



03062

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LOS
RECEPTORES A AMINOACIDOS EXCITADORES DE
LAS CELULAS DE MULLER, DURANTE LA
DIFERENCIACION EN CULTIVO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
**MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA (NEUROCIENCIAS)**
PRESENTA LA BIOLOGA:
MONICA ROMO DE VIVAR VILLASANA

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I -	ABREVIATURAS.....	3
II -	INTRODUCCION.....	5
1 -	MORFOLOGIA Y CLASIFICACION DE LAS CELULAS GLIALES....	5
a)	Microglia.....	6
b)	Macroglia.....	6
c)	Células relacionadas con los astrocitos.....	8
-	Células endoteliales.....	8
-	Glia de Bergmann.....	8
-	Células de Müller.....	8
2 -	FUNCIONES DE LAS CELULAS GLIALES.....	9
a)	Funciones generales.....	9
b)	Funciones en la retina.....	10
3 -	PLASTICIDAD DE LAS CELULAS GLIALES.....	13
4 -	RECEPTORES EN LAS CELULAS GLIALES Y SUS DIFERENTES funciones.....	14
a)	efectos a largo plazo.....	15
b)	efectos a corto plazo.....	16
5 -	RECEPTORES A AMINOACIDOS EXCITADORES EN EL SNC.....	18
a)	Receptores ionotrópicos.....	19
-	Receptores a NMDA.....	19
-	Receptores a AMPA.....	22
-	Receptores a Kainato.....	22
-	Receptores a APB.....	24
b)	Receptores metabotrópicos.....	24
6 -	RECEPTORES A AMINOACIDOS EXCITADORES EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS.....	29
a)	Estructura de la retina.....	30
III -	OBJETIVO.....	32
IV -	MATERIALES Y METODOS.....	33
V -	RESULTADOS.....	36
-	Cultivos control.....	36
-	Caracterización inmunocitoquímica de los cultivos.....	36
-	Cultivos en presencia de AMP cíclico.....	37
-	Cultivos en presencia de quisqualato y L-glutamato.....	42
-	Efecto de 1% de FCS.....	42
-	Conteo celular y cuantificación de timidina ³ H.....	50
-	Caracterización farmacológica de la unión específica de L-asp- ³ H en células gliales sembradas con 1% 1% de FCS.....	55
-	Curva de saturación para L-asp ³ H en células gliales 1 DIV sembradas en medio con 1 % de suero.....	57

- Curva de saturación para L-asp- ³ H en células gliales 12 DIV sembradas en medio con 1% de suero.....	59
- Efecto del suero inactivado sobre la unión específica de L-asp- ³ H.....	62
- Hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato.....	59
VI - DISCUSION.....	64
VII - BIBLIOGRAFIA.....	75

I - ABREVIATURAS

- ACBC - Acido 1-amino ciclobutano-1-carboxilico.
ACC - 1-amino-ciclopropano-carboxilato.
AMP - Adenosin monofosfato.
AMPA - a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato.
AP4 - Acido 2-amino-4-fosfonobutirico.
AP5 - Acido D ó L-amino-7-fosfonovalérico.
APDA 10 - N-(3-aminopropil)-1,10 diaminodecano.
Asp - Acido aspártico.
BSA - Sero albúmina de bovino.
12-CA - Indol-2-carboxilato.
CGS-19755 - Acido Cis-4-(fosfonometil-2-piperidin carboxilico).
7-Cl-KYN - 7-cloro-quinurenato.
CNQX - L6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-dion.
CPP - 3-(+)-2-carboxipiperazin-4-il-propil-1-fosfonato.
DA 10 - 1,10-diaminodecano
dBu AMPc - Dibutiril AMP cíclico.
t-DGG - t-glutamilglicina.
DIV - Dias "in vitro".
DET - Dietilenetriamina.
Fab - Fragmento de un anticuerpo con unión a antígeno.
FCS - Suero de bovino fetal.
FITC -Isotiocianato de fluoresceína
GDEE - Dietil ester de glutamato.
GFAP - Proteina ácida fibrilar glial.
Glu - Acido glutámico.
Gli - Glicina.

GMPC - Guanosin monofosfato.
HA-966 - 3-amino-hidroxipirrolidona-2.
HM-asp - Hidroxamato del aspártico.
H-MEM - Medio de Dulbecco Eagle modificado con alto bicarbonato.
Homocys - Homocisteato.
IgG - Inmunoglobulina G.
IP2 - Inositol 4,5-difosfato.
IP3 - Inositol 1,4,5-trifosfato.
JST - Joro Spider Toxin.
KA - Kainato.
KYN - Kinurenato.
L-asp - L-aspartato.
L-glu - L-glutamato.
L-MEM - Medio de Dulbecco Eagle modificado con bajo bicarbonato.
NBQX - 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxalina.
MK-801 - (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo (a,d) ciclohepten-
5.10-iminomaleato.
NMDA - N-metil-D-aspartato.
PBS - Solución salina amortiguadora con fosfatos
PCP - Fenilciclidina.
PDA - Piperidin dicarboxilato.
PKC - Proteína cinasa c.
SDS - Dodecil sulfato de sodio.
SNC - Sistema Nervioso Central.
TCP - Tienil ciclohexil piperidina.
Willardina - (1-(2-amino-carboxietil)-uracil.

I- INTRODUCCION

Las células gliales constituyen mas del 50% de volumen total del cerebro (Rank, 1963), aún así se desconocen muchas de sus funciones. Hasta hace poco tiempo se les consideraba elementos no excitables de soporte en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Ran, 1963); recientemente se ha demostrado que las membranas de las células gliales tienen propiedades que no difieren tanto de las neuronales (Barres, 1991). Al igual que las neuronas poseen procesos que salen de sus cuerpos celulares (Whittaker, 1984), receptores a neurotransmisores con características similares a los neuronales (Murphy y Pearce, 1987), y canales iónicos dependientes de voltaje (Barres, 1990); elementos que presentan las células gliales tanto in vivo como in vitro (Barres, 1991 Barres et al, 1990 Clark y Mobbs, 1991). Aunque la glía no pueda generar potenciales de acción debido a la poca densidad de canales de Na^+ sensibles a voltaje (Barres et al, 1990 Sontheimer et al 1992) y al potencial de reposo que es mucho mas electronegativo que el de las neuronas (-90 mV) (Kuffler y Nichols, 1977), no se les puede considerar elementos inexcitables del SNC, sino células que poseen una forma particular de comunicarse con otras células gliales o con las neuronas (Barres, 1990). Ya que no está claro el papel de las células gliales en la transmisión, es indispensable su estudio para comprender mejor su funcionamiento en el SNC.

1 - MORFOLOGIA Y CLASIFICACION DE LAS CELULAS GLIALES

La glía se clasifica de acuerdo a su origen ontogenético en

microglia de origen mesodérmico y la macroglia cuyo origen embrionario es ectodérmico e incluye a los astrocitos y oligodendrocitos (Whittaker, 1984).

a) Microglia

Son pequeñas células bipolares o multipolares que poseen algunos procesos tortuosos los cuales llevan proyecciones. Son células fagocíticas y móviles las cuales se encuentran distribuidas a través de la materia gris (Whittaker, 1984).

b) Macroglia

Como se mencionó anteriormente, las células macrogliales incluyen a los astrocitos y a los oligodendrocitos. Los oligodendrocitos son células que poseen pequeños cuerpos celulares y tienen algunos procesos delicados con pequeños alargamientos nodulares. Su núcleo es pequeño y la cromatina está comprimida. Los oligodendrocitos se encuentran tanto en la materia blanca como en la materia gris. Los oligodendrocitos que se encuentran en la materia blanca son los responsables de la producción de mielina. La oligodendroglia de la materia gris está en asociación con cuerpos celulares neuronales (Whittaker, 1984). Los astrocitos poseen algunas mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi, y cuerpos densos (Mugnaini y Walberg, 1964). En los astrocitos maduros casi no hay microtúbulos en su citoplasma y el componente del citoesqueleto más característico que poseen son filamentos intermedios constituidos en su mayoría por la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) (Eng et al, 1971). La GFAP tiene un peso molecular 49 kDa y sirve como marcador específico de estas células. Otra característica distintiva de los astrocitos son las reservas de glucógeno (Mugnaini y Walberg, 1964).

Existen dos subpoblaciones de astrocitos en el SNC: astrocitos tipo 1 y astrocitos tipo 2, los cuales pueden identificarse por criterios citoquímicos. Los astrocitos tipo 1 son GFAP y Ran 2 positivos, y negativos al anticuerpo A2B5. Los astrocitos tipo 2 son GFAP positivos, el anticuerpo A2B5 se une a ellos y presentan reacción negativa al anticuerpo Ran-2. Morfológicamente, también se puede distinguir a estas células; los astrocitos tipo 1 son células polimórficas y planas, mientras que los astrocitos tipo 2 tienen forma estrellada (Raff et al, 1983). Estos dos tipos de células gliales también difieren en su localización, ya que los astrocitos tipo 1 se encuentran en la materia blanca y la materia gris, mientras que los astrocitos tipo 2 se encuentran únicamente en la materia blanca, y probablemente correspondan a los astrocitos fibrosos (Raff et al, 1983).

Siguiendo un criterio morfológico y de distribución, existen dos grandes clases de astrocitos: protoplásmicos y fibrosos. Los astrocitos protoplásmicos, son células esféricas, con poco espacio citoplasmático, y tienen procesos que se expanden en todas direcciones; estos procesos son numerosos, cortos, muy ramificados y su superficie es irregular. Algunos de sus procesos llegan a vasos sanguíneos. Este tipo de astrocitos se encuentra en la materia gris (Vaughan, 1984).

Los astrocitos fibrosos son células elongadas, con gran cantidad de citoplasma y con procesos menos numerosos y largos que los astrocitos protoplásmicos; algunos de sus procesos terminan en vasos sanguíneos (Privat y Rataboul, 1986).

c) Células relacionadas con los astrocitos

- Células ependimales

Se encuentran en los ventrículos del cerebro y en el canal central de la médula espinal. En los mamíferos, forman una capa epitelial continua. Poseen algunos microtúbulos, retículo endoplásmico rugosos y liso, ribosomas y un aparato de Golgi bien desarrollado (Brightman y Palay, 1963).

Las células ependimales poseen filamentos intermedios parecidos a los de los astrocitos, sin embargo, sólo en etapas tempranas de su desarrollo poseen GFAP (Brightman y Palay, 1963).

- Glía de Bergmann

Esta glía se encuentra en el cerebelo y posee GFAP (Bignami y Dahl, 1974). Estas células son una forma especializada de astrocitos que se extienden radialmente por el cerebelo y se consideran elementos importantes para guiar a las neuronas en el desarrollo del cerebelo (Schachner et al, 1977 y Mugnaini y Forstronen 1967).

