

00562
5
24

TESIS

EVALUACION DEL ACIDO GLUTAMICO COMO NEUROTRANSMISOR
EN EL CEREBELO DE LA RATA.

QUE PRESENTA EL ALUMNO: Carlos A. Torner Aguilar.

PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS.

ESPECIALIDAD: BIOQUIMICA.

FACULTAD DE QUIMICA

U. N. A. M.

1987

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

I. Introducción.	1
II. Antecedentes.	7
a) El ácido glutámico en el tejido nervioso.	7
1. Metabolismo.	7
2. Compartimentalización metabólica del ácido glutámico	13
b) El ácido glutámico como neurotransmisor.	
1. Criterios para la identificación de neurotransmisores.	15
2. Efecto del ácido glutámico sobre las células nerviosas.	19
3. Liberación del ácido glutámico del tejido nervioso.	22
4. Receptores para el ácido glutámico.	24
5. Eliminación del ácido glutámico del espacio sináptico.	28
6. Vías glutamatérgicas postuladas.	30
c) El cerebelo como modelo de estudio.	
1. Citarquitectura de la corteza del cerebelo.	34
2. Desarrollo del sistema de fibras paralelas.	42
3. El ácido glutámico en el cerebelo.	46
III. Objetivos de este trabajo.	48
IV. Material y Métodos.	
a) Material.	49
b) Experimentos de liberación de ácido glutámico.	
1. Preparación.	50
2. Perfusión.	51
3. Cálculos.	55
4. Controles.	56
c) Experimentos de captura de ácido glutámico.	
1. Preparación.	57
2. Captura de ácido glutámico en el desarrollo.	58
3. Cálculos.	60
4. Cinética de captura de ácido glutámico.	60

d) Experimentos de captura de glutamina.	
1. Preparación.	61
2. Purificación de la glutamina.	61
3. Captura de la glutamina en el desarrollo.	62
V. Resultados.	
a) Liberación de ácido glutámico en la corteza del cerebelo.	
1. Liberación de aminoácidos de la capa molecular del- cerebelo.	63
2. Liberación basal de ácido glutámico durante el - desarrollo.	64
3. Liberación dependiente de calcio de ácido glutámico - durante el desarrollo.	64
4. Liberación dependiente de calcio de GABA durante el - desarrollo.	65
5. Metabolismo del ácido glutámico.	65
b) Captura de ácido glutámico en el desarrollo.	
1. Captación de ácido glutámico en el cerebelo durante - el desarrollo.	70
2. Cinética de captura de ácido glutámico ¹⁴ C.	70
c) Captura de glutamina en el desarrollo.	74
VI. Discusión.	77
VII. Bibliografía.	85
ANEXO: Experimentos con tiofeno.	102

INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1.- Esquema de una circunvolución cerebelosa de mamífero.
- Figura 2.- Esquema de un corte coronal de la corteza del cerebelo de mamífero.
- Figura 3.- Células en estrella y células en canasta.
- Figura 4.- Esquema de maduración de una célula de Purkinje de rata y las conexiones sinápticas sobre la misma.
- Figura 5.- Desarrollo de las células granulares.
- Figura 6.- Sistema de perfusión.
- Figura 7.- Liberación de aminoácidos de homogenados de la capa molecular de cerebelos de ratas.
- Figura 8.- Línea basal de la liberación de ácido glutámico durante el desarrollo del cerebelo de la rata.
- Figura 9.- Liberación de ^{14}C ácido glutámico por despolarización en presencia de calcio.
- Figura 10.- Liberación de ^3H GABA por despolarización en presencia de calcio.
- Figura 11.- Captura dependiente de sodio de ^{14}C ácido glutámico en el cerebelo en desarrollo.
- Figura 12.- Gráfica doble recíproca de la captura de ^{14}C ácido glutámico.
- Figura 13.- Captura de glutamina en el tiempo.
- Figura 14.- Captura dependiente de sodio de ^3H glutamina en la capa molecular del cerebelo de ratas en desarrollo.

ABREVIATURAS.

APB .- 2-amino-4-fosfonobutirato.

APV .- 2-amino-5-fosfonovaleriato.

3-AP .- 3-acetilpiridina.

Ca⁺⁺ .- calcio iónico.

DAA .- D-alfa-aminoadipato.

EGTA .- Etilenglicol-bis- (beta-aminoetileter) N,N'-ácido
tetra acético.

GABA .- Acido gama-amino butírico.

GDEE .- Dietiléster del ácido glutámico.

Hepes .- N-2- hidroxietil piperazina-N'-2-etanol sulfonato.

Km .- Constante de Michaelis-Menten.

NMDA .- N-metil-D-aspartato.

Rf .- Coeficiente de reparto.

SDS .- Dodecil sulfato de sodio.

Tris .- (Trizma base) Tris (hidroximetil) amino metano.

RESUMEN

El ácido glutámico parece ser uno de los principales neurotransmisores excitadores del sistema nervioso central de los mamíferos. Debido a que el ácido glutámico tiene un amplio papel metabólico, ha sido difícil demostrar su función como neurotransmisor. Tratando de obtener evidencias que apoyen la función del ácido glutámico como neurotransmisor en una sinapsis específica, estudiamos la liberación del ácido glutámico en las sinapsis de las fibras paralelas de la corteza del cerebelo. El cerebelo como modelo de estudio, nos brinda una región con abundantes sinapsis probablemente glutamatérgicas que es la capa molecular, las fibras paralelas forman las sinapsis más numerosas del sistema nervioso y además, su desarrollo es postnatal, lo que permite estudiar el desarrollo de un sistema sináptico probablemente glutamatérgico.

Siguiendo el curso de la liberación del ácido glutámico durante el desarrollo del cerebelo, encontramos que la liberación dependiente de calcio de ácido glutámico correlaciona temporalmente con la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas en la capa molecular del cerebelo de la rata, lo que apoya la función del ácido glutámico como neurotransmisor en estas sinapsis.

La captura de ácido glutámico ha sido utilizada para identificar regiones en donde este aminoácido pudiera tener funciones de neurotransmisor. Sin embargo, en nuestros experimentos la captura de ácido glutámico de alta afinidad

no presentó correlación con la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas.

Por otra parte, la glutamina ha sido considerada como el precursor del ácido glutámico liberable como neurotransmisor. La captura de glutamina en homogenados de capa molecular de ratas, mostró un mecanismo independiente de la presencia de sodio y otro mecanismo que depende del sodio para la captura de glutamina. La aparición de las sinapsis de las fibras paralelas tiene correlación temporal con el surgimiento de la captura dependiente de sodio de glutamina, lo que sugiere que probablemente este mecanismo de captura se localice en las terminales sinápticas de las fibras paralelas.

Como anexo a este trabajo, se presentan experimentos de ratas tratadas con tiofeno, una substancia que debía lesionar a las células granulares y producir una disminución de las sinapsis de las fibras paralelas. En nuestros experimentos, el tiofeno no produjo ninguna lesión.

Summary.

"Evaluation of the glutamic acid as a neurotransmitter in the cerebellum of the rat".

Glutamic acid is probably the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system. However, this amino acid has not accomplished the criteria to be considered a neurotransmitter because of the complex metabolic functions that it is involved with. In order to obtain evidences to support the neurotransmitter function of glutamic acid in a defined synapse, we studied the calcium-dependent release of this amino acid from molecular layer homogenates of the cerebellum of the rat.

The molecular layer of the cerebellum contains the most abundant synapses of the nervous system: the parallel fiber's synapses. These synapses appear to release glutamic acid in a calcium-dependent manner and they have a useful characteristic: they emerge and develop after birth.

In our experiments, the calcium dependent glutamic acid release from molecular layer homogenates increases from 15 days old rats to adult animals, and these increments do correlate with the appearance of the parallel fiber's synapses. This supports the glutamic acid as the neurotransmitter of these synapses.

On the other hand, high affinity glutamic acid uptake has been used to define the neural areas where this amino acid could be neurotransmitter. In our experiments, high affinity glutamic acid uptake does not correlate with the appearance of the parallel fiber's synapses. This uptake seems to be correlated with glial cells.

Glutamine is the major precursor of the releaseable glutamic acid. Glutamine uptake by nervous tissue has been a topic of controveerse. In our experiments, glutamine uptake has two components: one which is sodium-dependent and the other is sodium independent. The sodium-dependent glutamine uptake correlates with the appearance of parallel fiber's synapses. This suggests that this uptake is related to these synapses.

I.- Introducción.

Los neurotransmisores son sustancias que participan en la comunicación celular en zonas especializadas de las neuronas denominadas sinapsis. Para la caracterización de una sustancia como neurotransmisor, esta debe de cumplir con una serie de requisitos anatómo-funcionales, los que han sido definidos conforme se ha avanzado en el conocimiento del funcionamiento de diversos neurotransmisores en sinapsis específicas. Estos requisitos comprenden: a) la presencia de la sustancia en las terminales sinápticas, b) un mecanismo de síntesis (en algunos casos se encuentra además un mecanismo para la reutilización) del probable transmisor en las terminales sinápticas, c) la estimulación tanto eléctrica como por agentes químicos del tejido nervioso, debe provocar la liberación de la sustancia en forma dependiente de la entrada de calcio en las terminales sinápticas, d) la aplicación en el tejido nervioso de la sustancia en cuestión , debe producir los mismos cambios electrofisiológicos en las neuronas postsinápticas que la estimulación de una vía nerviosa que utilice a esta sustancia como neurotransmisor, e) la aplicación de fármacos que bloquean el efecto de estimular una vía nerviosa, deben producir el mismo bloqueo de la respuesta de la aplicación del supuesto neurotransmisor directamente en el tejido nervioso, f) debe existir un mecanismo de eliminación del transmisor del espacio sináptico. Estos

requisitos para postular a una sustancia como neurotransmisor, se han definido como "criterios para la identificación de transmisores sinápticos" (Werman, 1966; Tapia, 1976; Orrego, 1978).

El ácido glutámico fue propuesto como neurotransmisor por Krnjevic en 1970. Se conoce su participación como neurotransmisor excitador en las sinapsis neuromusculares de organismos invertebrados (Usherwood, 1969; 1981). En el sistema nervioso central de mamíferos, cuando se aplica el ácido glutámico en la vecindad de neuronas sometidas a registros intracelulares, se produce un aumento en la frecuencia de disparo que perdura durante la aplicación del aminoácido (Curtis y cols., 1960a; 1960b; Krnjevic y Phillis, 1963); la excitación neuronal que produce la aplicación del ácido glutámico, ha sido relacionada con la actividad de algunas vías nerviosas (ver antecedentes). Además se ha demostrado la liberación dependiente de calcio de ácido glutámico de terminales nerviosas aisladas (Bradford, 1970; Bradford y cols., 1973) y de otras preparaciones tanto in vitro como in vivo (ver antecedentes). La síntesis del ácido glutámico liberable, se lleva a cabo en las terminales nerviosas teniendo como principal precursor a la glutamina (Bradford, 1978; Hamberger y cols., 1979a). También se ha descrito un mecanismo de eliminación del ácido glutámico del espacio sináptico mediante la captura de este por las células perisinápticas, este mecanismo es de alta afinidad similar a

los descritos para otros neurotransmisores (Logan y Snyder, 1972).

Sin embargo, la caracterización definitiva del ácido glutámico como neurotransmisor ha sido difícil por varias razones: la aplicación del ácido glutámico produce despolarización en todas las neuronas centrales en las que se ha estudiado (Krnjevic y Phillis, 1963) y ello condujo a proponer que su efecto excitador en el sistema nervioso fuera inespecífico (Curtis y Watkins, 1963), por otro lado, los fármacos antagonistas de esta excitación no son específicos (Watkins y Evans, 1981), probablemente debido a la multiplicidad de receptores que pudiera ocupar el ácido glutámico (Fagg, 1985). Además, el ácido glutámico es el aminoácido de mayor concentración y ubicuidad en el tejido nervioso y participa en una gran variedad de vías metabólicas, lo que complica aún más su caracterización como neurotransmisor. Por esto, y como lo indican los criterios de evaluación de neurotransmisores que hemos señalado, su participación como mensajero químico solo puede (y debe) ser demostrada en vías y sinapsis específicas.

Existen varios modelos para estudiar la posible función del ácido glutámico como neurotransmisor, de los cuales el cerebelo parece ser el más adecuado, debido a que contiene en una zona específica una gran cantidad de sinapsis en las que se ha propuesto que este aminoácido cumpla funciones de neurotransmisor: las sinapsis de las fibras paralelas (Sandoval y Cotman, 1978; De Barry y cols., 1982). Las

Y fibras paralelas (y sus sinapsis), se localizan en la capa molecular del cerebelo, estas constituyen los axones de las células granulares que tienen su soma en otra capa del cerebelo denominada granular. Estas células son las más abundantes del sistema nervioso de mamíferos por lo que en la capa molecular, se encuentran una gran cantidad de sinapsis de las fibras paralelas (Llinás y Simpson, 1981), lo que nos permite estudiar aisladamente a una región rica en posibles sinapsis glutamatérgicas.

Las evidencias que sugieren que el ácido glutámico puede ser el neurotransmisor en las sinapsis de las fibras paralelas son las siguientes: 1) el ácido glutámico produce un marcado aumento en la frecuencia de disparo de las células de Purkinje al ser aplicado en rebanadas de cerebelo (Chujo y cols., 1975), 2) esta sustancia es liberada de la capa molecular del cerebelo en forma dependiente de calcio (Sandoval y Cotman, 1978), y 3) existe un mecanismo de captura de alta afinidad para el ácido glutámico, que en experimentos con autorradiografía es más visible en la capa molecular (De Barry y cols., 1982).

En nuestro estudio, la estrategia para intentar reunir evidencia adicional e independiente que pudiera relacionar la actividad de las fibras paralelas con una transmisión glutamatérgica, se basa en las peculiaridades del desarrollo postnatal de la corteza del cerebelo (Ramón y Cajal, 1911). En la rata, las sinapsis de las fibras paralelas surgen entre los días 12 al 30 postnatales, alcanzando su mayor

velocidad de aparición entre los días 15 al 21; ninguna otra sinapsis tiene este patrón de aparición en la corteza del cerebelo (Altman, 1972a; 1972b; 1972c), lo que nos permite correlacionar la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas con el desarrollo de la liberación de sus neurotransmisores. Nuestros resultados indican que la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas ocurre al mismo tiempo que se incrementa la liberación dependiente de calcio de ácido glutámico en preparaciones de capa molecular del cerebelo de ratas en el desarrollo (Sandoval y cols., 1984).

Por otro lado, aunque la mayor afinidad de captura de ácido glutámico se localiza en las células gliales (Hosli y Hosli, 1978; Campbell y Shank, 1978), la captura de alta afinidad del ácido glutámico por la capa molecular se ha relacionado con la posibilidad de que esta sustancia actúe como neurotransmisor (Johnston, 1981).

En el presente trabajo estudiamos la captura de alta afinidad de ácido glutámico durante la maduración del cerebelo y encontramos que esta captura no estuvo correlacionada con la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas.

En la tercera parte de este trabajo, se estudió la captura de glutamina, la que parece ser el principal precursor del ácido glutámico que se libera en forma dependiente de calcio (Hamberger y cols., 1979a). Algunos autores han propuesto que la captura de glutamina por el

tejido nervioso se realiza por un mecanismo independiente de sodio (Benjamin y cols., 1980; Shank y Aprison, 1977). Sin embargo, otros autores proponen que en la captura de glutamina si existe un componente dependiente de sodio (Balcar y Johnston, 1975), el cual ha sido caracterizado en neuronas en cultivo aunque no en cultivos de células gliales (Ramaharobandro y cols., 1982).

Actualmente no hay evidencias claras que relacionen la captura de glutamina con las terminales nerviosas. Nosotros estudiamos esta captura en relación con la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas en la corteza del cerebelo, y encontramos que además de tener un componente dependiente de sodio, su existencia se relaciona con la aparición de dichas sinapsis (a diferencia de lo que ocurre con la captura del ácido glutámico). Con base en los resultados obtenidos, proponemos que existe un mecanismo de captura de la glutamina en las terminales sinápticas de las fibras paralelas.

II.- Antecedentes.

a) El ácido glutámico en el tejido nervioso.

1.- Metabolismo.

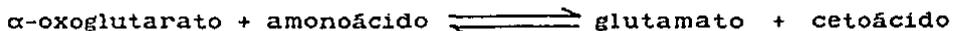
El ácido glutámico cumple con varias funciones en el metabolismo del tejido nervioso, como veremos a continuación:

El ácido glutámico no es transportado de la sangre hacia el tejido nervioso en cantidades apreciables, por lo que debe ser sintetizado en el tejido neural. El precursor principal en la síntesis de ácido glutámico es la glucosa, la producción de ácido glutámico a partir de glucosa [^{14}C], varía entre 30 a 80 % (Balazs y Haslam, 1965; Shank y Campbell, 1983), lo que indica la importancia del metabolismo de este aminoácido en el tejido nervioso.

La glucosa para poder ser transformada en ácido glutámico debe ser metabolizada hasta α -oxoglutarato (α -cetoglutarato) a través de las vías glucolítica y del ciclo de Krebs. Por otro lado, la lista de precursores que se convierten en ácido glutámico en el tejido nervioso, involucra a todas las moléculas que pudieran alimentar al ciclo de Krebs, como son: los ácidos pirúvico, láctico, aspártico, acético, propiónico, butírico, cítrico, y β -hidroxibutírico, además del glicerol, la leucina y otros substratos. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la fuente más importante de ácido glutámico es la glucosa.

La síntesis de ácido glutámico en el tejido nervioso a partir de α -oxoglutarato, se realiza por dos vías principales:

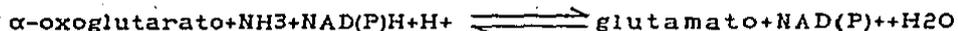
a) mediante la transaminación de los aminoácidos con el α -oxoglutarato, por la acción de la enzima aspartato amino transferasa (E.C. 2.6.1.1.); la reacción es la siguiente:



Esta reacción tiene una gran actividad en el tejido nervioso (Balazs y Haslam, 1965). La incubación de homogenados de corteza cerebral de ratas con ácido glutámico [^{14}C], produce una distribución homogénea de la marca entre el ácido glutámico y el α -cetoglutarato en poco tiempo (Balazs y Haslam, 1965). La velocidad a la cual se recambian el ácido glutámico con el α -oxoglutarato ha motivado que a esta distribución se le considere como un intercambio isotópico; la actividad de la aspartato amino transferasa es suficiente para explicar el equilibrio de la marca radioactiva (media transaminación), aunque no se excluye la participación de otro tipo de reacciones enzimáticas.

La participación del ácido glutámico en la transaminación catalizada por la aspartato amino transferasa, esta ligada al funcionamiento de la lanzadera aspartato-malato, la que transporta agentes reductores del citosol al interior de las mitocondrias (Dennis y Clark, 1977; Shank y Campbell, 1983).

b) Mediante la reacción de la glutamato deshidrogenasa (E.C. 1.4.1.3.), que conjuga moléculas de amoniaco con α -oxoglutarato, la reacción es la siguiente:



La síntesis de ácido glutámico por este mecanismo se encuentra en estudio, ya que la administración de amoniaco radioactivo in vivo en el cerebro de ratas, produce una incorporación de la marca radioactiva en las moléculas de glutamina mientras que se incorpora escasamente en el ácido glutámico (Cooper y cols., 1979). La reacción de la glutamato deshidrogenasa llega al equilibrio en concentraciones de ácido glutámico de 80 nmol/mg de proteínas, por lo que en condiciones fisiológicas la enzima pudiera favorecer más la degradación que la síntesis del ácido glutámico (Yu y cols., 1982).

De los precursores posibles del ácido glutámico, la glutamina es de gran importancia puesto que se tiene evidencia de que es el precursor del ácido glutámico que se libera de las terminales sinápticas (Hamberger y cols., 1979a; Bradford y cols., 1978). La glutamina es convertida en ácido glutámico por la acción de la enzima glutaminasa (glutamino amido hidrolasa, E.C. 3.5.1.2.), las mayores concentraciones de esta enzima se han encontrado en la fracción sinaptosomal de cerebro de ratas (Bradford y Ward, 1976). La glutamina se revisa más ampliamente en la sección siguiente (compartimentalización del metabolismo del ácido glutámico).

El ácido glutámico en la producción de energía.

El ácido glutámico se encuentra en recambio constante con el α -oxoglutarato (Balazs y Haslam, 1965) por lo que participa como alimentador del ciclo de Krebs; la incubación de homogenados de corteza cerebral con ácido glutámico [^{14}C] produce el desprendimiento de CO_2 -[^{14}C] en menos de 1 minuto (Balazs y Haslam, 1965). Por otro lado, la lanzadera malato-aspartato es el único transportador de protones que se ha demostrado en el tejido nervioso y está ligado a las fuentes de precursores de ácido glutámico y a su transporte en las mitocondrias: se han descrito transportadores antiport que intercambian glutamato por aspartato del interior de las mitocondrias al citosol (Brand y Chappel, 1974), además de que en mitocondrias aisladas de homogenados de cerebro se ha descrito una actividad rápida de captura de malato y de glutamato, además de que estas mitocondrias son capaces de liberar ácido aspártico y α -oxoglutarato (Dennis y Clark, 1977; Kerpel-Fronius y cols., 1977).

Incorporación a proteínas.

En hidrolizados de proteínas extraídas del cerebro, se ha encontrado que el ácido glutámico y la glutamina (es difícil impedir la interconversión de uno en otro) constituyen 8 a 10 % del total de los residuos de los aminoácidos, casi el doble de lo esperado (Minard y Richter, 1968; Wherret y Tower, 1971).

Los residuos de ácido glutámico son particularmente abundantes en proteínas asociadas a membranas, lo que contribuye a la carga negativa expresada por esas proteínas.

Participación del ácido glutámico en la regulación de la concentración de amoniaco en el tejido nervioso.

