

03062  
10.  
8

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del  
Colegio de Ciencias y Humanidades

"IDENTIFICACION NEUROQUÍMICA DE LOS TRANSMISORES EN LOS  
GLÓMERULOS CEREBELOSOS"

Tesis que presenta el Biólogo

**EZEQUIEL MORALES SANDOVAL**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA**

(Especialidad de Neurociencias)

1984

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEX. D.F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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

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

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

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

## INDICE

	pag.
1.- ORGANIZACION DE LA TESIS	2
2.- INTRODUCCION GENERAL	3
3.- EL CEREBELO	8
3A- NEUROQUIMICA DEL CEREBELO	10
a) GABA	10
b) acetilcolina	11
c) glicina	12
d) serotonina	13
e) aspartato, glutamato, sustancia P y encefalinas	14
4.- EL GLOMERULO CEREBELOSO	16
5.- CAPTURA Y LIBERACION DE TRANSMISORES	22
a.- Captación dependiente de sodio	22
b.- Liberación dependiente de calcio	24
6.- OBJETIVOS DE LA TESIS	27
7.- MATERIALES Y METODOS	29
9.- RESULTADOS: "NEUROTRANSMITTERS OF THE CEREBELLAR GLOMERULI: UPTAKE AND RELEASE OF LABELED -AMINO BUTYRIC ACID, GLYCINE, SEROTONIN AND CHOLINE IN A PURIFIED GLOMERULUS FRACTION AND IN GRANULAR LAYER SLICES"	32
10.- APENDICE DE RESULTADOS	33
a.- Captura de colina en sinaptosomas de cerebro de ratón	33
b.- Captación de colina en rebanadas de vermis sin capa molecular, efecto de algunos inhibidores	34
c.- Determinación de acetilcolina en las rebanadas de vermis	35
d.- Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa en los glomérulos aislados	36
e.- Microscopia electrónica y óptica	37
10- DISCUSION Y CONCLUSIONES	38
a.- Captación y liberación de GABA y glicina	38
b.- Captura y liberación de serotonina a publicación. Por esta	40
c.- La acetilcolina no parece ser un neurotransmisor de las terminales musgosas	42
11- BIBLIOGRAFIA	45

## ORGANIZACION DE LA TESIS

Ya que la parte central de la tesis está constituida por un artículo enviado para su publicación, éste ocupa la parte de los resultados, pero se agrega un anexo donde se muestran resultados experimentales en apoyo a los enviados a publicación. Por esta razón, en la sección de MATERIALES Y METODOS se describen en detalle los experimentos anexos, y los del artículo de publicación solo brevemente. Por esta misma razón, en la sección de discusión y conclusiones al referirme a alguna figura, será a las contenidas en el texto de publicación, a menos que se diga que pertenecen al anexo de resultados. Por lo demás, se sigue el orden que se indica en el índice de la página 1.

\*\*\*\*\*

## INTRODUCCION GENERAL

No hay producto de la evolución de los seres vivos que se pueda comparar con la complejidad, variabilidad y capacidad de manejar información del sistema nervioso. Es por esto que se considera que la comprensión del sistema nervioso, y en especial del cerebro, constituye la frontera máxima del conocimiento, esto es, que a lo máximo a que se puede aspirar es a que el cerebro genere el conocimiento para entenderse a si mismo. Este problema de la ciencia es tremendamente complejo y abordable por tanto desde infinidad de aspectos. Así, se pueden mencionar desde los estudios a nivel macroscópico tales como la observación de conductas, hasta aquellos a nivel molecular. El reconocimiento de que el sistema nervioso esta formado por células perfectamente individualizadas y no por un sincicio celular como se pensó inicialmente, condujo a estudiar las interrogantes que se mantienen hasta nuestros días, y que son el conocer los mecanismos de que se valen las celulas nerviosas para comunicarse entre si, y cómo es que esta información es almacenada e integrada para producir conductas tan complejas como son el aprendizaje y la memoria. Las células del sistema nervioso son las neuronas, y aunque de manera general se pueden definir como células especializadas en recibir y emitir señales, es necesaria una definición más extensa.

Morfológicamente, existe una diversidad enorme de neuronas, sin embargo, para fines prácticos se puede visualizar a una neurona como constituida por un soma o cuerpo principal, donde las estructuras más conspicuas son el núcleo, además de organelos

como las mitocondrias y el aparato de Golgi (Bullock et al, 1977). Otra característica del soma es la presencia de los corpúsculos de Nissl, que son agrupaciones de ribosomas, lo que indica que el soma tiene una alta actividad de síntesis de proteínas. Del soma parten numerosas prolongaciones llamadas dendritas, las cuales se asocian con los sitios por los cuales la neurona recibe estímulos, aunque en realidad se ha comprobado que todas las partes de la célula son sensibles a estimulación. Una neurona que es estimulada produce y propaga a su vez una señal por medio de otra de sus prolongaciones que recibe el nombre de axón. El axón tiene la particularidad de conducir señales sin atenuación alguna, siempre y cuando el estímulo sea lo suficientemente grande para sobrepasar el umbral de excitación propio de las neuronas. Sin embargo, si el umbral no es sobrepasado, la señal solo se propaga localmente y a distancias muy cortas. Después del umbral, las respuestas que se producen son de una misma intensidad, siendo por tanto respuestas de todo o nada y que son más conocidas como potenciales de acción. Así, en conjunto, lo que maneja el sistema nervioso son señales de una misma intensidad pero de frecuencia variable. La conducción de señales en el axón es un fenómeno electroquímico, atribuible a cambios en la permeabilidad de la membrana axonal a iones específicos tales como el sodio ( $\text{Na}^+$ ) y el potasio ( $\text{K}^+$ ), al mismo tiempo que como las diferencias en el potencial eléctrico, producto de las cargas de los mismos iones transportados a través de la membrana axonal durante el potencial de acción (Kuffler, S.W. y Nicholls, J.G., 1976). Las distancias que separan a una

neurona de otra no permiten el paso del impulso nervioso de manera directa, a excepción de algunos casos en que la cercanía entre las membranas es tal que lo permite, como sucede en los contactos del tipo eléctrico. Para salvar este problema, las neuronas utilizan como mensajeros a compuestos que tienen sitios de reconocimiento específicos sobre la membrana de la célula receptora, de manera que pueden ser portadores de una señal en particular. Estos compuestos son los neurotransmisores (o sencillamente transmisores). Los neurotransmisores no son liberados desde cualquier parte de la neurona, sino que lo hacen desde sitios especializados llamados de sinapsis. A grandes rasgos, la liberación de los transmisores en una terminal nerviosa está precedida por la llegada de un impulso nervioso que hace que aumente la conductancia para iones calcio, y posterior a la entrada de este catión a la terminal, el transmisor es liberado al espacio sináptico. Cabe mencionar que en el sistema nervioso central (SNC), las sinapsis son mayoritariamente del tipo químico, y solamente hay algunos casos de sinapsis eléctricas.

Vista al microscopio electrónico, la sinapsis química presenta una morfología tal que permite reconocer tanto a la parte de la neurona emisora (presinapsis), como a la receptora (postsinapsis). La presinapsis en el SNC presenta la forma de una bulbosidad que tiene en su interior numerosas vesículas y casi siempre mitocondrias. La postsinapsis por su parte muestra un engrosamiento electrodenso en el sitio adyacente a la membrana donde se encuentran los receptores al transmisor. Lo anterior confiere a las sinapsis del tipo químico una asimetría

característica, ya que las sinapsis eléctricas son por lo general simétricas, teniendo vesículas sinápticas muy poco numerosas a ambos lados de las membranas pre y postsinápticas. Existe un gran cuerpo de evidencias experimentales que demuestran que la presinapsis contiene todos los mecanismos bioquímicos necesarios para la síntesis, liberación y recaptura de los transmisores, por lo cual ha sido una estructura intensamente estudiada. Los transmisores pueden tener una función tanto excitadora como inhibitoria sobre las neuronas receptoras, lo que depende de como la postsinapsis transduzca el mensaje. Cuando el efecto es de excitación, la interacción del transmisor con el receptor produce cambios en la permeabilidad a iones, que conducen finalmente a la generación de otro potencial de acción. Por el contrario, cuando el efecto es de inhibición, los cambios de conductancia alejan a la neurona receptora del umbral de disparo. Esto es así por la asociación de los receptores con canales iónicos específicos, con cuya regulación se controla el potencial de membrana y con ello la producción de los potenciales de acción. Cuando las conductancias son afectadas de manera rápida, se dice que es un efecto ionotrópico. Existe otro tipo de efecto, donde el cambio es observado a largo plazo, producto de la utilización de segundos mensajeros. A este último efecto se le llama metabotrópico. En el SNC el esquema no es tan sencillo, ya que cada neurona recibe tanto señales de excitación como de inhibición, por lo que la producción de señales depende de la sumación algebraica de todas, así como de la secuencia temporal en que sean recibidas. En consecuencia, y ya que la sinapsis



juega un papel preponderante en el fenómeno de la comunicación neuronal, es necesario recalcar algunos aspectos en los que tiene un papel preponderante:

a.- La presinapsis está implicada en los fenómenos de reconocimiento del blanco preciso para hacer sinapsis durante la ontogenia, es decir, tiene que ver con el establecimiento de las vías neurales, a lo que también contribuye la postsinapsis.

b.- La sinapsis tiene la capacidad de modificar en cierto grado sus funciones, propiedad que en general se conoce como "plasticidad sináptica", lo que le permite a la presinapsis modificar su eficacia e incluso formar nuevas sinapsis, tal como sucede en algunos casos de lesión.

c.- Por contener todos los elementos para efectuar la transmisión nerviosa, la presinapsis es una estructura fundamental para comprender la fisiología de la neurona.

Todo lo anterior da razón más que suficiente para estudiar a la sinapsis como un medio de conocer en buena parte el funcionamiento del SNC.

\*\*\*\*\*

## EL CEREBELO

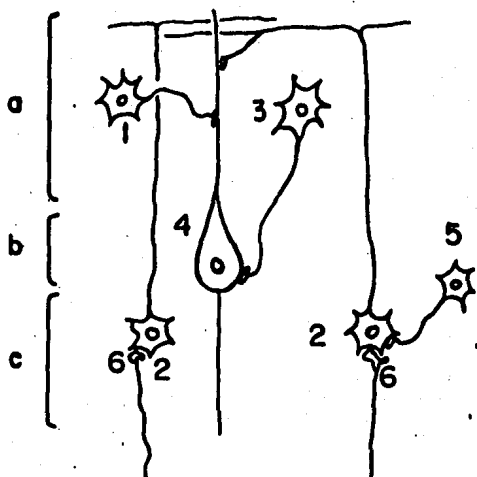
Evolutivamente, el cerebelo se presenta en todos los vertebrados, con una gran variabilidad en cuanto a la forma y tamaño en las diferentes especies. De manera general se puede decir que el cerebelo es la parte del SNC que tiene los circuitos neurales encargados de la regulación del control motor aunque por sí mismo no es capaz de iniciar movimiento alguno. Desde los trabajos de Santiago Ramón y Cajal se tiene un conocimiento preciso de la citoarquitectura del cerebelo. Este arreglo neuronal consiste en el ordenamiento de las neuronas en tres capas en la corteza del cerebelo. La capa más externa es la capa molecular, donde se agrupan dos tipos neuronales: las células estrelladas y las células en canasta. Además, en este estrato se encuentran las dendritas de las células de Purkinje y los axones de las neuronas granulares. Tanto las células en canasta como las estrelladas son inhibitorias, acción que realizan sobre las células de Purkinje. El segundo estrato está formado por una capa unicelular de células de Purkinje, cuyos axones representan la única eferencia de la corteza cerebelosa y que es de naturaleza inhibitoria. Por último, el tercero y más profundo estrato contiene también dos tipos neuronales: las células granulares, que, como se dijo anteriormente tienen sus terminales en la capa molecular, y las neuronas de Golgi, de acción inhibitoria sobre las dendritas de las células granulares y también sobre las de Purkinje. Las células granulares que son las únicas de naturaleza excitatoria en la corteza cerebelosa, son las más abundantes, siendo alrededor de 30,000 millones en el cerebelo humano, y su

efecto excitador lo llevan a cabo en las dendritas de las células de Purkinje. Las aferencias que recibe la corteza del cerebelo son dos, una de ellas es la de las fibras trepadoras, axones que se originan en la oliva inferior, como lo muestran los experimentos de lesión química con 3-acetilpirinina (Sotelo et al, 1975; Resclin y Colin, 1980). La otra aferencia es la de las fibras musgosas, originadas en el núcleo reticular lateral y el núcleo pontino entre otros. tanto las fibras trepadoras como las musgosas son de naturaleza excitatoria (Eccles et al, 1967). Las fibras musgosas se ramifican para formar numerosas rosetas terminales, y cada roseta hace contacto a su vez con numerosas dendritas de células granulares. El esquema general del cerebelo es el de un sitio que recibe una aferencia muy amplia por las fibras musgosas, información que es procesada para salir de la corteza como una señal inhibitoria de control, por los axones de las células de Purkinje. La figura 1, es una representación esquemática de la corteza del cerebelo.

a: Capa molecular  
 1.-célula estrellada  
 3.-célula en canasta

b: Capa de células de Purkinje (4).

c: Capa granular  
 2.-célula granular  
 5.-neurona Golgi  
 6.-terminal musgosa



## NEUROQUIMICA DEL CEREBELO

A pesar del extenso conocimiento que se tiene de la corteza cerebelosa en lo referente a la ontogenia de sus elementos, a la forma en que finalmente quedan constituidos en redes neurales, y a la fisiología de los mismos, el panorama de los posibles neurotransmisores es aún muy incompleto. A continuación se exponen brevemente algunas evidencias de los transmisores encontrados en la corteza del cerebelo, con énfasis en aquellos sobre los cuales se enfoca este trabajo de tesis: el ácido gama aminobutírico (GABA), la glicina, la acetilcolina y la serotonina. Esta parte intenta ser una breve revisión general, de ninguna manera exhaustiva, de los transmisores en el cerebelo, pues la parte más específica se describirá en la referente a los glomérulos cerebelosos.

### a) GABA

El GABA es el transmisor inhibitor más ampliamente distribuido en el SNC, y en el cerebelo especialmente se observa esta abundancia, pues ha sido propuesto como el transmisor de las células en canasta, de Purkinje, estrelladas y de Golgi. A este respecto, Obata y colaboradores (1967), demostraron que en el núcleo de Deiters, lugar a donde llegan las terminales de las células de Purkinje, el GABA produce una hiperpolarización, lo cual se correlaciona con un contenido alto de descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en esta zona (Fonnum et al, 1970; Dertel et al, 1981). Con técnicas de autorradiografía, se ha demostrado la captación de GABA por las

terminales axónicas de las neuronas de Golgi (Wilkin et al, 1974). La presencia de GAD es significativa en las células en canasta (McLaughlin et al, 1974; Chan-Palay et al, 1979), y por otro lado se ha demostrado la captura específica de  $^3\text{H}$ -GABA por éstas células en cultivo (Sotelo et al, 1972). También las células estrelladas exhiben inmunoreactividad para la GAD, (Dertel et al, 1981). Todo esto muestra que el GABA está ampliamente distribuido en la corteza cerebelosa, pues de cinco tipos celulares que en ella hay, cuatro usan este compuesto como transmisor.

#### b) Acetilcolina

La corteza del cerebelo contiene cantidades importantes de acetilcolinesterasa (ACE) aunque relativamente poca colinacetiltransferasa (CAT), respectivamente las enzimas de degradación y síntesis de la acetilcolina (Kasa y Silver, 1968; Goldberg y Mc Caman, 1967). Hay una correlación entre la distribución de esterasa y la zona granular, donde se supone una innervación colinérgica (Kasa, 1969). Más importante aún es la presencia de CAT también en la zona granular (Kan et al 1978, 1980), pues la ACE es muy ubicua, mientras que la CAT es un mejor indicador de una sinapsis colinérgica. La aplicación iontoforética de acetilcolina (ACh) en zonas profundas de la corteza cerebelosa no tiene resultados, pero en las células de Purkinje produce excitación (Crawford et al, 1963). De igual manera, registros precisos de la actividad de las terminales musgosas en los lóbulos IX y X muestran que es difícil precisar que la acetilcolina pueda ser el transmisor en estas fibras

(Crepel y Dhanjal, 1982). Otras referencias de la acetilcolina se mencionarán en la sección referente a los glomérulos cerebelosos aislado. En general, la acetilcolina se encuentra en pequeñas cantidades en la corteza del cerebelo, pero su localización en sitios específicos puede correlacionarse con una posible actividad neurotransmisora.

### c) Glicina

La glicina es un aminoácido inhibitor, efecto que ha sido ampliamente descrito en la médula espinal de mamíferos y de otras especies, donde se ha caracterizado su efecto (Curtis et al, 1968; Logan y Snyder, 1972; Henke y Cuénod, 1978). También en la médula espinal, con el uso de anticuerpos se ha descrito su localización a nivel de los complejo sinápticos, específicamente en las postsinapsis (Triller et al, 1985). Sin embargo, en otras zonas del SNC los datos que se tienen son poco concluyentes. Así, en la Sustancia Nigra, la glicina aplicada por iontoforesis produce inhibición en todos los tipos de neuronas (Dry et al, 1976; James y Starr, 1979). Asimismo, en homogenados de cerebro de rata, parece haber las propiedades de captación específica que indican un posible papel como neurotransmisor (Aprison et al, 1973), así como en el cerebro de rana, donde Muller y Snyder encuentran una gran semejanza en cuanto a las constantes cinéticas de captura de glicina (Muller y Snyder, 1978). Sin embargo, en el cerebelo se tienen pocos indicios en este sentido. La distribución de glicina en la corteza del cerebelo no parece tener nada de especial pues es muy uniforme a través de todas sus capas (Nadi et al, 1977), algo

similar a lo que ocurre en el cerebro. En cuanto a su efecto fisiológico, la aplicación iontoforética de glicina produce en algunos casos una leve depresión en las células de Purkinje (Kawamura y Provini, 1970), aunque Bisti y colaboradores (1971) muestra que esta inhibición es mucho más debil que la producida por el GABA. Por otro lado, la D-amino oxidasa, una enzima que tiene como sustrato a la glicina se encuentra en relativamente alta cantidad en cerebelo (De Marchi y Johnson, 1969), y en especial en los glomérulos del cerebelo de cerdo (Weimar y Niems, 1977).

