



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

POSIBLE INTERACCION ENTRE LA
ACETILCOLINA
Y LA TRANSMISION GLUTAMATERGICA
EN EL CEREBELO

T E S I S
Que para obtener el título de
B I O L O G O
P R E S E N T A :
Luis Medrano González

MEXICO, D. F. 1985



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 está 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.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION GENERAL.	
ASPECTOS BASICOS DE LA ESTRUCTURA Y FUNCION DEL CEREBELO.....	
Estructura macroscópica.....	3
Citología de la corteza cerebelosa.....	5
Aferentes a la corteza cerebelosa.....	8
Conexiones aferentes del cerebello.....	10
EL CEREBELO EN RELACION CON LA EVOLUCION DE LOS VERTEBRADOS.....	
NEUROQUIMICA DEL CEREBELO.....	14
SECCION EXPERIMENTAL.	
ANTECEDENTES.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	27
Obtención de distintas fracciones de tejido.....	27
Extracción de la fracción sinaptosomal cruda (P2).....	27
Obtención de la capa molecular del cerebello.....	27
Tratamiento con 3-acetilpiridina (3-AP).....	28
Captación de alta afinidad de colina.....	28
Determinación de la actividad de la colina-acetiltransferasa (CAT).....	30
Perfusión discontinua.....	32
Perfusión continua.....	34
RESULTADOS.....	36
Colina-acetiltransferasa (CAT).....	36
Captación de alta afinidad de colina.....	37
Liberación de acetilcolina.....	38
Liberación de glutamato.....	41
DISCUSION.....	43
CONCLUSION.....	58
REFERENCIAS.....	61

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el papel de la acetilcolina como neurotransmisor en la capa molecular del cerebelo desde un punto de vista bioquímico utilizando a la rata como animal de experimentación. Se evaluaron los criterios de síntesis de acetilcolina, captación de alta afinidad de colina y liberación de acetilcolina.

Se observó que en la capa molecular del cerebelo existe la enzima colina-acetiltransferasa (CAT) que sintetiza acetilcolina a partir de colina y acetyl-CoA. La actividad de esta enzima surge con el mismo patrón temporal en que aparecen las sinapsis de las fibras paralelas y las células de Purkinje. Con respecto a la captación de alta afinidad de colina, se vio que existe un sistema de transporte activo de alta afinidad de colina en la capa molecular. Sin embargo, a diferencia de lo que se ha descrito en otros sistemas colinérgicos, la captación de colina no depende del ion sodio. No obstante, este sistema de transporte es sensible a la acción del hemicolina (HC-3), una sustancia que inhibe específicamente la captación de alta afinidad de colina en otros sistemas colinérgicos. En virtud de la existencia de un sistema de captación de alta afinidad de colina y de la presencia de la CAT, se decidió estudiar la liberación de acetilcolina en la capa molecular del cerebelo. Se observó que se establece una línea de liberación espontánea de acetilcolina. Sin embargo, no fue posible estimular la liberación de acetilcolina con despolarización inducida por veratrina o por la elevación de la concentración externa de potasio. Ya que se tienen varios antecedentes de la asociación de la acetilcolina con las fibras paralelas, como neurotransmisor es el glutamato, se estudió la acción del glutamato sobre una posible liberación de acetilcolina. Se vio que en la capa molecular del cerebelo, el glutamato únicamente en condiciones de despolarización, estimula la liberación de acetilcolina. La acetilcolina, por su parte, no parece tener ningún efecto directo sobre la liberación de glutamato.

Estos datos se discuten en relación a otros reportes que tratan sobre la acetilcolina en el cerebelo. De esta discusión se desprende una hipótesis sobre el papel de la acetilcolina en el cerebelo. Se propone que la acetilcolina podría liberarse de las dendritas de las células de Purkinje por efecto del glutamato en condiciones de despolarización. La acetilcolina, al actuar en receptores muscarínicos localizados en las células de Purkinje, aumentaría así la excitabilidad de esta neurona. Este aumento en la excitabilidad, a su vez, podría provocar cambios en el efecto de las fibras paralelas sobre las células de Purkinje. Esto concordaría con el modelo de Marr sobre el funcionamiento de la corteza cerebelosa.

INTRODUCCION GENERAL

ASPECTOS BASICOS DE LA ESTRUCTURA Y FUNCION DEL CEREBELO

El cerebelo es la estructura del sistema nervioso central de vertebrados quizá mejor conocida, ya que su organización anatómica comparada con otras zonas del cerebro, ha hecho pensar que el cerebelo ofrece un buen modelo experimental para estudiar de qué manera la función neuronal da cuenta de los complicados procesos nerviosos. No obstante, hasta hoy no ha sido posible dar una explicación completa al funcionamiento de esta estructura ya que dicha función depende de una interacción con muchos otros elementos del sistema nervioso que definen un contexto fisiológico muy complejo. Así pues, la comprensión cabal del cerebelo existe chonder más no solamente en el cerebelo sino en todo el sistema nervioso en general.

En el siglo XVII Willis sugirió que el cerebelo controlaba los movimientos reflejos e involuntarios. Sin embargo, a principios del siglo XIX, Rolando y Fleurens describen perturbaciones de movimientos voluntarios, entre los que se incluye el habla, causados por lesiones en el cerebelo. Hoy día, se sabe que esta estructura coordina patrones motores muy elaborados, resule movimientos finos y posturales, estos últimos en relación al equilibrio y participa en el caso del ser humano, en la articulación de palabras. Podemos entonces, adrupar el papel del cerebelo en el balance, el tono muscular y la coordinación sensoriomotora (Pearson y Pearson 1976).

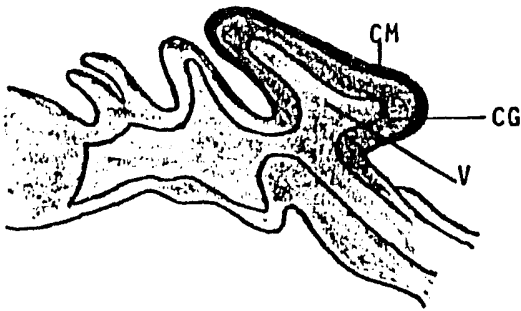
Estructura macroscópica.

El término cerebelo deriva del diminutivo de la palabra latina cerebrum y significa cerebro pequeño o menor. El cerebelo en efecto, semeja un cerebro. Se encuentra en la región dorsal posterior del encefalo y constituye el metencefalo en el que originalmente se encuentra el cuarto ventrículo cerebral o metacele y que en los mamíferos está muy reducido. En los peces, sin embargo, dicha cavidad es muy amplia y ocupa un volumen importante

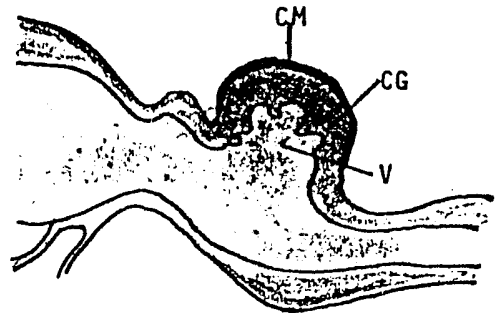
del metencéfalo. El cerebelo está sujeto a la parte posterior del encéfalo concretamente en el bulbo raquídeo a través de tres pedúnculos formados por fibras nerviosas que son parte de las vías aferentes e eferentes de la corteza cerebelosa. Dichos pedúnculos son: el inferior o cuerpo rafeiforme que lleva fibras espinocerebelosas, olivocerebelosas, reticulocerebelosas, vestibulocerebelosas, del cruzado y del fascículo uncinado. El segundo pedúnculo es el medio (brachium pontis) que lleva fibras pontinocerebelosas. El tercer pedúnculo es el superior (brachium conjunctivum) cuyos fibras son dentatorubroespinales, espinocerebelosas, tectocerebelosas y trisaminocerebelosas (Eccles et al. 1967).

Forman parte del cerebelo tres pares de núcleos situados en su base que son: el inferior o fastigial, el medio o emboliforme (o interpositus) y el superior o dentado. El número de núcleos varía de especie a especie y en el caso de los anfibios ni siquiera existen (Pearson y Pearson 1976). En este trabajo se hará referencia al caso más general que se conoce en mamíferos. Los núcleos del cerebelo se conectan a la corteza cerebelosa por medio de fibras que junto con aquellas provenientes de los pedúnculos, conforman la zona central de materia blanca del cuerpo del cerebelo y que por su forma ramificada es llamada árbol de la vida. En la parte superficial del cerebelo se encuentra un manto de materia gris que es la corteza cerebelosa, la cual está muy plegada formando una serie de proyecciones más o menos digitiformes hacia el interior del cuerpo del cerebelo (Figura 1). El plegamiento de la corteza provoca que en la superficie del cerebelo se observen una serie de fisuras transversales que dividen la corteza en folias, los que a su vez presentan fisuras menores formando segmentos a los que se da el nombre de lóbulos (Figura 2).

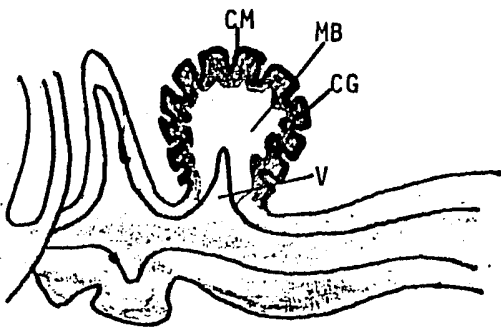
Longitudinalmente, el cerebelo se divide en dos partes separadas por la fisura posterolateral. La parte posterior es el lóbulo X al que se denomina flocculonodular. La región anterior o



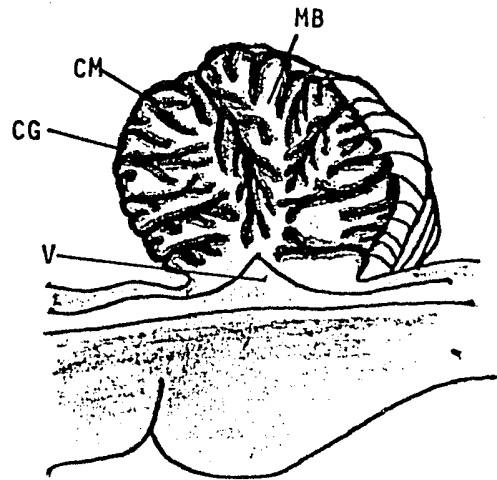
ELASMOBRANQUIO



REPTIL



AVE



MAMIFERO

Figura 1. Aspecto macroscópico del cerebelo de distintas clases de vertebrados vistos en corte sagital. Abreviaturas: CM, capa molecular; CG, capa granular; MB, materia blanca; V, cuarto ventrículo cerebral. Esquemas redibujados de: J. Alvarez del Villar. (1979).

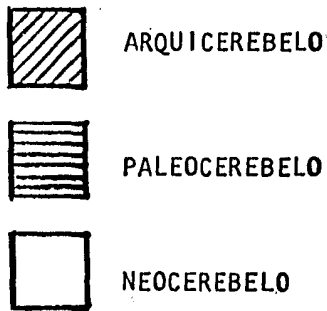
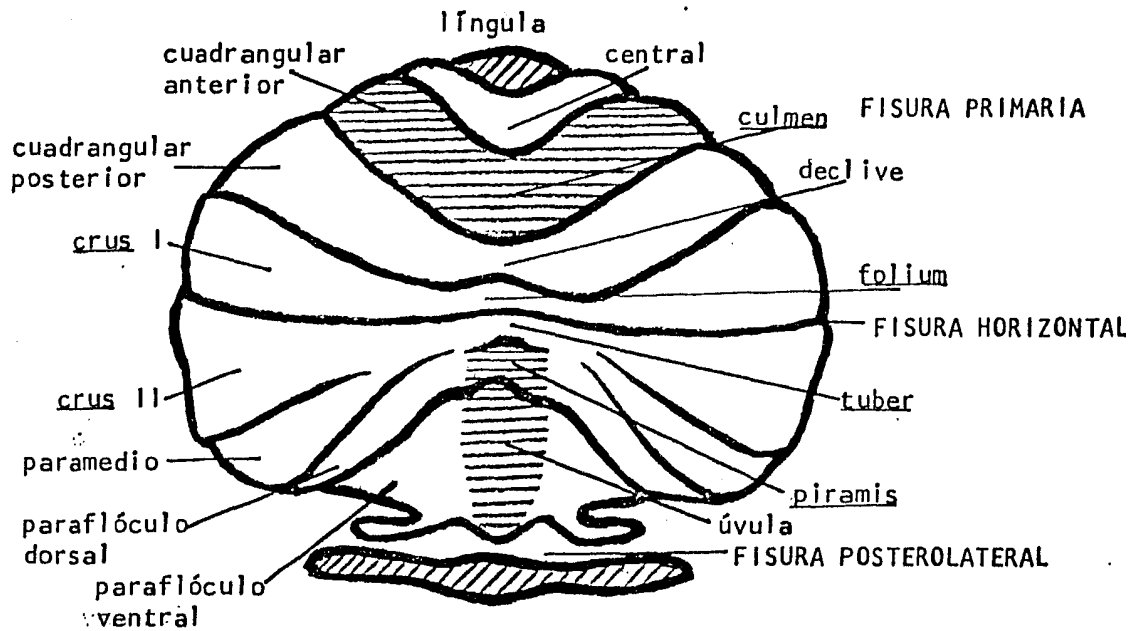


Figura 2. Esquema que muestra la regionalización del cerebelo de mamíferos. El lóbulo anterior es la parte anterior a la fisura primaria. El lóbulo posterior comprende la porción entre la fisura primaria y la fisura posterolateral. El lóbulo floculonodular se encuentra por detrás de la fisura posterolateral. Esquema redibujado de E. R. Kandel y J. H. Schwartz. (1981).

Cerebellum y su vez está segmentada por la fisura primaria en una porción anterior (lóbulos I al V) y otra posterior (lóbulos VI al IX). Transversalmente, el cerebelo se subdivide en vermis que es la parte central y los hemisferios cerebelosos que a su vez se consideran divididos en una porción intermedia y una lateral o distal (Llinás y Simpson 1981).

Estas divisiones del cerebelo no solamente reflejan relaciones anatómicas, sino también filogenéticas y funcionales como se verá más adelante. Desde un punto de vista filogenético, el lóbulo flocculonodular es la porción más antigua del cerebelo; razón por la cual recibe el nombre de araucocerebelo; recibe aferentes de los núcleos vestibulares. La región del vermis es la parte que subsecuentemente surge en la sucesión filética denominándose el neocerebelo. Se relaciona con los núcleos vestibulares en su parte posterior. Recibe aferentes visuales, auditivos y espinales. Finalmente, aparecen los hemisferios cerebelosos, o paleocerebelo. La aferencia a los hemisferios cerebelosos está constituida por la vía córtico-pontocerebelosa y proviene de la corteza de asociación a la que se cree relacionada con la planeación e inicio de los comandos motores (Llinás y Simpson 1981).

Citología de la corteza cerebelosa.

La estructura de la corteza cerebelosa se empezó a determinar a finales del siglo XIX con los estudios de Santiago Ramón y Cajal, quien aplicó la técnica de tinción anatómica desarrollada por Camilo Golgi. Los aspectos de las conexiones entre los componentes del cerebelo y de estos con otras estructuras del sistema nervioso, se han inferido a partir del uso de las técnicas de degeneración de fibras nerviosas (Desclin 1974) y de técnicas de electrofisiología (Eccles et al. 1967).

A pesar de que la corteza cerebelosa está muy plazada, especialmente en los hemisferios, su organización interna resulta

mas uniformes, regulares y por lo mismo, precisos. Además, las conexiones neuronales de la corteza del cerebelo son muy simples en comparación, por ejemplo, a lo que ocurre en la corteza cerebral. El circuito neuronal de la corteza cerebelosa es muy parecido entre las distintas clases de vertebrados, lo que indica que el procesamiento básico de información podría ser similar a pesar de que las rutas motoras reguladas pueden ser distintas (Eccles et al. 1967; Pearson y Pearson 1976; Eccles 1977 y Llinás y Simons 1981).

Se encuentran cinco tipos de células neuronales en la corteza del cerebelo: las células de Purkinje, las células granulares, las células de Golgi, las células en cesta o en canasta y las células estrelladas. La corteza del cerebelo se divide en tres estratos: la capa molecular, la capa que contiene a las células de Purkinje y el estrato donde se encuentran las células granulares (Eccles et al. 1967).

La capa molecular es la más externa. En esta capa se encuentran las células estrelladas y en cesta, las dendritas de las neuronas de Golgi y de Purkinje, y los axones de las células granulares a los que se les llama fibras paralelas.

El siguiente estrato es el de células de Purkinje. La precisión de las conexiones neuronales de la corteza del cerebelo también se manifiesta en una configuración espacial bien definida; en el caso de las neuronas de Purkinje, se observa que los cuerpos celulares están alineados regularmente en el estrato intermedio de la corteza. Del ápice del soma nace una dendrita corta que se bifurca y ramifica dicotómica y extensamente en el plano sagital, formando un profuso árbol plano cuya altura ocupa casi todo el espesor de la capa molecular. De las ramas de este árbol dendrítico nacen pequeñas espinas que protruyen en unas proyecciones bulbosas de las fibras paralelas en donde se realiza la unión sinéptica (Figura 3). Una fibra paralela hace una o pocas sinapsis con una célula de Purkinje y alcanza a tocar aproximadamente 300 de dichas

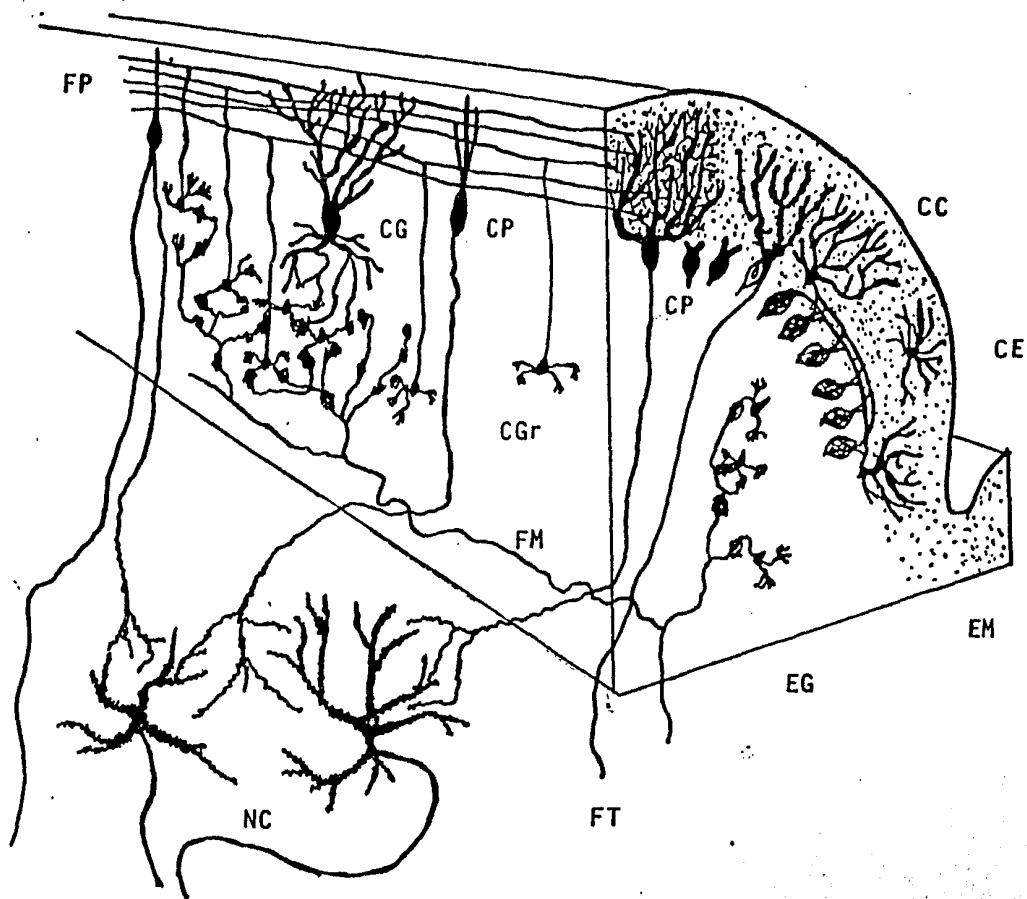


Figura 3. Arquitectura de la corteza del cerebelo. Abreviaturas: NC, núcleos del cerebelo; CP, célula de Purkinje; CG, célula de Golgi; CGr, célula granular; CC, célula en cesta; CE, célula estrellada; FT, fibra trepadora; FM, fibra muscosa; FP, fibras paralelas; EG, capa granular y EM, capa molecular. Es notable la regularidad de las conexiones celulares en toda la corteza cerebelosa. Las fibras trepadoras provienen del núcleo de la oliva inferior y las fibras muscosas de varios sitios en el encéfalo y la médula espinal. Esquema redibujado de: J. C. Eccles. (1979).

neuronas. Por su parte una célula de Purkinje establece cerca de 200.000 o más sinapsis con las fibras paralelas (Eccles et al. 1967).

