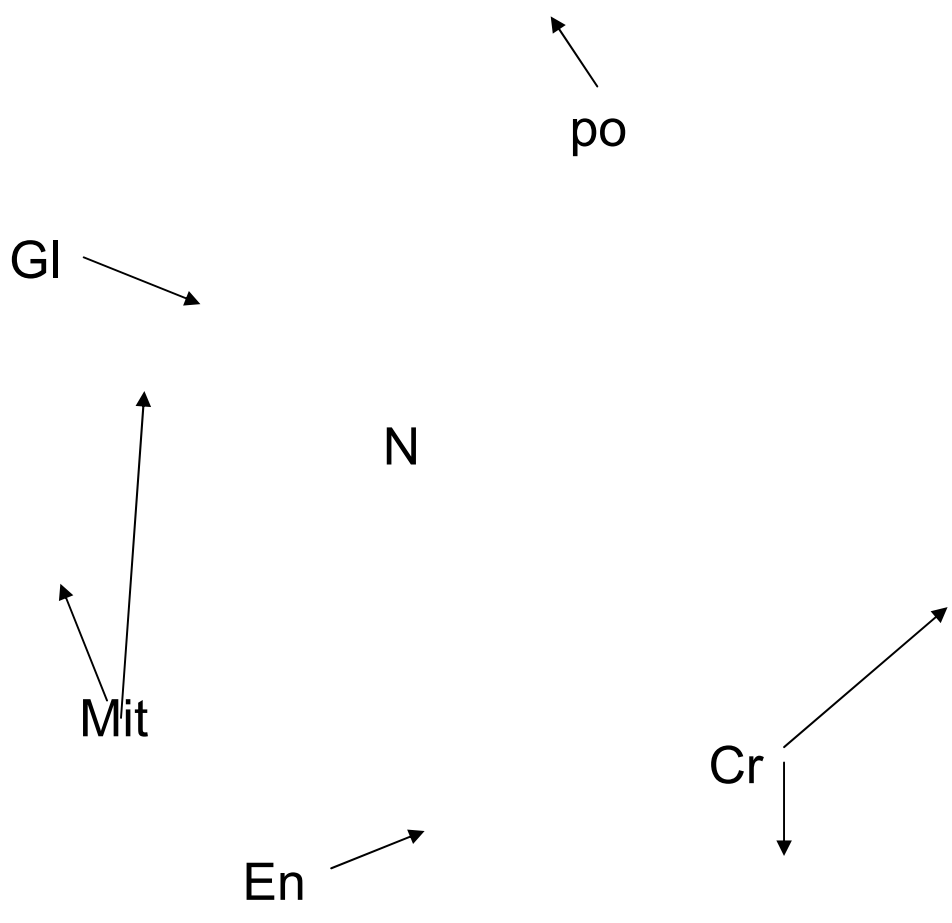
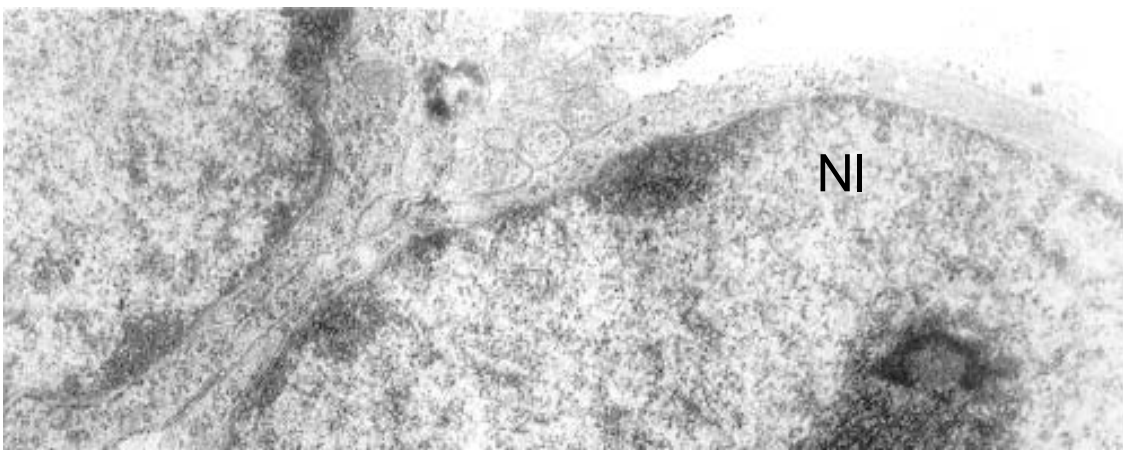