#### d) Serotonina

La superfusión del vermis con serotonina radioactiva ha demostrado que esta se acumula en un sistema difuso que se distribuye en todas las capas del cerebelo donde forma pequeñas varicosidades, y por otro lado se acumula en las rosetas que forman las terminales musgosas (Beaudet y Sotelo, 1981; Chan-Palay, 1975), aunque otras técnicas, como las de anticuerpos contra la serotonina no muestran la presencia más que del sistema difuso (Takeuchi et al; 1982; Bishop y Ho, 1985). La serotonina aplicada directamente sobre las células de Purkinje produce en algunos casos excitación y en otros inhibición (Strahlendorf et al, 1984). El efecto que tiene la serotonina sobre las células granulares es predominantemente de excitación (Bloom et al, 1972). Respecto a las constantes cinéticas, se ha encontrado que la captación de 5-HT en homogenados de cerebelo es del orden de  $10^{-7}$  M (Beas-Zarate et al, 1984; Yunger y Harvey, 1976), algo semejante a las concentraciones de captura de otros transmisores.

El origen de la inervación serotoninérgica del cerebelo es principalmente el núcleo del rafé, como lo sugieren los experimentos de Kuhar y colaboradores (1972), lesionando dicho núcleo.

e) Aspartato, glutamato, sustancia P y encefalinas

La inyección intraperitoneal de 3-acetilpiridina destruye selectivamente a las neuronas de la oliva inferior, que es el sitio de origen de las fibras trepadoras, lo que determina una reducción de los niveles de ácido aspártico en la corteza cerebelosa (Desclin y Colin, 1980; Rea et al, 1980). Lo anterior indica que este compuesto es el transmisor de las fibras mencionadas. Otros compuestos neuroactivos encontrados en la corteza del cerebelo son los péptidos. Se ha demostrado que hay inmunorreactividad para la sustancia P y las encefalinas en el cerebelo de tortuga, como lo muestran algunos estudios de autorradiografía (Korte et al, 1980; Schulman et al, 1981) sin conocerse mayormente su efecto fisiológico. Por último, cabe mencionar al glutamato como el candidato más probable para transmisor de las células granulares. Lo anterior es evidente por los experimentos de Sandoval y Cotman (1978), que midieron la liberación de glutamato dependiente de calcio en cerebelo sin células granulares, donde observaron que esta liberación se reduce de manera apreciable. Como breve resumen a esta sección, se puede concluir que en la corteza del cerebelo coexisten numerosos compuestos con actividad neurotransmisora, la mayoría de los cuales están poco explorados. Lo anterior resulta en que se tiene un esquema muy completo en lo referente a la actividad



fisiológica de los elementos neurales del cerebelo, pero relativamente pobre de las moléculas que realizan estos efectos. Como un ejemplo de esta incertidumbre de la neuroquímica del cerebelo, se muestra a continuación el siguiente esquema tomado de Ito (1984), donde se pueden apreciar las interrogantes acerca de la naturaleza de los transmisores.

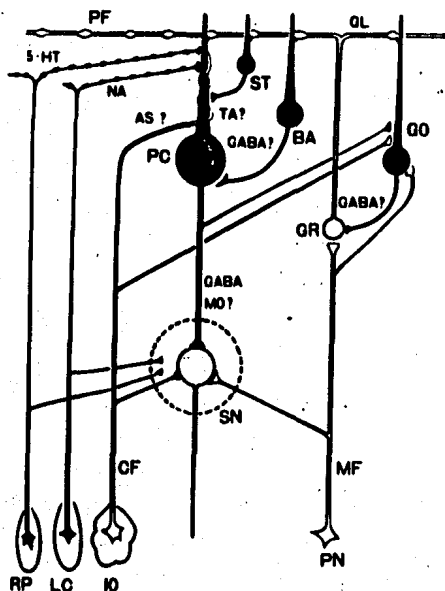


FIG. 3. Basic neuronal circuitry and putative neurotransmitters in the cerebellum. PC, Purkinje cell; GO, Golgi cell; BA, basket cell; ST, stellate cell; GR, granule cell; PF, parallel fiber; MF, mossy fiber; CF, climbing fiber; SN, vestibular or cerebellar nuclear cell; PN, precerebellar neuron which issues mossy fibers; IO, inferior olive; LC, locus coeruleus; RP, raphe nuclei. Inhibitory neurons and synapses are in black, and excitatory ones have been left unfilled. Candidates for neurotransmitter substances are indicated for some synapses. Question mark indicates that criteria for identification have not yet been fulfilled. GL, glutamate; AS, aspartate; TA, taurine; MO, motilin; NA, noradrenalin; 5-HT, serotonin (modified from Ito, 1978).

## EL GLOMERULO CEREBELOSO

Como en cualquier investigación experimental, para estudiar los mecanismos de la neurotransmisión, se requiere de modelos adecuados. Hay sinapsis que por su tamaño resultan muy apropiadas, ya que es posible introducir en ellas instrumentos de medición, como es el caso de la sinapsis neuromuscular de mamíferos o de la sinapsis gigante del calamar, en el caso de los invertebrados. En estas sinapsis, es posible medir los cambios de potencial eléctrico de la membrana postsináptica después de estimular la fibra nerviosa o de agregar externamente algún compuesto de interés, y en el caso de la sinapsis gigante se puede también introducir un electrodo en la terminal presináptica. Sin embargo, cuando se busca un modelo de sinapsis en el SNC, es común encontrarse con muchas limitaciones. Como se dijo anteriormente, en el SNC las sinapsis están formadas por un botón terminal o presinapsis, y por la membrana postsináptica. Las estructuras presinápticas generalmente son de un tamaño muy pequeño (alrededor de 1  $\mu$ m) y no permiten por lo tanto los registros directos de su actividad por los métodos electrofisiológicos. Para el estudio de las sinapsis centrales se han ideado técnicas de aislamiento de fracciones subcelulares. Particularmente útil ha sido el aislamiento de terminales nerviosas (sinaptosomas). Los sinaptosomas se obtienen homogeneizando cuidadosamente tejido nervioso en un medio isotónico y después, empleando técnicas de centrifugación diferencial y en gradientes de densidad, la fracción que contiene terminales nerviosas es aislada del resto. Durante la fase de

homogenización, las terminales sinápticas sellan sus membranas en los sitios de ruptura, manteniendo en su interior el contenido original. Los sinaptosomas, como ha sido probado extensamente (Bradford, 1975), mantienen los mecanismos de transporte y síntesis intactos por períodos de tiempo que les hacen ser un modelo muy favorecido. Sin embargo, pesar de que es posible aislar sinaptosomas de zonas discretas del cerebro, no es posible tener una preparación homogénea en cuanto al tipo de transmisor que éstas utilizan. Esto es consecuencia de las intrincadas redes neuronales, que hacen que las aferencia a una zona del SNC sean múltiples y por tanto con una heterogeneidad química inherente.

Debido a esta situación, el cerebelo es una parte del SNC que ofrece algunas ventajas en cuanto a los intentos por aislar elementos neurales tales como células o sinapsis específicas. Como se dijo anteriormente, el cerebelo posee solo cinco tipos celulares agrupados en estratos definidos, cuyo establecimiento temporal en la ontogenia se conoce con precisión. Ciertos tipos de terminales sinápticas son morfológicamente inconfundibles, tal y como sucede con las terminales musgosas de la capa granular. Esta terminal se identifica por su tamaño (aproximadamente 10  $\mu$ m) que es mayor a cualquier otra terminal del SNC. La terminal musgosa es además notoria por el contenido de muy numerosas vesículas sinápticas en su interior, así como de mitocondrias, las cuales se ordenan por lo general al centro de la estructura. Estas características han hecho a las terminales musgosas muy llamativas para la experimentación, por lo que se han ideado

metodologías de su aislamiento a partir de homogenados de cerebelo. Israel y Whittaker (1965), utilizando gradientes continuos de Ficoll aislaron fracciones enriquecidas en terminales musgosas de cerebelo de rata, cobayo, pichón y conejo, y determinaron que las musgosas de rata y cobayo así aisladas tienen un contenido apreciable de acetilcolina. Resulta de interés hacer notar lo anterior debido a que la acetilcolina casi siempre tiene efectos excitatorios. Con el método de Israel y Whittaker, aunque se obtienen las terminales musgosas de forma pura, no parecen tener viabilidad por tiempos ni remotamente cercanos a los de una preparación de sinaptosomas convencionales. Los mencionados investigadores determinaron que tiempos de incubación tan pequeños como 8 minutos producen cambios morfológicos tan drásticos que hacen pensar en un daño de la preparación. Se han ideado técnicas alternativas para conservar a la terminal musgosa metabólicamente activa por un tiempo mayor, tal es el caso de las técnicas para el aislamiento de partículas glomerulares.

In situ, la terminal musgosa está incluida en la estructura mejor conocida como glomérulo cerebeloso, que es un complejo sináptico abundante en la capa granular del cerebelo. Como se dijo anteriormente, una fibra musgosa se ramifica en numerosas rosetas terminales que son las encargadas de hacer los contactos sinápticos con las dendritas de las células granulares. Estas dendritas reciben simultáneamente sinapsis de las terminales axónicas de las neuronas Golgi. La estructura completa de terminal musgosa, dendritas granulares y terminales axónicas de Golgi es a lo que se llama glomérulo.

Hajos y colaboradores (1975), Hamberger et al (1976) y Terrian et al (1985), han descrito técnicas de aislamiento para las partículas glomérulares, así como también se han descrito algunas características bioquímicas de la preparación (Tapia et al, 1974; Wilson et al, 1975). Los glomérulos aislados mantienen su actividad metabólica hasta por una hora, tiempo durante el cual producen  $\text{CO}_2$  lactato de manera lineal, después de haberlos incubado en un medio de glucosa radioactiva (Wilson et al, 1975). Esta preparación también conserva intactos sus mecanismos de captura de alta afinidad para compuestos tales como el aspartato, la glicina, el GABA y otros, lo cual es un indicio de su viabilidad y de una heterogeneidad química de probables transmisores. También se ha medido las actividades específicas de enzimas importantes desde el punto de vista de los transmisores como son la GAD y la CAT, enzimas de síntesis de GABA y acetilcolina respectivamente, encontrándose que hay una actividad muy importante de GAD, lo cual refleja en buena parte la inervación de las terminales axónicas de Golgi (Hajos et al, 1974; Tapia et al, 1974). Lo anterior correlaciona con la determinación de los receptores a GABA encontrados en los glomérulos aislados (Kingsbury et al, 1980) y con los experimentos de autorradiografía realizados por Wilkin y colaboradores (1974), que encontraron que las terminales axónicas de Golgi en los glomérulos acumulan selectivamente GABA radioactivo. Sin embargo, un buen indicio de que las terminales axónicas de Golgi no son homogéneas en cuanto al transmisor que manejan, lo constituyen los estudios de Wilkin y colaboradores

(1981), que demostraron que tanto el GABA como la glicina son transportados al interior de terminales axónicas de Golgi, aunque lo más probable es que lo hagan por sitios de transporte diferentes, pues la glicina resultó ser un inhibidor muy débil del transporte de GABA e inversamente el GABA casi no inhibió el transporte de glicina.

En cuanto a la terminal musgosa, se tienen evidencias para algunos probables transmisores pero pocos datos son concluyentes, y todo parece indicar que también hay una heterogeneidad de transmisores en estas terminales. Como se dijo anteriormente, en la zona granular hay una abundancia de acetilcolinesterasa, y ha sido posible determinar que esta enzima se localiza alrededor de los sitios de sinapsis de las terminales musgosas, es decir, en los lugares donde realizarían su función degradativa de la acetilcolina (Kása, 1969). En registros de potenciales inducidos en rebanadas de vermis, Crepel y Dhanjal (1982) midiendo la amplitud de las ondas N, características de las terminales musgosas, no obtienen resultados concluyentes, aunque no descartan que al menos una porción de las terminales musgosas sean colinérgicas. La actividad colinérgica en el cerebelo sigue un patrón de desarrollo muy diferente al de otras zonas del SNC que se localiza sobre todo en los lóbulos IX y X del vermis donde, al inicio del desarrollo, hay una alta actividad que decrece conforme se alcanza la madurez (Kása et al, 1982).

Otro compuesto interesante localizado específicamente en la terminal musgosa es la serotonina. Para ampliar la información que se dio en la sección de neuroquímica del cerebelo, mencionaré aquí que otros investigadores además de Chan-Palay han

encontrado que inyecciones de serotina radioactiva resultan en la acumulación de ésta en algunas terminales musgosas (Beaudet y Sotelo, 1981; Bloom et al, 1972). En adición a la excitación y/o inhibición sobre las células de Purkinje, se ha encontrado que la serotonina induce excitación sobre las células granulares (Bloom et al, 1972), que puede ser un dato interesante puesto que las fibras musgosas tienen en estas células su blanco. En glomérulos cerebelosos, Terrian y colaboradores (1985), describieron que la serotina se capta por un sistema de alta afinidad, con una  $K_m$  de aproximadamente 5  $\mu M$ . En contraste con lo anterior, las constantes de captura encontradas en homogenados de cerebelo completo, resultan en valores tan pequeños como 0.05  $\mu M$  (Yunger y Harvey, 1976).

En suma, el glomérulo cerebeloso es un modelo de sinapsis del SNC potencialmente útil para el estudio de los mecanismos de transmisión, pues es una estructura relativamente sencilla en cuanto a los elementos que lo conforman, aunque muestra una diversidad en los probables transmisores que utiliza. Otra ventaja es que es una estructura de la cual se conoce su localización anatómica.

\*\*\*\*\*

## CAPTURA Y LIBERACION DE TRANSMISORES

Se sospecha que una sustancia es un transmisor cuando es capaz de modificar el disparo de una neurona, produciendo inhibición o excitación. Si además el compuesto en cuestión se encuentra en el tejido, así como las enzimas que lo sintetizan y degradan, y se puede demostrar que es liberable de una presinapsis después de estimular por medios eléctricos o químicos, entonces con muchas probabilidades se está hablando de un transmisor. En adición a lo anterior, las terminales nerviosas poseen mecanismos especiales de captura para las moléculas transmisoras. Debido a que los resultados experimentales de esta tesis se basan ante todo en la captación y liberación de transmisores, se amplían a continuación ambos criterios.

### Captación dependiente de sodio

La captura de compuestos que en el SNC funcionan como neurotransmisores o precursores de éstos, es una característica más o menos ubicua de todo el organismo. Aminoácidos como la glicina o el ácido aspártico son además de transmisores en algunos sitios, constituyentes normales de las proteínas y de varias vías metabólicas. Así, una pregunta es, cómo hace la terminal nerviosa para desviar parte de lo que capta para utilizarlo como transmisor?. Por otro lado, y desde el punto de vista de funcionalidad de la sinapsis, es necesario retirar a los transmisores de la vecindad de la membrana postsináptica para mantener receptivo al sistema, al mantener en disponibilidad a los receptores postsinápticos en capacidad de recibir nuevas señales. Es tal vez esto último una de las principales



funciones de la existencia de sistemas específicos de captura en las terminales nerviosas (Snyder et al, 1973). Existe evidencia experimental de que los compuestos neuroactivos son captados por las terminales por medio de sistemas que en general se denominan de "alta afinidad". Este término es descriptivo para la cinética de transporte de sustancias transmisoras, para diferenciarlo de otro tipo de sistemas que utiliza la neurona para introducir sustancias. El sistema de alta afinidad utiliza el acoplamiento del gradiente del ión  $\text{Na}^+$ , concentrado mayormente en el medio extraneuronal, con el transporte de moléculas (Snyder et al, 1973). La cinética de captura de los transmisores no sigue el clásico modelo de saturación, análogo a la cinética de enzimas de un solo sitio activo, sino que, por lo general al analizar con el sistema de dobles recíprocas, se encuentran por lo general dos pendientes, una llamada de alta afinidad y otra de baja afinidad. Esto se ha interpretado como la existencia de sitios de captura para un mismo compuesto. En general, las constantes de captura de alta afinidad se encuentran en el rango  $\mu\text{M}$ , a diferencia de las de baja afinidad, que son mayores en concentración, siendo en el rango  $\text{mM}$ . El sistema de alta afinidad que es el preferentemente dirigido hacia la función transmisora, es fuertemente dependiente de la presencia de  $\text{Na}^+$  en el medio extracelular, así, la glicina, el aspartato y el GABA siguen este patrón, al igual que las aminas biogénicas (Bogdanski et al, 1970). En este mecanismo intervienen además del sodio, otros iones como el cloruro (Kuhar y Zarbin, 1978). Finalmente, cabe señalar que el sistema de alta afinidad es muy sensible a

temperatura (Simon y Kuhar, 1976), y en algunos casos se cuenta con inhibidores específicos.

#### Liberación dependiente de calcio

Como se mencionó en la introducción, después que el impulso nervioso propagado por el axón llega a la terminal sináptica, la conductancia al calcio se aumenta y este evento de alguna manera produce que los transmisores se liberen a partir de la terminal. Que el calcio es esencial para que la transmisión nerviosa se lleve a cabo, es algo que se conoce desde inicios de siglo, cuando se observó que las contracciones en el músculo esquelético de rana se disminuían cuando no había calcio en el medio. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo completo de liberación, posiblemente es un fenómeno inherente a la membrana sinaptosomal misma, ya que el tiempo que transcurre entre la entrada de calcio y la salida del transmisor es muy pequeño como para que ocurran otras interacciones antes de activarse el mecanismo de liberación (Llinás et al, 1976). Esto es aun más claro en los modelos de membranas reconstituidas (proteoliposomas), donde se han insertado las proteínas de terminales colinérgicas de la electroplaca del torpedo (Israel et al, 1984), y se ha podido observar la liberación de acetilcolina sin mediar en el interior del proteoliposoma ninguna estructura subcelular.