El estrato más interno es el de las células granulares cuyos cuerpos son pequeños (1 μ m aproximadamente) y se encuentran tan densamente empaquetados que el número de células granulares en el cerebelo excede al del resto de las neuronas en todo el sistema nervioso. El axón de las células granulares atraviesa la capa que contiene a las somas de las células de Purkinje hasta llegar a la capa molecular. En esta capa el axón se bifurca en forma de T y corre transversal y paralelamente a la superficie del folium. Cada rama recorre aproximadamente de 1 a 5 mm dependiendo de la especie de que se trate. Los axones de las células granulares en la capa molecular constituyen las fibras paralelas. Estas fibras hacen sinapsis sobre las células de Purkinje en estas, estralladas o de Golgi. Según evidencias electrofisiológicas estas sinapsis son de tipo excitador (Eccles et al. 1967).

Las células de Golgi se encuentran también en la capa granular pero en mucho menor número que las células granulares. Los cuerpos de las células de Golgi son grandes y por lo general se encuentran por debajo de las somas de las células de Purkinje. Las dendritas de las células de Golgi emergen en todas direcciones pero la mayoría se orientan hacia arriba para entrar a la capa molecular. Estas dendritas se orientan en los tres planos de forma casi radial y se alinean con el árbol dendrítico de las células de Purkinje. Del soma de la célula de Golgi nace un axón que se ramifica en la capa granular y cuyas terminales hacen sinapsis inhibitorias con las dendritas de células granulares en el glomérulo (Eccles et al. 1967). De este modo se forma un circuito de retroalimentación negativo que regula las señales de entrada provenientes de las fibras musculosas. Posiblemente este sistema se encarga de seleccionar qué señales son las que entran a la corteza del cerebelo (Llinás y Simson 1981).

Las fibras paralelas se comunican con las dendritas de las células estrelladas y en esta las que, a su vez, inhiben a las neuronas de Purkinje laterales a aquellas con la que están alineadas. Esta inhibición ocurre así, en virtud de que el axón de las células estrelladas y en esta se orienta en dirección longitudinal (perpendicular a las fibras paralelas) y paralelamente a la superficie del folium. Mientras que las células estrelladas establecen sus sinapsis en las dendritas, las células en cesta lo hacen en el soma. Ya que las dendritas de células estrelladas y en cesta no se proyectan en un solo plano, las fibras paralelas llegan a hacer cerca de 30 sinapsis. Además, ya que las dendritas de las células estrelladas y en cesta no son tan extensas como las de células de Purkinje, cada célula estrellada y en cesta recibe aproximadamente 20,000 de dichas terminales sinápticas provenientes de las fibras paralelas. Por su parte, estas neuronas llegan a comunicarse con aproximadamente 50 células de Purkinje mientras que cada célula de Purkinje recibe terminales de 20 células estrelladas o de cesta; aproximadamente (Pearson y Pearson 1976). De este modo, se tiene que por la aferencia a la corteza cerebelosa, por las fibras muscosas, se genera una banda orientada transversalmente, de células de Purkinje excitadas y un campo alrededor de estas neuronas inhibidas. Temporalmente, se observa que la excitación en la célula de Purkinje por efecto de la estimulación a las fibras paralelas, va seguida de un período de inhibición causado por las células estrelladas y en cesta, y que dura más, cuanto mayor sea el estímulo a las fibras paralelas (Eccles et al. 1967).

Aferentes a la corteza cerebelosa.

Las aferentes que entran a la corteza del cerebello terminan como fibras muscosas, también llamadas fibras "mossy" o fibras trepadoras. Ambas aferentes tienen características estructurales y funcionales bien definidas (Eccles et al. 1967 y Marr 1969).

Las fibras muscosas entran a la capa granular en donde se

ramifican y terminan en las dendritas de las células granulares. Las sinapsis que establecen han sido caracterizadas como de tipo excitador (Eccles et al. 1967). Las fibras musculosas provienen de neuronas cuyos cuerpos celulares se encuentran en varios sitios del sistema nervioso como son la médula espinal; los núcleos centincales; los núcleos vestibulares y el cerebro medio. De este modo se forman las vías espinocerebelosas, reticulocerebelosas, córticocerebelosas y vestibulocerebelosas. Cada terminal axónica es muy larga y hace contacto sináptico con varias dendritas de las células granulares. Junto con las terminales axónicas de las células de Golgi que llasan a las dendritas de las células granulares, se forma una estructura bulbosa recubierta de células gliales a la que se le ha dado el nombre de bulbo cerebeloso o glomérulo. Cada fibra muscosa establece contacto sináptico con cerca de 600 células granulares mientras que cada célula granular hace contacto con cerca de cuatro fibras muscosas (Pearson y Pearson 1974).

Otro tipo de aferente a la corteza cerebelosa lo constituyen las fibras trepadoras que provienen del núcleo de la oliva inferior. La proyección de este núcleo a la corteza del cerebelo es contralateral. Cada fibra trepadora, al llegar a la capa molecular del cerebelo, se ramifica extensamente y establece uniones sinápticas de carácter excitador en el árbol dendrítico de las células de Purkinje (Eccles et al. 1967).

La excitación provocada por estimulación de las fibras trepadoras a las neuronas de Purkinje produce un pequeño tren de impulsos de carácter todo o nada. Esto es indicativo de que cada célula de Purkinje establece sinapsis con sólo una fibra trepadora lo cual también ha sido apoyado por estudios morfométricos (Eccles et al. 1967). En ocasiones, las fibras trepadoras realizan uniones sinápticas con células en cesta y de Golgi. El núcleo de la oliva inferior también envía fibras a núcleos cerebelosos. En virtud de que el número de células de Purkinje es aproximadamente 10 veces

menor que el número de células en el núcleo de la oliva inferior, se piensa que de cada célula de la oliva inferior ascienden a la corteza alrededor de 10 fibras trepadoras, de modo que cada neurona de la oliva inferior excita a 10 células de Purkinje (Desclin 1974 y Pearson y Pearson 1976).

A principios de la década de los años 70, se descubrió un tercer tipo de aferente al cerebelo de fibras provenientes del locus caeruleus que contiene catecolaminas, muy probablemente noradrenalina (Bloom et al. 1971). Estas fibras se distribuyen ampliamente por toda la corteza del cerebelo. Hasta la fecha, se conoce muy poco acerca del papel de estas fibras en la fisiología de la corteza cerebelosa.

Conexiones eferentes del cerebelo.

La única vía eferente de la corteza cerebelosa es la constituida por los axones de las células de Purkinje. Los terminales de estos axones inhiben a las neuronas de los núcleos del cerebelo y a los núcleos vestibulares, a las células en cesta y a las células de Golgi.

Con el fin de determinar el papel del cerebelo en el procesamiento de señales de los patrones motores, se han obtenido datos acerca de hacia dónde se proyectan específicamente las vías eferentes de la corteza del cerebelo (Figura 4). El vermis se comunica al núcleo fastigial, las partes intermedias al interpositus y las porciones laterales, al núcleo dentado (Ulinés y Siarson 1981).

Las regiones de la corteza cerebelosa que reciben fibras de los núcleos vestibulares: la úvula y el lóbulo flocculonodular, se proyectan directamente a los núcleos vestibulares en forma insilateral. Esta demarcación funcional da base para que a esta parte del cerebelo se le concierda como el vestibulocerebelo. El

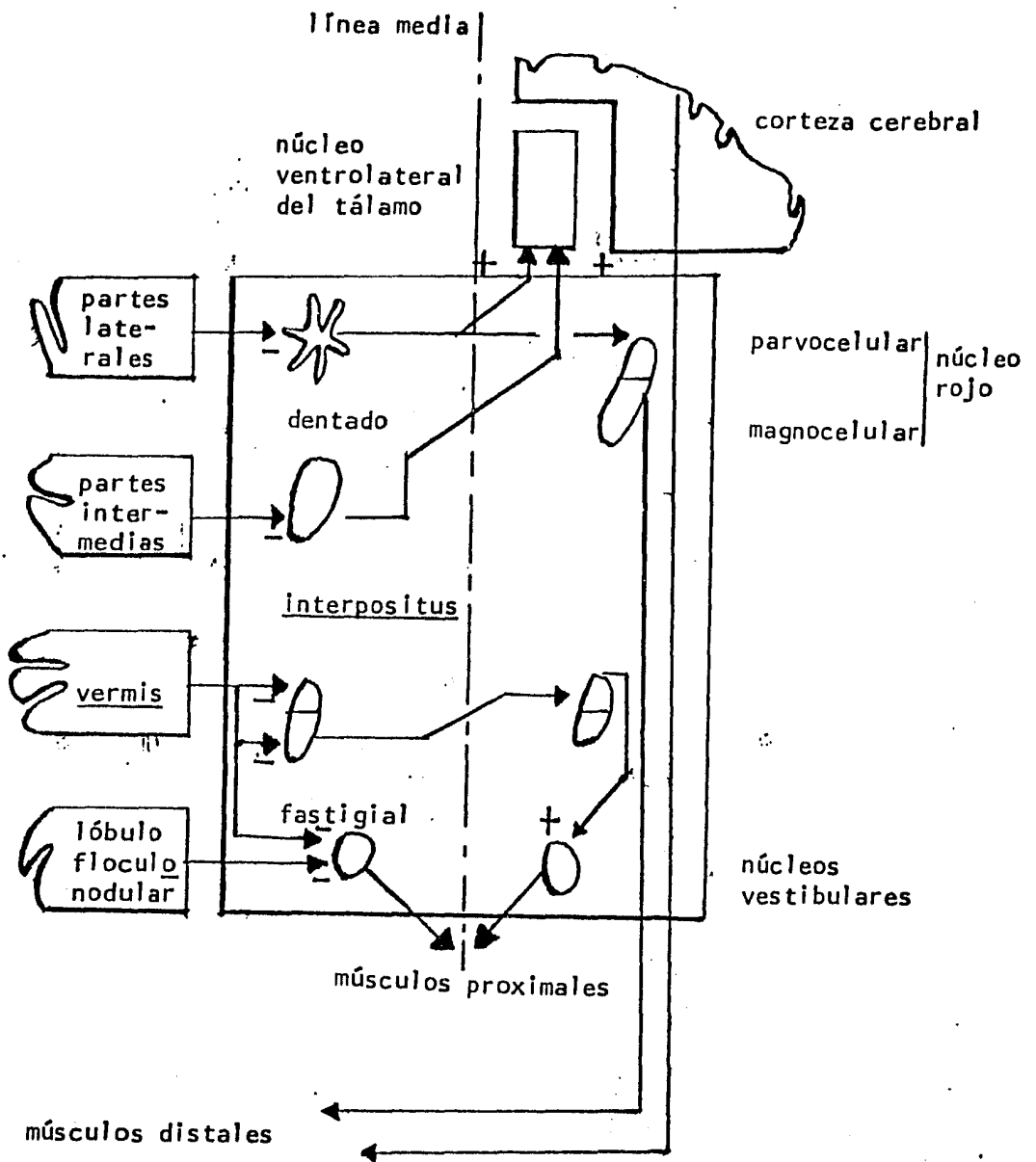


Figura 4. Conexiones eferentes del cerebelo. La única vía de salida de la corteza cerebelosa es la de las células de Purkinje que tienen un efecto inhibitorio sobre los núcleos a los que llegan. La región floculonodular se conecta a los núcleos vestibulares a través de los cuales regula los movimientos reflejos. La parte del vermis se comunica a los músculos proximales a través del núcleo fastigial ipsi y contralateral. Las partes laterales del cerebelo se comunican a través del tálamo a las cortezas de asociación y la corteza motora. Las partes laterales se comunican también al núcleo rojo que es el origen de la vía motora rubroespinal. Redibujado de: E. R. Kandel y J. H. Schwartz. (1981).

vestibulocerebelo también se comunica con el núcleo fastigial el que a su vez, se conecta con el núcleo vestibular lateral (núcleo de Deiter) contralateral. El núcleo fastigial se comunica además, con la formación reticular y con el tálamo. El tálamo, por su parte, se proyecta a la región de la corteza motora que controla los músculos proximales. También los núcleos vestibulares se relacionan con estos músculos que intervienen en el control de la postura y el balance.

El núcleo interpositus se proyecta a la región mesencefálica del núcleo rojo contralateral, en el cerebro medio. Es en este sitio en donde se origina la vía motora rubroespinal que controla la contracción de los músculos de las extremidades. Las regiones intermedias del cerebelo, son las que se comunican al núcleo interpositus, y reciben fibras colaterales de la vía corticoespinal.

El núcleo dentado se proyecta al tálamo el cual, como ya se mencionó, se conecta a la corteza motora. El núcleo dentado también envía fibras a la región parvocelular del núcleo rojo contralateral que por su parte se proyecta al núcleo de la oliva inferior, formando así un circuito de retroalimentación. El papel de este circuito en las funciones motoras no se conoce. Se ha visto que lesiones en la conexión del núcleo rojo con el núcleo de la oliva inferior causan alteraciones motoras.

Al conocer pues, estas conexiones, se ha podido entender de manera general, el papel del cerebelo en el sistema motor de los vertebrados. Asimismo, ha sido posible explicar los trastornos provocados por lesiones en el cerebelo, lo que también ha contribuido a comprender el funcionamiento de este órgano (Kandel y Schwartz 1981).

Una cuestión de importancia para comprender el funcionamiento del cerebelo, es que las células de Purkinje tienen una actividad basal de disparo cuya frecuencia varía entre 50 y 100 impulsos por

cediendo (Eccles et al. 1967). Esto implica que la actividad de la vía de salida puede variar, en un intervalo amplio, su estado de excitación. Este estado de excitación, a su vez, está en función de la actividad sináptica que sobre la célula de Purkinje, ejercen los elementos excitadores e inhibidores de la corteza del cerebelo. La actividad basal de disparo en las células de Purkinje, es pues, un factor que da plasticidad a los eventos de regulación y control de estas células. De esta forma, la salida del cerebelo puede definir estados funcionales específicos ante un gran número de combinaciones en la información que entra a esta estructura.

Por ser entonces, un componente integrador en la función del cerebelo, la célula de Purkinje posee un elaborado sistema de procesamiento de las señales que sobre ella inciden y que consiste en la presencia de varios tipos de corrientes iónicas situadas en regiones específicas de la célula. Los tipos de corrientes presentes en el soma de las células de Purkinje son: conductancia al ion sodio de las espigas de corta duración (fast spikes); corriente espontánea de sodio que no tiene inactivación; corriente de potasio decreciente del ion calcio; corriente de potasio dependiente de voltaje (de la cual existen seis tipos); corriente de calcio de umbral bajo y corriente de calcio de umbral alto (dendrítica) (Llinás y Susimori 1980a y Llinás y Susimori 1980b).

EL CEREBELO EN RELACION CON LA EVOLUCION DE LOS VERTEBRADOS

Ya que es un sistema de regulación motora, el desarrollo del cerebelo está en relación con las habilidades motoras de los organismos. De modo general, se observa que en la sucesión evolutiva de las distintas clases de vertebrados, el desarrollo del cerebelo va siendo mayor. No hay que olvidar que cada línea filética evoluciona independientemente y por lo mismo, lo anterior debe tomarse con reservas. Así, por ejemplo, existen peces, como es el caso de los salchicos y muchas teleosteos, los mercuridos, entre otros, cuyo cerebelo es más grande y complejo que el de los anfibios y reptiles (Pearson y Pearson 1974).

El araucocerebelo es la parte que puede considerarse más primitiva ya que se presenta en todas las clases de vertebrados. En los anuros esta región constituye prácticamente la totalidad del cerebelo. Por su asociación con el complejo vestibular, el araucocerebelo originalmente parece ser que surge como un sistema que detecta la posición del organismo con respecto al medio acuático. Subsecuentemente, esta función en los vertebrados terrestres se amplía al control de la postura y el balance durante la locomoción (Eccles 1979). Se observa en el caso del hombre, que lesiones en esta parte del cerebelo ocasionan disturbios en el balance tanto en movimiento como en el mantenimiento de la postura (Kandel y Schwartz 1981).

El paleocerebelo que, hasta donde se puede intuir por los estudios de anatomía comparada, surge con la aparición de los peces mandibulados, animales que se presentan miembros pareados. Se relaciona, como se se dijo, con los músculos proximales, entre ellos, los de las cinturas pectoral y ventral. Parece, por lo tanto, que el paleocerebelo está originalmente involucrado con la coordinación de los movimientos de locomoción de estos peces, cuya natación es más eficiente y de mayores potencialidades que la de los anuros. Posteriormente, el control de los músculos proximales

Interviene en el control del balance y la postura en los vertebrados terrestres. A pesar de la presencia de patas en los anfibios y reptiles, la locomoción de estos animales se da en gran medida por movimientos del tronco similares a los de los peces, por lo cual se explica el que estos organismos tengan un escaso desarrollo lateral del cerebelo, que es el relacionado con el control de los arcos reflejos (Pearson y Pearson 1974).

En el caso de las aves y los mamíferos que son animales que presentan patas motoras muy elaboradas, en donde las extremidades realizan múltiples funciones y son las responsables de la locomoción, la cual es además, muy especializada, se observa un notable desarrollo del cerebelo, particularmente en los hemisferios. Este último sobre todo en los mamíferos y especialmente en el hombre. De acuerdo a las alteraciones causadas en los hemisferios del cerebelo por lesiones, se ha visto que esta parte del cerebelo lleva a cabo el control de las extremidades y la coordinación de patrones motores complejos (Kandel y Schwartz 1981).

Como se ha dicho, los hemisferios del cerebelo se relacionan con la corteza cerebral denominada de asociación, la cual también se comunica con los ganglios basales. Es sabido que estos ganglios están involucrados en la planeación e inicio de los movimientos. Ya que el cerebelo es un órgano que regula señales nerviosas, se ha pensado que el neocerebelo corrige o modula las secuencias de comandos, los cuales, una vez rectificados, pasan a la corteza motora a través de las conexiones del núcleo dentado. El movimiento generado a su vez es controlado continuamente a nivel de comandos, por las proyecciones aferentes al cerebelo que provienen del cerebro medio y de la corteza motora, y a nivel de los resultados motores cuya información es llevada por los vías espinocerebelosas y vestibulocerebelosas (Kandel y Schwartz 1981).

Específicamente en el hombre, el cerebelo resulta ser un órgano de singular relevancia ya que es responsable de regular movimientos

finos; coordinar tareas muy complejas e inesperadas; controlar el bilingüismo y la articulación de palabras; todo lo cual es determinante en el modo de vida del ser humano. Las lesiones en el cerebelo humano producidas ya sea por traumas o bien por enfermedades, por ejemplo, el meduloblastoma o la necrosis por efecto del alcohol, no provocan la imposibilidad del movimiento pero sí producen graves alteraciones en el equilibrio, en las acciones reflejas, en la secuenciación correcta de determinadas rutas motoras; en la articulación de palabras e incluso se altera el aprendizaje de nuevas tareas motoras (Kendel y Schwartz 1981 y Llinás y Simpson 1981).

Evolutivamente, se observa que conforme el hombre va siendo más hábil; inferido esto por los instrumentos y objetos encontrados junto con los fósiles; aumenta la especialización de las extremidades posteriores en la locomoción y el cuerpo se adapta al bilingüismo. Esto se deduce por la posición del foramen magnum y el análisis mecánico del esqueleto en general; particularmente, de la cintura pélvica y la planta del pie. También inferido por estudios anatómicos de fósiles; con el cambio en el modo de vida del hombre durante su evolución; aparece el lenguaje articulado. Como se sabe; en el registro fósil, esto se relaciona con el aumento del volumen del cráneo que corresponde al desarrollo del encéfalo; concretamente; el telencéfalo (Bobczanski et al. 1980). Pero mientras que en el último millón de años de evolución humana; la bóveda craneana ha crecido aproximadamente dos veces; se calcula que el tamaño del cerebelo ha aumentado de tres a cuatro veces. Por las proporciones anatómicas que se observan en los vertebrados actuales; es de pensar que este crecimiento se ha dado sobre todo; en los hemisferios cerebelosos que son los que se relacionan con la corteza cerebral.

