

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE MEDICINA  
CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

**Niveles de Neurotransmisores Aminoacídicos durante la  
Neurogénesis y en Cultivos Histotípicos de Diferentes  
Regiones del Sistema Nervioso Central en el Ratón**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Autora: **Leticia Miranda de Contreras**

Profesor Tutor: **Dr. Ernesto Palacios Prü**

Tesis presentada ante el Consejo de la Facultad de Medicina de la  
Ilustre Universidad de Los Andes para optar al título de:  
**DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES**

**Mérida, 2002**

C.C.Reconocimiento-No Compartir

*"No existe la menor duda de que el factor individual más importante para mantener vivo el esfuerzo de la investigación es la intensidad de motivación. Tan sólo aquellos que tienen una profunda relación amorosa con su trabajo pueden mantener la continuidad en la producción científica. Ellos pertenecen a aquel tipo de personas que en cualquier camino de la vida la acción es para ellos una necesidad a la cual no pueden escapar. Para los investigadores científicos profundamente motivados para todas aquellas personas realmente comprometidas, el trabajo es una vocación y no tan sólo una profesión. Siendo una vocación algo que uno vive para hacer y una profesión algo que uno hace para vivir.*

*www.bdigital.ula.ve*

*Por supuesto que amor solo no es suficiente. Se requiere una gran cantidad de factores del talento, tales como: medidas de [a inteligencia, capacidad para el trabajo fuerte, habilidades manuales, sentir placer al poner en práctica [a destreza, imaginación y objetividad crítica. Aún cuando todas estas condiciones no son comunes, buena parte de requieren en conjunto en las ciencias como en las artes.*

*Quizás por eso es que muchos lo intentan, pero son pocos los que llegan lejos. "*

*Hans A. Krebs*

*Especialmente dedico esta tesis a mi gran maestro, el Dr. Ernesto Palacios Prü, que con estímulo, conocimiento, generosidad y Paciencia, me ha enseñado y me ha guiado desde que comencé en el Mundo de los Científicos, para así poder contribuir con algunos conocimientos en el campo de las Neurociencias.*

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

C.C.Reconocimiento-No Compartir

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

*“En el Centro de Microscopía Electrónica tenemos vocación por el experimento transparente y sencillo, porque los grandes misterios de la vida tienen, por lo general, explicaciones impresionantemente cristalinas y pequeñas. Por otra parte, cultivamos la voluntad de tono fuerte para poder enfrentar nuestras propias inferioridades. En este Centro estamos obligados a ser mejor cada día y finalmente hemos declarado con humildad que estamos comprometidos a renunciar el relativismo de las verdades para dedicarnos al cultivo del conocimiento...”*

*Fragmento de carta del  
Dr. Emesto Palacios Prú a un estudiante*

*Deseo expresar mi sincero agradecimiento muy especialmente:*

*A mi tutor, el Dr. Ernesto Palacios-Prü, quien ha a sido mi guía durante mis estudios de Postgrado.*

*A mis compañeros investigadores:*

*Dr. Rosa Virginia Mendoza, Lic. Pedro Benítez, MSc Zulma Peña y Dr. Luisa de Martens por su colaboración y apoyo en la realización del presente trabajo.*

*A Juan Carlos Alarcón, Nancy Pacheco, María Paulina Gil, Deisy Vera, José Ramírez y Alirio Balza por su excelente asistencia técnica. Al Ing. Francisco Javier Durán por su colaboración en los análisis estadísticos y al Lic. Henry Picon Picón por su valiosa colaboración en la elaboración de los gráficos y la presentación de este trabajo.*

*A las secretarias: Nuris Vargas y Yuraima Vásquez por su colaboración y cariño.*

*A mi querida familia a Carlos, Jesse, Marites y Michelle por todo su amor y apoyo*

*Gracias a todos.*

www.bdigital.ula.ve

## Tabla de Contenido

<b>I. Introducción</b> .....	<b>1</b>
A. Objetivos .....	2
B. Neurogénesis .....	3
C. Neurogénesis en el Bulbo Olfatorio, la Corteza Cerebelosa y la Médula Espinal del Ratón .....	4
1. Bulbo Olfatorio.....	4
2. Corteza Cerebelosa.....	5
3. Médula espinal.....	5
D. Papel de los Neurotransmisores Aminoacídicos en el Bulbo Olfatorio, la Corteza Cerebelosa y la Médula Espinal.....	6
1. Bulbo Olfatorio	
2. Corteza Cerebelosa.....	7
3. Médula Espinal.....	8
<b>II. Materiales y Métodos</b> .....	<b>10</b>
A. Animales.....	10
B. Cultivos Histotípicos.....	10
C. Análisis con Microscopía de Luz de Alta Resolución y Microscopía Electrónica .....	11
D. Análisis de Neurotransmisores Aminoacídicos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	11
E. Análisis Estadístico.....	12
<b>III. Resultados</b> .....	<b>13</b>
A. Bulbo Olfatorio.....	13
1. Microscopía de Luz de Alta Resolución y Microscopía Electrónica.....	13
2. Variación en los Niveles de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios Durante el Desarrollo <i>In Situ</i> .....	13
3. Niveles <i>In Vitro</i> de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios.....	14
B. Corteza Cerebelosa.....	15
1. Microscopía de Luz de Alta Resolución y Microscopía Electrónica.....	15
2. Variación en los Niveles de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios Durante el Desarrollo <i>In Situ</i> .....	15
3. Niveles <i>In Vitro</i> de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios.....	17
C. Médula Espinal.....	17
1. Microscopía de Luz de Alta Resolución y Microscopía Electrónica.....	17

2.	Variación en los Niveles de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios Durante el Desarrollo <i>in Situ</i> .....	18
3.	Niveles <i>In Vitro</i> de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios.....	20
<b>IV.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>21</b>
A.	Bulbo Olfatorio .....	21
B.	Corteza Cerebeloza .....	23
C.	Médula Espinal .....	26
<b>V.</b>	<b>Resumen y conclusiones</b> .....	<b>30</b>
<b>IV.</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>32</b>
<b>VII.</b>	<b>Figuras</b> .....	<b>43</b>
<b>VIII.</b>	<b>Tablas</b> .....	<b>81</b>
<b>IX.</b>	<b>Financiamiento</b> .....	<b>83</b>

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## I. Introducción

Una de las principales metas en el estudio de la Neurobiología del Desarrollo es la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que permiten a las neuronas formar conexiones específicas y precisas con sus parejas sinápticas, es decir, una selectividad que es la base de la función apropiada de los circuitos neuronales en el sistema nervioso central (SNC) maduro. Por otra parte, el conocimiento del ensamblaje del circuito neuronal en cada región del SNC, conduce a una mejor comprensión de los circuitos locales o intrínsecos, lo cual a su vez facilita el entendimiento sobre el procesamiento de la información en cada localidad neuronal y del cerebro como una totalidad.

Durante las últimas dos décadas, en nuestro laboratorio hemos trabajado en dos líneas de investigación: sinaptogénesis y cultivos primarios de tejido cerebrales. La investigación sobre la sinaptogénesis se centró en el estudio de los mecanismos ultraestructurales y bioquímicos relativos al origen y formación de las sinapsis en el SNC [Palacios-Prü y col., 1981; 1988; Miranda-Contreras y Palacios-Prü, 1995]. Por otro lado, los cultivos de tejidos cerebrales nos permitieron obtener información sobre los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren durante la maduración *in vitro* de poblaciones neuronales en diferentes regiones del SNC [Palacios-Prü y col., 1982; 1991; 1995; 1998; Miranda-Contreras y col., 1992; 1998; 1999; 2000]. De estos estudios, logramos contribuir con una valiosa información en el campo de las Neurociencias, como por ejemplo, la formulación de dos importantes hipótesis sobre la transmisión sináptica: la hipótesis de origen ribosoma de la densidad postsináptica [Palacios-Prü y col., 1981; 1988] Y la hipótesis dual de la neurotransmisión [Palacios-Prü y Colasante, 1988; 1990; Palacios-Prü y col., 1999]. En relación a los cultivos de tejidos cerebrales, fueron exitosos los trabajos de implantes en animales de experimentación de los cultivos histotípicos de hipotálamo [Palacios-Prü y col., 1994], así como los cultivos histotípicos de la cápsula suprarrenal [Palacios-Prü y col., 1995]; ambos cultivos son productores de neurotransmisores como las catecolaminas. Estos resultados nos han permitido seguir con proyectos más ambiciosos y creemos que tienen un potencial de aplicación en problemas de salud en el campo de la Medicina Reparativa.

A pesar que estas líneas de investigación han resultado fructíferas, carecemos todavía de mucha información importante que nos permita una mejor comprensión de la biología molecular y celular de la sinapsis durante su origen, maduración y funcionamiento en el animal adulto. En tal sentido, nos planteamos estudiar la ontogénesis de los neurotransmisores sinápticos durante la neurogénesis en diferentes regiones del SNC, tanto *in situ* como *in vitro*. Existe una variedad de agentes químicos que actúan como neurotransmisores; la mayoría de ellos se puede clasificar dentro de una de las tres categorías: aminoácidos, aminas y péptidos. En este trabajo nos limitaremos a describir y discutir la ontogénesis de los

neurotransmisores aminoacídicos: glutamato, aspartato, y-amino ácido butírico (OABA), glicina y taurina, en tres diferentes regiones del SNC de ratón: el bulbo olfatorio, la corteza cerebelosa y la médula espinal. La técnica de cultivo de tejidos neuronales histotípicos fue empleada en estos estudios como una herramienta que nos permitió determinar los niveles intrínsecos de estos neurotransmisores en cada una de las regiones estudiadas. Los resultados obtenidos en estos trabajos nos proporcionaron no solamente los niveles normales, durante el desarrollo embrionario hasta la edad adulta, de las principales sustancias neuroactivas involucradas en la maduración de los circuitos sinápticos intrínsecos del bulbo olfatorio, la corteza cerebelosa y la médula espinal, sino también una comprensión del desarrollo de las conexiones sinápticas de la neurotransmisión aminoacídica en estas regiones. Por otra parte, los cultivos histotípicos de estas regiones del SNC, caracterizados por su histotipia, citotipia y propiedades neuroquímicas, serán un modelo importante para estudios funcionales concernientes a la fisiopatología de la neurotransmisión aminoacídica, como ocurre en condiciones de hipoxia y enfermedades neurodegenerativas.

#### A. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

Primero: Determinar los niveles normales de los neurotransmisores aminoacídicos: glutamato, aspartato, GABA, glicina y taurina, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), durante la neurogénesis en diferentes regiones del SNC: el bulbo olfatorio, la corteza cerebelosa y la médula espinal, en ratones de edades comprendidas desde el día E12 hasta la edad de adulto joven, entre P30-P40.

Segundo: Determinar los niveles de neurotransmisores aminoacídicos en cultivos primarios histotípicos de bulbo olfatorio, corteza cerebelosa y médula espinal. Los cultivos histotípicos de bulbo olfatorio y corteza cerebelosa fueron preparados de ratones de 10 días de edad postnatal, como fue descrito en trabajos anteriores [Palacios-Prü y col., 1982]; en el caso de médula espinal, los cultivos fueron preparados de ratones de edades comprendidas entre E12-P0. Todos los cultivos obtenidos fueron analizados ultraestructuralmente para determinar sus características histotípicas.

Tercero: Analizar el grado de maduración de los componentes celulares en los diferentes cultivos mediante microscopía de luz de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión.

Cuarto: Hacer un análisis comparativo de los niveles *in situ* e *in vitro* de los neurotransmisores aminoacídicos en las tres regiones del SNC estudiadas

## B. Neurogénesis

La neurogénesis incluye muchos procesos que ocurren durante el desarrollo, tales como la generación de neuronas y células gliales, la migración neuronal y la ubicación de las neuronas en su posición final (topotipia) en el SNC; al llegar a su topotipia, las neuronas comienzan los procesos de diferenciación y maduración, formación de sinapsis, y finalmente, la reorganización o refinamiento de las sinapsis, o modelaje neuronal y del circuito neuronal. Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso se genera una sobre abundancia de neuronas y células gliales, y se eliminan las células superfluas por muerte celular programada o apoptosis [Thomaidou y col., 1997]. Ha sido reconocido que el balance entre la proliferación y la muerte celular durante la embriogénesis es un factor importante en la formación del SNC [Ross, 1996].

En el último decenio se han obtenido los primeros conocimientos moleculares sobre los mecanismos por los cuales las células adquieren una identidad o fenotipo neuronal o glial, gracias a los estudios genéticos realizados en dos organismos invertebrados: la mosca del vinagre, *Drosophila* sp. y el nemátodo, *Caenorhabditis elegans* [Jessell y Sanes, 2001; Ohnuma y col., 2001], demostrándose así la sorprendente conservación filogenética de la maquinaria molecular responsable del desarrollo animal. Sin embargo, la diferenciación celular no termina cuando una célula abandona el ciclo celular y se convierte en una neurona. El fenotipo maduro de una neurona usualmente se determina postnatalmente en la etapa adulta del animal. Por otra parte, para que una neurona madura funcione, tiene que expresar las características propias de una neurona, en particular los transmisores que envían señales a otras neuronas y a los órganos diana, y los receptores que permiten la respuesta de la célula a la aferencia sináptica correspondiente. El funcionamiento adecuado del SNC depende del establecimiento de conexiones precisas entre diferentes tipos de neuronas durante el desarrollo; este proceso, en su mayoría, ocurre antes del nacimiento o durante los primeros estadios postnatales, y está guiado mediante comunicación entre células a través de contactos físicos en las sinapsis, mediado por neurotransmisores. El período de máxima formación de contactos sinápticos o sinaptogénesis ocurre durante un período restringido de desarrollo, denominado período crítico [Palacios-Prü y col., 1976; 1977] Y varía en duración y tiempo en las diferentes regiones del SNC. Inicialmente las sinapsis son inmaduras en su estructura y función y redundantes en sus conectividades. Aunque muchos de los contactos sinápticos se forman antes del nacimiento, durante los primeros estadios postnatales, las conectividades sufren un proceso de refinamiento dependiente de las actividades o de la influencia del ambiente que ingresen sensorial y sensitivamente, particularmente en la corteza cerebral, ocasionando la eliminación de sinapsis excesivas y reforzando las conexiones que son funcionalmente importantes [Kakizawa y col., 2000; Lichtman y Colman, 2000]. Los sistemas sensoriales y motores son fácilmente modificados por el ambiente durante períodos críticos que usualmente ocurren en los primeros estadios postnatales en los mamíferos. De esta manera, nuestro cerebro es un producto no solamente de nuestros genes, sino también del mundo en donde crecemos.

## C. Neurogénesis en el Bulbo Olfatorio, la Corteza Cerebelosa y la Médula Espinal del Ratón

En el sistema nervioso de casi todas las especies, los diferentes tipos de neuronas se originan de células que se dividen en momentos particulares. En los vertebrados este hecho se manifiesta claramente en la formación de una citoarquitectura estratificada u organización neuronal en capas, y sirve como ejemplo la corteza cerebral, donde las diferentes capas están compuestas por células con distintas fechas de nacimiento, con las células generadas más tempranas situadas en las capas más profundas y las últimas se localizan en las capas más superficiales, es decir, un crecimiento de adentro hacia afuera. Por lo tanto, el destino neuronal parece estar determinado en estadios específicos de desarrollo o después de varias divisiones celulares [Briscoe y Ericson, 2001; Ohnuma y col., 2001].

El inicio de la neurogénesis neocortical en el epitelio ventricular pseudoestratificado cerebral del ratón comienza con la aparición temprana de las primeras neuronas postmitóticas a los once días de gestación (E11) [Caviness, Jr., 1995]. En las regiones de la médula espinal, el bulbo olfatorio y la corteza cerebelosa, el proceso de neurogénesis se inicia igualmente en una etapa muy temprana, entre E11 y E12, como ha sido demostrado mediante estudios autorradiográficos usando [<sup>3</sup>H] timidina [Hinds, 1967; Altman, 1969; Nornes y Das, 1972-1974; Bayer, 1983]. A continuación se describe la neurogénesis en estas tres regiones, objetivos de este estudio.

www.bdigital.ula.ve

### 1. Bulbo Olfatorio

La neurogénesis en el bulbo olfatorio de la rata comienza en un estadio temprano, desde E12 y se extiende hasta P20, aunque se ha demostrado que la neurogénesis continúa a una baja tasa en el adulto, con la generación de células nuevas en la capa subependimal proliferativa para el recambio de las células granulosas durante la vida adulta [Hinds, 1967; Altman, 1969; Bayer, 1983; Corotto y col., 1994]. El desarrollo de las neuronas del bulbo olfatorio procede en un orden secuencial con las neuronas eferentes (células mitrales y células en penacho) nacidas entre E12-E21, con excepción de las células granulosas del bulbo olfatorio accesorio, las cuales se generan entre E15-E21, las interneuronas del bulbo olfatorio principal, las neuronas periglomerulares y las células granulosas localizadas por debajo de las células mitrales y de las células en penacho, son generadas postnatalmente y casi simultáneamente entre P0-P20 [Mair y col., 1982; Bayer, 1983; Berkowicz y col., 1994]. La sinaptogénesis en el bulbo olfatorio del ratón comienza en E14, entre los axones de las neuronas olfatorias receptoras de las células mitrales y de las células en penacho, en los presuntos glomérulos por debajo de la capa del nervio olfatorio [Hinds y Hinds, 1976]. Estudios ultraestructurales cuantitativos han demostrado que el número de sinapsis aumenta considerablemente

durante el estadio embrionario tardío y en el nacimiento hasta la madurez sexual, el número de las sinapsis glomerulares y extraglomerulares se incrementa en factores de 90 y 170 veces, respectivamente [Pomeroy y col., 1990; Moriizumi y col., 1995]. Estudios electro fisiológicos proveen evidencias donde se demuestra que las sinapsis entre los receptores olfatorios y las células mitrales son funcionales en ratas recién nacidas y que la actividad de este trayecto aferente es modulado por el comportamiento respiratorio del animal recién nacido [Mair y col., 1982].

## 2. Corteza Cerebelosa

La neurogénesis en la corteza cerebelosa del ratón comienza entre E11 - E13,5 finalizado el período mitótico de las células de Purkinje [Oberdick y col., 1998]. En ratas, el estadio de máxima generación de neuronas de los núcleos cerebelosos profundos ocurre un día antes al de las células de Purkinje. La generación máxima de las neuronas de los núcleos olivares inferiores ocurre aun más temprano, dos días antes que las células de Purkinje. Por otra parte, las principales interneuronas de la corteza cerebelosa: las células granulosas, las células en cesta y las células estrelladas, se generan después del tercer día postnatal. La migración de las células granulosas desde la capa germinal externa hacia la capa granulosa interna ocurre durante un período de una semana, entre P7-P14 [Farrant y col., 1991].

En roedores, la formación de los contactos sinápticos excitatorios con las células de Purkinje comienza poco tiempo después del nacimiento [Armengol y Sotelo, 1991]. Desde el día postnatal P2, se establecen sinapsis funcionales entre las fibras trepadoras y las células de Purkinje y se han encontrado múltiples inervaciones de la célula de Purkinje por las fibras trepadoras al día P3 [Crépel y col., 1981; Mariani y Changeaux, 1981; Mason y col., 1990]. Las fibras paralelas comienzan a formar contactos sinápticos con las células de Purkinje a partir del día P7 y entre los días P10 y P14, múltiples inervaciones se establecen en las espinas dendríticas de las células de Purkinje, lo cual coincide con la maduración cerebelosa y con el período de máxima sinaptogénesis. Las sinapsis inhibitorias no están desarrolladas o son relativamente pocas en la primera semana postnatal, pero se incrementan rápidamente, cerca de cuatro veces, entre los días P10 y P17, en la capa granulosa interna y en la capa de las células de Purkinje [Meinecke y Rakic, 1990; Zheng y col., 1993]. Todas estas interacciones sinápticas se hacen más extensas y maduras durante la tercera semana del desarrollo postnatal.

## 3. Médula Espinal

Es conocido que la neurogénesis en la médula espinal de la rata ocurre en una secuencia ventrodorsal entre los días embrionarios E11- E16 [Nornes

www.bdigital.ula.ve

y Das, 1972; 1974; Altman y Bayer, 1984]. Las motoneuronas hacen su aparición entre los días E11-E13 con una generación máxima de motoneuronas en E13; las neuronas de la región intermedia se empiezan a observar entre los días E12-E15 y las neuronas de la sustancia gelatinosa entre E14-E16 [Nornes y Das, 1972; 1974; Altman y Bayer, 1984; Phelps y col., 1988]. Al día E1 0,5, axones aferentes sensoriales comienzan a ingresar a la médula espinal y ya entre E12,5-E15,5 se puede observar la distribución topográfica de estas fibras sensoriales en las diferentes láminas de la sustancia gris medular [Ozaki y Snider, 1997; Sharma y Frank, 1998]. Las fibras aferentes procedentes del músculo penetran la materia gris al día E13,5; mientras que las fibras aferentes sensoriales, de grandes calibres, ingresan al día E14,5; mientras que otros aferentes cutáneos lo hacen al E15,5. Por otra parte, al día E12, las fibras supraespinales descendientes, provenientes del tallo cerebral, ya han innervado la médula espinal [de Boervan Huizen y ten Donkelaar, 1999]. Tan pronto como al día E13, registros eléctricos han revelado potenciales de acción sodio-dependientes, y entre E14-E15, se tienen registros de transmisión sináptica excitatoria [Seno y col., 1984; Mandler y col., 1990; Ziskind-Conhaim, 1990]. El inicio de la sinaptogénesis en las motoneuronas espinales ocurre al E16-E17, cuando la mayoría de los contactos sinápticos se establecen entre las neuronas glicinérgicas y GABAérgicas; las sinapsis excitatorias se forman en todas las motoneuronas al E19 [Ziskind-Conhaim, 1990]. El patrón de la expresión funcional sugiere que durante el período embrionario hasta 1-10 días después del nacimiento, la glicina y el GABA generan depolarizaciones de la membrana cloruro-dependientes en las motoneuronas de la médula espinal, sin embargo, no se sabe a qué edad estos agonistas comienzan a producir hiperpolarizaciones de la membrana [van den Pol y col., 1998; Khalilov y col., 1999].