La concentración total de amoniaco en el tejido nervioso es de 0.2 a 0.3 m mol/kg de tejido húmedo; la concentración en el líquido cefalorraquídeo es de 0.006 a 0.02 m mol/l. La concentración de amoniaco en el tejido nervioso es la mayor de la economía interna de los mamíferos. El amoniaco es súmamente tóxico, la dosis letal 50 en ratones es de 6 m mol/kg (Kvamme, 1983).

La producción de amoniaco parece tener relación con la actividad nerviosa; el contenido de amoniaco en el cerebro disminuye con el período de sueño y con la anestesia y aumenta con la estimulación eléctrica del cerebro, la anoxia, la hipoglicemia y las crisis convulsivas (Kvamme, 1983).

Por otro lado, se ha reportado que el cerebro de monos captura aproximadamente 40 % del amoniaco de la sangre arterial (0.01 ml/l; Phelps y cols., 1981). El amoniaco principalmente se canalizará hacia la producción de glutamina; esta reacción es catalizada por la glutamino sintetasa. La incorporación de amoniaco radioactivo es mucho mayor en el grupo amida de la glutamina que en su grupo amino (Cooper y cols., 1979; Kvamme, 1983). La glutamina es

transportada por vía sanguínea del tejido nervioso al hígado y los riñones para eliminar el amoniaco en forma de urea.

El ácido glutámico como precursor del neurotransmisor GABA

El ácido glutámico ha sido postulado como precursor del GABA (Baxter, 1970; Tapia y González, 1978) aunque algo del GABA pudiera ser sintetizado a partir de putresina (Seiler y Elchentopf, 1975). La enzima que sintetiza al GABA a partir de glutamato es la glutamato descarboxilasa (GAD; Tapia, 1983). Por estudios de inmunocitoquímica se ha visto que esta enzima se encuentra localizada en las neuronas GABAérgicas de manera exclusiva (Barber y cols., 1978).

La glutamato descarboxilasa parece ser el paso limitante en la síntesis de GABA; esta enzima utiliza como cofactor al fosfato de piridoxal, el que parece tener un papel fundamental en la regulación de la GAD; la disminución farmacológica de los niveles de fosfato de piridoxal produce una menor actividad de la enzima que se revierte mediante la aplicación del cofactor.

El GABA es metabolizado mediante la enzima GABA transaminasa, la cual transfiere el grupo amino del GABA al α -oxoglutarato para producir ácido glutámico y semialdehído succínico; este último será oxidado hasta ácido succínico mediante la deshidrogenasa del semialdehído succínico. La transaminasa del GABA también depende del fosfato de piridoxal, pero a diferencia de la GAD, la coenzima se encuentra fuertemente unida a la enzima por lo que la

disminución de los niveles de fosfato de piridoxal no afectan la actividad de esta enzima.

Participación del ácido glutámico en el balance osmótico y aniónico.

La concentración de ácido glutámico en el tejido nervioso es de 8 a 10 m mol/l, por lo que contribuye con 2 a 5 % de la osmolaridad total intracelular y 4 a 10 % de los aniones intracelulares. Si tomamos en cuenta que la carga negativa de las proteínas es debida a los radicales carboxilo de los ácidos glutámico y aspártico, la contribución a la carga aniónica intracelular del glutamato debe ser aún mayor (Shank y Campbell, 1983).

2.- Compartimentalización metabólica del ácido glutámico.

La administración de ácido glutámico radioactivo en el cerebro de ratas in vivo, produce la incorporación de la marca principalmente en las moléculas de glutamina (Van der Berg y cols., 1969). Sin embargo, la administración en el tejido nervioso de glucosa [^{14}C] produce la incorporación de la marca en las moléculas de ácido glutámico (Van der Berg y cols., 1969). Los precursores que se van a incorporar en las moléculas de ácido glutámico son: la glucosa, el glicerol, el lactato, y el β -hidroxibutirato; mientras que los precursores de la glutamina son: el acetato, el propionato, el butirato, la leucina, el α -amino butirato, el aspartato, la prolina, y el citrato (Van der Berg y cols., 1969; Van der Berg y cols., 1976; Tapia, 1980).

Por estos datos se ha propuesto que el metabolismo del ácido glutámico se encuentra compartimentalizado en dos pozas que pudieran corresponder a dos modalidades del ciclo de Krebs, y probablemente a dos tipos celulares distintos del tejido nervioso. Por otro lado, mediante estudios de sedimentación diferencial de homogenados de cerebros de rata, se ha encontrado que la población de mitocondrias del sistema nervioso se distribuyen en varias subpoblaciones, lo que está de acuerdo con la idea de compartimentalización tanto del ácido glutámico como del ciclo de Krebs en el sistema nervioso (Van der Berg y cols., 1976; Tapia, 1980).

Las enzimas que toman parte en el metabolismo del ácido glutámico también presentan una distribución que favorece la idea de la compartimentalización. La glutamino sintetasa, que sintetiza glutamina a partir de glutamato y amoníaco, se expresa de manera selectiva en los astrocitos cultivados, aunque en los somas neuronales también pueda existir (Dennis y cols., 1980; Lacoste y cols., 1982; Patel y cols., 1983a y 1983b). Por otro lado, la forma activada por fosfato (y otros iones, entre ellos el calcio) de la enzima glutaminasa, se encuentra fundamentalmente en el tejido nervioso y ha sido relacionada con las terminales sinápticas (Bradford y Ward, 1976; Kvamme y Olsen, 1981; Altschuler y cols., 1984) aunque también se encuentra presente en astrocitos cultivados de cerebro de ratón (Kvamme y cols., 1982). Estos datos, relacionan a la poza grande del ácido glutámico con las neuronas, y a la poza pequeña de ácido

glutámico y de glutamina con las células gliales (Hamberger y cols., 1979b). Se ha propuesto que el ácido glutámico liberado por las terminales nerviosas es capturado por los astrocitos, en donde va a ser convertido en glutamina, en esta forma, puede viajar de regreso a las terminales nerviosas para ser convertido en ácido glutámico y tener la probabilidad de ser utilizado como neurotransmisor.

Los datos que apoyan a esta hipótesis son:

- a) las células gliales son las que tienen la mayor afinidad para la captura de ácido glutámico (Hosli y Hosli, 1978).
- b) La presencia de la enzima glutamino sintetasa en las células gliales (Dennis y cols., 1980; Lacoste y cols., 1982).
- c) la captura de glutamina en forma dependiente de sodio por sinaptosomas de cerebro (Balcar y Johnston, 1975).
- d) La presencia en las terminales nerviosas de la enzima glutaminasa (Bradford y Ward, 1976; Kvamme y Olsen, 1981).

b) El ácido glutámico como neurotransmisor.

1.- Criterios para la identificación de neurotransmisores.

Los neurotransmisores son sustancias que participan en la comunicación neuronal, sirviendo de mensajeros químicos entre dos neuronas o entre una neurona y una célula muscular, glandular o receptora, en tipos especializados de contacto intercelular que se denominan sinapsis.

Para definir a una sustancia como neurotransmisor, se han establecido una serie de requisitos que la sustancia

debe cumplir experimentalmente en una sinapsis específica. Estos requisitos han sido derivados fundamentalmente del conocimiento que se ha adquirido del funcionamiento de los transmisores en las sinapsis del sistema nervioso periférico, y se han denominado "criterios para definir a un neurotransmisor en el sistema nervioso central" (Werman, 1966). Al postular estos criterios, se pretendía inicialmente discriminar entre las múltiples sustancias que se conocía que eran capaces de modificar la actividad del sistema nervioso, de las que fueran utilizadas de manera fisiológica en la transmisión sináptica (Werman, 1966).

El objetivo de estos criterios implica que para definir a una sustancia como neurotransmisor, se requiere demostrar que su acción sobre la célula postsináptica es idéntica a la acción sináptica en todos los aspectos; que dicha sustancia es liberada en cantidades adecuadas durante la actividad de las terminales nerviosas presinápticas, y que el efecto de tal sustancia en la sinapsis es afectado por agentes farmacológicos de igual manera que la actividad sináptica inducida por el neurotransmisor específico (Krnjevic, 1974).

Los criterios originales propuestos por Werman, (1966) han sido modificados. A continuación, presento una recopilación de diversas proposiciones de varios autores:

1.- "Criterio de la presencia del transmisor". Este criterio en un sentido lógico, sugiere que solamente puede ser neurotransmisor una sustancia que se encuentre dentro de las neuronas que la utilicen como tal. Existen un gran

número de sustancias que modifican la actividad neuronal y que no son componentes normales del sistema nervioso, por lo que el efecto de estas sustancias es farmacológico y no pueden ser identificadas como neurotransmisores (Tapia, 1976). Los métodos que más se utilizan para satisfacer este criterio son: la medición directa del transmisor en sinaptosomas, la autorradiografía, la histoquímica, y la inmunocitoquímica. Mediante estas últimas técnicas podemos constatar la presencia del supuesto transmisor en el interior de las neuronas.

2.- "Criterio de la enzima sintetizadora del transmisor". Este criterio requiere de la demostración de la existencia de una vía para la síntesis de la sustancia en cuestión, dentro de las neuronas. En algunos casos, también se requiere que exista un sistema de transporte del transmisor hacia el interior de las terminales sinápticas. Estos mecanismos deben asegurar la posibilidad de liberar al neurotransmisor cuando sea requerido.

3.- "Criterio de la colección del transmisor". Al estimular tanto farmacológica como eléctricamente al tejido nervioso, la sustancia transmisora debe ser liberada hacia el fluido extracelular y este ser colectado de la región de las sinapsis estimuladas. La liberación del transmisor debe ser proporcional a la magnitud de la estimulación; la liberación, además, debe ser dependiente de la entrada de calcio en las terminales sinápticas (Miledi, 1973).

4.- "Criterio de la identidad de acción". Se refiere a que la aplicación del supuesto neurotransmisor debe producir cambios bioeléctricos en la célula o en la membrana postsinápticas, registrados por microelectrodos. Estos cambios deben ser iguales a los producidos por la estimulación eléctrica de una vía aferente a las neuronas, que utiliza supuestamente a la sustancia en cuestión como neurotransmisor.

5.- "Criterio de la identidad farmacológica". La aplicación de agentes farmacológicos que interfieren con la unión del neurotransmisor y el receptor postsináptico, deben inhibir la respuesta de la célula postsináptica tanto cuando se estimula una vía nerviosa aferente como cuando se aplica la sustancia en cuestión directamente en el tejido nervioso. La medición de los cambios en la respuesta postsináptica se efectúa con los mismos parámetros del criterio de identidad de acción.

6.- "Criterio del mecanismo de inactivación". Debe demostrarse la existencia de un mecanismo de eliminación o inactivación del neurotransmisor en el espacio sináptico.

7.- "Criterio de la distribución diferencial". La sustancia en estudio debe encontrarse en diferentes concentraciones en distintas regiones cerebrales. La mayor concentración de una sustancia en sinaptosomas o en una región cerebral, sugiere que esta sustancia pudiera participar en la comunicación celular en esa región (Orrego, 1978).

La demostración de que el ácido glutámico puede actuar como neurotransmisor, presenta algunas dificultades de difícil solución. El ácido glutámico se encuentra presente en el interior de todas las células; en todas ellas se encuentran también los mecanismos para su síntesis, y en todas las regiones cerebrales se han encontrado mecanismos para la captura de este aminoácido. Las características del metabolismo del ácido glutámico en el tejido nervioso, hacen que los criterios de la presencia del transmisor y de la enzima sintetizadora no sean de utilidad para definirlo como neurotransmisor. El criterio de la inactivación del transmisor, que en el caso del ácido glutámico se realiza por la captura de alta afinidad, debe ser manejado con cautela como veremos en la sección 5 de este inciso.

En las secciones siguientes, se presentan una serie de evidencias que apoyan la probabilidad la posibilidad de que el ácido glutámico sea uno de los principales neurotransmisores excitadores del sistema nervioso central.

2.- Efecto del ácido glutámico sobre las células nerviosas.

El efecto de la aplicación del ácido glutámico en la vecindad de las neuronas fué estudiado inicialmente mediante técnicas de microiontoforesis y registro electrofisiológico simultáneos, utilizando preparaciones de médula espinal de gatos. Se encontró que la aplicación de los ácidos glutámico, aspártico, cisteico y homocisteico, producían una despolarización intensa, que desaparecía en milisegundos al

término de la aplicación de cualquiera de los aminoácidos (Curtis y cols., 1960a; Curtis y Watkins, 1960b; Krnjevic y Phillis, 1963).

Inicialmente, el ácido glutámico no fué postulado como neurotransmisor debido a que la despolarización que producía su aplicación era igual a la producida por los ácidos aspártico, cisteico y homocisteico, además de que tanto las formas D como L de estos aminoácidos eran capaces de producir despolarización. El mecanismo de eliminación de los neurotransmisores que se proponía en aquel entonces era la degradación enzimática (similar a la degradación de la acetilcolina por la colinesterasa; Krnjevic y Phillis, 1963; Curtis y cols., 1972), y los D-aminoácidos no pueden ser degradados enzimáticamente, por lo que se propuso que estas sustancias fueran agentes que despolarizaban de manera inespecífica a las neuronas (Curtis y Watkins, 1963).

La despolarización inespecífica producida por el ácido glutámico, se relacionó con la apertura de los canales de sodio sensibles a voltaje. Sin embargo, se encontró que la tetrodotoxina, que bloquea estos canales, no eliminaba el efecto excitatorio que se producía por la aplicación del ácido homocisteico en la médula espinal del gato (Curtis y cols., 1972). Otro mecanismo que se propuso para explicar la despolarización inespecífica inducida por el ácido glutámico, fué el de que la captura del ácido glutámico por las neuronas acarrea iones de sodio; esta posibilidad fué descartada al conocerse que el efecto excitador de la

aplicación de ácido glutámico en la médula espinal de gatos aumentaba en presencia de inhibidores de la captura de ácido glutámico (Curtis y cols., 1970); por otro lado, los análogos del ácido glutámico que no son capturados por el tejido nervioso como son los ácidos quisquálico y kaínico, producían despolarización con mayor potencia y duración que el ácido glutámico (Curtis, 1979).

El ácido glutámico fué propuesto como neurotransmisor por Krnjevic hasta 1970. La evidencia experimental que dió motivo a esta proposición, fué que las neuronas de ganglios espinales no eran excitadas por el ácido glutámico, lo que sugirió que la sensibilidad al ácido glutámico dependía de contactos sinápticos (Krnjevic, 1970). Por otro lado, ya se había propuesto como mecanismo de eliminación de algunos transmisores su captura por las células que circundan a las sinapsis, como es en el caso del ácido glutámico, y se iniciaban los experimentos que mostraban la liberación neural del aminoácido (Katz y cols., 1969; Krnjevic, 1970).

El mecanismo iónico de la despolarización que produce el ácido glutámico es consistente con un incremento en la permeabilidad membranal a los iones de sodio y de potasio (Curtis, 1979), donde la participación de los iones de sodio es la más importante; la despolarización producida por la aplicación de ácido glutámico en neuronas en cultivo, es abolida al reemplazar al sodio por colina en el medio (Curtis, 1979).

3.- Liberación del ácido glutámico por el tejido nervioso.

Experimentos *in vitro*:

En sinaptosomas de cerebro de rata, tanto la estimulación eléctrica de estos elementos, como la inducida por potasio (56 mM), produjeron un incremento selectivo en la liberación de los ácidos glutámico, aspártico y γ -amino butírico (Bradford, 1970; De Belleruche y Bradford, 1972), no se encontró en estos experimentos liberación de glicina ni de alanina. Cuando se omitió el calcio del medio en el que se encuentra la preparación, se observó una menor liberación de los aminoácidos mencionados (De Belleruche y Bradford, 1972).

La estimulación eléctrica de rebanadas de cerebro de ratas, aumentó la liberación de GABA, ácido glutámico, lisina, leucina, y taurina, aunque en este tipo de estimulación, la ausencia de calcio en el medio no disminuyó la liberación de estos aminoácidos (Katz, Chase y Kopin, 1969; Hammerstad y Cutler, 1972). La estimulación de diversas preparaciones de tejido nervioso provenientes de varias regiones del cerebro, provocaba la liberación de ácido glutámico, y tal efecto era dependiente de la presencia de calcio en el medio. En presencia de concentraciones elevadas de potasio, se ha producido liberación de ácido glutámico en la corteza cerebral (Mulder y Snyder, 1974), en la corteza olfatoria (Bradford y Richards, 1976; Yamamoto y Matsui, 1976), en el hipocampo (Nadler y cols., 1977; Hamberger y cols., 1978), en el

cerebelo (Sandoval y Cotman, 1978; Foster y Roberts, 1980), y en la médula espinal (Mulder y Snyder, 1974). Por otra parte, también se ha conseguido provocar la liberación dependiente de calcio de GABA y de ácido glutámico mediante la estimulación eléctrica de raíces dorsales aisladas de ratas adultas (Roberts, 1974). Estos efectos no han sido explicados y por no haber sinapsis en la preparación, ha hecho pensar que la liberación de los aminoácidos podía ser de origen glial.

Experimentos *in vivo*:

La liberación espontánea de ácido glutámico de la corteza cerebral, hacia una cámara de perfusión implantada en la superficie de la corteza cerebral de gatos, aumentaba cuando el cerebro del animal muestra un patrón electroencefalográfico de animal despierto, mientras que en el animal dormido, la liberación de ácido glutámico disminuía (Jasper, y cols., 1965). La estimulación eléctrica de la corteza visual mediante electrodos colocados en el sitio de la perfusión, produjo un aumento significativo en la liberación de GABA, ácido glutámico y taurina, mientras que la colocación de los electrodos en el hemisferio contralateral o fuera del sitio de la perfusión (1 mm), la estimulación produjo un incremento en la liberación de GABA y taurina, y una disminución en la liberación de ácido glutámico (Clark y Collins, 1975).

En perfusiones de la corteza sensoriomotora de ratas anestesiadas, la estimulación del plexo braquial produjo un

aumento tanto de la liberación de ácido glutámico como de glutamina en la corteza contralateral, mientras que en la corteza ipsilateral no se produjeron cambios (Abdul-Ghani y cols., 1979). La inducción de convulsiones por la aplicación de cobalto o níquel en la corteza cerebral de gatos, provocó la liberación de ácido glutámico hacia perfusados del propio tejido. Esta liberación correlacionaba con la actividad convulsiva máxima (Dodd y Bradford, 1976).

En la médula espinal, la estimulación eléctrica de los tractos espinales descendentes produjo un aumento de la liberación de ácido glutámico y de glicina hacia un medio de lavado de la preparación (Fagg y cols., 1978).

4.- *Receptores del ácido glutámico.*

La existencia de receptores para los aminoácidos excitadores, fué postulada a partir de experimentos farmacológicos realizados en preparaciones de médula espinal de gatos y mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas. Los receptores que han sido descritos son de tres tipos y su nombre se deriva de acuerdo a los agonistas sintéticos que se emplearon para estudiarlos; estos son:

- 1) Receptores al n-metil-D-aspartato (NMDA).
- 2) Receptores al ácido quisquálico.
- 3) Receptores al ácido kaínico.

El NMDA es un análogo estructural de la molécula de ácido aspártico, mientras que los ácidos quisquálico y

Kaínico son análogos de la molécula de ácido glutámico. Debido a esto, los receptores NMDA se consideran ácido aspártico preferentes mientras que los receptores a los ácidos quisquálico y kaínico son considerados ácido glutámico preferentes. Esta diferencia se debe fundamentalmente al tamaño de las moléculas respectivas. Por otra parte, aunque los ácidos glutámico, aspártico, cisteico y homocisteico pueden estimular a cualquiera de los receptores mencionados, ello ocurre con diferente potencia.

Los receptores al NMDA han sido relativamente fáciles de estudiar; tienen la característica de ser sensibles a concentraciones bajas de magnesio, lo que produce respuestas de menor magnitud a la aplicación de NMDA en preparaciones de médula espinal de rana (Evans y cols., 1977) y de médula espinal de gato (Davies y Watkins, 1977). En contraste, la excitación producida por la aplicación de los ácidos glutámico, quisquálico o kaínico en ambas preparaciones, no varía al disminuir las concentraciones de magnesio en el medio.

De los antagonistas que se han encontrado para los receptores NMDA, el ácido 2-amino-5-fosfonovalérico (APV) es el antagonista más específico para bloquear la respuesta a la aplicación tanto de NMDA o de ácido aspártico en el tejido (Watkins y cols., 1977; Watkins y Evans, 1981). A través de este último antagonista, se ha estudiado también la participación de los receptores NMDA en el hipocampo y en fenómenos de toxicidad celular (Fagg, 1985).

Los receptores a los ácidos quisquálico y kaínico son sensibles a la aplicación de ácido glutámico; la diferencia entre ambos se ha estudiado en preparaciones de médula espinal de gatos, en donde el antagonista dietilester del ácido glutámico (GDEE) deprime las respuestas neuronales provocadas por la aplicación de ácido quisquálico sin afectar las respuestas de la aplicación del ácido kaínico (Davies y Watkins, 1979). Por otro lado, en la misma preparación, el dipéptido gamma-D-glutamil glicina antagoniza a las respuestas de la aplicación de NMDA y de ácido kaínico mientras que las respuestas de la aplicación de ácido quisquálico no se modifican (Davies y Watkins, 1980).

En la médula espinal, la respuesta provocada por el ácido glutámico es más sensible a los antagonistas del NMDA (Evans y cols., 1978; Watkins y cols., 1980), mientras que las respuestas a la aplicación del ácido glutámico son más sensibles a la aplicación de GDEE (Mc Lennan y Lodge, 1979), lo que relaciona funcionalmente (aparte del tamaño molecular) al ácido aspártico con el receptor NMDA y al ácido glutámico con el receptor al ácido quisquálico. El ácido glutámico es también un buen agonista del receptor al ácido kaínico, mientras que el ácido aspártico es un débil agonista de este receptor (Watkins y Evans, 1981).

Estudios de unión del ácido glutámico y sus análogos al receptor.