Así pues; vemos; en relación a lo que se mencionó anteriormente; que el estudio del cerebelo resulta comprensible solamente cuando se estudia en relación a la función del sistema

nervioso en general y este último en dependencia de la relación de los organismos con su medio en el proceso de la evolución. Esto no es sino un ejemplo de que al estudiar un fenómeno, el que sea, debe considerarse en conexión con los procesos con que está relacionado, pues es en ese vínculo en el que existe y por lo mismo, sea que le es externo forma parte de él.

NEUROQUIMICA DEL CEREBELO

A pesar de que el cerebelo se ha estudiado extensamente, poca énfasis se ha puesto a nivel bioquímico. Esto es, quizá, una de las razones por las cuales no ha sido posible explicar de qué manera se procesa la información en la corteza cerebelosa, pues no se conoce mucho sobre sus procesos de neurotransmisión. Estos fenómenos no pueden ser colocados ya que justamente en la transmisión sináptica se dan fenómenos en los cuales cambia el estado funcional de las células nerviosas, fenómenos como son el cambio e la permeabilidad de iones, el incremento en los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos y la interacción entre neurotransmisores.

En el cerebelo existen un número pequeño de tipos sinápticos: terminales de fibras muscotas, trepadoras, paralelas, de células de Golgi, estrelladas, en cesta y de Purkinje. Por ello, el cerebelo resulta además, un buen sistema experimental para estudiar eventos bioquímicos y fisiológicos en sinapsis específicas en el sistema nervioso central. Esto es posible ya que en el cerebelo de la rata las sinapsis se establecen a tiempos bien definidos después del nacimiento (Altman 1972) se conocen sustancias que carecen de tipos celulares específicas (Soren et al. 1982 y Young et al. 1974). También se han desarrollado técnicas de irradiación para evitar el desarrollo de las células granulares específicamente o bien, para alterar el desarrollo de otros tipos celulares (Soren et al. 1982 y

Sandoval y Cotman 1979).

Es necesario conocer primero qué sustancias funcionan como neurotransmisores en el cerebro. La identificación de una sustancia como neurotransmisor se hace con base en la observación de su comportamiento en relación a los características que hasta donde llaga nuestro conocimiento, distinguen a un neurotransmisor. De este modo, se establecen una serie de criterios que al ser evaluados, definen el papel de una sustancia determinada en relación a su función en la transmisión sináptica de una región del sistema nervioso (Sandoval y Lara 1983). Así pues, si una sustancia es neurotransmisor debe existir en la terminal sináptica; debe ser sintetizada por el tejido en donde supuestamente es transmisor. Su liberación debe ser dependiente de la entrada de ion calcio a la terminal sináptica por efecto de la despolarización de la membrana plasmática. Debe existir un receptor específico en la membrana postsináptica para el posible neurotransmisor; y el efecto de este último al ser aplicado a la membrana postsináptica tiene que ser igual al de la estimulación de la neurona presináptica. Resuere haber un sistema de remoción del transmisor del espacio intersináptico que puede consistir en una enzima que degrada el transmisor o en un sistema de captura del mismo de alta afinidad; dependiente de sodio. Este transportador puede también, captar los productos de degradación del transmisor; los cuales por su parte, pueden ser precursores en la síntesis de nuevo transmisor.

En este contexto, se ha demostrado que el ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el transmisor en las células estrelladas, en estas, de Purkinje y de Golgi (Kurivama et al. 1966; Foster y Roberts 1980; Flint et al. 1981 y Levi et al. 1982). Ello con base principalmente, a su efecto inhibitorio y a que se libera en forma dependiente de calcio.

También se ha propuesto, que por lo menos una parte de las células Golgi son colinérgicas así como las fibras musculosas (Altan

(Bos 1970; Brown y Palay 1972) a partir del uso de técnicas histoquímicas para la identificación de la acetilcolinesterasa. Sin embargo, se ha visto que el estudio de este enzima no es un criterio confiable en el estudio de sinapsis colinérgicas pues se sabe que existe una actividad elevada de colinesterasa inespecífica es decir, que no participa en la hidrólisis fisiológica de la acetilcolina (Goldberg y McCaman 1967). Se sabe que la colinesterasa inespecífica existe sobre todo en el caso del cerebelo de mamíferos (Wachtler 1960). No obstante también se tienen evidencias de la presencia de la colina-acetiltransferasa en las fibras musculosas (Woodward et al. 1982) o de un efecto de activación de la célula de Purkinje al aplicar iontofóricamente acetilcolina en la capa granular del cerebelo del gato (McCance y Phillip 1968).

Existe mucha evidencia sobre la participación del glutamato como el transmisor de las fibras paralelas. Se ha observado que el glutamato aplicado iontofóricamente excita la membrana de la célula de Purkinje (Chubb et al. 1975), que se libera en forma dependiente de calcio, se ve que se trate de glutamato endógeno o radiactivo recientemente incorporado (Sandoval y Colman 1978; Foster y Roberts 1980; Flint et al. 1981 y Levi et al. 1982). Se ha demostrado que en el desarrollo ontogénico, esta liberación ocurre con el mismo patrón temporal que las fibras paralelas (Sandoval et al. 1984) al igual que las vacuolas de alta afinidad (De Barro et al. 1980). Por otro lado, se conoce la existencia de un sistema de captación de alta afinidad de glutamato (De Barro et al. 1982 y Sandoval et al. 1984) que parece estar relacionado con las células gliales adyacentes a la terminal en las que el glutamato se transfiere a glutamina. A su vez, la glutamina es tomada por la célula neuronal como precursor del glutamato neurotransmisor o del GABA en el caso de las interneuronas inhibitorias. Se sabe también, que los niveles de glutamato en el cerebelo disminuyen en mutantes carentes de células granulares (Young et al. 1974). Se conoce que el glutamato (Levi y Sells 1981), al igual que la estimulación eléctrica de las fibras paralelas (Mao et al. 1975), aumentan los

niveles de GMP cíclico (GMPc).

Se ha descubierto también la existencia de sistemas de aminas biogénicas provenientes del locus coeruleus (Bloom et al. 1971), muy probablemente noradrenérgicos (Yamamoto et al. 1977) y también serotoninérgicos (Deas et al. 1984), los cuales, llegan a las células de Purkinje o los que inhiben. Parece que la actividad de estas aminas catecolaminérgicas incrementa los niveles de AMP cíclico (AMPc) (Kakiuchi y Rall 1968). Es factible, por lo tanto, que en la célula de Purkinje, por lo menos, las elementos excitadores e inhibidores de la corteza, tengan distintos efectos metabólicos, quizá asociados, a través de nucleótidos cíclicos.

También se ha postulado la posible existencia de transmisión por medio de adenosina o alguna de sus derivadas (Kosterovics et al. 1975) que disminuya la actividad de la célula de Purkinje. Quizá también la taurina esté involucrada en los procesos de neurotransmisión en el cerebelo (Flint et al. 1981 y Bernardi et al. 1984).

Se ha pensado que probablemente, el aspartato es el neurotransmisor de las fibras trepadoras (Wiklund et al. 1982), sin embargo, no existe liberación dependiente de calcio para esta sustancia en la cara molecular (Sandoval et al. 1984), aunque se observa en el cerebelo completo (Flint et al. 1981 y Wiklund et al. 1982). Además el aspartato, al igual que el glutamato, aumenta los niveles de GMPc en el cerebelo (Garthwaite 1982).

Todos estos datos sobre la identificación de neurotransmisores en la corteza del cerebelo no son relevantes si no se aplica este conocimiento a la investigación sobre el papel de cada una de estas sustancias en la fisiología de la corteza cerebelosa. Por ello, es necesario ahondar en fenómenos como son la interacción entre los efectos de los diversos neurotransmisores en las distintas células y cómo repercute ésta, en los eventos a nivel fisiológico. Los

eventos como pueden ser: la potenciación del efecto de un neurotransmisor; el cambio de umbral de disparo de una célula; la resistencia de la membrana celular; etc. Todo esto con el propósito de un conocimiento íntegro y no fragmentario sobre el funcionamiento de la corteza del cerebelo.

SECCION EXPERIMENTAL

ANTECEDENTES

La acetilcolina es un neurotransmisor más común en el sistema nervioso central y periférico de los vertebrados y en el sistema nervioso de los invertebrados (Kuffler y Nicholls 1976). Su estructura consiste en un éster entre colina y acetato (Figura 5b). La acetilcolina es sintetizada en los terminales nerviosos a partir de colina y acetilcoenzima-A por la enzima colina-acetiltransferasa también llamada colina-acetilasa (CAT). Se cree que la acetilcolina, al igual que otros transmisores, se almacena en las vesículas sinápticas de donde se libera al espacio intersináptico por exocitosis (Figura 5a).

Originalmente, gracias al trabajo de Otto Loewi, la acetilcolina se determinó como una sustancia que por estimulación de la aferente del simpático al corazón, disminuía la frecuencia de contracción cardíaca (Loewi 1921). De esta manera, además, por primera vez se demostró que la transmisión sináptica estaba mediada por una sustancia química. Posteriormente se demostró en la unión neuromuscular que la acetilcolina se libera de la fibra nerviosa y provoca una contracción en el músculo al unirse la acetilcolina a una molécula receptor situada en la membrana postsináptica (Dale et al. 1936). Para entonces, ya se había demostrado la existencia de sustancias como la nicotina, que actuaban como agonistas de la acetilcolina; es decir, que tenían los mismos efectos que la acetilcolina. También se descubrieron sustancias que inhibían el efecto de la acetilcolina. A este último tipo de fármacos se les denominó antagonistas. En el caso de la aferencia del nervio vago al corazón, el efecto de la acetilcolina era reproducido por la muscarina y antagonizado por la atropina. En la unión neuromuscular, la nicotina funcionaba como agonista y la curarina como antagonista (Kuffler y Nicholls 1976). Se vio además, que la nicotina y la curarina no tenían efecto en el músculo cardíaco y que la muscarina y la atropina no actuaban en la unión neuromuscular. Con base en las respuestas ante agonistas y antagonistas, se

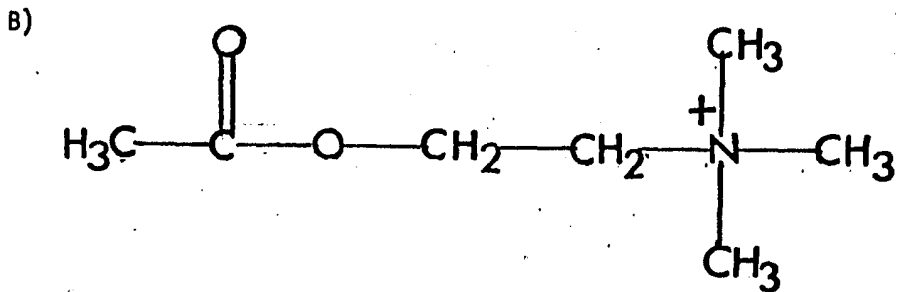
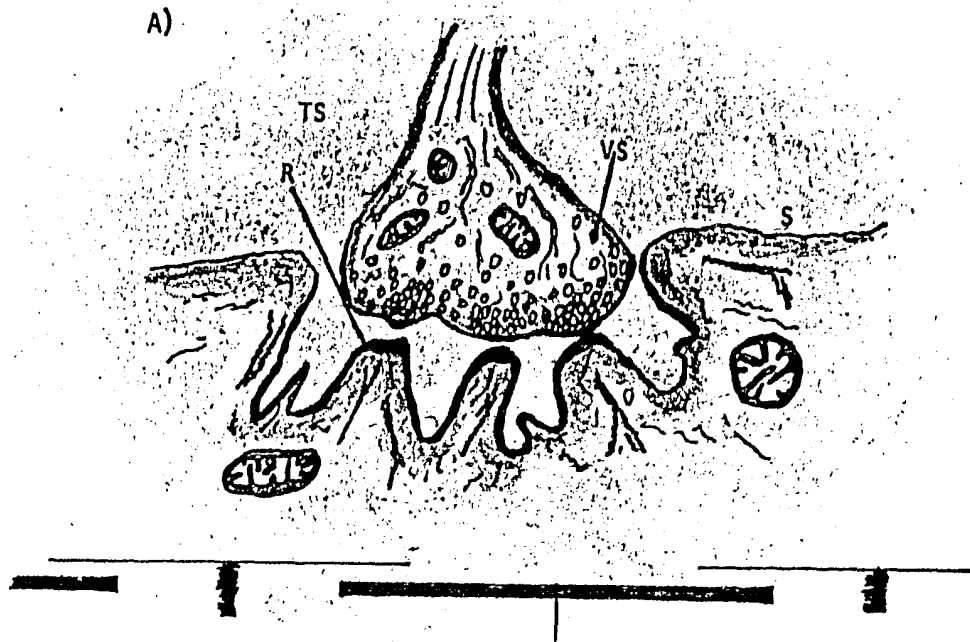


Figura 5. A). Diagrama que muestra la unión neuromuscular que es de carácter colinérgico. Se postula que el impulso nervioso provoca la entrada de calcio que, por su parte, promueve la liberación de acetilcolina de las vesículas sinápticas. Al actuar en los receptores postsinápticos, la acetilcolina provoca una despolarización del sarcolema que a su vez causa la contracción de los sarcómeros. Abreviaturas. TS, Terminal sináptica, VS, vesículas sinápticas, S, Sarcolema, R, receptores colinérgicos. B). Estructura de la molécula de acetilcolina. Esquemas redibujados de: E. R. Kandel and J. H. Schwartz. (1981).

determinó que existen dos tipos de receptores; uno se presenta en la unión neuromuscular o el otro en el músculo cardíaco. A estos receptores se les denominan respectivamente, nicotínico y muscarínico y han sido estudiados hasta nivel de estructura molecular (Hucho 1981, Anholt 1981 y Anderson 1983).

Los efectos postsinápticos de estos receptores son heteroséneos. El receptor nicotínico es excitador mientras que el muscarínico puede ser inhibidor o excitador dependiendo de la zona del sistema nervioso de que se trate (Mathanson 1982). Pero además, en caso de ser excitador, el efecto del receptor muscarínico no es igual al del receptor nicotínico. Mientras que el receptor nicotínico provoca un aumento rápido en la permeabilidad a iones, el receptor muscarínico tiene su efecto a más largo plazo, por lo que se ha pensado que su acción puede estar mediada por un segundo mensajero. Asimismo, se ha observado que el receptor nicotínico puede aumentar la síntesis de GMPc (Mathanson 1982 y Patrick y Heinemann 1982).

La acetilcolina una vez liberada al espacio intersináptico, es hidrolizada en colina y acetato por la acetilcolinesterasa, una enzima que se encuentra en la membrana citoplásmica. El acetato y la colina son tomados por la terminal en donde la colina sirve como precursor en la síntesis de acetilcolina. El sistema de transporte de colina, al igual de lo que ocurre con otros transmisores o sus precursores, es dependiente de energía y de la presencia del ion sodio (Murrin 1980).

Como se mencionó anteriormente, la acetilcolina es un compuesto al que se ha propuesto como neurotransmisor en el cerebelo. Sin embargo, poco es lo que se sabe acerca de su localización y papel en la corteza cerebelosa.

Desde 1936, Miller mostró que el epícler eserina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, en el lóbulo anterior de la corteza del

cerebelo del gato, se producía una extensión de las extremidades anteriores, por lo que se pensó que la acetilcolina facilita la transmisión sináptica en la corteza. Posteriormente (Phillis 1965 y McCance y Phillis 1968), se encontró que la acetilcolina excita a las células de Purkinje, efecto que se atribuyó a las fibras paralelas (Crawford et al. 1963). Al mismo tiempo, se determinó la existencia, en el cerebelo, de las enzimas colina-acetiltransferasa y acetilcolinesterasa (Arrison et al. 1964 y Phillis 1965), tanto en la cara molecular como la granular (Goldberg y McCamen 1967 y Sellinger et al. 1972), en distintas regiones del cerebelo (Kása y Silver 1969).

La localización del posible sistema colinérgico en el cerebelo, se empezó a determinar a través de la distribución de la colinesterasa. Como se dijo anteriormente, algunos estudios (Altman y Das 1970; Brown y Palay 1972 y Woodward et al. 1982) indicaban que posiblemente las células Golgi y las fibras muscúlosas son colinérgicas. Un aspecto importante de estos reportes, así como de otros más actuales (Kása et al. 1982), es que la actividad de la colina-acetiltransferasa y acetilcolinesterasa es mayor en la región posterior del vermis del cerebelo, concretamente en los lóbulos IX y X. A este respecto, también se ha observado en el pez eléctrico Asteronotus, que la actividad de la colinesterasa y de la colina-acetiltransferasa es mayor en la región electrosensorial del cerebelo que se encuentra en la región caudal. Además, en el caso de este pez, estas enzimas se encuentran sobre todo en la cara molecular (Maler et al. 1981). Otro hecho interesante es que la actividad de la colina-acetiltransferasa se decrementa solamente al lesionar el pedúnculo cerebeloso inferior que, como se ha dicho, es el que se relaciona con el vermis. Sin embargo, la disminución en la actividad de esta enzima se presenta en todas las regiones del cerebelo lo que indica que el pedúnculo cerebeloso inferior se comunica con todas las partes del cerebelo, lo que es de esperarse, ocurre con otros pedúnculos (Ásín et al. 1984). Ello indica también, que las posibles terminales colinérgicas en el cerebelo, se

relacionan con el pedúnculo cerebeloso inferior. Asimismo, se vio que la actividad de la colina-acetiltransferasa es mayor en el vestibulocerebelo y menor en el neocerebelo. Se encuentra además, en este estudio, que la actividad de la enzima no se decremente del todo por efecto de la lesión, sino aproximadamente sólo la mitad y en todas las zonas del cerebelo; lo que indica, por este criterio, que posiblemente existe un elemento interneuronal colinérgico.

La idea de que existe este componente colinérgico se ve apoyada por otra serie de evidencias entre las que se pueden citar; el hecho de que la célula de Purkinje se excita por acetilcolina y por inhibidores de su degradación como la neostigmina (Phillis 1965 y McCance y Phillis 1969). Esta excitación posiblemente tenga que ver con receptores nicotínicos, muscarínicos o ambos (McCance y Phillis 1968). Recientemente, se ha visto que quizá el receptor muscarínico está involucrado en la generación de las espigas de corta duración (fast spikes) de la célula de Purkinje; ya que éstas son bloqueadas por la adición de atropina (Crepel y Dhanjal 1982).

Por otro lado, se conoce la existencia de receptores muscarínicos cuya densidad es mayor en la capa molecular del vestibulocerebelo (Rotter et al. 1979). En el desarrollo, estos receptores aparecen primero en la capa granular y subsecuentemente en la capa molecular donde su densidad es mayor en el animal adulto. Los estudios hechos en ratas con lesiones en las células granulares o en el desarrollo de las mismas (Sorens et al. 1982) muestran que las células granulares no contribuyen a la presencia de los receptores muscarínicos, y que su correcta ontogénesis depende del establecimiento de las conexiones sinépticas correctas. Además, los receptores aparecen con un patrón temporal similar al de establecimiento y maduración de las sinapsis de las fibras paralelas.

Estos datos apuntan, primero, a que el receptor colinérgico pertenece a un componente de la corteza que migra de la capa

granular o la molecular y segundo, que este posiblemente se relacione con las fibras paralelas. Parece probable entonces, que el supuesto sistema colinérgico tiene que ver con las sinapsis entre las fibras paralelas y la célula de Purkinje.

En el cerebelo se ha descrito un sistema de captación de alta afinidad de colina, dependiente de sodio (Kása et al. 1982) que es más abundante en el varnis posterior. Sin embargo su localización no ha sido tan estudiada como es el caso del receptor muscarínico. Se sabe que la captura de alta afinidad de colina, está íntimamente relacionada con la síntesis de acetilcolina, por lo menos de manera cinética, en caso de no haber un acoplamiento físico entre el transportador de colina y la CAT (Kerschbante y Kessler 1982), especialmente en condiciones de actividad neuronal elevada (Murrin 1980; Meyer et al. 1982 y Trommer et al. 1982). Este sistema de transporte de colina es inhibido por el hemicolinio (HC-3) (Gusenot et al. 1973), el cual inhibe también, y por completo, la síntesis de acetilcolina a partir de la colina que se capta en presencia de este droga (Meyer et al. 1982). Últimamente, se ha visto que en el cerebelo, en las capas granular y molecular, existen sitios de unión para el HC-3 (Rainbow et al. 1984) lo cual sugiere que los sitios de captura de colina presentes en el cerebelo, probablemente están relacionados con la síntesis de acetilcolina y que por lo tanto, la presencia de captura de alta afinidad de colina, dependiente de sodio o sensible a HC-3, o a ambos, es un criterio que apoya la existencia de sistemas colinérgicos en el cerebelo.