#### D. Papel de los Neurotransmisores Aminoacídicos en el Bulbo Olfatorio, la Corteza Cerebelosa y la Médula Espinal

Los neurotransmisores aminoacídicos juegan papeles importantes en el SNC; ellos están involucrados en múltiples aspectos del desarrollo cerebral antes de desempeñarse como neurotransmisores [Lipton y Kater, 1989; Lauder, 1993; Levitt y col., 1997; Cameron y col., 1998]. El glutamato y el aspartato son los principales neurotransmisores excitatorios en el SNC, mientras que el  $\gamma$ -amino ácido butírico (GABA) y la glicina son los transmisores inhibitorios más prominentes. La taurina, que se encuentra en concentraciones similares a las de glutamato en el cerebro de los mamíferos, es también considerada un neurotransmisor inhibitorio en algunas regiones [Okamoto y col., 1983], sin embargo, algunos trabajos señalan su papel como neuromodulador en la transmisión sináptica [Galaretta y col., 1996; Magnusson, 1996].

## 1. Bulbo Olfatorio

El circuito sináptico y la neuroquímica del bulbo olfatorio se conocen bien [Halász y Shepherd, 1983; Mori, 1987; Shepherd y Greer, 1990; Trombley y Shepherd, 1993]. Como en otras regiones del SNC, muchos de los trayectos sinápticos excitatorios usan glutamato como transmisor y GABA como el principal transmisor inhibitorio [Fagg y Foster, 1983; Decavel y van Den Pol, 1990; Brann, 1995]. En la capa glomerular del bulbo olfatorio, los nervios olfatorios aferentes hacen sinapsis excitatorias sobre las ramificaciones distales de las dendritas primarias de las principales células eferentes del bulbo olfatorio, las células mitrales y células en penacho [Sassoe-Pognetto y col., 1993; Berkowicz y col., 1994; Didier y col., 1994; Ennis y col., 1996; García y col., 1995]. La salida de la capa glomerular se realiza mediante potenciales de acción a través de los somas de las células mitrales y de las células en penacho y luego la propagación del potencial retorna a las dendritas primarias y secundarias mediante los contactos sinápticos dendrodendríticos con las interneuronas inhibitorias periglomerulares y las células granulosas [Mugnaini y col., 1984; Bischofberger y Jonas, 1997; Chen y col., 1997; Cameron y col., 1998].

Se piensa que las sinapsis dendrodendríticas recíprocas en el bulbo olfatorio juegan un papel importante en el procesamiento de la información olfativa [Saarson y Stowbridge, 1998; Schoppa y col., 1998]. El glutamato liberado de las dendritas de las células mitrales excita las dendritas de las células granulosas, las que a su vez producen la inhibición dendrodendrítica GABAérgica en retorno a las dendritas de las células mitrales. Como en las sinapsis axodendríticas, las sinapsis dendrodendríticas entre las células mitral y granulosa, la respuesta excitatoria postsináptica de la célula granulosa está mediada por receptores de glutamato del tipo AMPA y NMDA [Cotman y Iversen, 1987; MacDermott y Dale, 1987; García y col., 1995; Schoppa y col., 1998] y la respuesta inhibitoria de la célula mitral es mediada por receptores GABA<sub>A</sub> [Gutierrez y col., 1994; Laurie y col., 1992]. Se ha demostrado que los receptores NMDA de las sinapsis dendrodendríticas entre las células mitral y granulosa no sirven como moduladores, pero tienen un papel central en la inhibición dendrodendrítica de larga duración, indicando la importancia de los receptores de NMDA para el procesamiento sensorial en el bulbo olfatorio [Trombley y col., 1993; Schoppa y col., 1998].

## 2. Corteza Cerebelosa

En el cerebelo, la mayoría de las sinapsis excitatorias son aquellas establecidas entre las fibras paralelas de las células granulosas y las espinas dendríticas de las células de Purkinje, la cual explica más del 95% de las aferencias axonales a las células de Purkinje [Sotelo, 1978]. Otras

dos aferencias excitatorias impocerebelosa provienen de las fibras trepadoras originadas del núcleo de la oliva inferior que hacen sinapsis en las ramificaciones primarias y secundarias del árbol dendrítico de las células de Purkinje y de las fibras musgosas provenientes de varias regiones del SNC que hacen sinapsis en la capa de células granulosas [Palay y ChanPalay, 1974]. Cada fibra paralela contacta muchas células de Purkinje, y cada célula de Purkinje recibe entradas de muchas fibras paralelas (~150.000 sinapsis); en contraste, cada célula de Purkinje recibe un poderoso contacto de una sola fibra trepadora [Mariani y Changeux, 1981; Mason y col., 1990; Kano y col., 1997]. Las sinapsis de las fibras paralelas y las fibras musgosas utilizan el glutamato como neurotransmisor [Somogyi y col., 1986; Garthwaite y Brodbelt, 1990], mientras que las fibras trepadoras se piensa que emplean el aspartato como transmisor [Wiklund y col., 1982; Fagg y Foster, 1983].

Las células de Purkinje son un modelo de la neurotransmisión inhibitoria y son la única salida o eferencia de la corteza cerebelosa, formando sinapsis inhibitorias GABAérgicas con las neuronas localizadas en los núcleos profundos cerebelosos. Dentro de la capa molecular, las células de Purkinje reciben inervaciones inhibitorias de las interneuronas: las células estrelladas, las células en cesta y las células de Golgi. Aunque GABA es el principal transmisor liberado por las interneuronas, altos niveles de transportadores de glicina fueron encontrados en el cerebelo indicando que la glicina también se emplea en la transmisión sináptica inhibitoria en la corteza cerebelosa [Dieudonné, 1995; Zaira y col., 1995]. Por otra parte, la taurina que es un potente neurotransmisor inhibitorio parece ser importante en muchas actividades durante el desarrollo. Se ha demostrado que está involucrada en los procesos de migración de las células granulosas en el cerebelo [Sturman y col., 1985] y se encuentra presente durante el desarrollo de las células de Purkinje, sugiriendo que la taurina puede jugar un papel de protección contra la excitotoxicidad del glutamato, por lo tanto promueve el crecimiento óptimo y la sobrevivencia neuronal [Trenker, 1990; Magnusson, 1994]. La colocalización de taurina con GABA en los terminales de las células de Purkinje, así como en otras interneuronas ha dado evidencias en respaldo a su papel como modulador de la transmisión sináptica inhibitoria [Ottersen y col., 1988a; Kontro y Oja, 1989].

### 3. Médula Espinal

En la médula espinal al igual que en el resto del SNC de los mamíferos, los neurotransmisores predominantes involucrados en la transmisión sináptica rápida son los aminoácidos excitatorios: el glutamato y el aspartato, y los inhibitorios: el GABA y la glicina. Estudios farmacológicos han indicado que las redes neurales en la médula espinal dependen esencialmente de la transmisión excitatoria glutamatérgica e inhibitoria glicinérgica [Grillner y col., 1995; 2000]. Es así como las

neuronas retículoespinales glutamatérgicas de los núcleos rombencefálicos posterior y medial activan las motoneuronas e interneuronas de la médula espinal [Grillner y col., 1995]. El glutamato interviene en la transmisión de información sensorial [Skilling y col., 1988; Jeftinija y col., 1991]; los aferentes nociceptivos contienen no solamente glutamato sino también Sustancia P liberados de aferentes primarios, especialmente las fibras C, que conducen información nociceptivas a neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal [Heath y col. 1994; Aichler y col., 1997]. Por otra parte, evidencias inmunocitoquímicas y fisiológicas muestran la participación de los receptores metabotrópicos de glutamato en la modulación de las funciones somatosensoriales, autonómicas y motoras, en los momentos espinales [Alvarez y col., 2000; Yuan-Xiang y col., 2000].

La inmunoreactividad de la glicina y de los receptores glicinérgicos revelan la amplia distribución de estos compuestos tanto en el asta ventral como en la dorsal de la médula espinal, sugiriendo que la glicina juega un papel importante en el control del movimiento en el asta ventral y en la percepción sensorial y nociceptiva en el asta dorsal [Betz 1991; Kuhse y col., 1995; Flint y col., 1998]. Algunos experimentos electro fisiológicos sugieren que las neuronas de la médula espinal, incluyendo las motoneuronas, las células de Renshaw y las neuronas del asta dorsal, responden más a la glicina que al GABA, comportamiento contrario al observado en las cortezas cerebral y cerebela [Cammission y col., 1996; Menecke y Rakic., 1998]. Sin embargo, otros estudios señalan que el GABA ejerce mayores efectos funcionales en los niveles segmentarios [Bohlhalter y col., 1996; Tran y Phelps, 2000]. El sistema GABAérgico desempeña un papel importante en la inhibición presináptica de las aferencias primarias, modulando la transmisión sensorial, la nociceptiva y la actividad motora en los niveles pre- y postsinápticos [Bohlhalter y col., 1996; Yuan-Xiang y col., 2000]. El GABA y la glicina están frecuentemente colocalizados en el mismo terminal axónico y las alteraciones en la inhibición sináptica que afectan cualquier sistema neurotransmisor contribuyen al desarrollo de síndromes de dolor crónico e hiperalgesia [Todd y Sullivan, 1990; Todd y col., 1996].

La taurina, otro neurotransmisor aminoacídico presente en altas concentraciones en la médula espinal, es considerada como un neuromodulador inhibitorio [Padjen y col., 1989; Baev y col., 1992] y además como un estabilizador de membranas excitables, como un osmorregulador y desempeña una importante función durante el desarrollo del cerebro [Huxtable, 1989; Hussy y col., 1997]. La localización de la taurina en terminales axónicos identificados morfológicamente como inhibitorios a nivel del asta dorsal de la médula espinal aportó evidencias morfológicas a la hipótesis de que la taurina juega un papel inhibitorio y tiene un efecto antinociceptivo selectivo sobre la nocicepción inducida químicamente [Lee y col., 1992]. Por otra parte, su localización en

astrocitos y células endoteliales en las astas dorsal y ventral de la médula espinal indica su participación en la osmorregulación [Shupliakov y col., 1994].

## II. Materiales y Métodos

### A. Animales

Las muestras de bulbo olfatorio, corteza cerebelosa y médula espinal fueron obtenidas de ratones NMRI de diferentes edades de desarrollo: a) embrionarios desde E12 a E21; b) de edades postnatales P0, P1, P3, P5, P7, P9, P11, P15; y c) adultos jóvenes entre P30 y P40. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de temperatura controlada ( $24\pm 1^\circ\text{C}$ ), en ciclos de 12 horas luz-oscuridad y se les administró comida y agua *ad libitum*. Los ratones fueron anestesiados con vapores de cloroformo y sacrificados; luego se les extrajo las tres regiones bajo estudio. Los tejidos fueron colocados en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, a  $4^\circ\text{C}$ . Dependiendo de la edad de desarrollo, fueron usados de 30 a 50 animales por edad. Las muestras fueron recolectadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml y almacenadas a  $-70^\circ\text{C}$  hasta el día de su análisis.

### B. Cultivos Histotípicos

Los cultivos primarios de bulbo olfatorio, corteza cerebelosa y médula espinal fueron preparados de ratones de diferentes edades de desarrollo. Para la preparación de los cultivos histotípicos de bulbo olfatorio y corteza cerebelosa fueron utilizados ratones de edad postnatal P10, de acuerdo al procedimiento previamente publicado [Palacios-Prü y col., 1982]. En el caso de la médula espinal, los cultivos primarios fueron preparados de ratones en edades embrionarias, entre E12-E21, para determinar el período crítico para la obtención de los cultivos histotípicos de esta región.

En un ambiente estéril, los embriones fueron removidos de las ratonas hembras con el tiempo de gestación controlado y bajo observación con una lupa estereoscópica se extrajo cuidadosamente el bulbo olfatorio, la corteza cerebelosa y la médula espinal para los cultivos. En el caso de los animales de edad postnatal fueron anestesiados con vapores de cloroformo y se les extrajeron las regiones mencionadas anteriormente, para ser cultivadas. Los tejidos fueron colocados en una cápsula de Petri con solución Tyrode libre de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ . Por cada cultivo de bulbo olfatorio y corteza cerebelosa se tomó tejido de 4-8 animales; para la médula espinal se utilizaron segmentos completos del tejido provenientes de 1-3 embriones. Luego los tejidos fueron cortados en pequeños fragmentos y transferidos a frascos Erlenmeyer de 125-ml de capacidad, que contenían: 90% de medio basal de Eagle con L-glutamina (GIBCO), 9% de suero de caballo (GIBCO) y 1% de solución

penicilina-estreptomicina. Los frascos fueron gasificados con 95% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 min e incubados a 37°C bajo rotación constante a 70 rpm. El medio de cultivo fue cambiado cada 48 h y oxigenado por 1 min cada 24 horas. Después de 6 días de incubación, se tomaron muestras de los cultivos para el análisis con microscopía de luz de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión y los cultivos restantes fueron lavados tres veces con solución Tyrode libre de Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>, colocados en tubos Eppendorf de 1,5 ml y almacenados a -70°C hasta el día de análisis del contenido de neurotransmisores aminoacídicos.

### C. Análisis con Microscopía de Luz de Alta Resolución y Microscopía Electrónica

Los cultivos fueron fijados, a 4°C, en una mezcla de glutaraldehído al 3% y formaldehído al 3%, preparada en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,2 (Palacios-Prü y Mendoza, 1972). Después de 1 hora de fijación, las muestras fueron lavadas tres veces en el mismo tampón cacodilato y postfijadas por 2 horas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% preparada en tampón cacodilato. Los tejidos fueron deshidratados en alcohol etílico en concentraciones ascendentes, del 30%-100%, durante 10 min cada uno, y finalmente en óxido de propileno puro durante 10 min. Luego el material fue infiltrado con la resina epoxídica (Epon 812) en proporciones ascendentes de una mezcla de Epon 812: óxido propileno, v / v, 1:4; 2:3; 3:2; 4:1, y finalmente en Epon 812 puro. En cada paso, el material fue agitado constantemente durante 30 min. Finalmente, el material fue incluido en Epon 812 puro y llevado a la estufa, a 60°C, por 48 horas. Se hicieron cortes gruesos de 1 µm, los cuales fueron coloreados con Azur II para ser observados con microscopía de luz de alta resolución (Polyvar), donde se escogió el material con mejores características fenotípicas para su ulterior observación al microscopio electrónico. Secciones finas de 90 nm de espesor fueron teñidas usando una modificación del método de acetato de uranilo/citrato de plomo (Palacios-Prü y col., 1981) para el análisis ultraestructural con el microscopio electrónico de transmisión (Hitachi 7000).

### D. Análisis de Neurotransmisores Aminoacídicos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Para el análisis simultáneo de los neurotransmisores aminoacídicos: glutamato, aspartato, glicina, taurina y GABA se utilizó la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) después de derivatización con cloruro de dansilo, usando una modificación al procedimiento de Oray y col. (1983). Las muestras fueron homogeneizadas en ácido perclórico al 0,05N y después de tomar alícuotas para la determinación de proteínas, los homogeneizados fueron centrifugados a 4°C por 15 min, a 10.000 g. Los sobrenadantes fueron filtrados a través de filtros Millipore de 0,45 µm y las alícuotas fueron derivatizadas con cloruro de dansilo. La columna analítica utilizada fue una columna de fase reversa BIO Sil ODS-5S (250 X 4.0 mm, tamaño de partícula 5 µm) mantenida a 33°C.

Para la separación cromatográfica se hizo un gradiente con dos fases móviles: solvente A: acetonitrilo al 5% en tampón fosfato 30 mM, pH 6,5; y solvente B: acetonitrilo al 60% en tampón fosfato 30 mM, pH 6,5. Los aminoácidos dansilados fueron eluidos a un flujo de 1 ml/min y la detección de absorbancia fue realizada a 215 nm. Los niveles de neurotransmisores aminoacídicos fueron calculados comparando las áreas pico con estándares y los valores fueron expresados en  $\mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas. La determinación de proteínas fue realizada según el método de Lowry modificado [Stoscheck, 1990] utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

#### E. Análisis Estadístico

Todos los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  DE. La significancia estadística fue comprobada con el Test de Student para datos apareados usando el Software Microcal Origin y MATLAB 5.3.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

### **III. Resultados**

Los resultados obtenidos *in situ* e *in vitro*, tanto morfológicos como bioquímicos, serán discutidos por separado para cada una de las regiones estudiadas.

#### **A. Bulbo Olfatorio**

##### **1. Microscopía de Luz de Alta Resolución y Microscopía Electrónica**

Los cultivos primarios se prepararon de bulbo olfatorio de ratones de P10 y se cultivaron por 6 días hasta adquirir un alto grado de desarrollo fenotípico, como se evidencia por el estudio ultraestructural mostrado en las figuras 1A y 1B. Se enfocó el análisis de microscopía electrónica de estos cultivos en la observación de sinapsis axodendríticas o dendrodendríticas recíprocas, como se muestra en la figura 1A y el crecimiento de las células mitrales y células en penacho, así como de las células granulosas, como se muestra en la figura 1B. En la figura 1A se observan dos tipos de sinapsis establecidas con la misma dendrita: una del tipo simétrico sin la densidad postsináptica (DPS) y la otra del tipo asimétrico con una gruesa DPS. Tanto los elementos presinápticos como los postsinápticos tienen vesículas sinápticas en la región sináptica activa, indicando la existencia en estos cultivos de sinapsis recíprocas excitatorias e inhibitorias, lo cual es común en las células mitrales, las células en penacho y las células granulosas. En la figura 1B, las neuronas principales, las células mitrales y las células granulosas son fácilmente reconocidas por sus características fenotípicas, con un prominente núcleo ovoidal con cromatina dispersa y grandes nucléolos, y un citoplasma rico en organelas, como numerosas mitocondrias y un aparato de Golgi bien desarrollado. Las células granulosas pueden ser identificadas por su pequeño tamaño, núcleos fuertemente electrónicos densos y poca cantidad de citoplasma.

##### **2. Variación en los Niveles de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios Durante el Desarrollo *In Situ*.**

Los cambios durante el desarrollo en las concentraciones de los neurotransmisores aminoacídicos excitatorios e inhibitorios fueron analizados por HPLC, como se muestra en las figuras 2 y 3 Y en la Tabla 1. Durante el período prenatal, entre E13-E21, altos contenidos de neurotransmisores excitatorios, como glutamato y aspartato, así como del neurotransmisor inhibitorio GABA fueron detectados, con los valores de GABA aproximadamente de 2 a 3 veces mayores comparados con los de glutamato y aspartato. En el nacimiento (P0), una reducción significativa en las concentraciones de éstos fue observada. Entre E21 y P0, el

contenido de glutamato disminuyó cerca del 55%, desde  $3,72 \pm 0,32$  hasta  $1,65 \pm 0,15$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, con una  $p < 0,0001$ ; los valores de aspartato disminuyeron cerca del 76%, desde  $4,71 \pm 0,46$  hasta  $1,12 \pm 0,18$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas,  $p < 0,0001$  y el contenido de GABA decreció cerca del 50%, desde  $9,52 \pm 0,36$  hasta  $4,75 \pm 0,76$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas,  $p < 0,0001$ . Durante las dos primeras semanas de desarrollo postnatal, el contenido de glutamato se incrementó gradualmente y alcanzó los niveles del adulto ( $2,54 \pm 0,19$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) después de la segunda semana. Las concentraciones de aspartato fueron ligeramente más bajas que aquellas de glutamato y muestran valores máximos al día P3 y en el estadio adulto,  $3,08 \pm 0,22$  y  $3,34 \pm 0,22$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, respectivamente.

Las concentraciones postnatales de GABA permanecieron relativamente altas comparadas con los otros neurotransmisores aminoacídicos. Los valores máximos de GABA fueron detectados al P3 ( $6,95 \pm 0,58$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) y alcanzaron los niveles adultos ( $4,94 \pm 0,71$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) en la segunda semana del desarrollo postnatal. Los niveles de glicina permanecieron bajos y constantes a todo lo largo del período de desarrollo estudiado, desde E15 ( $1,21 \pm 0,29$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) hasta la edad de adulto joven ( $1,38 \pm 0,27$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas), mientras que la concentración de taurina se incrementó gradualmente con la edad, mostrando un aumento de 30 veces más, desde  $0,32 \pm 0,08$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas en E13 hasta  $4,01 \pm 0,70$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas en la edad de adulto joven,  $p < 0,0001$ .

### 3. Niveles *In Vitro* de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios

En los cultivos histotípicos de bulbo olfatorio, el glutamato, la glicina y el GABA fueron los neurotransmisores aminoacídicos más abundantes (Fig. 4). El nivel de glutamato *in vitro* ( $3,59 \pm 0,69$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) fue cerca de 1,4 veces mayor que el encontrado *in situ* ( $2,54 \pm 0,20$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas),  $p < 0,0001$ , mientras que el contenido de aspartato *in vitro* ( $0,95 \pm 0,16$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) fue cerca del 90% inferior a los valores conseguidos *in situ* ( $3,34 \pm 0,23$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas),  $p < 0,0001$ . Las concentraciones de GABA *in vitro* ( $5,58 \pm 0,92$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteína) son comparables con los valores *in situ* ( $4,94 \pm 0,71$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas). La concentración *in vitro* de glicina ( $5,70 \pm 0,52$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) fue significativamente más alta, aproximadamente 4 veces, que la encontrada *in situ* ( $1,39 \pm 0,27$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas),  $p < 0,0001$  mientras que los niveles de taurina *in vitro* ( $0,38 \pm 0,18$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) mostraron una significativa reducción de aproximadamente el

90% comparado con la concentración *in situ* ( $4,01 \pm 1,00 \mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas),  $p < 0,0001$ .

## B. Corteza Cerebelosa

### 1. Microscopía de Luz de Alta Resolución y Microscopía Electrónica

Cultivos primarios fueron preparados de corteza cerebelosa de ratón P10 y cultivados por 6 días donde adquirieron un alto grado de desarrollo fenotípico, como lo evidencian los estudios ultraestructurales (Figs 5 y 6 A y B). En estos cultivos pueden ser claramente distinguidas una capa plexiforme definida y una capa granular. En la figura 5, pueden observarse sinapsis axoespinosas (flechas) en la neuropila de la capa plexiforme, homologables a las observadas *in situ*. La formación de una neuropila plexiforme en estos cultivos indica la maduración *in vitro* de las características sinaptológicas de esta región del cerebelo. En la figura 6, se muestra un arreglo glomerular, semejante al observado *in situ*, que está compuesto por un axón terminal semejante a una fibra musgosa rodeado por cuerpos de células granulosas. A mayor aumento (Fig. 7), en el axón terminal semejante a una fibra musgosa se puede encontrar una gran cantidad de vesículas sinápticas redondeadas y electrón-transparentes, pocas vesículas electrón-densas (flechas), mitocondrias y pueden verse las múltiples sinapsis asimétricas que ella establece.