- Células de Müller

Es la glía radial de la retina y presenta rasgos morfológicos y bioquímicos similares a los astrocitos. Poseen grandes almacenes de glucógeno y filamentos intermedios en su citoplasma. La presencia de GFAP se ha detectado tanto en condiciones patológicas (Bignami, 1984), como en condiciones normales "in vivo" en glía de Müller de rata (Bignami, 1971), y de pollo (Semple Rowland, 1991).

La glía de Müller presenta una gran actividad de glutamino sintetasa (GS), que se considera un marcador bioquímico de los astrocitos. Otra característica que comparte con los astrocitos

es la existencia de mecanismos de captura de alta afinidad y enzimas que degradan a diversos neurotransmisores (Schnitzer, et al, 1981).

En común con los oligodendrocitos poseen gran actividad de anhidrasa carbónica e inmunorreactividad contra la proteína asociada a mielina (Newman, 1986). Por las razones anteriores las células de Müller no pueden ser clasificadas ni como astrocitos, ni como oligodendrocitos ya que poseen propiedades y realizan funciones de ambos tipos celulares (Newman, 1986).

2 - FUNCIONES DE LAS CELULAS GLIALES

a) Funciones generales:

Hallazgos recientes sugieren que las células gliales aunque no son excitables, realizan muchas mas funciones de las que se pensaba inicialmente. Las células gliales pueden sensor y responder potencialmente a muchas señales neuronales (Barres,1991), liberando moléculas como factores de crecimiento esteroides, péptidos, eicosanoides, etc (Giulian y Douglas; 1986 Giulian et al, 1988). Asimismo se ha postulado que algunos canales de Na^+ dependientes de voltaje presentes en las células neuronales, pudieran ser sintetizados por los astrocitos y transferidos a las neuronas por contacto celular directo entre membranas principalmente en los nódulos de Ranvier (Bevan et al,1985).

Por estudios bioquímicos se ha podido averiguar que las células gliales participan en la inactivación de transmisores químicos. Por ejemplo en la transmisión glutamatérgica la glia posee un sistema de captura de alta afinidad dependiente de energía y de

Na^+ compartido por L-glutamato, L-aspartato, y D-aspartato (Drejer et al, 1983). Una vez que es captado el glutamato, la glía posee un sistema para transformar el glutamato en glutamina por medio de la enzima glutamino sintetasa, que cataliza la síntesis de glutamina a partir de glutamato, ATP, y el ión amonio; la glutamina resultante de esta reacción no sólo es necesaria para la síntesis de proteínas sino que también sirve como un almacén de nitrógeno en numerosos caminos biosintéticos. La glutamina es muy importante en el cerebro, ya que constituye un precursor para el glutamato y el GABA, importantes aminoácidos neurotransmisores en el SNC. Se sabe que las neuronas glutamatérgicas toman la glutamina que libera la glía y la transforman en glutamato por medio de la enzima glutaminasa (De Vellis et al., 1986).

Las células gliales sintetizan y en algunos casos liberan neurotransmisores. Mediante el uso de técnicas inmunocitoquímicas se ha podido demostrar la existencia de un gran variedad de neurotransmisores: ácido glutámico, ácido aspártico, ácido homocisteico y GABA entre otros (Cuenod et al., 1990; Zhang et al., 1990; Barres 1990). Aunque las células gliales no poseen vesículas sinápticas se ha sugerido que podrían liberar estos neurotransmisores por mecanismos de transporte, independientes de Ca^{++} , como sería el caso del sistema de captura actuando en sentido inverso (Szatkowski et al 1991).

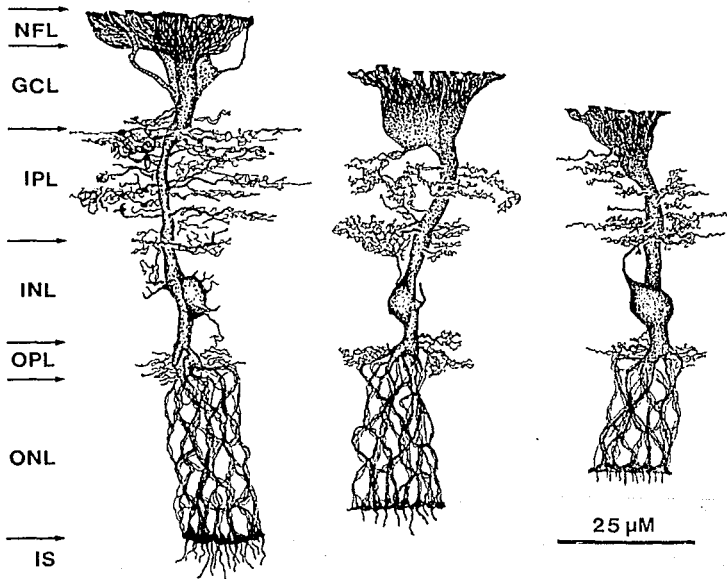
Por otra parte , las células gliales de tipo astrocítico contribuyen a la regulación de K^+ extracelular, funcionando como sensores para el K^+ al capturar a este ión; el K^+ una vez en el interior de las células gliales podría viajar a través de ellas y

ser expulsado en regiones distales (Orkand et al., 1966).

b) Funciones en la retina:

La retina de los vertebrados, como parte del Sistema Nervioso Central, posee dos subtipos de células gliales de tipo macroglial: las células de Müller y los astrocitos ; estos últimos se encuentran asociados a vasos sanguíneos (Schnitzer, 1988), y por lo tanto los astrocitos de la retina sólo se encuentran en especies que poseen retinas vascularizadas. En el caso de las aves al ser retinas no vascularizadas, poseen únicamente células de Müller (Moscona, 1983). Las células de Müller (principal elemento glial de la retina), se expanden a través de toda la retina desde la capa limitante interna donde se encuentra la parte apical, hasta la capa limitante externa donde se encuentra su pie terminal (Newman, 1986) Esquema 1.

Las células de Müller regulan la concentración de K^+ extracelular gracias a que su membrana posee una alta permeabilidad a este ión (Conner et al., 1985). Cambios de iluminación producen un aumento de K^+ extracelular en la retina que puede ser uniforme o localizado dependiendo del tipo de estímulo (Mobbs et al., 1988). Cuando ocurre un cambio uniforme de K^+ extracelular, los iones K^+ entran a la célula por la parte apical desde donde son transportados a todo lo largo de la célula. El pie de esta célula está en contacto con el humor vítreo, y en la membrana presenta una resistencia mucho menor ($12M\Omega$) lo cual favorece la salida de K^+ al humor vitreo (Mobbs et al 1988). Cuando ocurren cambios de iluminación no uniformes en la retina se induce un



Esquema 1. Dibujos en cámara lúcida de células de Müller en los cuales se muestra como se encuentran relacionadas con las distintas capas celulares de la retina. NFL=capa de fibras nerviosas , CGL=capa plexiforme interna, INL=capa nuclear interna, OPL=capa plexiforme externa, ONL=capa nuclear externa, IS= segmentos internos (Robinson y Dreher; 1990).

aumento de K^+ extracelular que es tomado por la célula de Müller adyacente y difundido a las células de Müller vecinas gracias a que están en contacto por uniones comunicantes, reduciéndose así el aumento de K^+ extracelular (Mobbs et al., 1988).

Se sabe también que las células de Müller ayudan a eliminar el CO_2 de la retina al convertirlo en bicarbonato por medio de la enzima anhidrasa carbónica (Musser y Rosen, 1973).

3 - Plasticidad en las células gliales

Las células gliales son un blanco que responde muy fácilmente a los estímulos del medio ambiente. En cultivo de tejidos al variar la cantidad de suero, la concentración de nucleótidos cíclicos, aminoácidos etc, se puede alterar el índice de proliferación, la morfología y más aún se pueden tener efectos gliotóxicos (Nicoletti et al 1990, Moonen et al 1975, Moonen et al 1976, Haas y Erdo 1991).

En cultivos primarios de astrocitos de cerebro se ha visto que el glutamato y su análogo quisqualato tienen efectos antiproliferativos (Nicoletti et al, 1990). Haas y Erdo (1991) al probar quisqualato (1mM) en cultivo de tejidos de astrocitos de cerebro encontraron que este agonista del glutamato provoca hinchamiento osmótico y posterior muerte celular.

La supresión de suero puede provocar modificaciones en la adhesividad de los astrocitos al sustrato, y provoca una apariencia diferenciada en estas células (Moonen et al, 1976). El bajo suero (0.1%) en astrocitos de corteza cerebral mantenidos en cultivo de tejidos, influye en un cambio de la respuesta de estas

células a bradiquinina y vasopresina, con respecto a cultivos control (Cholewinski y Wilkin, 1988).

En cultivos primarios de astrocitos tipo 1 se puede inducir la aparición de canales de Ca^{++} con sustancias que incrementan los niveles intracelulares de AMPc o al hacer cocultivos glía-neurona (Corvalan et al, 1990). La aparición de estos canales de Ca^{++} en astrocitos tipo 1 se puede lograr dependiendo del lote de suero que se use o la marca siempre y cuando se trate de suero de bovino fetal (Barres et al, 1989).

El dibutiril AMPc provoca cambios en la morfología de las células astrocíticas mantenidas en cultivo de tejidos induciendo la formación de múltiples procesos celulares, y promoviendo la polimerización del filamento intermedio GFAP (Juurlink y Hertz, 1985).

4 - Receptores en las células gliales y sus diferentes funciones

Recientemente se han ido acumulando una serie de evidencias de que la glía no solo posee receptores a diferentes neurotransmisores y péptidos sino que estos receptores son funcionales (Murphy y Pearce, 1987).

La activación de los receptores en astrocitos puede tener un doble efecto, uno inmediato parecido al producido en otros tipos celulares como es el aumento en corrientes iónicas, generación de segundos mensajeros como son GMPc, AMPc, fosfatos de inositol y diacil glicerol (Murphy y Pearce, 1987). El otro efecto que es a largo plazo puede producir cambios en los almacenes de glucógeno en astrocitos, liberación de aminoácidos, alteraciones en las proteínas del citoesqueleto y forma de las células y por último

modificaciones en el índice de división celular (Murphy y Pearce, 1987).

A continuación se enumerarán algunos ejemplos de efectos a corto y largo plazo producidos por compuestos que funcionan como neurotransmisores.

a) Efectos a largo plazo

Cambray-Deakin et al.(1988) empleando cultivos primarios de astrocitos, al usar transmisores del tipo β -adrenérgico, serotoninérgico y colinérgico muscarínico, descubrieron que estos compuestos son capaces de producir en las células gliales glucogénesis y liberar la glucosa resultante al medio.

Las células astrogliales de tipo IRLM55 en cultivos primarios, responden a agonistas β -adrenérgicos con cambios morfológicos asociados a la contracción de filamentos de actina y miosina (Shain et al,1987; Shain et al, 1992).

Péptidos secretados por la glía como la interleucina-1 y el factor de crecimiento fibroblástico producen crecimiento y madurez en la glía provocando movimiento celular y mielinización (Giulian et al., 1988); la interleucina-1 también produce aumento en la síntesis del RNA mensajero que codifica para el factor de crecimiento nervioso (Carmankrzan et al, 1991).