A pesar de que existen razones para creer que en el cerebelo existe un elemento interneuronal colinérgico, este no ha sido localizado. Tampoco ha sido caracterizado su papel en la fisiología de la corteza cerebelosa. Además se necesitan evaluar otros criterios como es el de liberación del transmisor. Hace falta también, estudiar la captura de alta afinidad de colina y la enzima colina-acetiltransferasa, específicamente en la capa molecular ya que probablemente, por lo que se ha dicho, el sistema colinérgico

está localizado en la cara molecular.

El objetivo de este trabajo fue determinar si en la cara molecular del cerebelo de la rate existe un sistema de transmisión colinérgica. Se caracterizó, al menos en parte, el sistema colinérgico desde el punto de vista bioquímico en relación a su localización y su función en la corteza del cerebelo. En la cara molecular del cerebelo se evaluaron los criterios de síntesis de acetilcolina; captación de alta afinidad de colina y liberación de acetilcolina. Los resultados obtenidos no son aún concluyentes pero sugieren que la acetilcolina posiblemente, está relacionada con la transmisión glutamatergica de las fibras paralelas.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de distintas fracciones de tejido.

Los experimentos se realizaron utilizando ratas albino Wistar, de distintas edades, machos en su gran mayoría. Los animales se sacrificaron por decapitación; el cerebelo o cerebro fueron removidos rápidamente y se pusieron en una solución de sacarosa fría 0.32 M.

Extracción de la fracción sinaptosomal cruda (P2).

Un cerebelo o una mitad longitudinal de un cerebro (tomado desde el cerebro medio) se homogenizaron en frío en 10 ml de sacarosa 0.32 M. Se centrifugó por 10 min a 1,500 g a temperatura de 4 grados C. El sobrenadante se centrifugó, también en frío, a 10,000 g por 15 min y el botón resultante se resuspendió en un determinado medio según el ensayo a realizar. En el caso de la captación de alta afinidad de colina; el tejido se resuspendió en sacarosa 0.32 M, glucosa 0.32 M o medio Ringer - Krebs sin sodio. Para la determinación de la colina-acetiltransferasa (CAT), el tejido se resuspendió en amortiguador de fosfatos de sodio 38 mM a pH de 7.4 el cual, es un medio hipotónico que permite que el contenido celular quede en el medio al romperse las células o fracciones celulares como los sinaptosomas. Después de resuspendarse, el tejido se volvió a homogenizar. Esta fracción es rica en mitocondrias, células gliales y sinaptosomas.

Obtención de la capa molecular del cerebelo.

Una vez que se tuvo el cerebelo en sacarosa 0.32 M, se hicieron cortes sagitales de 0.4 - 0.5 mm de espesor en la región del vermis. Las rebanadas resultantes se regresaron a solución isotónica de sacarosa en frío. En una placa de hule que se mantenía fría sobre hielo, se separó, bajo observación al microscopio estereoscópico, la

capa molecular de la corteza con una navaja cuya punta es aproximadamente de 1 o 2 mm. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se pasaron los pedazos de capa molecular a sacarosa fría 0.32 M. El tejido podía entonces homogenizarse o cambiarse a otro medio antes de ser homogenizado. El cambio de medio se realizó de la manera siguiente. Se dejó que los fragmentos de la capa molecular se precipitaran en el fondo del recipiente y se quitó la mayor cantidad posible de sacarosa 0.32 M con una pipeta Pasteur. Se diluyeron los fragmentos con un nuevo medio y se dejó sedimentar otra vez. Se retiró el medio y se volvió a diluir de tal forma que el nuevo medio tenía una contaminación por solución de sacarosa inferior al 1%. Es importante mantener siempre el tejido en frío. La operación desde el sacrificio de la rata hasta la obtención de tejido suficiente para realizar los ensayos, no excedió de una hora.

Tratamiento con 3-acetilpiridina (3-AP).

Con el propósito de eliminar las fibras treadoras de la corteza del cerebelo, se lesionó el núcleo de la oliva inferior por medio del tratamiento con 3-AP de acuerdo al procedimiento referido por Flint et al. en 1981 y Llinás et al. en 1975. El efecto de la 3-AP en el núcleo de la oliva inferior es específico y no afecta a otras partes del cerebelo (Llinás et al. 1975). Se tuvo un lote de ratas control y las que se les inyectó solución salina 0.85 % y un lote de ratas tratadas con 3-AP 0.065 mg/Kg de peso corporal. Seis días después de la inyección, las ratas se sacrificaron para medir actividad de CAT en la capa molecular.

Captación de alta afinidad de colina.

Para determinar la dependencia iónica de la captura de alta afinidad de colina en la capa molecular del cerebelo, se tuvieron los medios cuya composición se ve en la tabla I.

TABLA I

Composición de medios de incubación para ensayos de captura de alta afinidad

Tipo de medio	Concentración (mM)			
	NaCl	LiCl	Na ₂ SO ₄	Sacarosa
Componente				
NaCl	115.0	-	-	-
LiCl	-	115.0	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	57.5	-
Sacarosa	-	-	57.5	230.0
KH ₂ PO ₄	3.0	3.0	3.0	3.0
MgSO ₄	1.2	1.2	1.2	1.2
Glucosa	10.0	10.0	10.0	10.0
Hepes - tris	20.0	20.0	20.0	20.0
CaCl ₂	1.0	1.0	1.0	1.0

Con estos medios se determinó la dependencia de los iones cloro y sodio que son, especialmente este último, los iones de los que depende el transporte de alta afinidad (Marrin 1980). A 0.9 ml de medio se les agregó 0.1 ml de homogenado y se preincubó en baño María 3 min a 37 grados C antes de añadir colina tritiada a una concentración final de 0.4 a 1.0 μ M. La cantidad de radioactividad usada por cada fracción fue de 1.0 μ Ci. Después se incubó 30 min a 37 grados C y se filtraron por separado 2 alícuotas de 0.45 ml; en filtros con poro de 0.65 μ m; lavando con 3 ml de medio de incubación. Paralelamente, se procesó del mismo modo una fracción a una temperatura de 4 grados C, incubada en hielo, con el fin de determinar si la incorporación de la colina radiactiva es un proceso activo, un transporte o unión inespecífica en la membrana

celular. Se añadió a los filtros 1 ml de SDS (dodecil sulfato de sodio) que es un detergente que, al disolver las membranas, permite que la radioactividad incorporada quede en solución. Los filtros se incubaron 20 min de 70 a 80 grados C o bien se dejaron reposar de 20 a 30 horas para que el detergente disolviera las membranas. Posteriormente, se agregaron 10 ml de tritosol, un líquido de centelleo cuya composición se ve en la tabla II.

TABLA II
Composición del tritosol

Componente	Cantidad
Xilol	600 ml
Tritón	257 "
Etanol	106 "
Etilenglicol	37 "
PPD (difeniloxazol)	3 g

La radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido. Una parte del tejido usado, se utilizó para determinar la cantidad de proteínas conforme a la técnica de Lowry et al. (1951).

Determinación de la actividad de la colina-acetiltransferasa (CAT).

La actividad de esta enzima se determinó de acuerdo a la técnica de Fennum (1975). Los homogenados de las distintas fracciones se tuvieron en solución de amortiguador de fosfatos de

sodio 38 mM a pH de 7.4. El procesamiento por fracción consistió en agregar, por duplicado, a un tubo de ensayo de aproximadamente 0.5 ml, 50 μ l de homogenado más 236 μ l de un medio cuya composición final durante la incubación, se muestra en la tabla III.

TABLA III

Composición del medio de incubación para el ensayo de la colina-acetiltransferasa

Componente	Concentración
Amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.4	314.00 mM
Sulfato de eserina	0.08 "
EDTA (ácido etilendiamino-tetracético) pH 7.4	17.90 "
Cloruro de colina	17.30 "
3H-(acetil) acetil coenzima A	2.00 " (0.1 μ Ci)
Tritón X-100	0.035 %

Los tubos se incubaron a 37 grados C durante 15 min y luego se detuvo la reacción por dilución; al añadir 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos 38 mM a pH de 7.4. Otro par de tubos con el mismo contenido sirvieron como tubos blanco al detener la reacción inmediatamente después de agregar la acetil coenzima-A tritiada. En este punto, se tenían acetilcolina y acetil coenzima-A tritiadas. La degradación de la acetilcolina sintetizada se previno con la presencia de sulfato de eserina; que es un inhibidor de la colinesterasa. Se procedió entonces, a separar la acetilcolina

triturada por medio de solventes orgánicos. A los 10 ml del medio que contienen acetilcolina o acetil coenzima-A trituradas, se le agregaron 2 ml de tetrafenilboro en acetonitrilo (0.5 g/dl) y 9 ml de liquifluer (4 g PPO (difeniloxazol) 0.05 g POPDF (1,4-bis[4-metil-5-fenil-2-oxazolil]benzeno)/1 litro de tolueno), formando un sistema de 2 fases. El tetrafenilboro extrae la acetilcolina a la fase de tolueno que contiene los contenedores PPO o POPDF. En esta fase se midió la radioactividad. Una vez esresada la fase orgánica, se dejó reposar de 15 a 30 horas para dar tiempo a la extracción de la acetilcolina antes de analizar la muestra en el contador de centelleo líquido. Una parte del tejido se guardó para determinar la cantidad de proteínas.

Perfusión discontinua.

Se realizó una evaluación del efecto de la acetilcolina sobre la liberación de glutamato de acuerdo al procedimiento usado por Sandoval et al. (1984). Se obtuvo la capa molecular homogenizada en aproximadamente 0.7 ml de sacarosa 0.32 M. Después se añadieron 0.5 ml de este homogenado a 5.5 ml de medio Ringer - Krebs con CaCl_2 2.0 mM; eserina 1.0 mM y amortiguado con bicarbonato de sodio 25 mM sin EGTA. Se preincubó 3 min a 37 grados C y se esresó glutamato radioactivo marcado con ^{14}C uniformemente distribuido en la molécula. La concentración final del glutamato fue de 0.25 μM . La cantidad que se usó fue de 0.4 μCi . Se hizo una incubación a 37 grados C durante 5 min para incorporar el glutamato marcado y se repartieron 6 alícuotas de 1 ml en 6 filtros de poro 0.65 μm . Se hicieron 6 lavados de 30 seg cada uno con 2 ml de medio Ringer - Krebs; eserina 0.1 mM; EGTA (ácido etilendiol-bis-4 aminoacetil eter) N,N'-tetraacético; 0.1 mM al cual se usa para acular el calcio que puede haber en el medio (medio LK). El medio se retiró aplicando vacío al filtro. De este modo, se estableció la línea basal de liberación de glutamato. Subsecuentemente se dieron 2 pulsos de 30 seg cada uno con 2 ml de uno de los siguientes medios (ver tabla IV): Ringer - Krebs sin calcio (LK); Ringer - Krebs con

potasio alto con y sin calcio (HKCa y HK respectivamente), Ringer - Krebs con calcio y acetilcolina 10 μ M (LKCa-ach), Ringer - Krebs con potasio alto y 10 μ M de acetilcolina con y sin calcio (HKCa -ach y HK-ach respectivamente).

TABLA IV
Composición de medios de perfusión

Tipo de medio	Concentración (mM)			
	LK	LKCa	HK	HKCa
Componente				
NaCl	115.0	115.0	65.0	65.0
KCl	3.0	3.0	53.0	53.0
NaH ₂ PO ₄	1.2	1.2	1.2	1.2
MgSO ₄	1.2	1.2	1.2	1.2
Glucosa	10.0	10.0	10.0	10.0
NaHCO ₃	25.0	25.0	25.0	25.0
CaCl ₂	-	2.1	-	2.1
EGTA	0.1	0.1	0.1	0.1
Veratrina	6.0 mg/dl	6.0 mg/dl		

(en el caso de los medios señalados como V y VCa respectivamente).

Se recedió el perfusado y se tomó una alícuota de 1 ml a la que se le agregaron 5 ml de tritoxol para medir radioactividad por centelleo. La cantidad de radioactividad en el filtro, se determinó de igual forma que la señalada para los experimentos de captación.

la liberación se considera del siguiente modo:

$$\% \text{ liberación} = \frac{\text{dpm en el filtrado}}{\text{dpm en el filtrado} + \text{dpm en el tejido}} \times 100$$

Por medio de este procedimiento pudo determinarse, según los pulsos usados, liberación basal, liberación estimulada por despolarización con alto potasio, con y sin calcio, y el efecto de la acetilcolina en cada una de estas condiciones.

Perfusión continua.

Se obtuvo la capa molecular del cerebelo o el hipocampo completo. Este último se cortó en partes de 2 mm y luego se separaron con una pipeta Pasteur. Se realizó el cambio a 1 ml de medio Ringer - Krebs con CaCl_2 1 mM, eserina 1 mM, amortiguado con bicarbonato de sodio 25 mM, sin EGTA. Se preincubó 3 min a 37 grados C y se agregó colina tritiada, 0.4 o 1 μM en la incubación, 2 o 3 μCi , o glutamato marcado uniformemente con ^{14}C en el caso de un experimento con la capa molecular, 2.4 μM en la incubación, 0.7 μCi . Posteriormente se incubó 10 min a 37 grados C y las rebanadas se repartieron, según el experimento, en un número variable (de 2 a 6) de unidades portefiltros de poro 0.65 μm . Cada filtro se lavó con 10 ml de medio Ringer - Krebs sin CaCl_2 , eserina 0.1 mM. Las unidades portefiltros se conectaron a una bomba peristáltica con flujo de 1 o 2 ml/min. En algunos experimentos se pasaron a la velocidad máxima de la bomba, aproximadamente 5 ml de medio Ringer - Krebs. Posteriormente se llevó a cabo el procedimiento usado en todos los casos, que consistió en perfundir durante 10 min con medio Ringer - Krebs sin CaCl_2 y con eserina 0.1 mM, para establecer la línea basal de liberación. Posteriormente, se perfundieron durante 10 min los medios cuyo efecto se deseaba estudiar (tabla IV): LK, LKCa, HK, HKCa, V, VCa, LKCa-glu, HKCa-glu y VCa-glu (medios indicados con -glu llevan glutamato 10 μM). Cada minuto se cambió

al frasco que recibe el líquido de perfusión. La liberación se estimó de igual manera que en el caso de la perfusión discontinua.

Sustancias radioactivas NEW ENGLAND NUCLEAR (NEN).

- ^{14}C (U) L-glutamato (0.1 mCi/ml), 267 mCi/mmol.
- ^3H (metil) cloruro de colina (1.0 mCi/ml), 90 Ci/mmol.
- ^3H (acetil) acetil coenzima-A (0.1 mCi/ml), 936 mCi/mmol.

RESULTADOS

Colina-acetiltransferasa (CAT).

Se determinó, en la capa molecular del cerebelo, la actividad de la CAT. Puede observarse en la Figura 4 que la actividad de esta enzima en la capa molecular (CM) es mucho menor que la que se detecta en la fracción sinaptosomal cruda del cerebro (P2Cr) o similar a la que se obtiene en la fracción sinaptosomal cruda del cerebelo (P2C). En virtud del efecto excitador de la acetilcolina sobre la célula de Purkinje (McCance y Phillip 1968), resulta posible que la actividad de la CAT esté asociada con los aferentes excitadores a esta célula. Dichos aferentes están constituidos por las fibras trezadoras y las fibras paralelas. Con el propósito de identificar si la actividad de la CAT se asocia a fibras trezadoras, se hicieron lesiones en el núcleo de la oliva inferior por medio del tratamiento con 3-acetilpiridina (3-AP). La lesión es específica (Llinás et al. 1975). Al término del tratamiento con 3-AP se observó que los animales perdían tono muscular, coordinación y balance. Estos signos son similares a los reportados en el trabajo de Llinás y colaboradores (1975). Los animales tratados con solución salina aumentaron su peso en un 10 % aproximadamente mientras que los tratados con 3-AP perdieron, en promedio, el 8 % de su peso corporal. En la Figura 6 se puede ver que al degenerar las fibras trezadoras por efecto de la 3-AP, la actividad de la CAT no disminuyó.

Al descartar la posibilidad de la asociación de la CAT con las fibras trezadoras, se determinó, en la capa molecular del cerebelo, cuál es el patrón temporal con el que surge la actividad de síntesis de acetilcolina durante el desarrollo. En el cerebelo, las sinapsis aparecen a distintos tiempos después del nacimiento (Altaen 1972abc). En el caso de las sinapsis de fibras paralelas, se observa que en la rata, dichas sinapsis empiezan a establecerse a partir del día 12 después del nacimiento, que es cuando las células

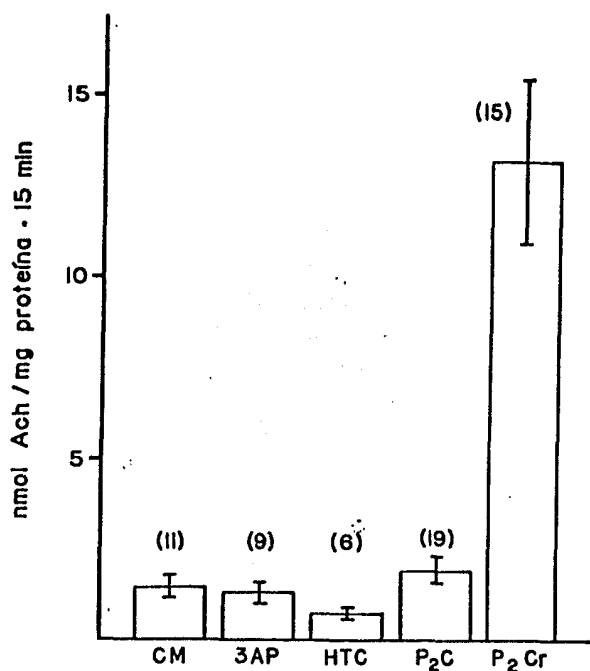


Figura 6. Actividad de la colina-acetiltransferasa (CAT) en distintas fracciones de tejido nervioso. Abreviaturas: CM, capa molecular de cerebelo; 3AP, capa molecular del cerebelo de animales tratados con 3-AP; HTC, homogenado total de cerebelo; P₂C, fracción sinaptosomal cruda de cerebelo completo y P₂Cr, fracción sinaptosomal cruda de cerebro completo; Ach, acetilcolina. Los números entre paréntesis indican el número de determinaciones. Las barras de incertidumbre representan el error estándar de la media.

granulosa empieza a migrar desde la capa granular, situada sobre la capa molecular, hasta la capa granular. Los sinapsis terminan de formarse en el día 21 en donde, subsecuentemente, su densidad baja un poco hasta el estado adulto debido a que algunos sinapsis son transitorias (Altman 1972aba). Ya que resultaba posible que la actividad de la CAT estuviera asociada con las fibras paralelas, se determinó la actividad de esta enzima en la capa molecular del cerebelo de animales de 15, 17, 19 y 21 días de edad y en animales adultos. Se observó que la actividad de la CAT aparece con el mismo patrón temporal con el que surgen las sinapsis de fibras paralelas, esto es, durante la tercera semana de vida postnatal (Figura 7).

Captación de alta afinidad de colina.

Aunque ha sido reportado (Köse et al. 1982) que existe captura de alta afinidad de colina dependiente de ion sodio en el cerebelo, no queda claro si esta captura se da en la capa molecular o en la capa granular. Con el fin de estudiar si en la capa molecular existe este sistema de transporte, se determinó la incorporación de colina en presencia de los iones sodio y cloro en distintas combinaciones. En la Figura 8 puede observarse que en la capa molecular del cerebelo la captura de colina de alta afinidad, a una concentración de $1 \mu\text{M}$, no dependió de la presencia del ion sodio, o del ion cloro. Sin embargo, puede apreciarse que la captura de alta afinidad fue dependiente de la temperatura.

Se sabe que la captura de alta afinidad de colina, está acoplada a la síntesis de acetilcolina, y en algunos sistemas, como en los sinaptosomas de cerebro, es inhibido por el compuesto hemicolinio (HC-3) a concentraciones de $10 \mu\text{M}$ (Meyer et al. 1982). Con este antecedente, se determinó el efecto del HC-3 en la captura de alta afinidad de colina en la capa molecular del cerebelo. En la Figura 9 puede observarse que el HC-3 inhibió significativamente, $P < 0.01$ para la prueba de "t" de variables correlacionadas pues los experimentos se hicieron con el mismo homogenado, la captura de alta

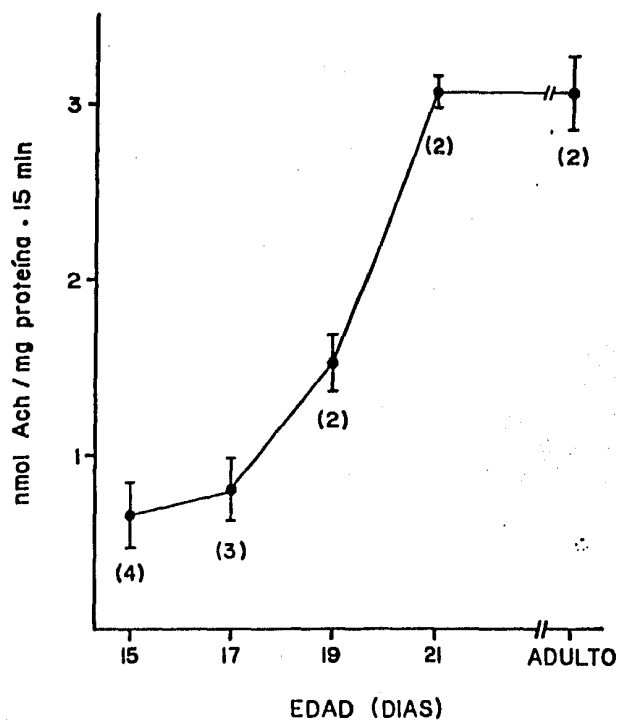


Figura 7. Actividad de la colina-acetiltransferasa (CAT) en la capa molecular del cerebelo de animales de distintas edades. Ach, acetilcolina. Los números entre paréntesis indican el número de determinaciones. Las barras de incertidumbre representan el error estándar de la media.