### 2. Variación en los Niveles de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios Durante el Desarrollo *In Situ*

La variación en los niveles de glutamato y aspartato durante el desarrollo de la corteza cerebelosa del ratón se muestra en la figura 7 y en la Tabla II. Las concentraciones de glutamato y aspartato mostraron un patrón de cambios similares durante el período de desarrollo estudiado, desde E15 hasta el estadio de adulto. Al día E17, los valores de glutamato y aspartato fueron relativamente altos:  $2,09 \pm 0,29$  y  $2,27 \pm 0,66 \mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas, respectivamente. Para el día E21, estos valores disminuyeron cerca del 50%, obteniéndose cifras de  $1,02 \pm 10,16 \mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas ( $p < 0,0001$ ) y  $1,28 \pm 0,04 \mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas ( $p < 0,0002$ ). Durante las dos primeras semanas postnatales, los niveles de glutamato se incrementaron progresivamente, alrededor de 2,6 veces más entre P0 y P3, dando cifras de  $1,26 \pm 0,25$  y  $3,27 \pm 0,61 \mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas, respectivamente ( $p < 0,0001$ ) y aumentó cerca de 1,5 veces entre P7 y P9, con valores de  $1,99 \pm 0,47$  y  $3,04 \pm 0,01 \mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas, respectivamente ( $p < 0,0001$ ). Aunque el patrón de desarrollo del aspartato fue similar al del glutamato, las concentraciones del aspartato corresponden aproximadamente a la mitad de las concentraciones de

glutamato. Los valores máximos de aspartato fueron observados en los días P0 ( $1,99 \pm 0,14$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas), P3 ( $1,93 \pm 0,23$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) y P11 ( $1,72 \pm 0,43$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas). Después del día P15 las concentraciones de los aminoácidos excitatorios aumentaron significativamente hasta los valores obtenidos en animales adultos jóvenes de glutamato,  $3,76 \pm 0,052$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas ( $p < 0,0001$ ) y de aspartato,  $3,25 \pm 0,45$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas ( $p < 0,0001$ ).

El patrón de cambios durante el desarrollo en los niveles de neurotransmisores aminoácidos inhibitorios se muestran en la figura 8 y en la Tabla II. El GABA, principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebelo, mostró valores elevados a lo largo del período de desarrollo estudiado, desde E15 hasta el adulto joven. Entre el día E15 y E17, fue detectado un aumento significativo de aproximadamente 2 veces en los valores de GABA, de  $4,12 \pm 0,05$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas al día E15 hasta  $8,20 \pm 0,95$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas al día E17 ( $p < 0,0001$ ). Al día E21, la concentración de GABA disminuyó cerca del 41%, con una cifra de  $3,33 \pm 0,36$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas ( $p < 0,0001$ .) Los primeros 3 días después del nacimiento, los niveles de GABA permanecieron elevados en un rango entre 4 y 6  $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas. Al día P5, estos valores decrecieron cerca del 48%, desde  $5,20 \pm 0,61$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas al día P3 hasta  $3,02 \pm 0,52$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas al día P5 ( $p < 0,0001$ ). Durante la segunda semana postnatal, el contenido de GABA aumentó gradualmente obteniéndose los valores máximos de  $4,21 \pm 0,41$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas al día P11, y luego disminuyó a los niveles de  $2,7 \pm 0,44$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas encontrados en animales adultos jóvenes.

En contraste con GABA, el patrón de desarrollo del neurotransmisor glicina mostró niveles relativamente muy bajos desde el período prenatal hasta el día del nacimiento, con un abrupto incremento durante las primeras 24 horas postnatal y un descenso gradual hasta las concentraciones encontradas en animales adultos. Entre los días E15 y P0, el contenido de glicina permaneció en cifras bajas entre 0,4 y 0,8  $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas. Al día P1, fue observado un aumento significativo de aproximadamente 6 veces ( $5,57 \pm 0,87$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas ( $p < 0,0001$ )). Durante la segunda semana de desarrollo postnatal, las concentraciones de glicina mostraron consistentemente valores bajos hasta alcanzar el nivel de  $2,12 \pm 0,35$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas en el adulto joven.

En la figura 8, se puede observar la variación de la taurina durante el período de desarrollo estudiado, mostrando un patrón similar al de la glicina. Entre los días E15 y P0, los niveles de taurina se mantuvieron en valores bajos, en un rango entre 0,2 y 0,6  $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas. En las primeras 24 horas después del nacimiento, la concentración de taurina aumentó aproximadamente 4 veces, de  $0,6 \pm 0,28$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas

al día P0 hasta  $2,37 \pm 1,24$   $\mu\text{mol}/100\text{mg}$  proteínas al P1 ( $p < 0,0001$ ). Durante la segunda semana postnatal, los niveles de taurina aumentaron ligeramente con valores máximos de  $2,08 \pm 0,32$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas al día P11; en animales adultos jóvenes, el nivel de la taurina se mantuvo alrededor de  $2,60 \pm 0,52$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas.

### 3. Niveles *In Vitro* de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios

La producción intrínseca de los neurotransmisores aminoacídicos fue estudiada analizando los respectivos niveles en cultivos histotípicos preparados de cerebelo de ratones P10 (Fig. 9). En estos cultivos, después de 6 días de incubación, fueron encontrados cantidades de GABA y de glicina homologables con los valores *in situ* del adulto joven, mientras que los niveles de glutamato y aspartato fueron cerca del 50% más bajo. La concentración de GABA en los cultivos fue aproximadamente 2 veces más alta que la encontrada *in situ*, siendo los valores *in vitro* de  $1,73 \pm 0,23$   $\mu\text{mol}/100\text{mg}$  proteínas e *in situ*,  $3,76 \pm 0,52$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas,  $p < 0,10$ . Por otra parte, los niveles *in vitro* de glicina ( $1,89 \pm 0,40$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteínas) son comparables a aquellos observados *in situ* ( $2,12 \pm 0,35$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas). En contraste a GABA y glicina, hubo una reducción muy significativa en los niveles de taurina *in vitro* ( $0,55 \pm 0,18$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas), aproximadamente de 79% si la comparamos con los valores obtenidos en animales adultos jóvenes que fue de  $2,60 \pm 0,52$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas ( $p < 0,0001$ ).

En relación a los neurotransmisores excitatorios en los cultivos cerebelosos al ser comparados con los valores obtenidos *in situ*, hubo un dramático descenso en el contenido tanto del glutamato como del aspartato. Los niveles de glutamato fueron aproximadamente 2,2 veces más elevados *in situ* ( $3,76 \pm 0,52$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas), en comparación con los valores *in vitro* ( $1,73 \pm 0,23$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas),  $p < 0,0001$ , mientras que las concentraciones *in situ* de aspartato ( $3,25 \pm 0,45$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) fue aproximadamente dos veces más altas que *in vitro* ( $1,67 \pm 0,29$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas),  $p < 0,0002$ .

## C. Médula Espinal

### 1. Microscopía de Luz de Alta Resolución y Microscopía Electrónica

Durante el desarrollo embrionario de la médula espinal, los eventos morfológicos que conducen a la maduración neuronal comienzan a ser observados en el día E13. Como se muestra en la figura 10A, células mitóticas y numerosos neuroblastos migratorios se presenta en el borde

ependimario. A esta edad ya existe una región estrecha acelular o sustancia blanca externa y la alta velocidad de actividad mitótica en el neuroepitelio se evidencia por la presencia de abundantes figuras mitóticas, como se observan en estas secciones de 1  $\mu\text{m}$ . Los cultivos primarios de médula espinal preparados de diferentes edades embrionarias, entre E13 y E21, mostraron diferentes grados de maduración, siendo los cultivos obtenidos de embriones de E15-E16 los que ofrecieron mayor grado de maduración y características fenotípicas homologables a los animales vivos (figura 10B). Como se muestra en la figura 11, algunas neuronas grandes, probablemente motoneuronas, poseen núcleos grandes y exhiben una abundancia de organelas en su citoplasma. En la misma figura se puede observar la asociación "compleja" entre un centríolo periférico y el aparato de Golgi, lo cual se ve en las grandes neuronas postmitóticas. La neuropila en los cultivos histotípicos de médula espinal presenta numerosas sinapsis asimétricas o excitatorias y simétricas o inhibitorias (figura 12A,B) y es posible observar la presencia de axones discretamente mielinizados, sugiriendo el desarrollo de células oligodendrogliales en estos cultivos.

## 2. Variación en los Niveles de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios Durante el Desarrollo *In Situ*

En la figura 13 y en la Tabla III se muestran los cambios de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos excitatorios, glutamato y aspartato, durante el desarrollo. En edades tempranas como en E12, se observaron altas concentraciones de glutamato con valores aproximadamente dos veces más altos que del aspartato. Entre E14 y E16 el contenido de glutamato disminuyó significativamente, alrededor de un 40%, desde  $2,84 \pm 0,59$  a  $1,64 \pm 0,31$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas,  $p < 0,01$  y después se detectó un gradual pero significativo incremento en el contenido de glutamato entre E16 y E21, desde  $1,64 \pm 0,31$  a  $2,12 \pm 0,36$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, respectivamente,  $p < 0,01$ . Durante el período neonatal, fueron observadas variaciones importantes en las concentraciones de glutamato entre P1 y P3, experimentando un incremento de aproximadamente 1,5 veces,  $1,88 \pm 0,55$  y  $2,85 \pm 0,38$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, respectivamente,  $p < 0,01$ , y entre P3 y P7, mostraron una disminución significativa alrededor de un 50%, desde  $2,85 \pm 0,38$  a  $1,30 \pm 0,17$   $\mu\text{mol}/100$  proteínas,  $p < 0,001$ . Después de la primera semana postnatal, los valores de glutamato llegaron a los valores de adulto joven.

Las variaciones en el contenido de aspartato demostraron un patrón diferente en comparación con las del glutamato. Entre los días E12 y E17 se detectó una reducción gradual en los niveles de aspartato,  $1,47 \pm 0,27$  a  $1,05 \pm 0,30$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, respectivamente, disminuyendo más aún, cerca de un 50%, entre E17 y E19, desde  $1,05 \pm 0,30$  a  $0,49 \pm 0,16$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas,  $p < 0,01$ . El día antes de nacimiento, E21, la

concentración de aspartato se incrementó significativamente, alrededor de 2,8 veces, desde  $0,49 \pm 0,16$  a  $1,37 \pm 0,31$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas,  $p < 0,01$  para disminuir alrededor de un 50% al nacer. Al día P3 y en los días posteriores, los valores de aspartato fueron comparables con los niveles de animales adultos. El patrón de cambio durante el desarrollo en los niveles de los neurotransmisores aminoacídicos inhibitorios GABA, glicina y taurina se muestra en la figura 14 y Tabla III. Durante el desarrollo, la transmisión inhibitoria en la médula espinal de mamíferos es primordialmente mediada por glicina cuyos valores consistentemente son 2 a 3 veces más altos que los del GABA. Durante el período embrionario, el contenido de glicina permanece constante entre E12 y E14, de  $1,62 \pm 0,25$  a  $0,96 \pm 0,30$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, respectivamente,  $p < 0,01$ . A partir del E17, los valores de glicina se incrementan continuamente hasta P3, aumentando significativamente alrededor de 4,4 veces, de  $1,27 \pm 0,47$  a  $4,20 \pm 0,12$   $\mu\text{mol}/100$  ml mg proteínas, respectivamente,  $p < 0,0001$ . Al final de la primera semana postnatal, se observa una disminución significativa en el contenido de glicina, disminuyendo cerca de un 66%, de  $4,20 \pm 0,12$  a  $1,44 \pm 0,16$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, respectivamente,  $p < 0,0001$ . En la segunda semana postnatal, la concentración de glicina se incrementa alrededor de 1,4 veces alcanzando valores no significativamente diferentes a los del adulto.

Valores muy bajos de GABA fueron detectados entre E12 y E17, sin embargo al E 4 el contenido de GABA se incrementó significativamente cerca de 4,5 veces, desde  $0,20 \pm 0,10$  a  $0,90 \pm 0,24$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, respectivamente,  $p < 0,0001$ . Durante la última semana antes del nacimiento, entre E14 y E21, la concentración de GABA aumentó gradualmente, con excepción de un incremento abrupto pero significativo entre E17 y E19, desde  $1,14 \pm 0,34$  a  $1,90 \pm 0,25$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, respectivamente,  $p < 0,0001$ . El contenido de GABA permaneció constante hasta P1 y luego se incrementó alrededor de 1,7 veces al día P3,  $1,40 \pm 0,35$  a  $2,35 \pm 0,43$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, respectivamente,  $p < 0,02$ . Entre P3 y P7, el nivel de GABA disminuyó alrededor de un 35% desde  $2,35 \pm 0,43$  a  $1,54 \pm 0,18$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas, respectivamente,  $p < 0,05$ . Al igual que la glicina, la concentración de GABA se incrementó cerca de 1,3 veces en la segunda semana postnatal y luego disminuyó a los niveles de adulto joven de  $0,75 \pm 0,13$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas.

Durante el período embrionario hasta la etapa de adulto joven, el contenido de taurina fue relativamente más alto en comparación a los neurotransmisores inhibitorios rápidos, glicina y GABA, variando de 1 a 6 veces en relación con la glicina y 2 a 9 veces en relación con el GABA. La variación en el contenido de taurina durante el desarrollo fue similar a la variación de la glicina, como se muestra en la figura 5. Entre E12 y E16 hubo una gradual pero significativa reducción en los valores de taurina, desde  $9,36 \pm 1,70$  a  $5,3 \pm 0,93$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas,  $p < 0,0001$ . Desde

E17 hasta P3 el contenido de taurina se incrementó gradualmente para llegar a valores máximos de  $8,94 \pm 0,68 \mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas en P3. Durante la primera semana postnatal el contenido de taurina disminuyó significativamente, cerca de un 50%, a valores promedio  $4,22 \pm 0,71 \mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas,  $p < 0,002$ . En la segunda semana postnatal se incrementó la cantidad de taurina alrededor de 1,2 veces, sin embargo, en el adulto joven hubo una caída significativa con un promedio de  $1,51 \pm 0,44 \mu\text{mol}/100 \text{ proteínas}$   $p < 0,0001$ .

### 3. Niveles *In Vitro* de Neurotransmisores Aminoacídicos Excitatorios e Inhibitorios

El desarrollo de sinapsis funcionales en cultivos de médula espinal de ratón fue determinado mediante el análisis de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos, excitatorios e inhibitorios, en cultivos preparados de animales de diferentes edades de desarrollo embrionario, entre E13 y E19 e incubados *in vitro* durante 6 días (Figs.15 A y 8, Tabla IV). En relación a los contenidos de glutamato y aspartato, los cultivos preparados de embriones de E 13 mostraron los valores más altos después de 6 días de incubación,  $1,74 \pm 0,30$  y  $1,3 \pm 0,37 \mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas, respectivamente. Los cultivos preparados con embriones de mayor edad, entre E14 y E19, mostraron un patrón decreciente en los niveles de neurotransmisores excitatorios, a excepción de un incremento moderado observado en cultivos preparados de embriones E 15 (Fig. 15A).

La relación glicina/GABA varió de 2 a 6 veces en los diferentes cultivos de médula espinal preparados con embriones entre E13 y E19 (Fig. 158; Tabla IV). El contenido de taurina fue 2 a 3 veces más alto que los niveles de glicina y cerca de 4 a 9 veces en comparación con los valores de GABA. El nivel de GABA fue relativamente bajo en los diferentes cultivos estudiados, siendo los cultivos preparados de embriones de E15-E16 los que mostraron los mayores valores de GABA. La variación en los niveles de glicina y taurina mostró un patrón similar, siendo detectados los valores más altos en los cultivos preparados de embriones de E13 y E16.

El análisis comparativo del contenido de neurotransmisores aminoacídicos *in vitro* e *in situ* en la médula espinal del ratón permite la cuantificación relativa de la producción intrínseca de estos neurotransmisores, en contraste con los niveles extrínsecos aportados por los axones aferentes. Los niveles intrínsecos fueron determinados en los cultivos histotípicos provenientes de embriones E15 y E16 (Fig. 15 A y 8). Los niveles intrínsecos de aspartato y glutamato fueron 40% más bajos que los valores equivalentes en E21 *in situ*, como se muestra en la figura 16 y Tablas III y IV. Por otra parte, los niveles intrínsecos de glicina

( $2,47 \pm 0,05$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas), taurina ( $6,22 \pm 0,42$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) y GABA ( $1,27 \pm 0,03$   $\mu\text{mol}/100$  mg proteínas) fueron comparables con sus contenidos equivalentes en E21 *in situ* (Fig. 16; Tablas III y IV).

#### IV. Discusión

En este trabajo hemos presentado datos sobre la variación de los niveles normales de los neurotransmisores aminoacídicos, excitatorios e inhibitorios, durante la neurogénesis en tres regiones del SNC cuyas funciones se relacionan con el procesamiento de la información sensorial como es el caso del bulbo olfatorio, coordinación motora como en la corteza cerebelosa y sensitivo - sensorial - coordinación motora en la médula espinal. Cada una de estas regiones está compuesta por circuitos neuronales complejos, que actúan en la integración de miles de señales sinápticas, transformando una gran cantidad de entradas sinápticas en una respuesta singular de salida. La variación en los niveles de neurotransmisores aminoacídicos durante el desarrollo, refleja la ontogénesis de las poblaciones neuronales que emplean estos neurotransmisores en la transmisión sináptica y por ende, el desarrollo de la formación de los circuitos neurales excitatorios, glutamatérgicos y aspartatérgicos e inhibitorios, GABAérgicos, glicinérgicos y taurinérgicos. El contenido de estos neurotransmisores fue también estudiado en cultivos primarios histotípicos del bulbo olfatorio, la corteza cerebelosa y la médula espinal, cultivados durante 6 días para determinar los niveles *in vitro* de estos neurotransmisores en cada región, lo cual también refleja el grado de desarrollo bioquímico de los circuitos neuronales locales crecidos *in vitro*. Por lo tanto, vamos a discutir los resultados del estudio en cada región por separado y comparado con los obtenidos en los cultivos histotípicos.

##### A. Bulbo Olfatorio

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que, en el bulbo olfatorio, al igual como en otras regiones del SNC, el glutamato es el neurotransmisor excitatorio dominante y el GABA el principal neurotransmisor inhibitorio. En los primeros estadios del desarrollo hasta el día antes del nacimiento (E13-E21), altos contenidos de glutamato, aspartato y GABA fueron detectados (Figs. 2 y 3; Tabla 1). Los altos niveles de glutamato prenatal se correlacionan con el período de generación de las neuronas principales del bulbo olfatorio, las células mitrales y las células en penacho, lo cual ocurre entre E13 y E21 [Bayer, 1983]. Para el día E19, las neuronas sensoriales olfatorias glutamatérgicas [Sassoe-Pognetto y col., 1993; Didier y col., 1994; Ennis y col., 1996] son funcionalmente maduras y forman sinapsis sobre las dendritas de las células mitrales y en penacho en los arreglos glomerulares del bulbo olfatorio [Hinds y Hinds, 1976; Gesteland y col., 1982]. Sin embargo, durante las primeras 24-48 horas después del nacimiento, hubo una reducción significativa en las concentraciones de glutamato, aspartato y GABA que

puede ser provocada por el estrés natal; el principio de la respiración abrupta durante el nacimiento tiene posibles implicaciones fisiológicas y metabólicas en el sistema olfatorio. Por otra parte, el cambio de una situación de existencia en un líquido, el amniótico, a una situación de existencia en un medio atmosférico debe producir cambios significativos en la fisiología de un quimiorreceptor. Entre P3 y P15, período durante el cual ocurre la máxima formación de sinapsis en el bulbo olfatorio [Pomeroy y col., 1990], se produce un incremento progresivo en los contenidos de glutamato para luego disminuir progresivamente en el estadio de adulto joven. Los niveles de aspartato muestran un valor máximo al día P3 y decrecen gradualmente hasta la segunda semana postnatal. En el estadio de adulto joven, las concentraciones de aspartato fueron comparables con aquellas de glutamato, indicando que el aspartato juega un papel de igual importancia al glutamato en la transmisión sináptica excitatoria del adulto. Las conexiones excitatorias en el bulbo olfatorio incluyen las sinapsis dendrodendríticas entre las células mitrales y las células en penacho, y las sinapsis con los axones colaterales recurrentes dentro del bulbo olfatorio [Mori, 1987; Trombley y Shepherd, 1993]. Estas neuronas excitatorias, las cuales se generan antes del nacimiento [Hinds, 1967; Hinds y Hinds, 1976], contribuyen en gran parte al incremento en el número y complejidad de los circuitos neuronales del bulbo olfatorio. Durante el desarrollo postnatal, el número de circuitos complejos, los glomérulos, que procesan la información olfatoria se incrementa gradualmente y a las 12 semanas de edad postnatal, el número de los glomérulos aumenta hasta 4 veces más que la encontrada neonatalmente [Pomeroy y col., 1990]. Estas regiones especializadas de la neuropila también reciben en raras sinapsis excitatorias desde las neuronas sensoriales olfatorias, las cuales continuamente se recambian durante toda la vida del animal [Valverde y col., 1992; Berkowitz y col., 1994; Keller y col., 1998].

Los contenidos postnatales de GABA se incrementan progresivamente desde el nacimiento hasta la madurez mostrando valores máximos durante P3, P11 y en el estadio de adulto joven. Durante las primeras tres semanas de vida postnatal se generan la mayoría de las poblaciones interneuronales, sin embargo la neurogénesis de las células granulosas continúa hasta la edad adulta [Mair y col., 1982; Bayer, 1983]. Casi todas las neuronas del bulbo olfatorio reciben aferencias GABAérgicas provenientes de las células granulosas y las interneuronas bulbares. Alrededor de los glomérulos, las células periglomerulares GABAérgicas inervan las dendritas primarias de las células mitrales y en penacho. Por otra parte, las dendritas secundarias de las células mitrales y en penacho forman sinapsis dendrodendríticas recíprocas en la capa plexiforme externa con las dendritas periféricas de las células granulosas GABAérgicas internas. Las células granulosas internas y las células periglomerulares reciben aferencias de los axones cortos de las interneuronas GABAérgicas.