Foster y Roberts (1978) encontraron que la unión del ácido glutámico [^3H] a preparaciones de membranas de cerebelo de ratas, fué óptima a un pH de 7.4 y una temperatura de 37°C. Esta unión fué específica y ocurrió en un sitio único de alta afinidad. Las constantes cinéticas que encontraron fueron: K_D de 744 nM con capacidad de 73 p mol/mg de proteínas. Dicha unión fué desplazada por los ácidos L-glutámico, D,L-iboténico y D,L-quisquálico, y en menor grado por el ácido kainico.

En otros estudios, Michaelis y cols. (1981) encontraron una unión de alta afinidad del ácido glutámico a sinaptosomas purificados de cerebro de ratas, con K_D de 0.2×10^{-6} M. Cuando se estudió la unión de ácido glutámico [^3H] a membranas sinaptosomales purificadas, se encontraron dos sitios de unión con distinta afinidad; el sitio de alta afinidad tuvo una K_D de 60 a 70 nM mientras que el sitio de baja afinidad mostró una K_D de 208 a 295 nM (Michaelis y cols., 1981). Sarif y Roberts (1984) utilizando membranas sinaptosomales de cerebelo de ratas, encontraron constantes de unión de ácido glutámico [^3H] con K_D de 433 nM, que sufrieron modificaciones con la congelación y liofilización de las membranas hasta valores de K_D de 208 nM.

La unión de ácido glutámico [^3H] a membranas aisladas de sinaptosomas de corteza cerebral de ratas (Michaelis y cols., 1981), alcanzó el equilibrio a los 40 - 60 segundos a 37 °C; mientras que el desplazamiento de este aminoácido por un exceso de ácido glutámico frío, alcanzó la mayor

parte a los 45 segundos, aunque una parte del ácido glutámico [3H] permaneció unido durante varios minutos (Michaelis y cols., 1981).

Las constantes temporales reportadas son:

K asociación = 0.379 min⁻¹

K disociación = 0.209 min⁻¹

Aislamiento del receptor.

El receptor al ácido glutámico fué aislado por el grupo de Michaelis (1981) mediante la solubilización de las proteínas de las membranas sinápticas con Tritón X-100. El extracto solubilizado se sometió a dos columnas de cromatografía de afinidad, la primera con fibra de vidrio - ácido glutámico y la subsecuente con sefarosa - concanavalina A. Se aisló una glucoproteína con alta afinidad por la unión de ácido glutámico, y no era desplazado por el NMDA ni por el ácido kaínico (Michaelis, 1981). El peso molecular medido por electroforesis en gel en presencia de SDS fué de 13,800. Se encontró que la glucoproteína así obtenida, tiende a formar agregados y que se trata de una metaloproteína conjugada con hierro.

Cabe mencionar que ningún otro grupo ha reportado la purificación del receptor para el ácido glutámico, por lo que estos resultados están en espera de ser confirmados.

5.- Eliminación del ácido glutámico del espacio sináptico.

El mecanismo que se ha encontrado para la eliminación del ácido glutámico del espacio sináptico, consiste en la captura de este aminoácido por las terminales sinápticas y por las células que rodean al espacio sináptico. El mecanismo de captura es de alta afinidad (descrito por primera vez por Logan y Snyder, 1972), y depende de la temperatura, la energía y el sodio extracelular (Bennett y cols., 1972; Balcar y Johnston, 1972).

Las constantes de afinidad fueron medidas en rebanadas de corteza cerebral y en sinaptosomas de cerebro de ratas, y produjeron valores de $K_m = 20 \mu M$ aproximadamente (Logan y Snyder, 1972; Roskoski, 1979). En preparaciones de sinaptosomas de cerebelo de ratón, la K_m para la captura de ácido glutámico fue de $3 \mu M$ (Campbell y Shank, 1978).

La captura de alta afinidad de ácido glutámico es realizada por un transportador inespecífico, el cual captura indistintamente a los ácidos L-glutámico, D y L aspártico (Davies y Johnston, 1976). Los ácidos D-glutámico y L-homocisteico son capturados mediante un mecanismo de baja afinidad ($K_m = 500 \mu M$; Benjamin y cols., 1980).

En sinaptosomas de cerebro de ratón, utilizando sodio radioactivo, se encontró que la captura de una molécula de ácido glutámico se lleva a cabo conjuntamente con 2 iones de sodio; la presencia de tetrodotoxina no afecta a esta captura de sodio (Stallcup y cols., 1979).

Se conocen varios inhibidores de la captura de ácido glutámico, los más potentes son los isómeros D y L del ácido

treo-3-hidroxiaspártico (Balcar y cols., 1977). Otros inhibidores son el etanol (Roach y cols., 1973), la cloropromazina, el ácido p-cloromercurifenil-sulfónico (Balcar y Johnston, 1972a y 1972b) y el ácido fólico (Roberts y Watkins, 1975). La administración de inhibidores de la captura de ácido glutámico ha producido una potenciación de la excitación que provoca la aplicación iontoforética de este aminoácido en diferentes preparaciones (Curtis y cols., 1970; Haldeman y Mc Lennan, 1973; Lodge, 1979).

6.- *Vías glutamatérgicas postuladas.*

La evidencia a favor del ácido glutámico como neurotransmisor en el sistema nervioso central, ha sido parcial e incompleta, aunque existen algunos resultados interesantes. En seguida revisaremos algunas vías que se han propuesto como glutamatérgicas.

Ya en la sección sobre liberación de ácido glutámico por el tejido nervioso (sección II, b, 3) revisamos la evidencia que muestra que este aminoácido es liberado en la corteza cerebral durante la actividad neural. Asimismo, mediante la utilización de la técnica de autorradiografía, se ha encontrado que las zonas de la corteza que capturaron [^3H]-D-aspartato fueron las capas I, V y VI de la corteza cerebral, además, en la capa IV la marca radioactiva fué capturada en sitios relacionados con las terminales provenientes de otras áreas de la corteza (vías cortico-

corticales), lo cual determina que la autorradiografía muestre una distribución columnar (Fonnum y cols., 1981; Fonnum y Malthé-Sorensen, 1981).

En la corteza olfatoria, se ha encontrado gran actividad de captura de D-aspartato en la parte profunda de la capa plexiforme, de la que se tiene evidencia de que es la que recibe los impulsos corticales (Fonnum y Malthé-Sorensen, 1981).

Las vías eferentes de la corteza cerebral se han relacionado con la actividad glutamatérgica. Así, la ablación de la corteza disminuyó la actividad de captura tanto de D-aspartato como L-glutamato radioactivos en el tubérculo olfatorio (Fonnum y Malthé-Sorensen, 1981), en el cuerpo estriado ipsilateral a la ablación de la corteza (Divac, 1977; Beckstead, 1979; Fonnum y cols., 1981), en el tálamo, donde además se acompañaba de una disminución significativa de la concentración del ácido glutámico endógeno (Fonnum y Malthé-Sorensen, 1981) y en el cuerpo geniculado (Lund-Karlsen y Fonnum, 1978).

En otros experimentos que apoyan al ácido glutámico como el transmisor de las vías corticofugas, se encontró que la respuesta de las células del cuerpo estriado al estimular la corteza cerebral, era bloqueada mediante la aplicación del dietil ester del ácido glutámico (Spencer, 1976). Además, la estimulación de rebanadas de cuerpo estriado con soluciones despolarizantes de potasio produce

una liberación de ácido glutámico endógeno (Rowlands y Roberts, 1980; Reubi y Cuenod, 1979).

En el hipocampo, se ha demostrado la liberación de ácido glutámico endógeno inducida por despolarización (Hamberger y cols., 1978), y además se han encontrado sitios de captura para los ácidos L-glutámico, D y L aspártico en las zonas del área dentada en donde llegan las terminales de la vía perforante (Storm-Mathisen e Iversen, 1979). En rebanadas de hipocampo mediante autorradiografía, se ha encontrado que la mayoría de la radioactividad es capturada por las terminales sinápticas de la vía perforante, y la sección de esta, produjo una disminución de la captura de L-glutamato medida tanto bioquímica como histoquímicamente (Storm-Mathisen, 1977).

En estudios farmacológicos, se encontró que la excitación de las células granulares, tanto por la estimulación de la vía perforante como por la aplicación de ácido glutámico, fue bloqueada mediante la aplicación del dietil-ester del ácido glutámico o por 2-amino-4-fosfonobutirato (Hicks y Mc Lennan, 1979).

Las células piramidales de la región CA 3 del hipocampo envían axones a la región CA 1. La interrupción quirúrgica de la proyección de CA 3 a CA 1 produjo una disminución en la captura de [^3H] D-aspartato en el *stratum radiatum* de CA 1, tanto en la imagen autorradiográfica como por criterios bioquímicos (Storm-Mathisen, 1977). Las células piramidales, particularmente en el *subiculum*, proyectan a

través del fórnix a varias regiones cerebrales tales como los núcleos de la estria terminal, el hipotálamo mediobasal y los cuerpos mamilares (Swanson y Cowan, 1977). La interrupción quirúrgica del fórnix produjo una reducción de la captura de ácido glutámico en estos núcleos y de una disminución del ácido glutámico endógeno (Meibach y Siegel, 1977).

En la médula espinal se ha encontrado una distribución diferencial de ácido glutámico; los niveles de este aminoácido son mayores en las raíces dorsales que en las ventrales, por lo que se ha sugerido que actúe como neurotransmisor en las neuronas aferentes primarias (Curtis y Johnston, 1974). En relación a esto, se ha observado que existe un transporte retrógrado que ha sido selectivo para [3H] D-aspartato, hacia el soma de las células de los ganglios espinales dorsales en la médula espinal cervical (Streit, 1980).

c) El cerebelo como modelo de estudio.

1.- *Citoarquitectura de la corteza de cerebelo.*

El cerebelo es el modelo natural más sencillo para el estudio del ácido glutámico, ya que las fibras paralelas, que son las que probablemente lo utilizan como neurotransmisor, se encuentran localizadas en la capa molecular de la corteza de esta estructura, formando las sinapsis más abundantes del sistema nervioso central en los mamíferos. A continuación, se presentan las características histológicas del cerebelo.

La corteza del cerebelo tiene como característica sobresaliente una organización neuronal regular, constante y laminada (Ramón y Cajal, 1911; Llinás y Simpson, 1981); la distribución celular y las conexiones celulares son similares en toda su corteza, existiendo poca variación entre las diferentes especies de los vertebrados (figura 1).

La corteza del cerebelo tiene en todas sus regiones cinco estirpes neuronales, distribuidas en tres capas como sigue:

a) capa molecular; fué denominada capa plexiforme por Ramón y Cajal (1911), es la capa más externa y contiene las células en estrella y las células en canasta.

b) capa de células de Purkinje; es una capa intermedia, formada por los somas de las células de Purkinje (Ramón y Cajal no la consideró como capa).

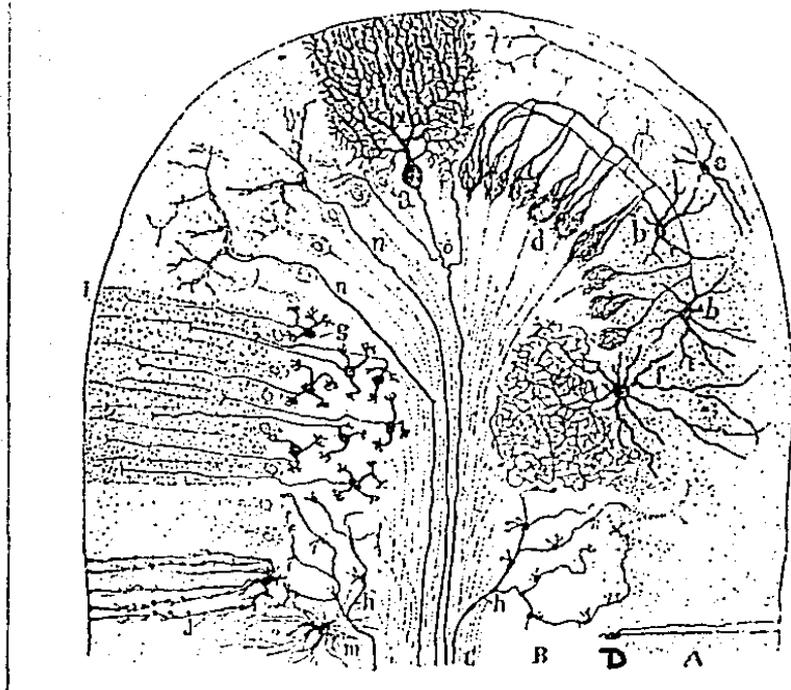


Figura 1 .- Esquema de una circunvolución cerebelosa de mamífero, mostrada en un corte transversal.

A, capa molecular; B, capa granular; C, substancia blanca; D, capa de células de Purkinje; a, célula de Purkinje; - b, células en canasta; d, arborizaciones axonales formando las canastas de las células en canasta; e, células en estrella; f, células de Golgi; g, células granulares con su axón ascendente; h, fibras musgosas; j, célula glial de Bergmann; m, célula glial de la capa granular; n, fibras trepadoras; o, colaterales recurrentes del axón de la célula de Purkinje.

(Tomado de Ramón y Cajal, 1911).

c) capa granular; es la capa más interna de la corteza cerebelosa, contiene los somas de las células granulares y de las células de Golgi.

Por debajo de estas capas, se encuentra la substancia blanca, que contiene los axones para la entrada y salida de la información de la corteza cerebelosa.

Las células de Purkinje.- constituyen las neuronas más grandes del cerebro (Llinás y Simpson, 1981), su arborización dendrítica se expande en todo el grosor de la capa molecular (varía de 300 a 400 μm en los mamíferos, dependiendo de la especie); la suma total de los segmentos dendríticos calculada mediante computadora es de 4 mm para una célula de Purkinje de gato (Llinás y Simpson, 1981). Las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje se encuentran orientadas en un plano parasagital (ver figuras 1 y 2), esto es, en cortes coronales del cerebelo no se observa la arborización dendrítica (lo que se muestra en la figura 2).

En las células de Purkinje converge toda la información de la corteza del cerebelo y los axones de estas células constituyen la vía eferente de la corteza cerebelosa. Las células de Purkinje son inhibitorias, la estimulación de éstas produce una fuerte inhibición en las neuronas de los núcleos profundos del cerebelo y del núcleo de Dieters (Eccles, Ito y Szentágothai, 1967). El transmisor que utilizan probablemente las células de Purkinje es el GABA, los somas de estas células contienen gran cantidad de GABA,

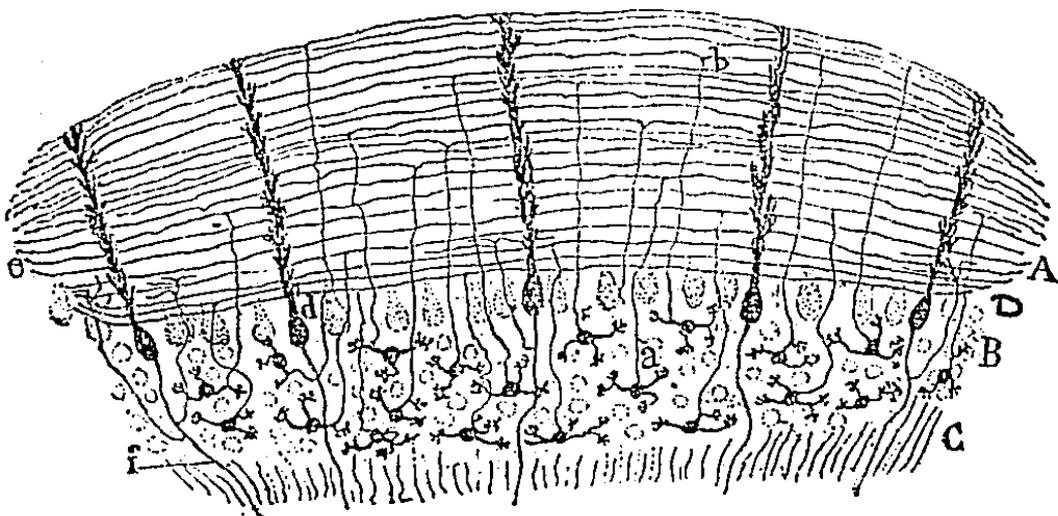


Figura 2 .- Esquema de un corte coronal (longitudinal) de la corteza del cerebelo de mamífero.

A, capa molecular; -B, capa granular; -C Substancia blanca; -D, capa de células de Purkinje; -a, axón de una célula granular; -b, fibras paralelas; -d, célula de Purkinje; -e, extremidad de las fibras paralelas (según S. Ramón y Cajal); -f, axón de las células de Purkinje.

NOTA.- En el esquema no están consideradas las células en estrella, en canasta ni Golgi; tampoco las fibras trepadoras ni musgosas.

(Tomado de S. Ramón y Cajal, 1911).

además de tener a la enzima glutamato descarboxilasa (Kuriyama y cols., 1966).

La superficie del soma y de las dendritas principales de las células de Purkinje se encuentran separadas del entorno mediante una envoltura formada por procesos celulares de las células gliales de Bergmann (Eccles, Ito y Szentágothai, 1967).

Las células granulares.- constituyen la estirpe neuronal más abundante, con 2.4×10^6 neuronas por milímetro cúbico (Eccles, Ito y Szentágothai, 1967), en otros cálculos, se ha reportado una cantidad de células granulares de 10 11 en el cerebelo de monos (Llinás y Simpson, 1981). El soma se localiza en la capa granular (a la que le da el nombre) siendo esférico, de 5 a 8 μm de diámetro, tiene de 3 a 5 dendritas que terminan en forma de garra en complejos sinápticos que se denominan glomérulos, en donde reciben contactos sinápticos con las fibras musgosas (figura 1).

El axón de estas células surge del soma, asciende hacia la capa molecular, en donde se bifurca en forma de T para dar origen a las fibras paralelas. Estos axones corren paralelamente a los pliegues del cerebelo, esto es, en un sentido coronal (figura 2). En gatos, la longitud de las fibras paralelas es de 1 a 1.5 mm del sitio de la bifurcación hasta uno de los extremos, las fibras paralelas están orientadas transversalmente al plano de las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje; una

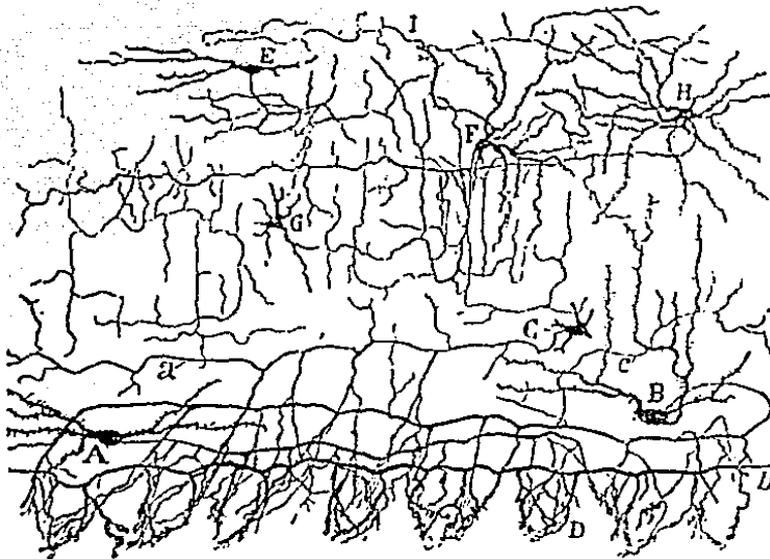


Figura 3 .- Células en estrellã y células en canasta.

Corte transversal de la corteza del cerebelo.

A, B y C muestran los somas de las células en canasta; D, muestra los axones de las células en canasta que en vuelven el soma de las células de Purkinje, formando las canastãs que le dan el nombre a las células; E, F, G y H muestran los somas de las células en estrella, - el axón de estas células muestra una orientación ortogonal a las fibras paralelas; a y b muestran la misma orientación espacial en los axones de las células en c canasta.

(Tomado de S. Ramón y Cajal, 1911).

fibra paralela establece contactos sinápticos con aproximadamente 500 células de Purkinje y cada célula de Purkinje recibe aproximadamente 80 000 contactos sinápticos con las fibras paralelas en las espinas dendríticas en el gato (Llinás y Simpson, 1981). También establecen contactos sinápticos con las fibras paralelas: las células en canasta, las células en estrella y las células Golgi. Las sinapsis de las fibras paralelas son excitadoras (Eccles, Ito y Szentágothai, 1967).

Las células en estrella.- se encuentran en la parte superficial de la capa molecular, sus dendritas se orientan de manera similar a las dendritas de las células de Purkinje, y reciben contactos sinápticos principalmente de las fibras paralelas aunque también de las fibras trepadoras. Sus axones terminan en las dendritas de las células de Purkinje en donde hacen contactos sinápticos de tipo inhibitorio (figura 3).

Las células en canasta.- se localizan en la parte profunda de la capa molecular (Ramón y Cajal les llamó células estrelladas profundas). Su árbol dendrítico se orienta de manera similar al de las células de Purkinje; el axón de las células en canasta, surge del soma y se dirige hacia los somas de las células de Purkinje, estableciendo contactos sinápticos múltiples con 8 a 10 de estos somas en una dirección parasagital (Ramón y Cajal, 1911; Eccles, Ito y Szentágothai, 1967). El axón de las células en canasta forma una serie de ramificaciones que envuelven a cada

célula de Purkinje en forma semejante a una canastilla (figura 3); las sinapsis más abundantes de la canasta se encuentran en la región del cono axónico de las células de Purkinje y se tiene evidencia de que estas son de tipo inhibitorio (Eccles, Ito y Szentágothai, 1967).

Las células de Golgi.- tienen su soma localizado en la capa granular, las dendritas surgen de la parte apical del soma y se dirigen hacia la capa molecular sin tener una orientación particular (estas neuronas no son planas). El axón de estas células surge de la base del soma, se divide inmediatamente teniendo una arborización profusa, y establece múltiples contactos sinápticos con los glomérulos cerebelosos.

Se ha propuesto que las células en estrella, en canasta y Golgi utilicen al GABA como neurotransmisor. La actividad de estas interneuronas es inhibitoria (Eccles, Ito y Szentágothai, 1967); mediante estudios con inmunocitoquímica se han observado anticuerpos anti-glutamato descarboxilasa en las terminales de estas células (Mc Laughlin y cols., 1974).