La sustancia P produce liberación de prostaglandinas en cultivos primarios de astrocitos (Marriot et al,1991).

Los aminoácidos excitadores también provocan efectos a largo plazo en las células gliales en cultivo de tejidos como son: formación de procesos (filipodios) los cuales se dan gracias a una reorganización de actina, proceso que se piensa está mediado

por hidrólisis de fosfatidil inositol (Cornell-Bell et al., 1990). Los aminoácidos excitadores quisqualato, glutamato e ibotenato pueden provocar en las células gliales disminución en el crecimiento celular y proliferación (Condorelli et al, 1989). EL ácido glutámico y algunos análogos de éste (Kainato y quisqualato) ejercen efectos tóxicos en cultivos primarios de glía del hipocampo (Lehman y Hansson, 1988).

b) Efectos a corto plazo

Las células gliales de tipo astrocítico son capaces de responder a agonistas a aminoácidos excitadores y a agonistas adrenérgicos aumentando la concentración intracelular de Ca^{++} de manera oscilatoria (Cornell-Bell et al, 1990; Delumeau et al, 1991), y pueden estimular la hidrólisis de fosfolípidos de inositol (Murphy y Pearce, 1987, Jensen y Chiu, 1991; Cornell-Bell, et al 1990; Delumeau et al, 1991, Glaum et al, 1990, Wilson, 1991).

Los péptidos pueden producir incremento en la síntesis de AMPc y GMPc (Murphy y Pearce, 1987; Angullo et al, 1990, Erickson et al 1990). En explantes de astrocitos de tallo cerebral y médula espinal, el péptido vasoactivo intestinal (VIP), la angiotensina II (AngII), la vasopresina y la endotelina, despolarizan a estas células gliales (Hosli et al, 1987; y Hosli et al, 1992).

En cultivos primarios de astrocitos o de la línea C6 al ser estimulados con serotonina, se aumenta la producción de AMPc o bien se induce el metabolismo de fosfatidil inositol bifosfato (Murphy y Pearce, 1987; Hanson et al, 1987; Manor et al 1992; Hosli et al 1987; Ongura y Amano, 1984).

Por estudios electrofisiológicos y empleando colorantes de cianina se ha medido cambios en el potencial de membrana de

astrocitos mantenidos en cultivos primarios empleando como agentes despolarizantes el ácido glutámico, ácido aspártico, ácido quisquálico y ácido kainico (Bowman y Kimelberg, 1984; Enkvist et al., 1988). Para explicar esta despolarización se ha propuesto dos posibles mecanismos iónicos (Usovich et al., 1989). Uno de los mecanismos sería la captación electrogénica de glutamato junto con Na^+ la cual se demostró en las células de Müller (Brew y Attwell, 1987; Barbour et al., 1988) y en astrocitos tipo 1 (Usovich et al., 1989). Este acarreador transporta análogos del glutamato tipo NMDA y tipo no-NMDA.

En las células de Müller de ajolote se ha visto que se transportan al menos dos iones Na^+ por cada anión glutamato que entra a la célula (Brew y Attwell, 1987). Análogos del glutamato como L-aspartato, D-aspartato, NMDA también provocan corrientes entrantes en las células de Müller, mientras que los análogos al glutamato, el ácido quisquálico y ácido kainico no provocan corriente de entrada (Brew y Attwell, 1987). En las células de Müller de salamandra también se ha medido la captación electrogénica de ácido glutámico, encontrándose que por cada molécula de L-glutamato, entran tres iones Na^+ al interior de la célula y sale un ión K^+ . Esta captación se inhibe al aumentar la concentración de K^+ extracelular (Barbour et al., 1988).

En astrocitos tipo 1 además del transportador electrogénico existe un receptor acoplado a la hidrólisis de fosfatidil inositol (Nicoletti et al., 1989) el cual se activa con los agonistas quisqualato, ibotenato y glutamato (Nicoletti et al., 1989 y Cornell-Bell, 1990). La estimulación provocada por estos

compuestos se antagoniza totalmente por L-AP4 y parcialmente por L-AP5 (Nicoletti et al., 1989 y Cornell-Bell, 1990).

El otro mecanismo iónico propuesto para explicar la despolarización de los astrocitos es por medio de la apertura de canales iónicos asociados a receptores a aminoácidos excitadores (Backus et al., 1989). Este mecanismo se activa por los análogos del ácido glutámico, kainato, quisqualato y AMPA (Gallo et al., 1989, Usowicz et al., 1989, Backus et al., 1989), y no así por NMDA y aspartato. Este tipo de receptores se encuentra en astrocitos tipo 1 y 2 está asociado a un canal iónico de Na^+/K^+ (Kettenman et al 1989), el cual permite la entrada de Ca^{++} (Usowicz et al., 1989; Jensen et al., 1990; Barres et al., 1991). La respuesta de este receptor se antagoniza totalmente por CNQX que es un antagonista específico de los receptores ionotrópicos de glutamato del tipo no NMDA (Honoré et al., 1989). Recientemente se ha encontrado un receptor con las características anteriormente mencionadas en las células del linaje O2A que son precursores tanto astrocitos tipo 2 como de los oligodendrocitos, in vivo (Barres et al 1990).

5 -Receptores a aminoácidos excitadores en el SNC

Los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato son los neurotransmisores mas abundantes en el Sistema Nervioso Central (Farroqui y Horrocks., 1991). Estos aminoácidos producen su efecto al interactuar con receptores específicos en la membrana de las células (Farroqui y Horrocks .,1991). Basados en el mecanismo de transducción estos receptores se han clasificado en dos grupos 1) Receptores ionotrópicos y 2)Receptores

metabotrópicos.

a) Receptores ionotrópicos

La activación de estos receptores da como resultado la apertura de un grupo de canales iónicos que permiten la entrada de Na^+ , K^+ y Ca^{++} (Farroqui y Horrocks., 1991). Por estudios tanto electrofisiológicos como bioquímicos se ha descrito cuatro clases de receptores ionotrópicos a aminoácidos excitadores.

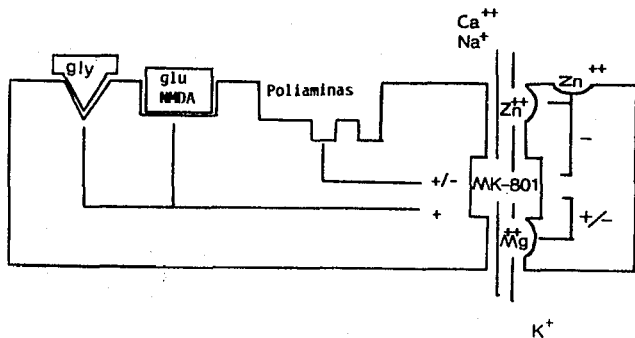
- 1) Receptor a NMDA (N-metil-D-aspartato)
- 2) Receptor a AMPA (a amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato)
- 3) Receptor a Kainato
- 4) Receptor a AP4 (2-Amino-4-fosfonobutirato).

-Receptores de NMDA. Los sitios de unión de NMDA se localizan preferentemente en la corteza cerebral, los ganglios basales, las áreas asociadas a los sistemas sensoriales y el area CA1 del hipocampo (Rev Somohano y López-Colomé, 1990).

El complejo del receptor de NMDA posee diferentes sitios de reconocimiento para ligandos endógenos y exógenos (esquema 2). Estos sitios de reconocimiento incluyen el sitio de unión al glutamato o NMDA (Johnson y Asher, 1987), el sitio donde actúan los agonistas alostéricos glicina y D-serina (Lehman et al, 1988), el sitio donde actúan los anestésicos disociativos MK-801 y endopsicosina (Anis et al, 1983; Huettner y Bean, 1988), el sitio de unión al Mg^{++} dependiente de voltaje (Cotman e Iversen, 1987; Mayer et al, 1984), el sitio de unión al Zn^{++} no dependiente de voltaje (Peters et al, 1987), y el sitio de unión a las poliaminas espermina y espermidina (Williams et al, 1991). La activación del receptor a NMDA depende de voltaje debido a la interacción del Mg^{++} con el canal (Cotman e Iversen, 1987; Mayer et al, 1984). Al activarse el receptor de NMDA provoca la

despolarización de las células por la entrada de iones Ca^{++} (Honoré, 1989). En este receptor la glicina, transmisor inhibitor de la médula espinal (Curtis et al, 1960), actúa como modulador alostérico positivo, provocando un aumento en la respuesta, la cual no es antagonizada por la estriquina, inhibidor del receptor sináptico de la glicina (Young y Snyder, 1971). El Zn^{++} antagoniza alostéricamente la respuesta a NMDA (Honoré, 1989). Las poliaminas incrementan la unión de los bloqueadores del canal iónico y al sitio de glicina (Williams et al, 1991).

Recientemente se ha logrado clonar a este receptor; Moriyoshi et al, (1991) clonaron un cDNA que codifica para una proteína que presenta cuatro dominios transmembranales y un gran dominio extracelular. En este estudio se realizó una reconstitución de este receptor en ovocitos de *Xenopus* encontrándose que una sola subunidad es funcional y posee todos los sitios moduladores alostéricos exceptuando al sitio de unión a las poliaminas. Por otra parte se ha clonado un cDNA que codifica para una proteína de unión a glutamato (Kumar et al, 1991), la cual probablemente forma parte del complejo de cuatro proteínas aisladas por este mismo grupo, que pueden representar el complejo intacto del receptor con su canal iónico asociado y los sitios de unión a los anestésicos disociativos y a la glicina. Dado que las secuencias propuestas para estas proteínas son diferentes, es difícil por el momento definir cual de estas proteínas pudiera representar al receptor funcional a NMDA, quedando la posibilidad de haber clonado subunidades no relacionadas de un mismo oligómero (Barnard, 1992).



Modelo del receptor tipo NMDA. En este modelo se representa una proteína oligomérica, que presenta, además del sitio de reconocimiento al neurotransmisor o agonista (NMDA), un sitio de reconocimiento a la glicina, sitio de reconocimiento a las poliaminas, un canal catiónico, y en este, un sitio para moduladores alostéricos negativos (MK-801) y dos sitios para iones Zn^{++} y Mg^{++} que bloquean el paso de los cationes por el canal y, en el caso de Mg^{++} , le confieren una dependencia de voltaje (tomado de Williams et al, 1991). (Abreviaturas pg 3).

Receptores a AMPA.

Los canales activados por AMPA tienen una distribución paralela al receptor de NMDA. Los canales activados por AMPA median la mayoría de la neurotransmisión sináptica rápida, son independientes de voltaje y selectivos para cationes monovalentes (Watkins et al; 1990). Los agonistas mas selectivos para este receptor son el AMPA y el quisqualato (Watkis et al.,1990). Potentes antagonistas para este receptor son DNQX 6,7 dinitroquinoxalina,2,3 dion , CNQX 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3 dion (Watkins et al 1990) y NBQX (2,3,dihidro-6-nitro-7-sulfamoilbenzo (F) quinoxalina (Sheardon et al, 1990) (Tabla 2).