En todo el período de desarrollo estudiado, la concentración de glicina permaneció relativamente baja (Fig. 3), sugiriendo que en el bulbo olfatorio la glicina probablemente ejerce más el papel de neuromodulador que el de neurotransmisor. Estudios inmunocitoquímicos identificaron en el mismo terminal axónico la presencia de los neurotransmisores glicina y GABA en la capa

glomerular del bulbo olfatorio [Kosaka y col., 1998]. En relación a la taurina, concentraciones relativamente bajas fueron detectadas durante el período prenatal, pero después del nacimiento el contenido de taurina se incrementó gradualmente con la edad y en el adulto, su concentración fue comparable con la del GABA y glutamato (Fig. 3). Evidencias inmunohistoquímicas demuestran la presencia de taurina en varias células bulbares y en la región glomerular y su colocalización con el glutamato en los terminales axónicos de las neuronas olfatorias [Didier y col., 1994]. Se ha propuesto que la taurina es un neuromodulador inhibitorio porque regula el flujo del calcio en los terminales nerviosos del cerebro [Magnusson, 1996], pero en un reporte más reciente [Puopolo y col., 1998] ha sido demostrado su rol como neurotransmisor inhibitorio mediado por la activación directa de los receptores GABA<sub>A</sub>.

Los cultivos primarios preparados de bulbo olfatorio de ratones P10 adquieren un alto grado de características histotípicas después de 6 días de desarrollo *in vitro*, como se puede observar en las micrografías electrónicas mostradas en las figuras 1A y 1B. A pesar de la deafferentización, las células mitrales y granulosas exhiben características ultraestructurales homologables a las células desarrolladas en el animal vivo (Fig. 1B) y muestran una neuropila bien definida, en donde las sinapsis recíprocas pueden ser fácilmente identificadas (Fig. 1A). Los resultados del análisis comparativo del contenido de neurotransmisores aminoacídicos *in vitro* e *in situ* en el bulbo olfatorio reflejan los niveles intrínsecos de estos neurotransmisores, en contraste con los niveles extrínsecos aportados por los axones aferentes; aunque existe la posibilidad que las condiciones *in vitro* puedan causar cambios en los niveles endógenos de estos neurotransmisores. En estudios anteriores hemos empleado este método comparativo para determinar la producción endógena de varios neurotransmisores en una región particular del SNC [Palacios-Prü y col., 1998; Miranda-Contreras y col., 1998]. Los niveles *in vitro* de glutamato y glicina fueron significativamente más altos que los valores equivalentes en el adulto *in situ*, mientras que el contenido de GABA *in vitro* fue comparable al equivalente en el adulto *in situ* (Fig. 4). Por otra parte, los niveles *in vitro* de aspartato y taurina fueron significativamente más bajos que sus contenidos equivalentes en el adulto *in situ*. Estos datos sugieren que la producción intrínseca de glutamato, glicina y GABA en el bulbo olfatorio es mayor que la cantidad extrínseca proveniente de los axones aferentes de los nervios olfatorios y de los centros olfatorios de la corteza cerebral; por otra parte, cantidades mayores de aspartato y taurina provienen de neuronas localizadas extrínsecamente. Estos resultados son consistentes con las evidencias inmunohistoquímicas que demuestran la colocalización de taurina y glutamato en los terminales axónicos de las neuronas sensoriales olfatorias [Fagg y Foster, 1983; Didier y col., 1994], así como la colocalización de glicina y GABA en las células periglomerulares y en las neuronas de axón corto [Kosaka y col., 1998].

## B. Corteza Cerebelosa

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman y amplían los hallazgos de los estudios previos sobre la neurotransmisión sináptica en la corteza

cerebelosa del ratón, demostrando que el glutamato y el GABA son los neurotransmisores aminoacídicos predominantes en el cerebelo. Durante los estadios tempranos de la neurogénesis, entre los días E15 y E21, fueron detectados niveles de GABA con valores de 2-3 veces más altos que los contenidos de glutamato y aspartato (Figs. 7 y 8). En los ratones, el período de máxima proliferación de las células de Purkinje y de las células de Golgi ocurre entre los días E13-E16 y E18-E21, respectivamente [Altman y Bayer, 1984]. Los altos niveles de GABA durante este período se correlacionan con la generación de estas neuronas y la inmunorreactividad con la descarboxilasa ácido glutámico observada en las células de Purkinje inmaduras y en las células de Golgi. Durante este período también se encuentran altos niveles de glutamato y aspartato, los cuales juegan un papel trófico durante el desarrollo [Lipton y Kater, 1989; Lauder, 1993]. Estos resultados son consistentes con los estudios inmunocitoquímicos y demuestran la abundancia de los receptores y transportadores de glutamato desde muy temprana edad, como es E13 [Takayama y col., 1996; Furuta y col., 1997; Yamada y col., 1997], así como la influencia moduladora positiva de GABA produciendo un factor de equilibrio para el glutamato y un soporte trófico para las células que son vulnerables a la excitotoxicidad del glutamato [Chen y col., 1996; Khalilov y col., 1999].

Los niveles postnatales de glutamato y aspartato mostraron patrones comparables de variación, aumentando gradualmente desde el nacimiento hasta el estadio de adulto joven, mostrando valores máximos los días P3, P11 y adulto joven (Fig. 7). Estos resultados corroboran los períodos de nervación excitatoria de las células de Purkinje: el primero, entre P2-P5, cuando múltiples fibras trepadoras hacen contactos sinápticos con los procesos somáticos de las células de Purkinje; y el segundo, entre P10-P14, que coincide con el crecimiento y arborización de las dendritas de las células de Purkinje, cuando se establecen múltiples contactos sinápticos entre las espinas dendríticas de las células de Purkinje y las fibras paralelas de las células granulosas [Crépel y col., 1981; Mariani y Changeaux, 1981]. En el cerebelo maduro, cada célula de Purkinje es inervada por muchas fibras paralelas y recibe numerosos contactos sinápticos de una fibra trepadora [Mason y col., 1990]. Nuestros datos sugieren que tanto el glutamato como el aspartato participan en el desarrollo de las conexiones sinápticas excitatorias en el cerebelo.

Durante las primeras dos semanas después del nacimiento, los niveles de GABA permanecieron altos y a la tercera semana, alcanzan los valores de adulto (Fig. 8). En la corteza cerebelosa del ratón este período se caracteriza por la maduración neuronal, tanto de las células de Purkinje como de las células de Golgi así como incluye también el período de la sinaptogénesis entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje [Altman, 1972]. Los niveles altos de GABA observados en los días P3 y P11 podrían corresponder al período inicial de formación sináptica entre los axones de las células de Purkinje y las neuronas de los núcleos cerebelosos profundos entre los días P2-P6, la elaboración de las dendritas y axones de las células de Golgi entre P3-P5 y la inervación de las células de Purkinje por las células en cesta y las células estrelladas, maduran hacia la segunda semana postnatal [Altman, 1972]. A las tres semanas de desarrollo postnatal, estas interacciones

sinápticas se hacen más extensas y maduras. Los altos contenidos de GABA durante este período son consistentes con el incremento en la síntesis de GABA en las neuronas GABAérgicas en el cerebelo durante el desarrollo; por otra parte, la síntesis de los receptores GABAA también aumenta significativamente durante la segunda semana del desarrollo postnatal [Meinecke y Rakic, 1990; Laurie y col., 1992].

Los neurotransmisores inhibitorios, glicina y taurina, mostraron patrones comparables de desarrollo, como se pueden ver en la figura 8. Ambos neurotransmisores están presentes en concentraciones relativamente bajas durante el período prenatal, desde E15 hasta E21. Sin embargo, después del nacimiento sus concentraciones ascienden significativamente cerca de 4 veces al día P1 y luego decrecen a niveles moderados durante la primera semana postnatal. Es interesante destacar que tanto la glicina como la taurina son los únicos neurotransmisores encontrados en niveles bajos durante los días prenatales, ya que en el momento del nacimiento hay un incremento abrupto en sus concentraciones; este fenómeno requiere estudios adicionales. Un incremento gradual en los niveles de ambos neurotransmisores fue observado durante la segunda semana postnatal; durante la tercera semana alcanzan valores semejantes a los del animal adulto. La variación en los niveles de glicina durante el desarrollo en el cerebelo es consistente con la expresión de los transportadores de glicina, G1 y T1 y G1 y T2 [Zafra y col., 1995]. La glicina ha sido colocalizada con GABA en los terminales axónicos de las células de Golgi [Ottersen y col., 1988b], por otra parte se ha demostrado la presencia de los receptores de glicina y GABA en las células de Golgi [van den Pol y Cotter, 1988; Dieudonné, 1995]. Durante los primeros estadios de desarrollo se han encontrado altas concentraciones de taurina en las células de Purkinje y en las células granulosas [Magnusson, 1994; 1996]. La taurina parece jugar un papel importante durante el crecimiento del árbol dendrítico de las células de Purkinje y durante la migración de las células granulosas, lo cual es uno de los procesos fundamentales que definen la morfogénesis cerebelosa [Trenker, 1990; Trenker y col., 1996].

A pesar de la deaferentización, los cultivos histotípicos de la corteza cerebelosa mostraron un alto grado de diferenciación neuronal, como se demuestra con la formación de las capas plexiformes granulosas (Figs. 5 - 6 A y B) que representan la organización de los circuitos sinápticos intrínsecos en la corteza cerebelosa. Un hallazgo interesante en estos cultivos es la presencia de grandes terminales axónicos semejantes a las fibras musgosas (Fig. 6A y 6B) que muestran contactos sinápticos múltiples con las dendritas de las células granulosas. Dado que las fibras musgosas son de origen extracerebelar, la formación *in vitro* de terminales axónicos semejantes a las fibras musgosas podría ser una contribución de los axones de las células en cesta localizadas en la capa granulosa [Mugnaini y col., 1997] o ser una expresión de plasticidad neuronal que hace que los axones de algunas células granulosas produzcan sitios multisinápticos para asemejar la organización de los necesarios terminales musgosos que actúan como los elementos divergentes del circuito excitatorio de las células de Purkinje. En favor de esta última hipótesis está el hecho que las vesículas sinápticas son esféricas como las de los musgos y las

de las fibras paralelas, mientras que las células en cesta o de Cajal tienen vesículas aplanadas [Palacios-Prü y col., 1977].

Los datos obtenidos de los estudios comparativos, *in situ* e *in vitro*, demuestran que tanto el glutamato como el aspartato juegan un papel importante en la neurotransmisión excitatoria de los circuitos cerebelosos intrínsecos. Después de 6 días de incubación, los cultivos histotípicos de la corteza cerebelosa mostraron niveles comparables de glutamato y aspartato, pero sus concentraciones en los cultivos fueron 50% más bajas que los valores equivalentes en el animal adulto *in vivo*. Debido a que las células granulosas constituyen la única población neuronal excitatoria en el cerebelo, estos resultados sugieren que las neuronas granulosas usan tanto glutamato como aspartato como neurotransmisores. Además, aproximadamente 50% de las sinapsis excitatorias en los circuitos neuronales de la corteza cerebelosa en el adulto son sinapsis establecidas entre las células de Purkinje y los aferentes axónicos provenientes de los núcleos de la oliva inferior, las fibras trepadoras, y de varias regiones del SNC, las fibras musgosas. Estos hallazgos indican que las aferencias, las fibras trepadoras y musgosas, también utilizan glutamato y aspartato como sus agentes transmisores excitatorios, lo cual está en desacuerdo con algunos reportes [Somogyi y col., 1986; Garth Waite y Brodbelt, 1990] que afirman que son principalmente glutamatérgicos. Estudios previos han demostrado la presencia y la liberación de aspartato en los terminales axónicos de las fibras trepadoras que hacen sinapsis con las células de Purkinje [Wiklund y col., 1987].

En los cultivos histotípicos de la corteza cerebelosa, la neurotransmisión inhibitoria es predominantemente GABAérgica, como se puede observar en la figura 8, con una elevada concentración de GABA *in vitro*, cerca de 3 veces mayor que la de glicina y 6 veces más alta que la de taurina. Los niveles de GABA y glicina *in vitro* son comparables con los valores en el adulto *in situ*, sugiriendo que la gran mayoría del GABA y de glicina se produce endógenamente en la corteza cerebelosa. En relación al contenido de taurina *in vitro*, fueron detectados niveles relativamente bajos, cerca del 79% más bajo que los valores equivalentes *in situ*. Estos hallazgos sugieren que en el cerebelo la mayor parte de la taurina proviene de aferencias extracerebelosas. Evidencias inmunocitoquímicas han demostrado la presencia de taurina en las células de Purkinje y en los axones aferentes en migración de las fibras trepadoras y musgosas en la capa granulosa durante los primeros estadios de desarrollo [Magnusson, 1994].

### C. Médula Espinal

En el presente estudio hemos demostrado que el glutamato es el neurotransmisor aminoacídico excitatorio más importante en la médula espinal y la glicina es más abundante que el GABA en esta región del SNC; estos resultados son consistentes con los reportes previos que involucran a estos neurotransmisores en la

neurotransmisión sináptica rápida en la médula espinal [van de Pol y Gorcs, 1988; Clements y col., 1990; Betz, 1991; Kuhse y col., 1995; Álvarez y col., 2000]. Estudios con antagonistas indican que existen dos componentes en la inhibición de las neuronas espinales: una de fase rápida que compromete a los receptores de glicina y una de fase lenta mediada por los receptores GABAA [Baba y col., 1994; Yoshimura y Nishi, 1995].

En la médula espinal la conexión neuronal más ampliamente estudiada durante el desarrollo ha sido la establecida entre las motoneuronas y los músculos que ellas inervan [deLapeyrière y Henderson, 1997; Hughes y Salinas, 1999]. Todas las motoneuronas son consideradas colinérgicas e inician la expresión de colina acetiltransferasa en etapas muy tempranas del desarrollo [Phelps y col., 1988; Tanabe y Jessell, 1996]. Sin embargo, se tiene poca información en relación al desarrollo de las interneuronas espinales y la formación de conexiones sinápticas interneuronales. La vía eferente motora de la médula espinal es generada, en gran parte, por los circuitos de interneuronas excitatorias e inhibitorias. En este sentido se sabe que los componentes básicos de la red neuronal que coordina la locomoción, contienen interneuronas excitatorias glutamatérgicas que se proyectan a todos los tipos de interneuronas ipsilaterales y a las motoneuronas e interneuronas inhibitorias glicinérgicas y GABAérgicas con proyecciones ipsilaterales y contra laterales que inhiben todas las células en la red locomotora [Grillner y col., 1995; 2000; Tran y Phelps, 2000]. Los datos reportados en el presente estudio sobre los cambios en los niveles de neurotransmisores aminoacídicos desde el período embrionario hasta el postnatal temprano, permiten aportar información sobre la ontogénesis de la población de interneuronas espinales y la cronología del desarrollo de los circuitos funcionales de las interneuronas excitatorias e inhibitorias.

Como se muestra en la figura 13, niveles relativamente altos de glutamato ya se detectan en la médula espinal del ratón al día E 12, indicando la presencia de numerosas neuronas glutamatérgicas, lo cual se correlaciona con la evidencia electro fisiológica del registro de potenciales de acción sodio-dependientes en la rata, en edades tempranas como E13 [Saito, 1979; Seno y col., 1984; Ziskind-Conhaim, 1988; Mandler y col., 1990]. Entre E16 y E19, el contenido de glutamato se incrementa significativamente; este incremento se corresponde con el inicio de la sinaptogénesis en motoneuronas espinales a partir del día E 16; ya al día E 19 se observan sinapsis excitatorias bien establecidas en todas las motoneuronas [Ziskind-Conhaim, 1990]. Por otra parte, disminuciones significativas del contenido de glutamato fueron observadas entre E12-E16 y entre P3-P7. Estos resultados sugieren una pérdida importante de los contactos sinápticos excitatorios establecidos entre interneuronas y motoneuronas y entre axones aferentes y motoneuronas, los cuales corroboran los hallazgos de Oppenheim [1986] sobre la pérdida numérica de motoneuronas durante el desarrollo de la médula espinal de la rata, mostrando un 40-45% de pérdida de estas células entre E 15 y P5. Los dos períodos aparentemente relacionados con la eliminación de sinapsis pueden estar correlacionados como dos eventos importantes que ocurren en el cerebro en desarrollo: la muerte celular programada o apoptosis y el refinamiento de las sinapsis estímulo-dependiente. La apoptosis está involucrada en el modelaje final de la población neuronal en el

sistema nervioso en desarrollo [Linden, 1994; Thomaidou y col., 1997], mientras que el refinamiento de las sinapsis estímulo-dependiente asegura las conexiones precisas en el circuito neural para el funcionamiento adecuado del SNC [Lichtman y Colman, 2000].

Los cambios durante el desarrollo de los contenidos de glicina y GABA se muestran en la figura 15 y Tabla III. Entre E12-E13, los niveles de glicina se encuentran aproximadamente 6-8 veces más altos que los valores de GABA, indicando que en esta temprana edad ya existen en la médula espinal del ratón abundante interneuronas glicinérgicas. Entre E17 y P3, el contenido de glicina se incrementó significativamente, aproximadamente 4 veces más de su contenido inicial, sugiriendo la generación de numerosas neuronas glicinérgicas durante este período. Estos resultados son consistentes con los datos bioquímicos que muestran la presencia de receptores de glicina desde el día E14 en la rata [Akagi y Mileidi, 1988] y con evidencias inmunocitoquímicas del aumento en la cantidad de células inmunoreactivas a glicina y GABA entre E17 y E19 [Wu y col., 1992; Gao y Ziskind-Conhaim, 1995]. Por otra parte, el patrón de cambios en los contenidos de GABA durante el desarrollo mostró un incremento gradual entre E14 y P3, con valores máximos observados en E19 y P3. Estos resultados confirman los reportes de registros electrofisiológicos al día E17 indicando actividad GABAérgica en la médula espinal aislada de fetos de rata [Seno y Saito, 1985]. Con técnicas inmunocitoquímicas se ha detectado la enzima que sintetiza el neurotransmisor GABA, la descarboxilasa ácido glutámico (GAD65), entre los días E17 y E20 [Colton J. y col., 2000], así como un aumento en el número de células inmunoreactivas a glicina y GABA entre E17 y E19 [Wu y col., 1992]. Como se muestra en la figura 15, hay una reducción significativa en los niveles de glicina entre los días E14-E16 y P3-P7, la cual puede estar relacionada con la apoptosis durante el desarrollo normal; el grado de apoptosis fue menos pronunciado para las interneuronas GABAérgicas en estos dos períodos.

El papel de neurotransmisor inhibitorio o neuromodulador de la taurina ha sido demostrado en la médula espinal [Yasunami y col., 1988; Lee y col., 1992] así como también en otras regiones del SNC [Decavel y Hatton, 1995; Gragera y col., 1995; Puopolo y col., 1998; Flint y col., 1998; Scheller y col., 2000]. Los altos niveles de taurina detectados durante el desarrollo implican que ella realiza otras funciones diferentes a la neurotransmisión, como es la de actuar como osmorregulador y estabilizador de las membranas celulares [Saransaari y Oja, 1992; Hussy y col., 1997]. Sin embargo, la abundancia de taurina en el cerebro proviene no solamente de las células nerviosas sino también de las células gliales, ya que la biosíntesis de la taurina a partir de la cisteína también se encuentra en el aparato metabólico de los astrocitos [Brand y col., 1998]. Por otra parte, como se observa en los patrones de cambio de los niveles de glutamato y glicina durante el desarrollo (Figs. 14 y 15), disminuciones significativas en los niveles de taurina fueron encontradas durante tres etapas: entre E15-E16, entre P3-P7 y en el estadio del animal adulto. Estos resultados parecen reforzar el rol de la taurina en la neurotransmisión sináptica en la médula espinal. La taurina se conoce bien como un activador de los receptores de glicina y GABA<sub>A</sub> durante el desarrollo neocortical

temprano [Hussy y col., 1997; Flint y col., 1998; del Olmo y col., 2000]. Varios reportes han demostrado que la activación de estos receptores en la neocorteza en desarrollo es excitatoria, conduciendo a un aumento en la actividad sináptica y en la elevación del calcio intracelular [Hussy y col., 1997; Flint y col., 1998; van de Pol y col., 1998; del Olmo y col., 2000]. Como se muestra en la Tabla III, durante el desarrollo en la médula espinal, la proporción de taurina a glutamato varió de 2 a 4 veces, mientras que la relación de taurina a glicina, de 2 a 6 veces; en el adulto, ambas relaciones dieron valores de 1:1. Estos resultados demuestran el papel protector de taurina a las neuronas en crecimiento, protegiéndolas de excesiva excitación que puedan causar los neurotransmisores aminoacídicos excitatorios [Lehman y col., 1984]. Este hecho probablemente explica su abundancia relativa en el CNS en desarrollo [Huxtable, 1989; Magnusson, 1996].

En el estudio de los niveles de los neurotransmisores aminoacídicos en cultivos de médula espinal de ratón, preparamos cultivos primarios de la médula de embriones de diferentes edades, entre E13 y E19, y se cultivaron durante 6 días, para determinar la edad crítica de desarrollo en la cual se obtienen las características histotípicas. Como resultado de los análisis usando la de microscopía de luz de alta resolución (Figs. 10A y B) Y estudios ultraestructurales (Figs. 11 - 12 A y B), así como del análisis de la ontogénesis de los neurotransmisores aminoacídicos en la médula espinal (Fig. 15 A y B; Tabla IV), los cultivos preparados de ratones E15-E16 mostraron las mejores características fenotípicas y contenidos de neurotransmisores homologales a los embriones vivos de edad equivalente a E21. La microscopía de luz y electrónica de los cultivos revelaron características morfológicas con un alto grado de diferenciación, mostrando diversidad neuronal y una neuropila externa o sustancia blanca bien definida. En estos cultivos fueron observados numerosos contactos sinápticos asimétricos y simétricos, características de las sinapsis excitatorias e inhibitorias, respectivamente (Figs. 12 A y B). La presencia de grandes neuronas con rasgos ultraestructurales propios de las motoneuronas (Fig. 11) indica un alto grado de sobre vivencia de la población neuronal de motoneuronas e interneuronas de la médula espinal a pesar de la deafferentización. Además, la presencia de axones mielinizados (Fig. 12) y la existencia de una región periférica de sustancia blanca indican el desarrollo de células gliales, tanto oligodendrocitos como astrocitos, en estos cultivos histotípicos de médula espinal.