La entrada de información a la corteza del cerebelo se establece mediante dos vías de carácter excitatorio y una vía aparentemente inhibitoria:

a) las fibras trepadoras, que provienen en su mayoría de la oliva inferior (Armstrong, 1974; Desclin, 1974; Brodal, 1981); cada fibra trepadora establece múltiples contactos sinápticos con las dendritas de una célula de Purkinje. La

estimulación eléctrica de las fibras trepadoras produce un intenso potencial postsináptico excitatorio en las células de Purkinje (Llinás y Simpson, 1981).

b) las fibras musgosas, que provienen de diversos núcleos del tallo cerebral y de la médula espinal. Establecen sinapsis *en passant* en los glomérulos cerebelosos con las dendritas de las células granulares; estas sinapsis son de tipo excitatorio. La estimulación de las fibras musgosas produce una despolarización inicial de las células de Purkinje, mediada por las fibras paralelas (Eccles, Ito y Szentágothai, 1967; Llinás y Simpson, 1981).

c) fibras provenientes de los núcleos *Locus Coeruleus* y del raquí. Estas fibras fueron descubiertas mediante la técnica de histofluorescencia (Falck y cols., 1962); terminan en la capa molecular y su forma no se parece a la de las fibras trepadoras ni musgosas (Hoxfelt y Fuxe, 1969; Descarries y Lapierre, 1977; Beaudet y Sotelo, 1980). Las fibras provenientes del *Locus Coeruleus* contienen noradrenalina (Bloom y cols., 1971; Descarries y Lapierre, 1977) y su estimulación produce inhibición de las células de Purkinje (Siggins y cols., 1973). Las fibras provenientes de los núcleos del raquí contienen serotonina y producen inhibición de las células de Purkinje (Shinnar y cols., 1973; Bloom y cols., 1972).

2.- Desarrollo del sistema de las fibras paralelas.

El desarrollo de la corteza del cerebelo de los vertebrados tiene lugar postnatalmente en los mamíferos y después de la eclosión en las aves y los reptiles.

En los mamíferos, las neuronas que se encuentran en el momento del nacimiento en la corteza del cerebelo, son las células de Purkinje y de Golgi; superficiales a estas, se encuentra una capa de células embrionarias que darán origen a las interneuronas conforme se desarrolle el cerebelo, estas células se denominan células germinales y forman la capa germinal externa.

En la corteza del cerebelo de la rata, en los días 3 al 7 posteriores al nacimiento, se establecen los contactos sinápticos de las fibras trepadoras con el soma de las células de Purkinje (Aitman, 1972b); se ha propuesto que conforme surge y se desarrolla el árbol dendrítico de las células de Purkinje, estas sinapsis emigran junto con el crecimiento celular que implica la formación de las dendritas (figura 4).

Las células granulares surgen de la capa germinal externa hacia el final de la segunda semana de vida postnatal. El proceso de diferenciación ocurre conjuntamente con la migración de las células de la capa germinal externa hasta alcanzar su localización definitiva en la capa granular (figura 5); durante esta migración, la célula emite prolongaciones celulares que van a constituir las fibras paralelas. Una vez formadas las fibras paralelas, la célula continúa su migración hacia la capa granular y se conecta a

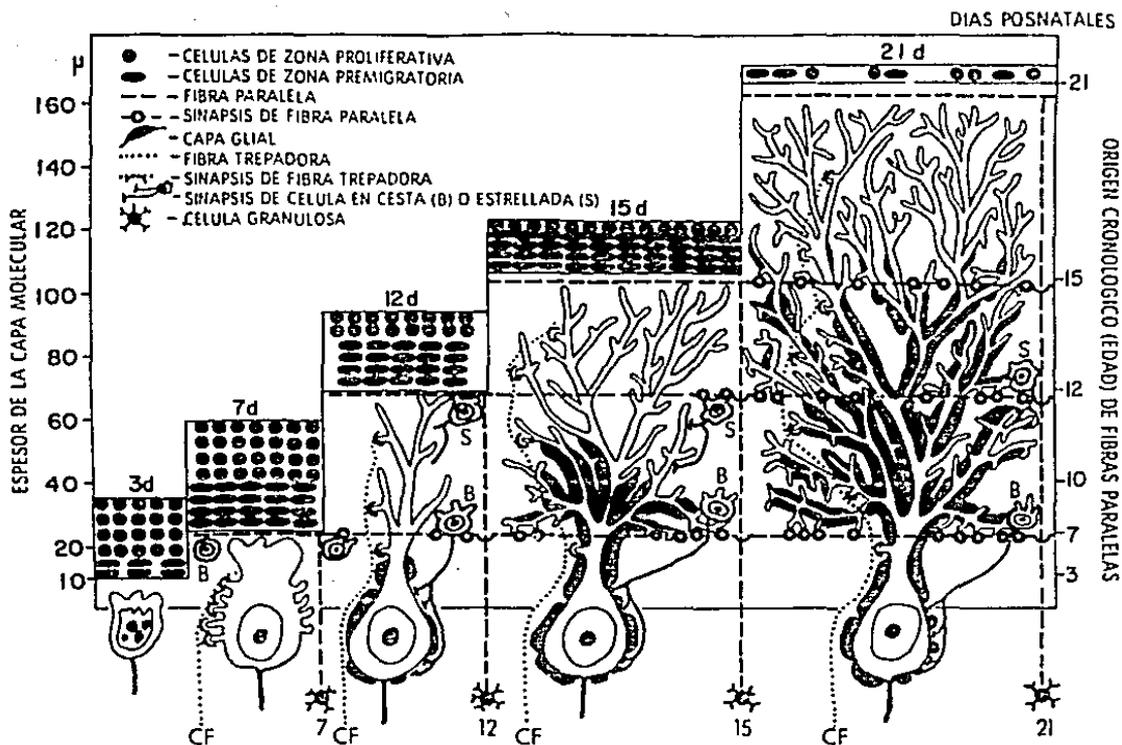


Figura 4 .- Esquema de maduración de una célula de Purkinje de rata y las conexiones sinápticas sobre la misma. Se indican cinco etapas de desarrollo a los 3, 7, 12, 15 y - 21 días después del nacimiento. La clave de las diversas estructuras se da en el texto inserto. Hacia el final de la primera semana se han formado las sinapsis de las fibras trepadoras, mientras que las sinapsis de las fibras paralelas inician su formación hacia el día 12 postnatal. (Modificado de Altman, 1972).

Modèle du
grain et appu-
rillon des fi-
bres mous-
sues.

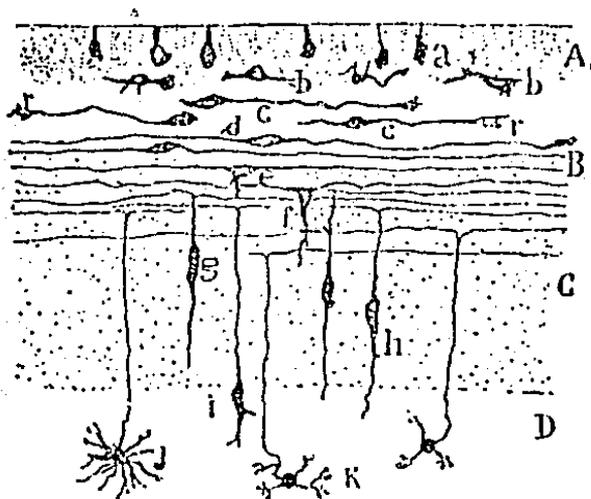


Figura 5 .- Desarrollo de las células granulares.

En la figura se muestran las diferentes fases de la maduración y migración de las células granulares. En A se localiza a la capa germinal externa, donde a y b son células germinales. Las letras B y C refieren a la capa molecular; en c se muestra a las células germinales emitiendo prolongaciones hacia los lados del citoplasma, en d y e las prolongaciones formaron a las fibras paralelas. En f, g y h, después de la formación de las fibras paralelas, el soma migra hacia la capa granular (referida por D), en donde las células granulares al alcanzar su localización definitiva, que se muestra en j y k, formarán las dendritas que recibirán contactos sinápticos (modificado de S. Ramón y Cajal, 1911).

través del axón con la fibra paralela que formó. Cuando estas células llegan a la capa granular, emiten sus prolongaciones dendríticas, las que van a formar los glomérulos en las sinapsis con las fibras musgosas (figura 5). La generación de células granulares y sus contactos sinápticos tiene lugar entre los días 12 al 30 de la vida postnatal en la rata (Altman, 1972b).

3.- *El ácido glutámico en el cerebelo.*

Existen una serie de evidencias que sugieren que el ácido glutámico sea el transmisor de las células granulares.

La aplicación de ácido glutámico mediante iontoforesis produjo un marcado aumento en la frecuencia de disparo de las células de Purkinje, en preparaciones de rebanadas de cerebelo de cuyos (Chujo y cols., 1975) y de rata (Crepel y cols., 1982).

Las células granulares son las que contienen la mayor cantidad de ácido glutámico; la lesión de las células granulares de hamsters mediante la inoculación del virus PRE 308 al momento del nacimiento, produjo una disminución de los niveles de ácido glutámico mientras que otros aminoácidos no se afectaron (Young y cols., 1974).

En general, se ha relacionado la disminución de las células granulares con la disminución del ácido glutámico. En ratones mutantes con agenesia de células granulares de las cepas Weaver y Reeler, se ha encontrado disminución en la cantidad de ácido glutámico, aunque la disminución de las

células granulares no correspondió en términos cuantitativos con la disminución del ácido glutámico (Roffler-Tarlov y Sidman, 1978). En ratones mutantes Weaver y Staggerer con agenesia completa de las células granulares en los animales homocigotos, se encontró una disminución de 64 % en la cantidad de ácido glutámico y 87 % de ácido aspártico, tanto en la corteza del cerebelo como en los núcleos profundos del mismo (Roffler-Tarlov, 1978; Dupont y cols., 1984).

La disminución de las células granulares mediante la irradiación de rayos X en el cerebelo de ratas recién nacidas, produjo también disminución de los niveles de ácido glutámico (Mc Bride y cols., 1976; Rhode y cols., 1979) aunque este dato no fué corroborado por otros autores (Sandoval y Cotman, 1978).

La lesión del cerebelo con rayos X produjo un decremento en la actividad de captura de ácido glutámico (Rhode y cols., 1979) y una marcada disminución en la liberación dependiente de calcio del ácido glutámico endógeno (Sandoval y Cotman, 1978).

III.- Objetivos de este trabajo.

a) Una de las estrategias que se han empleado para definir a un neurotransmisor en una sinapsis específica, ha sido lesionar a esta sinapsis, lo que debe disminuir: la concentración de la sustancia en el tejido, la liberación dependiente de calcio y la respuesta fisiológica.

En relación con esta estrategia, nosotros estudiamos el mecanismo inverso: la liberación de ácido glutámico en relación con la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas.

Por otro lado, intentamos también producir una lesión selectiva de las sinapsis de las fibras paralelas mediante una sustancia neurotóxica; estos resultados se presentan como un anexo al final de esta tesis.

b) La captura de ácido glutámico ha sido utilizada para identificar probables regiones en donde el ácido glutámico es utilizado como neurotransmisor. Nosotros estudiamos la captura de ácido glutámico en preparaciones de cerebelos de ratas durante el desarrollo, para intentar conocer la evolución del sistema de eliminación del ácido glutámico como neurotransmisor.

c) La glutamina es el precursor del ácido glutámico que se libera de terminales nerviosas. Se estudió la captura de glutamina durante el desarrollo de la corteza del cerebelo para intentar correlacionar la aparición de las sinapsis con este sistema de captura .

VI Material y Métodos.

Material:

Los siguientes productos fueron comprados a Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. USA.

Acido L-glutámico.

Albumina serica bovina.

Acido γ -amino butírico (GABA).

L-glutamina.

Hepes (N-2-hidroxietyl- piperazina-N'-2-etanol- sulfonato).

Reactivo de Fenol de Folin & Ciocalteau.

Trizma base (Tris (hidroximetil) aminometano).

Veratrina (Base libre).

El material radioactivo enlistado se compró a New England Nuclear. Du Pont NEN Research Products. Boston, MA. USA.

L-[U-¹⁴C]-acido glutámico (act. esp. 297 mCi/m mol).

[³H] GABA (act. esp. 40.2 Ci/m mol).

L-[U-¹⁴C]-acido aspártico (act. esp. 225 mCi/m mol).

L-[3,4-³H(N)]-glutamina (act. esp. 43.9 Ci/m mol).

Metodos:

a) Experimentos de liberación de ácido glutámico.

1.- *Preparación: homogenado de capa molecular.*

Utilizamos ratas Wistar, de 15, 17, 19, 21, 26 y 32 días postnatales controlados por fecha de nacimiento y peso de los animales, y ratas adultos de 150 a 250 grs de peso, sin diferenciar el sexo de los animales.

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación. Después de remover piel, tejidos subcutáneos y el hueso occipital, el cerebelo fué disecado mediante la sección de los pedúnculos cerebelosos, para ser depositado en una solución de sacarosa 0.32 M, enfriada a 0 - 4°C, se intentó mantener esta temperatura en el manejo del tejido; el tiempo promedio para la obtención del cerebelo fué de 1 a 2 minutos.

El cerebelo fué cortado parasagitalmente utilizando un rebanador Mc Ilwain Tissue Chopper, el grosor de las rebanadas fué de 0.4 mm. Utilizamos en todos los experimentos las rebanadas del vermis solamente, ya que en esta región del cerebelo las rebanadas parasagitales son similares entre sí. La capa molecular fué disecada manualmente con microespátulas elaboradas en nuestro laboratorio, el proceso de disección se realizó con la ayuda

de un microscopio estereoscópico. Para intentar mantener el tejido a $0 - 4^{\circ}\text{C}$ durante la disección, las rebanadas del vermis se depositaron en la superficie externa de un recipiente que contenía hielo en su interior. Los fragmentos obtenidos de la capa molecular fueron depositados en 1 ml de medio Krebs-bicarbonato (Tabla I) para ser homogenizados en un homogenizador vidrio-vidrio (espacio entre el pistón y el vaso: 0.004 - 0.006 pulgadas).

La cantidad de cerebelos que utilizamos por experimento fué de 1 en animales adultos y 2 en animales en edades entre 15 y 32 días postnatales con el objeto de tener cantidades similares de proteína (obteníamos de 1.3 a 1.7 mg de proteínas por ml de homogenado). La duración total del procedimiento varió entre 45 a 60 minutos.

2.- *Perfusión.*

Del homogenado de la capa molecular tomamos 0.8 ml, que fueron mezclados en 2.5 ml de medio Krebs-bicarbonato al que se le agregó calcio 2 mM (esta solución la utilizamos como medio de incubación), preincubamos la preparación 3 minutos a 37°C , al término de los cuales añadimos el ácido glutámico para su captura (se realizaron además experimentos con ácido aspártico y GABA; la concentración final de los aminoácidos en el medio de incubación fué de 8 μM); incubamos durante 5 minutos a 37°C para que fuera capturado el aminoácido por el tejido (en este tiempo, teníamos una actividad de captura cercana a la máxima, con poco

Tabla I.

Soluciones utilizadas en los experimentos de liberación de ácido glutámico (ambas son iso-osmolares).

Medio Krebs-bicarbonato:

Na Cl	115 mM
K Cl	3 mM
Na H ₂ PO ₄	1.2 mM
Mg SO ₄	1.2 mM
Na HCO ₃	25 mM
Glucosa	10 mM

pH 7.4 mantenido con mezcla O₂-CO₂ (95-5 %).

Medio Krebs-alto potasio:

Na Cl	65 mM
K Cl	53 mM
Na H ₂ PO ₄	1.2 mM
Mg SO ₄	1.2 mM
Na HCO ₃	25 mM
Glucosa	10 mM

pH 7.4 mantenido con mezcla O₂-CO₂ (95 - 5 %).

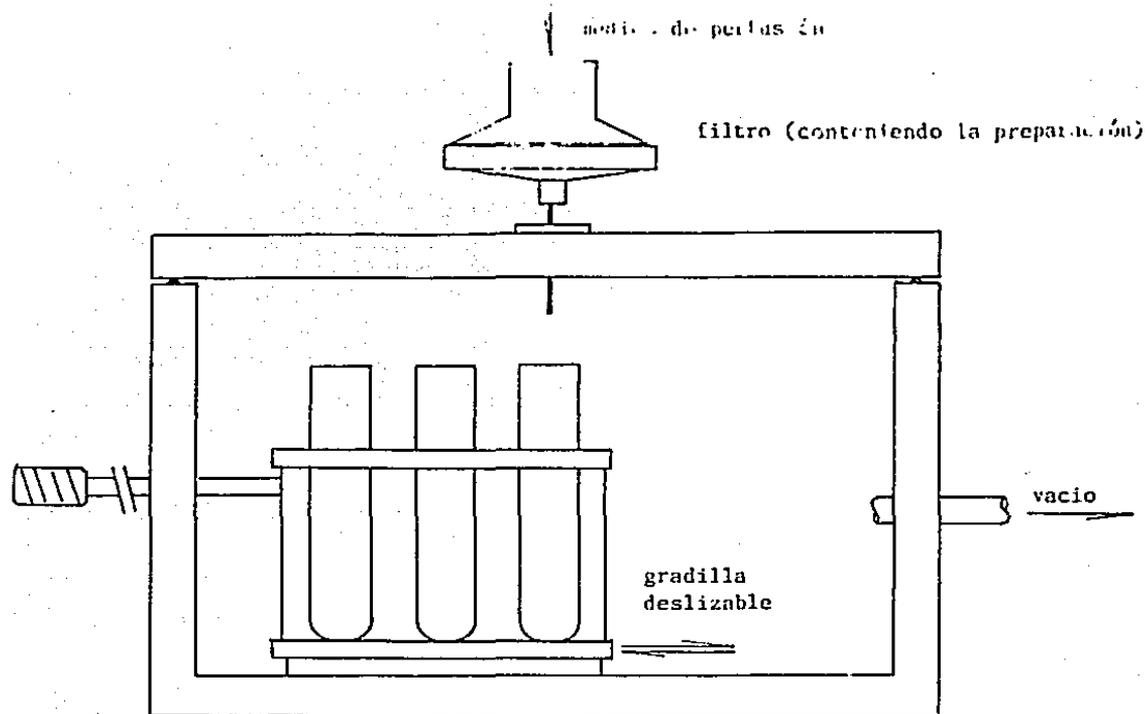


Figura 6 .- Sistema de Perfusión.

El sistema de perfusión consiste en una caja de plástico transparente en la que se puede llevar a condiciones de vacío mediante una bomba de succión, en su interior, contiene una gradilla deslizable para coleccionar la fracción de los perfusados que nos interese; la preparación se aplica sobre filtros en las unidades Swinex Millipore. Este sistema de perfusión nos permite manejar en paralelo hasta 8 filtros.

metabolismo del ácido glutámico como se demuestra en la sección de resultados).

Al término de la incubación, tomamos alícuotas de 0.5 ml del medio de incubación, las que fueron transferidas a unidades de filtración Swinex Millipore de 25 mm de diámetro, las cuales fueron modificadas para aumentar su volumen (figura 6), estas unidades utilizaban filtros Millipore con poro de 0.65 μm . Las unidades de filtración fueron adaptadas a una caja de vacío, que contenía una gradilla deslizable para poder recoger en tubos de ensayo los perfusados (figura 6). Este sistema de perfusión, nos permitía manejar paralelamente hasta 8 unidades de perfusión (Levi y cols., 1973; Sandoval y Cotman, 1978).

Una vez en las unidades de filtración, la preparación fué lavada para eliminar el exceso de radioactividad y obtener una liberación constante de ácido glutámico marcado, lo que se alcanzaba después de 6 lavados; los lavados fueron hechos con medio Krebs-bicarbonato, 2 ml durante 30 segundos para cada fracción.

Al término de los lavados, se aplicaban en los filtros 1 al 6 respectivamente, las siguientes soluciones:

- 1) Krebs-bicarbonato (línea basal - control).
- 2) Krebs-bicarbonato + 2 mM de Ca^{++} (efecto del Ca^{++} en ausencia de estímulo).
- 3) Krebs-alto potasio (estímulo en ausencia de Ca^{++}).
- 4) Krebs-alto potasio + 2 mM de Ca^{++} (estímulo en presencia de Ca^{++}).

5) Krebs-bicarbonato + veratrina 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (despolarización en ausencia de Ca^{++}).

6) Krebs-bicarbonato + veratrina 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 2 mM de Ca^{++} (despolarización en presencia de Ca^{++}).

En nuestros experimentos no utilizamos EGTA en los pulsos en ausencia de calcio, dado que la presencia o ausencia de este compuesto no producía variación en los valores de liberación cuando se omitía el calcio en los pulsos.

Los pulsos fueron de 2 ml con duración de 30 segundos cada uno, colectados en los tubos de ensayo, y de ellos se extrajeron alícuotas de 0.5 ml, las que fueron mezcladas con 5 ml de tritosol para contar la radioactividad mediante centelleo líquido (Fricke, 1975).

El resto del perfusado se empleó para estudiar el metabolismo del ácido glutámico marcado mediante cromatografía en placa fina (ver en controles).

Al final de la perfusión, al tejido se le aplicó agua bidestilada a $0 - 4^{\circ}\text{C}$, 1 ml durante 60 segundos en dos ocasiones, para recuperar el ácido glutámico intracelular. Del choque osmótico se tomaron 100 μl para contar la radioactividad, el volúmen restante fué utilizado para analizar el metabolismo del ácido glutámico (ver controles).

La radioactividad remanente en el filtro fué contada con 10 ml de tritosol.