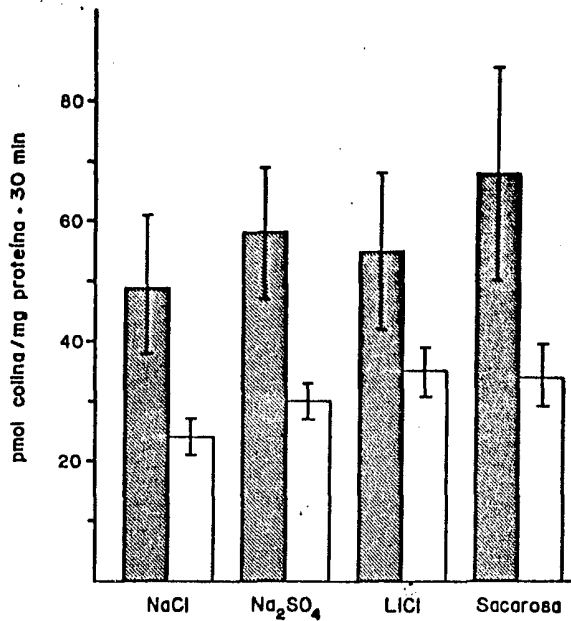


Figura 8. Captura de alta afinidad de colina ($1 \mu\text{M}$) en la capa molecular del cerebelo en distintas combinaciones iónicas. Se muestra la incorporación de colina al tejido a temperatura de 37 grados C (barras sombreadas) y a 4 grados C (barras en blanco). Las indicaciones que se notan al pie de cada par de barras corresponden a los medios señalados en la Tabla I de material y métodos. NaCl, medio con cloro y sodio; Na₂SO₄, medio con sodio sin cloro; LiCl, medio con cloro sin sodio; Sacarosa, medio sin cloro y sin sodio. Las barras de incertidumbre representan el error estándar de 4 determinaciones.

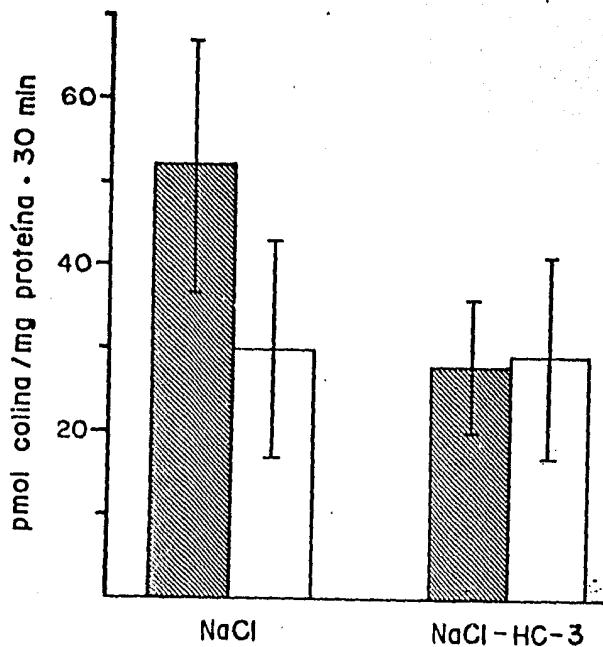


Figura 9. Efecto del hemicolinio (HC-3), (10 μ M) en la captura de alta afinidad de colina (0.4 μ M) en la capa molecular del cerebelo. Las barras sombreadas indican la incorporación de colina a temperatura de 37 grados C. Las barras en blanco corresponden a la incorporación a 4 grados C. Las barras de incertidumbre representan el error estándar de 3 determinaciones.

afinidad de colina dependiente de la temperatura. En estos experimentos se usó colina a una concentración de $0.4 \mu\text{M}$. Se nota, por comparación de las figuras 8 y 9, que la magnitud del transporte de colina a concentración de $0.4 \mu\text{M}$ fue igual al que se observó con colina a $1 \mu\text{M}$. De este resultado se desprende que a concentración de $0.4 \mu\text{M}$ el sistema de transporte de alta afinidad de colina posiblemente está saturado, y por lo mismo, es de suponer que la constante de Michaelis (K_m) para este transportador quizá sea menor que $0.4 \mu\text{M}$.

En una serie de experimentos preliminares, en donde se determinó la captura de alta afinidad de colina en la fracción sinartosomal cruda de cerebro completo, (Figura 10), se observó que la captura es dependiente del ion sodio y de temperatura. Por su parte, la captación de glutamato de alta afinidad en la capa molecular del cerebelo también mostró una clara dependencia de sodio (Figura 11).

Liberación de acetilcolina.

En un principio se estudió la liberación de acetilcolina en homogenados de la capa molecular del cerebelo con la técnica de perfusión discontinua. Puede verse en la figura 12 que la liberación de acetilcolina no fue estimulada por despolarización con 53 mM de potasio o con veratrina en presencia o ausencia de calcio. Debe decirse que, por medio de esta técnica, se obtuvo una variabilidad grande en los datos, además de que los perfiles de liberación no son reproducibles de experimento a experimento. Por otro lado, los valores de liberación basal son altos si se comparan a los obtenidos al medir liberación de glutamato por la misma técnica. Con estas consideraciones, se decidió entonces cambiar a un sistema de perfusión continua para seguir el establecimiento de una línea basal de liberación. Además, para evitar alteraciones del tejido por la homogenización se usaron rebonadas de capa molecular. Debe señalarse que tanto en el caso de los experimentos de perfusión

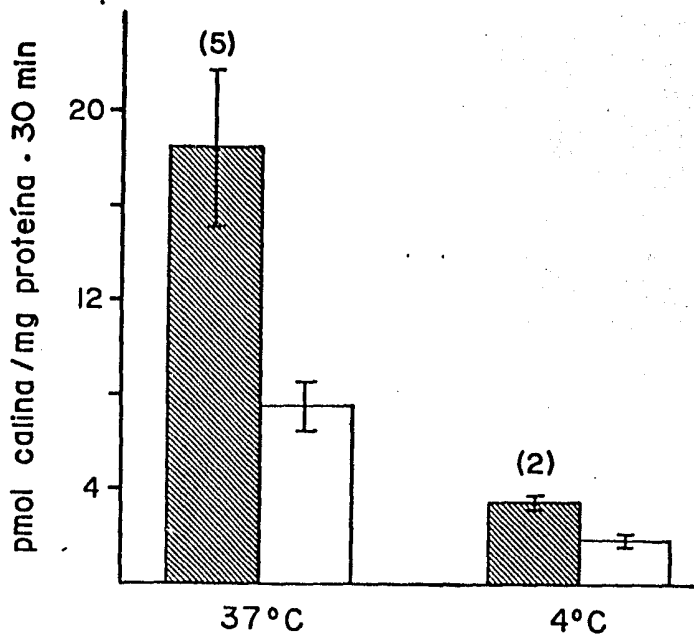


Figura 10. Captura de alta afinidad de colina ($0.4 \mu\text{M}$) en la fracción sinaptosomal cruda del cerebro completo. Las barras sombreadas indican la incorporación en un medio con sodio cuya composición corresponde al medio NaCl de la Tabla I. Las barras en blanco representan la incorporación de colina en un medio sin sodio cuya composición es la del medio señalado como Sacarosa en la Tabla I. Los números entre paréntesis indican el número de determinaciones. Las barras de incertidumbre señalan el error estándar.

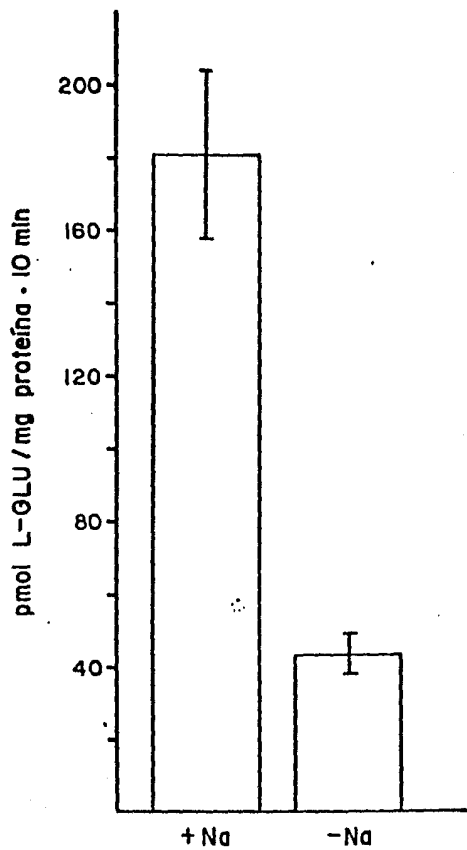


Figura 11. Captación de alta afinidad de L-glutamato (L-GLU), (0.8 μ M) en la capa molecular del cerebelo. Las anotaciones al pie de cada barra indican respectivamente, de izquierda a derecha, incorporación en medio con sodio (NaCl de la Tabla I) e incorporación en medio sin sodio (Sacarosa de la Tabla I). Las barras de incertidumbre representan el error estándar de 6 determinaciones.

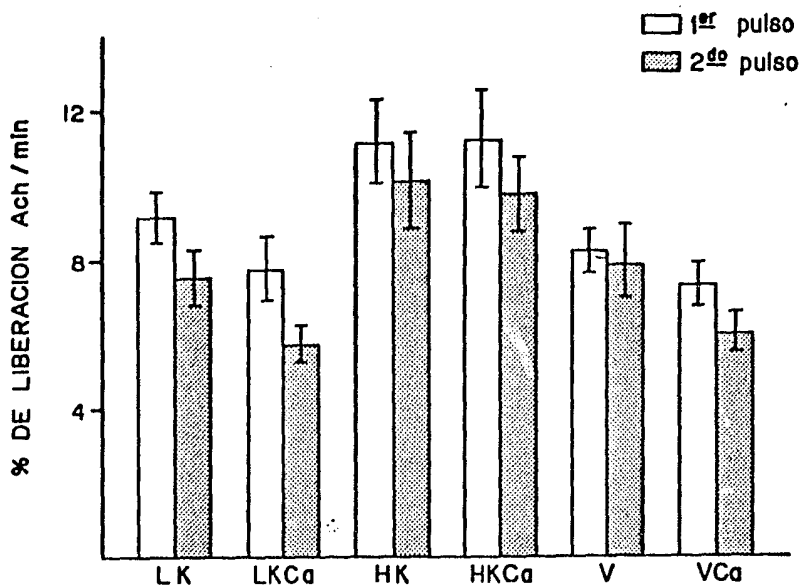


Figura 12. Perfil de liberación de acetilcolina (ACh) en perfusiones discontinuas de homogenados de la capa molecular del cerebelo. Cada par de barras indica el porcentaje de liberación en el primero y segundo pulsos de la perfusión con el medio que se indica al pie de cada par de barras. La composición de estos medios corresponde a la señalada en la Tabla IV. LK, medio Ringer - Krebs sin calcio; LKCa, medio Ringer - Krebs con calcio; HK, medio alto potasio sin calcio; HKCa, alto potasio con calcio; V, medio Ringer - Krebs con veratrina sin calcio; y VCa, medio Ringer - Krebs con veratrina y calcio. Las barras de incertidumbre indican el error estándar de 12 a 24 determinaciones.

intermitente o perfusión continua, no se pudo determinar si la radioactividad del líquido perfundido era de acetilcolina. Esto se debe a que la cantidad de radioactividad en el líquido perfundido era muy pequeña, y ella se debió primero a que el tejido corte muy poca colina y segundo, a que se obtiene muy poca cantidad de tejido de corte molecular en cada fracción; esto es de 2 - 3 μ g de proteína.

En la figura 13 se muestra el perfil de liberación de radioactividad que surgen es de acetilcolina, cuando se perfundieron rebonedas de la corte molecular en condiciones de liberación basal y en presencia de 53 mM de potasio con y sin calcio. Primero puede observarse que durante los primeros 10 minutos en que se perfundió con medio Ringer - Krebs sin calcio, se estableció una línea basal de liberación que es asintótica, lo que significa que tiende a estabilizarse. Esta línea basal de liberación es un poco alta en relación a la que se observó en el perfil de liberación de diacetato obtenido con la misma técnica (Figura 16). En la misma figura puede verse que cuando se estimuló con 53 mM de potasio, ya sea en presencia o no de calcio, no aumentó la liberación de radioactividad y sólo siguió un curso temporal similar al de la liberación basal. Este mismo fenómeno se observó cuando se hizo la estimulación con veratrina, tanto en presencia o ausencia de calcio (Figura 14).

Con el fin de determinar si la técnica de perfusión era adecuada se obtuvo el perfil de liberación de radioactividad que se surge es de acetilcolina, en rebonedas de hipocampo. Se accedió el hipocampo como control es que se tiene evidencia electrofisiológica (Duda 1975; Fird y Ashkenjian 1976; Dodd et al. 1981; y Cole y Nicoll 1984), y bioquímica (Martin et al. 1977 y Simpson y Smart 1982) de la existencia de sistemas colinérgicos en esta zona del sistema nervioso. En la figura 15 se observa el perfil de liberación de radioactividad que se obtuvo al perfundir rebonedas de hipocampo. Se ve que se estableció una línea basal de liberación menor a la que se observó al perfundir la corte molecular de

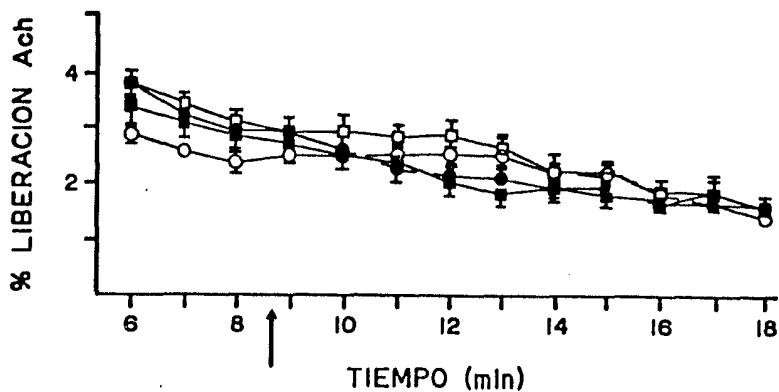


Figura 13. Perfil de liberación de acetilcolina (ACh) en capa molecular de cerebelo en perfusión continua. Trazo ■ corresponde a medio LK; trazo ● a medio LKCa; trazo □ a medio HK y trazo ○ a medio HKCa. La flecha indica el momento en que se realizó el cambio de medio LK a otro. La composición de estos medios corresponde a la señalada en la tabla IV. La incertidumbre representa el error estándar de 6 determinaciones en el caso de medio LK; 13 para el medio LKCa; y 4 para los medios HK y HKCa.

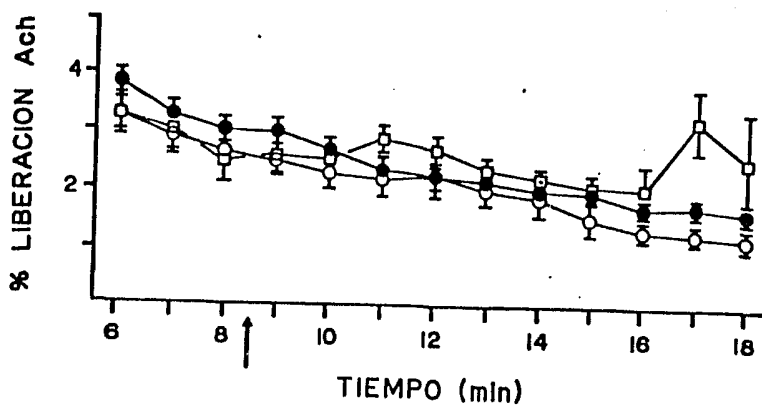


Figura 14. Perfil de liberación de acetilcolina (ACh) en capa molecular de cerebelo en perfusión continua. Trazo ● indica liberación en medio LKCa, trazo □ a medio V (veratrina) y trazo ○ al medio VCa. La flecha indica el momento en que se cambió el medio LK a otro. La composición de estos medios corresponde a la señalada en la tabla IV. La incertidumbre representa el error estándar de 13 determinaciones en el caso del medio LKCa y 4 para los medios V y VCa.

cerebello. La liberación de radioactividad se incrementó por despolarización con veratrina e en forma dependiente de calcio. Aunque si bien los incrementos en la liberación no fueron muy grandes en términos absolutos, resultan considerables en comparación a los valores de la línea basal.

Con el propósito de determinar que la preparación de caso molecular se encontraba en condiciones adecuadas en los experimentos de perfusión continua, se estudió el perfil de liberación de glutamato en perfusión continua de caso molecular de cerebello. Dicho perfil se muestra en la figura 16 e en él puede verse que la liberación de glutamato fue estimulada por despolarización con 53 mM de potasio e con veratrina en forma dependiente de calcio.

Para estudiar si la liberación de acetilcolina en la cara molecular del cerebello dependía de algún ion, se estudió el efecto de distintos ionóforos sobre ésta. Dichos experimentos no se muestran ya que son muy heterogéneos; se usaron ionóforos e distintas concentraciones, disueltos en distintos solventes, en ocasiones se aplicaron en la incubación junto con la colina; en otras veces se aplicaron al espezor e perfundir; otros todos ellos dieron el mismo resultado. Se hicieron despolarizaciones con la benzocaina que es un ionóforo de sodio e con valinomicina que es un ionóforo de potasio; tanto en presencia como en ausencia de calcio e no fue posible estimular la liberación de acetilcolina en la cara molecular del cerebello. También se probó el efecto del ionóforo de calcio A23187, sin embargo los resultados obtenidos con dicho fármaco no son claros ya que no son reproducibles. Estos resultados indicaban que de existir liberación de acetilcolina ésta no estaba directamente relacionada con el ion sodio o el ion potasio.

Ya que la síntesis de acetilcolina parecía estar relacionada con las fibras paralelas, se decidió determinar si el glutamato, que es el neurotransmisor de estas fibras, tenía algún efecto en la liberación de acetilcolina. En la figura 17 se observa que el

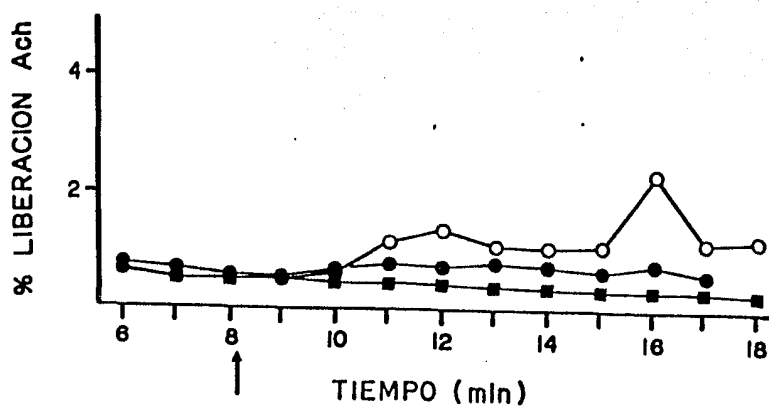


Figura 15. Perfil de liberación de acetilcolina (ACh) en hipocampo. Trazo ■ corresponde a medio LKCa, trazo ● a medio V y trazo ○ a medio VCa. La flecha indica el momento en que se cambió el medio LK a otro. La composición de estos medios corresponde a la señalada en la tabla IV. La gráfica corresponde a una sola determinación.