Aunque los cultivos histotípicos retienen las características morfológicas principales de la médula espinal intacta, existe la posibilidad que las condiciones *in vitro* puedan causar reorganizaciones conexas después de la deafferentización de todas las conexiones extrínsecas, aferentes y eferentes. Además las condiciones *in vitro* también pueden afectar la producción endógena de neurotransmisores de los circuitos neuronales intrínsecos conservados. Como se muestra en la figura 16, el análisis comparativo de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos, *in vitro* vs. *in situ*, demuestra que la distribución normal de los aminoácidos neuroactivos en la médula espinal se mantiene en estos cultivos histotípicos. Sin embargo, los contenidos de aspartato y glutamato fueron más bajos aproximadamente el 40%, respecto a los valores normales *in situ*, lo cual puede ser debido a la

deafrentización de los terminales axónicos sensitivos, sensoriales y supraespinales, en los cuales se ha demostrado que son principalmente glutamatérgicos [Grillner y col., 1995; 2000; Álvarez y col., 2000]. En contraste, los niveles de glicina y taurina están cerca de 80-90% de los valores normales *in situ*, mientras que los contenidos de GABA fueron homologables con los niveles *in situ*. Estos resultados indican que los circuitos sinápticos intrínsecos pueden ser mantenidos en los cultivos histotípicos de la médula espinal preparados de embriones de ratón de E15-E16.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## V. Resumen y Conclusiones

- A. En este estudio, hemos suministrado datos cuantitativos, obtenidos mediante HPLC, sobre los niveles normales de neurotransmisores aminoacídicos, tales como: el glutamato, el aspartato, la glicina, la taurina y el GABA, durante la neurogénesis del bulbo olfatorio, la corteza cerebelosa y la médula espinal de ratón, desde E12 hasta P30. El estudio de la ontogénesis de estos neurotransmisores en distintas regiones del SNC nos aporta una mejor comprensión del desarrollo de las conexiones sinápticas de la neurotransmisión aminoacídica de cada región.
- B. Para determinar los niveles funcionales de los neurotransmisores aminoacídicos en los circuitos locales o intrínsecos de las regiones objetos de estudio, fueron analizados estos neurotransmisores en cultivos primarios histotípicos de bulbo olfatorio, corteza cerebelosa y médula espinal de ratón.
- C. Los cultivos de médula espinal fueron preparados de embriones entre E13 y E19, y de los cuales los cultivos provenientes de E15-E16 tienen el mayor grado de desarrollo de las características histotípicas y el más alto contenido de neurotransmisores si se les compara con las edades equivalentes. Por otra parte, los cultivos de bulbo olfatorio y corteza cerebelosa fueron preparados de ratones de la edad P10 para obtener cultivos histotípicos como se ha demostrado en nuestros trabajos anteriores.
- D. Basándose en los datos obtenidos en este estudio, podemos concluir que en la construcción de los circuitos neuronales complejos del bulbo olfatorio durante la neurogénesis, los neurotransmisores glutamato y GABA tienen un papel principal en la transmisión sináptica (Fig. 17). Sin embargo en el animal adulto, el aspartato se encuentra en concentraciones similares a la del glutamato indicando la importancia de ambos aminoácidos en la transmisión sináptica excitatoria en el adulto. Por otra parte, tanto GABA y taurina tienen concentraciones comparables en el animal adulto joven sugiriendo la influencia importante de la taurina en la neuromodulación o neurotransmisión sináptica inhibitoria en el adulto.
- E. El análisis comparativo *in vitro* e *in situ* de los neurotransmisores aminoacídicos indican una alta proporción de glutamato, glicina y GABA en los cultivos indicando que estos son intrínsecos al bulbo olfatorio y que la mayor proporción del aspartato y la taurina proviene de neuronas localizadas extrínsecamente.
- F. Los estudios comparativos *in situ* e *in vitro* de los neurotransmisores aminoacídicos en la corteza cerebelosa demuestran que tanto el glutamato como el aspartato juegan un papel de igual importancia en la neurotransmisión excitatoria de los circuitos cerebelosos intrínsecos. Ya que las células granulosas constituyen la única población

www.bdigital.ula.ve

neuronal excitatoria en el cerebelo, nuestros resultados sugieren que las neuronas granulosas emplean glutamato y aspartato como neurotransmisor. Aproximadamente 50% de las sinapsis excitatorias en la corteza cerebelosa madura son sinapsis establecidas entre las células de Purkinje y los aferentes axónicos de las fibras trepadoras y musgosas. Nuestros resultados también indican que las aferencias extracerebelares utilizan el glutamato así como el aspartato como sus agentes neurotransmisores excitatorios.

- G. En la corteza cerebelosa, la neurotransmisión inhibitoria es predominantemente GABAérgica (Fig. 18). Los niveles de GABA y glicina *in vitro* son comparables con sus equivalentes contenidos *in situ*, sugiriendo que la gran proporción de GABA y glicina se produce endógenamente en la corteza cerebelosa. En el cerebelo, la mayoría de la taurina proviene de aferencias extracerebelosas.
- H. La neurotransmisión sináptica inhibitoria en médula espinal es principalmente mediada por glicina, como ha sido demostrado en este estudio con los niveles de glicina consistente mente más altos aproximadamente 2 a 3 veces más que los de GABA (Fig. 19). Sin embargo, los niveles de taurina son aún más altos en comparación con los neurotransmisores inhibitorios rápidos, el GABA y la glicina, variando de 1-6 veces en relación con glicina y de 2-9 veces en relación con GABA. Por otra parte, los valores de taurina disminuyeron significativamente en el estadio de taurina adulto, demostrando que la taurina ejerce una influencia importante en el desarrollo de la médula espinal.
- I. El análisis comparativo, *in situ* e *in vitro*, de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos en médula espinal demuestran que los contenidos de estos aminoácidos neuroactivos en cultivos histotípicos son comparables con sus valores equivalentes en el animal vivo, con excepción de los niveles de glutamato y aspartato que fueron aproximadamente 40% más bajos de los valores *in situ*, lo cual puede ser debido a la deaferentización de los terminales axónicos sensitivos, sensoriales y supraespinales. Estos resultados indican que los circuitos sinápticos intrínsecos se mantienen íntegros en los cultivos histotípicos de la médula espinal.
- J. Finalmente, los cultivos histotípicos de diferentes regiones del SNC, caracterizados por su histotipia, citotipia y propiedades neuroquímicas, serán un modelo importante para estudios funcionales concernientes a la fisiología y la fisiopatología de la neurotransmisión sináptica aminoacídica y así llegar a establecer estrategias reparativas para muchos desórdenes del SNC.

## VI. Referencias

Aichler SA, Sharma S, Cheng PY, Pickel VM (1997) The N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is postsynaptic to Substance P-containing axon terminals in the rat superficial dorsal horn. *Brain Res* 772:71-81.

Akagi H, Miledi R (1988) Heterogeneity of glycine receptors and their messenger RNAs in rat brain and spinal cord. *Science* 242:270-273.

Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulbo. *J Comp Neurol* 137:433-458.

Altman J (1972) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 1. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J Comp Neurol* 145:353-398.

Altman J, Bayer SA (1984) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. 1. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J Comp Neurol* 179:23-48.

Altman J, Bayer SA (1984) The development of rat spinal cord. En Beck F, Hild W, van Limbogh J, Orman R, Paul LL, Schieble TH (eds) *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, Vol 83, Springer, Berlin, pp 1-166.

Alvarez JF, Villalba RM, Carr PA, Grandes P, Somohano PM (2000) Differential distribution of metabotropic glutamate receptors 1a, 1b, and 5 in the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 422:464-487.

Armengol JA, Sotelo C (1991) Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum: a light and electron microscopic study using axonal tracing in *in vitro* slices. *Dev Brain Res* 64:95-114.

Baba H, Yoshimura M, Nishi S, Shimoji K (1994) Synaptic responses of substantia gelatinosa neurons to dorsal column stimulation in rat spinal cord *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 478:87-99.

Baev KV, Rusin KI, Safronov BV (1992) Primary receptor for inhibitory transmitters in lamprey spinal cord neurons. *Neuroscience* 46:931-941.

Bayer SA (1983) <sup>3</sup>H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulbo. *Exp Brain Res* 50:329-340.

Berkowicz ZA, Trombley PQ, Shepherd GM (1994) Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. 1. *Neurophysiol* 71:2557-2561.

Betz H (1991) Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci* 14:458-461.

Bischofberger J and Jonas P (1997) Action potential propagation into the presynaptic dendrites of rat mitral cells. *J. Physiol. (Lond.)* 504:359-365.

Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy compartmentalization of GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes in immunohistochemical study. *J Neurosci* 16:283-297.

Brand A, Leibfritz D, Hamprecht B, Dringen R (1998) Metabolism of cysteine in astroglial cells: Synthesis of hypotaurine and taurine. *J Neurochem* 71: 827 -832.

Brann DW (1995) Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 61 :213-225.

Briscoe J, Ericson J (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 11 :43-49.

Cameron HA, Hazel TG and McKay RDG (1998) Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol* 36:287-306.

Campistrón G, Ruijs R, Geffard M (1986) Glycine neurons in the brain and spinal cord. Antibody production and immunocytochemical localization. *Brain Res* 376:400-407.

Caviness, Jr, Takahashi T, Nowakowski RS (1995) Numbers, time and neocortical neurogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci* 18:379-383.

Chen G, Trombley PQ and van den Pol AN (1996) Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. 1. *Physiol. (Lond)* 494 :451-464.

Chen WR, Midtgard I and Shepherd GM (1997) Forward and backward propagation of dendritic impulses and their synaptic control in mitral cells. *Science* 278:463-467.

Clements JR, Magnusson KR, Betz AJ (1990) Ultrastructural description of glutamate-, aspartate-, taurine-, and glycine-like immunoreactive terminals from five rat brain regions. *J Electron Microscop Tech* 15:49-66.

Corotto FS, Henegar JR and Maruniak JA (1994) Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 61 :739-744.

Cotman CW and Iversen LL (1987) Excitatory amino acids in the brain - focus on NMDA receptors. *Trends Neurosci* 10:263-265.

www.bdigital.ula.ve

Crépel F, Delhaye-Bouchard N, Dupont JL (1981) Fate of the multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibers in immature control, x-irradiated and hypothyroid rats. *Dev Brain Res* 1 :59-71.

De Boer-van Huizen RT, ten Donkelaar JH (1999) Early development of descending supraspinal pathways: a tracing study in fixed and isolated rat embryos. *Anat Embryol* 199:539-547.

Decavel C and van Den Pol AN (1990) GABA: a dominant transmitter in the hypothalamus. *J Comp Neuro* 302:1019-1037.

Decavel C, Hatton GI (1995) Taurine immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus: prominent localization in glial cells. *J Comp Neurol* 354: 15-26.

del Olmo N, Bustamante J, del Río RM, Solís JM (2000) Taurine activates GABA<sub>A</sub> but not GABA<sub>B</sub> receptors in rat hippocampal CA1 area. *Brain Res* 864:298-307.

deLapeyrière O, Henderson CE (1997) Motoneuron differentiation, survival and synaptogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 7:642-650.

Didier A, Ottersen OP and Storm-Mathisen J (1994) Differential subcellular distribution of glutamate and taurine in primary olfactory neurones. *NeuroReport* 6: 145-148.

Dieudonné S (1995) Glycinergic synaptic currents in Golgi cells of the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1441-1445.

Ennis M, Zimmer LA and Shipley M (1996) Olfactory nerve stimulation activates rat mitral cells via NMDA and non-NMDA receptors *in vitro*. *NeuroReport* 7:989-992.

Fagg GE and Foster AC (1983) Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9:701-719.

Farrant M, Feldmeyer O, Takahashi T, Cull-Candy SG (1994) NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature* 368:335-339.

Flint AC, Liu X, Kriegstein AR (1998) Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20:43-53.

Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17:8363-8375.

Galarreta M, Bustamante J, Martín del Río R, Solís JM (1996) Taurine induces a longlasting increase of synaptic efficacy and axon excitability in the hippocampus. *J Neurosci* 16:92-102.

www.bdigital.ula.ve

Gao BX, Ziskind-Conhaim L (1995) Development of glycine- and GABA-gated currents in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 74: 113-121.

García Y, Ibarra C and Jaffé EH (1995) NMDA and non-NMDA receptor-mediated release of [<sup>3</sup>H] GABA from granule cell dendrites of rat olfactory bulb. *J Neurochem* 64:662-669.

Garthwaite J, Brodbelt AR (1990) Glutamate as the principal mossy fiber transmitter in rat cerebellum: pharmacological evidence. *Eur J Neurosci* 2: 177-180.

Gesteland PC, Yancey RA, Farbman AI (1982) Development of olfactory receptor neuron selectivity in the rat fetus. *Neuroscience* 7:3127-3136.

Gragera RR, Muñiz E, De Esteban G, Alonso MJ, Martinez-Rodriguez R (1995) Immunohistochemical demonstration of taurine in the rat cerebellar cortex. Evidence for its location within mossy fibers and Golgi axons. *J Brain Res* 36:269-276.

Grillner S, Deliagina T, Ekeberg O, El Manira A, Hill RH, Lansner A, Orlovsky GN, Wallén P (1995): Neural networks that co-ordinate locomotion and body orientation in lamprey. *Trends Neurosci* 18:270-279.

Grillner S, Cangiano J, Hu GY, Thompson R, Hill R, Wallén P (2000) The intrinsic function of a motor system - from ion channels to networks and behaviour. *Brain Res* 885:224-236.

Gutierrez A, Khan ZU, De Bias AL (1994) Immunocytochemical localization of  $\gamma_2$  short and  $\gamma_2$  long subunits of the GABA<sub>A</sub> receptor in the rat brain. *J Neurosci* 14:7168-7179.

Halász N, Shepherd GM (1983) Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulbo. *Neuroscience* 10:579-619.

Heath MJ, Womack MD, MacDermott AB (1994) Substance P elevates intracellular calcium in both neurons and glial cells from the dorsal horn of the spinal cord. *J Neurophysiol* 72: 1192-1198.

Hinds JW (1967) Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulbo 1. Time of origin of neurons and neuroglia. *J Comp Neurol* 134:287-304.

Hinds JW, Hinds PL (1976) Synapse formation in the mouse olfactory bulbo 1. Quantitative studies. *J Comp Neurol* 169: 15-40.

Hughes SM, Salinas PC (1999) Control of muscle fibre and motoneuron diversification. *Curr Opin Neurobiol* 9:54-64.

Hussy N, Deleuze C, Pantaloni A, Desarmenien MG, Moos F (1997) Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurons: possible role in osmoregulation. *J Physiol (Lond)* 502:609-621.

Huxtable RJ (1989) Taurine in the central nervous system and mammalian actions of taurine. *Prog Neurobiol* 32:471-533.

Isaacson JS, Strowbridge BW (1998) Olfactory reciprocal synapses: dendritic signalling in the CNS. *Neuron* 20:749-761.

Jeftinija S, Jeftinija K, Liu F, Skilling SR, Smullin DH, Larson AA (1991) Excitatory amino acids are released from rat primary afferent neurons *in vitro*. *Neurosci Lett* 125:191-194.

Keller A, Yagodin S, Aroniadou-Anderjaska V, Zimmer LA, Ennis M, Sheppard Jr NF, Shipley MT (1998) Functional organization of rat olfactory bulb glomeruli revealed by optical imaging. *J Neurosci* 18:2602-2612.

Jessell TM, Sanes JR (2001) Generación y supervivencia de las células nerviosas. En Kandel ER, Schwartz Jh, Jessell TM (eds), *Principios de Neurociencia*, Cuarta edición, McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp 1041-1061.

Kakizawa S, Yamasaki M, Watanabe M, Kano M (2000) Critical period for activity-dependent synapse elimination in developing cerebellum. *J Neurosci* 20:4954-4961.

Kano M, Hashimoto K, Kurimara H, Watanabe M, Inoue Y, Hiba H, Tonegawa S (1997) Persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar cells in mice lacking mGluR1. *Neuron* 18:71-79.

Khalilov I, Dzhalal V, Ben-Ari Y, Khazipov R (1999) Dual role of GABA in the neonatal rat hippocampus. *Dev Neurosci* 21:310-319.

Kontro P, Oja SS (1989) Release of taurine and GABA from cerebellar slices from developing and adult mice. *Neuroscience* 29:413-423.

Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T (1998) How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 30:101-110.

Kuhse J, Betz H, Kirsch J (1995) The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 5:318-323.

Lauder JL (1993) Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* 16:233-239.

Laurie DJ, Wisden W, Seeburg PH (1992) The distribution of thirteen GABA<sub>A</sub> receptor mRNAs in the in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* 12:4151-4172.

Lee IS, Renno WM, Beitz AJ (1992) A quantitative light and electron microscopic analysis of taurine-like immunoreactivity in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 321:65-82.

Lehmann A, Hagberg H, Hamberger A (1984) A role for taurine in the maintenance of homeostasis in the central nervous system during hyperexcitation. *Neurosci Lett* 52: 341-346.

Lichtman JW, Colman H (2000) Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25:269-278.

Linden R (1994) The survival of developing neurons: a review of afferent control. *Neuroscience* 58:671-682.

Lipton SA, Kater SB (1989) Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci* 12:265-270.

MacDermott AB, Dale N (1987) Receptors, ion channels and synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory amino acids. *Trends Neurosci* 10: 280-284.

Magnusson KR (1994) Changes in the localization of taurine-like immunoreactivity during development and regeneration in the rat brain. En Huxtable RJ and Michalk DV (eds), *Taurine in Health and Disease*, Plenum Press, New York, pp 235-243.

Magnusson KR (1996) Distributions of taurine, glutamate and glutamate receptors during postnatal development and plasticity in the brain. En RJ Huxtable and DV Michalk (eds), *Taurine 2*, Plenum Press, New York, pp 435-444

Mair RG, Gelman RL, Gesteland RC (1982) Postnatal proliferation and maturation of olfactory bulb neurons in the rat. *Neuroscience* 7:3105-3116.

Mandler RN, Schaffner AE, Novotny EA, Lange GD, Smith SV, Barker JL (1990) Electrical and chemical excitability appear one week before birth in the embryonic rat spinal cord. *Brain Res* 522:46-54.

Mariani J, Changeaux JP (1981) Ontogenesis of olivocerebellar relationships. I. Studies of intracellular recordings of the multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the developing rat cerebellum. *J Neurosci* 1: 696-702.

Mason CA, Christakos S, Catalano S (1990) Early climbing fiber interactions with Purkinje cells in the postnatal mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 297:77-90.

Meinecke DL, Rakic P (1990) Developmental expression of GABA and subunits of the GABA<sub>A</sub> receptor complex in an inhibitory synaptic circuit in the rat cerebellum. *Dev Brain Res* 55:73-86.

Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Zambrano E, Palacios-Prü EL (1992) Release of neurotransmitters and neurosecretory substances during *in vitro* maturation of mouse hypothalamic cultures.

Miranda-Contreras L, Palacios-Prü EL (1995) Existence of a putative specific postsynaptic density protein produced during Purkinje cell spine maturation. *Int J Devl Neurosci* 13:403-416.

Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Palacios-Prü EL (1998) Levels of monoamine and amino acid neurotransmitters in the developing male mouse hypothalamus and in histotypic hypothalamic cultures. *Int J Devl Neurosci* 16:403-412.

Miranda-Contreras L, Benitez-Díaz PR, Mendoza-Briceño RV, Delgado-Saez MC, Palacios-Prü EL (1999) Levels of amino acid neurotransmitters during mouse cerebellar neurogenesis and in histotypic cerebellar cultures. *Dev Neurosci* 16:403-412.

Miranda-Contreras L, Ramírez-Martens LM, Benitez-Díaz PR, Peña-Contreras ZC, Mendoza-Briceño RV, Palacios-Prü EL (2000) Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures. *Int J Devl Neurosci* 18:83-91.

Mori K (1987) Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulbo *Prog Neurobiol* 29:275-320.

Moriizumi T, Sakashita H, Furukawa M, Kawano J, Okoyoma S, Kitao Y, Kudo M (1995) Electron microscopic study of synaptogenesis and myelination of the olfactory center in developing rats. *Exp Brain Res* 103:385-392.

Mugnaini E, Oertel WH and Wouterlood FF (1984) Immunocytochemical localization of GABA neurons and dopamine neurons in the rat main and accessory olfactory bulbs. *Neurosci Lett* 47:221-226.

Mugnaini E, Diño MR, Jaarsma D (1997) The unipolar brush cells of the mammalian cerebellum and cochlear nucleus: Cytology and microcircuitry. En de Zeeuw CI, Strala P, Voogd J (eds), *The Cerebellum from Structure to Control*. *Prog Brain Res*, Elsevier, Amsterdam, vol 114, pp 131-150.

Nornes HO, Das GD (1972) Temporal pattern of neurogenesis in spinal cord: cytoarchitecture and directed growth of axons. Proc Natl Acad Sci USA 69: 1962-1966.

Nornes HO, Das GD (1974) Temporal pattern of neurogenesis in spinal cord of rat. 1. An autoradiographic study-time and sites of origin and migration and settling patterns of neuroblasts. Brain Res 73:121-138.

Oberdick J, Baader SL, Schilling K (1998) From zebra stripes to postal zones: deciphering patterns of gene expression in the cerebellum. Trends Neurosci 21 :383-390.

Ohnuma S, Philpott A, Harris W A (2001) Cell cycle and cell fate in the nervous system. Curr Opin Neurobiol 11:66-73.

Okamoto K, Kimura H, Sakai Y (1983) Taurine-induced increase in the chloride conductance of cerebellar Purkinje cell dendrites *in vitro*. Brain Res 259:319-323.

Oppenheim R W (1986) The absence of significant postnatal motoneuron death in the brachial and lumbar spinal cord of the rat. J Comp Neuro 1246:281-286.

Oray B, Lu HS, Gracy RW (1983) High performance liquid chromatographic separation of Dns-amino acid derivatives and applications to peptide and protein structural studies. J Chromatogr 270:251-256

Orlino Jr EN, Wong CM, Phelps PE (2000) LI and GAD65 are expressed on dorsal commissural axons in embryonic rat spinal cord Dev Brain Res 125:117-130

Ottersen OP, Madsen S, Storm-Mathisen J, Somogyi P, Scopsi L, Larsson LI (1988) Immunocytochemical evidence suggests that Tau is colocalized with GABA in the Purkinje cell terminals, but that the stellate cell terminals predominantly contain GABA: A light and electron microscopic study of the rat cerebellum. Exp Brain Res 72: 407416.

Ozaki S and Snider WD (1997) Initial trajectories of sensory axons toward laminar targets in the developing mouse spinal cord. J Comp Neurol 380:215-229.

Padjen AL, Mitsoglou GM, Hassesian H (1989) Further evidence in support of taurine as a mediator of synaptic transmission in the frog spinal cord. Brain Res 488:288-296.

Palacios-Prü EL, Mendoza RV (1972) An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. Brain Res 36:404-408.

Palacios-Prü EL, Palacios L, Mendoza RV (1976) *In vi/ro vs in si/u* development of chick Purkinje cells. J Neurosci Res 2:357-362.