3.- *Calculos.*

La liberación de ácido glutámico fué expresada como el porcentaje de la radioactividad que se liberaba del tejido con respecto a la radioactividad presente en el tejido antes del pulso; esto fué calculado como sigue:

c.p.m. a d.p.m. mediante estándares internos.

$$\% \text{ de liberación} = \frac{\text{dpm perfusado} \times 100}{\text{dpm perfusado} + \text{dpm tejido} + \text{dpm filtros}}$$

4.- *Controles.*

Para conocer cuanto de la radioactividad permanecía como ácido glutámico, analizamos los perfusados y lo recuperado de los choques osmóticos mediante cromatografía en placa fina como sigue: las sales interfieren con la resolución de los aminoácidos en este tipo de sistema cromatográfico, por lo que para eliminar las sales usamos un sistema de cromatografía de intercambio iónico. Utilizamos una resina de intercambio catiónico Dowex AG 50 W X 8 en forma protonada, para lo que antes de utilizarla se lavó con HCl 1 N. Las muestras antes de ser aplicadas se acidificaron con 1 gota de HCl 1 N; el grupo amino de los aminoácidos, al adquirir carga positiva interacciona con el grupo sulfonilo de la resina, lo que hace que se retengan los aminoácidos en la columna. Las columnas fueron lavadas con 3 ml de agua bidestilada para eliminar otras sustancias y después se pasó por las columnas amoniaco 2.5 H, 2.5 ml para recuperar los aminoácidos de la columna, con lo que se recuperaba el 96 % del ácido glutámico retenido en la columna.

Las muestras en solución de amoniaco, fueron evaporadas en una centrifuga y evaporador Savant, acoplado a un sistema de vacío. Los aminoácidos en polvo fueron resuspendidos en 50 µl de agua bidestilada, de los que aplicamos 35 µl en placas finas de sílica-gel marca Whatman y 10 µl del resuspendido se utilizó para contar la radioactividad. Cada placa se corrió inicialmente en butanol/agua (4:1 v/v) y posteriormente en etanol/agua/etilenglicol (7:3:1 v/v); al final del proceso, raspamos la placa en segmentos de 1 cm para contar la radioactividad. El ácido glutámico fué determinado aplicando como acarreador ácido glutámico "frío" y revelando con ninhidrina (se determinaron de manera similar los aminoácidos GABA y aspartato; Sandoval y cols., 1984).

La recuperación de la radioactividad al final de todo el procedimiento fué de 70 % aproximadamente.

b) Experimentos de captura de ácido glutámico.

1.- *Preparación.*

Para los experimentos de captura de ácido glutámico se usó la fracción sinaptosomal cruda (P₂) de cerebelo completo de ratas; esto fué decidido en base a que la captura de ácido glutámico por miligramo de proteínas que mostró esta preparación fué similar a la captura del ácido glutámico en homogenados de capa molecular.

Las edades de los animales que se utilizaron fueron: 4, 10, 15, 17, 19, 21, 26, y 32 días postnatales y adultos de 150 a 200 g.

Obtuvimos el cerebelo como se describió anteriormente, el que depositamos en una solución de sacarosa 0.32 M y fué homogenizado usando un homogenizador con pistón de teflón acoplado a un taladro, que giró a 900 rpm, el vaso era de vidrio y la luz entre el pistón y el vaso fué de 0.004 a 0.006 pulgadas. El homogenado fué centrifugado a 1,580 x g durante 10 minutos, el sobrenadante fué centrifugado a 18,000 x g durante 15 minutos y la pastilla fué resuspendida en 1 ml de sacarosa 0.32 M mediante un homogenizador vidrio-vidrio siendo esta la fracción sinaptosomal cruda (P2).

2.- *Captura de ácido glutámico en el desarrollo.*

0.2 ml de la fracción sinaptosomal cruda fué mezclado con 2 ml de medio Krebs-bicarbonato con calcio (tabla II). De la misma fracción sinaptosomal, 0.2 ml fueron mezclados con 2 ml de medio sin sodio (tabla II); del resto de la fracción sinaptosomal cruda se determinaron las proteínas utilizando el método de Lowry (Lowry y cols., 1951).

El procedimiento siguiente fué el mismo para las fracciones con sodio y sin sodio: la preparación se preincubó durante 3 minutos a 37 ° C, al término se adicionaron 7.8×10^{-7} M de ácido glutámico, y se incubó durante 2 minutos para permitir su captura (en este tiempo, estabamos en velocidad inicial de la actividad de captura de ácido glutámico). La reacción fué detenida por filtración,

Tabla II.

Medio de incubación:

Medio Krebs-bicarbonato con calcio:

Na Cl	115 mM
K Cl	3 mM
Ca Cl ₂	2 mM
Na H ₂ PO ₄	1.2 mM
Mg SO ₄	1.2 mM
Na HCO ₃	25 mM
Glucosa	10 mM

pH 7.4 mantenido con mezcla O₂ - CO₂ (95 - 5 %).

Medio sin sodio:

Cloruro de colina	137 mM
K Cl	3 mM
Mg SO ₄	1.5 mM
K H ₂ PO ₄	1.2 mM
Glucosa	10 mM
Ca Cl ₂	2 mM

pH 7.4 mantenido con Hepes- Tris 10 mM.

Estos medios son iso-osmolares. En el medio sin sodio

la colina substituye al sodio. Se decidió utilizar como amortiguador al Hepes-Tris debido a los problemas de solubilidad del bicarbonato de potasio. Ambos medios fueron gaseados con O₂ - CO₂ (95-5 %) para intentar mantener similar a la P O₂.

utilizando una caja multifiltros Millipore, con filtros de poro 0.65 μm , en donde se pusieron alícuotas de 0.8 ml de la preparación. El filtro fué lavado con 2.5 ml de medio sin sodio a 36 °C para eliminar la radioactividad no captada por el tejido. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Los filtros fueron transferidos a frascos para conteo de centelleo, en donde se disolvió el tejido con 1 ml de una solución de SDS 1 %, EGTA 20 mM y pH 8 ajustado con Na OH, incubando los filtros con esta solución por 20 minutos a 60 °C, al final, la radioactividad fué contada agregando 10 ml de tritosol.

La eficiencia del conteo y el apagamiento (quenching) se determinaron mediante estándares internos.

3.- Cálculos.

De los duplicados, se obtenía el promedio y se calculaba la radioactividad en dpm; mediante la actividad específica, se calculó la actividad de captura en moles. Para fines comparativos, se calculó la captura de ácido glutámico en moles por miligramo de proteínas.

4.- Cinética de captura del ácido glutámico.

La cinética de captura fué medida en animales de 15 días postnatales y en adultos de 150 - 200 g. El procedimiento que se siguió fué el mismo que el anterior. Las concentraciones de ácido glutámico [^{14}C] a las que se realizó la cinética de captura fueron:

4 x 10^{-8} M.

8 x 10^{-8} M.
4 x 10^{-7} M.
8 x 10^{-7} M.
4 x 10^{-6} M.
8 x 10^{-6} M.
4 x 10^{-5} M.

c) Experimentos de captura de glutamina.

1.- *Preparación.*

Utilizamos los homogenados de la capa molecular, que se obtuvieron de la misma manera que para los experimentos de liberación de ácido glutámico en el desarrollo (sección a), 1), de métodos).

2.- *Purificación de la glutamina.*

La glutamina es una molécula inestable. La lisis espontánea de la glutamina tiene entre sus productos a los ácidos glutámico y piroglutámico, por lo que para estudiar la captura de la glutamina, fué necesario purificarla.

Utilizamos placas finas Whatman de sílica-gel, aplicamos la glutamina y corrimos la placa en etanol/agua/etilenglicol (7:3:1 v/v); raspamos el sitio de corrimiento de la glutamina, el que fué determinado mediante los Rf (los Rf's son: glutamato = 0.779; piroglutamato = 0.711; GABA = 0.616). La sílica fué resuspendida en agua bidestilada y precipitada por centrifugación, quedando la glutamina en el agua. La glutamina al final del

procedimiento tiene 98 % de pureza, con 0.4 % de ácido glutámico.

3.- *Captura de la glutamina en el desarrollo.*

Los experimentos de captura de glutamina se efectuaron en ratas de 15, 18, 22 y 26 días postnatales y animales adultos de 150 - 200 g.

Del homogenado de la capa molecular se tomaron 0.2 ml y se mezclaron con 2 ml del medio de incubación; se preincubó durante 3 minutos, al término de los cuales se agregó la glutamina 0.2 mM (act. esp. 1.37 μ Ci/mM).

Los tiempos de incubación fueron 2, 5 y 10 minutos (en animales de 18 días y adultos se incubó a 30 segundos y 1 minuto además). Al término de la incubación, la reacción fué detenida por filtración siguiendo el procedimiento que se utilizó para el ácido glutámico. El tejido fué digerido con SDS 1 %, EGTA 20 mM a pH 8 incubandolo 20 minutos a 60 o C, y la radioactividad fué contada con Tritosol como ya fué descrito.

Los cálculos se hicieron como se describió para la captura de ácido glutámico.

V .- Resultados.

a) Liberación del ácido glutámico de la corteza del cerebelo.

1.- Liberación de aminoácidos de la capa molecular del cerebelo.

La liberación de varios aminoácidos recién capturados, fué medida en homogenados de la capa molecular de ratas adultas. Se procuró que la captura de los aminoácidos se hiciera mediante el sistema de alta afinidad, por lo que cada aminoácido se incubó en concentraciones de 8 μM (figura 7).

La liberación basal, es la liberación de aminoácidos en un pulso de medio Krebs-bicarbonato, después de haber lavado la preparación 6 veces con el mismo medio. La liberación basal de los ácidos glutámico y aspártico tienen el mismo valor porcentual, siendo menor la liberación basal de GABA. Un estímulo despolarizante como es 56 mM de potasio en ausencia de calcio, produce un incremento similar en la liberación de los tres aminoácidos. La presencia de 2 mM de calcio en el pulso de Krebs-alto potasio, produce un aumento en la liberación de GABA y de ácido glutámico, sobre la liberación obtenida con 56 mM de potasio. El ácido aspártico no muestra liberación dependiente de calcio bajo estimulación (figura 7).

2.- Liberación basal de ácido glutámico durante el desarrollo.

La liberación basal en animales de 15 días postnatales, es mayor que en los de mayor edad; a partir del día 17, la liberación basal de ácido glutámico en homogenados de capa molecular presenta poca variación (figura 8). La liberación basal es igual tanto en ausencia como en presencia de calcio en el pulso (Sandoval y cols., 1984).

3.- Liberación dependiente de calcio de ácido glutámico durante el desarrollo.

La liberación de ácido glutámico dependiente de calcio en condiciones de despolarización, fué estudiada utilizando dos mecanismos diferentes para producir despolarización: a) 56 mM de potasio en el medio de perfusión, y b) veratrina en el medio de perfusión.

Al valor de la liberación del ácido glutámico en el pulso en presencia de calcio, le fué restado el valor de la liberación del mismo pulso en ausencia de calcio, tanto en los experimentos con alto potasio como en los de veratrina (figura 9). Las curvas de liberación dependiente de calcio de ácido glutámico son similares para las dos condiciones de estimulación, ambas muestran un incremento en los días 15 a 21 postnatales; a partir del día 21, la liberación tiene poca variación en sus valores, sufriendo un ligero decremento hacia los animales adultos.

4.- Liberación dependiente de calcio de GABA durante el desarrollo.

El incremento en la liberación de GABA, provocado por la presencia de 2 mM de calcio en un pulso Krebs-alto potasio se muestra en la figura 10. La liberación de GABA de homogenados de capa molecular, aumenta 25 % de las ratas de 15 días a los animales adultos. Este incremento es marcadamente menor que el incremento de la liberación de ácido glutámico en las mismas edades.

5.- Metabolismo del ácido glutámico.

El metabolismo del ácido glutámico en los experimentos de liberación, fué medido en ratas de 15 días y adultos.

En los animales de 15 días, de la radioactividad que permanecía en el tejido al término de la perfusión, el 59.7 + 3.1 % (n = 5) fué ácido glutámico, mientras que en los perfusados, el 57.9 + 14 % (n = 4) de la radioactividad fué ácido glutámico. Los animales adultos mostraron que el 72.5 + 10.1 % (n = 5) de la radioactividad permanecía como ácido glutámico en el tejido al término de la perfusión y en los perfusados, el 54.1 + 15 % (n = 4) de la radioactividad fué ácido glutámico.

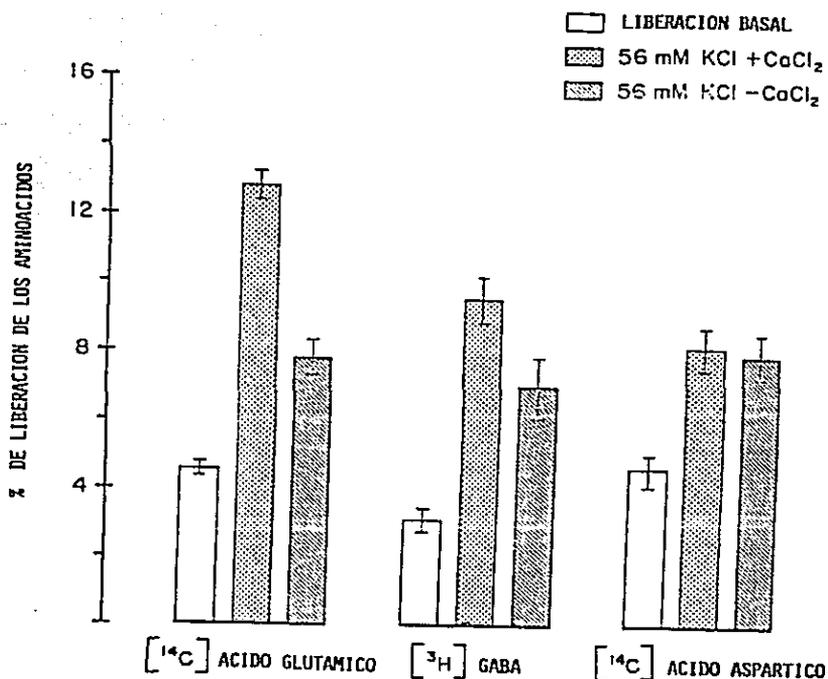


Figura 7 .- Liberación de aminoácidos de homogenados de la capa molecular de cerebelos de ratas.

Los aminoácidos fueron captados por la preparación in cubando previamente al tejido en presencia del aminoácido. Los experimentos se llevaron a cabo por separado para evitar interferencias. Después de obtener la liberación basal, se aplicaron los pulsos. La liberación de aminoácido radioactivo durante el pulso, se refiere como el porcentaje de liberación. Las barras muestran el error estandar.

Para cada aminoácido se hicieron 8 a 10 determinaciones. (modificado de Sandoval y cols., 1984).

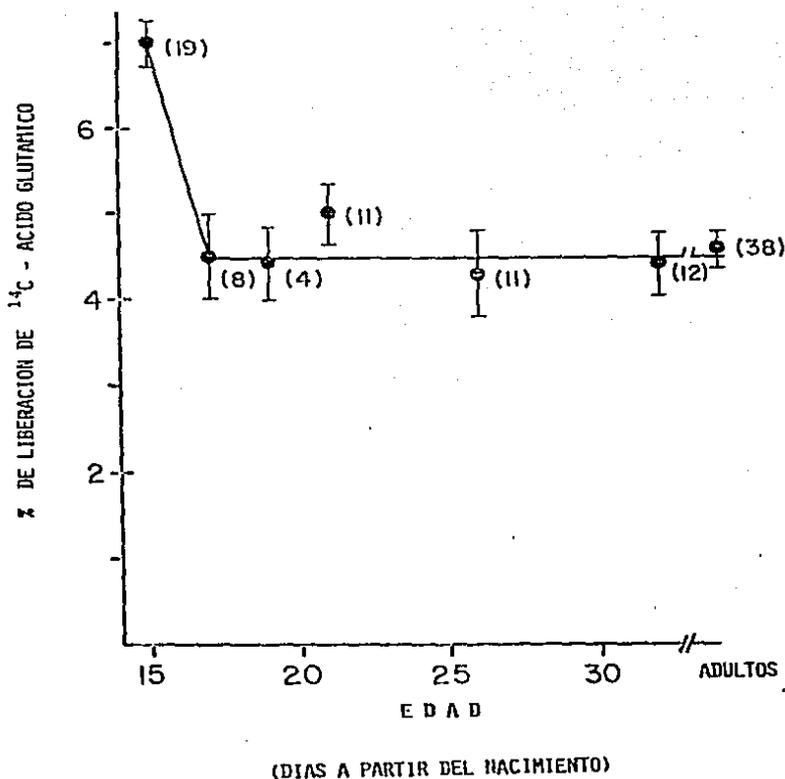


Figura 8 .- Línea basal de la liberación de ácido glutámico durante el desarrollo del cerebelo de la rata.

La figura representa la liberación de [^{14}C]-ácido glutámico en un pulso con medio Ringer Krebs-bicarbonato en homogenados de cerebelos de ratas de 15, 17, 19, 21, 26, y 32 días postnatales y adultos. Los datos representan el promedio \pm en error estándar; entre paréntesis se encuentra el número de determinaciones.

(Modificado de Sandoval y cols., 1964).

% DE LIBERACION DEPENDIENTE DE Ca^{++} DE ACIDO GLUTAMICO

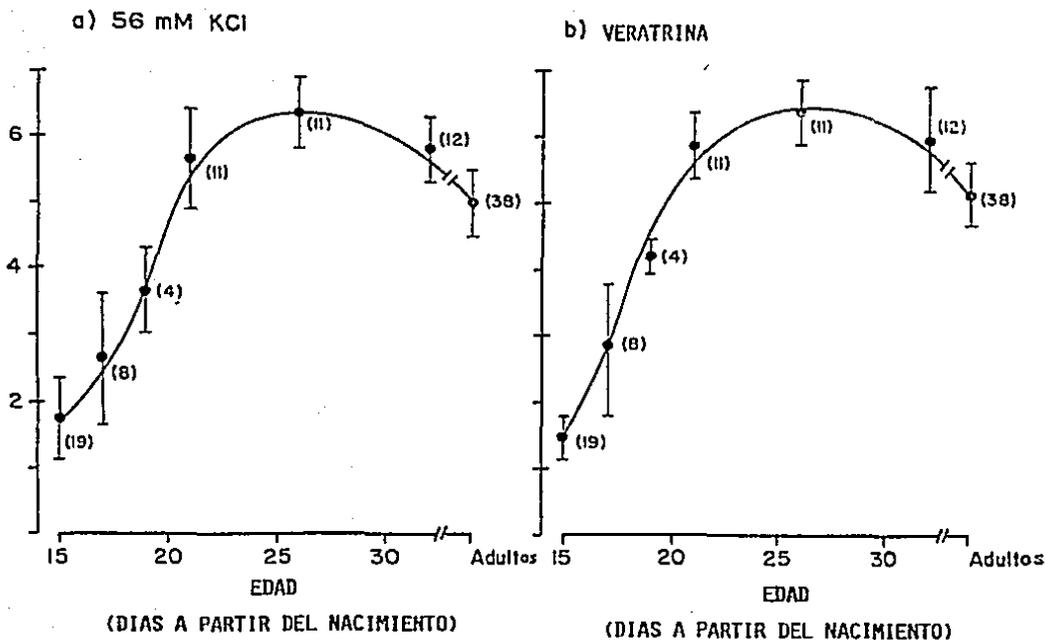


Figura 9 .- Liberación de [^{14}C]-ácido glutámico por despolarización en presencia de calcio.

a) muestra el incremento en la liberación de glutamato - radioactivo por un pulso de medio Krebs modificado con 56 ml de potasio + 2 ml de calcio.

b) muestra el incremento en la liberación de glutamato radioactivo por un pulso de medio Krebs-bicarbonato con veratrina y calcio 2 ml.

En ambos casos, las edades de las ratas son 15, 17, 19, 21, 26 y 32 días después del nacimiento. Las barras muestran el error estándar; en los parentesis se muestra el número de determinaciones.

(Modificado de Sandoval y cols., 1984).

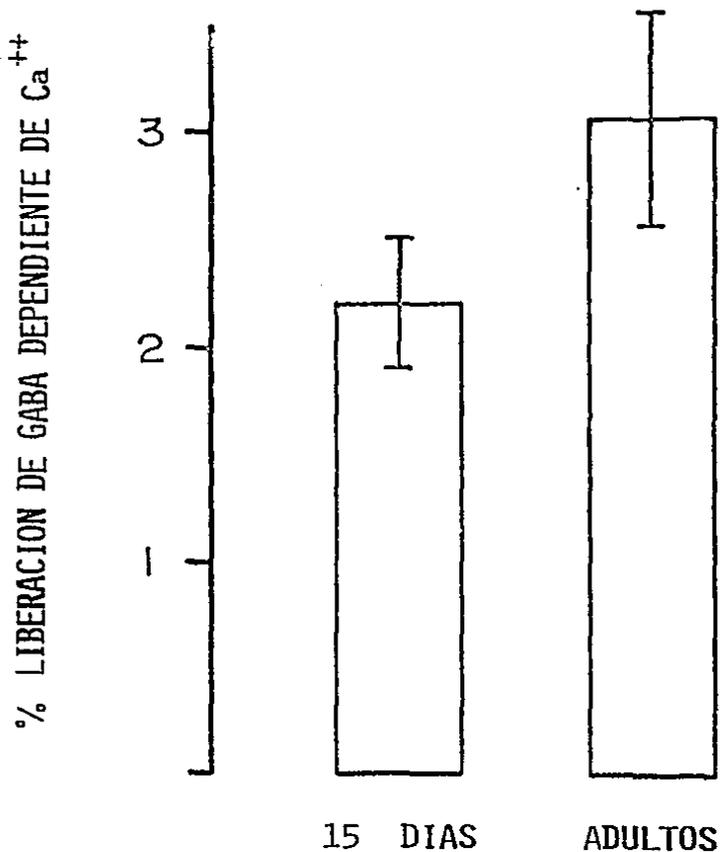


Figura 10.- Liberación de [³H]-GABA por despolarización en presencia de calcio.

La figura muestra el incremento en la liberación dependiente de calcio provocada por 56 mM de potasio. En las ordenadas se grafica el porcentaje de liberación. Las barras son \pm el error estandard de 6 a 8 determinaciones.

b) Captura de ácido glutámico en el desarrollo.