- Receptores a Kainato

Es difícil distinguir entre los receptores de AMPA y kainato utilizando criterios farmacológicos, pero a pesar de este impedimento se ha logrado encontrar su presencia en fibras del ganglio de la raíz dorsal (Watkis et al 1990) donde no hay unión de AMPA-H³ (Watkins et al 1990).

No hay una relación muy clara entre la unión de kainato-H³ y las respuestas electrofisiológicas al kainato probablemente porque este compuesto no es un agonista específico (Watkins et al 1990). Algunas respuestas a kainato pueden estar mediadas por una población particular de sitios de unión a AMPA-H³. Esto puede explicar de alguna manera la dificultad de antagonizar la respuesta al AMPA o al kainato (Watkins, et al., 1990).(Tabla 2).

Barnard y Henley (1990), proponen que existe un receptor ionotrópico unitario tipo no-NMDA que es una proteína con multisubunidades en la cual tanto el kainato como el AMPA se pueden unir y abrir el mismo canal. Este receptor podría estar

ya sea en conformación kainato o conformación AMPA (Barnard y Henley, 1990).

Hasta hace poco tiempo no se conocía nada acerca de la estructura del receptor a kainato; el primer resultado exitoso lo obtuvo Gregor et al (1989) aislando una proteína del cerebelo que une al kainato, esto se logró por solubilización con Tritón X-100 y purificando 50 veces. Somogy et al (1990) encontraron que esta proteína que une kainato se encuentra restringida a la glía de Bergmann del cerebelo. El DNA complementario que codifica esta proteína ya ha sido aislado, lo que sirvió para determinar su estructura la cual tiene cuatro dominios transmembranales (Gregor et al., 1989). Al inyectar el mRNA que codifica esta proteína en ovocitos de Xenopus no se encontró respuesta electrofisiológica (Hollman et al., 1989).

Mas tarde se logró aislar un clon de cDNA, GluR-K1 de cerebro anterior de rata (Hollman et al, 1989). Este cDNA cuando se expresa en ovocitos de Xenopus codifica una proteína funcional que une al kainato, que posee características electrofisiológicas y farmacológicas del subtipo del receptor a kainato (Hollman et al, 1989). Nakanishi et al (1990), utilizando un oligonucleótido con la secuencia del receptor GluRK1 identificaron una familia de genes que codifica un receptor que une kainato/AMPA; esta familia de genes al igual que la proteína que une kainato presenta cuatro dominios transmembranales que pueden participar en la formación del canal, y un dominio extracelular muy grande (Nakanishi et al, 1990).

Receptores a APB

Este tipo de receptor sólo puede detectarse en presencia de Cl^- , aumenta en presencia de Ca^{++} , y la unión del ligando al receptor puede inhibirse por bloqueadores de canales de Cl^- (Recasens et al., 1986). Se ha visto que la unión del ligando al receptor disminuye con la congelación de las membranas (Honoré et al., 1986). Por las características anteriormente citadas se cree que este receptor es un sito de captura para el ácido glutámico y posiblemente esté localizado en las células gliales (Honoré et al., 1986). Los agonistas para este receptor son APB y L-glutamato (Watkins, 1986) y su antagonista la CNQX (Honoré et al., 1989). (Tabla 2).

b) Receptores metabotrópicos

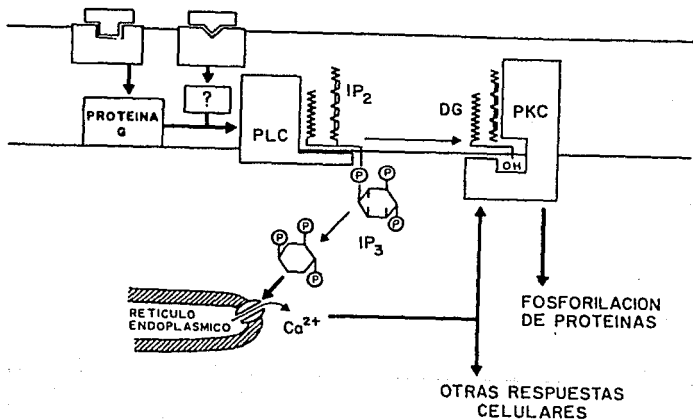
Estos receptores actúan a través de una proteína G que une GTP, esta proteína G activa diferentes enzimas membranales como la fosfolipasa C la cual hidroliza el fosfatidil inositol bifosfato, que es un fosfolípido membranar dando dos productos, 1,2 diacil glicerol e inositol 1,4,5 trifosfato; ambos productos actúan como segundos mensajeros (Berridge, 1984). La función del inositol trifosfato es producir la liberación de Ca^{++} del retículo endoplásmico, por otro lado el diacil glicerol activa enzimas como la proteína cinasa C que fosforila proteínas (Berridge., 1984). (Esquema 2).

Los receptores metabotrópicos responden al quisqualato pero no al AMPA (Farooqui u Horrocks, 1991). Este receptor puede ser activado por compuestos como el trans-ACPD (trans-1-amino-1,3-ciclopentanodicarboxilato) que es su agonista más potente (Farooqui y Horrocks, 1991), por el quisqualato, glutamato, NMDA,

Kainato, aspartato e ibotenato (Wroblewski et al, 1988; Farooqui y Horrocks, 1991) (Esquema 2).

La respuesta de hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato inducida por aminoácidos excitadores puede ser antagonizada por AP4, aunque este compuesto es inactivo a concentraciones arriba de 1mM (Schoepp et al, 1990); el AP3 (L-2-amino-3- fosfonopropionato) es el antagonista mas comunmente usado, y puede inhibir respuestas inducidas por, ibotenato y quisqualato pero no la producida por kainato, aunque la potencia y la selectividad con la que se antagonizan las respuestas depende del área del cerebro y del estado embrionario de éste (Schoepp, 1990). Con respecto a la respuesta inducida por el NMDA, se inhibe preferentemente por AP5 (2-amino-5- fosfonovalerato) que es un antagonista selectivo del receptor de NMDA, y esta respuesta provocada por NMDA se atenúa en presencia de Mg^{++} , y se aumenta en presencia de glicina (Wroblewski et al., 1981). (Tabla 2).

Se ha logrado aislar una familia de receptores metabotrópicos a glutamato, mGlu R2, mGlu R3, mGlu R4 a partir de una biblioteca de DNA complementario de rata (cDNA), usando el cDNA del mGlu R1, previamente clonado (Masu et al, 1991). Esta familia de receptores posee como en los receptores ionotrópicos a aminoácidos excitadores un gran dominio extracelular y, a diferencia de los receptores ionotrópicos, siete dominios transmembranales (Tanabe et al 1992).



Esquema 2. La hidrólisis de PIP₂ produce inositol trifosfato que difunde a través del citoplasma hasta el retículo endoplásmico donde induce la liberación de calcio, también se produce como producto de la hidrólisis de PIP₂ diacil glicerol, que activa enzimas como la proteína cinasa C. (Abreviaturas: Fosfatidil inositol 4,5-difosfato (IP₂), diacil glicerol (DG), inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), proteína cinasa C (PKC). Tomado de Mitchell, 1987).

TABLA 1 RECEPTORES DE NMDA

NOMENCLATURA

NMDA

AGONISTAS

L-ASP
L-GLU
NMDA
QUINURENATO
HOMOCYSTEATO

ANTAGONISTAS

CPP
APV
APH
CGS-19755

SITIO A GLICINA

AGONISTAS

GLICINA
D-SERINA
D-CICLOSERINA
ACC

AGONISTA INVERSO

7-CL-KIN
KINURENATO
CNQX

ANTAGONISTAS

HA-966
12-CA
ACBC

SITIO ALOSTERICO (-)

AGONISTAS

PCP
MK-801
KETAMINA
ENDOPSIKOSINA
SKF10047

SITIO A LAS POLIAMINAS

AGONISTAS

Espermina
Espermidina
APDA 10

AGONISTA INVERSO

DA 10

ANTAGONISTAS

DET
Arcaína
Ifendropil

(Rev Somohano y López-Colomé, 1990 y Rev Williams et al, 1991).
(Abreviaturas pg 3).

TABLA 2 RECEPTORES NO-NMDA

AMPA

AGONISTAS	ANTAGONISTAS	VIAS EFECTORAS
AMPA QUISQUALATO L-GLU	CNQX NBQX DNQX GDEE	Na ⁺ /K ⁺

kainato

AGONISTAS	ANTAGONISTAS	VIAS EFECTORAS
KAINATO DOMOATO L-GLUTAMATO AC ACROMELICO	CNQX NBQX DNQX t-GG KIN	Na ⁺ /K ⁺

L-AP4

AGONISTAS	ANTAGONISTAS	VIAS EFECTORAS
APB L-GLU	CNQX	

METABOTROPICO

AGONISTAS	ANTAGONISTAS	VIAS EFECTORAS
TRANS-ACPD L-GLU	AP4 AP3	IP ₃ /DG

(Watsón y Abbot, 1991 y Somohano y López-Colomé, 1990).
(Abreviaturas pg 3)

5 - Receptores a aminoácidos excitadores en la retina de los vertebrados

a) Estructura de la retina

La retina consiste esencialmente en cinco diferentes tipos de neuronas: los fotorreceptores, las células horizontales, amacrinas, bipolares y ganglionares, y dos tipos de células gliales, los astrocitos y las células de Müller (Dowling, 1979). En la retina, los cuerpos celulares se localizan en dos capas nucleares (capa nuclear externa y capa nuclear interna), y la capa de células ganglionares, mientras que las sinapsis se establecen en dos capas plexiformes. Los cuerpos celulares de los fotorreceptores se encuentran en la capa nuclear externa, y hacen sinápsis con las células bipolares y amacrinas de la capa nuclear interna. Las células bipolares y amacrinas hacen contacto con las células ganglionares que constituyen la última capa celular, la de las células ganglionares, cuyos axones se unen para formar el nervio óptico (Dowling, 1979). En cuanto a las células de Müller, atraviesan radialmente toda la retina (Newman, 1986).

La existencia de los receptores a aminoácidos excitadores en la retina de los vertebrados se ha podido demostrar gracias a estudios de neurotoxicidad, electrofisiológicos y bioquímicos.