Palacios-Prü E, Palacios L, Mendoza RV (1977) Formación de circuitos neuronales *in vitro* III Análisis ultraestructural de cultivos histotípicos de cerebelo y médula espinal. Acta Cient. Venezolana 28: 19-29.

Palacios-Prü EL, Palacios L, Mendoza R V (1981) Synaptogenetic mechanisms during chick cerebellar cortex development. J Submicrosc Cytol 13: 147 -167.

Palacios-Prü EL, Palacios L, Mendoza RV (1982) *In vitro* development of chick hypothalamic neurosecretory cells. Dev Brain Res 4:79-90.

Palacios-Prü EL, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Zambrano E (1988) Dendritic RNA and postsynaptic density formation in chick cerebellar synaptogenesis. Neuroscience 24:111-118.  
*del Sistema Nervioso Central 39*

Palacios-Prü EL, Colasante C (1988) Ultrastructural reversible changes in the fish neuromuscular junctions after chronic exercise. J Neurosci Res 18:245-251.

Palacios-Prü EL, Colasante C (1990) Hipótesis dual de la neurotransmisión en las uniones neuromusculares. Rev Venezolana Neurol Neurocirugía 4:20-28.

Palacios-Prü EL, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Zambrano E (1991) *In vitro* hypothalamic neurogenesis: morphological maturation of mouse hypothalamic cultures and *in vitro* versus *in situ* biochemical análisis. Dev Neurosci 13: 110-120.

Palacios-Prü EL, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Zambrano E (1994) Cerebral implants of histotypic hypothalamic cultures. Dev Neurosci 16:9-16.

Palacios-Prü EL, Peña-Contreras Z, Mendoza-Briceño RV, Miranda-Contreras L (1995) Intradermal implants of histotypic adrenal gland cultures. Dev Neurosci 17: 118-126.

Palacios-Prü EL, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Lozano-Hernandez JR (1998) Hypothalamic synaptogenesis and its relationship with the maturation of hormonal secretion. Cell Molec Neurobiol 18:267-284.

Palacios-Prü EL, Peña-Contreras Z, Alvarado J (1999) Ultrastructural changes in CNS synapses caused by anaesthesia, chronic exercise and recovery. Pharmacol Rev Commun 10:187-195.

Palay SL, Chan-Palay V (1974) The neuroglial cells of the cerebellar cortex and the climbing fiber. En Palay SL, Chan-Palay V (eds), Cerebellar Cortex Cytology and Organization, Springer-Verlag, New York, pp. 288-321.

Phelps PE, Barber RP, Vaughn JE (1988) Generation patterns of four groups of cholinergic neurons in rat cervical spinal cord: a combined tritiated thymidine autoradiographic and choline acetyltransferase immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 273:459-472.

Pomeroy SL, La Mantia AS, Purves D. (1990) Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulbo *J Neurosci*, 10: 1952-1966.

Puopolo M, Kratskin I, Belluzi O (1998) Direct inhibitory effect of taurine on relay neurons of the rat olfactory bulb *in vitro*. *NeuroReport* 9:2319-2323.

Ross ME (1996) Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *Trends Neurosci* 19:62-68.

Saito K (1979) Development of spinal reflexes in the rat fetus studied *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 294:581-594.

Saransaari P, Oja SS (1992) Taurine transport in the mouse cerebral cortex during development and ageing. In Lombardini JB (ed), *Taurine*, Plenum Press, New York, pp 215-220.

Sassoe-Pognetto M, Cantino D, Panzanelli P (1993) Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory neurons. *NeuroReport* 5:7-10

Scheller D, Korte M, Szthmary S, Tegancier F (2000) Cerebral release mechanisms *in vivo*: pharmacological investigations in rats using microdialysis for proof of principle. *Neurochem Res* 25:801-807.

Schoppa NE, Kinzie JM, Sahara Y, Segerson TP, Westbrook OL (1998) Dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is driven by NMDA receptors. *J Neurosci* 18:6790-6802.

Seno N, Ho S, Ohga A (1984) The development of responsiveness to substance P and glutamate in the spinal motoneurons of rat fetuses. *Brain Res* 298:366-369.

Seno N, Saito K (1985) The development of the dorsal root potential and the responsiveness of primary afferent fibers to  $\gamma$ -aminobutyric acid in the spinal cord of rat fetuses. *Dev Brain Res* 17:11-16.

Sharma K, Frank E (1998) Sensory axons are guided by local cues in the developing dorsal spinal cord. *Development* 125:635-643.

Shepherd GM, Oreeer CA (1990) Olfactory bulb. En *The Synaptic Organization of the Brain*, Oxford University Press, New York, pp. 133-169.

Shupliakov O, Brodin L, Srinivasan M, Orillner S, Cullheim S, Storm-Mathisen J, Ottersen OP (1994) Extrasynaptic localization of taurine-like immunoreactivity in the lamprey spinal cord. *J Comp Neurol* 347:301-311.

Skilling SR, Smullin DH, Beitz AJ, Larson AA (1988) Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. *J Neurochem* 51: 127-132.

Somogyi P, Halasy K, Somogyi J, Storm-Mathisen J, Ottersen OP (1986) Quantification of immunogold labelling reveals enrichment of glutamate in mossy and parallel fibre terminals in cat cerebellum. *Neuroscience* 1: 1045-1050.

Sotelo C (1978) Purkinje cell ontogeny: Formation and maintenance of spines. *Prog Brain Res* 48: 149-170.

Stoscheck CM (1990): Quantitation of protein. En Deutscher MP (ed), *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press, Vol 182, pp 50-68.

Sturman JA, Moretz RC, French JH, Wisniewski HM (1985) Taurine deficiency in the developing cat: Persistence of the cerebellar external granule cell layer. *J Neurosci Res* 13 :405-416.

Tanabe Y, Jessell TM (1996) Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274: 115-123.

Takayama C, Nakagawa S, Watanabe M, Mishina M, Inoue Y (1996) Developmental changes in the expression and distribution of the glutamate receptor channel  $\delta 2$  subunit according to the Purkinje cell maturation. *Dev Brain Res* 92: 146-155.

Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JFR, Parnavelas JO (1997) Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17: 1 075-1085.

Todd AJ, Sullivan AC (1990) Light microscope study of the co-existence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 296:496-505.

Todd AJ, Watt C, Spike RC, Sieghart W (1996) Colocalization of GABA, glycine and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 16:974-982.

Tran TS, Phelps PE (2000) Axons crossing in the ventral commissure express L1 and GAD65 in the developing rat spinal cord. *Dev Neurosci* 22:228-236.

Trenker E (1990) The role of taurine and glutamate during early postnatal cerebellar development of normal and weaver mutant mice. *Adv Exp Med Biol* 268:239-244.

www.bdigital.ula.ve

Trenker E, El Idrissi A, Harris C (1996) Balanced interaction of growth factors and taurine regulate energy metabolism, neuronal survival, and function of cultured mouse cerebellar cells under depolarizing conditions. En Huxtable RI and Michalk DV (eds), Taurine 2, Plenum Press, New York, pp 507-518.

Trombley PQ, Shepherd GM (1993) Synaptic transmission and modulation in the olfactory bulbo *Curr Opin Neurobiol* 3:540-547.

Val verde F, Santacana M and Heredia M (1992) Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. *Neuroscience* 49:255-275.

van den Pol AN, Gorcs T (1988) Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord *J Neurosci* 8:472-492.

van den Pol AN, Gao XB, Patrylo PR, Ghosh PK, Obrietan K (1998) Glutamate inhibits GABA excitatory activity in developing neurons. *J Neurosci* 18:10749-10761.

Wiklund L, Toggenburger G, Cuénod M (1982) Aspartate: possible neurotransmitter in cerebellar climbing fibers. *Science* 216:78-80.

Wu WL, Ziskind-Conhaim L, Sweet MA (1992) Early development of glycine- and GABA-mediated synapse in rat spinal cord. *J Neurosci* 12:3935-3945.

Yamada K, Wada S, Watanabe M, Tanaka K, Wada K, Inoue Y (1997) Changes in expression and distribution of the glutamate transporter EAAT4 in developing mouse Purkinje cells. *Neurosci Res* 27: 191-198.

Yasunami T, Kuno M, Matsuura S (1988) Voltage-clamp analysis of taurine-induced suppression of excitatory potentials in frog spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 60:1405-1418.

Yoshimura M, Nishi S (1995) Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 482:29-38.

Yuan-Xiang T, Yun-Qing L, Zhi-Qi Z, Johns RA (2000) Synaptic relationship of the neurons containing metabotropic glutamate receptor, mGluR5, with nociceptive primary afferent and GABAergic terminals in rat spinal superficial laminae. *Brain Res* 875:138143.

Zafra F, Gorneza J, Olivares L, Aragon C, Girnenez C (1995) Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters Gly 11 and Gly 12 in the rat CNS. *Eur J Neurosci* 7:1342-1352

Zheng T, Santi MR, Bovolin P, Marlier LNJ-L, Grayson DR (1993) Developmental expression of the GABAA receptor  $\alpha 6$  subunit mRNA occurs only after cerebellar granule cell migration. Dev Brain Res 75:91-104.

Ziskind-Conhaim L (1988) Electrical properties of motoneurons in the spinal cord of rat embryos. Dev Biol 128:21-29.

Ziskind-Conhaim L (1990) NMDA receptors mediate poly- and monosynaptic potentials in motoneurons of rat embryos. J Neurosci 10: 125-135.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Figura 1

A. Sección de neuropila en un cultivo histotípico del bulbo olfatorio preparado de ratones P10 y cultivados durante 6 días. En esta fotografía, se pueden ver dos tipos de sinapsis establecidas entre dos terminales con la misma dendrita grande (D): una sinapsis asimétrica excitatoria demostrando una densidad postsináptica (PSD) gruesa (flecha curva) y una sinapsis simétrica inhibitoria (flecha) sin PSD. Ambos elementos presináptico y postsináptico tienen vesículas sinápticas en las regiones sinápticas activas, indicando la presencia de sinapsis recíprocas en estos cultivos, lo cual es común entre las células mitrales y en penacho con las células granulosas. X34.200.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

B. En esta imagen de un cultivo histotípico del bulbo olfatorio, las características fenotípicas de una neurona principal, la célula mitral (CM), son fácilmente reconocibles como un núcleo prominente y ovoidal, con una cromatina dispersa y un nucléolo grande (flecha), y un citoplasma con abundantes organelas, tales como numerosas mitocondrias y un aparato de Golgi bien desarrollado. La célula granulosa (CG) se puede identificar por su tamaño pequeño, un núcleo oscuro y poco citoplasma. X9.000.

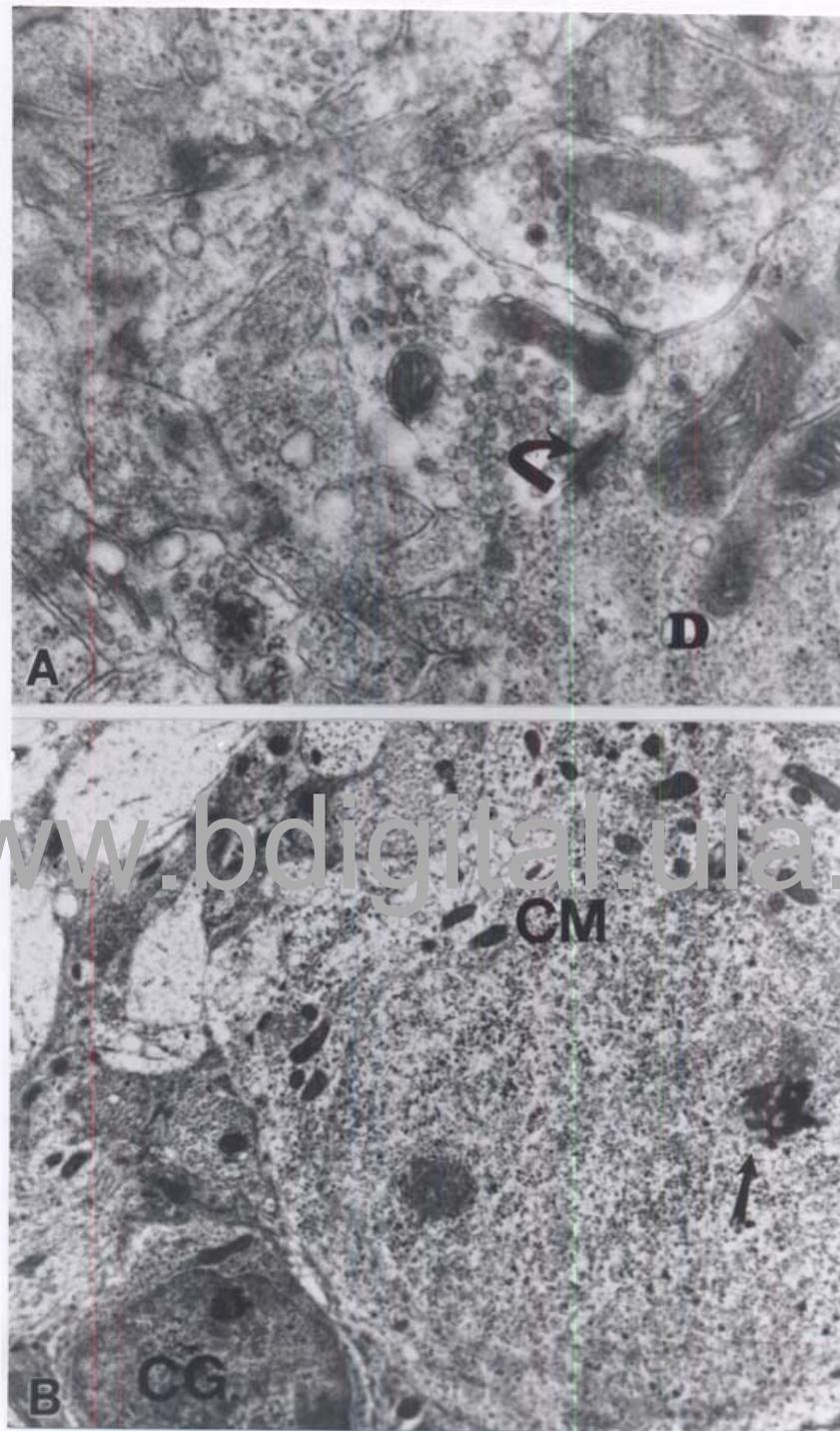
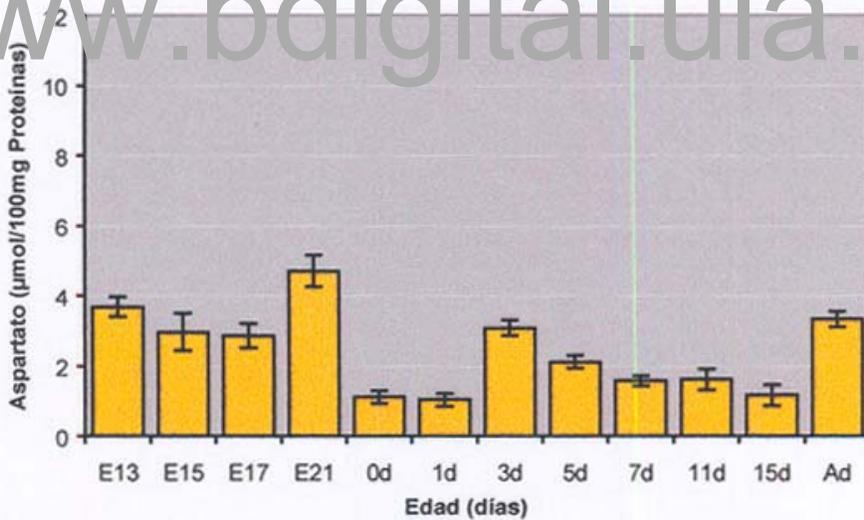
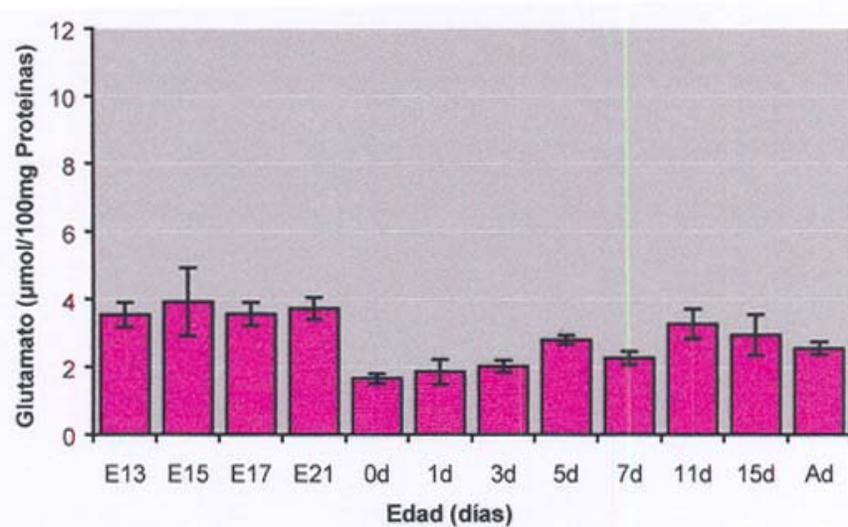


Figura 2

Niveles de neurotransmisores aminoacídicos excitatorios: glutamato y aspartato, durante el desarrollo del bulbo olfatorio, desde la edad embrionaria E15 hasta el estadio de adulto joven, P30-P40. Los valores están dados en  $\mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas, en promedio con su desviación estándar (X $\pm$ L.E.), n = 10.

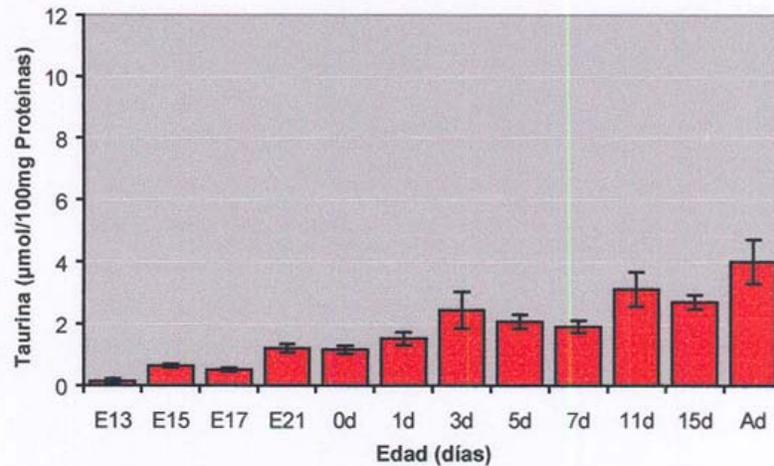
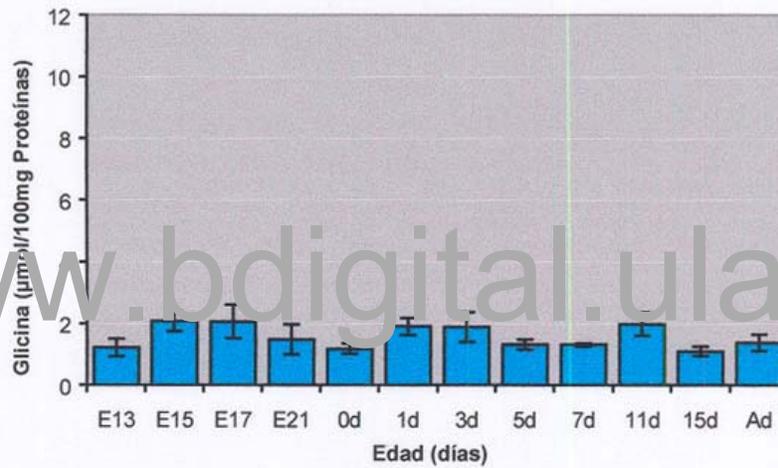
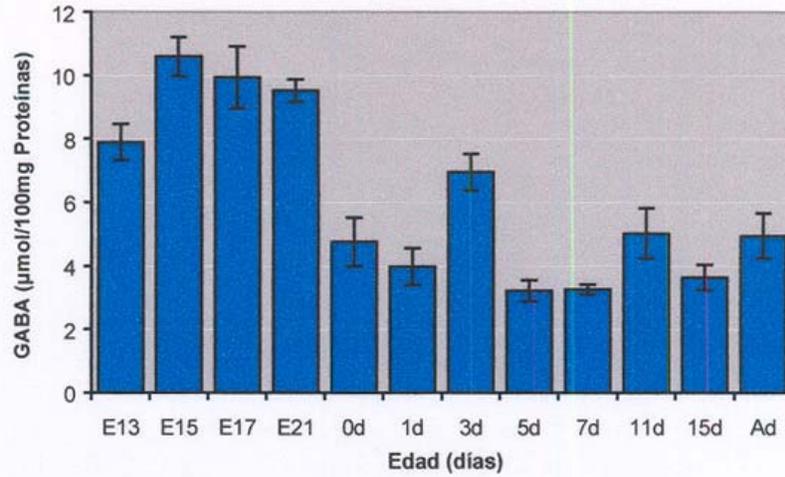
www.bdigital.ula.ve



[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Figura 3

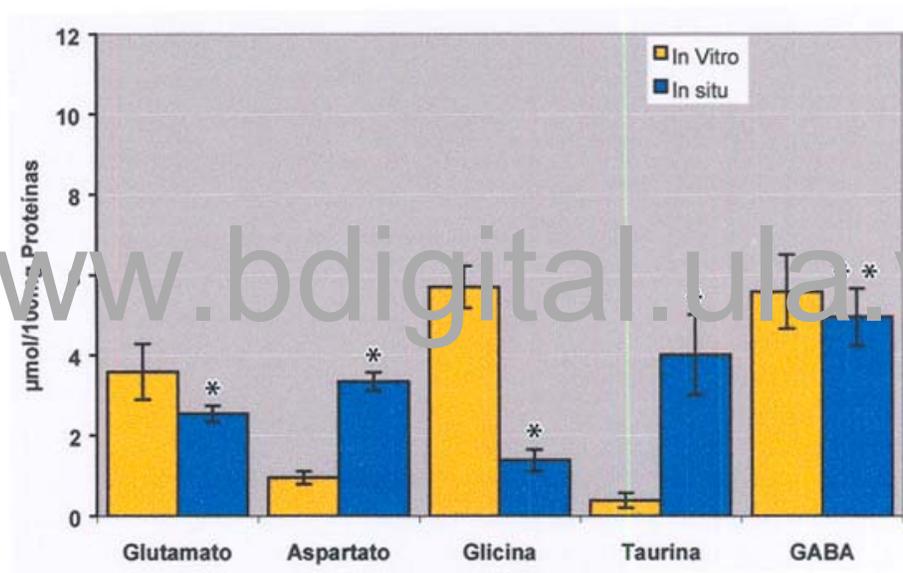
Niveles de neurotransmisores aminoacídicos inhibitorios: GABA, glicina y taurina, durante el desarrollo del bulbo olfatorio, desde la edad embrionaria E 15 hasta el estado de adulto joven (P. 0 P 10). Los valores están dados en  $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$  proteínas, en promedios con su desviación estándar ( $\bar{X} \pm \text{D.E.}$ ),  $n = 10$ .



www.bdigital.ula.ve

Figura 4

Análisis comparativo de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos en cultivos histotípicos del bulbo olfatorio y en animales adultos jóvenes. Los valores expresados en  $\mu\text{mol}/100 \text{ ng}$  proteínas representan los promedios con sus desviaciones estándar ( $\pm$  D.E.) de 5 experimentos independientes *in vitro*,  $n = 5$ , Y de 10 diferentes muestras *in situ*,  $n = 10$ . Diferencias estadísticas: \*\* $p < 0,0001$ , \* $p < 0,10$ .



www.bdigital.ula.ve

Figura 5

Sección de un cultivo histotípico de la corteza cerebelosa de ratón preparado de la edad postnatal P10 y cultivado durante 6 días. En esta fotografía, pueden ser observadas unas sinapsis axo-espinosas (flechas) en la neuropila plexiforme, las cuales son homologables a las encontradas en el animal vivo. X24.000.