La secuencia clara de entrada de calcio y salida de transmisor dió origen a la llamada "hipótesis del calcio", que Katz y Miledi demostraron plenamente en la preparación del axón gigante del calamar. Con este modelo experimental, los mencionados investigadores demostraron que la presencia de calcio

extracelular era indispensable para la liberación del transmisor, pues si éste se antagonizaba con magnesio, la liberación no ocurría, (Katz y Miledi, 1967), o de un modo más directo, que inyectando calcio en la presinapsis con una micropipeta, era suficiente para determinar la liberación del transmisor (Miledi, 1973). Por otro lado, en sinaptosomas aislados, se ha podido medir la entrada de calcio como consecuencia de una despolarización producida ya sea por medio de estimulación eléctrica (Swanson et al, 1974), o bien por altas concentraciones de potasio extracelular, como es más común. Técnicas alternas de medición como son las que usan colorantes metalocromáticos (Covarrubias y Tapia, 1982), u otros compuestos que forman complejos específicos con el calcio muestran también que el calcio penetra de manera importante como consecuencia de una despolarización. Los sinaptosomas también han sido un modelo aceptable para mostrar que la liberación de los transmisores en el SNC sigue un patrón similar al de la placa neoromuscular.

Blaustein (1975), midió la liberación de norepinefrina en sinaptosomas, estimulando con veratridina, un activador de canales de sodio sensibles a voltaje; esta liberación fue dependiente de calcio extracelular, y se inhibía si anteriormente se incubaba con tetrodotoxina que bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje. Esto se ha demostrado para otros transmisores en sinaptosomas, y en otras preparaciones como son las rebanadas de corteza cerebral, donde GABA, glicina y glutamato son liberados por un proceso dependiente de calcio (Mulder y Snyder, 1974; Srinivasan et al, 1969, Levi et al, 1982).

Por todo lo anterior, el criterio de liberación dependiente de calcio, así como la captación dependiente de sodio son utilizados como herramientas para determinar la actividad de un posible neurotransmisor, dado que éstas características son presentadas solamente por las terminales nerviosas.

\*\*\*\*\*

## OBJETIVOS DE LA TESIS

La complejidad inherente al SNC ha inducido a la búsqueda de modelos de estudio sencillos, pero que conserven las mismas propiedades fisiológicas del tejido intacto. Como se dijo con anterioridad, uno de estos modelos experimentales donde se ha estudiado la transmisión química de sinapsis centrales es el de los sinaptosomas. En este trabajo de tesis se emplea alternativamente un modelo de sinapsis central, utilizando una estructura que en cuanto al número de elementos que tiene es ligeramente más complicada que los sinaptosomas convencionales, pero que en cambio tiene la ventaja de conocerse con certeza su localización anatómica y el origen de las terminales; este modelo experimental es el de los glomérulos cerebelosos aislados. Con base en la referencias bibliográficas que se mencionaron en las secciones anteriores, que indican que el GABA, la glicina, la acetilcolina y la serotonina pueden ser transmisores de las sinapsis implicadas en el complejo glomerular, se hicieron experimentos para demostrar si los mencionados transmisores (o su precursor en el caso de la colina) son captados de manera dependiente de sodio, y son liberados de forma dependiente de calcio. Además, como una manera de corroborar los resultados, se compararon utilizando una preparación diferente, que fue la de rebanadas de vermis. Esta se utilizó porque el vermis es una zona muy estudiada, y en ella se han encontrado terminales nerviosas para los transmisores mencionados. Puesto que los glomérulos en condiciones normales se encuentran en la capa granular de la corteza cerebelosa, se emplearon tanto rebanadas de corteza

completa, como otras sin capa molecular. Con los resultados obtenidos se busca asignar los neurotransmisores a los dos tipos de sinapsis que se encuentran en el glomérulo, apoyándose en las referencias bibliográficas existentes. Estos resultados contribuyen a aumentar el conocimiento sobre la naturaleza de los transmisores de la corteza del cerebelo.

\*\*\*\*\*

## MATERIALES Y METODOS

La metodología está descrita con detalle en el manuscrito enviado para su publicación y que se encuentra en la sección de resultados, por lo cual en este espacio describiré sólo aquellas partes de metodología que se emplearon de apoyo para la interpretación de resultados, y que no están en el trabajo mencionado. Brevemente, los experimentos de captura consistieron en aislar los glomérulos del cerebelo de ratas, preincubarlos por un período de no más de 10 minutos, agregando posteriormente al medio de incubación transmisores marcados radioactivamente, tanto en presencia como en ausencia de  $\text{Na}^+$ . Después, para seguir el curso temporal de la captura de la marca radioactiva, se tomaron alícuotas de la suspensión cada 1, 2 y 4 minutos, filtrando sobre filtros Millipore de  $0.65 \mu\text{M}$  y lavando seguidamente con un medio no radioactivo. Posteriormente, se determinó la cantidad de compuesto captado, midiendo la radioactividad de los filtros con el tejido, después de agregar un líquido de centelleo. Para los experimentos de liberación, después de preincubar con el compuesto radioactivo, se tomaron alícuotas de la suspensión de glomérulos y se colocaron sobre filtros Millipore de  $0.65 \mu\text{M}$ , con un sistema de superfusión continua. Se lavó el exceso de radioactividad antes de coleccionar un período de liberación basal a una velocidad de flujo de  $0.5 \text{ ml}$  por minuto. Posteriormente, se cambió el medio de superfusión por uno que tuviera potasio  $47 \text{ mM}$  como despolarizante, y conteniendo o careciendo de calcio ( $2.5 \text{ mM}$ ), después, se siguió coleccionando cada minuto. Los experimentos de los cuales se obtuvieron las figuras 2 y 3 del anexo, se

hicieron disecando rebanadas de vermis, retirándoles la capa molecular con la ayuda del microscopio de disección. Estas rebanadas se incubaron en 0.5 ml de un medio Krebs-Tris durante 5 minutos y después se les agregó 10  $\mu$ l de una mezcla de colina radioactivas para tener una concentración final de 5  $\mu$ M. En las condiciones con ouabaina y monensina, éstas se agregaron desde el tiempo de preincubación, y en el caso del hemicolinio, se agregó al tiempo de añadir la marca radioactiva. La captura se detuvo a los 10 minutos, filtrando las rebanadas sobre filtros de nylon y lavando abundantemente con medio no radioactivo. Después se recuperó el filtro con el tejido, fué digerido con NaOH 1N y se tomó una alícuota de 0.1 ml para determinar proteína de cada ensayo. Para tener un control alterno de comparación de la manera en que se capta la colina por terminales nerviosas diferentes a las de la preparación de glomérulos cerebelosos, se hicieron experimentos de captura de colina en sinaptosomas de cerebro de ratón. Para esto, se aislaron sinaptosomas por el método de Hajos (1975) resuspendiéndolos en un medio Krebs/tris  $\text{Na}^+$ , pH 7.4. Una alícuota de 0.25 ml se agregó a 2.5 ml de medio de incubación con o sin  $\text{Na}^+$ , en un baño de 37 °C y con agitación continua. Después se preincubó y se realizó el experimento de manera similar a como se describe para los experimentos en glomérulos.

Por otro lado, para tener un control morfológico de las preparaciones, se hicieron muestreos de éstas; en el caso de los glomérulos se hizo microscopía electrónica fijándolos en glutaraldehído y procesando las muestras por la metodología



estandard, o directamente después de obtener la preparación, con microscopía de interferencia de fases (Nomarski). Con las rebanadas de vermis, se hizo microscopía óptica, fijando a las rebanadas disecadas en formol 10% y haciendo cortes histológicos de la preparación incluida en parafina y teñida con la técnica de hematoxilina-eosina.

\*\*\*\*\*

\*\*\*\*\*

RESULTADOS :

"NEUROTRANSMITTERS OF THE CEREBELLAR GLOMERULI: UPTAKE AND  
RELEASE OF LABELED  $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID, GLYCINE, SEROTONIN AND  
CHOLINE IN A PURIFIED GLOMERULUS FRACTION AND IN GRANULAR LAYER  
SLICES"

\*\*\*\*\*

NEUROTRANSMITTERS OF THE CEREBELLAR GLOMERULI: UPTAKE AND RELEASE OF  
LABELED  $\gamma$ -AMINO BUTYRIC ACID, GLYCINE, SEROTONIN AND CHOLINE IN A  
PURIFIED GLOMERULUS FRACTION AND IN GRANULAR LAYER SLICES

Ezequiel Morales and Ricardo Tapia

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600,  
04510-México, D.F., México

Correspondence and proofs to: Ricardo Tapia, at the address shown  
above. Tel 550-5215, ext. 4935

Abbreviations used: GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; ACh, acetylcholine;  
LDH, lactic dehydrogenase.

Abstract: We have studied some properties of the uptake and release of labeled  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), glycine, serotonin and choline in a purified fraction of glomeruli and in slices of the granular layer of the rat cerebellum. The uptake of both GABA and glycine into the glomerulus particles was dependent on the presence of  $\text{Na}^+$  in the medium. In contrast, the uptake of both serotonin and choline was completely  $\text{Na}^+$ -independent. In slices of the granular layer also no  $\text{Na}^+$  dependence of serotonin uptake was observed, and only a slight dependence was observed for choline. Choline uptake into the glomerulus particles showed two components, with apparent  $K_m$  values of 16.8 and 102  $\mu\text{M}$ . GABA release was stimulated by  $\text{K}^+$ -depolarization about 100% (peak stimulation) and this value was reduced to 50% when  $\text{Ca}^{2+}$  was omitted. The release of glycine was stimulated more rapidly and notably than GABA (200%) and this stimulation was completely abolished in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Serotonin release from the glomerulus particles was only slightly stimulated by depolarization, but this stimulation was strictly  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent. In slices of the granular layer, this stimulation was considerably larger (about 40%) and it was also almost totally dependent on  $\text{Ca}^{2+}$ . In contrast, after loading with labeled choline the release of radioactivity from both the glomerulus particles and the cerebellar slices was not stimulated at all by  $\text{K}^+$ -depolarization, either in the presence or in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Most of the radioactivity released spontaneously corresponded to choline, and only a small proportion (8-14%) to acetylcholine. From the results of the release experiments and taking into account the pertinent data from the literature, it is concluded that GABA

and glycine are probably the transmitters of different populations of Golgi axon terminals, whereas serotonin might be the transmitter of at least a certain population of the mossy fiber giant terminals, in the rat cerebellar glomeruli. In contrast, acetylcholine does not seem to have any transmitter role in the synaptic structures of the glomeruli.

Key words: Cerebellar glomeruli - GABA - Glycine - Serotonin  
- Choline - Acetylcholine

Running title: Neurotransmitters of cerebellar glomeruli

The cerebellar cortex is one of the best known regions of the CNS in terms of neuronal circuitry and physiology (Eccles et al., 1967; Ito, 1984). However, the identification of the neurotransmitters involved in specific synapses of the cerebellar cortex is still a major problem. Whereas all inhibitory neurons in the cerebellum, the Golgi, basket, stellate and Purkinje cells, seem to use  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) as neurotransmitter (Curtis and Felix, 1971; Fonnum and Walberg, 1973; Ribak et al., 1978), and glutamic acid is the most probable transmitter of granule cells parallel axons (Flint et al., 1981; Sandoval and Cotman, 1978; Young et al., 1974), the information on the transmitters of mossy and climbing fibers is scarce.

For neurochemical studies in specific synapses, the cerebellum offers some advantages. One of them is the possibility of isolating synaptic complexes morphologically identified as the glomeruli of the granular layer by their large size and by the presence of the giant mossy terminal, which is the core of the glomerulus and makes numerous synapses on granule cell dendrites (Hajós et al., 1974; 1975; Tapia et al., 1974; Balázs et al., 1975). The other main synapse present in the glomerulus is that established between the axon terminals of Golgi cells and the granule cell dendrites. The isolated glomerulus particles have been characterized in some respects. They are enriched in glutamate decarboxylase and succinate dehydrogenase but contain much less choline acetyltransferase (Tapia et al., 1974; Balázs

### Isolation of glomerulus particles

The glomerulus fraction was obtained by the rapid procedure of Hajós et al. (1975), with the following modifications.

Eight cerebella were cut in a McIlwain tissue chopper in two perpendicular axes to obtain tissue fragments of 500  $\mu$ m. The sliced tissue was homogenized manually using two conical pestles (250 and 125  $\mu$ m clearance) and filtered twice through a 250  $\mu$ m pore size nylon filter and once through a 100  $\mu$ m nylon filter. Details of the homogenization and centrifugation procedures were carried out as described (Hajós et al., 1975). The enrichment of glomerulus particles in the corresponding fraction of the sucrose gradient was confirmed by Nomarsky interference contrast microscopy and by electron microscopy after fixation in glutaraldehyde-osmium tetroxide. Electron microscopy of glomeruli after 20 min incubation in the uptake medium was also carried out in three experiments.

Besides electron microscopy, the possibility of damage of the mossy terminals during the incubation procedures was tested by measuring the release of lactic dehydrogenase (LDH). For this purpose aliquots of the resuspended glomerulus particles were added to the uptake medium and after different incubation periods centrifuged in a Beckman Microfuge 12. LDH activity was measured spectrophotometrically (Bergmeyer et al., 1963) in the supernatant and in the pellet after disrupting the particles by resuspension in a small volume of 0.4% Triton-X-100.

Protein was determined by the method of Lowry et al. (1951).

### Uptake experiments

For uptake studies the final pellet of glomerulus particles from 8 cerebella was resuspended in 3 ml of a  $\text{Na}^+$ -free medium containing (in mM): 4.7 KCl, 1.2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5  $\text{CaCl}_2$ , 1.2  $\text{MgSO}_4$ , 5.6 glucose, 236 sucrose and 25 Tris-HCl, pH 7.4. Aliquots of 0.4 ml, containing 2-4 mg protein were incubated in 2.5 ml of oxygenated uptake medium, which was either the resuspension medium described or medium in which 118 mM NaCl replaced sucrose ( $\text{Na}^+$ -medium). After 10 min preincubation at  $37^\circ\text{C}$ , ( $^3\text{H}$ )GABA (2 uCi, 0.5  $\mu\text{M}$  final concentration), ( $^3\text{H}$ )glycine (5 uCi, 10  $\mu\text{M}$ ), ( $^3\text{H}$ )serotonin (5 uCi, 0.5  $\mu\text{M}$ ) or ( $^3\text{H}$ )choline (5  $\mu\text{M}$ , 5 uCi; other concentrations, were also used for the kinetic experiments) was added. Aliquots of 0.4 ml were taken at 1, 2 and 4 min and filtered rapidly under vacuum on 0.65  $\mu\text{m}$  cellulose acetate Millipore filters, which were immediately washed twice with 5-7 ml of medium. The radioactivity retained in the filters was counted by liquid scintillation spectrometry after the addition of 5 ml of Tritosol (Fricke, 1975).

### Release experiments

The release of radioactivity after loading the glomeruli with labeled GABA, glycine, serotonin and choline was studied by the superfusion method previously described (Tapia and Sitges, 1982). The glomerulus preparation was resuspended in the  $\text{Na}^+$ -containing medium described above, except that  $\text{CaCl}_2$  was omitted, and incubated in this medium at  $37^\circ\text{C}$  as for the uptake experiments in order to load the glomeruli. After 10 min (GABA) or 20 min (glycine, serotonin and choline) incubation with the labeled compounds, 0.8 ml



aliquots were transferred to superfusion chambers holding 0.65  $\mu$ m filters. The filters were washed by superfusion at 1.5-2 ml/min during 5 min and then superfused at 0.5 ml/min for the collection of 1-min fractions. Superfusion medium was the same as that used for loading the glomeruli, and at 6 min it was quickly substituted by a medium containing a depolarizing  $K^+$  concentration (47 mM;  $Na^+$  was proportionally reduced to maintain osmolarity). Parallel superfusion chambers were used to study the release in the presence of 2.5 mM  $Ca^{2+}$  and in the absence of this cation and presence of 0.1 mM EGTA. In the experiments with GABA all media contained 0.1 mM aminooxyacetic acid, in those with serotonin they contained 0.1 mM pargyline and 1 mM ascorbic acid and in those with choline 0.1 mM eserine. The radioactivity in each collected fraction and that remaining in the filter at the end of the superfusion were counted after the addition of 5 ml of Tritosol (Fricke, 1975). Results are expressed as percent of total radioactivity released per minute (total radioactivity = total released + that remaining in the tissue at the end of the superfusion).

### Cerebellar slices

The uptake and release of labeled choline and serotonin was also studied in cerebellar slices. For this purpose, the vermis was separated from the cerebellar hemispheres and cut longitudinally in a McIlwain tissue chopper to obtain slices 500  $\mu$ m thick. These whole cortex slices were used for serotonin and ACh release. Furthermore, in an attempt to concentrate the granular layer of the cerebellar cortex, the molecular layer of the vermis slices was manually removed on

ice under a stereoscopic microscope. In some experiments these slices were fixed and stained with hematoxylin-eosin and it was corroborated that the removal of the molecular layer was complete. These granular layer slices were used for both uptake and release of serotonin and ACh. The slices were carefully transferred to the uptake medium and to the superfusion chambers using a wide mouth Pasteur pipette. Uptake and superfusion media were as described above for the glomerulus particles. The superfusion system for the slices was as described previously (López-Colomé et al., 1978). Two or three slices were used for each superfusion chamber. At the end of the superfusion the tissue was digested with 1 ml of a tissue solubilizer (NCS, Amersham, Arlington Heights, IL, U.S.A.) and radioactivity was counted after the addition of 5 ml Tritosol.