En la retina de pollo, Lopez-Colomé y Somohano, (1982), demostraron, por estudios de unión de aspartato- H^{-3} como ligando, la presencia de dos poblaciones de receptores, una de alta afinidad (K_D 40 nM) independiente de Na^+ que se encuentra en la fracción P1. La otra población de receptores también de alta afinidad se encuentra en la fracción P2 y presenta una K_D = 11.8

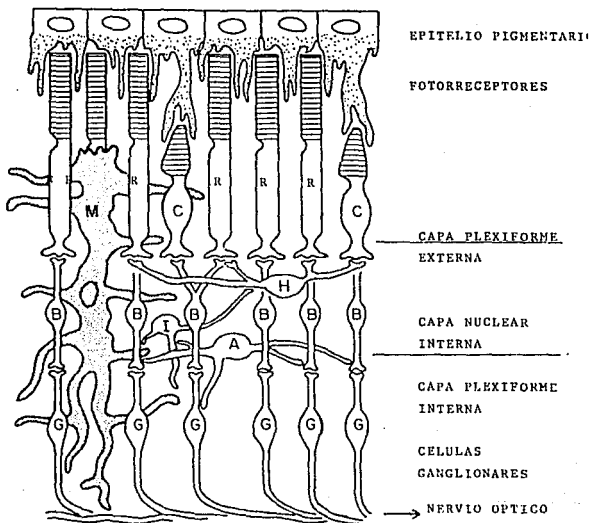
nM. En este estudio se observó que la unión de ácido aspártico independiente de Na^+ no se afecta con la congelación, mientras que la congelación afecta la unión dependiente de Na^+ .

Los receptores a ácido glutámico en retina de pollo se han identificado y caracterizado bioquímicamente (López Colomé, 1981). Se demostró la presencia tanto de la unión de glutamato dependiente de sodio, sensible a la congelación (sitios de captura) y unión independiente de sodio que no se afecta por la congelación, con $K_p = 0.55 \mu\text{M}$ (receptores sinápticos).

Otra prueba de la existencia de receptores a aminoácidos excitadores en la retina, es el efecto neurotóxico selectivo que el glutamato y sus análogos, especialmente el ácido kainico, ejercen sobre las células amacrinas (Coyle et. al., 1978), horizontales y bipolares así como sobre células gliales (Morgan e Ingham, 1981; López-Colomé y Somohano, 1984).

Por estudios de un ligando marcado radiactivamente a membranas de células retinianas, se ha demostrado que en la retina de pollo existen receptores para glutamato, aspartato, ácido kainico, NMDA, y ácido quisquálico los cuales aparecen en diferentes estados del desarrollo embrionario mostrando cada uno cambios en su proporción relativa, y en sus propiedades farmacológicas durante el desarrollo embrionario (Somohano et. al., 1988).

Las células de Müller de la retina de pollo en cultivo presentan unión de L-asp-H-³ con tres sitios de unión $K_p = 40,200$ y 1300 nM. Las primeras dos poblaciones están presentes a un día in vitro mientras que las últimas dos están presentes a 12 DIV. Las propiedades farmacológicas de esta unión también cambian en el desarrollo en cultivo (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991).



Esquema 3. Organización de la retina mostrando las diferentes células que la constituyen, y su relación con las células de Müller. C, Conos; R, Bastones; H, células Horizontales; B, células Bipolares; A, células Amacrinas; G, células ganglionares y M, células de Müller (Farber y Adler, 1986).

III - OBJETIVO

Puesto que las células de Müller poseen receptores a aminoácidos excitadores (Brew y Attwell, 1987; Mobbs et al, 1988; Sarantis y Attwell, 1990; Barbour et al, 1990; López-Colomé y Romo de Vivar, 1991), el propósito de este trabajo fué el de determinar si estos receptores sufren cambios en sus propiedades farmacológicas durante el desarrollo in vitro de la glia de la retina , y si los mismos obedecen a señales endógenas o bien a factores extrínsecos . Asimismo se ha hecho una caracterización farmacológica para tratar de discernir que clase de receptores a aminoácidos excitadores están presentes en las células de Müller.

Como se mencionó en la introducción, las células de Müller y los astrocitos tipo 1 comparten características morfológicas y bioquímicas (e.g apariencia aplanada y polimórfica en cultivo y presencia de sistemas similares de captura de aminoácidos excitadores). En los astrocitos tipo 1 se ha demostrado la existencia de receptores a aminoácidos excitadores acoplados a sistemas de transducción que involucran la hidrólisis de fosfoinosítidos (Nicolletti, 1990; Murphy y Pearce, 1988). Basándonos en el perfil farmacológico mostrado en membranas congeladas obtenidas de células de Müller, que indicaba la posible existencia de receptores similares (López-Colomé y Romo de Vivar, 1990), en este trabajo se investigó también la presencia receptores metabotrópicos asociados a la hidrólisis de fosfatidil inositol.

MATERIALES Y METODOS

El método de cultivo de tejidos empleado en este trabajo fué el descrito por Adler, et al. (1982) para células no neuronales de retina de embriones de pollo, con algunas modificaciones (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991).

Se usaron embriones de pollo "barrados" de 7 días. Las retinas se extrajeron, separándolas del epitelio pigmentario y se lavaron dos veces en una solución Hank's libre de Ca^{++} y Mg^{++} (0.8 g NaCl, 0.04g KCl, 0.006g KHP_2PO_4 , 0.02g Na_2PO_4 , 0.002g de rojo de fenol y 0.1g de glucosa en 100 ml de agua). Después de lavadas las retinas se incubaron 10 min en tripsina (0.25%) a 37°C. Parando la reacción enzimática con L-MEM: (1.338g de medio de Dulbecco Eagle modificado al cual se le adicionó 0.05g de glucosa, 0.022g de NaHCO_3 , 0.0125% de penicilina estreptomina y 0.025% de neomicina en 100 ml de agua + 1% de BSA (albúmina de bovino). Las células se disociaron mecánicamente utilizando una pipeta "Pasteur" y se filtraron a través de una red de nylon de 50µm, y se diluyeron en H-MEM sin suero (misma fórmula de L-MEM pero con 0.22g de NaHCO_3). Las células se sembraron en cajas de Petri que podían contener 1ml de H-MEM con 20% de suero (condición control), H-MEM con 20% de suero inactivado 30' a 60°C, H-MEM con 2% de suero, H-MEM con 20% de suero + 200µM glutamato, H-MEM con 20% suero + 100µM quisqualato, H-MEM con 20% + 2mM de dibutiril AMPc; para dar una concentración final de 10% ó 1% de suero al agregar la suspensión celular.

El medio de cultivo se cambió cada tercer día por 2 ml de H-MEM igual al medio en el que se sembró a las células, excepto en

el caso del medio con 1% de suero que después de 48 hrs se reemplazó por medio con 10% de suero de bovino fetal.

Se cosehó a las células a los 1, 5, 8 y 12 días "in vitro" (DIV), se raspó las células con un gendarme de hule; la suspensión celular se centrifugó a 1000X g y el paquete celular se homogeneizó en 10 ml de agua, y se dejó en hielo con el fin de completar el rompimiento osmótico y se centrifugó a 45'000xg por 20 min a 4°. Este procedimiento se repitió 3 veces y las membranas se congelaron.

Para tener la certeza de que los cultivos eran puros en glía, se usó la técnica citoquímica con el anticuerpo policlonal contra la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP); este anticuerpo se une a filamentos intermedios de las células de Müller (Bjorklund, et al., 1985). El método consiste brevemente en lo siguiente: las células se fijaron en paraformaldehído al 4% por 10 minutos, se lavaron con PBS con 0.1% de tritón x100 (0.8g NaCl, 0.2g KCl. 0.115g Na₂PO₄, 0.2g KH₂PO₄, 0.1 ml de tritón X100, en 100ml), se incubaron 10 min con suero de cabra para eliminar el fondo, se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal contra la GFAP, se lavaron con PBS, y se incubaron 30 min con el segundo anticuerpo IgG (Inmunoglobulina G) anticonejo específico para fragmento Fab (Fragmento de unión a antígeno) conjugado a FITC (Isotiocianato de fluoreceína), las células se lavaron nuevamente en PBS, se montaron en glicerol en PBS 1:9 y se observaron en un microscopio de fluorescencia.

Las membranas se descongelaron se resuspendieron y se homogeneizaron en buffer (Tris-HCl, p.H. 7.4, 0.1M). Los receptores se midieron por unión específica a las membranas de L-Aspartato-H³

(López-Colomé, 1981) en presencia o ausencia de 1mM de hidroxamato del aspártico; la unión inespecífica se tomó como la radiactividad que permanece unida a las membranas en presencia de 1mM de desplazador. Las membranas se incubaron 10 min a temperatura ambiente y la reacción se paró por centrifugación a 90 000xg. El sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó superficialmente dos veces con agua fría; se disolvió con SDS al 2% y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido después de agregar 5ml de Tritosol (Fricke, 1985). La proteína se midió por el método de Lowry et al (1958).

La hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato se midió por la acumulación de fosfatos de inositol radiactivos de acuerdo al método de Berridge et al. (1982), con ligeras modificaciones. Brevemente, cultivos de células gliales de 12 DIV sembradas en condición control se incubaron con 4 uCi por caja petri de myo ($2\text{-}^3\text{H}$)inositol (actividad específica 15.1 Ci/Mmol, por 24 horas para marcar los fosfolípidos de inositol. Al final de la incubación las cajas de cultivo se lavaron 3 veces con 1ml de Ringer Krebs bicarbonato conteniendo LiCl 10mM a 37°C; después de lavadas, las cajas se incubaron 10 min a 37°C en baño de agitación con 2ml del mismo buffer, se le agregó a cada caja el compuesto a probar (agonista) ya sea L-aspartato, NMDA, trans-ACPD, Kainato o Quisqualato a concentración final 1mM, y se incubaron por 30 min en un baño de agitación a 37°C. La reacción se paró agregando cloroformo-metanol (1:2 v/v) y se dejó 20' a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 0.75 ml de agua y 0.5ml de cloroformo. Para separar las dos fases, se centrifugó 15' a 1000

rpm, se tomó la fase acuosa, la cual se pasó por una columna de intercambio aniónico Dowex-1 (AG 1-X8) la columna se eluyó con mioinositol 5mM, y después con formiato de sodio 60mM/tetraborato de Na⁺ 5mM. Los fosfatos de inositol se eluyeron con formiato de amonio 1M/ ácido fórmico 0.1M. Las muestras se colectaron en viales y la radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido.

La incorporación de timidina H³ se midió añadiendo 1uCi de timidina-³H por 16 hrs 30 min, el DNA se presipitó con ácido tricloroacético 10% y se midió la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido.

El conteo celular se realizó en un contador Coulter utilizando pancreatina al 0.25% para separar las células.

IX RESULTADOS

Para comprobar si los cambios en la unión específica de L-aspartato- ^3H así como las características cinéticas y farmacológicas de esta unión se debían a características intrínsecas de las células o a las diferentes condiciones del medio que rodea a las células de Müller, se probaron diferentes condiciones de cultivo sobre la unión específica de L-aspartato- ^3H 25 nM, a los 1,5,8 y 12 DIV. Las condiciones experimentales que se probaron fueron las siguientes: 1mM de dibutiril AMP cíclico, 50uM de quisqualato, 100uM de glutamato, y medio con baja concentración de suero (1%).