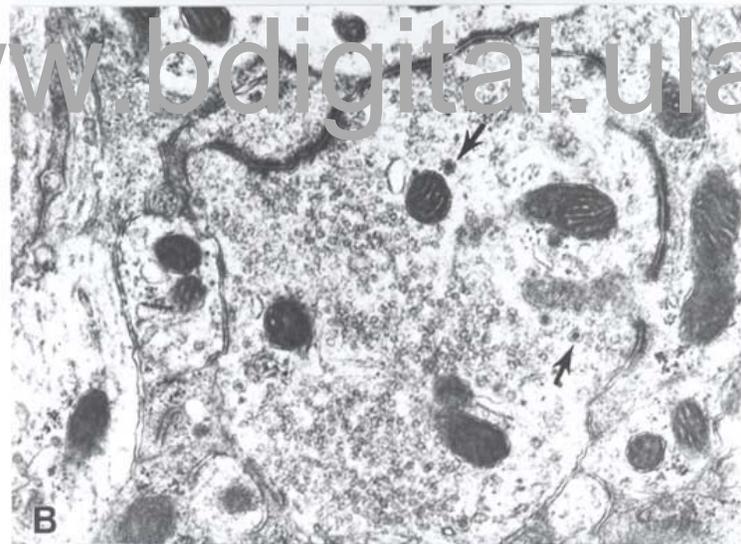
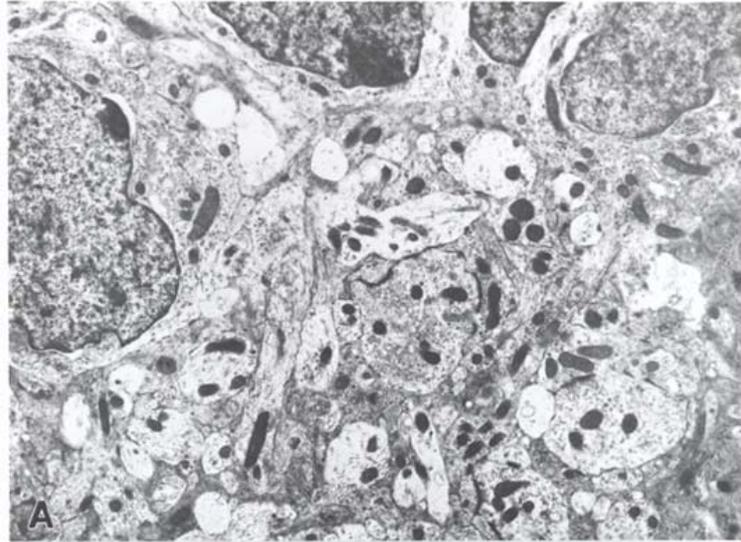
[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Figura 6

- A. En esta imagen de un cultivo histotípico de la corteza cerebelosa se muestra un arreglo sináptico glomerular, que es homologable con lo que se encuentra en el animal *in situ*, formado por un terminal axónico parecido al de una fibra musgosa rodeada por los cuerpos de las células granulosas. X8.000.
- B. A mayor aumento, el terminal axónico parecido al de la fibra musgosa muestra un contenido de numerosas vesículas sinápticas claras, pocas vesículas de corazón electrón denso (flechas) y mitocondrias; se observa el establecimiento de múltiples contactos sinápticos asimétricos que son característicos de una fibra musgosa. X28.800.

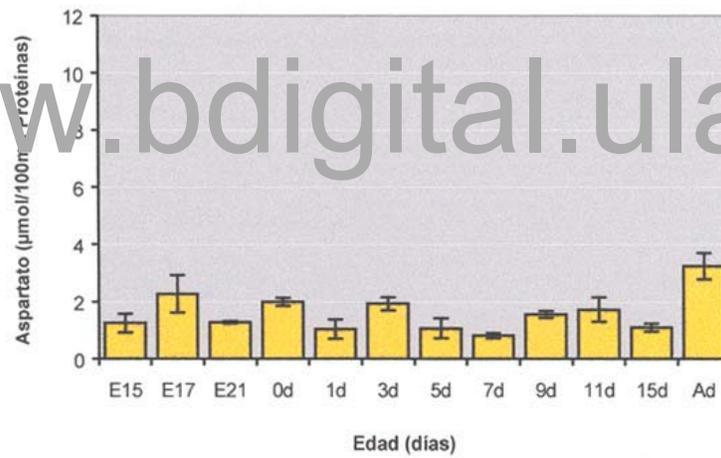
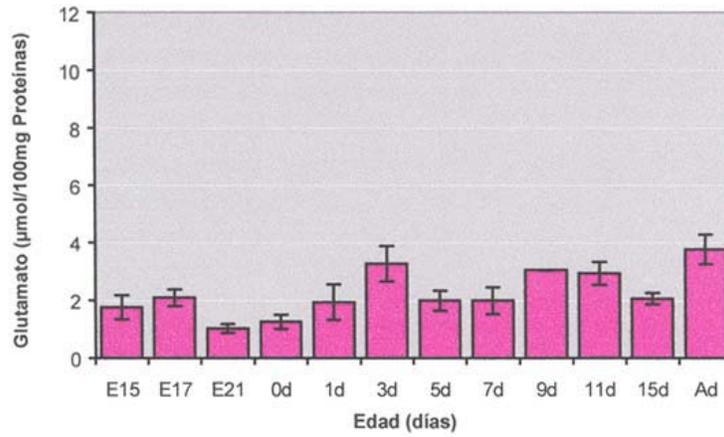


[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Figura 7

Niveles de neurotransmisores aminoacídicos excitatorios: glutamato y aspartato, durante el desarrollo de la corteza cerebelosa de ratón, desde la edad embrionaria E15 hasta el estadio de adulto joven, P30-P40. Los valores están dados en  $\mu\text{mol} / 100 \text{ ng}$  proteínas, en promedios con su desviación estándar ( $X \pm \text{D.E.}$ ),  $n = 10$ .

www.bodigital.ula.ve

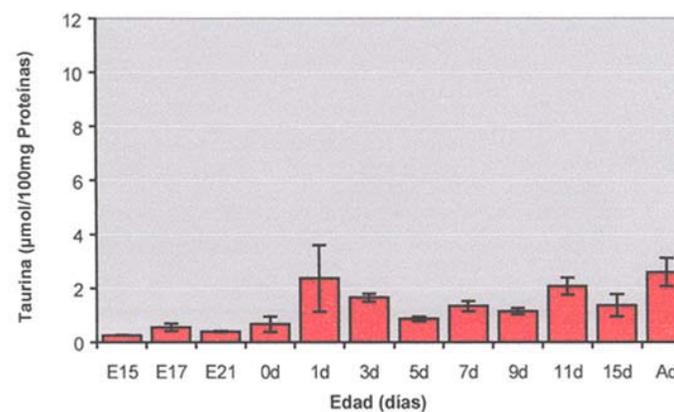
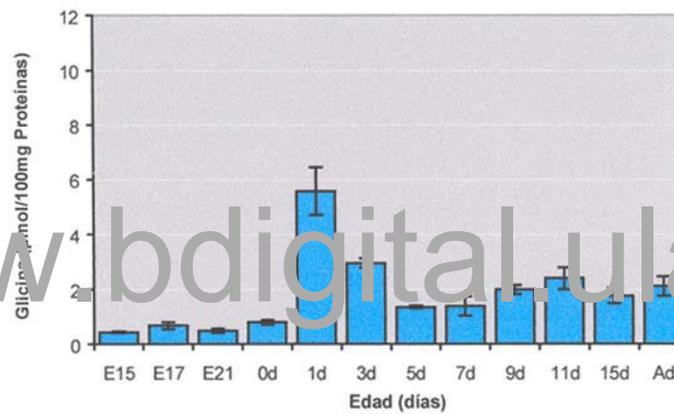
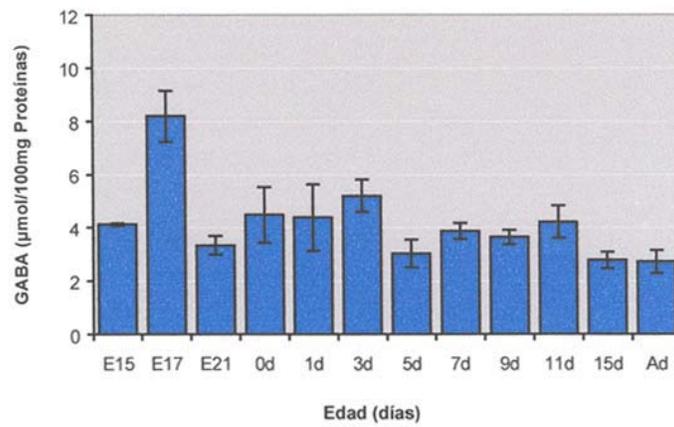


www.bdigital.ula.ve

Figura 8

Niveles de neurotransmisores aminoacídicos inhibitorios: GABA, glicina y taurina, durante el desarrollo de la corteza cerebelosa de ratón, desde la edad embrionaria E15 hasta el estadio de adulto joven P30-P40. Los valores están expresados en  $\mu\text{mol/l}$  ( $\text{mg}$  proteína), en promedios con su desviación estándar ( $X \pm D. E.$ ).  $n = 10$ .

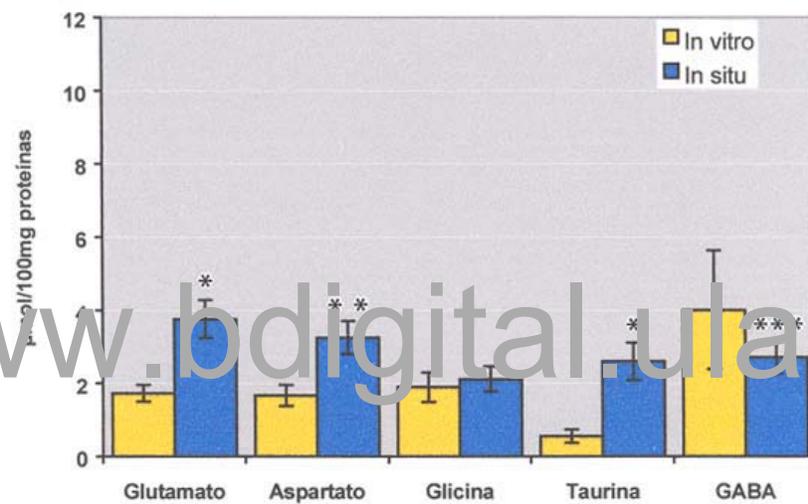
www.bdigital.ula.ve



www.bdigital.ula.ve

Figura 9

Análisis comparativo de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos en cuatro histotipos de la corteza cerebral de ratón y en animales adultos jóvenes. Los valores expresados en  $\mu\text{mol}/100\text{ mg proteínas}$ , representan los promedios con sus desviaciones estándar ( $X \pm D.E.$ ) de 5 experimentos independientes *in vitro*,  $n = 5$ , y de 10 diferentes muestras *in situ*,  $n = 10$ . Diferencias estadísticas: \* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,0002$ ; \*\*\* $p < 0,10$ .



www.bdigital.ula.ve

Figura 10

- A. En esta fotografía de un corte fino de la médula espinal del ratón embrionario de edad E13, se pueden observar células mitóticas en el borde ependimal (círculo) así como numerosos neuroblastos en migración (flechas). Una región estrecha, acelular, la sustancia blanca (SB) ya existe a esta edad.
- B. Sección de un cultivo histotípico de la médula espinal preparado de ratones embrionarios de edad E15, y cultivados durante 6 días, en donde se pueden ver grandes neuronas (flecha) y numerosas neuronas de diámetro más pequeño. En la periferia del cultivo, se puede notar la formación de una región plexiforme o neuropila externa (NE). X280



[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Figura 11

En esta fotografía de un cultivo histotípico de la médula espinal del ratón preparado de embriones de edad E15 y cultivados durante 6 días, dos neuronas grandes y bien diferenciadas, probablemente motoneuronas (Mn), se pueden observar con núcleos grandes y abundante citoplasma rico en organelas. N, núcleo. X8.500

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

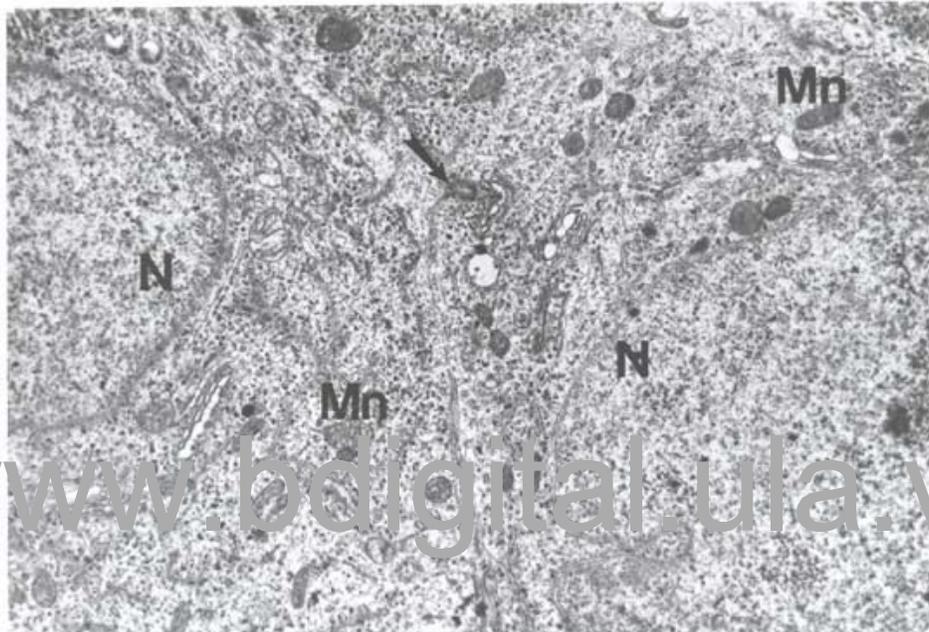


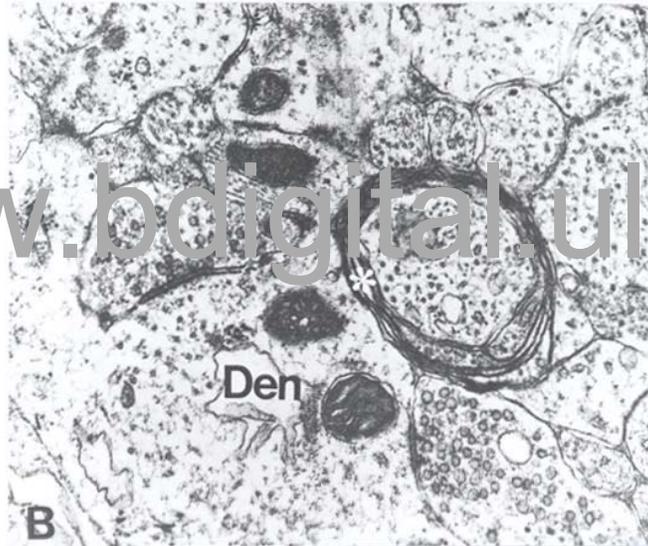
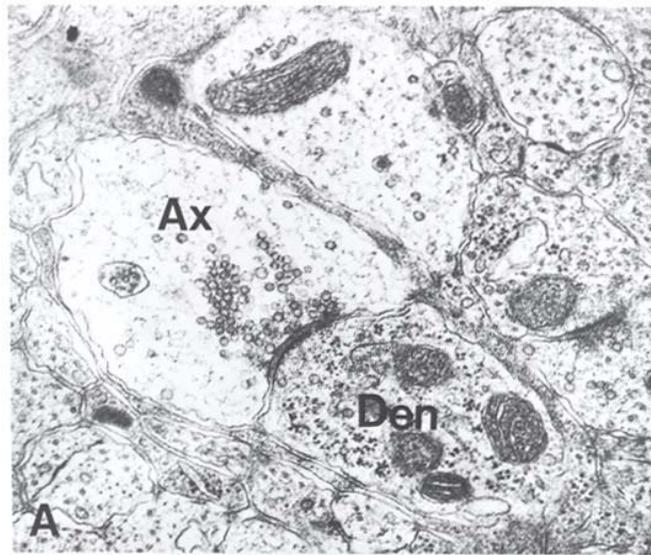
Figura 12

Secciones de la neuropila de un cultivo histotípico de la médula espinal preparado de ratones embrionarios de edad E15 y cultivados durante 6 días:

A. A mayor aumento, se pueden observar dos contactos sinápticos asimétricos, característicos de las sinapsis excitatorias. Ax, axón; Den, dendrita X36.000.

B. En esta imagen se pueden distinguir dos contactos sinápticos simétricos que carecen de densidades pos sinápticas, características de las sinapsis inhibitorias. Un axón pobremente mielinizado (\*) se puede observar. X 36.000.

www.bdigital.ula.ve

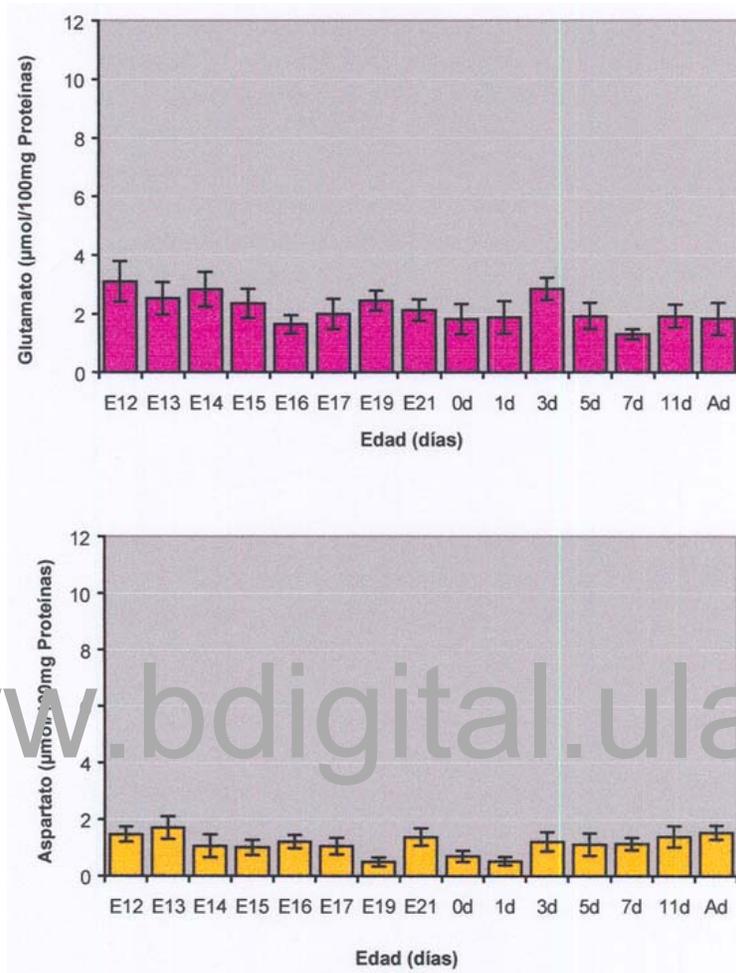


[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Figura 13

Niveles de neurotransmisores aminoacídicos excitatorios: glutamato y aspartato, durante el desarrollo de la médula espinal del ratón, desde la edad embrionaria E12 hasta el estadio de adulto joven, P30-P40. Los valores, expresados en  $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$  proteínas, son promedios con sus desviaciones estándares ( $X \pm D.E.$ ),  $n = 10-20$ .