1.- Captación de ácido glutámico en el cerebelo durante el desarrollo.

La captura de ácido L-glutámico [^{14}C] fué medida en animales de 4, 10, 15, 17, 19, 21, 26 y 32 días postnatales y en adultos (figura 11). Los animales de 4 días tienen los valores más bajos; en la gráfica se observa un aumento en la captura de ácido glutámico radioactivo en los animales entre 10 a 17 días de edad, disminuyendo posteriormente hasta los valores de los animales adultos.

2.- Cinética de captura del ácido glutámico [^{14}C].

La captura de ácido glutámico [^{14}C] dependiente de sodio es mayor en los animales de 15 días que en los adultos, esta captura es similar en homogenados de la capa molecular y en la fracción mitocondrial cruda del cerebelo completo, por lo que utilizamos esta última para estudiar la cinética de captación de ácido glutámico [^{14}C] (figura 12).

La cinética muestra que la captura es de alta afinidad tanto para los animales de 15 días como para los adultos, aunque en estos la K_m sea ligeramente menor. En la velocidad máxima, es donde se observa una disminución de aproximadamente 50 % de los animales de 15 días a los animales adultos, lo que sugiere que el número de sitios de

captura disminuyen con la edad durante el desarrollo del cerebelo de la rata.

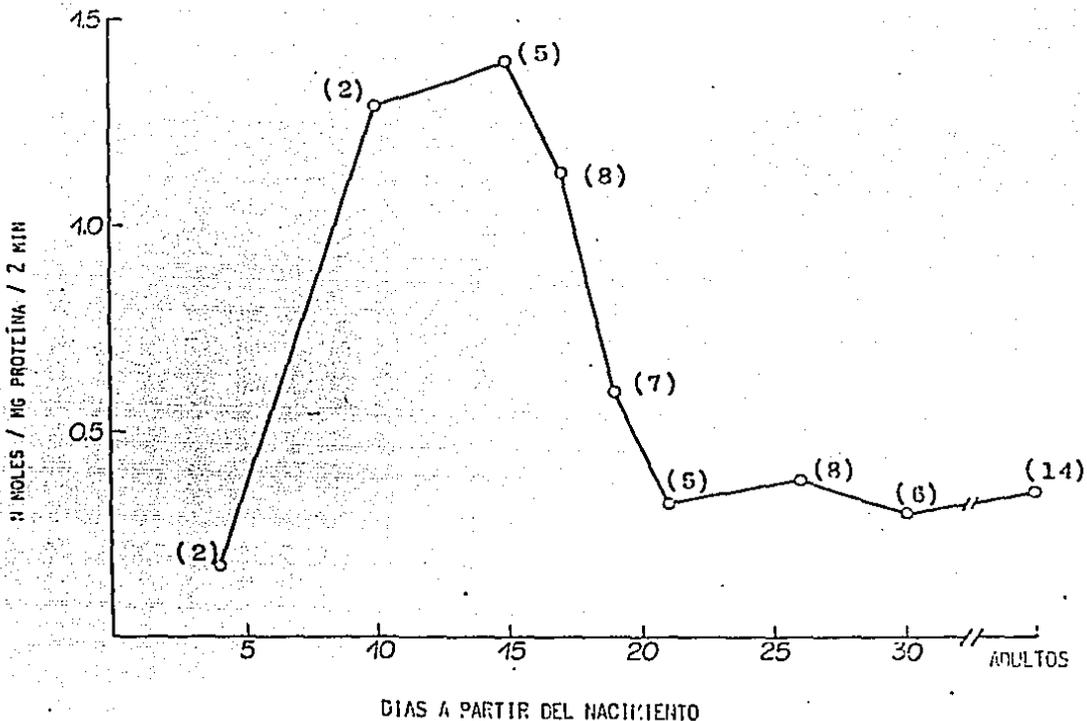


Figura 11.- Captura dependiente de sodio de $[^{14}\text{C}]$ -ácido glutámico en el cerebelo en desarrollo.-

Se midió la captura de $[^{14}\text{C}]$ -ácido glutámico en la fracción mitocondrial cruda (P_2) de cerebelos de ratas de 4, 10, 15, 17, 19, 21, 26 y 32 días postnatales y adultos. Los experimentos fueron realizados por duplicado; a cada valor se le restó la captación medida en un medio sin sodio.

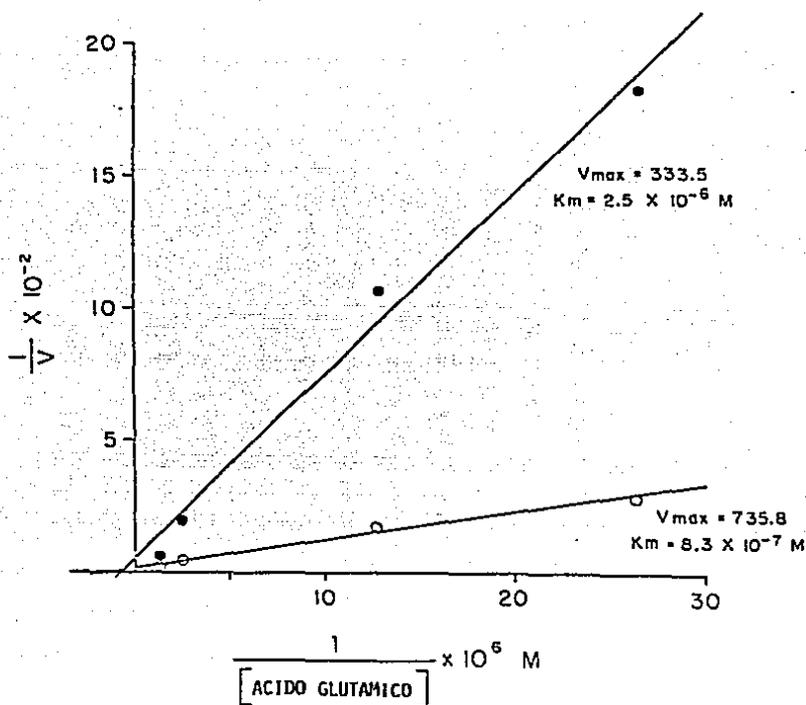


Figura 12 .- Gráfica doble recíproca de la captura de ^{14}C - ácido glutámico.

La captura de ^{14}C -ácido glutámico fue medida en la fracción mitocondrial cruda (P_2) de cerebelo completo de ratas adultas (o) y de ratas de 15 días postnatales (o). La velocidad (v) está expresada como $\mu\text{mol} / \text{mg}$ de proteínas / 2 minutos. Cada punto representa la media de 4 a 6 determinaciones, cada una por duplicado (modificado de Sandoval y cols., 1984).

c.- Captura de glutamina durante el desarrollo.

La captura de glutamina en homogenados de la capa molecular del cerebelo de ratas, presenta un componente independiente de sodio y otro dependiente de sodio que se observan mejor en los animales adultos (figura 13).

En un experimento por duplicado, la captura independiente de sodio de glutamina incubando la preparación 5 minutos a 0 °C tuvo un valor de 20 % con respecto a la misma captura a 37 °C en el mismo tiempo.

La captura de glutamina dependiente de sodio aparece después de los 15 días de edad y aumenta hasta los 22 días postnatales, a partir de los cuales los valores de esta captura se estabilizan. En la figura 14 se muestra que la captura dependiente de sodio de glutamina, tiene un incremento que depende de la edad de los animales que se utilizan para la preparación.

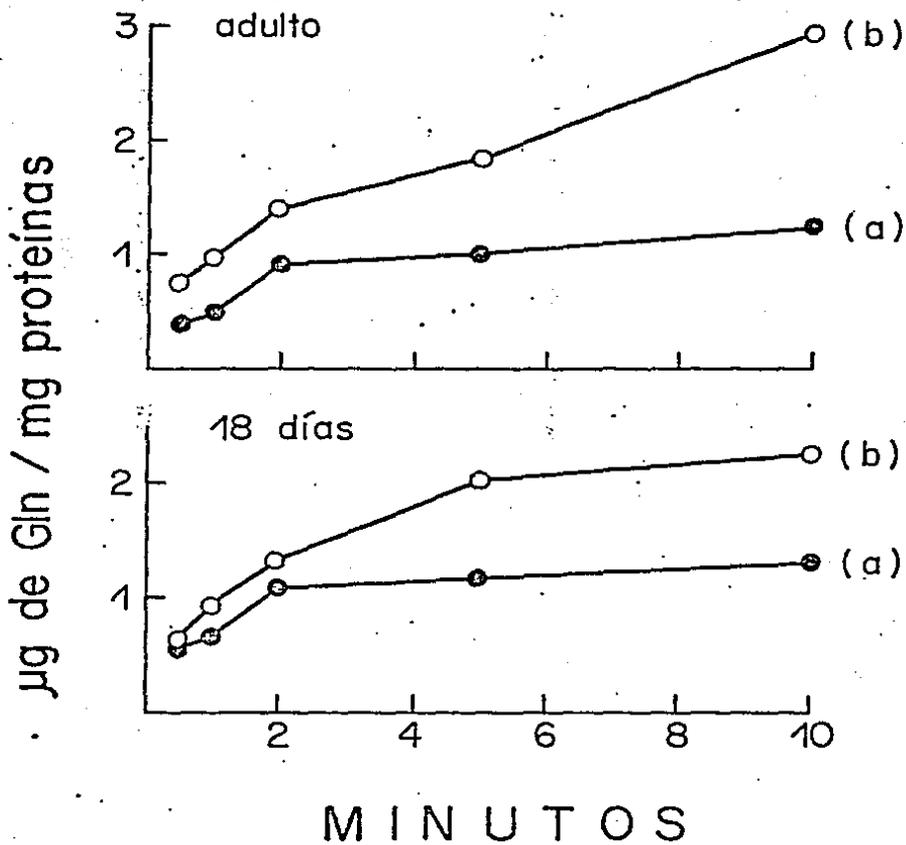


Figura 13 .- Captura de glutamina en el tiempo.

Incubando al tejido con 0.2 μ M de glutamina marcada, se midió la captura de este aminoácido en medio sin sodio (a) y en medio Krebs-bicarbonato (b). Los experimentos fueron realizados por duplicado. El número de datos es de 2 para los tiempos de incubación de 30 segundos y 1 minuto en adultos y 18 días; en los experimentos de 2, 5 y 10 minutos, - la n es de 4 para los animales de 18 días y 7 para los adultos.

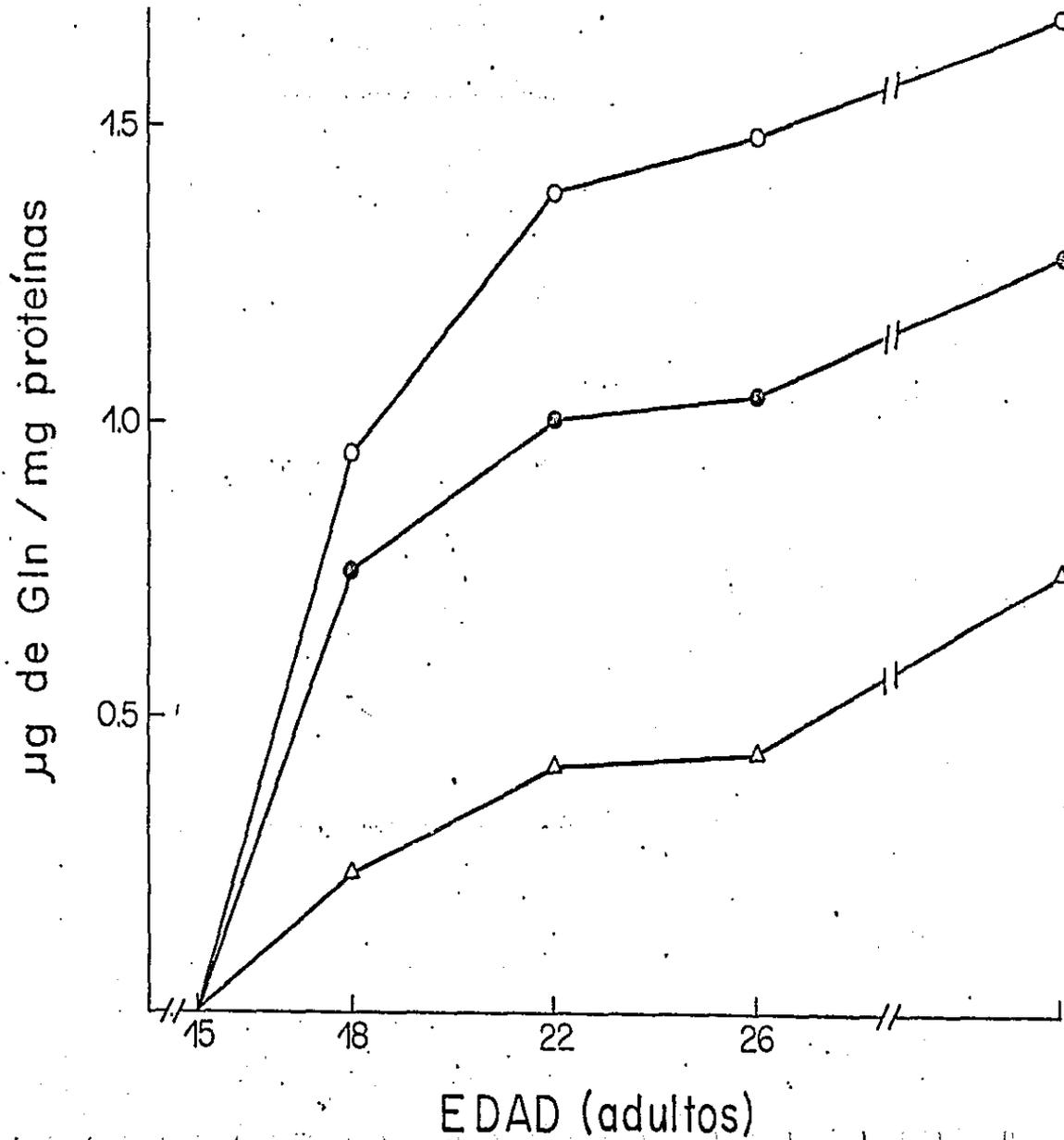


Figura 14 .- Captura dependiente de sodio de ^3H glutamina en la capa molecular del cerebelo de ratas en desarrollo.

La figura representa el incremento en la captura de glutamina que provoca la presencia de sodio en el medio de incubación, en homogenizados de capa molecular de cerebelo de ratas de 15, 18, 22 y 26 días postnatales y adultos. Para los animales adultos se hicieron 7 experimentos, en el reato de los animales se hicieron 3 a 4 experimentos, cada uno por duplicado.

VI.- Discusión.

Para definir a una sustancia como un neurotransmisor se deben tomar en cuenta una serie de criterios, los que fueron enunciados en la sección de antecedentes. Los criterios que en el consenso de la investigación neurobiológica han tenido mayor importancia son el criterio de identidad de acción y el criterio de identidad farmacológica. Sin embargo, las evidencias experimentales muestran que es difícil relacionar al efecto de la aplicación del ácido glutámico con un cambio bioeléctrico específico (relativo a la permeabilidad a un ion o a patrones postsinápticos de disparo). Por otra parte, no se conocen aún antagonistas específicos para los diferentes receptores del ácido glutámico, que nos permitan estudiar las respuestas neuronales a la aplicación del ácido glutámico, aunque se hayan hecho avances significativos en este respecto.

Uno de los criterios funcionales que se tienen para definir a una sustancia como neurotransmisor, consiste en que la sustancia en cuestión sea liberada de las terminales sinápticas (Werman, 1966; Orrego, 1972; Usherwood, 1981), esta liberación se debe dar en condiciones de despolarización que permitan la entrada de calcio en las terminales sinápticas (Miledi, 1973).

En un trabajo previo se demostró que existe liberación de ácido glutámico de homogenados la capa molecular de cerebelos de ratas adultas, y que en esa preparación, la liberación del aminoácido se comporta igual tanto si es endógeno como recién capturado por la preparación (Sandoval y Cotman, 1978).

En la parte inicial de este trabajo, se estudió la liberación de los ácidos glutámico, aspártico y GABA de la corteza del cerebelo. Cuando se aplica a la preparación un estímulo despolarizante, se observó un incremento en la liberación de los aminoácidos; este incremento es todavía mayor en presencia de calcio para los aminoácidos glutámico y GABA (figura 7). En los experimentos de liberación de ácido aspártico exógeno, no se observó que la presencia de calcio en el medio de estimulación produjera un aumento en la liberación de este aminoácido (figura 7), lo que sugiere que el ácido aspártico no es utilizado como neurotransmisor en esta preparación. Sin embargo, se ha reportado la liberación dependiente de calcio de ácido aspártico endógeno (Flint y cols., 1981; Wiklund y cols., 1982), lo que sugiere la posibilidad de que la captura de ácido aspártico no se encuentre acoplada al sistema de liberación dependiente de calcio. El papel del ácido aspártico en la corteza del cerebelo no fué investigado en este trabajo.

A partir de los 18 días de edad hasta los animales adultos, la liberación basal de ácido glutámico es similar, mientras que en los animales de 15 días de edad, la

liberación basal de este aminoácido tiene un valor 50 % más alto. Aparentemente, en los animales de 15 días hay una retención menor del ácido glutámico recién capturado que en los animales de mayor edad (figura 8).

La liberación de ácido glutámico exógeno, evocada por estimulación en presencia de calcio, fué medida en ratas de 15, 17, 19, 21, 26 y 32 días de edad y adultos; el paradigma experimental se propuso correlacionar la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas con la liberación sináptica evocada de ácido glutámico de la corteza del cerebelo. Aunque en la corteza del cerebelo de las ratas la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas se observa desde el día 12 postnatal, los animales de menor edad en los que la disección de la capa molecular se podía realizar sin contaminantes de otras capas, fueron los de 15 días, por lo que los experimentos de liberación fueron realizados en ratas de 15 días postnatales en adelante.

La liberación de ácido glutámico exógeno, que se obtiene por la estimulación con potasio (56 mM) en presencia de calcio (2 mM), aumenta de manera importante de las preparaciones obtenidas de los animales de 15 días a las de los animales de 21 días; en los experimentos realizados con animales de 21 días de edad en adelante, la liberación alcanza valores semejantes a los medidos en las preparaciones de los animales adultos (figura 9a).

Este incremento en la liberación de ácido glutámico estimulada por despolarización, ocurre en el lapso temporal

en el que se desarrollan las sinapsis de las fibras paralelas, y apoyan la hipótesis de que el ácido glutámico tiene funciones de neurotransmisor en este sistema. Por otro lado, es interesante que la liberación dependiente de calcio de ácido glutámico, provocada por la estimulación con veratrina, que tiene un efecto despolarizante basado en la entrada de los iones de sodio en las neuronas, es muy parecida a la liberación provocada por potasio durante el desarrollo (figura 9b). Esto indica que la liberación de ácido glutámico es independiente de la forma de la estimulación, aunque sí es dependiente de la entrada de calcio en las terminales como sucede con la liberación fisiológica.

El metabolismo del ácido glutámico no fué inhibido en los experimentos de liberación, por lo que estudiamos la recuperación de este aminoácido después de los experimentos. La recuperación del ácido glutámico en los animales adultos es similar a la recuperación de este aminoácido en los animales de 15 días, lo que nos permite suponer que la liberación dependiente de calcio de ácido glutámico estudiada durante el desarrollo, tiene su diferencia en base a la formación de las sinapsis de las fibras paralelas y no en base al diferente metabolismo de este aminoácido (Sandoval y cols., 1964).

Como control de los experimentos de liberación de ácido glutámico, estudiamos la liberación de GAEA en animales de 15 días y adultos. Encontramos que la liberación dependiente

de calcio de GABA aumenta en 25 % al comparar los animales de 15 días con los adultos, lo que sugiere que la mayoría de las sinapsis que utilizan GABA se encuentran ya formadas hacia los 15 días de edad (figura 10). Estos datos correlacionan con la descripción del desarrollo de las sinapsis inhibitorias en el cerebelo (Altman, 1972a, 1972b y 1972c).

La captura de ácido glutámico mediante un mecanismo de alta afinidad, dependiente de sodio y de energía, ha sido una parte importante en los estudios que intentan demostrar la función del ácido glutámico como neurotransmisor (Fonnum y Storm-Mathisen, 1981). Nosotros medimos la captura del ácido glutámico durante el desarrollo del cerebelo. La preparación utilizada fué la fracción mitocondrial cruda de cerebelo completo, debido a que la actividad de captura de ácido glutámico era similar en esta preparación a los valores medidos en homogenados de la capa molecular de animales de 15 días y adultos. Por otro lado, esta preparación nos permitió estudiar la captura de ácido glutámico en animales de 4 y 10 días de edad en los que la disección de la capa molecular no se puede realizar.

La preparación de la fracción mitocondrial cruda de cerebelo completo, intenta reflejar lo que ocurre con la captura de ácido glutámico en la capa molecular durante el desarrollo; en estudios de captura de ácido glutámico mediante autorradiografía, se encontró que la captura se

localiza principalmente en la capa molecular (De Barry y cols., 1982).

La curva de captura de ácido glutámico durante el desarrollo del cerebelo, muestra un incremento hacia el final de la segunda semana de vida postnatal (figura 11). Esta curva es similar a la reportada en una preparación de sinaptosomas de cerebelo (Sharif y Roberts, 1984).

El desarrollo máximo de la captura de ácido glutámico no correlaciona con la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas, sino con el período de aparición de las células gliales (Altman, 1972b). El decremento posterior en la captura del ácido glutámico pudiera estar dado por la desaparición de sinápsis transitorias durante el desarrollo y con esto la desaparición de la envoltura glial (Altman, 1972b). Otra posibilidad es que la captura se lleve a cabo en las células germinales, aunque en un estudio con autorradiografía, se mostró que la captura de ácido glutámico [^3H] se localiza en la capa molecular y se relaciona con las células gliales (De Barry y cols., 1982). Para resolver este aspecto, se requiere hacer un estudio sistemático de la captura de ácido glutámico en el cerebelo durante el desarrollo con técnica de autorradiografía.