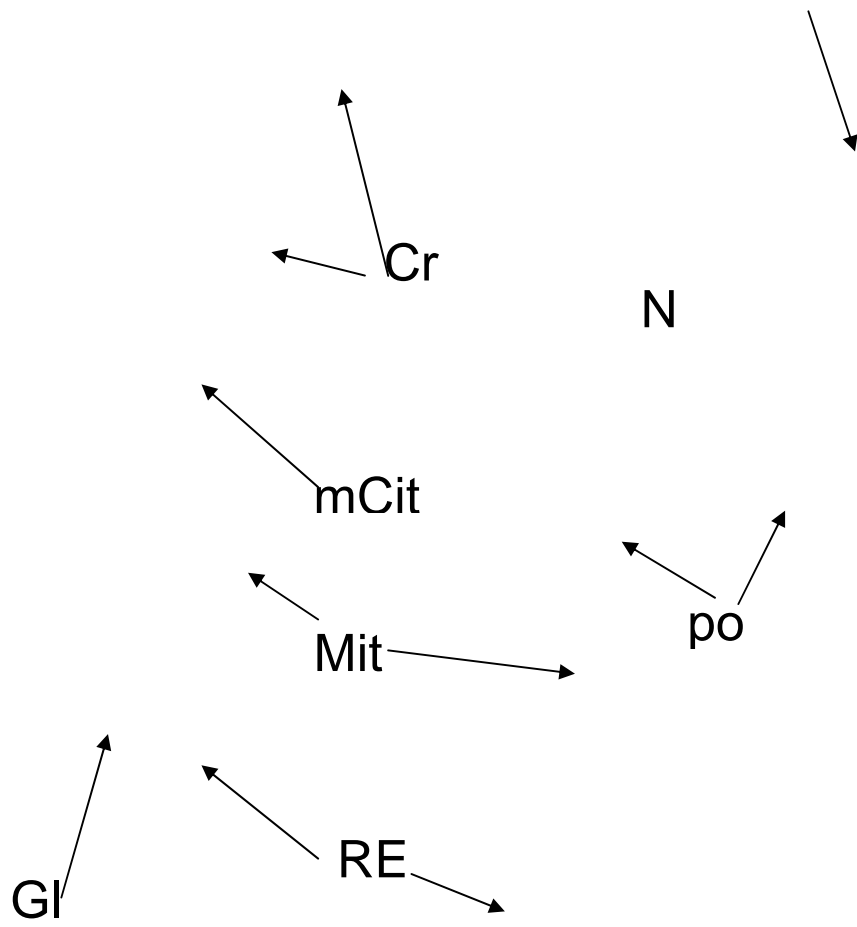