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

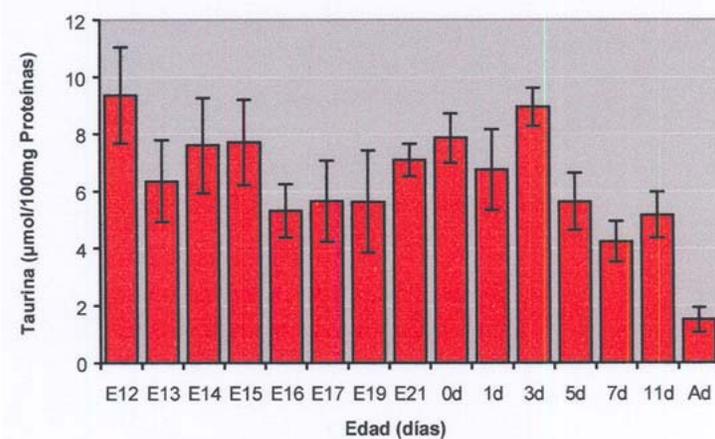
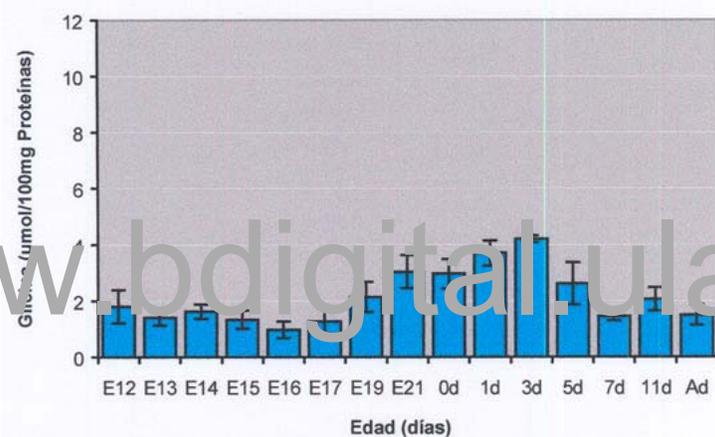
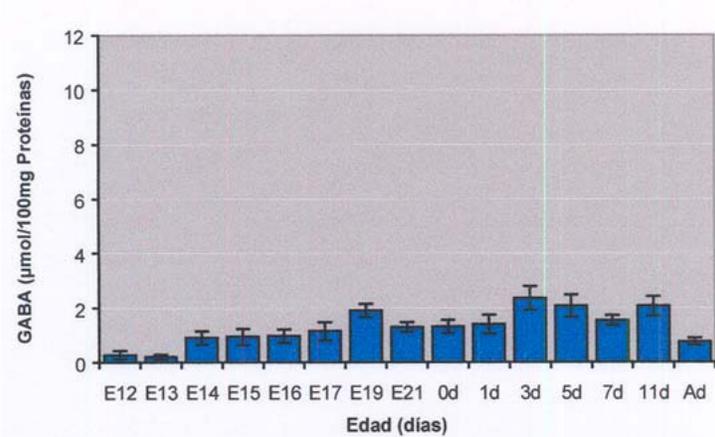


www.bdigital.ula.ve

Figura 14

Niveles de neurotransmisores aminoacídicos inhibitorios: GABA, glicina y taurina, durante el desarrollo de la médula espinal del ratón, desde la edad embrionaria E12 hasta el estadio de adulto joven, P30-P40. Los valores, expresados en  $\mu\text{mol} / 100\text{mg}$  proteínas, son promedios con sus desviaciones estándares ( $X \pm D.E.$ ),  $n = 10-20$ .

www.bdigital.ula.ve



www.bdigital.ula.ve

A. Figura 15

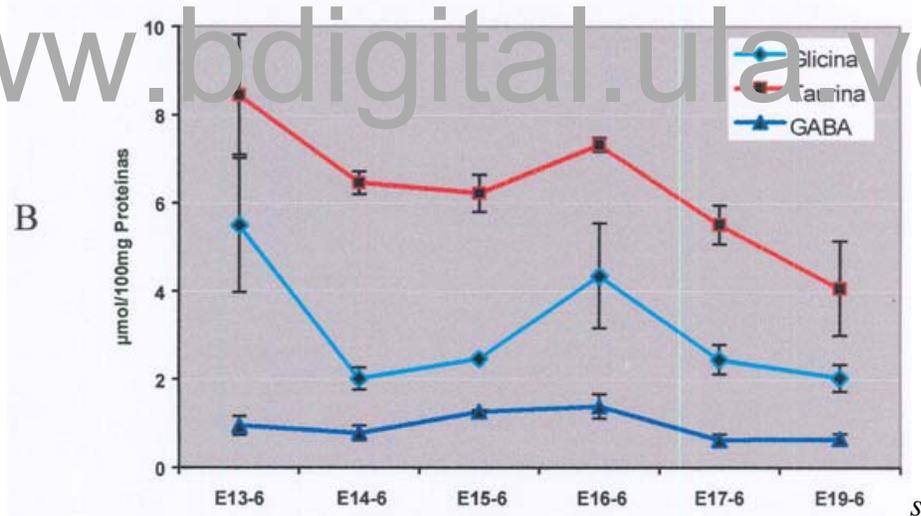
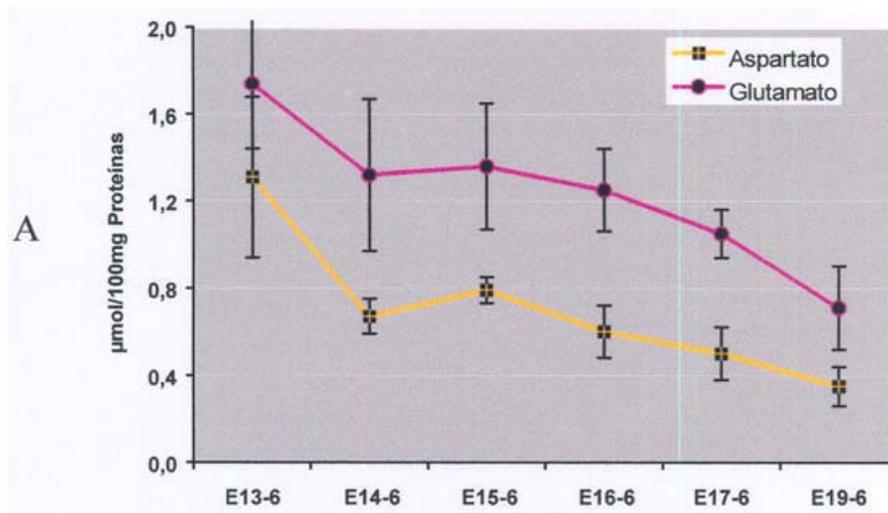
Variaciones en los niveles de neurotransmisores aminoacídicos en cultivos primarios de la médula espinal del ratón preparados de embriones entre las edades E 13 y E 19 y cultivados durante 6 días.

A. Contenidos de neurotransmisores excitatorios: glutamato y aspartato.

B. Contenidos de neurotransmisores inhibitorios: GABA, glicina y taurina.

Los valores, expresados en  $\mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas, son promedios con sus desviaciones estándares ( $X \pm D.E.$ )  $n = 5-10$ .

www.bdigital.ula.ve

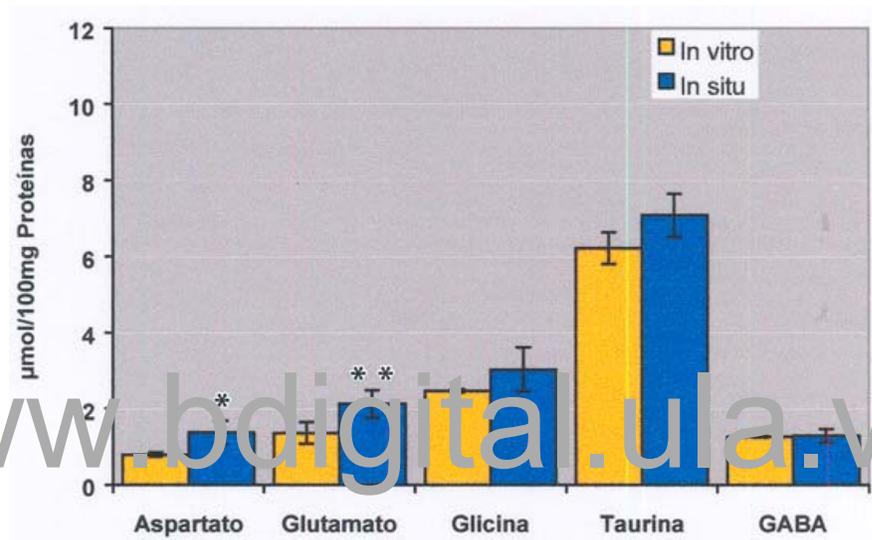


www.bdigital.ula.ve

Figura 16

Análisis comparativo de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos en cultivos histotípicos de la médula espinal, preparados de ratones embrionarios de edad E15 y cultivados durante 6 días, y en embriones vivos de edad equivalente a E21. Los valores, expresados en  $\mu\text{mol}/100 \text{ mg}$  proteínas, representan los promedios con sus desviaciones estándares (X $\pm$ D.E.) de 5 experimentos independientes *in vitro*, n = 5, y de 10 diferentes muestras *in situ*, n = 10. Diferencias estadísticas: \*p<0,02; \*\*p<0.01.

www.bdigital.ula.ve

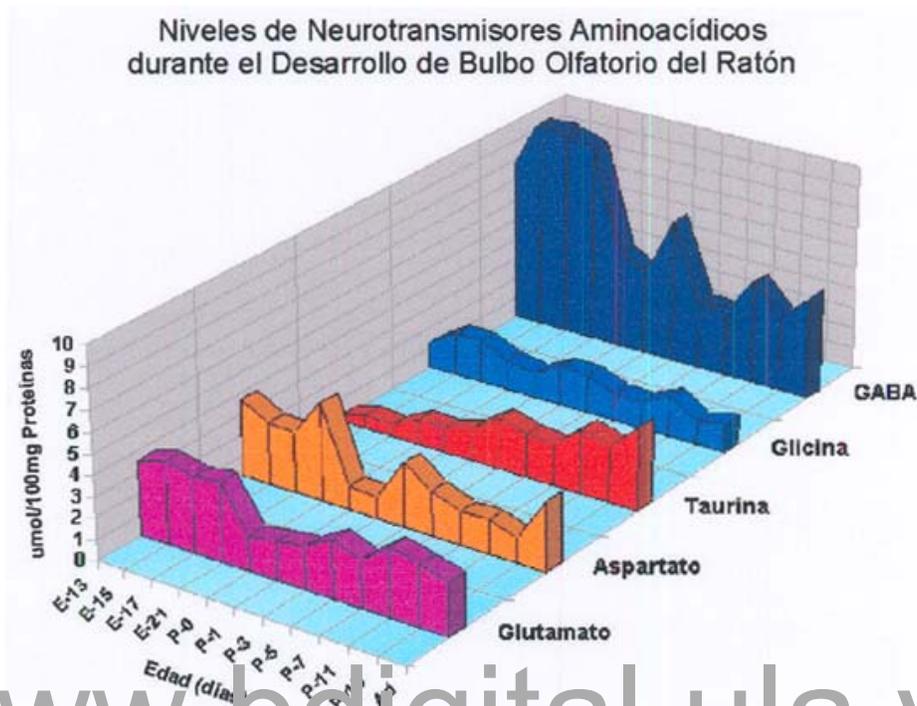


www.bdigital.ula.ve

Figura 17

Niveles de los neurotransmisores aminoacídicos: glutamato, aspartato, GABA, glicina y taurina durante el desarrollo del bulbo olfatorio de ratón, desde la edad embrionaria E15 hasta el estadio de adulto joven, P30-P40.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Figura 18

Niveles de los neurotransmisores aminoacídicos: glutamato, aspartato, GABA, glicina y taurina durante el desarrollo de la corteza cerebelosa de ratón, desde la edad embrionaria E15 hasta el estadio de adulto joven, P30-P40.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

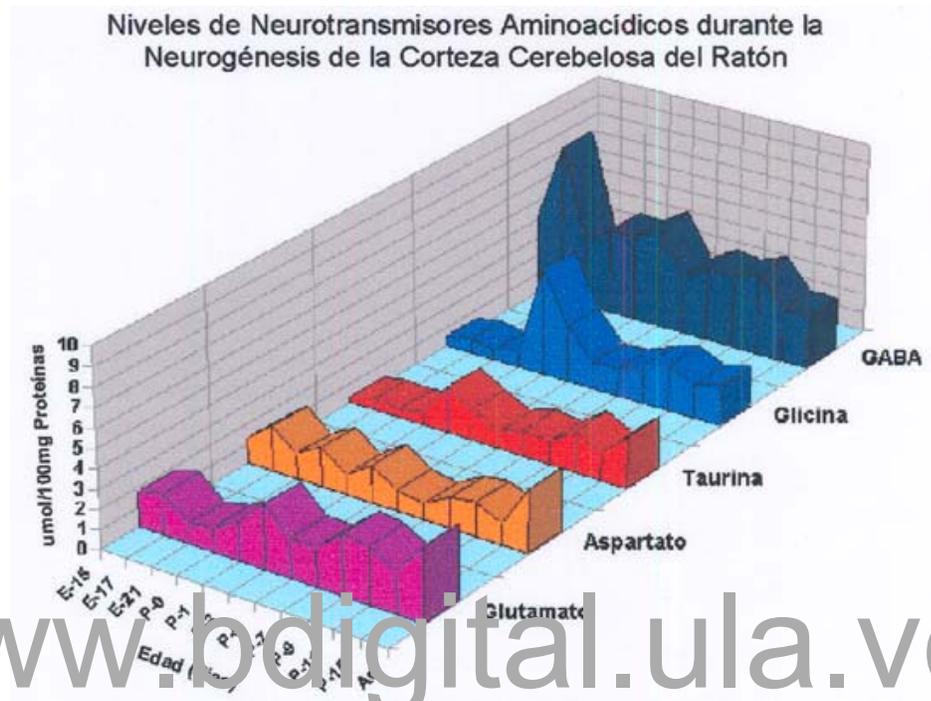


Figura 19

Niveles de los neurotransmisores aminoacídicos: glutamato, aspartato, GABA, glicina y taurina durante el desarrollo de la médula espinal de ratón, desde la edad embrionaria E12 hasta el estadio de adulto joven, P30-P40.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

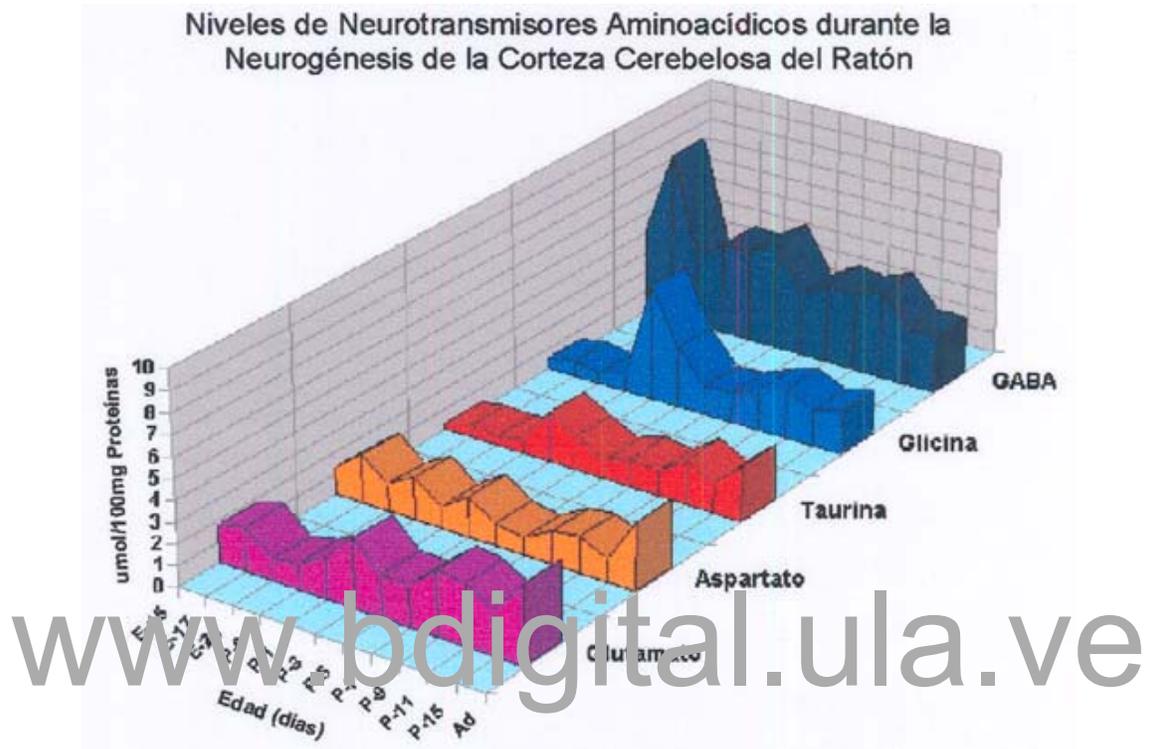


Tabla I. Niveles de neurotransmisores aminoácidos durante el desarrollo *in situ* en el bulbo olfatorio del ratón.

Edad	Glutamato	Aspartato	Taurina	GABA	Glicina
E-13	3.54±0.36	3.68±0.28	0.13±0.08	7.89±0.56	1.21±0.29
E-15	3.92±1.01	2.97±0.53	0.63±0.06	10.59±0.62	2.07±0.33
E-17	3.57±0.34	2.87±0.35	0.51±0.06	9.93±0.97	2.06±0.54
E-21	3.72±0.32	4.71±0.46	1.20±0.14	9.52±0.36	1.48±0.49
0d	1.65±0.15	1.12±0.18	1.15±0.13	4.75±0.76	1.18±0.18
1d	1.85±0.37	1.04±0.18	1.52±0.22	3.98±0.58	1.90±0.27
3d	2.02±0.18	3.08±0.22	2.45±0.60	6.95±0.58	1.88±0.48
5d	2.79±0.14	2.12±0.19	2.08±0.23	3.22±0.34	1.31±0.16
7d	2.25±0.20	1.58±0.14	1.92±0.21	3.26±0.16	1.31±0.05
11d	3.26±0.45	1.62±0.30	3.12±0.55	5.02±0.79	1.98±0.38
15d	2.94±0.61	1.18±0.30	2.71±0.23	3.64±0.40	1.10±0.16
Ad	2.54±0.19	3.34±0.22	4.01±0.70	4.94±0.71	1.38±0.27

Los valores, expresados en  $\mu\text{mol}/100\text{mg}$  proteínas, son los promedios  $\pm$  D.E. (n = 10).

Tabla II. Niveles de neurotransmisores aminoácidos durante el desarrollo *in situ* en la corteza cerebelosa del ratón.

Edad	Glutamato	Aspartato	Glicina	GABA	Taurina
E-15	1.76±0.41	1.25±0.38	0.44±0.03	4.12±0.65	0.26±0.01
E-17	2.0±0.29	2.27±0.61	0.6±0.15	8.20±0.95	0.55±0.14
E-21	1.2±0.16	1.8±0.0	0.4±0.08	3.33±0.36	0.39±0.02
0d	1.26±0.25	1.99±0.14	0.80±0.09	4.48±1.05	0.66±0.28
1d	1.94±0.61	1.04±0.33	5.57±0.87	4.38±1.25	2.37±1.24
3d	3.27±0.61	1.93±0.23	2.96±0.17	5.20±0.61	1.65±0.14
5d	1.99±0.35	1.07±0.34	1.36±0.05	3.02±0.52	0.86±0.09
7d	1.99±0.47	0.82±0.09	1.39±0.36	3.86±0.30	1.34±0.19
9d	3.04±0.01	1.55±0.12	1.99±0.17	3.64±0.27	1.14±0.12
11d	2.93±0.39	1.72±0.43	2.40±0.40	4.21±0.61	2.08±0.32
15d	2.06±0.20	1.10±0.13	1.77±0.28	2.77±0.32	1.36±0.42
Ad	3.76±0.52	3.25±0.45	2.12±0.35	2.71±0.44	2.60±0.52

Los valores, expresados en  $\mu\text{mol}/100\text{mg}$  proteínas, son los promedios  $\pm$  D.E. (n = 10).

www.digital.ula.ve

Tabla III. Niveles de neurotransmisores aminoácidos durante el desarrollo *in situ* en la medula espinal del ratón.

Edad	Aspartato	Glutamato	Glicina	Taurina	GABA
E12	1.47 ± 0.27	3.10 ± 0.68	1.80 ± 0.59	9.36 ± 1.70	0.28 ± 0.15
E13	1.70 ± 0.40	2.53 ± 0.55	1.40 ± 0.28	6.35 ± 1.43	0.20 ± 0.10
E14	1.05 ± 0.41	2.84 ± 0.59	1.62 ± 0.25	7.60 ± 1.67	0.90 ± 0.24
E15	1.00 ± 0.27	2.36 ± 0.50	1.33 ± 0.33	7.70 ± 1.50	0.94 ± 0.30
E16	1.20 ± 0.24	1.64 ± 0.31	0.96 ± 0.30	5.31 ± 0.93	0.96 ± 0.25
E17	1.05 ± 0.30	1.99 ± 0.51	1.27 ± 0.47	5.64 ± 1.42	1.14 ± 0.34
E19	0.49 ± 0.16	2.45 ± 0.35	2.13 ± 0.54	5.63 ± 1.79	1.90 ± 0.25
E21	1.37 ± 0.31	2.12 ± 0.36	3.03 ± 0.58	7.08 ± 0.56	1.29 ± 0.18
0d	0.69 ± 0.20	1.82 ± 0.52	2.96 ± 0.53	7.85 ± 0.87	1.31 ± 0.24
1d	0.52 ± 0.14	1.88 ± 0.55	3.69 ± 0.45	6.74 ± 1.42	1.40 ± 0.35
3d	1.20 ± 0.34	2.85 ± 0.38	4.20 ± 0.12	8.94 ± 0.68	2.35 ± 0.43
5d	1.10 ± 0.40	1.92 ± 0.45	2.61 ± 0.75	5.63 ± 1.01	2.06 ± 0.41
7d	1.12 ± 0.22	1.30 ± 0.17	1.44 ± 0.16	4.22 ± 0.71	1.54 ± 0.18
11d	1.38 ± 0.38	1.92 ± 0.39	2.06 ± 0.42	5.16 ± 0.81	2.06 ± 0.36
Ad	1.53 ± 0.24	1.83 ± 0.54	1.49 ± 0.37	1.51 ± 0.44	0.75 ± 0.13

Los valores, expresados en  $\mu\text{mol}/100\text{mg}$  proteínas, son los promedios  $\pm$  D.E. (n = 10).

Tabla IV. Niveles de neurotransmisores aminoácidos durante el desarrollo *in vitro* en la medula espinal del ratón.

Edad	Aspartato	Glutamato	Glicina	Taurina	GABA
E13-6	1,31 ± 0,37	1,74 ± 0,30	3,50 ± 1,52	8,45 ± 1,36	0,95 ± 0,21
E14-6	0,67 ± 0,08	1,32 ± 0,35	2,02 ± 0,25	6,46 ± 0,26	0,78 ± 0,17
E15-6	0,79 ± 0,06	1,36 ± 0,29	2,47 ± 0,05	6,22 ± 0,42	1,27 ± 0,03
E16-6	0,60 ± 0,12	1,25 ± 0,19	4,35 ± 1,19	7,32 ± 0,16	1,39 ± 0,28
E17-6	0,50 ± 0,12	1,05 ± 0,11	2,45 ± 0,33	5,51 ± 0,44	0,62 ± 0,13
E19-6	0,35 ± 0,09	0,71 ± 0,19	2,04 ± 0,31	4,07 ± 1,07	0,65 ± 0,11

Los valores, expresados en  $\mu\text{mol}/100\text{mg}$  proteínas, son los promedios  $\pm$  D.E. (n = 10).

www.bdigital.ula.ve

## **IX. Financiamiento**

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo de Estudios de Postgrado (CEP-ULA) de la Universidad de Los Andes y por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT-ULA) a través de los Proyectos de Investigación M533-95-03-AA y M-715-01-03-B.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)