#### Separation of released compounds

In some experiments the identity of the radioactivity released by depolarization after loading the glomeruli with GABA, glycine and serotonin was ascertained by chromatography. Superfusion fractions were desalted by passing through a Dowex AG 50 column ( $H^+$  form), eluted with 2.5 N  $NH_4Cl$ , concentrated by evaporation in a Savant concentrator, spotted on Whatman No. 1 paper or on TLC sheets of silica gel and run with butanol:acetic acid:water (4:1:1) or ethanol:ethylene glycol:water (7:3:1), respectively. The amino acids were run by both systems and serotonin only by TLC. Standards of the radioactive compounds were run in parallel. The paper or sheet was cut in 1 cm pieces, and radioactivity was counted in each piece after elution with Tritosol directly in scintillation vials. The

results of these chromatographic analysis showed that for glycine 65-70% of the radioactivity released corresponded to the amino acid; for GABA this value was 78-82% and for serotonin 85%.

Choline was separated from acetylcholine in the superfusion fractions by phosphorylation of choline with choline kinase and subsequent extraction of acetylcholine into a toluene scintillation mixture, as previously described (Tapia et al., 1985). Phosphorylation of a standard solution of labeled choline was carried out in parallel to the samples in order to correct for the actual phosphorylation value, which was 85-90% of the total choline present.

## RESULTS

### Glomerulus fraction

The appearance of the continuous gradient of the nuclear fraction was similar to that described previously (Hajós et al., 1975). The use of the tissue chopper to mince the tissue before homogenization proved to be more convenient than the previously employed method with scissors. Observation of the purified glomerular fraction by the Nomarski interference technique and by electron microscopy showed pictures very similar to those of Hajós et al. (1975). Furthermore, glomeruli incubated in the uptake medium for 20 min were also observed in the electron microscope in three experiments. No apparent damage of the glomerulus structure was observed after this incubation time.

The possibility of glomerulus damage during the incubation time was also studied by measuring the release of LDH as described

in Methods. In 5 experiments of this kind it was observed that before incubation  $19.0\% \pm 2.8$  (SEM) of the total LDH activity was in the supernatant, and this value increased to  $30.7\% \pm 4.8$  after 10 min incubation and to  $27.3\% \pm 2.7$  after 20 min incubation. The differences between these values and the control were not significant ( $P > 0.1$ ). If they represent some damage to the glomeruli during incubation, this is probably very slight.

#### Uptake experiments

The results of the experiments on the uptake of labeled GABA and glycine by the glomerular particles are shown in Fig. 1. In the presence of  $\text{Na}^+$  the uptake of ( $^3\text{H}$ )GABA was practically linear during the 4-min period studied, although a slightly faster uptake was observed in the first min. When  $\text{Na}^+$  was omitted in the medium there was no increase of GABA uptake with time, so that at 4 min the inhibition due to  $\text{Na}^+$  absence was 90%. The uptake of ( $^3\text{H}$ )glycine in the presence of  $\text{Na}^+$  was about twice that of GABA and its  $\text{Na}^+$  dependence was less clear. In the first min no inhibition was detected by omitting  $\text{Na}^+$ , but a 50-60% inhibition was observed at 2 and 4 min incubation (Fig. 1, bottom panel).

In contrast to the results with GABA and glycine, the uptake of ( $^3\text{H}$ )serotonin by the glomerulus particles in the presence of  $\text{Na}^+$  was quantitatively very small and it occurred mainly in the first min of incubation (Fig. 2). The omission of  $\text{Na}^+$  not only did not inhibit serotonin uptake but apparently stimulated it, particularly at 2 and 4 min where a 55-75% stimulation by  $\text{Na}^+$  absence was observed. In view of these results and those of serotonin release

that will be described below, the uptake of serotonin was also studied in slices of the granular layer obtained as described in Methods, in an attempt to preserve as much as possible the structure of the mossy terminals of the glomeruli and at the same time to eliminate the possible participation of molecular layer structures in the uptake process. The results of these experiments indicate that the uptake of serotonin in the slices was about 100% higher than that in the glomerulus fraction, but similarly to the latter it did not show any  $\text{Na}^+$  dependence, although an inhibition by  $\text{Na}^+$  omission was observed (Fig. 2, inset). When the experiment was carried out at  $4^\circ\text{C}$ , the uptake of serotonin in the presence of  $\text{Na}^+$  was about 50% reduced (Fig. 2 inset).

The uptake of ( $^3$ )choline by the glomerulus fraction and by the slices of the granular layer is shown in Fig. 3. It can be seen that choline uptake by the glomeruli was larger than of serotonin and that it was also independent of  $\text{Na}^+$ . In contrast, in the slices choline uptake was partially  $\text{Na}^+$ -dependent, since a 28 % decrease was observed when  $\text{Na}^+$  was omitted in the medium. In the presence of  $\text{Na}^+$  a 70 % decrease in the choline uptake was observed when the incubation was at  $4^\circ\text{C}$  (Fig. 3 inset).

Of the four compounds tested in the present paper, only choline uptake had not been previously studied in the isolated glomerulus particles. Therefore, a kinetic analysis of choline uptake in the presence of  $\text{Na}^+$  was carried out. The results of this study are shown in Fig. 4 as Lineweaver-Burk plots. Two components were detected, with different affinities. The high affinity uptake showed a  $K_m$  of  $16.8 \mu\text{M}$  and a  $V_{max}$  of  $109 \text{ pmoles/mg protein}$ , whereas

the values for the low affinity uptake were 102  $\mu\text{M}$  and 382 pmoles/mg protein, respectively.

#### Release experiments

The release of labeled GABA and glycine from the glomerulus particles superfused as described in Methods is shown in Fig. 5.  $\text{K}^+$ -depolarization produced a 100% peak stimulation of the release of ( $^3\text{H}$ )GABA in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . When this cation was omitted in the superfusion medium the stimulation was reduced by about 50% but it was not abolished, in spite of the fact that the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  was secured by adding EGTA to the superfusing media. The control curve of Fig. 5 (top panel) shows that the mechanical operation of changing the medium does not affect the release.

The release of ( $^3\text{H}$  glycine) was stimulated by  $\text{K}^+$ -depolarization by about 200% and this stimulation was strictly dependent on the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , since in the absence of this cation such stimulation was inhibited almost totally (Fig. 5, bottom panel). Furthermore, the stimulation of glycine release was more rapid than that of GABA, since the peak value for glycine was obtained 1-2 min after changing the medium, whereas for GABA a bell-like release curve was observed due to a slow increase of the release stimulated by depolarization.

The release of labeled serotonin from the glomerulus particles is shown in Fig. 6 (top panel). A small stimulation of about 14% (at peak value) was produced by  $\text{K}^+$ -depolarization in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . However, this stimulation seems to be real, since in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the medium it was completely abolished. In fact,

the release curve under the latter conditions is indistinguishable from the control curve obtained by the sole operation of changing the superfusion medium. Furthermore, the shape of the stimulation curve clearly indicates that, similarly to GABA, there is a gradual increase to the peak and then a slow decline, whereas in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  or when changing to the same medium there is a continuous asymptotic decline of the release. When the release of serotonin was studied in whole slices of the cerebellar vermis, the stimulation produced by  $\text{K}^+$ -depolarization was much more notable (40% peak stimulation), and this stimulation was reduced by about 75% when  $\text{Ca}^{2+}$  was omitted (Fig. 6, central panel). In slices of the granular layer the stimulation of serotonin release was similar to that in whole slices, and the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence was almost absolute (Fig. 6, bottom panel).

In contrast to the results with the amino acids and serotonin, the release of radioactivity from isolated glomeruli loaded with labeled choline was not stimulated at all by  $\text{K}^+$ -depolarization, either in the presence or in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Whereas in the case of serotonin the stimulation of the release was enhanced in the slices as compared to the glomerulus particles, again no stimulation whatsoever was observed in whole vermis slices nor in slices of granular layer loaded with labeled choline (Fig. 7).

In 5 experiments the proportion of radioactive choline and ACh released from cerebellar slices loaded with choline was studied as described in Methods. After correction for the actual extent of choline phosphorylation observed in standard samples run in parallel, it was found that in the three superfusion periods studied

(3 min before and two 3 min-periods after stimulation) 86-92% of the total radioactivity released was accounted for by choline and the remainder by acetylcholine.

## DISCUSSION

### Uptake studies

The main aim of the present work was to characterize the possible neurotransmitter role of GABA, glycine, serotonin and ACh in the synaptic structures of the cerebellar glomeruli. On the basis of previous findings in conventional brain synaptosomes (Bogdanski et al., 1968; Iversen, 1971; Kuhar and Murrin, 1978; Fagg and Lane, 1979), one of the properties that should be expected for such neurotransmitter role of amino acids and amines is a  $\text{Na}^+$ -dependent high affinity uptake, whereas choline seems to be taken up as a precursor of ACh. This type of uptake had been previously described in isolated glomerulus particles for glycine (Wilson et al., 1976). For GABA a high affinity uptake had been also described, but the  $\text{Na}^+$  dependence of this uptake was not studied (Hamberger et al., 1976; Wilson et al., 1976). Our results of glycine uptake are similar to those previously found (Wilson et al., 1976), except that the  $\text{Na}^+$ -dependence was less strict. In contrast, our data show an almost total inhibition of GABA uptake when  $\text{Na}^+$  was absent in the medium (Fig. 1).

In view of what is known on the uptake of choline and serotonin in isolated nerve endings (Bogdanski et al., 1968; Yamamura and Snyder, 1973; Simon and Kuhar, 1976; Kuhar and Murrin, 1978), it is surprising that the uptake of these two compounds



showed no dependence on  $\text{Na}^+$  in the isolated glomeruli (Figs. 2 and 3). This finding cannot be interpreted as due to damage of the glomerulus particles, unless the damage is specific for a glomerular structure able to take up serotonin and choline but not GABA and glycine. This does not seem to be the case, however, since in the slices of the granular layer, where the preservation of the glomerulus structures would be expected to be better, also no  $\text{Na}^+$ -dependence of serotonin uptake was observed, and only a slight dependence was observed for choline. The uptake of both compounds, however, was partially temperature-sensitive, suggesting the presence of an energy dependent transport.

The kinetic study of choline uptake showed two components, with apparent  $K_m$  values of 17 and 102  $\mu\text{M}$ . These values are in the range of those described for conventional synaptosomes from the cerebellum, but in the latter only one component, with a  $K_m$  of 41  $\mu\text{M}$ , which the authors consider of low affinity, was detected (Yamamura and Snyder, 1973). For serotonin, one high affinity component, with a  $K_m$  of 0.46  $\mu\text{M}$  (lateral cortex) or 1.45  $\mu\text{M}$  (vermis) was recently described in the bovine cerebellum glomerulus particles (Terrian et al., 1985).

It is particularly interesting that by means of autoradiographic techniques in isolated glomerulus particles the uptake of both GABA and glycine has been located specifically in the axon terminals of the Golgi cells, which lay in the periphery of the glomerulus, the mossy terminal being virtually unable to take up these amino acids (Wilkin et al., 1974; 1981). In contrast, serotonin uptake after intracisternal (Bloom et al.,

1972) or topical application on the vermis cortex (Beaudet and Sotelo, 1981) was located in a small population of mossy terminals, with little or no radioactivity in the Golgi axons. These findings will be discussed below in relation to our results on the release of GABA, glycine and serotonin.

## GABA

The role of GABA as the inhibitory transmitter of cerebellar Golgi cells has been postulated from electrophysiological findings (Bisti et al., 1971), and it has been supported by the already mentioned specific uptake of GABA, by the immunocytochemical location of glutamate decarboxylase in the Golgi terminals (McLaughlin et al., 1974), and by the enrichment of the activity of this enzyme (Balász et al., 1975) and of GABA receptors (Kingsbury et al., 1980) in the isolated glomerulus particles. GABA receptors have been also located autoradiographically in the granular layer (Palacios et al., 1980). It seems, therefore, that the only evidence lacking to complete the identification of GABA as the neurotransmitter of Golgi cell terminals, namely its release stimulated by depolarization, has been fulfilled by our present results (Fig.5). The partial dependence on  $Ca^{2+}$  observed is similar to that previously observed in conventional synaptosomes and brain slices (Minchin, 1980; Cunningham and Neal, 1981; Tapia and Arias, 1982; Arias et al., 1984). A  $Ca^{2+}$ -dependent, depolarization-induced release of endogenous GABA has been also demonstrated in cerebellar slices (Foster and Roberts, 1980; Flint et al., 1981).

## Glycine

In contrast to GABA, few data in the literature clearly suggest a transmitter role for glycine in the cerebellum, with the notable exception of its already mentioned specific uptake into the Golgi terminals. Glycine levels are low in the cerebellum as compared to other areas of the brain, although the activity of serine-hydroxymethyltransferase and glycine transaminase is similar to or higher than that in medulla-pons or spinal cord (Aprison and Nadi, 1978), where glycine is considered a neurotransmitter. In the granular layer of the cerebellar cortex, however, glycine is nearly as concentrated as GABA (Nadi et al., 1977). Glycine has some inhibitory action on neurons in the cerebellum, although weaker than that of GABA (Kawamura and Provini, 1970; Curtis et al., 1971), but the release of endogenous glycine (Foster and Roberts, 1980; Flint et al., 1981) and of labeled glycine (López-Colomé et al., 1978; Okamoto and Namima, 1978) from cerebellar slices was not stimulated by depolarization. In view of these data, our finding that glycine release in the glomerulus particles was notably and rapidly stimulated by  $K^+$ -depolarization, and that this stimulation was strictly  $Ca^{2+}$ -dependent, similarly to spinal cord synaptosomes (Osborne et al., 1973; Levi et al., 1982), is as surprising as the high affinity glycine uptake by the Golgi terminals, and is clearly complementary to the latter. It is noteworthy that in synaptosomes from the spinal cord, medulla and pons, and also from the cerebral cortex where the evidence for a glycinergic transmission is scarce, release curves were obtained strikingly similar to our results in the glomeruli, including the  $Ca^{2+}$ -dependence (compare Fig.5 of

the present paper with Figs. 4 and 5 of Levi et al., 1982). These results indicate therefore that, in spite of the relatively weak previous evidence, glycine should be considered a strong candidate as the transmitter of a certain population of the Golgi cells, possibly different from that releasing GABA, since competition experiments suggest that the two amino acids are taken up by different terminals (Wilkin et al., 1981).

Studies in membranes from isolated glomeruli have shown that they bind strychnine with rather low affinity and no displacement by glycine (Wilkin et al., 1981). However, strychnine binding not displaced by glycine has been found also in pigeon optic tectum (LeFort et al., 1978), and strychnine resistant effects of glycine have been described in the mammalian (Ryall et al., 1972) and frog spinal cord (Evans et al., 1976; Nicoll et al., 1976). Therefore, the lack of effect of strychnine on the inhibition mediated by Golgi neurons (Bisti et al., 1971) might indicate, in the light of the above discussion, not the absence of glycinergic transmission but the presence of strychnine-insensitive glycine receptors.

### Serotonin

There is ample evidence suggesting a role of serotonin as a transmitter in the cerebellar cortex. Immunohistochemical methods have been used to demonstrate the presence of serotonin containing and serotonin-transporting fibers and terminals in both the molecular and the granular layers, (Hokfelt and Fuxe, 1969; Chan-Palay, 1975; Beaudet and Sotelo, 1981; Takeuchi et al., 1982; Bishop and Ho, 1985). More detailed studies with electron microscopy autoradiography

after topical (Beaudet and Sotelo, 1981) or intracisternal (Bloom et al., 1972) administration of labeled serotonin have shown that this amine is taken up in some, although not the majority, of the mossy terminals of the glomeruli.

Furthermore, iontophoretic application of serotonin on granule cells elicited a prolonged acceleration of the rate of discharge, and it has been suggested that the predominant action of the amine on these cells is excitation (Bloom et al., 1972). Our results on the release of serotonin suggest that this amine is in fact the neurotransmitter of the mossy terminals, since it was possible to demonstrate its strictly  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent release in the isolated glomerulus preparation as well as in the slices of the granular layer. The fact that the stimulation of serotonin release was comparatively small in both types of preparations might be due to the heterogeneity of the mossy terminals in different parts of the cerebellum, since as already mentioned serotonin is taken up only in a limited population of mossy terminals (Bloom et al., 1972; Beaudet et al., 1981).

### Acetylcholine

Data suggesting a neurotransmitter role of ACh in structures of the cerebellar glomeruli are very scarce. The electrophysiological results are predominantly negative (Crawford et al., 1966; McCance and Phillis, 1968; Crepel and Dhanjal, 1982) and choline acetyltransferase, although immunohistochemically located apparently in the glomeruli (Kan et al., 1978; see however Rossier, 1975), is not enriched in the isolated glomerulus particles, its

relative specific activity being only 20% higher than that of LDH and about 50% less than that of glutamate decarboxylase or succinic dehydrogenase (Balázs et al., 1975). With this background, the total lack of stimulation of ACh release from both isolated glomerulus particles and granular layer slices loaded with labeled choline, observed in the present work, strongly argues against a transmitter role of ACh in the mossy terminals. This absolute lack of stimulated release sharply contrasts with the clear stimulation observed with the other three neurotransmitters studied and therefore cannot be ascribed to a damage of the possible ACh-releasing structure. The finding that most of the radioactivity released spontaneously from the slices was accounted for by choline agrees with previous data in brain synaptosomes showing that choline release is spontaneous but only acetylcholine release is stimulated by depolarization (Tapia et al., 1985).

In conclusion, the results of the present work indicate that the uptake of both serotonin and choline into the cerebellar glomeruli, differently from that of GABA and glycine, is not  $\text{Na}^+$  dependent. In the light of the identity of the glomerular structures capable of taking up GABA, glycine and serotonin, the results of the release experiments indicate that the two amino acids are most probably the inhibitory transmitters of the Golgi cell terminals, whereas serotonin might be the excitatory transmitter of at least a population of the mossy terminals. Finally, the complete lack of stimulation of ACh release by depolarization, together with other data from the literature, argues strongly

against a transmitter role of this compound in the cerebellar glomeruli.