Cultivos control

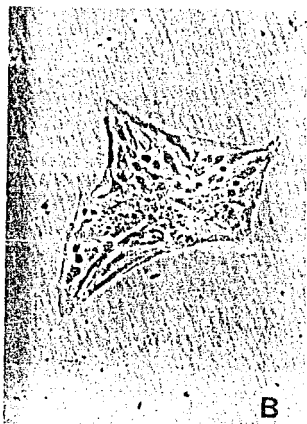
Las células de Müller crecieron en presencia de 10% de suero y se hicieron observaciones a 1,5,8 y 12 DIV. A 1 DIV las células se encuentran formando agregados celulares y no se distinguen como unidades; a los 5 DIV el agregado celular empieza a extenderse de manera uniforme y tampoco se distinguen las células; después de 8 DIV las células ya han abandonado el agregado celular y se pueden ver como unidades, 12 DIV el cultivo ya ha llegado a confluencia, y presentan una morfología que coincide con la reportada por Adler (1982), pero se ven los grandes núcleos que son típicos de las células gliales (Whittaker, 1984) (serie de fotografías 1).

Caracterización inmunocitoquímica de los cultivos.

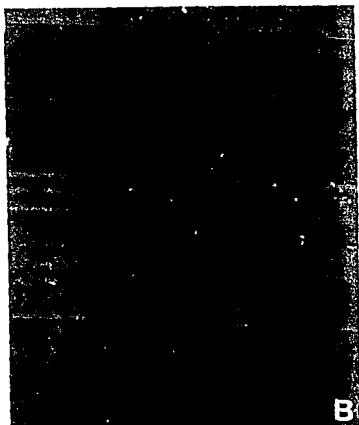
Para determinar la pureza de los cultivos se utilizó la técnica de inmunocitoquímica a la proteína ácida fibrilar de la glía (serie de fotografías 2), encontrando que efectivamente los cultivos están enriquecidos 90% en células gliales .

Cultivos en presencia de dibutiril AMP cíclico.

Se probó si el dibutiril AMP cíclico 1mM tenía influencia tanto en la morfología de las células como en la unión de L-aspartato ³H en los diferentes días in vitro en la glía de Müller, ya que se ha reportado que el dibutiril cAMP produce cambios morfológicos y fenotipos maduros en las células gliales (Moonen et al, 1976 y Moonen et al, 1975). Se encontró que en la glía de Müller en cultivo no hay influencia del dibutiril cAMP ni en la unión específica de L-aspartato ³H en los diferentes días in vitro, ni en la morfología de las células. (Gráfica 1 y serie de fotografías 3).



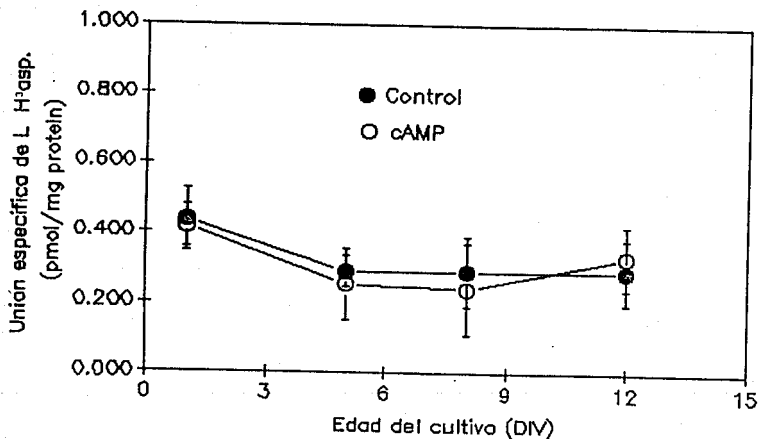
Serie de fotografías 1. Cultivo primario enriquecido en células gliales de la retina de embrión de pollo de 7 días. a) 1DIV b) 5 DIV c) 8 DIV d) 12 DIV Aumento 400 X.



Serie de fotografías 2. Cultivos de células de Müller 5 DIV marcados con el anticuerpo policlonal contra la proteína ácida fibrilar de la glía a), y sin el primer anticuerpo b). Aumento 400X.



Serie de fotografías 3. Cultivo primario de glia de Müller en presencia de 1mM de dibutilil cAMP. a)1DIV b)5DIV c)8DIV d)12DIV. Aumento 400 X.



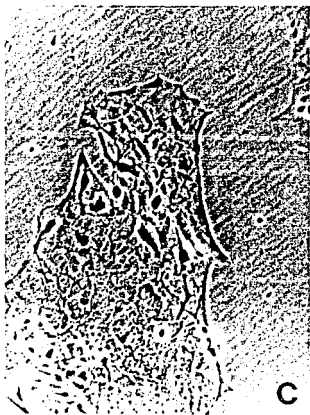
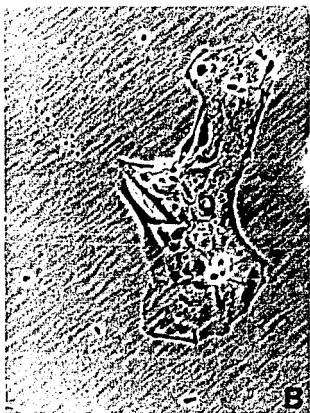
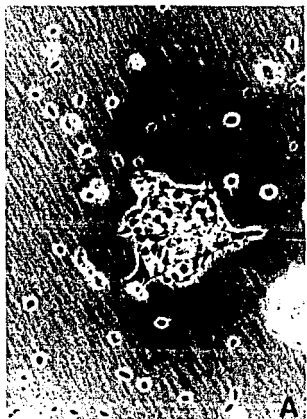
Gráfica 1. Unión específica de L-Aspartato-³H a membranas de células gliales en condición control (●) y crecidas en presencia de 1mM de dibutilil cAMP (○) donde se aprecia que no hay diferencias en la unión de aspartato-³H en las dos condiciones. Los datos son el promedio +/- error estandar mínimo de 3 determinaciones por triplicado, procedentes de cultivos diferentes.

Cultivos en presencia de quisqualato y L-glutamato.

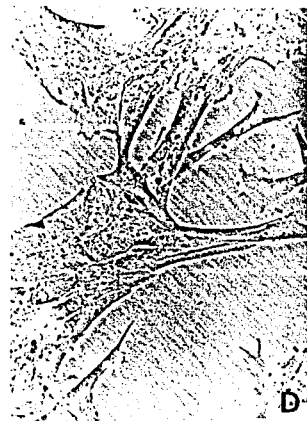
Se investigó si 100uM de glutamato o bién de su agonista el ácido quisquálico (50uM) tenían alguna influencia tanto en la morfología como en la unión específica de L-aspartato- H^3 , ya que Cornell-Bell et al (1990) reportan que (100uM) L-glutamato y quisqualato provocan cambios morfológicos en cultivos de células gliales. El ácido quisquálico se utilizó a una concentración de 50uM, porque a concentraciones de 100uM se observó un efecto gliotóxico en células de Müller.

El glutamato 100 uM no tiene influencia en las características morfológicas de la glía de Müller en ninguno de los días in vitro en que fueron examinadas (serie de fotografías 4). Tampoco presentan cambios en la unión específica de L-aspartato- H^3 con respecto al control en los diferentes días de desarrollo "in vitro" (gráfica 2).

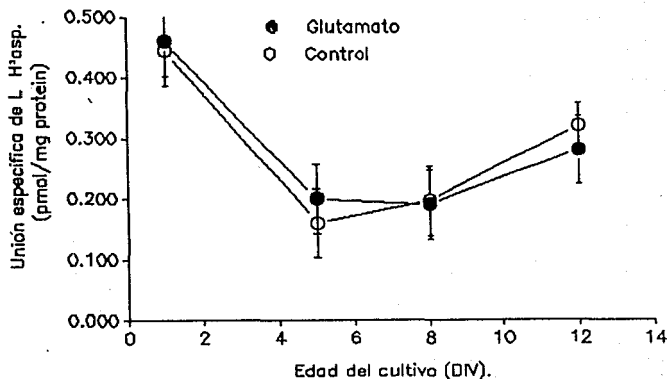
El ácido quisquálico (serie de fotografías 5) tampoco produce cambios morfológicos con respecto a los cultivos control (serie de fotografías 1), y con respecto a la unión específica de L-asp H^3 tampoco se observan diferencias significativas en esta condición con respecto a los cultivos control (gráfica 3).



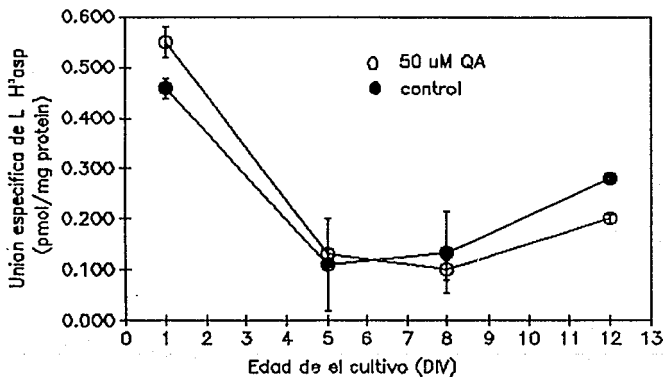
Serie de fotografías 4. Cultivo de células gliales de retina de embriones de pollo de 7 días; crecidas en presencia de $100\mu\text{M}$ de glutamato. a) 1DIV b) 5DIV c) 8DIV d) 12DIV. Aumento 400X.



Serie de fotografías 5. Cultivo de células gliales de retina de embriones de pollo de 7 días, crecidas en presencia de $50 \mu\text{M}$ de quisqualato a) 1DIV b) 5DIV c) 8DIV d) 12DIV. Aumento 400 X.



Gráfica 2. Unión específica de L-aspartato- H^3 a membranas de células gliales en condición control (O) y crecidas en presencia de $100\mu M$ de glutamato (\bullet), donde se aprecia que no hay diferencias entre el control y las células crecidas con $100\mu M$ de glutamato. Los datos son el promedio \pm error estándar mínimo de tres determinaciones por triplicado, procedentes de cultivos diferentes.



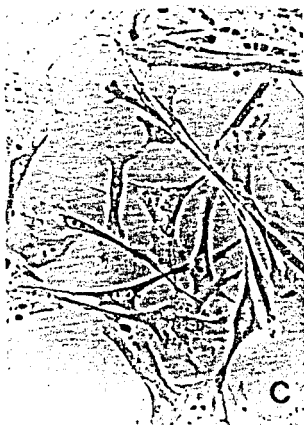
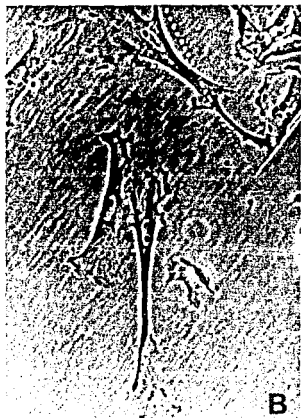
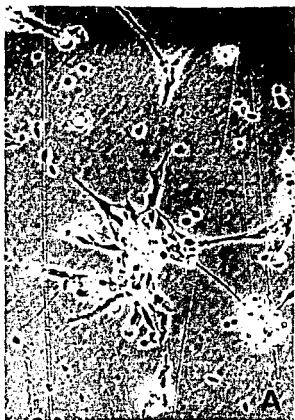
Gráfica 3. Unión específica de L-aspartato- H^3 a membranas de células gliales en condición control (●) y crecidas en presencia de $50\mu M$ de quisqualato (○). Los datos son el promedio \pm error estándar mínimo de tres determinaciones por triplicado, procedentes de cultivos diferentes.