Los estudios de captura mediante el análisis de Lineweaver-Burk, producen K_m 's aparentes de $2.5 \times 10^{-6}\text{M}$ para los animales adultos y $8.3 \times 10^{-7}\text{M}$ para los animales de 15 días, mientras que la V_{max} disminuye a menos de la mitad entre los animales de 15 días y los adultos (figura

12). Con estos resultados, es probable que el transportador del ácido glutámico sea el mismo en los animales de 15 días y los adultos mientras que el número de sitios de transporte disminuye con la edad.

La glutamina es el precursor principal de ácido glutámico que se libera de las terminales nerviosas por despolarización (Bradford y cols., 1978; Hamberger y cols., 1979a).

En la última parte de este trabajo, estudiamos la captura de glutamina en homogenados de la capa molecular durante el desarrollo del cerebelo. Encontramos que la captura de glutamina tiene un componente dependiente de sodio y otro componente independiente de sodio. El componente dependiente de sodio no se observa en los animales de 15 días de edad, aparece hacia los 18 días y tiene un incremento hasta los animales adultos. Esta curva correlaciona con la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas, sugiriendo que el sistema de captura de glutamina dependiente de sodio se encuentre localizado en estas sinapsis.

Desafortunadamente no fué posible caracterizar el sistema de captura de glutamina. En un experimento, mostró que es dependiente de temperatura, lo que sugiere que sea probablemente un mecanismo de transporte activo. Las constantes cinéticas de la captura de glutamina, están pendientes de ser estudiadas.

VII .- Conclusiones.

- 1.- En la rata, la liberación dependiente de calcio de ácido glutámico de la capa molecular del cerebelo, tiene una correlación temporal con la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas durante el desarrollo, lo que apoya a la función del ácido glutámico como el probable neurotransmisor de las fibras paralelas.
- 2.- La captura de ácido glutámico mediante un mecanismo de alta afinidad no se relaciona temporalmente con la aparición de las sinapsis de las fibras paralelas. Su correlación probable es con la aparición de las células gliales, aunque se requieren más experimentos para descartar la participación de otras células en la maduración de este sistema de captura.
- 3.-La glutamina parece ser el principal precursor del ácido glutámico que se libera de las terminales nerviosas. Encontramos que en concentraciones de glutamina en el medio de incubación de 0.2 mM, es posible encontrar un sistema de captura independiente de sodio, que no varía durante el desarrollo, y un sistema de captura de glutamina que requiere de la presencia de sodio en el medio de incubación y sigue el curso de aparición de las sinapsis de las fibras paralelas en la corteza del cerebelo. Esto sugiere que este sistema se localice en las terminales sinápticas.

Bibliografía.

- Abdul-Ghani, A.S., Bradford, H.F., Cox, D.W.G., y Dodd, - P.R. (1979). Peripheral sensory stimulation and the release of transmitter amino acids in vivo from specific regions of cerebral cortex. *Brain Res.* 171: 55-66.
- Altman, J. (1972a). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external molecular layer and the transitional molecular layer. *J. Comp. Neur.* 145: 353-398.
- Altman, J. (1972b). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J. Comp. Neur.* 145: 399-464.
- Altman, J. (1972c). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neur.* 145: 465-514.
- Altschuler, R.A., Wenthold, R.J., Schuartz, A.M., Haser, W.G., Curthoys, N.P., Parakhal, M.H., y Fex, J. (1984). Immunocytochemical localization of glutaminase-like immunoreactivity in the auditory nerve. *Brain Res.* 291: 173-178.
- Armstrong, D.M. (1974) Functional significance of the inferior olive. *Physiol. Rev.* 54: 358-417.
- Balcar, V.J., y Johnston, G.A.R. (1972a). Glutamate uptake by brain slices and its relation to the depolarization of neurones by acidic amino acids. *J. Neurobiol.* 3: 295-301.
- Balcar, V.J., y Johnston, G.A.R. (1972b). The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.* 19: 2657-2666.

- Balcar, V.J., y Johnston, G.A.R. (1975). High affinity up take of L-glutamate in rat brain slices. J. Neurochem. 24: 875-879.
- Balcar, V.J., Johnston, G.A.R., y Twitchin, B. (1977). Stereospecificity of the inhibition of L-glutamate and L-aspartate high affinity uptake in rat brain slices by threo-3-hydroxyaspartate. J. Neurochem. 28:1145-1146.
- Balázsz, R., y Haslam, R.J. (1965). Exchange transamination and the metabolism of glutamate in brain. Biochem. J. 94: 131-141.
- Barber, R.P., Vaughn, J.E., Saito, K., Mc Laughlin, B.J., y Roberts, E. (1978). GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. Brain Res. 141: 35-55.
- Baxter, C.F. (1970). Handbook of Neurochemistry, Vol. 3, pags 289-353. Editor: Abel Lajtha. Plenum Press.
- Beaudet, A., y Sotelo, C. (1980). Synaptic remodeling of serotonin axon terminals in rat agranular cerebellum. Brain Res. 206: 305-330.
- Benjamin, A.M., y Quastel, J.H. (1976). Cerebral uptakes and exchange diffusion in vitro of L- and D- glutamates. J. Neurochem. 26: 431-441.
- Benjamin, A.M., Verjee, Z.H., y Quastel, J.H. (1980). Kinetics of cerebral uptake processes in vitro of L-glutamine, branched-chain L-amino acids, and L-phenylalanine: effects of ouabain. J. Neurochem. 35: 67-77.
- Bennett, J.P., Mulder, A.H., y Snyder, B.H. (1974). Neurochemical correlates of synaptically active amino acids. Life Sci. 15: 1045-1056.

Beckstead, R.M. (1979). Convergent prefrontal and nigral projections to the striatum of the rat. *Neurosci. Lett.* 12: 59-64.

Bloom, F.E., Hoffer, B.J., y Siggins, 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.

Bloom, F.E., Hoffer, B.J., Siggins, G.R., Barker, J.L., y Nicoll, R.A. (1972). Effects of serotonin on central neurons: microiontophoretic administration. *Fed. Proc.* 31: 97-106.

Bloom, F.E., y Steiner, A.L. (1973). Noradrenergic stimulation of cyclic adenosine monophosphate in rat Purkinje neurons: an immunocytochemical study. *Science.* 179: 585-588.

Bradford, H.F. (1970). Metabolic response of synaptosomes to electrical stimulation: release of amino acids. *Brain Res.* 19: 239-247.

Bradford, H.F., Bennett, G.W., Thomas, A.J. (1973). Depolarizing stimuli and the release of physiologically active amino acids from suspensions of mammalian synaptosomes. *J. Neurochem.* 21: 495-505.

Bradford, H.F., y Richards, C.D. (1976). Specific release of endogenous glutamate from piriform cortex stimulated in vitro. *Brain Res.* 105: 168-172.

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

Bradford, H.F., Ward, H.K., y Thomas, A.J. (1978). Glutamine, a major substrate for nerve endings. *J. Neurochem.* 30: 1453-1459.

- Brand, M.D., y Chappel, J.B. (1974). Glutamate and aspartate transport in rat brain mitochondria. *Biochem. J.* 140: 205-210.
- Brodal, A. (1981). *Neurological Anatomy*. Oxford University Press.
- Campbell, G. LeM., y Shank, R.P. (1978). Glutamate and GABA uptake by cerebellar granula and glial cell: enriched populations. *Brain Res.* 153: 618-622.
- Chujo, T., Yamada, Y., y Yamamoto, C. (1975). Sensitivity of Purkinje cell dendrites to glutamic acid. *Exper. Brain Res.* 23: 293-300.
- Clark, R.M., y Collins, G.G.S. (1975). The spontaneous and potassium-evoked release of endogenous amino acids from the mammalian visual cortex. *J. Physiol.* 246: 16-17.
- Cooper, A.J.L., Mc Donald, J.M., Gelbard, A.S., Gledhill, R.F., y Duffy, T.E. (1979). The metabolic fate of ^{13}N -labeled ammonia in rat brain. *J. Biol. Chem.* 254: 4982-4992.
- Crepel, P., Dhanjal, S.S., y Sears, T.A. (1982). Effect of glutamate, aspartate and related derivatives on cerebellar Purkinje cell dendrites in the rat: an in vitro study. *J. Physiol.* 329: 297-317.
- Curtis, D.R. (1979). Problems in the evaluation of glutamate as a central nervous system transmitter. Libro: *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology*. Editores: Filer Jr. L.J. Raven Press.
- Curtis, D.R., Duggan, A.W., Felix, D., Johnston, G.A.R., Tebecis, A.K., y Watkins, J.C. (1972). Excitation of mammalian central neurones by acidic amino acids. *Brain Res.* 41: 283-301.

Curtis, D.R., Duggan, A.W., y Johnston, G.A.R. (1970). The inactivation of extracellularly administered amino acids in the feline spinal cord. *Exp. Brain Res.* 10: 447-462.

Curtis, D.R., Phillis, J.W., y Watkins, J.C. (1960). The chemical excitation of spinal cord neurones by certain acidic amino acids. *J. Physiol.* 150: 656-682.

Curtis, D.R., y Watkins, J.C. (1960b). The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* 6: 117-141.

Curtis, D.R., Perrin, D.D., y Watkins, J.C. (1960c) The excitation of spinal neurones by the ionophoretic application of agents with chelate calcium. *J. Neurochem.* 6: 1-20.

Curtis, D.R., y Watkins, J.C. (1963). Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *J. Physiol.* 166: 1-14.

Davies, L.P., y Johnston, G.A.R. (1976). Uptake and release of D- and L- aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.* 26: 1007-1014.

Davies, J., y Watkins, J.C. (1977). Effects of magnesium ions on the responses of spinal neurones to excitatory amino acids and acetylcholine. *Brain Res.* 130: 364-368.

Davies, J., y Watkins, J.C. (1979). Selective antagonism of amino acid-induced and synaptic excitation in the cat spinal cord. *J. Physiol.* 297: 621-635.

De Belleruche, J., y Bradford, H.F. (1972). Metabolism of beds of mammalian cortical synaptosomes: response to depolarizing influences. *J. Neurochem.* 19: 585-602.

De Barry, J., Langley, O.K., Vincendon, C., y Gombos, G. (1982). L-glutamate and L-glutamine uptake in adult rat

cerebellum: an autoradiographic study. Neuroscience. 7: 1289-1297.

Dennis, S.C., y Clark, J.B. (1977). The pathway of glutamate metabolism in rat brain mitochondria. Biochem. J. 168: 521-527.

Dennis, S.C., Lai, J.C.K., y Clark, J.B. (1980). The distribution of glutamine synthetase in subcellular fractions of the rat brain. Brain Res. 197: 469-475.

Descarries, L., Watkins, K.C., y Lapierre, Y. (1977). Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of the rat. III. Topometric ultrastructural analysis. Brain Res. 133: 197-222.

Divac, I., Fonnum, F., y Storm-Mathisen, J. (1977). High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. Nature. 266: 377-378.

Dupont, J.L., Fournier, E., Gardette, R., y Crepel, F. (1984). Effect of excitatory amino acids on Purkinje cell dendrites in cerebellar slices from normal and Staggerer mice. Neuroscience. 12: 613-619.

Dodd, P.R., y Bradford, H.F. (1976). Release of amino acids from the maturing cobalt induced epileptic focus. Brain Res. 111: 377-388.

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.

Eccles, J.C., Ito, M., y Szentagothai, J. (1967). The cerebellum as a neuronal machine. Springer, New York.

Evans, H.R., Francis, A.A., y Watkins, J.C. (1977). Selective antagonism by Mg^{2+} of amino acid-induced depolariza-

tion of spinal neurones. *Experientia* (Basel) 33: 489-491.

Evans, H.R., Francis, A.A., y Watkins, J.C. (1978). Mg²⁺-like selective antagonism of excitatory amino acid-induced responses by α -diaminopimelic acid, D- α -aminoadipate and HA-966 in isolated spinal cord of frog and immature rat. *Brain Res.* 148: 563-542.

Fagg, G.E. (1985). L-glutamate, excitatory amino acid receptors and brain function. *Trends in Neuroscience*, may. 1985, 207-210.

Fagg, J.E., Jordan, C.C., y Webster, R.A. (1978). The release of endogenous amino acids from the cat spinal cord in vivo. *British J. Pharmacol.* 58: 440-441.

Falck, B., Hillarp, N.A., Thieme, G., y Thorp, A. (1962). Fluorescence of catecholamines and related compounds with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* 10: 348-354.

Flint, R.S., Rea, N.A., y Mc Bride; W.J. (1981). In vitro release of endogenous amino acids from granule cell- stellate cell- and climbing fiber- deficient cerebella. *J. Neurochem.* 37: 1425-1430.

Fonnum, F., y Malthe-Sørensen, D. (1981). Localization of glutamate neurons. Libro: *Glutamate: Transmitter in the Central Nervous System*. Edit: Roberts, P.J. John Wiley & Sons.

Fonnum, F., Storm-Mathisen, J., y Divac, I. (1981). Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in the cortico-striatal and cortico-thalamic fibers in rat brain. *Neuroscience* 6: 863-875.

Foster, A.C., y Roberts, P.J. (1978). High affinity L-³H-glutamate binding to postsynaptic receptor sites on rat

cerebellar membranes. *J. Neurochem.* 34: 1467-1476.

Foster, A.C., y Roberts, P.J. (1980). Endogenous amino - acid release from rat cerebellum in vitro. *J. Neurochem.* 35: 517-519.

Fricke, U. (1975). Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Analyt. Biochem.* 63: 555-558.

Hamberger, A.C., Chiang, G.H., Nylén, E.S., Scheff, S.W., y Cotman, C.W. (1979a). Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Res.* 168: 513-530.

Hamberger, A., Chiang, G.H., Sandoval, E., y Cotman, C.W. (1979b). Glutamate as a CNS transmitter. II. Regulation of synthesis in the releasable pool. *Brain Res.* 168: 531-541.

Hamberger, A., Chiang, G.H., Nylén, E.S., Scheff, S.W., y Cotman, C.W. (1978). Stimulus evoked increase in the biosynthesis of the putative neurotransmitter glutamate in the hippocampus. *Brain Res.* 143: 549-555.

Hammerstad, J.P., y Cutler, R.W.P. (1972). Sodium ion movements and the spontaneous and electrically stimulated release of ^3H GABA and ^{14}C glutamic acid from rat cortical slices. *Brain Res.* 47: 401-413.

Hicks, T.P., y Mc Lennan, H. (1979). Amino acids in the synaptic pharmacology of granule cells in the dentate gyrus of the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 973-978.

Hockfelt, T., y Fuxe, K. (1969). Cerebellar monoamine nerve terminals a new type of afferent fibers to the cortex cerebelli. *Exp. Brain Res.* 9: 63-72.

Haldeman, S., y Mc Lennan, H. (1973). The actions of two inhibitors of glutamic acid uptake upon amino acid-induced and synaptic excitations of thalamic neurones. Brain Res. 63: 123-129.

Hösli, L., y Hösli, E. (1978). Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 81: 136-188.

Jasper, H.H., Khan, R.D., y Eliot, K.A.C. (1965). Amino acids release from cerebral cortex in relation to its state of activation. Science 147: 1448-1449.

Johnston, G.A.R. (1981). Libro: Glutamate: transmitter in the Central Nervous System. Edit: Roberts, P.J., Storm-Mathisen, J., y Johnston, G.A.R. John Wiley & Sons.

Katz, R.L., Chase, T.W., y Kopin, L.J. (1969). Effects of ions on stimulus-induced release of amino acids from mammalian brain slices. J. Neurochem. 16: 961-967.

Kerpel-Fronius, S., Beck, D.P., y Von Korff, R.W. (1977). Studies on the metabolism of glutamate and glutamine by mitochondria from rabbit brain: complications due to isotopic exchange reactions. J. Neurochem. 28: 871-875.

Krnjevic, K. (1970) Glutamate and γ -aminobutyric acid in brain. Nature 228: 119-124.

Krnjevic, K. (1974). Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. Physiol. Rev. 54: 418-540.

Krnjevic, K., y Phillis, J.W. (1963). Ionophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. J. Physiol. 165: 274-304.

Kuriyama, K., Haber, B., Siskin, B., y Roberts, E. (1966). The GABA system in rabbit cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55: 846.

- Kvamme, E. (1983). Ammonia metabolism in the CNS. Progress in Neurobiol. 20: 109-132.
- Kvamme, E., y Olsen, B.E. (1981). Evidence for compartmentation of synaptosomal phosphate activated glutaminase. J. Neurochem. 36:1916-1923.
- Kvamme, E., Svenneby, G.S., Hertz, L., y Schousboe, A. (1982). Properties of phosphate activated glutaminase in astrocytes cultured from mouse brain. Neurochem. Res. 7: 761-770.
- Lacoste, L., Chaudhary, K.D., y Lapointe, J. (1982). Derepression in the glutamine syntetase in neuroblastoma cells at low concentrations of glutamine. J. Neurochem. 39: 78-85.
- Levi, W.B., Redburn, D.A., y Cotman, C.W. (1973). Stimulus-coupled secretion of δ -aminobutyric acid from rat brain synaptosomes. Science 181: 676-678.
- Llinás, R.R., y Simpson, J.I. (1981). Cerebellar control of movement. en Handbook of behavioral neurobiology. Vol. 5. Edit: Towe. Plenum Press.
- Lodge, D. (1979). L-histidine: effects on sensitivity of cat spinal neurones to amino acids. Neurosci. Lett. 14: 171-176.
- Logan, W.J., y Snyder, S.H. (1972). High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous system. Brain Res. 42: 413-431.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol agent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- Lund-Karlsen, R., y Ponnum, F. (1978). Evidence for glutamate as a neurotransmitter in the corticofugal fibres to the dorsal lateral geniculate body and the superior colliculus in rats. *Brain Res.* 151: 457-467.
- Mc Bride, W.J., Nadi, N.S., Altman, J., y Aprison, M.H. (1976). Effects of selective doses of X-irradiation on the levels of several amino acids in the cerebellum of the rat. *Neurochem. Res.* 7: 141-152.
- Mc Laughlin, B.J., Wood, J.G., Saita, K., Barber, R., Vaugh, J.E., Roberts, E., y Wu, J.Y. (1974). The fine structural localization of glutamate decarboxylase in synaptic terminals of rodent cerebellum. *Brain Res.* 76: 377-392.
- Mc Lennan, H., y Lodge, D. (1979). The antagonism of amino acid-induced excitation of spinal neurones in the cat. *Brain Res.* 169: 83-90.
- Meibach, R.C., y Siegel, A. (1977). Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res.* 124: 197-224.
- Michaelis, E.K., Michaelis, M.L., Chang, H.H., Grubbs, R.D. y Kuonen, D.R. (1981). Molecular characteristics of glutamate receptors in the mammalian brain. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 38: 163-179.
- Miledi, R. (1973). Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 183: 421-425.
- Minard, F.N., y Richter, D. (1968). Electroshock-induced seizures and the turnover of brain protein in the rat. *J. Neurochem.* 15: 1463-1468.
- Mulder, A.H., y Snyder, S.H. (1974). Potassium-induced

release of amino acids from cerebral cortex and spinal cord slices of the rat. Brain Res. 76: 297-308.

Nadler, J.V., White, W.F., Vaca, K.W., Redburn, D.A., y Cotman, C.W. (1977), Characterization of putative amino acid transmitter release from slices of rat dentate gyrus. J. Neurochem. 29: 279-290.

Orrego, F. (1979). Criteria for the identification of central neurotransmitters, and their application to studies with some nerve tissue preparations in vitro. Neuroscience 4: 1037-1057.

Patel, A.J., Hunt, A., y Tahourdin, C.S.M. (1983a). Regulation of in vivo glutamine synthetase activity by glucocorticoids in the developing rat brain. Devel. Brain Res. 10: 83-91.

Patel, A.J., Hunt, A., y Tahourdin, C.S.M. (1983b). Regional development of glutamine synthetase activity in the rat brain and its association with the differentiation of astrocytes. Devel. Brain Res. 8: 31-37.

Phelps, M.E., Huang, S.C., Hoffman, E.J., Selin, C., y Kuhi, D.E. (1981). Cerebral extraction of N-13 ammonia: its dependence on cerebral blood flow and capillary permeability surface area product. Stroke. 12: 607-619.

Ramaharobandro, N., Borg, J., Mandel, P., y Mark, J. (1982). Glutamine and glutamate transport in cultured neuronal and glial cells. Brain Res. 244: 113-121.

Ramón y Cajal, S. (1911). Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des vertébrés. Edit: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 1972.

Reubi, J.C., y Cuenod, M. (1979). Glutamate release in vitro from cortico-striatal terminals. Brain Res. 176: 185-188.

Rhode, B.H., Rea, M.A., Simon, J.R., y Mc Bride, W.J. (1979). Effects of X-irradiation induced loss of cerebellar granule cells on the synaptosomal levels and the high affinity uptake of amino acids. *J. Neurochem.* 32: 1431-1435.

Roberts, P.J. (1974). Amino acid release from isolated rat dorsal root ganglia. *Brain Res.* 74: 327-332.

Roffler-Tarlov, S., y Sidman, R.L. (1978). Concentrations of glutamic acid in cerebellar cortex and deep nuclei of normal mice and Weaver, Staggerer and Nervous mutants. *Brain Res.* 142: 269-283.

Roskoski Jr., R. (1979). Net uptake of aspartate by a high affinity rat cortical synaptosomal transport system. *Brain Res.* 160: 85-93.

Roberts, P.J., y Watkins, J.C. (1975). Structural requirements for the inhibition of L-glutamate uptake by glia and nerve endings. *Brain Res.* 85: 120-125.

Rowlands, G.J., y Roberts, P.J. (1980). Specific calcium-dependent release of endogenous glutamate from rat striatum is reduced by destruction of the cortico-striatal tract. *Experim. Brain Res.* 39: 239-240.