The results of the present paper confirm that neurochemical studies in well identified isolated nerve endings from the CNS is a powerful tool for the identification of the transmitters of specific synapses. However, it is necessary to keep in mind that other problems still exist, for example the possibility of heterogenous populations of the identified terminals due to the subzones of the CNS regions, as it seems to be the case for serotonin in the present work.

Acknowledgment: This work was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project FCCBENA 800798).

## REFERENCES

- Aprison M.H. and Nadi N.S. (1978) Glycine: an inhibitor from the sacrum to the medulla, in Amino Acids as Chemical Transmitters (Fonnum F., ed.), pp. 531-570. Plenum Press, New York.
- Arias C., Sitges M., and Tapia R. (1984) Stimulation of  $^3\text{H}$ -aminobutyric acid release by calcium chelators in synaptosomes. J. Neurochem. 42, 1507-1514.
- Balázs R., Hajós F., Johnson A.L., Reynierse G.L.A., Tapia R., and Wilkin G.P. (1975) Subcellular fractionation of rat cerebellum: an electron microscopic and biochemical investigation. III. Isolation of large fragments of the cerebellar glomeruli. Brain Res. 86, 17-30.
- Beaudet A. and Sotelo C. (1981) Synaptic remodeling of serotonin axon terminals in rat agranular cerebellum. Brain Res. 206, 305-329.
- Bergmeyer H.U., Bent E., and Hess B. (1963) Lactic dehydrogenase, in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H.U., ed.), pp. 736-741. Academic Press, New York.
- Bishop G.A. and Ho R.H. (1985) The distribution and origin of serotonin immunoreactivity in the rat cerebellum. Brain Res. 331, 195-207.
- Bisti S., Iosif G., and Strata P. (1971) Suppression of inhibition in the cerebellar cortex by picrotoxin and bicuculline. Brain Res. 28, 591-593.
- Bloom F.E., Hoffer B.J., Siggins G.R., Barber J.L., and Nicoll R.A. (1972) Effects of serotonin on central neurons:



- microiontophoretic administration. Fed. Proc. 31, 97-106.
- Bogdanski D.F., Tissari A.H., and Brodie B.B. (1968) Role of sodium, potassium, ouabain and reserpine in uptake, storage and metabolism of biogenic amines in synaptosomes. Life Sci. 7, 419-428.
- Chan-Palay V. (1975) Fine structure of labelled axons in the cerebellar cortex and nuclei of rodents and primates after intraventricular infusions with tritiated serotonin. Anat. Embryol. 148, 235-265.
- Crawford J.M., Curtis D.R., Voorhoeve P.E., and Wilson V.J. (1966) Acetylcholine sensitivity of cerebellar neurons in the cat. J. Physiol. (Lond.) 186, 139-165.
- Crepel F. and Dhanjal S.S. (1982) Cholinergic mechanisms and neurotransmission in the cerebellum of the rat. An in vitro study. Brain Res. 244, 59-68.
- Cunningham J.O. and Neal M.J. (1981) On the mechanism by which veratridine causes a calcium-independent release of - aminobutyric acid from brain slices. Br. J. Pharmacol. 73, 655-667.
- Curtis D.R. and Felix D. (1971) The effect of bicuculline upon synaptic inhibition in the cerebral and cerebellar cortices of the cat. Brain Res. 34, 301-321.
- Curtis D.R., Duggan A.W., Felix D., Johnston G.A.R., and McLennan H. (1971) Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. Brain Res. 33, 57-73.
- Eccles J.C., Ito M., and Szentágothai J. (1967) The Cerebellum as a Neuronal Machine. Springer-Verlag, New York.

- Evans R.H., Francis A.A., and Watkins J.C. (1976) Biomodal action of glycine on frog spinal motoneurons Brain Res. 118, 395-401.
- Fagg G.E. and Lane J.D. (1979) The uptake and release of putative amino acid neurotransmitters. Neuroscience 4, 1015-1036.
- Flint R.S., Rea M.A., and McBride W.J. (1981) In vitro release of endogenous amino acids from granule cell-, stellate cell-, and climbing fiber-deficient cerebella. J. Neurochem. 37, 1425-1430.
- Fonnum F. and Walberg F. (1973) An estimation of the concentration of gamma-aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in the inhibitory Purkinje axon terminals in the cat. Brain Res. 54, 115-127.
- Foster A.C. and Roberts P.J. (1980) Endogenous amino acid release from rat cerebellum in vitro. J. Neurochem. 35, 517-519.
- Fricke U. (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton-X-100. Anal. Biochem. 63, 555-558.
- Hajós F., Tapia R., Wilkin G., Johnson A.L., and Balázs R. (1974) Subcellular fractionation of rat cerebellum: an electron microscopic and biochemical investigation. I. Preservation of large fragments of the cerebellar glomeruli. Brain Res. 70, 261-279.
- Hajós F., Wilkin G., Wilson J., and Balázs R. (1975) A rapid procedure for obtaining a preparation of large fragments of the cerebellar glomeruli in high purity. J. Neurochem. 24, 1277-1278.
- Hamberger A., Hansson H.-A., Lazarewicz J.W., Lundh T., and Sellstrom A. (1976) The cerebellar glomerulus: isolation and metabolic properties of a purified fraction. J. Neurochem. 27, 267-272.

- Hokfelt T. and Fuxe K. (1969) Cerebellar monoamine nerve terminals, a new type of afferent fibers to the cortex cerebelli. Exp. Brain Res. 9, 63-72.
- Ito M. (1984) The Cerebellum and Neural Control. Raven Press, New York.
- Iversen L.L. (1971) Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic neurotransmission. Br J. Pharmacol. 41, 571-591.
- Kan K.-S. K., Chao L.-P., and Eng L.F. (1978) Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in rabbit spinal cord and cerebellum. Brain Res. 146, 221-229.
- Kawamura H. and Provini L. (1970) Depression of cerebellar Purkinje cells by microiontophoretic application of GABA and related amino acids. Brain Res. 24, 293-304.
- Kingsbury A.E., Wilkin G.P., Patel A.J., and Balázs R. (1980) Distribution of GABA receptors in the rat cerebellum. J. Neurochem. 35, 739-742.
- Kuhar M.J. and Murrin L.C. (1978) Sodium-dependent, high affinity choline uptake. J. Neurochem. 30, 15-21.
- LeFort D., Henke H., and Cuenod M. (1978) Glycine specific <sup>3</sup>Hstrychnine binding in the pigeon CNS. J. Neurochem. 30, 1287-1291.
- Levi G. and Raiteri M. (1978) Modulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid transport in nerve endings: role of extracellular  $\gamma$ -aminobutyric acid and cationic fluxes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 2981-2985.
- Levi G., Bernardi G., Cherubini E., Gallo V., Marciani M.G., and Stanzione P. (1982) Evidence in favor of a neurotransmitter

- role of glycine in the rat cerebral cortex. Brain Res. 236, 121-131.
- López-Colomé A.M., Tapia R., Salceda R., and Pasantes Morales H. (1978) K<sup>+</sup>-stimulated release of labeled GABA, glycine and taurine in slices of several regions of rat central nervous system. Neuroscience 3, 1069-1074.
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L., and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- McCance I. and Phillis J.W. (1968) Cholinergic mechanisms in the cerebellar cortex. Int. J. Neuropharmacol. 7, 447-462.
- McLaughlin B.J., Wood J.G., Saito K., Barber R., Vaughn J.E., Roberts E. and Wu J. (1974) The fine structural localization of glutamate decarboxylase in synaptic terminals of rodent cerebellum. Brain Res. 76, 377-391.
- Minchin M.C.W. (1980) The role of Ca<sup>2+</sup> in the protoveratrin-induced release of -aminobutyrate from rat brain slices. Biochem. J. 190, 333-339.
- Nadi N.S., McBride W.J., and Aprison, M.H. (1977) Distribution of several amino acids in regions of the cerebellum of the rat. J. Neurochem. 28, 453-455.
- Nicoll R.A., Padjen A., and Barker J.L. (1976) Analysis of amino acid responses on frog motor neurons. Neuropharmacology 15, 45-53.
- Okamoto K. and Namima M. (1978) Uptake, release and homo- and hetero-exchange diffusions of inhibitory amino acids in guinea-pig cerebellar slices. J. Neurochem. 31, 1393-1402.

- Osborne R.H., Bradford H.F., and Jones D.G. (1973) Patterns of amino acid release from nerve-endings isolated from spinal cord and medulla. J. Neurochem. 21, 407-419.
- Palacios J.M., Young W.S. III, and Kuhar M.J. (1980) Autoradiographic localization of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptors in the rat cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 670-674.
- Ribak C.E., Vaughn J.E., and Saito K. (1978) Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. Brain Res. 140, 315-332.
- Rossier J. (1975) Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase: real or artefact? Brain Res. 98, 619-622.
- Ryall R.W., Piercey M.F., and Polosa C. (1972) Strychnine-resistant mutual inhibition of Renshaw cells. Brain Res. 41, 119-129.
- Sandoval M.E. and Cotman C.W. (1978) Evaluation of glutamate as neurotransmitter of cerebellar parallel fibers. Neuroscience 3, 199-206.
- Simon J.R. and Kuhar M.J. (1976) High affinity choline uptake: ionic and energy requirements. J. Neurochem. 27, 93-99.
- Takeuchi Y., Kimura H., and Sano Y. (1982) Immunohistochemical demonstration of serotonin-containing nerve fibers in the cerebellum. Cell Tissue Res. 226, 1-12.
- Tapia R. and Arias C. (1982) Selective stimulation of neurotransmitter release from chick retina by kainic and glutamic acids. J. Neurochem. 39, 1169-1178.
- Tapia R. and Sitges M. (1982) Effects of 4-aminopyridine on

- transmitter release in synaptosomes. Brain Res. 250, 291-299.
- Tapia R., Hajós F., Wilkin G., Johnson A.L., and Balázs R. (1974) Subcellular fractionation of rat cerebellum: an electron microscopic and biochemical investigation. II. Resolution of morphologically characterised fractions. Brain Res. 70, 285-299.
- Tapia R., Sitges M., and Morales E. (1985) Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. Brain Res. 361, 373-382.
- Terrian D.M., Butcher W.I., Wu P.H., and Armstrong D.L. (1985) Isolation of glomeruli from areas of bovine cerebellum and comparison of  $^3\text{H}$  serotonin uptake. Brain Res. Bull. 14, 469-475.
- Wilkin G.P., Csillag A., Balázs R., Kingsbury A.E., Wilson J.E., and Johnson A.L. (1981) Localization of high affinity  $^3\text{H}$  glycine transport sites in the cerebellar cortex. Brain Res. 216, 11-33.
- Wilkin G., Wilson J.E., Balázs R., Schon F., and Kelly J.S. (1974) How selective is high affinity uptake of GABA into inhibitory nerve terminals? Nature 252, 397-399.
- Wilson J.E., Wilkin G.P., and Balázs R. (1976) Metabolic properties of a purified preparation of large fragments of the cerebellar glomeruli: glucose metabolism and amino acid uptake. J. Neurochem. 26, 957-965.
- Yamamura H.I. and Snyder S.H. (1973) High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. J. Neurochem. 21, 1355-1374.
- Young A.B., Oster-Granite M.L., Herndon R.M., and Snyder S.H. (1974) Glutamic acid: selective depletion by viral induced granule cell loss in hamster cerebellum. Brain Res. . 73, 1-13.