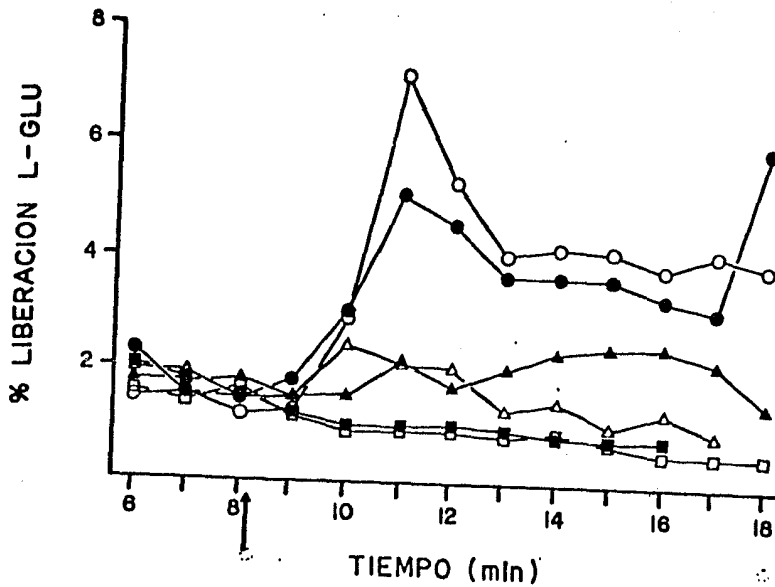


Figura 16. Perfil de liberación de L-glutamato (L-GLU) en capa molecular de cerebello. Trazo ■ indica el resultado en medio LK; trazo □ corresponde al medio LKCa; trazos △ y ▲ corresponden respectivamente a medios HK y V; trazos en ○ y ● representan de igual forma, a los medios HKCa y VCa. La flecha indica el momento en que se realizó el cambio de medio LK a otro. La composición de estos medios corresponde a la señalada en la tabla IV. La gráfica es de una determinación.

Glutamato a concentración de 10 μ M aumentó un poco pero significativamente; $P < 0.05$ con la prueba de "t" para variables independientes, en el tercero y cuarto punto después de la aplicación de glutamato; la liberación de radioactividad que sustrayamos es de acetilcolina. Cabe hacer notar que el efecto del glutamato se observó en todos los experimentos; es decir, fue reproducible. De hecho, la figura 17, por ser un promedio de curvas en donde el punto más alto de liberación no se presenta siempre en el mismo minuto; subestima un poco el efecto real del glutamato. En la figura 17 puede verse que el efecto del glutamato, además, depende de la despolarización con 53 mM de potasio. En estos experimentos se usó calcio. No se determinó la dependencia de este último ion en el efecto del glutamato.

En estos experimentos se incrementó la velocidad de perfusión de 1 ml/min a 2 ml/min con el fin de eliminar posibles problemas de difusión en el tejido. Si se comparan los valores de liberación basal de acetilcolina en la cara molecular obtenidos con ambas velocidades de perfusión, se observa que dicho aumento no afectó los valores de liberación previamente obtenidos (Figuras 13 y 14). Sin embargo, el medio alto potasio con calcio aumenta la liberación de acetilcolina en forma un poco más clara a velocidad de 2 ml/min que a 1 ml/min.

Liberación de glutamato.

Ya que el glutamato mostró un efecto en la liberación de acetilcolina; se estudió entonces, el efecto de la acetilcolina en la liberación de glutamato para determinar si la acetilcolina interviene en la regulación de la transmisión de las fibras paralelas a través de modificar la liberación del glutamato. Los experimentos se realizaron usando la técnica de perfusión discontinua de hemodendros de la cara molecular del cerebelo. En la figura 18 se observa que la acetilcolina a una concentración de 10 μ M no tuvo ningún efecto sobre la liberación de glutamato. En

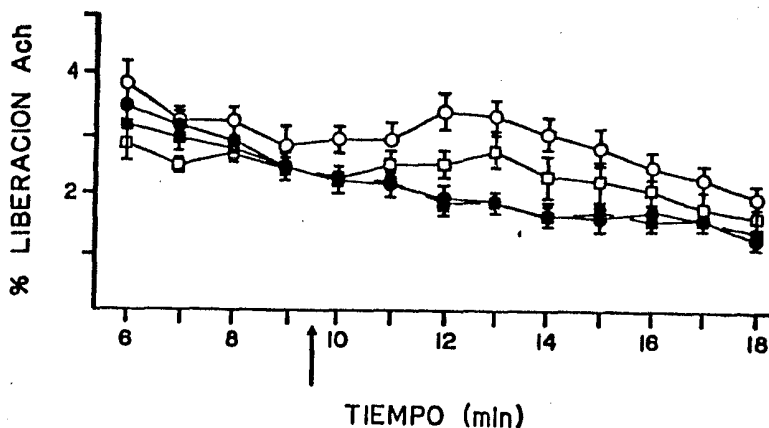


Figura 17. Efecto del L-glutamato a concentración de $10 \mu\text{M}$ en la liberación de acetilcolina (ACh) en la capa molecular del cerebelo. Trazo ■ corresponde a medio LKCa; trazo ● indica el medio LKCa con L-glutamato; trazo □ representa el medio HKCa y trazo en ○ al medio HKCa con L-glutamato. La flecha indica el momento en que se realizó el cambio de medio LK a otro. La incertidumbre indica el error estándar de 10 determinaciones en el caso de medio LKCa; 6 para el medio LKCa y L-glutamato; 4 para el medio HKCa y 6 para el medio HKCa y L-glutamato. La composición de los medios se señala en la tabla IV.

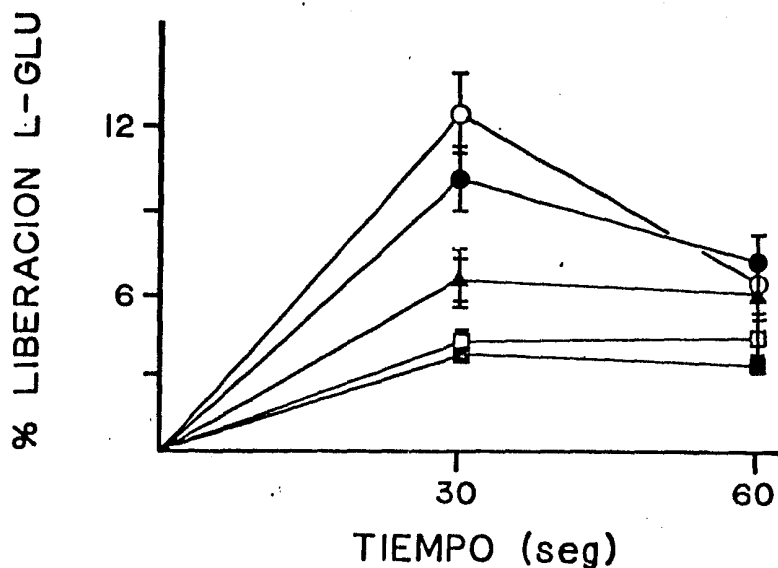


Figura 18. Efecto de la acetilcolina a concentración de $10 \mu\text{M}$ en la liberación de L-glutamato en la capa molecular del cerebelo en perfusión discontinua. Trazo ■ corresponde a medio LK; trazo ○ al medio LKCa y acetilcolina. Los trazos ▲ y △ que se encuentran superpuestos indican respectivamente medios HK y HK con acetilcolina. De igual forma, trazos ● y O no superpuestos representan respectivamente medios HKCa y HKCa con acetilcolina. La incertidumbre representa el error estándar de 4 determinaciones. La composición de los medios es la indicada en la tabla IV.

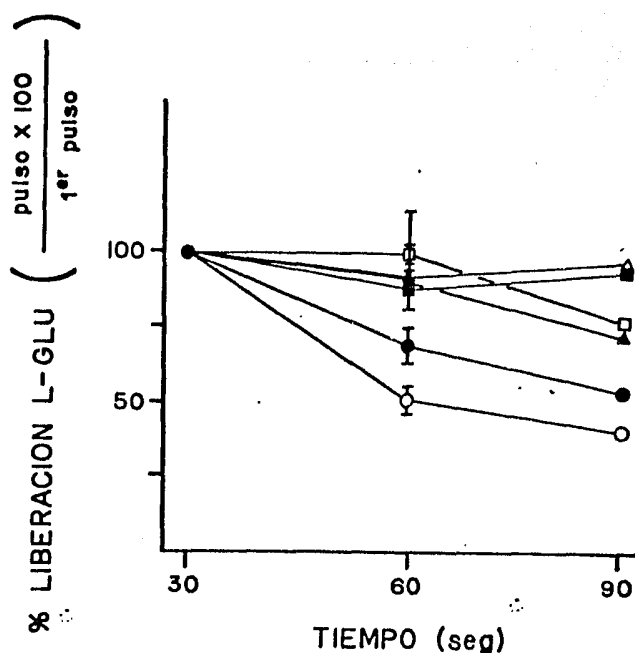


Figura 19 Liberación de L-glutamato en la capa molecular del cerebelo con respecto a la liberación en el primer pulso de la perfusión discontinua. Los datos son tomados de la figura 18. El trazo ■ indica el resultado obtenido con medio LK, el trazo □ al medio LKCa con acetilcolina, los trazos ▲ y ● representan respectivamente a los medios HK y HK con acetilcolina. De igual forma, los trazos ● y ○ corresponden a los medios HKCa y HKCa con acetilcolina respectivamente. La incertidumbre indica el error estándar de 4 determinaciones. En el tercer pulso se tiene una sola determinación. La composición de los medios es la señalada en la tabla IV.

condiciones de despolarización con calcio se observa que la acetilcolina aumentó un poco la liberación de glutamato en el primer pulso. Este aumento, sin embargo, no fue significativo. Si se grafica el porcentaje de liberación en el segundo pulso tomando el primer pulso como 100 % (Figura 19), se observa que en condiciones de despolarización con calcio, la acetilcolina disminuyó significativamente ($P < 0.05$) la liberación de glutamato en el segundo pulso.

DISCUSION

Si bien, se ha propuesto la existencia de transmisión colinérgica en el cerebelo, no se ha hecho una evaluación formal que contemple por principio, todos los criterios que definen a una sustancia como neurotransmisor en una zona determinada del sistema nervioso.

A pesar de que se ha propuesto que posiblemente parte de las fibras muscosas son colinérgicas, por el hecho de que la aplicación iontoforética en la cara granular provoca excitación en la célula de Purkinje (McCance y Phillis 1968), y por que se ha encontrado la presencia de las enzimas acetilcolinesterasa (Altman y Das 1970 y Brown y Palau 1972) y colina-acetiltransferasa (Woodward et al. 1982), esto no ha sido plenamente demostrado. En la misma situación se encuentra la posibilidad de que la acetilcolina sea el transmisor de las células de Golgi, en las que se ha encontrado la presencia de acetilcolinesterasa (Altman y Das 1970). De cualquier modo, existen varias razones para pensar que hay un elemento interneuronal colinérgico en la cara molecular del cerebelo. En primer término, la acetilcolina provoca una excitación al aplicarla directamente en la célula de Purkinje (McCance y Phillis 1968). Esta excitación es causada a través de la activación del receptor muscarínico (Cronel y Dhanjal 1982); cuya existencia, en la cara molecular del cerebelo, ha sido probada por medio del uso de técnicas de autorradiografía (Rotter et al. 1979), y de unión específica (Sorea et al. 1982). Asimismo, la existencia de este elemento interneuronal colinérgico ha sido inferido a partir de medir la actividad de la CAT cuando se lesiona el pedúnculo inferior y observar que la actividad de la CAT se reduce a la mitad en tanto que las fibras aferentes están completamente degeneradas (Acin et al. 1984). Además de pensar en la existencia de un posible sistema colinérgico interneuronal en la cara molecular del cerebelo, se ha visto que los lóbulos IX y X son los lóbulos en los que se localiza preferentemente este probable sistema colinérgico. Se ha visto, por autorradiografía, que los

receptores muscarínicos en la capa molecular son más abundantes en los lóbulos citados (Rotter et al. 1979). También, en los lóbulos IX y XI se ha probado que la actividad de la CAT, la unión de alta afinidad de análogos muscarínicos y la captación de alta afinidad de colina son mejores (Káse et al. 1982).

El objetivo del presente trabajo fue determinar a partir de criterios bioquímicos la existencia de este posible sistema colinérgico en la capa molecular del cerebelo. Los criterios evaluados fueron los de síntesis de acetilcolina, captura de alta afinidad de acetilcolina y liberación de de la misma.

La actividad de la CAT es un criterio muy acertado como indicador de la presencia de sistemas colinérgicos ya que es una enzima cuya actividad sólo se relaciona con el proceso de neurotransmisión mediado por la acetilcolina. La colinesterasa por su parte, resulta ser un indicador muy inespecífico. Es por esta razón por la cual se han desarrollado técnicas para poder determinar en forma precisa la localización de la CAT en todo el sistema nervioso tanto por medio de la inmunohistoquímica (Butcher 1977 y Wainer et al. 1984) como por otros medios histoquímicos (Burt y Silver 1973).

En el presente trabajo se determinó que en la capa molecular del cerebelo existe la enzima CAT (Figura 6) lo cual se había sido previamente reportado (Goldberg y McCaman 1967). También, se observó que la actividad de esta enzima es similar a la que se encuentra en la fracción sinaptosomal cruda del cerebelo completo y ligeramente mayor a la del homogenado total del cerebelo (Figura 6). Esto nos lleva a concluir que la CAT de la capa molecular del cerebelo se asocia al enriquecimiento sinaptosomal de la fracción P2 del cerebelo en comparación al homogenado total. Puede argumentarse que la CAT de las fibras muscosas es la que en realidad contribuye al enriquecimiento de la actividad enzimática, sin embargo, por su tamaño, las fibras muscosas se rompen en el proceso de homogenado

cuales además, se verificaría la asociación de la CAT con las sinapsis de las fibras paralelas y las células de Purkinje.

Otro criterio de evaluación usado fue el de captura de alta afinidad de colina. Merced de que el tejido nervioso no puede sintetizar colina, la síntesis de acetilcolina a partir de acetil-CoA y colina, está limitada por la captación de colina (Gussonet et al. 1973). Además, la síntesis de acetilcolina está relacionada con la captura de alta afinidad de colina (Meyer et al. 1982 y Merchbanks y Kessler 1982). Ya que la captación de alta afinidad es limitante en la síntesis de acetilcolina y, por lo tanto, se trata de un proceso a través del cual se puede regular la actividad colinérgica (Kuhar 1977), la captación de alta afinidad de colina es un criterio importante en la evaluación de posibles sistemas colinérgicos.

Como puede observarse en las figuras 10 y 11, los resultados indican la presencia de un sistema de captura de alta afinidad, dependiente de sodio y de temperatura para colina en la fracción sinaptosomal cruda del cerebro completo. También, como control, se determinó la captura de alta afinidad para el glutamato en la capa molecular del cerebelo. Llamo la atención, sin embargo, que no se observó captura de alta afinidad, dependiente de sodio para la colina en la capa molecular del cerebelo, aunque, la captura fue dependiente de temperatura, lo cual indica, se trata de un proceso de transporte activo. Se ha reportado (Kása et al. 1982) que la captación de alta afinidad de colina en el cerebelo es dependiente de sodio. Debe considerarse, a pesar de ello, que este reporte no contempla la captación de colina por estratos específicos de la corteza. Si se compararan las técnicas que se usan en este reporte y las del presente trabajo, es posible que las diferencias en los resultados puedan deberse al modo de homogenización de la capa molecular. Más adelante, al tratar sobre los datos de liberación, se verá que la homogenización de la capa molecular parece afectar la integridad del posible sistema colinérgico. De igual manera a lo

por lo cual es poco probable que, en la fracción P2, existan las terminales de las fibras musgosas. La obtención de las terminales de estas fibras en el laboratorio requiere un proceso de homogenización especial (Hamberger et al. 1975).

La actividad de la CAT en la capa molecular del cerebelo es considerablemente menor a la que se encuentra en la fracción P2 del cerebro completo; lo cual indica que, en comparación al cerebro completo, la densidad de elementos colinérgicos en la capa molecular del cerebelo es pequeña. Ahora bien, hay que considerar que la concentración de la CAT puede variar en las distintas zonas de la capa molecular del cerebelo. Ya se han dado varias evidencias que indican que los constituyentes del sistema colinérgico, incluyendo la CAT (Moss et al. 1982), son más abundantes en los lóbulos IX y X del cerebelo; por lo que es de suponer que la actividad de la CAT en la capa molecular que corresponde a estos dos lóbulos, sea mayor que la encontrada en la capa molecular de todos los demás lóbulos del cerebelo.

Una vez observada la actividad de la CAT en la capa molecular, el siguiente paso sería averiguar específicamente en qué célula de la corteza cerebelosa se encuentra esta enzima. En el presente trabajo se dio evidencia de que la CAT, en la capa molecular del cerebelo, no se asocia a las fibras trepadoras ya que su actividad no desaparece al degenerar las fibras trepadoras por efecto del tratamiento con 3-AP. La actividad de la CAT surge con el mismo patrón temporal en que se establecen las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje. Además, se ha reportado un patrón temporal semejante para el caso de los receptores muscarínicos (Soreca et al. 1982). De este modo, se piensa que el posible sistema colinérgico está relacionado con las sinapsis de las fibras paralelas. Sin embargo, aún es necesario determinar en qué lugar se encuentra la enzima CAT: en la presinapsis, postsinapsis o en la glia que recubre la sinapsis. Para resolver esta cuestión sería factible aprovechar las técnicas inmunohistoquímicas con las

Al evaluar la liberación de acetilcolina por perfusión discontinua de homodanos de la cara molecular del cerebelo (Figura 12), se encontró que los perfiles de liberación no eran reproducibles de experimento a experimento y los valores de liberación basal eran altos en relación a los que se obtienen por la

Para resumir, hasta este momento, la evidencia indica que se puede concluir que en la cara molecular del cerebelo existe un sistema de captación de alta afinidad de colina aunque éste no es dependiente de sodio. Debido a la sensibilidad de este sistema al HC-3 se podría pensar que este mecanismo de captura es asociado a la síntesis de acetilcolina, la cual parece estar asociada a las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje.

La sensibilidad de la captura de alta afinidad de colina al fármaco HC-3, también puede considerarse como un criterio válido para evaluar la existencia de un sistema de captación de alta afinidad relacionado con la síntesis de acetilcolina, pues el HC-3 inhibe la captura de colina de alta afinidad y la síntesis de acetilcolina o partir de la colina que se leore transportar en presencia de este droga (Meyer et al., 1982). El hecho de que en la cara molecular del cerebelo, la captación de alta afinidad, dependiente de la temperatura sea inhibida por el HC-3 y de que se haya reportado (Reinbow et al., 1984) que existen sitios de unión para el HC-3, sugiere que la captura de alta afinidad de colina, aunque no es dependiente de sodio, podría estar asociada a la síntesis de acetilcolina.

La cantidad de fármaco usado y en virtud de que la cantidad de fármaco molecular sin homodanos. Sin embargo, es que es necesario medir la necesidad de efectuar experimentos de captación de colina en cerebros que se hizo en el caso de la liberación de acetilcolina, se plantea

como técnica en el caso del glutamato. Fundamentalmente, el hecho de no tener perfiles de liberación reproducibles, indicaba que el procedimiento empleado afecta la integridad del tejido. Posiblemente, este problema tenga su causa en la forma de homogenización. Cuando se hicieron perfusiones continuas de acetilcolina en la capa molecular sin homogenizar, se vio primero, que la liberación basal, que suponemos es de acetilcolina, tiene valores mucho menores que los obtenidos en perfusión discontinua de homogenados. Segundo, estos valores son comparables a los que se tienen para el glutamato en la capa molecular del cerebelo con la misma técnica. Tercero, esta técnica permite ver una tendencia de la línea basal de liberación a estabilizarse lo cual es característico de sustancias que son neurotransmisores. Finalmente, los perfiles de liberación son reproducibles de experimento a experimento. Todo esto, también sugiere que el funcionamiento del posible sistema colinérgico parece alterarse por la homogenización de la capa molecular.