Roach, M.K., Davis, D.L., Pennington, W., y Norkyke, E. (1973). Effect of ethanol on the uptake by rat brain synaptosomes of ^3H -D L- norepinephrine, ^3H 5-hydroxytryptamine, ^3H GABA and ^3H glutamate. *Life Sci.* 12: 433-441.

Sandoval, M.E., y Cotman, C.W. (1978). Evaluation of glutamate as a neurotransmitter of cerebellar parallel fibers. *Neuroscience.* 3: 199-206.

Sandoval, M.E., Torner, C.A., y Medrano, L. (1984). High affinity uptake and Ca^{++} -dependent release of glutamic

acid in the developing cerebellum. *Neuroscience*. 11: 867-875.

Shank, R.P., y Campbell, G.L. (1983). Glutamate. Libro: *Handbook of Neurochemistry*. Vol. 3. Edit. Abel Lajtha. Plenum Press.

Sharif, N.A., y Roberts, P.J. (1984). Neurochemical, pharmacological, and developmental studies on cerebellar receptors for dicarboxylic amino acids. *Neurochem. Res.* 9: 81-101.

Shinnar, S., Maciewicz, R.J., y Shoter, R.J. (1973). A raphe projection to cat cerebellar cortex. *Brain Res.* 97: 139-143.

Siggins, G.R., Battenberg, E.F., Hoffer, B.J., Bloom, F.E., y Steiner, A.L. (1973). Noradrenergic stimulation of cyclic adenosine monophosphate in rat Purkinje neurons: an immunocytochemical study. *Science*. 179: 585-588.

Seiler, N., y Sichertopf, B. (1975). 4-aminobutyrate in mammalian putrescine catabolism. *Biochem. J.* 152: 201-210.

Spencer, H.J. (1976). Antagonism of cortical excitation of striatal neurons by glutamic acid diethylester: evidence for glutamic acid as an excitatory transmitter in the rat striatum. *Brain Res.* 102: 91-101.

Storm-Mathisen, J. (1977). Glutamic acid and excitatory nerve endings: reduction of glutamic acid uptake after axotomy. *Brain Res.* 120: 379-386.

Storm-Mathisen, J., e Iversen, L.L. (1979). Uptake of ^3H glutamic acid in excitatory nerve endings. Light and electronmicroscopic observations in the hippocampal formation

of the rat. Neuroscience. 4: 1237-1253.

Streit, P. (1980). Selective retrograde labeling indicating the transmitter of neuronal pathways. J. Comp. Neurol. 191: 429-464.

Swanson, L.W., y Cowan, W.M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. J. Comp. Neurol. 172: 49-84.

Stallcup, W.B., Bulloch, K., y Baetge, E.E. (1979). Coupled transport of glutamate and sodium in a cerebellar nerve cell line. J. Neurochem. 32: 57-65.

Tapia, R. (1980). Glutamine metabolism in brain. En: Glutamine: Metabolism, Enzymology and regulation. Edit: Mora, J. Academia P.

Tapia, R. (1983). δ -aminobutyric acid. Metabolism and biochemistry of synaptic transmission. En: Handbook of Neurochemistry. Edit: Abel Lajtha. Plenum Press.

Tapia, R. (1976). Bases bioquímicas de la transmisión sináptica: neurotransmisores. Bol. Est. Med. Biol. Mex. 29: 149-155.

Tapia, R., y González, R.M. (1978). Glutamine and glutamate as precursors of the releasable pool of GABA in brain cortex slices. Neurosci. Lett. 10: 165-169.

Usherwood, P.N.R. (1969). Nature. 223: 411-413.

citado en:

Usherwood, P.N.R. (1981). Glutamate synapses and receptors on insect muscle. En: Glutamate as a neurotransmitter. Edit: Di Chiara. Raven Press.

Watkins, J.C., Curtis, D.R., y Brand, S.S. (1977). Phosphonic acid analogues as antagonists of amino acid exci-

- tants. J. Pharm. Pharmacol. 29: 324.
- Watkins, J.C., y Evans, R.H. (1981). Excitatory amino acid transmitters. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21: 165-204.
- Weil-Malherbe, H. (1950). Significance of glutamic acid for the metabolism of nervous tissue. Physiol. Rev. 30: 549.
- Werman, R. (1966). Criteria for identification of a central nervous system transmitter. Comp. Biochem. Physiol. 18: 745-766.
- Wherret, R.J., y Tower, D.B. (1971). Glutamyl, aspartyl and amide moieties of cerebral proteins: metabolic aspects in vitro. J. Neurochem. 18: 1027-1042.
- Wiklund, L., Toggenburger, G., and Guénod, M. (1982). Aspartate: Possible neurotransmitter in cerebellar climbing fibers. Science. 216: 78-80.
- Van Der Berg, C.J., Krzalic, L.J., Mela, P., y Waelsch, H. (1969). Compartamentation of glutamate metabolism in brain. Evidence for the existence of two different tricarboxylic acid cycles in brain. Biochem. J. 113: 281-290.
- Van Der Berg, C.J., Matheson, D.F., Ronda, G., Reijnierse, G.L.A., Blokhuis, G.G.D., Kroon, M.L., Clarke, D.D., y Garfinkel, D. (1976). A model of glutamate metabolism in brain: a biochemical analysis of a heterogeneous structure. Libro: Metabolic Compartamentation and Neurotransmitter-Relation to Brain Structure and Function. Edit: Berl, S., Clarke, S., y Schneider, N.Y. Plenum Press.
- Yamamoto, C., y Matsui, S. (1976). Effect of stimulation of excitatory nerve tract on release of glutamic acid from olfactory cortex slices in vitro. J. Neurochem. 26: 487-491.

Young, A.B., Oster-Granite, M.L., Herndon, R.M., y Snyder,
S.H. (1974). Glutamic acid: selective depletion by viral
induced granule cell loss in hamster cerebellum. Brain Res.
73: 1-13.

ANEXO.

Experimentos con tiofeno.

Para relacionar a un neurotransmisor con el funcionamiento de una sinapsis específica, se ha empleado la estrategia de producir una lesión en la vía nerviosa que da lugar a las sinapsis que nos interesan.

En la corteza del cerebelo, se han producido lesiones de las fibras trepadoras y de las fibras paralelas:

La lesión de las fibras trepadoras se consigue mediante la inyección intraperitoneal de 3-acetilpiridina (3-AP; 65 mg/kg de peso) en animales adultos, lo que produce necrosis total de las células de las olivas en 4 días y en ese tiempo, las fibras trepadoras se encuentran totalmente degeneradas, siendo la única lesión visible en la corteza del cerebelo (Desclin y Escubi, 1974).

La lesión de las fibras trepadoras con 3-AP, produjo una disminución en la corteza del cerebelo de ratas, de los niveles de ácido aspártico y de taurina, mientras que el resto de los aminoácidos permaneció sin cambios (Nadi y cols., 1977); en otros experimentos, la lesión con 3-AP produjo una disminución significativa en la liberación del ácido aspártico endógeno de rebanadas de cerebelo de ratas, mientras que la liberación endógena de otros aminoácidos no se alteró de manera significativa (Wiklund y cols., 1982). Estos resultados apoyan la función del ácido aspártico como

el neurotransmisor de las fibras trepadoras, aunque por otro lado, otros autores no han encontrado liberación de ácido aspártico endógeno (Foster y Roberts, 1980) ni exógeno (Sandoval y cols., 1984).

Se ha intentado lesionar al sistema de las fibras paralelas mediante la irradiación focal del cerebelo con rayos X durante las dos primeras semanas de vida postnatal de la rata (dosis de 150 r/día; 50 r/min). Esto produjo una disminución total de las células granulares, y de las células en estrella y en canasta (Altman y Anderson, 1972); además de que alteraba la organización citoarquitectónica del cerebelo y la forma y orientación de las células de Purkinje (Altman y Anderson, 1971, 1972). Aunque la lesión de las fibras paralelas con rayos X produjo una importante disminución de la liberación de ácido glutámico (Sandoval y Cotman, 1978), esta lesión no se consideró lo suficientemente selectiva para correlacionar la disminución de las células granulares con la disminución de la liberación de ácido glutámico.

Otra lesión de las células granulares ha sido estudiada en hamsters inyectándoles el virus PRE 308 al nacimiento, con lo que disminuyen las células granulares de manera selectiva en 95 % (Young y cols., 1974). Esta lesión produjo una disminución en los niveles de ácido glutámico de 43 % y una reducción en la actividad de captura de este aminoácido de 70 % en la corteza del cerebelo de los hamsters tratados (Young y cols., 1974). Estos datos apoyan al ácido glutámico

como el neurotransmisor de las fibras paralelas, sin embargo, la captura de ácido glutámico se encuentra relacionada con las células gliales, por lo que se requiere otro tipo de enfoque experimental para intentar demostrar la función de neurotransmisor del ácido glutámico en la corteza del cerebelo.

Nosotros intentamos producir la lesión selectiva de las células granulares mediante la inyección sistémica de tiofeno, un agente que produce una lesión degenerativa de las células granulares de la corteza del cerebelo de ratas de manera selectiva (Herndon, 1968). Estudiamos la liberación de ácido glutámico [^{14}C] de la corteza del cerebelo de animales tratados con tiofeno con la idea de que la lesión de las células granulares produciría una disminución de la liberación de ácido glutámico. Los resultados tanto morfológicos como bioquímicos indican que el tiofeno no produjo la lesión de las células granulares como había sido reportado.

Material y Métodos.

El tiofeno fué comprado a ICN.Co. Cada lote fué sometido a un estudio de resonancia magnética nuclear, en el que se encontró más del 95 % de pureza (realizado en la División de Estudios Superiores de la Facultad de Química, UNAM, por la Química Ernestina Cervera).

De acuerdo con el esquema de Herndon (1968), el tiofeno fué administrado en ratas Wistar de 175 a 225 gramos; la

dosis fué de 0.2 ml por vía subcutánea, una inyección diaria durante doce días.

Los controles histológicos de la lesión se hicieron en la Unidad de Investigación del IMSS en Guadalajara, en colaboración con el Dr Alfredo Feria Velasco. Después del tratamiento con tiofeno, los animales fueron sacrificados a los 7, 14, 21, 30, 38, 45, 60 y 90 días después de la última inyección. La fijación del sistema nervioso se realizó mediante perfusión intravascular de glutaraldehído (glutaraldehído al 2 % en una solución de fosfatos 0.1 M y sacarosa 1 %) de acuerdo al método de Feria y Karnovsky (1970).

Se efectuaron conteos celulares de la corteza cerebelosa mediante un contador granulométrico automático Zeiss TGZ-III. La celularidad se expresa como número de células de la capa granular por unidad de área de la misma.

Se efectuaron además cálculos de áreas de la corteza cerebelosa mediante el empleo de un planímetro polar de compensación.

Los experimentos de liberación de ácido glutámico se realizaron como fué descrito en Material y Métodos de esta tesis (sección III, b). Los animales empleados para los experimentos de liberación fueron de 14 días después de la última inyección de tiofeno, de acuerdo a que la lesión aparente era mayor en este tiempo (Dr. Alfredo Feria, comunicación personal).

El área total de la corteza del cerebelo así como las demás áreas de la capa granular y la capa molecular fueron medidas 14, 21, 30, 45, 60 y 90 días después de terminar el tratamiento con tiofeno. Las áreas medidas no presentaron variaciones significativas con respecto a las áreas medidas en las ratas control (figura 1).

En la tabla I se muestra el conteo celular en la capa granular; no se encontró disminución de la cantidad de células granulares provocadas por el tratamiento con tiofeno.

El estudio con microscopio óptico de cerebelos tratados con tiofeno, mostró que 30 % de las células de la capa granular presentaron un aumento en el tamaño del núcleo en un 15 a 20 % con respecto al tamaño de los núcleos de las células de los animales control. Estos cambios fueron observables en las ratas hasta 90 días después de finalizar el tratamiento con tiofeno. Se utilizaron 2 animales para cada fecha que se estudió.

No se estudió la degeneración de las fibras paralelas producida por el tiofeno. El resto de las células no mostró cambios microscópicos en las ratas tratadas con tiofeno.

En los experimentos de liberación, se encontró que la liberación de ácido glutámico estaba disminuida de modo general, tanto en la línea basal de liberación como en la liberación inducida por potasio (figura 2). La liberación dependiente de calcio de ácido glutámico no fué modificada por el tratamiento con tiofeno con respecto a los controles.

En los experimentos de liberación estimulando al tejido con veratrina, se encontró una disminución en la liberación dependiente de calcio, pero esta disminución correspondía más a un aumento en la liberación con veratrina en ausencia de calcio en el medio (figura 2).

Discusión.

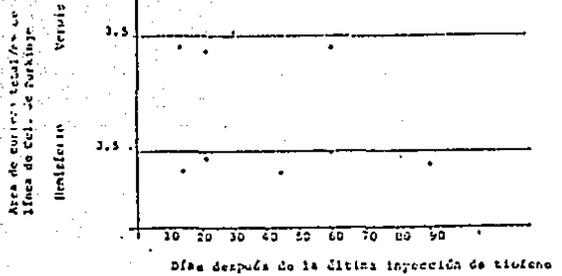
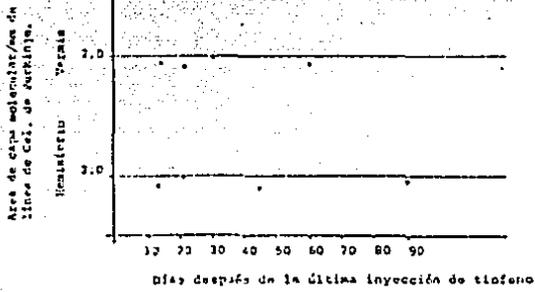
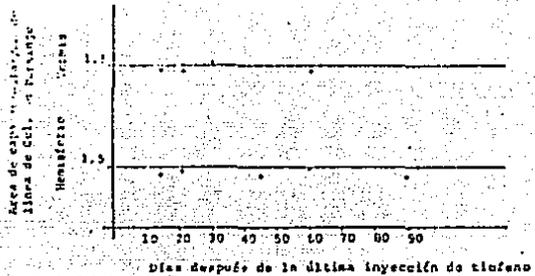
La lesión que se había comunicado que produce el tiofeno en la corteza del cerebelo de ratas, no pudo ser reproducida en nuestro laboratorio.

En las ratas tratadas con tiofeno, el control histológico no mostró disminución en el número de células granulares, lo que contrasta con la comunicación de Herndon (1968); los cambios en la morfología de las células granulares producidos por la lesión con tiofeno fueron: aumento en el tamaño de los núcleos, hinchamiento de las mitocondrias, dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico y aumento en el número de ribosomas (comunicación del Dr Alfredo Feria). Estos cambios fueron observables en todos los animales tratados con tiofeno hasta 90 días después de la última inyección, pero aún en tiempos tan largos post-tratamiento no se encontró disminución celular, por lo que parece que el tiofeno no tuvo toxicidad letal sobre las células granulares en nuestros experimentos.

En los estudios de liberación de ácido glutámico recién capturado, la liberación se encontraba disminuida en la

línea basal así como cuando se estimuló con potasio, tanto en ausencia como en presencia de calcio. La liberación dependiente de calcio, mantuvo niveles similares a los animales control. La liberación dependiente de calcio estimulada por veratrina sí presentó una disminución con respecto a los controles, pero esta disminución se produjo por el incremento de la liberación basal en presencia de veratrina, y no por una disminución de la liberación de la liberación cuando se aplicó el pulso de veratrina con calcio, en la preparación de los animales tratados con tiofeno.

La ausencia de la lesión en las células granulares, nos permite proponer que el tiofeno pudiera tener un efecto farmacológico sobre el tejido, lo que era manifiesto por la disminución generalizada de la liberación de ácido glutámico. Los cambios morfológicos celulares, no fueron los de una lesión letal de las células granulares, por lo que el problema de lesionar selectivamente a las fibras paralelas para conseguir evidencias sobre la función del ácido glutámico como neurotransmisor de este sistema, no fue posible mediante este tratamiento, por lo que decidimos abandonar este proyecto.



Control
Experimental

Figura 1. — Evolución histológica de la lesión producida por tiófeno en la corteza del cerebelo.
El número de animales estudiados varía de 10 a 29 (Reporte del Dr. Alfredo Varón).

		No. de células por campo (15049.60 μm^2)	No. de células totales de capa granulosa	Índice de celularidad de capa granulosa /L de Cel. de Purkinje.
VERMIS CONTROL	18	180 \pm 3.94	102501.06	18271.133
HEMISFERIO CONTROL	11	196 \pm 5.41	80355.624	20446.723
VERMIS 7 días	20	186 \pm 3.60	---	---
HEMISFERIO 7 días	13	226 \pm 7.41	---	---
VERMIS 14 días	14	184.42 \pm 8.54	99013. 502	17100.777
HEMISFERIO 14 días	13	215.6 \pm 9.28	63180.423	19743.882
VERMIS 21 días	29	176.4 \pm 4.53	92132.63	16220.533
HEMISFERIO 21 días	13	194.15 \pm 3.60	68115.56	18409.61
VERMIS 30 días	21	183. 23 \pm 6.9	120046.23	19809.60
HEMISFERIO 30 días	23	206.30 \pm 5.11	---	---
VERMIS 38 días	10	175.2 \pm 8.16	---	---
hemisferio 38 días	2	169 \pm 55	---	---
VERMIS 45 días	16	175.5 \pm 4.16	---	---
HEMISFERIO 45 días	16	207.06 \pm 6.10	55997.11	18420.102

n = número de fotografías o número de campos
L.± longitud.

TABLA I

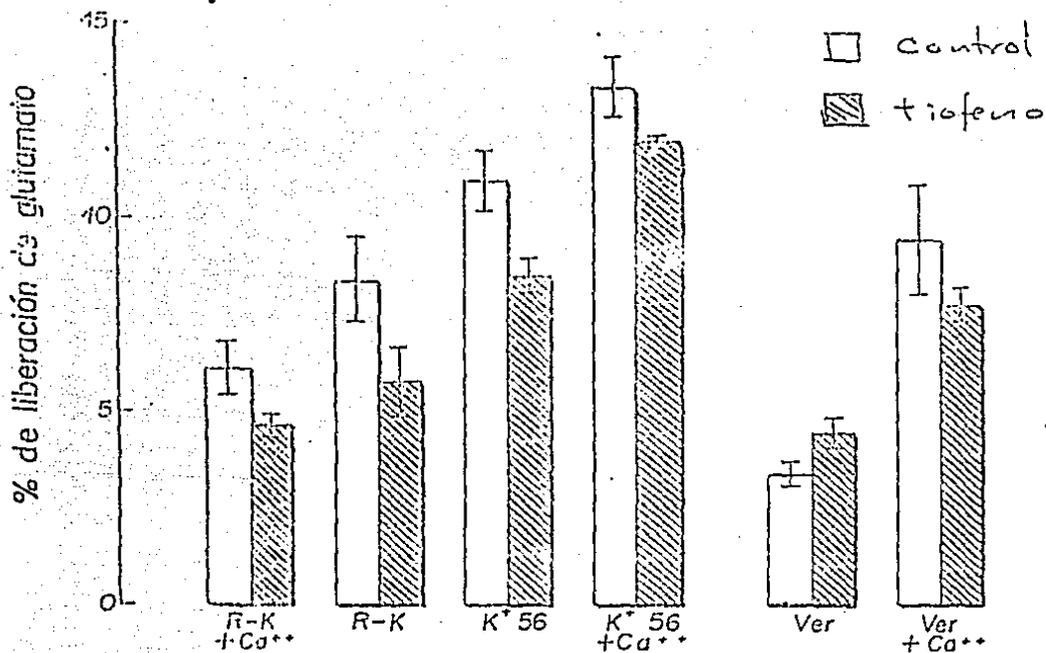


Figura 2.- Efecto del tiofeno en la liberación del ácido glutámico en la capa molecular del cerebelo de rata.

En ratas previamente tratadas con tiofeno, se midió la liberación de ácido glutámico-¹⁴C.

a) en condiciones basales: esto es Ringer Krebs (R-K) con y sin calcio; b) Ringer-modificado con 56 mM de potasio con y sin calcio; c) Ringer Krebs con veratrina con y sin calcio.

El número de experimentos es de 6; los barras representan el error estándar.

REFERENCES

- Alaman, J., y Anderson, J.J. (1971). Irradiation of the cerebellum in infant rats with low level X-rays: histological and cytological effects during infancy and adulthood. *Exper. Neurol.* 33: 487-509.
- Altman, J., y Anderson, J.J. (1972). Experimental reorganization of the cerebellar cortex. I. Morphological effects of elimination of all microneurons with prolonged X-irradiation started at birth. *J. Comp. Neurol.* 146: 355-406.
- Baselin, J.S., y Escubi, J. (1974). Effect of 3-acetylpyridine on the central nervous system of the rat, as demonstrated by silver methods. *Brain Res.* 77: 365-384.
- Foster, S.G., y Roberts, P.J. (1980). High affinity L-³H -glutamate binding to postsynaptic receptor sites on rat cerebellar membranes. *J. Neurochem.* 31: 1467-1477.
- Harnden, R.M. (1968). Thiophen induced granule cell necrosis in the rat cerebellum: an electron microscopic study. *Exper. Brain Res.* 6: 49-68.
- Hedl, H.G., Hunter, D., Mc Bride, W.J., y Aprison, M.H. (1977). Effects of 3-acetylpyridine on several putative neurotransmitter amino acids in the cerebellum and medulla of the rat. *J. Neurochem.* 28: 661-662.
- Smoller, J. B.G., y Cotman, C.W. (1978). Evaluation of glutamate as a neurotransmitter of cerebellar parallel fibers. *Neuroscience* 3: 199-206.
- Smoller, J. B.G., Cotman, C.W., y Hedrum, L. (1984). High affinity uptake and Ca²⁺ dependent release of glutamic acid in the developing cerebellum. *Neuroscience* 11: 867-875.
- Young, E.B., Green-Gravito, I.G., Harnden, R.M., y Snyder, S.H.

(1974). Glutamate synthase: selective depletion by viral induced
granule cell loss in hamster cerebellum. Brain Res. 73: 1-13.