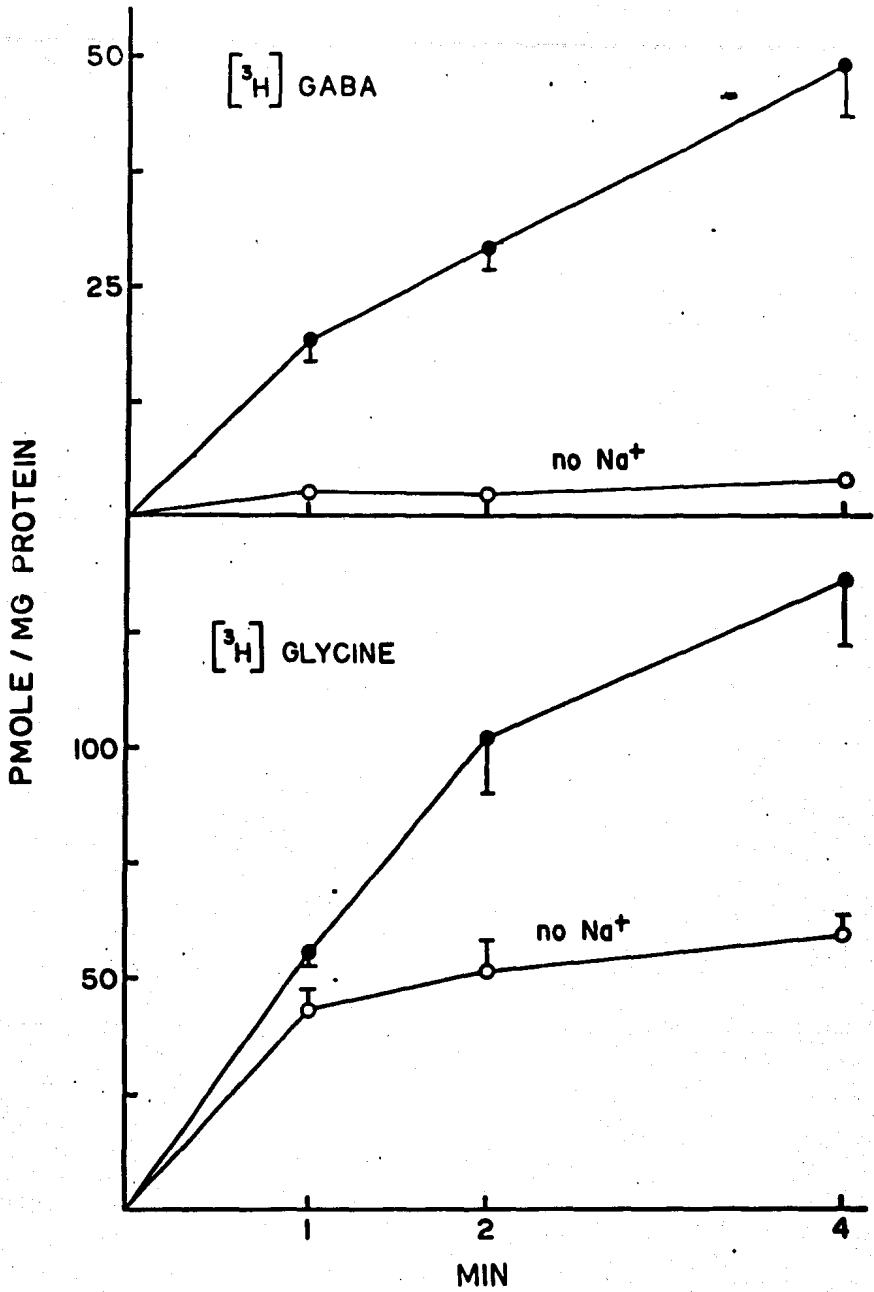


Fig. 1

PMOLE / MG PROTEIN

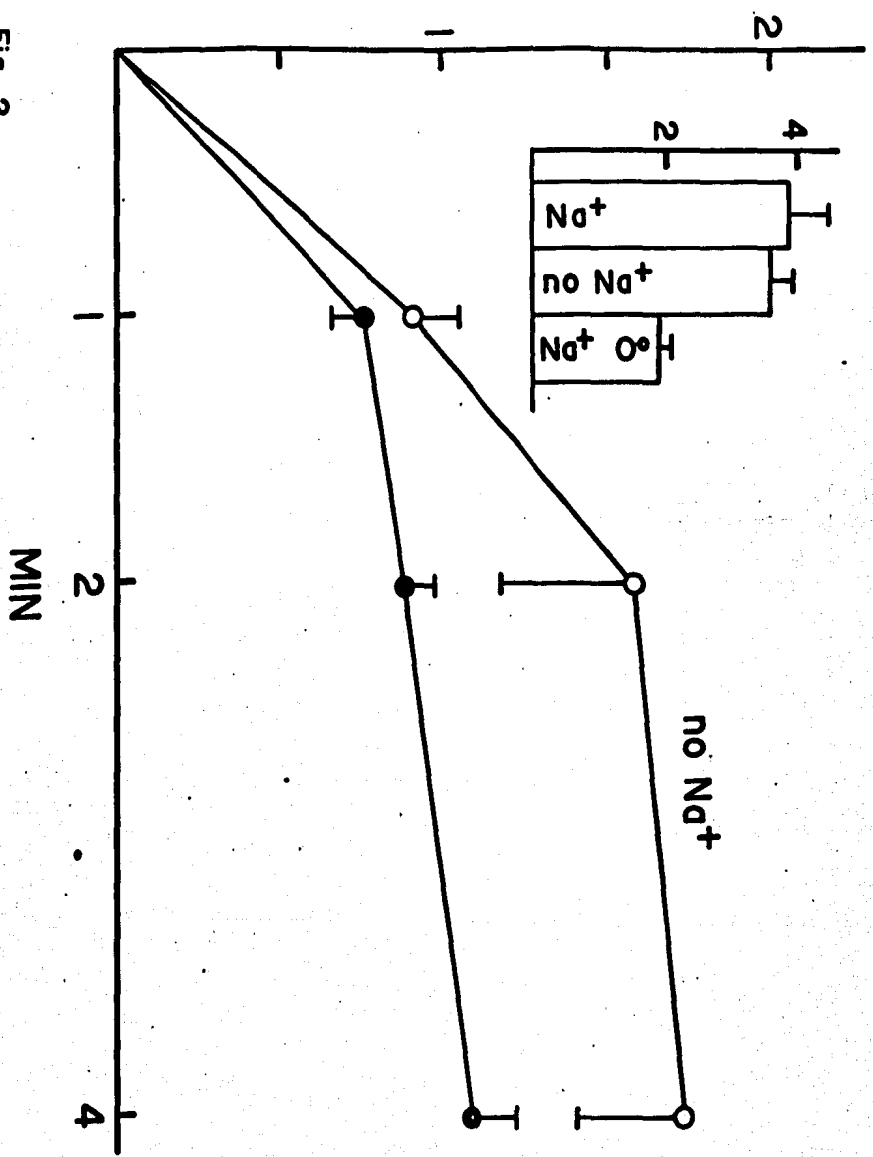


Fig. 2

MIN

no Na<sup>+</sup>



PMOLE / MG PROTEIN

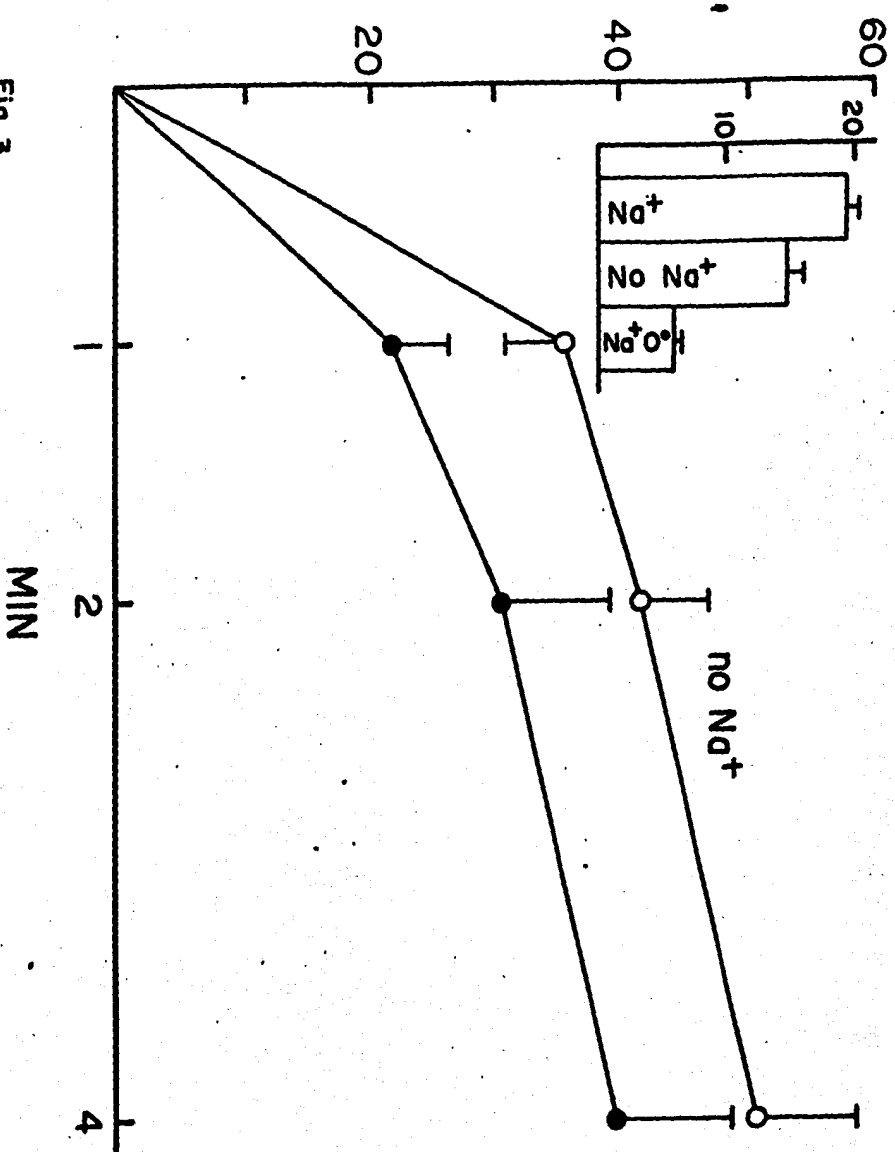


Fig. 3

MIN

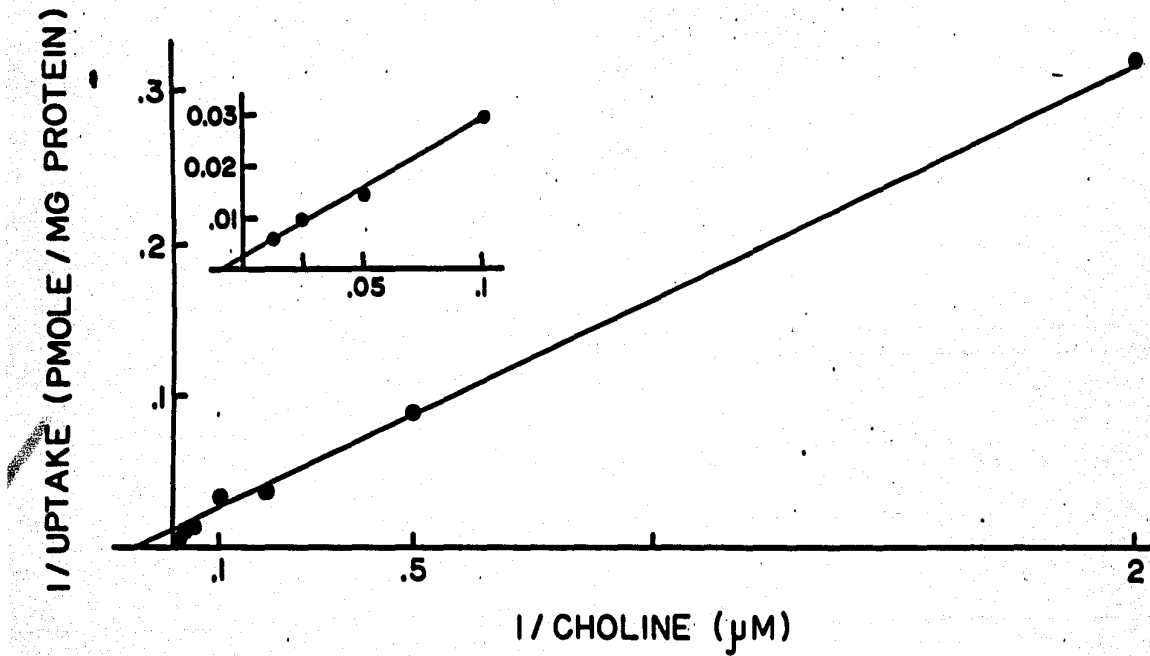


Fig. 4

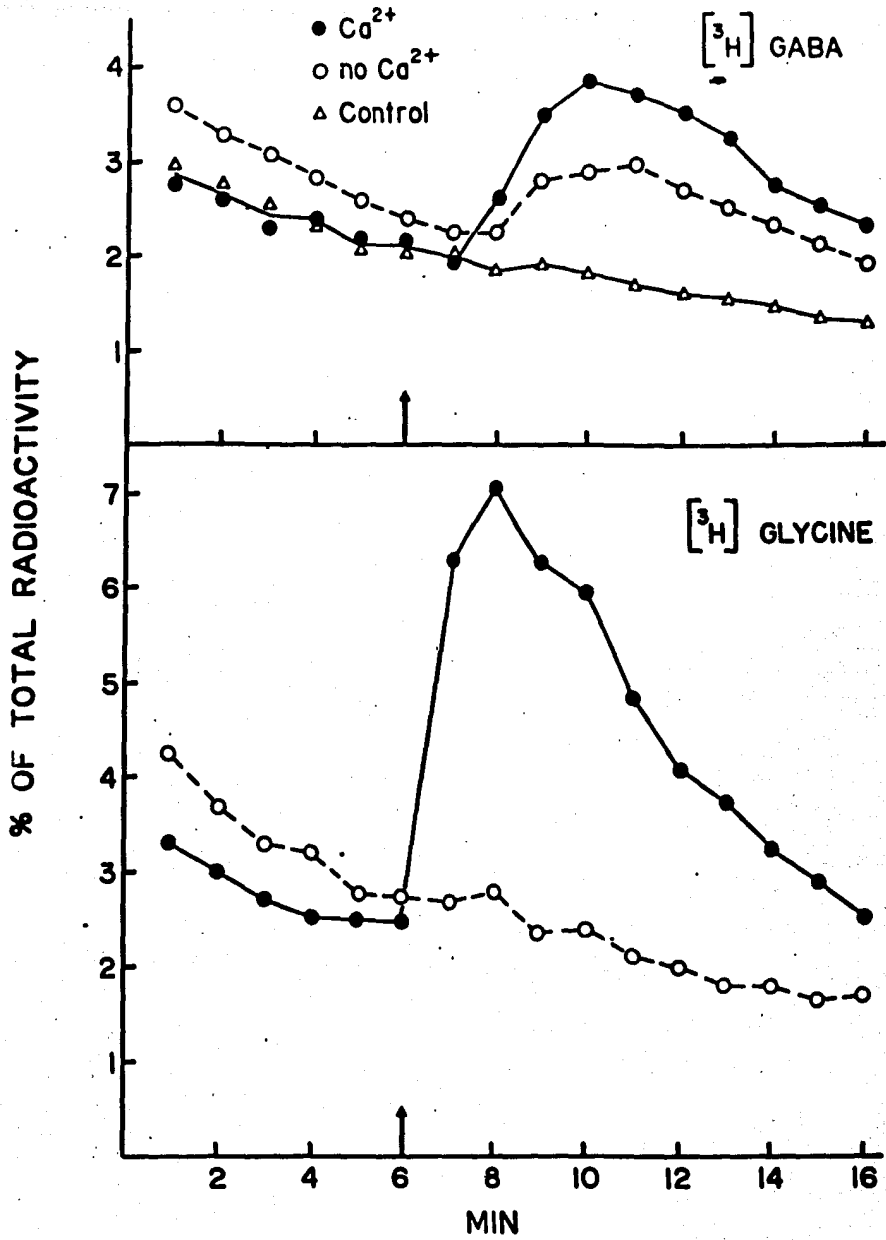
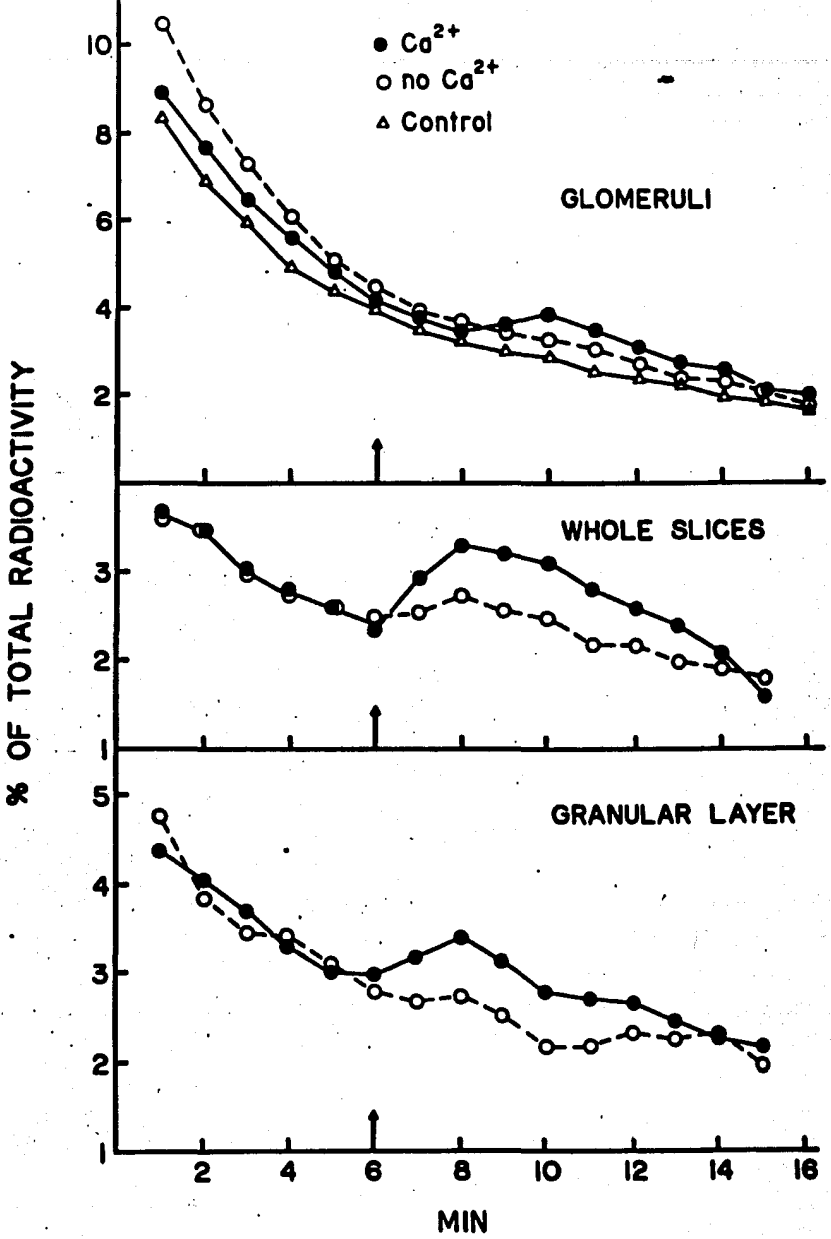
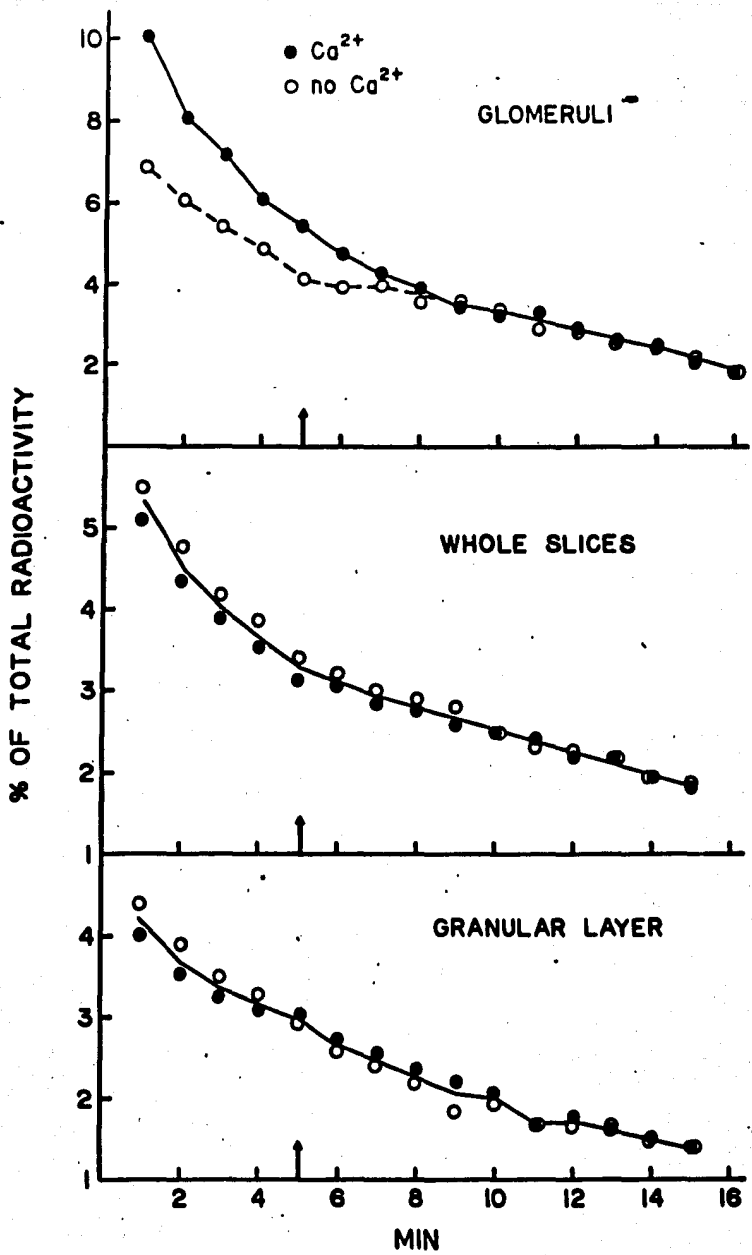


Fig. 5



**Fig. 6**



**Fig. 7**

Figure legends:

Fig. 1. Uptake of labeled GABA and glycine by isolated glomerulus particles in the presence (118 mM) and absence of  $\text{Na}^+$ . Mean values of 11 experiments for GABA and 6 for glycine  $\pm$  SEM.

Fig. 2. Uptake of  $^3\text{H}$  serotonin by isolated glomerulus particles, and by slices of the granular layer (inset) in the presence (118 mM) and absence of  $\text{Na}^+$ . The uptake by the slices at  $0^\circ\text{C}$  in the presence of  $\text{Na}^+$  is also shown. Mean values of 5 experiments  $\pm$  SEM

Fig. 3. Uptake of  $^3\text{H}$  choline by isolated glomerulus particles and by slices of the granular layer (inset), in the presence (118 mM) and absence of  $\text{Na}^+$ . The uptake by the slices at  $0^\circ\text{C}$  is also shown. Mean values of 6 experiments for the glomeruli and 5 for the slices  $\pm$  SEM.

Fig. 4. Double reciprocal plot of  $^3\text{H}$  choline uptake by isolated glomerulus particles in the presence of 118 mM  $\text{Na}^+$ . Glomerulus particles were incubated for 4 min with different concentrations of choline. The low affinity component is amplified in the inset.  $K_m$  and  $V_{max}$  values obtained from this plot are given in the text. Each point is the mean value of 10 experiments.

Fig. 5. Release of labeled GABA and glycine from glomerulus particles in the presence (2.5 mM) and absence (with 0.1 mM EGTA) of  $\text{Ca}^{2+}$ . After loading the particles with the amino acid they were washed and superfused as described in Methods. At 6 min (arrow) the superfusion medium was substituted by a depolarizing medium containing 47 mM  $\text{K}^+$ . The control curve of the upper panel

refers to the operation of changing the normal medium (4.7 mM K<sup>+</sup>) for the same one. Mean values of 9 experiments for GABA and 6 experiments for glycine. The maximum SEM was 13% of the corresponding mean, but for most points it was smaller than 10%.