FIGURA 15. CELULAS GRANULARES EN CULTIVO DE 6 DIV (DIAS *IN VITRO*) DEL GRUPO TRATADO CON NMDA 150 μ M. OBSERVAMOS EN EL NUCLEO (N) EL NUCLEOLO (NI) Y CUMULOS DE CROMATINA DENSA (Cr) RODEANDO LA ENVOLTURA NUCLEAR (En). EN EL CITOPLASMA NOTAMOS LA ABUNDANTE CANTIDAD DE MITOCONDRIAS (Mit), EL RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO (RE) Y EL APARATO DE GOLGI (Gi). PODEMOS VER EL BUEN ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LA MEMBRANA CITOPLASMICA (mCit) QUE DELIMITA INDIVIDUALMENTE A LAS NEURONAS QUE COMPONEN ESTE CUMULO CELULAR. TECNICA DE CONTRASTE GENERAL (ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO) 10,000 AUMENTOS A 80 KV.





V DISCUSION.

En este trabajo se estudió la ultraestructura de las células granulares del cerebelo en cultivo y las posibles diferencias en las estructuras celulares debido al efecto trófico, ya conocido, del alto potasio y del N-metil- D-Aspartato (NMDA) en este tipo celular.

Actualmente se ha demostrado que la depolarización por potasio no sólo influye directamente en la sobrevivencia de neuronas en determinadas etapas del desarrollo, sino también afecta la maduración bioquímica de las células granulares del cerebelo. (Gallo y cols. 1987; Balász y cols. 1988; Morán y cols. 1992). Balász en 1988 establece que la dependencia por la despolarización provocada por potasio en las células granulares en cultivo sólo se presenta del 2DIV (días *in Vitro*) al 4DIV (día *in Vitro*) lo que sugirió que *in vitro* tal despolarización coincide en el tiempo al que ocurren las primeras innervaciones que estas células reciben *in vivo* a través de las fibras musgosas. Al ser glutamatérgicas estas fibras, Balász sugiere que alguna sustancia análoga al glutamato podría sustituir al potasio. Tal es el caso del NMDA (N-metil-D-aspartato) que puede promover la sobrevivencia de neuronas cultivadas con bajo potasio.

En nuestro trabajo, a pesar de ser solo una muestra pudimos apreciar que en los citoplasmas de las células tratadas con alto potasio (K^+) y con NMDA (N-metil-D-aspartato) muestran un incremento de tamaño, el cual es más notorio en el grupo de células tratadas con NMDA. Esto coincide con algunas observaciones que hacen Peng y sus colaboradores en 1991 en células mantenidas con alto potasio. También observamos aumento en la extensión que ocupan el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi después de que las células granulares se mantuvieron en cultivo con alto potasio, pero el aumento fue notablemente mayor en células tratadas con NMDA. Estos resultados sugieren que en estas células existe una síntesis proteica muy activa. Estas observaciones coinciden con lo que se reportó en estudios de la bioquímica de estas células por Morán y Rivera (1992); donde la Cicloheximida y Actinomicina D (ambos inhibidores de la síntesis proteica) bloquean el efecto del NMDA y del potasio sobre la actividad de la PAG y de la AAT, sugiriendo que el efecto inducido por NMDA y por potasio ejerce de una síntesis *de novo* de proteínas y de RNA.

VI CONCLUSIONES.

De nuestro trabajo podemos concluir en dos sentidos: Por un lado, podemos hablar de los aspectos técnicos, en particular de la conservación de las células. El estudio de la ultraestructura del Sistema nervioso Central implica dificultades en la fijación del tejido, producto de su natural protección por la barrera hematoencefálica. La aproximación que aquí hicimos al trabajar células en monocapa evitó esta inconveniencia, pero las células en cultivo son de manejo muy delicado y tuvimos que intentar varios procesos hasta lograr la buena conservación del material como se observa en las micrografías que mostramos como ejemplo para cada una de las condiciones experimentales.

Por otro lado considerando los aspectos fisiológicos, podemos sugerir que la activación del receptor de NMDA (N-metil-D-aspartato) como la despolarización por potasio de células granulares de cerebelo inducen cambios morfológicos a nivel ultraestructural que coinciden con un efecto trófico de maduración tanto bioquímica como morfológica. Estos resultados apoyan las observaciones previas en el sentido de que la activación del receptor tipo NMDA en la sinapsis glutamatergica de las células granulares es determinante para la maduración y diferenciación de estas células en periodos críticos del desarrollo. Las observaciones cualitativas que hicimos en este estudio solo son una muestra de lo que sugerimos ocurre en una pequeña población, pero estudios subsecuentes podrían aportar datos relevantes sobre la ultraestructura de las células granulares de rata en cultivo durante el desarrollo.