No obstante, cuando se probó el efecto de la veratrina y de la elevación de la concentración externa de potasio, se vio que, sea fuera en presencia o ausencia de calcio, no se lograba estimular la liberación de acetilcolina (Figuras 13 y 14). Para verificar la técnica, como control, se hicieron perfusiones de brozos de hipocampo (Figura 15) el cual, es rico en elementos colinérgicos (Dodd 1975; Bird y Ashajanian 1976; Merrin et al. 1977; Dodd et al. 1981; Simson y Smart 1982 y Cole y Nicoll 1984). Se observó que la veratrina provoca, en estas condiciones, un aumento en la liberación de acetilcolina dependiente de calcio. Los valores de la liberación basal y por estimulación obtenidos son semejantes a los que se reportan en perfusiones continuas de sinaptosomas de corteza cerebral (Marchi et al. 1983) y de hipocampo (Merrin et al. 1977). Cuando se hizo la perfusión de glutamato, como control en la capa molecular del cerebelo, igualmente se obtuvo una línea de liberación estable. La liberación de glutamato es estimulada tanto por veratrina como por alto potasio en forma dependiente de calcio

(Figura 16). Todo ello indica que el procedimiento experimental es adecuado y que los resultados logrados al evaluar la liberación de acetilcolina en la capa molecular del cerebelo, son válidos. Llama la atención entonces, la falta de liberación de acetilcolina en la capa molecular del cerebelo. En el caso de los datos que se presentan en este trabajo, parece que no hay problemas apreciables de difusión en el tejido pues, como puede verse en la perfusión del glutamato en la capa molecular, se tienen valores de liberación estimulada considerablemente altos. Debe verse, también, que si se supone que se está midiendo liberación de acetilcolina, no hay recaptura de la marca radiactiva de colina por el tejido (como debe ocurrir con el glutamato) por el hecho de que la degradación de la acetilcolina se previene con la presencia de eserina en los medios de incubación y perfusión.

En otros trabajos (Murrin et al. 1977 y Marchi et al. 1983), la estimulación de la liberación de acetilcolina se hace después de los 15 minutos de perfusión, cuando la línea basal alcanza la estabilidad en valores cercanos al 1 por ciento. Las líneas baseales de liberación obtenidas, para el glutamato en la capa molecular y para la acetilcolina en el hipocampo, son alrededor del 1 por ciento, menores a las que se tienen para la acetilcolina en la capa molecular del cerebelo. De hecho, una línea basal comparable a la de los dos primeros casos, para la acetilcolina en la capa molecular, se obtiene sólo después de los 15 minutos de perfusión. Por esta razón, es posible que los efectos de distintas sustancias vistos en este trabajo, no sean tan claros por el hecho de que se hicieron los cambios de medios a tiempos en los cuales la liberación basal aún no estaba del todo estable.

Ya se señaló que se intentó determinar, a través del uso de distintos ionóforos, si podía estimularse la liberación de acetilcolina por efecto de eldón ion. Concretamente, se probó que la despolarización por entrada de sodio o por incrementar la permeabilidad al potasio en medios de potasio normal y alto potasio,

no provocaba un aumento en la liberación de acetilcolina. Los resultados obtenidos con el ionóforo de calcio A23187 no son aún indicativos del papel del calcio en la liberación de acetilcolina en la capa molecular del cerebelo.

En virtud de los resultados obtenidos para la liberación de acetilcolina bajo distintas condiciones, parece ser que la acetilcolina en la capa molecular del cerebelo no se asocia a terminales sinápticas nerviosas como un neurotransmisor clásico. Sin embargo (ver sección de antecedentes), ya que la acetilcolina parece intervenir en la comunicación neuronal en la corteza del cerebelo, se pensó en la posibilidad de que la acetilcolina tuviera un papel modulador en la transmisión sináptica en esa región. Existen receptores muscarínicos, al parecer en la célula de Purkinje sobre todo en los lóbulos IX y X (Rotter et al. 1979; Cresel y Dhanjal 1982 y Sorea et al. 1982) que en el desarrollo surgen con un patrón temporal similar al de establecimiento de las sinapsis de las fibras paralelas y células de Purkinje (Sorea et al. 1982). También se ha visto que estos receptores están involucrados en la excitación de la célula de Purkinje por efecto de la acetilcolina (McCaskey y Phillis 1968 y Cresel y Dhanjal 1982). Ya que en el presente trabajo se encontró que la CAT se asocia a las sinapsis de las fibras paralelas y las células de Purkinje, se podría pensar que la acetilcolina esté relacionada con la transmisión sináptica de estas fibras. Ya que la transmisión sináptica en las fibras paralelas es de tipo glutamatergica, se decidió estudiar si el glutamato tenía algún efecto sobre la liberación de acetilcolina en la capa molecular del cerebelo.

En la figura 17 se ve que, en la capa molecular, el glutamato a concentración de 10 μ M, en condiciones de despolarización con un medio alto potasio, causa un pequeño pero significativo aumento en la liberación de la acetilcolina con respecto a la liberación con alto potasio ($P < 0.05$ con prueba de 't' para variables independientes en los minutos 12 y 13 de la perfusión). Como se se

mencionó en la parte de resultados, el efecto del glutamato depende de la despolarización por medio de elevar la concentración externa de potasio. En un medio Ringer - Krebs normal, el glutamato como lo muestra la figura 17, no tiene ningún efecto en la liberación de acetilcolina.

El efecto observado a una concentración de glutamato de $10 \mu\text{M}$ es indicativo de que la acción del glutamato es sinérgica pues esta concentración es mas baja para que se trate de efectos farmacológicos. Esta concentración también es similar a la K_m de captación de alta afinidad reportada para el glutamato en la capa molecular del cerebelo (Sandoval et al. 1984) y que es de $2.6 \mu\text{M}$. Debe considerarse, además, que se que se trabajó con rebasados de tejido o no con homogenizados, la concentración efectiva del glutamato en el tejido puede ser aún menor a $10 \mu\text{M}$. De cualquier modo, ciertamente queda por determinar si el efecto del glutamato en la liberación de acetilcolina es bloqueado por antagonistas al receptor del glutamato. También, con la intención de demostrar que la acción del glutamato se relaciona con la transmisión de las fibras paralelas, habría que determinar cuál es el efecto del glutamato en distintas fases de desarrollo de la capa molecular del cerebelo. Para esto último, sería necesario investigar primero cómo es el perfil de liberación de acetilcolina en cada etapa del desarrollo ontogénico de la capa molecular. En cuanto a los requerimientos de la acción del glutamato, no se averiguó si ésta depende de calcio, de un segundo mensajero citoplásmico o de ambos. La posibilidad de que la liberación de la acetilcolina depende de un segundo mensajero, un nucleótido cíclico en concreto, surge primero de que la liberación de la acetilcolina no parece estar relacionada al menos por un efecto subsecuente a la despolarización por sodio o por potasio en la capa molecular del cerebelo sino que parece ser causada por el glutamato que es el neurotransmisor de las fibras paralelas. Segundo, es sabido que el glutamato provoca un aumento en los niveles de AMPc. Y tercero, se ha reportado (Katsuki et al. 1977) que la acetilcolina puede ser liberada por AMPc en el cerebro

de la rata.

Ya que es posible que la acetilcolina module la transmisión glutamatergica en la capa molecular del cerebelo, se buscó como primera instancia si la acetilcolina podria modificar la liberación del glutamato. En la figura 19 que muestra los perfiles de liberación de glutamato en ausencia y presencia de acetilcolina (10 μ M), puede apreciarse que la acetilcolina solamente provee un aumento en la liberación de glutamato en condiciones de despolarización con calcio. Este aumento, sin embargo, no fue consistente en los cuatro experimentos realizados y la diferencia en la liberación de glutamato no es significativa. Cuando se grafica el porcentaje de liberación de glutamato tomando el primer pulso como 100 por ciento, entonces si se nota que la acetilcolina en condiciones de despolarización con calcio, disminuye significativamente ($P < 0.05$) la liberación de glutamato en el segundo pulso.

Si la acetilcolina causa una disminución en la liberación del glutamato es de suponer entonces, que existen receptores a la acetilcolina en las terminales de las fibras paralelas. Se ha probado que los receptores muscarínicos de la capa molecular, en el desarrollo, primero aparecen en la capa granular y subsecuentemente en la capa molecular (Rottler et al. 1979). Esto no es lo que ocurre con las terminales de las fibras paralelas las cuales en su desarrollo, nunca están en la capa granular. Segundo, se ha mostrado en el cerebelo de ratas a las que se les ha hecho perder las células granulares de distintas formas, que éstas no contribuyen a la presencia de receptores muscarínicos en la corteza del cerebelo (Soren et al. 1982). Por estas razones, entonces, se puede concluir que la acetilcolina no tiene ningún efecto directo en la liberación de glutamato. Una alternativa para explicar la disminución en la liberación de glutamato en el segundo pulso por efecto de la acetilcolina, es que la cantidad de glutamato en el perfusado disminuye porque la acetilcolina aumenta la captura de

alta afinidad de glutamato. La captura del glutamato se lleva a cabo fundamentalmente por la glia (Hamberger et al. 1976 y Henn 1976). Es probable que el receptor colinérgico se encuentre al menos en parte en la glia. Ya se ha reportado en el suero sifante del colamar la presencia de receptores a la acetilcolina en las células gliales que lo recubren (Villessa 1981); por lo cual quizá se podrían encontrar receptores a la acetilcolina en la glia de la corteza del cerebelo. Sin embargo, esta opción no tiene ninguna evidencia experimental.

A pesar de que la evidencia experimental, tanto la reportada en la literatura como la encontrada en este trabajo, no es en modo alguno completa ni concluyente, se ha juzgado conveniente elaborar una hipótesis acerca del papel de la acetilcolina en la capa molecular del cerebelo con el fin de que, al integrar la información dispersa en la literatura y en este trabajo, plantear problemas concretos susceptibles de ser probados experimentalmente y con ellos, proponer la continuación del trabajo de investigación. Hay que considerar también la posibilidad de que la acetilcolina no tenga nada que ver con la fisiología del cerebelo; en virtud, sobre todo, de que los resultados obtenidos en este trabajo no son claros respecto al comportamiento del posible sistema colinérgico en el cerebelo; por lo menos, este trabajo no da ninguna evidencia concluyente sobre el papel de la acetilcolina en el cerebelo y ajenos de las consideraciones que se hacen a continuación. Lo que se pretende es mostrar lo que se ha llegado a pensar, como posible, acerca de la acetilcolina en el cerebelo.

Ya se ha mostrado que la acetilcolina en la capa molecular del cerebelo parece estar relacionada con las sinapsis entre fibras paralelas y las células de Purkinje. Sin embargo, el hecho de que la acetilcolina no se libere por despolarización en forma

dependiente de calcio, hace pensar que el posible sistema colinérgico no está asociado a las terminales de las fibras paralelas. Además, el que la costación de alta afinidad de colina no dependa de sodio pero sea sensible al HC-3, también es indicativo de que la acetilcolina no se sintetiza en las terminales de las fibras paralelas. Ya que el glutamato provoca la liberación de acetilcolina, posiblemente por vía sinéptica, se deduce que la célula portadora del sistema colinérgico tiene receptores al glutamato. Quizá, el sistema colinérgico esté localizado en la glía que recubre las sinapsis entre fibras paralelas y células de Purkinje o, más bien podría pensarse que en las dendritas de las células de Purkinje.

Se ha pensado en la glía como portadora del sistema colinérgico en virtud de que se ha reportado la existencia de la actividad enzimática butirilcolinesterasa en la glía de la capa molecular del cerebelo (Barth y Ghandour 1983). Esta actividad enzimática, no obstante, es una forma de evaluar la colinesterasa inespecífica, es decir, no relacionada con la terminal nerviosa. Además, ya se hizo notar que, en el axón gigante del calamar, la glía que recubre el axón tiene un sistema de acetilcolina que responde a los cambios en la concentración externa de potasio (Villedas 1981). En este sistema, el glutamato posiblemente está interviniendo en la liberación de acetilcolina. Este modo de comunicación a la glía está involucrado en cambios metabólicos de ésta (Fentress 1982). A este respecto, en la capa molecular del cerebelo no se ha comprobado que la glía tenga receptores al glutamato y a la acetilcolina; además de que, es claro, no se puede extrapolar lo que sucede en el axón gigante del calamar a la corteza cerebelosa de la rata. Estos receptores, más bien, parece que se localizan en la membrana de la célula de Purkinje.

Puede entonces pensarse que la acetilcolina se libera de las dendritas de la célula de Purkinje por efecto del glutamato. Se ha visto que al actuar en los receptores muscarínicos de la célula de

Purkinje, la acetilcolina produce una pequeña despolarización y un incremento en la resistencia de entrada de la membrana que hace más excitable a la célula de Purkinje (Crepel y Dhanjal 1982). Este efecto de la acetilcolina se conoce en la corteza cerebral y parece estar mediado por GMPc (Wooda 1977 y Wooda et al. 1978). En intervalos de tiempo más largos, se ha observado que la aplicación iontoforética de acetilcolina en la capa molecular del cerebelo, provoca un aumento en la tasa de disparo de las células de Purkinje. Este efecto tarda algunos segundos en presentarse y dura varios segundos después de que la acetilcolina ha sido aplicada (Crawford et al. 1963 y McCance y Phillis 1968). Ya se mencionó que el glutamato causa un aumento en los niveles de GMPc así como la estimulación de las fibras trepadoras. El hecho de que el efecto del glutamato sobre la liberación de la acetilcolina en la capa molecular depende de la despolarización, podría correlacionarse con la despolarización de las fibras trepadoras en las dendritas de las células de Purkinje.

Así pues, se puede pensar que el aumento en los niveles de GMPc que causan el glutamato y la estimulación de las fibras trepadoras, es primero, en la célula de Purkinje y segundo, está mediado por el efecto muscarínico de la acetilcolina; o bien, que el aumento en los niveles de GMPc por estimulación glutamatérgica y de las fibras trepadoras es potenciado, por medio de la acetilcolina, cuando ambas aferentes a la célula de Purkinje están activas simultáneamente.

Se plantea, por lo tanto, la hipótesis de que la estimulación simultánea de las fibras paralelas y las fibras trepadoras provoca un aumento en la liberación de acetilcolina en las dendritas de las células de Purkinje, cuyo efecto es el de aumentar la excitabilidad de estas mismas. Esta hipótesis está de acuerdo con la teoría de la función de la corteza cerebelosa desarrollada por Marr (1969) en la que se propone que la estimulación simultánea de fibras paralelas y trepadoras provoca un aumento en el efecto de las fibras paralelas en la célula de Purkinje. Esta facilitación sinéptica, de acuerdo a

La teoría de Marr, es la base del aprendizaje de tareas motoras, el cual ocurre en el cerebelo (Andersen 1982 y Thompson 1983).

La teoría de Marr argumenta que el cerebelo es un órgano en el que se da el aprendizaje de tareas motoras, ya sean voluntarias o reflejas. Brevemente, la teoría de Marr consiste en lo siguiente: Toda acción de movimiento tiene una representación en términos de movimientos simples o elementales; por ejemplo, el doblar una articulación; los cuales, a su vez, tienen una expresión neuronal como una secuencia de patrones de disparo en las células del núcleo de la oliva inferior. Cada célula de la oliva inferior responde a un comando cerebral, o bien a una señal de uno o más receptores en el caso de movimientos reflejos. Las fibras trepadoras que nacen de las células de la oliva inferior comunican cada señal a las células de Purkinje que, a través de sus conexiones, llevan esta señal a convertirse finalmente en una instrucción para un movimiento elemental. Las células de Purkinje están sujetas, al mismo tiempo, al efecto de las aferentes formadas por las fibras muscosas, las cuales proporcionan información sobre el contexto en que se da la señal que proviene de las fibras trepadoras. El arreglo de las conexiones entre las fibras muscosas y las células trepadoras y luego con las células de Purkinje, proporciona la capacidad requerida de discriminación entre contextos de información similares.

Con base en estas premisas, se predice que para el aprendizaje de tareas motoras, la estimulación conjunta de las fibras trepadoras y las fibras paralelas facilita la transmisión en las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje de modo que cuando se da una vez más el contexto fisiológico que representan las fibras paralelas, la célula de Purkinje responde más fácilmente ante esta situación. Un hecho importante que no está explícito en esta teoría, es que la facilitación sinéptica debe ser local para responder ante estímulos específicos. Por eso el aumento predicho en la excitabilidad de la célula de Purkinje no se da en toda la

Esta cuestión necesita ser resuelta, de estudios que aborden el problema a otros niveles fenomenológicos, concretamente estudios biofísicos de manera que se puedan explicar las bases de los fenómenos que se observan electrofisiológicamente. En este trabajo se ha propuesto como hipótesis que la facilitación en las sinapsis de fibras paralelas a células de Purkinje después de la estimulación conjunta con las fibras trepadoras podría estar mediada por un mecanismo colinérgico localizado en las dendritas de la célula de Purkinje.

(McDevitt et al., 1982).

en la experimentación hasta el modo de obtener y procesar datos problemas metodológicos que incluyen desde el procedimiento técnico sus colaboradores) la discrepancia en los resultados se debe a Purkinje a la acción de las fibras paralelas (McDevitt et al., 1982; Biedel et al., 1983 y Ebner et al., 1983). De acuerdo a McDevitt y en realidad es el de aumentar la sensibilidad de la célula de repete que el efecto de la estimulación de las fibras trepadoras de Purkinje al estímulo (Ito et al., 1982). No obstante, se ha dado por una disminución específica en la sensibilidad de la célula (Andersen 1982 y Rawson et al., 1982). Este cambio parece estar acción excitadora de las fibras paralelas en la célula de Purkinje indican que la estimulación de las fibras trepadoras disminuye la embargo, este efecto no es del todo claro. Existen evidencias que la célula de Purkinje ante la acción de las fibras paralelas, sin trepadoras, como predice la teoría de Marr, modifica la respuesta de electrofisiológica. Se ha visto que la estimulación a las fibras cerebelosa ha empezado a ser evaluada sólo a nivel La teoría de Marr sobre el funcionamiento de la corteza

involucradas en prever el contexto fisiológico que es aprendido.

célula sino sólo en las sinapsis de las fibras paralelas

Toda teoría es gris, pero amiso,
y verde el árbol de oro de la vida.

Goethe

CONCLUSION

Es claro que por la naturaleza del problema en cuestión, se requiere abordar el problema desde distintos puntos de vista y, con ello, el uso de varias técnicas de experimentación. Al empezar este trabajo, originalmente se tenía como objetivo hacer una evaluación de la acetilcolina como neurotransmisor en la capa molecular del cerebelo. Sin embargo, se empezaron a acumular datos que resultaban paradójicos como por ejemplo, haber determinado que en la capa molecular del cerebelo existe un sistema de transporte activo de alta afinidad de colina, sensible al HC-3 pero no dependiente de sodio. Otro resultado extraño fue el que, aunque se presentaba una liberación basal de acetilcolina similar a la reportada en otros sistemas colinérgicos, lo cual, además, es característico de sustancias neurotransmisoras, no se lograba estimular la liberación de acetilcolina al despolarizar de distintas maneras ya fuera o no, en presencia de calcio. En virtud de que averiguar el papel de la acetilcolina en la fisiología de la corteza cerebelosa representaba un problema en principio más complicado de lo que se esperaba, se decidió darle a la investigación un carácter general para tener idea de qué aspectos requerían especial atención.

Por esta razón, sería aventurado hacer afirmaciones concluyentes sobre los datos encontrados en este trabajo, especialmente en lo que se refiere a la dependencia de sodio del sistema de captación de alta afinidad de colina y a la liberación de acetilcolina en la capa molecular del cerebelo. Primero, porque existen problemas sobre el procedimiento experimental. Por ejemplo, en las perfusiones continuas de acetilcolina en la capa molecular, quizá hubiera sido más conveniente haber estimulado la liberación de

acetilcolina después de los 15 minutos de perfusión. Segundo: el número de determinaciones en algunos casos, es pequeño como para considerar el dato como concluyente. Por otro lado, también se vio en la parte de la discusión que acortar lo que pudieran los datos esté sujeta a realizar otras pruebas experimentales. Por ejemplo: el efecto del glutamato sobre la liberación de acetilcolina bloqueada por antedonistas al receptor glutamatergico, está sujeta a verificación. Es necesario comprobar también, que lo que se está liberando en las perfusiones es acetilcolina. Es por esto por lo que no tendría sentido hacer conclusiones formales sobre los datos, sino más bien, con base en ellas, elaborar hipótesis sobre el funcionamiento del posible sistema colinérgico en la capa molecular del cerebelo para que en el futuro, se genere una investigación al respecto.

De este modo, se ha llegado a proponer como hipótesis, que la acetilcolina se libera de las dendritas de la célula de Purkinje en condiciones de despolarización como respuesta a la estimulación de las fibras trepadoras cuyo neurotransmisor es el glutamato. La acetilcolina, al ser liberada, se une a los receptores muscarínicos situados en la célula de Purkinje. El efecto de la acetilcolina en este tipo de receptores, aumenta la resistencia de entrada a la membrana y con ello, la excitabilidad neuronal que en la célula de Purkinje se puede manifestar como una tasa de disparo más alta. Este sistema colinérgico aquí sea el responsable de cambios plásticos en las sinapsis de las fibras paralelas con las células de Purkinje, cambios que se relacionan con la teoría de Marr (1969) sobre el funcionamiento de la corteza cerebelosa.