Fig. 6. Release of <sup>3</sup>H serotonin from isolated glomerulus particles (glomeruli), from slices of the cerebellar vermis (whole slices) and from slices of the granular layer, in the presence and absence of Ca<sup>2+</sup>. Details as for Fig. 5. Mean values of 6 experiments for the glomeruli, 10 for the whole slices and 5 for the granular layer. The corresponding mean, but for most points it was smaller than 8%.

Fig. 7. Release of radioactivity from isolated glomerulus particles and from cerebellar slices, as described in Fig. 6 after loading with <sup>3</sup>H choline. As indicated in the text, more than 85% of the radioactivity released corresponded to choline. Mean values of 5 experiments for the glomeruli, 8 for the whole slices and 6 for the granular layer. The maximum SEM was 11% of the corresponding men, but for most points it was smaller than 8%.

## APENDICE DE RESULTADOS

Se describen en esta sección los resultados que no están ampliamente explicados en el artículo de publicación, así como otros experimentos que no están mencionados como son los de captura de colina en rebanadas de vermis con inhibidores.

### Captura de colina por sinaptosomas de cerebro de ratón

En la figura 1 se observa que la captura de colina en sinaptosomas de cerebro de ratón es dependiente de la presencia de  $\text{Na}^+$  en el medio de incubación, en condiciones experimentales similares a las de los experimentos con glomérulos. Cualitativamente, la diferencia más notable entre los glomérulos y los sinaptosomas, es la ausencia de dependencia al sodio en la captura de colina por parte de los glomérulos aislados.

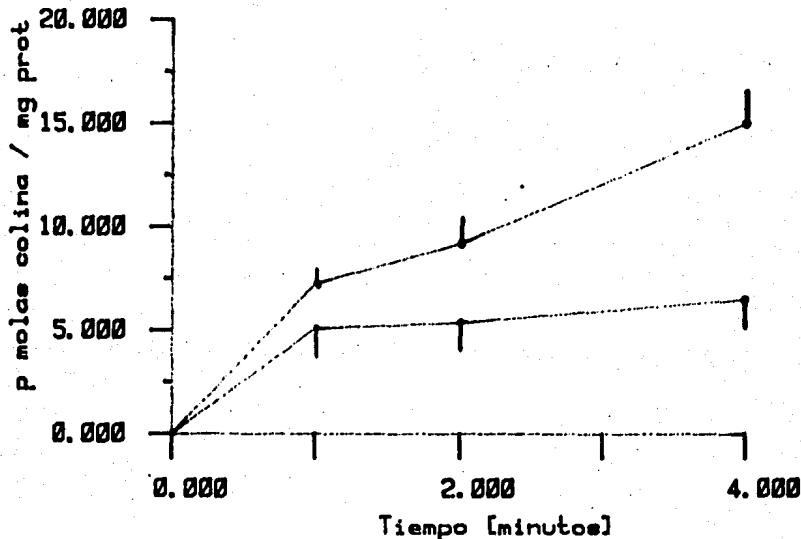


Fig. 1. Captación de colina en sinaptosomas aislados de cerebro de ratón, incubando la fracción sinaptosomal en un medio con o sin  $\text{Na}^+$ , con  $^3\text{H}$ -colina 0.5  $\mu\text{M}$ . Los puntos representan el promedio  $\pm$  E.S. de 3 experimentos.



Captación de colina en rebanadas de vermis sin capa molecular; efecto de algunos inhibidores.

Puesto que la captura de colina en rebanadas de vermis resultó disminuida ligeramente en ausencia de  $\text{Na}^+$  (inserto de la figura 2 del artículo anexo), era interesante probar si dicha captura era también sensible a inhibidores específicos. Como se observa en la figura 2, el efecto del hemicolinio-3, un inhibidor del transporte de alta afinidad de colina, es de inhibición de un 37% respecto del control, así como también se observó inhibición con el ionóforo de sodio monensina, y con la ouabaina, un inhibidor de la ATPasa de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ . Como en los experimentos del inserto de la figura 2 (manuscrito), se comprobó que el sistema de captura es fuertemente dependiente de temperatura.

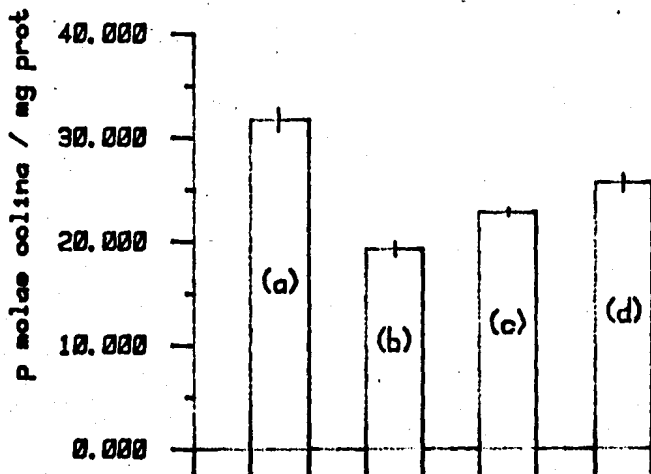


Fig. 2. Efecto de algunos inhibidores sobre el transporte de colina en rebanadas de vermis sin capa molecular. Incubando las rebanadas durante 10 minutos en presencia de (b) hemicolinio 100  $\mu\text{M}$ , (c) monensina 10  $\mu\text{M}$ , y (d) ouabaina 100  $\mu\text{M}$ ; (a) es la captación control. Promedio + E.S. de 5 experimentos.

### Determinación de acetilcolina en las rebanadas de vermis

Estos experimentos se realizaron con el fin de saber qué proporción de la marca radioactiva colectada en los experimentos de liberación era acetilcolina y cuanto era colina, después de incubar con ésta última como precursor, ya que las terminales nerviosas no captan acetilcolina. Estos resultados se muestran en la figura 3, calculados como el porcentaje de colina y acetilcolina. Como se observa, el porcentaje de acetilcolina formada fue muy pequeña, y esta no aumentó de manera importante después de aplicar el potasio 47 mM como despolarizante (a), y aunque parece haber un aumento en el segundo periodo de colecta después de la despolarización, esto no se observó nunca como una estimulación de la liberación ni en glomérulos aislados ni en rebanadas.

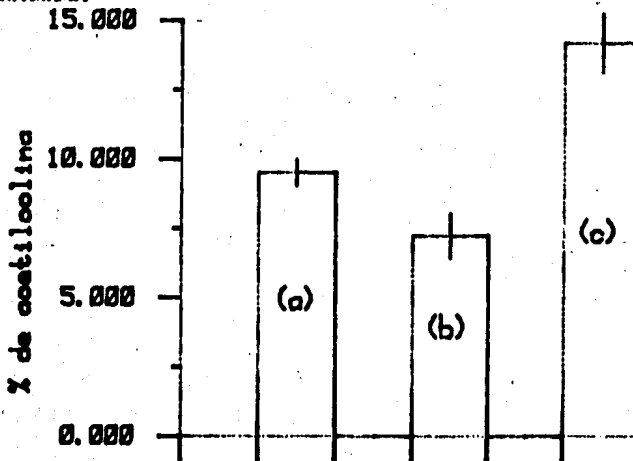


Fig. 3. Determinación de acetilcolina en rebanadas de vermis sin capa molecular. Se hicieron experimentos de liberación y se colectaron muestras de 3 minutos de (a): liberación basal, (b): 3 minutos después de aplicar el despolarizante (K<sup>+</sup> 47 mM), y (c), los siguientes 3 minutos a (b). Resultados en porcentaje de acetilcolina, respecto del total de radioactividad liberada. Promedio + S.E. de 5 experimentos.

Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa en los glomérulos aislados.

Para medir el posible daño tisular de la fracción glomerular, se midió la actividad de la lactato deshidrogenasa en los sobrenadantes de glomérulos incubados en un medio Krebs/Tris después de incubar hasta 40 minutos. Los resultados se muestran en la figura 4, donde solo se observa un pequeño aumento en la actividad de LDH después de los primeros minutos de incubación y posteriormente se mantiene constante.

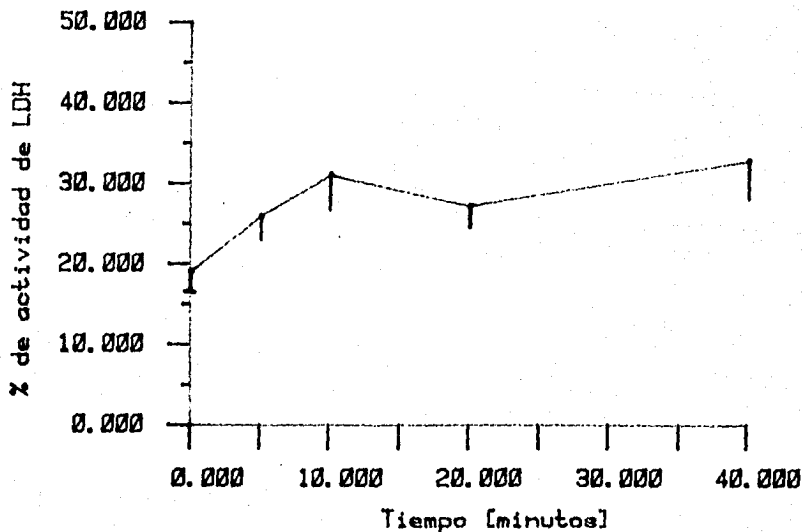


Fig.4. Determinación de la actividad de LDH en glomérulos aislados. Las fracciones de glomérulos se incubaron durante 5, 10, 20 y 40 minutos. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se centrifugaron y se midió la actividad de LDH en el sobrenadante y sedimento obtenidos. Los resultados se muestran como % de actividad en el sobrenadante, respecto del 100% (sobrenadante + sedimento). Promedio + E.S. de 5 experimentos.

## Microscopía electrónica y óptica

Se hicieron algunos ensayos para determinar la pureza de las preparaciones empleadas en los experimentos por lo que se muestran aspectos de los muestreos realizados. En la figura 5(a) se muestra una micrografía electrónica de glomérulos aislados donde se puede ver claramente a los elementos de la estructura reconocibles como terminales musgosas. En (b), microscopía óptica de una rebanada de vermis sin capa molecular, donde se puede observar que la capa molecular fué retirada casi completamente, quedando solo la capa granular, con lo que se puede afirmar que los experimentos de captura y liberación en que se emplearon estas rebanadas, se hicieron con una preparación que contenía principalmente la zona de las terminales musgosas. Finalmente en (c) se muestra el aspecto de las partículas glomerulares con iluminación Nomarski.

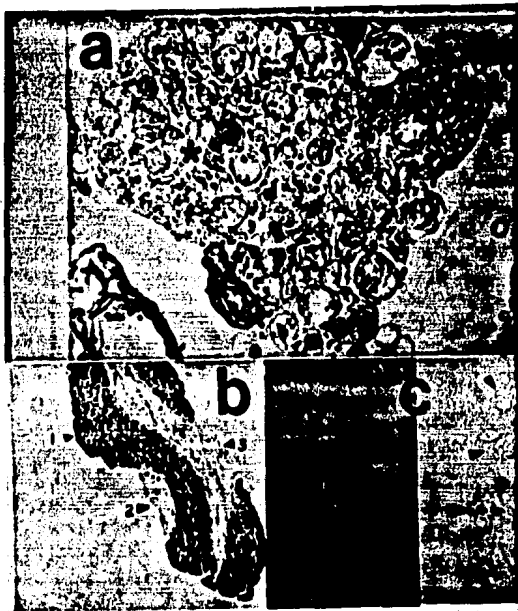


Fig. 5. a) Micrografía electrónica de una partícula glomerular; los asteriscos señalan dos terminales musgosas. b) Rebanada de capa granular obtenida después de disecar la capa molecular; 1) capa granular, 2) resto de capa molecular 3) materia blanca. c) Dos aspectos (bajo y alto aumento) de las partículas glomerulares con iluminación Nomarski.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

### Captación y liberación de GABA y glicina

De los resultados que aquí se exponen, es posible concluir de manera general que el cerebelo, apesar de ser una estructura relativamente simple en cuanto a la citoarquitectura de sus tipos neuronales ea muy complicada en cuanto a sus posibles neurotransmisores, aún si estos se estudian en estructuras de relativamente pocos elementos neuronales. Como se observa en la figura 1, la captación que los glomérulos hacen de GABA y glicina es en ambos casos dependiente de la presencia de sodio en el medio de incubación. De manera particular el GABA muestra tener una grán dependencia al sodio, pues como se observa en dicha figura, en un medio sin  $\text{Na}^+$  se alcanza una inhibición de hasta un 70%. Como se ha propuesto por muchos investigadores, las terminales sinápticas tienen un sistema de transporte de alta afinidad de moléculas transmisoras que es particular de esas estructuras. En los glomérulos aislados, este tipo de transporte está presente para el GABA y la glicina.

Sin embargo, tal vez un dato más concluyente lo representa la posibilidad de demostrar que los compuestos propuestos como neurotransmisores se puedan liberar de las presinapsis. A este respecto, en la figura 5 se observa que tanto el GABA como la glicina se liberan de la preparación de glomérulos por despolarización de  $\text{KCl}$  47 mM, en una forma dependiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aunque no se conoce en detalle el mecanismo de liberación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , éste fenómeno se ha observado en

menor o mayor grado para todas las sustancias neuroactivas. Por lo anterior, la demostración de que el GABA y la glicina se liberan de terminales sinápticas, las de un tipo encontradas en el glómulo en este caso, constituye un punto importante en favor del papel de estos compuestos como transmisores.

Por otras metodologías, se ha demostrado que el GABA puede ser el transmisor de las terminales axónicas de Golgi. Así, la presencia de GAD en estas células (McLaughlin et al, 1974) y la captura específica de GABA radioactivo que las mencionadas terminales realizan en los glómulos aislados (Wilkin et al, 1981) parece coincidir plenamente con los resultados de captura y liberación que aquí se presentan. Para la glicina se tienen menos datos acerca de su posible papel transmisor en el cerebelo. Como se mencionó en la introducción, la glicina no tiene una distribución que indique alguna función en especial, como sucede con otros compuestos, ya que se distribuye uniformemente en la corteza cerebelosa. Sin embargo, la especificidad de función no depende sólo de un parámetro, como sería el de captación en este caso. Otro indicio en favor de un papel neurotransmisor de la glicina en el cerebelo está dado por la presencia de receptores específicos en la zona granular del cerebelo, tal como lo demostraron Wilkin y colaboradores, (1981) midiendo la unión de estriknina, aunque este ligando no fué desplazado por glicina.

Por otro lado, aún la ausencia de receptores sensibles a estriknina (un compuesto específico para receptores glicinérgicos), no demostraría tampoco la ausencia de actividad transmisora de la glicina, pues siempre cabe la posibilidad de que los receptores del cerebelo no fueran sensibles a la

estricnina (ver las referencias sobre este punto en el manuscrito de publicación). Es por esto que el criterio de liberación es muy importante para la glicina en los glomérulos aislados, pues aunado a las evidencias de que en esa zona del cerebelo se encuentran los receptores específicos y un sistema de captura de alta afinidad, la demostración de que el compuesto es liberable aumenta enormemente la evidencia en favor de una función transmisora de la glicina. Tanto para el GABA como para la glicina, las evidencias acerca de la sinapsis específica en los glomérulos, donde ambos compuestos se acumulan selectivamente, y por tanto a partir de las cuales se podría liberar, es sobre la base de los datos de autorradiografía (Wilkin et al, 1981), y estas sinapsis son las de los axones de las neuronas Golgi. Por lo anterior, es posible que la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA y  $^3\text{H}$ -glicina de los datos que aquí se presentan, provenga de las mencionadas sinapsis.

#### Captura y liberación de serotonina

Puesto que se ha encontrado 5-HT en las rosetas glomerulares, los experimentos que aquí se hicieron tuvieron la intención de probar si el compuesto es liberable de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y captado de manera dependiente de  $\text{Na}^+$ . Como se puede observar en la figura 2, los glomérulos captan una pequeña cantidad de 5-HT y no se observa ninguna dependencia al  $\text{Na}^+$ ; tampoco se observó dependencia alguna cuando se hizo el ensayo de captura en las rebanadas de vermis sin capa molecular, aunque la incubación a  $4^{\circ}\text{C}$  en este tipo de rebanadas revela que el sistema es afectado por la temperatura, como se ha descrito para los sistemas de alta

afinidad. Las gráficas de liberación de  $^3\text{H}$ -5-HT, muestran que hay una pequeña liberación cuando el ensayo se hace en los glomérulos aislados, y el efecto se aumenta cuando se emplean rebanadas completas o sin capa molecular (fig. 6). Es probable que este mejor efecto visto con las rebanadas de vermis se deba a que se tiene una mayor integridad del tejido, ya que comparativamente a el tiempo de aislamiento de los glomérulos, el de las rebanadas es pequeño. Como se dijo con anterioridad, la 5-HT tiene un efecto ambiguo cuando se aplica en algunos elementos de la corteza del cerebelo como son las células de Purkinje. Sin embargo, específicamente en las neuronas granulares produce una excitación (Bloom et al, 1972). Lo anterior quiere decir que la 5-HT tiene por si sola un efecto, y como éste es de excitación sobre las neuronas granulares, es posible postularlo como transmisor de las terminales musgosas, pues éste es el tipo de efecto fisiológico que las fibras musgosas producen. Un aspecto importante que se debe recalcar es que no todas las rosetas musgosas captan 5-HT, lo cual indica que no es suficiente el criterio morfológico para considerar que todas posean el mismo neurotransmisor. Esta afirmación puede explicar la gran diversidad de compuestos neuroactivos que se han encontrado en las terminales musgosas. Así, los experimentos de captura y liberación que aquí se muestran parecen confirmar que hay una población de terminales musgosas que usan a la 5-HT como neurotransmisor.