VII BIBLIOGRAFIA

1. Alavez S., Gutierrez-Kobeh L., Morán J. (1996) Characterization of the activation of glutaminase induced by N-methyl-D-aspartate and potassium in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res.* Sep 1;45(5):637-46.
2. Altman J. (1982). Morphological development of rat cerebellum and some of its mechanism. *Exp. Brain Res.*, Suppl. 6 8-49
3. Balaz R. (1988). Metabolic imbalance and nerve cell damage in the brain. *Progress in Brain Research* 73:447-463.
4. Burgoyne R. D. and Cambray- Deakin M. A. (1988). The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Research Reviews* 13 77-101.
5. Caballero-Benítez A., Alavez S., Uribe R.M., Morán J. (2004). Regulation of glutamate-synthesizing enzymes by NMDA and potassium in cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci.* Apr;19(8):2030-8.
6. Cotman C. and Inversen L. (1987). Excitatory aminoacids in the brain- focus on NMDA receptors. *TINS* 10(7):263-265.
7. Dreyfus C. and Black I. (1990) Multiple approaches to brain culture in methods in neuroscience. Vol. 2 Cell Culture. P. Michael Conn Eds. 3-17.
8. Fonnum T. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem* (42) 1-11.
9. Gallo V., Kinsbury A., Balász R. and Sogensen O. (1987). The role of depolarization, the survival and diferentiation of cerebellar granulle cells in culture. *J. of Neuroscience* 7(7): 2203-2213.
10. Garthwaite, J. Garthwaite G. and Hajos F (1986). Aminoacid neurotoxicity: relationship to neuronal despolarization in rat cerebellar slices. *Neuroscience* (18) 449-460.
11. Hansen (1987). Trophic effects of GABA on cerebellar granule cells. In : neurotrophic activity of GABA during development. *Neurology and Neurobiology* (32) 109-138.
12. Ito M. (1984). *The cerebellum and neural control.* Raven Press New York 580pp.
13. Koning N., Drian M., Privat A., Lamande N., Pares- herbule N., Schaner M. (1986). Dissociated cells of foetal rat pallium grown in culture medium supplemented with noradrenaline. Efects of the expression of neuron-specific enolase and cell adhesion molecule L1. *Neurosci. Lett.* 66:67-72.
14. Landis D. (1971). Cerebellar cortical development in the stagerer mutant mouse. *J: Cell Biol.* 51, 159 a.
15. Lauder (1983). Hormonal and humoral influences on brain development. *Phyconeuroendocrinology* 8:121-155.
16. Liesi P., Akinshola E., Matsuba K., Lange K., Morest K., (2003). Cellular migration in the postnatal rat cerebellar cortex: Confocal-infrared microscopy and the rapid Golgi method *J. Neurosci.Res.* Vol.72,(3)290-302
17. Morán J. Patel A . (1989). Stimulaton of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of granule neurons and not astrocytes. *Brain Res* 486: 15-25
18. Morán J, Rivera-Gaxiola (1992) M. Effect of potassium and N-methyl-D-aspartate on the aspartate aminotransferase activity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci Res.* Oct;33(2):239-47.

19. Narumi S., Kimelberg H. and Bourque R. S. (1978). Effects of norepinephrine on the morphology and some enzyme activities of primary monolayer cultures from rat brain. *J. Neurochem.* 31:1479-1490.
20. Palaiologos G., Hertz L. and Schousboe A.(1988). Evidence that Aspartateaminotransferase activity and ketodicarboxylate carrier function are essential for biosynthesis of transmitter glutamate. *J. Neurochem.* 51:317-320.
21. Palay S. L. (1982). Current status of neuroanatomical research in the cerebellum. In Palay S.L, Chan Palay V (Eds). *Exp. Brain. Res. Suppl.* 6 "The cerebellum New Vistas". Berlin Heidelberg. New York: Springer Verlag, 1-8.
22. Patel A , Zinkand C W., Thompson C., Keith R and Salama A. (1990). Role of glycine in the N-methyl-D-aspartate mediated neuronal citotoxicity. *J.Neurochem.* 54 (3): 849-854.
23. Purves D. and Lichman J. (1985). *Principles of neural development.* Sinaver Associates Inc. Publishers. 433.
24. Rakic P. (1974). Neurons in Rhesus monkey visual cortex: Systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*183: 425-427.
25. Ross C. A, Bredth D. and Snyder S. H. (1990). Messenger molecules in the cerebellum. *TINS* Vol. 13 (6).
26. Schousboe A. (1987). An overview of the biochemistry and pharmacology of glutamic and GABAergic neurotransmission. *Bioche. Soc. Trans.* 15: 205-208.
27. Tach W. T. (1980). The cerebellum. En: *Medical Physiology.* 14th Ed. (VB Mountcastle Ed) St. Louis, Mosby 837-858.