Al hacer esta sugerencia, se ha pretendido abarcar las implicaciones a todos los niveles fenomenológicos con el propósito de dar una visión íntegra sobre lo que personalmente he llegado a pensar acerca del papel de la acetilcolina en el cerebelo. Un punto importante sobre la investigación en el cerebelo, es que esta estructura esté lo suficientemente estudiada como para empezar a

hacer trabajos que muestren integralmente, la dinámica de su funcionamiento; porque la función del cerebelo como en todo no puede inferirse a partir de conocer cada aspecto por separado.

Ya que se ha mencionado que se requiere ahondar más en la interacción entre los distintos transmisores de la corteza cerebelosa. Se puede citar por ejemplo que el GABA estimula la liberación de glutamato (Gallo et al. 1981 y Levi y Gallo, 1981); la liberación de GABA a su vez, es modificada por autorreceptores (Pearce et al. 1982). Se sabe también que las eferentes noradrenérgicas que provienen del locus caeruleus aumentan el efecto inhibitor del GABA (Meises et al. 1983 y Yeh y Woodward 1983). Las interacciones de este tipo y como la que se susiere que puede ocurrir con la acetilcolina y el glutamato; aunque en un principio no sabemos mucho, pueden ser la base para empezar a explicar las bases químicas de la dinámica funcional del cerebelo. En un principio se mencionó que conocer cabalmente la función del cerebelo exige profundizar más no solamente en él, sino en el sistema nervioso en general; pues la función del cerebelo se da en el contexto fisiológico de todo el organismo, el que, a su vez, interacciona con el entorno ambiental. Suficiente razón para evitar de exceso al momento de especular.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Altman J. y Das G. (1970). Postnatal changes in the concentration and distribution of cholinesterase in the cerebellar cortex of rats. *Exptl Neurol*, 28: 11-34.
2. Altman J. (1972a). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J. Comp. Neurol*, 145: 352-398.
3. Altman J. (1972b). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: II. Phases in the maturation of Purkinje cells and the molecular layer. *J. Comp. Neurol*, 145: 399-464.
4. Altman J. (1972c). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: III. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neurol*, 145: 465-514.
5. Alvarez del Villar J. (1979). Anatomía comparada básica. Ed Trillas, México.
6. Andersen P. (1982). Cerebellar synaptic plasticity-putting theories to the test. *TINS*, 5: 324-325.
7. Anderson D. J. (1983). Acetylcholine receptor biosynthesis: from kinetics to molecular mechanism. *TINS*, 6: 169-171.
8. Anholt R. (1981). Reconstitution of acetylcholine receptors in model membranes. *TIBS*, 6: 288-291.
9. Aprison M. H., Takahashi R. y Folkerth T. L. (1964). Biochemistry of the avian central nervous system-I. The 5-hydroxytryptophan decarboxylase-monoamine oxidase and cholineacetylase-acetylcholinesterase systems in several discrete areas of the pigeon brain. *J. Neurochem*, 11: 341-350.
10. Asin K. E., Satoh K. y Fibiger H. C. (1984). Regional cerebellar choline acetyltransferase activity following peduncular lesions. *Exptl Brain Res*, 53: 370-373.

11. Barth F. & Ghondar N. S. (1983). Cellular localization of acetylcholinesterase in adult rat cerebellum determined by immunofluorescence. *Neurosci. Lett.* 39: 149-153.
12. Bess C., Sandoval M. E. & Feris A. (1984). Serotonin uptake and release from rat cerebellum In Vitro. *J. Neurosci. Res.* 12: 129-136.
13. Bernardi N., Assouad J. A., Dacke C. G. & Davidson N. (1984). Release of labelled taurine from the rat dorsal medulla and cerebellum in vivo. *Fluoresc. Arch.* 401: 193-197.
14. Bird G. J. & Ashkenian G. K. (1976). The cholinergic pharmacology of hippocampal pyramidal cells: a microiontophoretic study. *Neuropharmacol.* 15: 273-282.
15. Bloedel J. R., Ebner J. J. & Yu R-X. (1983). Increased responsiveness of Purkinje cells associated with climbing fiber inputs to neighboring neurons. *J. Neurophysiol.* 50: 220-239.
16. Bloom F. E., Hoffer B. J. & Siddins G. R. (1971). Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of rat cerebellum. I. Localization of the fibers and their synapses. *Brain Res.* 25: 501-521.
17. Brown W. J. & Palau S. L. (1972). Acetylcholinesterase activity in certain glomeruli and Golgi cells of the granular layer of the rat cerebellar cortex. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 137: 317-334.
18. Ruit A. M. & Silver A. (1973). Histochemistry of choline acetyltransferase: a critical analysis. *Brain Res.* 62: 509-516.
19. Butcher L. L. (1977). Recent advances in histochemical techniques for the study of central cholinergic mechanisms. In: D. J. Jenden, (ed.) *Cholinergic mechanisms and psychopharmacology. Advances in behavioral biology*, 24: 93-124.
20. Chujo T., Yamada Y. & Yamamoto C. (1975). Sensitivity of Purkinje cells dendrites to glutamic acid. *Exptl Brain Res.* 23: 293-300.

21. Cole A. L. & Nicoll R. A. (1984). The pharmacology of cholinergic excitatory receptors in hippocampal pyramidal cells. *Brain Res.* 305: 283-290.
22. Crawford J. M., Curtis D. R., Voorhoeve P. E. & Wilson V. J. (1963). Excitation of cerebellar neurones by acetylcholine. *Nature, Lond.* 200: 579-580.
23. Crepel F. & Dhanjal S. (1982). Cholinergic mechanisms and neurotransmission in the cerebellum of the rat. An In Vitro study. *Brain Res.* 244: 59-68.
24. Dale H. H., Feldberg W. & Vost M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J. Physiol.* 86: 353-380.
25. De Barry J., Vincendon G. & Gombos G. (1980). High affinity glutamate binding during postnatal development of rat cerebellum. *FEBS Lett.* 109: 175-179.
26. De Barry J., Landley, O. K., Vincendon G. & Gombos G. (1982). L-glutamate and L-glutamine uptake in adult rat cerebellum: an autoradiographic study. *Neuroscience.* 7: 1289-1297.
27. Desclin J. C. (1974). Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat. *Brain Res.* 77: 365-384.
28. Dobzhansky T., Ayala F. J., Stebbins G. L. & Valentine J. W. (1980). *Evolución*. Ediciones Océano, Barcelona.
29. Dodd J., Dinsledine R. & Kelly J. S. (1981). The excitatory action of acetylcholine on hippocampal neurones of the guinea-pig and rat maintained in vitro. *Brain Res.* 207: 109-127.
30. Buda J. B. (1975). The effect of septal nuclei stimulation on the release of acetylcholine from the rabbit hippocampus. *Brain res.* 82: 123-133.

31. Ebner FF, Yu G-Y, Alameddine J. R. (1983). Increase in Purkinje cell cells associated with axotomically activated climbing fiber input. *J. Neurophysiol*, 50: 205-219.
32. Eccles J. C., Ito M., & Szentesi J. (1967). *The cerebellum as a neuronal machine*. Springer: New York.
33. Eccles J. C. (1979). Introductory Remarks. In: J. Massieu and K. Gassner, (eds.) *Cerebro-cerebellar interactions*. *Developments in Neuroscience*, 6: 1-18.
34. Flint R. S., Rea M. A. & Mc Bride H. J. (1981). In Vitro release of endogenous amino acids from granule cell-, stellate cell-, and climbing fiber-deficient cerebella. *J. Neurochem*; 37: 1425-1430.
35. Fonnum F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem*; 24: 407-409.
36. Foster A. C. & Roberts P. J. (1980). Endogenous amino acid release from rat cerebellum In Vitro. *J. Neurochem*; 35: 517-519.
37. Gallo V., Levi G., Reiteri M. & Coletti A. (1981). Enhancement by GABA of glutamate depolarization-induced release from cerebellar nerve endings. *Brain Res*; 205: 433-435.
38. Garthwaite J. (1982). Excitatory amino acid receptors and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in incubated slices of immature and adult rat cerebellum. *Neuroscience*; 7: 2491-2497.
39. Goldberg A. M. & McCaman R. E. (1967). A quantitative microchemical study of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in the cerebellum of several species. *Life Sciences*; 6: 1493-1500.
40. Guzenot P., Lefrasne P., Rossier J., Beaudouan J-C. & Glowinski J. (1973). Effect of sodium, hemicholinium-3 and antiparkinson drugs on [¹⁴C]acetylcholine synthesis and [³H]choline uptake in rat striatal synaptosomes. *Brain Res*; 62: 523-529.

41. Hamburger A., Hanson H., & Sellstrom A. & Yamashiro T. (1975). Isolation of highly purified molecular complexes from rabbit cerebellum. *Experientia*, 15: 221-233.
42. Hamburger A., Nertson E., Sellstrom A. & Weiler U. F. (1976). Aminoacid transport in isolated neurons and glia. In: G. Levi, L. Ballistrin, & A. Lajtha (eds.) Transport phenomena in the nervous system.
43. Henn F. A. (1976). Neurotransmission and glial cells: a functional relationship? *J. Neurosci. Res.* 2: 271-282.
44. Hucho F. (1981). The nicotinic acetylcholine receptor. *TIBS*, 6: 242-245.
45. Ito M., Sakurai M. & Tansiroch P. (1982). Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* 324: 113-134.
46. Kandel E. R. & Schwartz J. H. (1981). Principles of neural science. Elsevier/North-Holland, New York, Amsterdam, Oxford.
47. Kakiuchi S. & Rall T. W. (1968). The influence of chemical agents on the accumulation of adenosine 3',5'-phosphate in slices of rabbit cerebellum. *Mol. Pharmacol.* 4: 367-378.
48. Kása P. & Silver A. (1969). The correlation between choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activity in different areas of the cerebellum of rat and Guinea pig. *J. Neurochem.* 16: 389-396.
49. Kása P., Bószászy K., Rakonczay Z. & Gulus K. (1982). Postnatal development of the acetylcholine system in different parts of the rat cerebellum. *J. Neurochem.* 39: 1726-1732.
50. Katsuki S., Matsuda T., Hata F. & Yoshida H. (1977). Increase in Ach release from the rat brain cortex slices by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate. *Japan. J. Pharmacol.* 27: 173-175.

51. Kostopoulos G. K., Lisscher J. J. & Phillis J. W. (1975). Action of various adenosine derivatives on cerebellar Purkinje cells. *Brain Res.* 98: 162-165.
52. Kuffler S. W. & Nicholls J. G. (1976). *From neuron to brain.* Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
53. Kuhar M. J. (1977). Characteristics and significance of sodium-dependent, high affinity choline uptake. In: D. J.enden (ed.) *Cholinergic mechanisms and psychopharmacology.* Advances in behavioral biology, 24: 447-456.
54. Kurisama K., Haber B., Siskin B. & Roberts E. (1966). The γ -aminobutyric acid system in the rabbit cerebellum. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA.)* 55: 946-952.
55. Levi G. & Gallo V. (1981). Glutamate as a putative transmitter in the cerebellum: stimulation by GABA of glutamic acid release from specific pools. *J. Neurochem.* 37: 22-31.
56. Levi G., Gordon R. D., Gallo V., Wilkin G. F. & Balazo E. (1982). Putative acidic amino acid transmitters in the cerebellum I. Depolarization-induced release. *Brain Res.* 239: 425-445.
57. Llinás R., Walton K. & Hillman D. E. (1975). Inferior olive: its role in motor learning. *Science.* 190: 1230-1231.
58. Llinás R. & Sugimori M. (1980a). Electrophysiological properties of In Vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol.* 305: 171-195.
59. Llinás R. & Sugimori M. (1980b). Electrophysiological properties of In Vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol.* 305: 197-213.
60. Llinás R. & Simson J. I. (1981). Cerebellar control of movement. *Handbook of Behavioral Neurobiology.* 5: 231-301.
61. Loewi O. (1921). On the humoral propagation of cardiac nerve action. *Pflügers Arch.* 189: 239-242.

51. Kosterschev G. N., Zimocher J. S. & Phillis J. W. (1973). Action of various adenine derivatives on cerebellar Purkinje cells. *Brain Res.* 98: 162-165.
52. Kuffler S. W. & Nicholls J. G. (1976). *From neuron to brain.* Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
53. Kuhar M. J. (1977). Characteristics and significance of sodium-dependent, high affinity choline uptake. In: D. J. Jenden (ed.) *Cholinergic mechanisms and psychopharmacology.* *Advances in behavioral biology* 24: 447-456.
54. Kurisako K., Haber R., Siskin B. & Roberts E. (1966). The β -aminobutyric acid system in the rabbit cerebellum. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA.)* 55: 846-852.
55. Levi G. & Gallo V. (1981). Glutamate as a putative transmitter in the cerebellum: stimulation by GABA of glutamic acid release from specific pools. *J. Neurochem.* 37: 22-31.
56. Levi G., Gordon R. D., Gallo V., Wilkin G. P. & Balazs R. (1982). Putative acidic amino acid transmitters in the cerebellum I. Depolarization-induced release. *Brain Res.* 239: 425-445.
57. Llinás R., Walton K. & Hillman D. E. (1975). Inferior olive: its role in motor learning. *Science*, 190: 1230-1231.
58. Llinás R. & Sudimori M. (1980a). Electrophysiological properties of In Vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol.* 305: 171-195.
59. Llinás R. & Sudimori M. (1980b). Electrophysiological properties of In Vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol.* 305: 197-213.
60. Llinás R. & Simson J. I. (1961). Cerebellar control of movement. *Handbook of Behavioral Neurobiology*, 5: 231-301.
61. Loewi O. (1921). On the humoral propagation of cardiac nerve action. *Pflügers Arch.* 189: 237-242.

62. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
63. Møler L., Collins M. & Mathieson W. B. (1981). The distribution of acetylcholinesterase and choline acetyl transferase in the cerebellum and posterior lateral line lobe of weakly electric fish (Gymnotidae). *Brain Res.* 226: 320-325.
64. Nee C. C., Guidotti A. & Costa E. (1975). Inhibition by diazepam of the tremor and the increase of cerebellar cGMP content elicited by harmaline. *Brain Res.* 83: 513-515.
65. Marchbanks R. M. & Kessler F. D. (1982). The independency of choline transport and acetylcholine synthesis. *J. Neurochem.* 39: 1424-1433.
66. Merchi M., Cavallia A., Paudice P. & Raiteri M. (1983). Calcium-dependent ³H-acetylcholine release and muscarinic autoreceptors in rat cortical synaptosomes during development. *Neurochem Res.* 8: 621-628.
67. Marr D. (1969). A theory of cerebellar cortex. *J. Physiol.* 202: 437-470.
68. McCance I. & Phillis J. W. (1968). Cholinergic mechanisms in the cerebellar cortex. *Int. J. Neuropharmacol.* 7: 447-462.
69. McDevitt C. J., Ebner T. J. & Bloedel J. R. (1982). The changes in Purkinje cell simple spike activity following spontaneous climbing fiber inputs. *Brain Res.* 237: 484-491.
70. Meyer Jr. E. M., Engel D. A. & Cooper J. R. (1982). Acetylation and phosphorylation of choline following high or low affinity uptake by rat cortical synaptosomes. *Neurochem Res.* 7: 749-759.
71. Miller F. R. (1938). The local action of aserine on the central nervous system. *J. Physiol.* 91: 212-221.

72. Morley W. G., McFarhana E. B., & Haxby J. J. (1983). Local muscarinic stimulation evoked local inhibitory processes in rat cerebellum. *Brain Res. Bull.* 17: 795-804.
73. Murrin L. C., DeHaven R. H., & Kuhar M. J. (1977). On the relationship between [³H]choline uptake activation and [³H]acetylcholine release. *J. Neurochem.* 29: 681-687.
74. Murrin L. C. (1980). High-affinity transport of choline in neuronal tissue. *Pharmacol.* 21: 132-140.
75. Nathanson N. M. (1982). Resolution and development of muscarinic acetylcholine receptors. *TINS.* 5: 401-404.
76. Patrick J., & Heinemann S. (1982). Outstanding problems in acetylcholine receptor structure and resolution. *TINS.* 6: 300-302.
77. Pearce E. R., Freedman E. G., & Dutton G. R. (1982). Autoreceptors modify the evoked release of [³H]GABA from cerebellar neurons in dissociated cell culture. *European J. Pharmacol.* 82: 131-135.
78. Pearson F., & Pearson L. (1976). The vertebrate brain. Academic Press: London; New York; San Francisco.
79. Pentreath V. W. (1982). Potassium signalling of metabolic interactions between neurons and glial cells. *TINS.* 5: 339-345.
80. Phillis J. W. (1965). Cholinergic mechanisms in the cerebellum. *Brit. Med. Bull.* 1965: 26-29.
81. Rainbow T. C., Parsons E., & Wiczorek M. (1984). Quantitative autoradiography of [³H]hemicholinium-3 binding sites in rat brain. *European J. Pharmacol.* 102: 195-196.
82. Rawson J. A., & Tilokkulchai K. (1982). Climbing fibre modification of cerebellar Purkinje cell responses to parallel fibre inputs. *Brain Res.* 237: 492-497.

83. Butler A., Field P. M. & Reisman B. (1979). Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. III. Postnatal development of binding of 3H-azoxylbenzylcholine esters. *Brain Res. Rev.* 1: 185-205.
84. Sandoval M. E. & Cutman C. W. (1978). Evaluation of glutamate as a neurotransmitter of cerebellar parallel fibers. *Neuroscience*, 3: 199-206.
85. Sandoval M. E. & Lore R. (1983). Propiedades generales de la transmisión sináptica. En: H. Pasantes & H. Archisa (comp.) *Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas*. Libro-homenaje al Dr. Guillermo Massieu. UNAM: 19-30.
86. Sandoval M. E., Turner C. A. & Medrano L. (1984). High affinity uptake and Ca^{++} -dependent release of glutamic acid in the developing cerebellum. *Neuroscience* 11: 867-875.
87. Sellinger G. Z., Ledin Z. & Ancurra J. M. (1972). A comparison of enzyme patterns in the granular and molecular layers of the rabbit cerebellar cortex. *Brain Res.* 42: 159-175.
88. Simpson J. & Smart L. (1982). Sodium-dependent choline binding in rat hippocampal synaptosomes. *European J. Pharmacol.* 80: 267-270.
89. Sorek H., Gurwitz B., Eliezer B. & Sokolovska M. (1982). Altered ontogenesis of muscarinic receptors in granular cerebellar cortex. *J. Neurochem.* 39: 756-763.
90. Thompson R. F. (1983). Neuronal substrates of simple associative learning: classical conditioning. *TINS*, 6: 270-275.
91. Trommer B. A., Schaidt B. E. & Mecker L. (1982). Exogenous choline enhances the synthesis of acetylcholine only under conditions of increased cholinergic neuronal activity. *J. Neurochem.* 39: 1704-1709.
92. Villegas J. (1981). Axon/Schwann-cell relationships in the giant nerve fibre of the squid. *J. exp. Biol.* 95: 135-151.

93. Wachtel K. (1980). The regional distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase, and acetylcholinesterase in vertebrate brains of different phylogenetic levels. In: S. Passafium, L. Lodinckx (eds.) Cholinergic mechanisms. Advances in behavioral biology, 25: 59-72.
94. Wainer B. H., Lovey A. I., Mufson E. J. & Mesulam M.-M. (1984). Cholinergic systems in mammalian brain identified with antibodies against choline acetyltransferase. Neurochem. Int, 6: 143-182.
95. Wiklund L., Tjssenburger G. & Cotman C. W. (1982). Aspartate: possible neurotransmitter in cerebellar climbing fibers. Science, 216: 78-80.
96. Woody C. D. (1977). If cyclic GMP is a neuronal second messenger what is the message? In: D. J. Jenden (ed.) Cholinergic mechanisms and psychopharmacology. Advances in behavioral biology, 24: 253-266.
97. Woody C. D., Swartz B. E. & Bruen E. (1978). Effects of acetylcholine and cyclic GMP on input resistance of cortical neurons in awake cats. Brain Res, 158: 373-395.
98. Woodward W. R., Blank N. K. & Seil F. J. (1982). Choline acetyltransferase activity in mouse cerebellar cultures. Brain Res, 241: 323-327.
99. Yamamoto T., Ichikawa M. & Tanaka C. (1977). Catecholaminergic terminals in the developing and adult rat cerebellum. Brain Res, 132: 355-361.
100. Yeh H. H. & Woodward D. J. (1983). Noreadrenergic action in the developing rat cerebellum: interaction between norepinephrine and γ -aminobutyric acid applied microiontophoretically to immature Purkinje cells. Dev. Brain Res, 10: 49-62.
101. Young G. B., Oster-Granite M. L., Harnden R. M. & Snider S. H. (1974). Glutamic acid: selective depletion by viral induced granule cell loss in hamster cerebellum. Brain Res, 73: 1-13.

Más luz !

Goethe