Efecto de 1% de FCS.

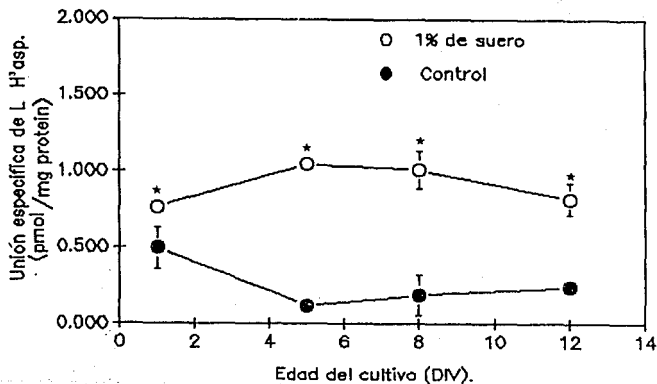
Se investigó si sembrar a las células gliales en 1% de suero y posterior cambio a 10 % de suero a las 48 hrs tenía efectos en la morfología y expresión de receptores a L-aspartato- H^3 , partiendo del hecho de que el suero posee sustancias que regulan las propiedades que presentan las células "in vitro" (Landis et al, 1990; Barres et al, 1989), y que la ausencia de suero produce cambios morfológicos como son la aparición de múltiples procesos, y la adhesión de las células al sustrato dando a las células una apariencia de células diferenciadas (Moonen et al. 1975).

La presencia de bajo suero al inicio de los cultivos provocó cambios morfológicos apreciables en las células caracterizados por una apariencia mas alargada y aplanada y una tendencia a salir del agregado celular y a verse bien delimitadas en los primeros días de desarrollo in vitro (serie de fotografías 6) en comparación con los cultivos control (serie de fotografías 1).

Se encontró asimismo que sembrar a las células en 1% de FCS, produce un incremento en la unión específica de L-aspartato- H^3 y este incremento no es reversible cuando a las células de Müller se les cambia el bajo suero por 10% de suero (condición control) (gráfica 4).



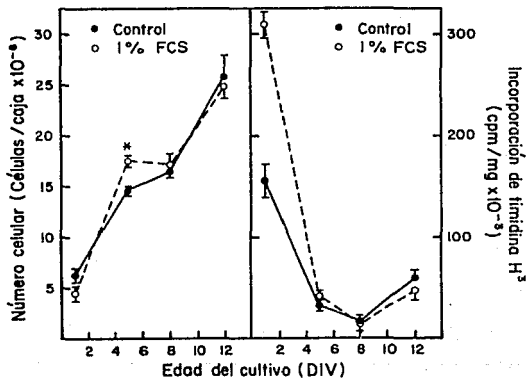
Serie de fotografías 6. Cultivo de células gliales de retina de embriones de pollo de 7 días sembradas en presencia de 1% de suero a) 1 DIV b) 5 DIV c) 8 DIV d) 12 DIV. Aumento 400X.



Gráfica 4. Unión específica de L-aspartato- H^3 a membranas de células gliales en condición control, y sembradas en medio con 1% de suero, a los 1, 5, 8 y 12 DIV donde se aprecia un aumento en la unión específica de Lasp- H^3 en las células gliales sembradas en presencia de 1% de suero en todos los días de desarrollo *in vitro*. Los datos son el promedio \pm error estandar mínimo de tres determinaciones hechas por triplicado procedentes de cultivos diferentes. * Muestra que hay diferencias significativas del control con respecto al problema, aplicando la prueba de "T de Student": 1DIV $P < 0.05$ y 5, 8 y 12 DIV $P < 0.001$.

Conteo celular y cuantificación de timidina H³

El incremento en la unión específica de L-aspartato H³ podía deberse a un aumento en el número de células o bien a un aumento en el número de receptores en las células; para discernir entre estas dos posibilidades se midió la incorporación de timidina H³ y se contó el número de células en los diferentes días de desarrollo in vitro en cultivos control y cultivos sembrados 1% de suero. Al aplicarse la prueba estadística "T de Student" se vió un aumento significativo en la incorporación de timidina H³ en células sembradas en bajo suero comparando con la condición control; en cuanto al número de células sólo se encuentra un aumento significativo a 5 DIV en cultivos sembrados en bajo suero con respecto a cultivos control. Estos resultados parecen indicar que sembrar a las células en 1% de suero produce un aumento en la síntesis de DNA a 1 DIV que trae como consecuencia un aumento en el número de células que se verá posteriormente a 5 DIV. (gráfica 5). A 12 DIV hay un aumento tanto en la incorporación de timidina H³ como en el número de células, en cultivos sembrados en medio con baja concentración de suero y en condición control. En cultivos de células de Müller en confluencia, ya ha sido reportado un aumento en el número celular, debido al contacto entre célula y célula, el cual induce incremento en la síntesis de DNA y división celular mediado posiblemente por uniones comunicantes (Burke, 1989).



Gráfica 5. Conteo celular e incorporación de timidina H³ (1 μ Ci/16.5 hrs) en cultivos control (●) y cultivos sembrados con 1% de suero (○), en diferentes estadios del desarrollo *in vitro*. Los datos son el promedio \pm error estándar de 4-6 experimentos. * Significa que hay diferencias significativas del control con respecto al problema, utilizando la prueba de "T de Student" $p < 0.01$.

Características farmacológicas de la unión específica de L-asp H^3 en células gliales sembradas con 1% de suero a 1 y 12 DIV

Las células de Müller en cultivos control presentan un perfil farmacológico para la unión de L-asp- H^3 en el que desplazan preferentemente dos tipos de análogos: los inhibidores de sitios de captura y análogos que se unen a receptores postsinápticos (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991). Con el objeto de saber si cambiaba la eficiencia con la que estos dos tipos de análogos desplazaban al L-asp- H^3 en membranas de células de Müller sembradas en medio con 1% de suero, con respecto a los cultivos control a 1 y 12 DIV se realizó un perfil farmacológico de la unión de L-asp- H^3 .

Se probó la capacidad de diferentes compuestos de competir por el sitio de unión de L-aspartato- H^3 a la membrana, llevando a cabo el ensayo en presencia de 1mM del desplazador correspondiente. Los compuestos se seleccionaron ya sea por su analogía estructural con el L-aspartato- H^3 , o bien por ser agonistas o antagonistas de los diversos subtipos de receptores de aminoácidos excitadores. Asimismo se probó el β -monohidroxamato del aspartato (HMasp), el D-aspartato y el dihidrokainato, los cuales se unen específicamente a sitios de transporte para L-glutamato, L-aspartato y D-aspartato (Drejer et al., 1983).

Como se ve en la tabla 1 cuando se siembran las células en bajo suero aumenta la eficiencia con la que desplazan al L-asp- H^3 los agonistas que se unen a sitios de captura tanto a 1 DIV como a 12 DIV. Con respecto a los agonistas de los diversos subtipos de receptores a 1 DIV el ácido quisquálico y su antagonista el

GDEE aumentan su eficiencia para desplazar al L-asp-H³. En los cultivos sembrados con 1% de suero a 12 DIV se ve que hay un aumento de la eficiencia con la que desplazan al L-asp-H³ los agonistas específicos para receptores postsinápticos: L glutamato, D-glutamato, GDEE, NMDA y AMPA.

TABLA 1

FARMACOLOGIA DE LA UNION DE L-ASPARTATO $3_H A$
 MEMBRANAS DE GLIA 1. Y 12 DIV SEMBRADAS EN 1% O 10% DE SUERO.

DIAS EN CULTIVO (DIV)

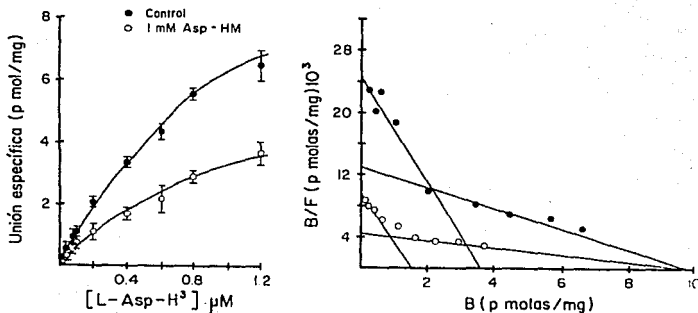
ANALOGO	1		12	
	CONTROL	1% SUERO	CONTROL	1% SUERO
L-ASPARTATO	100	100	100	100
L-GLUTAMATO	* 71	88±6.9	66	108±2 *
D-ASPARTATO	* 57	115±6.2	32	100±2.8 *
D-GLUTAMATO	48	36±4.7	54	75±1.6 *
KAINATO	-	-	30	42±7.5
QUISCUALATO	* -	77±0.5	66	42±1.6 *
AMPA	129	119±10	54	104±10 *
NMDLA	83	80±9.5	69	93±5.9 *
AP5	74	69±4.4	59	58±6
AP4	68	66±6	66	78±5.2
GDEE	* 30	79	30	79±3.5 *
HM-ASP	* 53	156±6	54	112±8.6 *
DHK	* -	60±5	51	60±1.2

Desplazamiento específico de L-aspartato H^3 25nM (10ul/175ul) por análogos de receptores de aminoácidos excitadores a concentración 1nM. Los datos representan el porcentaje de unión específica ± error estándar con respecto al control mínimo de tres determinaciones hechas por triplicado y con material procedente de cultivos independientes. * Muestra que hay diferencias significativas entre los cultivos control y los problema, en todos los casos $P < 0.05$.

Curva de saturación para L-asp H³ en células gliales 1 DIV sembradas con 1% de suero.

En este trabajo se midió la unión específica de L-asp-H³ en membranas congeladas de células gliales a 1 DIV sembradas en medio con 1% de suero, en un rango de concentraciones de L-asp-H³ de 12.5 a 1200nM (gráfica 6 izquierda), y se realizó el análisis de Scatchard de los datos (gráfica 6 der). A 1 DIV se encontró dos sistemas de unión a L-asp-H³ uno de alta afinidad $K_B=150nM$, y $B_{max}=3.6p.mol/mg$ prot (gráfica 6 der), el cual permanece en el mismo rango que los cultivos control (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991); el otro sistema es de baja afinidad $K_B=725nM$ y $B_{max}=9.8 p.mol/mg$ prot (gráfica 6 der), semejante al que se encuentra en cultivos confluentes de 12 DIV (gráfica 7 der), y no existe en cultivos control a 1 DIV (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991). El sistema de baja afinidad se inhibe competitivamente por HM-asp (inhibidor del sitio de captura de L-glu y L-asp Johnston et al, 1980), lo que parece indicar que este sistema de baja afinidad pertenece a un sitio de transporte.