Por otro lado, no debe sorprender el hecho de que solo una población determinada de terminales musgosas usen serotonina como



transmisor, ya que provienen de somas localizados de más de un sitio, y esto posiblemente esta es la explicación de que en las terminales musgosas se hayan encontrado varias sustancias neuroactivas. Es también posible que estas sustancias actúen como neuromoduladores y no como transmisores en el sentido estricto del concepto.

La acetilcolina no parece ser un neurotransmisor de las terminales musgosas.

Como se dijo anteriormente, el cerebelo tiene, respecto a la acetilcolina, un patrón diferente en relación a otros sitios del SNC. Así, el contenido de acetilcolina durante las primeras fases después del nacimiento es mayor que cuando las redes neurales se han formado completamente (Kása et al, 1982; Yavin y Harel, 1979). Las concentraciones finales que hay de acetilcolina en el cerebelo adulto son muy pequeñas. Por otro lado, la presencia de CAT es baja y restringida mayormente a los lóbulos IX y X, lugar donde también Kása y colaboradores han detectado la presencia de un sistema de captura de alta afinidad. mientras que la de la ACE es mayor y de una distribución uniforme en todas las capas del cerebelo. Resulta más útil como marcador de una probable vía colinérgica la presencia de la CAT pues esta es la encargada de realizar la síntesis. También se mencionó que las terminales musgosas de algunas especies parecen tener un alto contenido de acetilcolina (Israel y Whittaker, 1965) y las partículas glomérulares contienen algo de CAT (Tapia et al, 1974), la cual podría pensarse que se encuentra en las terminales musgosas. Con estos elementos podría esperarse que, análogamente

a lo que sucede en los sinaptosomas convencionales, la captura de colina por los glomérulos resultaría en la síntesis (y liberación) de acetilcolina. Sin embargo, como lo muestran los resultados de este trabajo, ni en glomérulos aislados ni en rebanadas de vermis completas o sin capa molecular se observó estimulación en la liberación (fig. 7). Si se compara la captura de colina en sinaptosomas convencionales y en glomérulos, en los primeros es claramente dependiente de  $\text{Na}^+$ , mientras en glomérulos no se observó esta dependencia, y solo ligeramente cuando se midió en rebanadas de vermis. Otros experimentos demostraron que esta salida de radioactividad de las preparaciones de cerebelo empleadas, es principalmente  $^3\text{H}$ -colina y solo una pequeña proporción de acetilcolina (fig. 3 del anexo).

Es posible que la cantidad de acetilcolina que tenga una función transmisora pudiera ser muy pequeña y por tanto no detectable con la metodología que aquí se emplea. Sin embargo, registros electrofisiológicos realizados en rebanadas de vermis de los lobulos IX y X, midiendo los efectos de antagonistas de la acetilcolina sobre los potenciales de inhibición y excitación que se producen sobre las células de Purkinje indican también que la inervación colinérgica es mínima (Crepel y Dhanjal, 1982). En conjunto, nuestros resultados tampoco apoyan que la acetilcolina se use ampliamente como transmisor en las terminales musgosas, aunque, como lo sugieren las gráficas de cinética y de captura en rebanadas de vermis en presencia de inhibidores, existe un sistema de transporte de alta afinidad para la colina.

En conclusión, el glomérulo cerebeloso es un modelo que permite la experimentación de algunas sustancias con actividad

neurotransmisora, de las cuales el GABA y la glicina parecen ser asignadas a las terminales axónicas de Golgi, la serotonina probablemente a ciertas terminales musgosas, mientras que para la acetilcolina aún está dudosa su participación como transmisor. La posible participación de la glicina y el GABA como transmisores de un tipo de terminales morfológicamente semejante, o la presencia de diferentes compuestos neuroactivos en la terminal musgosa hacen notar que la corteza del cerebelo es muy estereotipada en cuanto a los circuitos neuronales que presenta, pero heterogénea en los transmisores de éstos circuitos. El modelo de los glomérulos aislados puede ser explorado a otro nivel para dar mayor información, y uno de estos niveles puede ser el interior de la terminal musgosa, pues como se dijo tiene un alto contenido de vesículas sinápticas y mitocondrias, y ambos elementos que pueden tener relación con la transmisión nerviosa de esta sinapsis.

\*\*\*\*\*

\*\*\*\*\*

## BIBLIOGRAFIA

Aprison, M.H. and McBride, W.J., Evidence for the net accumulation of glycine into a synaptosomal fraction isolated from the telencephalon and spinal cord of the rat., *Life Sci.*, 12 (1973) 449-458

Beaudet, A. and Sotelo, C., Synaptic remodeling of serotonin axon terminals in rat agranular cerebellum., *Brain Research*, 206 (1981) 305-329

Beas-Zarate, C., Sandoval, M.E. and Feria-Velazco, A., Serotonin uptake and release from rat cerebellum in vitro., *J. Neurochem. Res.*, 12 (1984) 129-136

Bisti, S., Iosif, G., and Strata, P., Suppression of inhibition in the cerebellar cortex by picrotoxin and bicuculline., *Brain Research*, 28 (1971) 591-593

Blaustein, M.P., Effects of potassium, veratridine, and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals., *J. Physiol. (Lond.)* 247 (1975) 617-655

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

Bogdanski, D.F., Blaszkowski, T.P. and Tissari, A.H., Mechanisms of biogenic amines transport and storage. IV Relationship between  $K^+$  and  $Na^+$  requirement for transport and storage of 5-hydroxytryptamine and norepinephrine in synaptosomes., *Biochim. Biophys. Acta*, 211 (1970) 475-505

Bradford, H.F., Isolated nerve terminals as an in vitro preparation for the study of dynamic aspects of transmitter metabolism and release., En Iversen, L.L., Iversen, S.D. and Snyder, S. (Eds.), *Handbook of Psychopharmacology*, Plenum, New York, 1975, p. 191-252

Bullock, T.H., Orkand, R. and Grinnell, A., Microanatomy of nervous elements. En Introduction to nervous system, Kennedy, D. editor, W.H. Freeman and Co. Sn. Francisco, U.S.A.

Chan-Palay, V., Fine structure of labelled axons in the cerebellar cortex and nuclei of rodents and primates after intraventricular infusions with tritiated serotonin., *Anat. Embryol.*, 148 (1975) 235-265

Chan-Palay, V., Palay, S.L. and Wu, J.-Y., Gamma-aminobutyric acid pathways in the cerebellum studied by retrograde and anterograde transport of glutamic acid decarboxylase antibody after in vivo injections., *Anat. Embryol.*, 157 (1979) 1-14

Covarrubias, M. and Tapia, R., A procedure for detecting changes in the internal  $Ca^{2+}$  concentrations in isolated nerve endings using the metallochromic dye arsenazo III., *Neuroscience*, 7 (1982) 1641-1646

Crawford, J.M., Curtis, D.R., Voorhoeve, P.E. and Wilson, V.J., Excitation of cerebellar neurons by acetylcholine., *Nature*, 200 (1963) 579-580

Crepel, F. and Dhanjal, S.S., Cholinergic mechanisms and neurotransmission in the cerebellum of the rat. An in vitro study., *Brain Research*, 244 (1982) 59-68

Curtis, D.R., Hosli, L., Johnston, A.R. and Johnston, I.H., The hyperpolarization of spinal motoneurons by glycine and related amino acids., *Exp. Brain Res.*, 5 (1968) 235-258

De Marchi, W.J. and Johnston, G.A.R., The oxidation of glycine by D-amino acid oxidase in extracts of mammalian central nervous tissue., *J. Neurochem.*, 16 (1969) 335-361

Desclin, J.C. and Colin, F., The olivocerebellar system. II. Some ultrastructural correlates of inferior olive destruction in the rat., *Brain Research*, 187 (1980) 29-46

Dry, A., Gonye, T.J. and Oakley N.R., Caudate stimulation and substantia nigra activity in the rat., *J. Physiol. (Lond.)*, 259 (1976) 825

Eccles, J.C., Ito, M. and Szentágothai, G., 1967, *The cerebellum as a neuronal machine*, Springer-Verlag, Berlin

Fonnum, F., Storm-Mathisen, J. and Walberg, F., Glutamate decarboxylase in inhibitory neurons: A study of the enzyme in Purkinje cell axons and boutons in the cat., *Brain Research*, 20 (1970) 257-275

Goldberg, A.M. and McCaman, R.E., A quantitative microchemical study of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in the cerebellum of several species., *Life Sci.*, 6 (1970) 1493-1500

Hajós, F., Wilkin, G., Wilson, J. and Balázs, R., A rapid procedure for obtaining a preparation of large fragments of the cerebellar glomeruli in high purity., *J. Neurochem.*, 27 (1975) 267-272

Hajós, F., An improved method for the preparation of synaptosomal fraction in high purity., *Brain Research*, 93 (1975) 465-489

Hajós, F., Tapia, R., Johnson, A.L. and Balázs, R., Subcellular fractionation of rat cerebellum: An electron microscopic and biochemical investigation. I. Preservation of large fragments of the cerebellar glomeruli., *Brain Research*, 70 (1974) 261-279

Hamberger, A., Hanson, H.-A., Lazarewicz, J.W., Lundh, T. and Sellstrom, A., The cerebellar glomerulus: Isolation and metabolic properties of a purified fraction., *J. Neurochem.*, 27 (1976) 267-272

Henke, H. and Cuénod, N., Uptake of L-alanina, glycine and L-serine in the pigeon central nervous system., *Brain Research*, 152 (1978) 105-119

Hokfelt, T. and Fuxe, K., Cerebellar monoamine nerve terminals, a new type of afferent fibers to the cortex cerebellii., *Brain Research*, 9 (1969) 63-72

Ito, M., *The cerebellum and control neural.*, Raven Press, (1984), New York

Israel, M. and Whittaker, V.P., The isolation of mossy fibre endings from the granular layer of the cerebellar cortex., *Experientia*, 21 (1965) 325-326

Israel, M., Lesbats, B., Morel, N., Manaranche, R., Gulik-Krzywicki, T. and Dedieu, J.C., Reconstitution of a functional synaptosomal membrane possessing the protein constituents involved acetylcholine translocation., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) 277-281

James, T.A. and Starr, M.S., Is glycine an inhibitory synaptic transmitter in the substantia nigra?., *European J. Pharmacol.*, 57 (1979) 115-125

Kan, K.-S.K., Chao, L.P. and Eng, L.F., Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in rabbit spinal cord and cerebellum., *Brain Research*, 146 (1978) 221-229

Kan, K.-S.K., Chao, L.P. and Forno, L.S., Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in the human cerebellum., *Brain Research*, 193 (1980) 165-171

Kása, P. and Silver, A., The correlation between choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activity in different areas of the cerebellum of rat and guinea pig., *J. Neurochem.*, 16 (1969) 389-396

Kása, P., Electron histochemical evidence of different types of mossy fibre endings in the cerebellar cortex., *Experientia*, 15 (1969) 740-741

Kása, P., Bánsághy, K., Rakonczay, Z. and Gulya, K., Postnatal development of the acetylcholine system in different parts of the rat cerebellum., *J. Neurochem.*, 39 (1982) 1726-1732

Katz, B. and Miledi, R., The timing of calcium action during neuromuscular transmission., *J. Physiol. (Lond.)*, 189 (1967) 535-544

Kawanura, H. and Provini, L., Depression of cerebellar Purkinje cells by microiontophoretic application of GABA and related amino acids., *Brain Research*, 24 (1970) 293-304

Kingsbury, A.E., Wilkin, G.P., Patel, A.J. and Balázs, R., Distribution of GABA receptors in the rat cerebellum., *J. Neurochem.*, 35 (1980) 739-742

Korte, G.E., Reiner, A. and Karten, H.J., Substance P-like immunoreactivity in cerebellar mossy fibers and terminals in the red-eared turtle *Chrysemys scripta elegans*., *Neuroscience*, 5 (1980) 903-914

Kuffler, S.W. and Nicholls, J.G., Ionic basis of resting and action potentials., *En From neuron to brain*, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Massachusetts, U.S.A.

Kuhar, M.J., Aghajanian, G.K. and Roth, R.H., Tryptophan hydroxylase activity and synaptosomal uptake of serotonin in discrete brain regions after midbrain raphe lesions: Correlation with serotonin levels and histochemical fluorescence., *Brain Research*, 44 (1972) 165-176

Kuhar, M.J. and Zarbin, M.A., Synaptosomal transport: A chloride dependence for choline, GABA, glycine and several other compounds., *J. Neurochem.*, 31 (1978) 251-256

Levi, G., Gordon, R.D. Gallo, V., Wilkin, G.P. and Balázs, R., Putative acidic amino acid transmitters in the cerebellum I. Depolarization-induced release., *Brain Research*, 239 (1982) 425-445

Llinás, R., Steinberg, I.G. and Walton, K., Presynaptic calcium currents and their relation to synaptic transmission: Voltage clamp study in squid giant synapse and theoretical model for calcium gate., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73 (1976) 2918-2922

Logan, W.J. and Snyder, A.H., High affinity uptake system for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissue., *Brain Research*, 42 (1972) 413-431

McLaughlin, B.J., Wood, J.G., Saito, K., Barber, R., Vaughn, J.E., Roberts, E. and Wu, J.-E., The fine structural localisation of glutamate decarboxylase in synaptic terminals of rodent cerebellum., *Brain Research*, 76 (1974) 377-391

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Miledi, R., Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals., Proc. R. Soc. Lond. B., 183 (1973) 421-425

Mulder, A.H. and Snyder, S.H., Potassium-induced release of amino acids from cerebral cortex and spinal cord slices of the rat., Brain Research, 76 (1974) 297-308

Muller, W.S. and Snyder, S.H., Glycine high affinity uptake and strychnine binding associated with glycine receptors in the frog central nervous system., Brain Research, 143 (1978) 487-498

Nadi, N.S., McBride, W.J. and Aprison, M.H., Distribution of several amino acids in regions of the cerebellum of the rat., J. Neurochem., 28 (1977) 453-455

Obata, K., Ito, M., Ochi, R. and Sato, N., Pharmacological properties of the postsynaptic inhibition by Purkinje cell axons and the action of  $\gamma$ -aminobutyric acid in Deiters neurones., Exp. Brain Res., 4 (1967) 43-57

Oertel, W.H., Schmechel, D.E., Mugnaini, E., Tappaz, M.L. and Kopin, I.J., Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat cerebellum with a new antiserum., Neuroscience, 6 (1981) 2715-2735

Rea, M.A., McBride, W.J. and Rohde, B.H., Regional and synaptosomal levels of amino acid neurotransmitters in the 3-acetylpyridine deafferented rat cerebellum., J. Neurochem., 34 (1980) 1106-1108

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

Schulman, J.A., Finger, T.E., Brecha, N.C. and Karten, H.J., Enkephalin immunoreactivity in Golgi cells and mossy fibres of mammalian, avian, amphibian and teleost cerebellum., Neuroscience, 6 (1981) 2407-2416

Simon, J.R. and Kuhar, M.J., High affinity choline uptake: Ionic and energy requirements., J. Neurochem., 27 (1976) 93-99

Snyder, S.H., Logan, W.J., Bennett, J.P. and Arregui, A., Amino acids as central nervous transmitters: Biochemical studies., En Neurosciences Research, vol. 5, pp 131-151, Academic Press, New York and London.

Sotelo, C., Hillman, D.E., Zamora, A.J. and Llinás, R., Climbing fiber deafferentation: Its action on Purkinje cell dendritic spines., Brain Research, 98 (1975) 574-581



Soleto, G., Pini, A., and Fraga, H., Localization of <sup>3</sup>H-6-aminocaproic acid in the glomeruli of rat cerebellum using electron microscope, radioautography, Brain Research, 45 (1972) 392-398

Srinivasan, V., Neal, H.J. and Mitchell, J.F., The effect of electrical stimulations and high potassium concentrations on the efflux of <sup>3</sup>H-aminobutyric acid from brain slices., J. Neurochem., 31 (1978) 151-157

Swanson, P.D., Anderson, L. and Stahl, W.L., Uptake of calcium by synaptosomes from rat brain., Biochim. Biophys. Acta, 35A (1974) 174-183

Tapia, P., Hajós, F., Wilkin, G., Johnson, A.L. and Balázs, R., Subcellular fractionation of rat cerebellum: An electron microscopic and biochemical investigation. II. Resolution of morphologically characterized fractions., Brain Research, 70 (1974) 285-299

Terrian, D.H., Butcher, M.L., Wu, P.H. and Armstrong, D.L., Isolation of glomeruli from areas of bovine cerebellum and comparison of <sup>3</sup>H-serotonin uptake., Brain Res. Bull., 14 (1985) 469-475

Triller, A., Cluzaud, F., Pfeiffer, F., Datz, H. and Korn, H., Distribution of glycine receptors at central synapses: An immunoelectron microscopy study., J. Cell Biol., 101(1985)603-605

Weimar, M.R. and Hiems, A.H., Hog cerebellar-aminooxidase and its histochemical and immunofluorescent localization., J. Neurochem., 28 (1977) 559-572

Wilkin, G., Wilson, J.E., Balázs, R., Schon, F. and Kelly, J.S., How selective is high affinity uptake of GABA into inhibitory nerve terminals?, Nature, 252 (1974) 397-399

Wilkin, G.P., Csillag, A., Balázs, R., Kinoshita, A.F., Wilson, J.E. and Johnson, A.L., Localization of high affinity <sup>3</sup>H-glycine transport sites in the cerebellar cortex., Brain Research, 216 (1981) 11-33

Wilson, J.E., Wilkin, G.P. and Balázs, R., Metabolic properties of a purified preparation of large fragments of the cerebellar glomeruli: Glucose metabolism and amino acid uptake., Nature (Lond.), 252 (1974) 397-399

Yavin, E. and Harel, S., Muscarinic binding sites in the developing rabbit brain., FEBS Lett., 97 (1979) 154

Yunger, L.H. and Harvey, J.A., Kinetic analysis of <sup>3</sup>H-serotonin accumulation in four regions of rat brain after lesions in the medial forebrain bundle., Life Sci., 19 (1976) 105-116

\*\*\*\*\*