GRAFICA 6. CURVA DE SATURACION DE LA UNION DE L-ASP H³ A CULTIVOS DE CELULAS GLIALES SEMBRADOS EN 1% DE SUERO 1 DIV



Curva de saturación para aspartato-H³ en membranas congeladas de glia sembradas en presencia de 1% de suero.

1% de suero:

$$K_{B1}=150nM,$$

$$B_{max1}=3.6 \text{ p.mol/mg de prot.}$$

$$K_{B2}=725nM,$$

$$B_{max2}=9.8 \text{ p.mol/mg de prot.}$$

1% de suero

$$K_{B1}=160nM,$$

$$B_{max1}=1.6 \text{ p.mol/mg de prot.}$$

+ 1mM de HM asp:

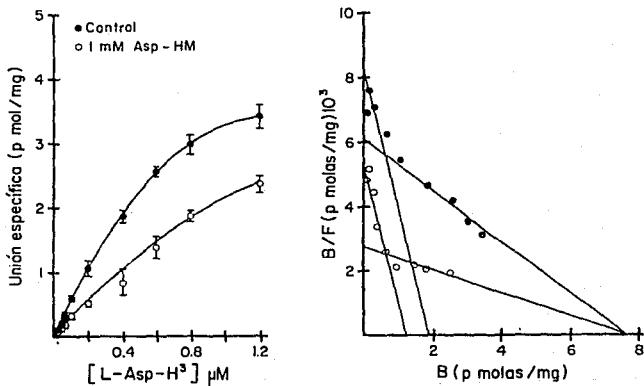
$$K_{B2}=2450nM,$$

$$B_{max2}=9.8 \text{ p.mol/mg de prot.}$$

Curva de saturación para la unión de L-asp-H³ en células de Müller sembradas 1% de suero a 12 DIV

Con el objeto de saber si los dos sitios de unión para aspartato a 12 DIV, alta afinidad $K_B=208\text{nM}$, $B_{\text{max}}=2 \text{ p.mol/mg}$ de prot y baja afinidad $K_B=1242\text{nM}$ y $B_{\text{max}}=7.4 \text{ p.mol/mg}$ de prot. (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991), cambiaban al sembrar a las células en 1% de suero, se midió la unión específica de aspartato H³ en membranas congeladas de células gliales de 12 DIV sembradas en 1% de suero en un rango de concentraciones de L-asp-H³ de 12.5 a 1200 nM (gráfica 7 izquierda) y se hizo el análisis de Scatchard de los datos (gráfica 7 der), encontrándose que no se alteraba ni la B_{max} ni la K_B de los dos sistemas al compararlos con cultivos control. Para comprobar si el sistema de baja afinidad era un sitio de captura la curva de saturación de L-asp-H³ se realizó en presencia de 1mM de HMas_p encontrando que el HMas_p inhibe competitivamente la unión específica de L-asp-H³ al sitio de baja afinidad $B_{\text{max}} \text{ control}=7 \text{ pmol/mg}$ de prot y $B_{\text{max}}^{\text{HMASp}}=7 \text{ p.mol/mg}$ de prot.

GRAFICA 7. CURVA DE SATURACION DE L-ASP H³ A MEMBRANAS CONGELADAS DE GLIA DE 12 DIV SEMBRADAS CON 1% DE SUERO



Curva de saturación de L-asp H³ a membranas congeladas, de glia a 12 DIV sembradas en presencia de 1% de suero. El ensayo esta hecho en presencia o ausencia de 1mM de HMAsp.

0 1% suero

K_{B1} =208nM

K_{B2} =1321nM

B_{max1} =1.83 p.mol/mg de prot.

B_{max2} =7 p.mol/mg de prot.

0 1% suero

+ 1mM HMAsp

K_{B1} =127nM

K_{B2} =3300nM

B_{max1} =0.7 p.mol/mg de prot.

B_{max2} =7 p.mol/mg de prot.

Efecto del suero inactivado sobre la unión específica de L-asp-H³

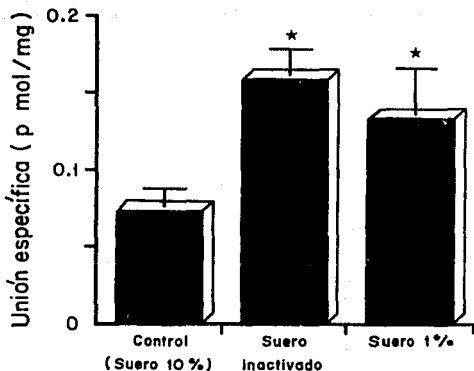
Se investigó si el efecto supresor del suero (10%) en la unión específica de L-asp-H³ podía deberse a algún factor termolábil; por esta razón se inactivó el suero calentando 30 min a 60°C, y se midió la unión específica de L-asp-H³ en cultivos de células de Müller a 5 DIV que es la edad in vitro donde se observa una mayor diferencia en la unión específica de L-asp-H³ entre cultivos control y cultivos sembrados 1% de suero.

El suero inactivado produce un aumento en la unión específica de L-asp-H³ similar al observado en cultivos de células de Müller sembrados 1% de suero (gráfica 8).

Hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato

En cultivos de 1 y 12 DIV sembrados en bajo suero o en condición control existe una población de sitios de unión a L-asp-H³ que no se inhibe competitivamente con HM-asp (gráficas 6 y 7) y posiblemente corresponda a un sitio con características postsinápticas, en estos mismos cultivos la unión específica de L-asp-H³ puede ser desplazada por análogos que actúan con receptores metabotrópicos (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991; y tabla 1). Estos datos parecen indicar que la glía de Müller posee receptores con características postsinápticas que pueden estar asociados al mecanismo de transducción que induce hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato, por esta razón en este trabajo se investigó si el sitio de alta afinidad para la unión específica de L-asp-H³ estaba asociado a la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato. Con este objetivo, cultivos control 12 DIV se incubaron con 4 μ Ci de Mioinositol H³ por 24 hrs, se estimularon

con análogos de receptores a aminoácidos excitadores (1mM concentración final), 30 min a 37°C. Se encontró que análogos de receptores a aminoácidos excitadores son capaces de promover la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato, con el siguiente orden de eficiencia L-glu>L-asp>NMDA=QA=KA y el trans ACPD que es uno de los agonistas mas específicos para producir hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato en neuronas (Schoepp et al, 1990), no produce hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato en las células de Müller (tabla 2).



Gráfica 9. Unión específica de L-asp-H³ a membranas congeladas de glía de 5 DIV sembradas en: condición control (10% de suero), con 1% de suero y con 10% de suero inactivado. Los datos son la media \pm error estándar de 3 determinaciones hechas por triplicado, cada determinación procede de cultivos diferentes. * Muestra que hay diferencias significativas entre los cultivos control y los problemas, al aplicar la prueba estadística "T de Student": suero inactivado $P < 0.001$ y 1% de suero $P < 0.05$.

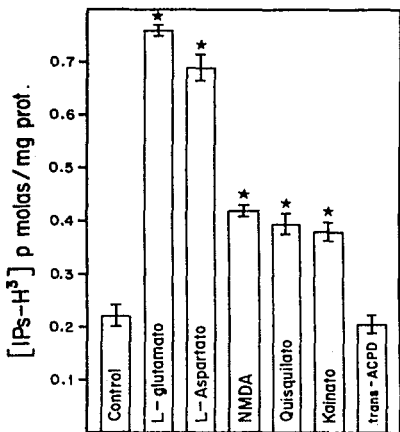


Tabla 2. Estimulación del metabolismo de fosfolinosítidos por agonistas a receptores a aminoácidos excitadores 1mM, en cultivos control de células gliales a 12 DIV. Los resultados están expresados en p.mol//mg prot y son la media \pm error estandar de 3-5 experimentos. * Muestra que hay diferencias significativas entre los cultivos control y los estimulados, al aplicar la prueba "T" Student: L-glu y L-asp $P < 0.001$; NMDA, quisqualato y kainato $P < 0.02$.

DISCUSION

El descubrimiento reciente de que las células gliales se despolarizan (Bowman y Kimelberg, 1984), a pesar de considerarse como células "no excitables" en condiciones fisiológicas (Barres, 1991) ha ampliado las posibilidades de comunicación en el SNC (Barres, 1989). Tanto los mecanismos moleculares que en condiciones normales despolarizan a estas células, como las consecuencias fisiológicas de esta despolarización se desconocen. Sin embargo, su estudio se hace esencial ya que la glía interviene no sólo en el mantenimiento de la homeostasis requerida por las neuronas (Walz, 1989), sino en procesos como el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Stewart y Coomber, 1986), la transmisión (Murphy y Pearce, 1987) y señales de calcio a larga distancia (Cornell-Bell, 1990). En el caso más concreto de la glía radial, al estar intrínsecamente relacionadas con las terminales sinápticas de las neuronas (Brew y Atwell, 1987), podrían tener un efecto directo en la modulación de las señales nerviosas.

Avances más recientes relacionados con la posible función de diferentes agentes que inducen despolarización en las neuronas, señalan que tanto astrocitos tipo 1 como tipo 2 poseen receptores a aminoácidos excitadores asociados a canales iónicos (Usovich et al, 1989, Jensen y Chiu, 1991, Willie et al 1991, Gallo et al 1989, Kettenman y Schachner, 1985, Sontheimer et al 1988). En las células gliales de Müller y los astrocitos tipo 1 existe además un transportador electrogénico de glutamato y aspartato (Brew y Attwell, 1987, Mobbs et al, 1988, Cull-Candy et al 1988, Backus et

al 1989, Clark y Mobbs 1992, Barres 1989, Sarantis y Attwell, 1990, Kimelberg et al 1989, Barbour et al 1991). Ambos sistemas al activarse producen despolarización de la membrana. Los astrocitos tipo 1 poseen además un receptor metabotrópico de aminoácidos excitadores, a través del cual se activa la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (Jensen y Chiu 1991, Glaum et al 1990, Nicoletti et al 1990, Pearce et al, 1990 y Cornell-Bell 1990).

Puesto que las células de Müller poseen receptores a aminoácidos excitadores (Brew y Attwell, 1987; Mobbs et al, 1988; Sarantis y Attwell, 1990; Barbour et al, 1991; y López-Colomé y Romo de Vivar, 1991), el objetivo general de este trabajo fué el de determinar si estos receptores sufren cambios en sus propiedades bioquímicas durante el desarrollo "in vitro", y si los mismos obedecen a señales endógenas o bien a factores extrínsecos. Asimismo se hizo una caracterización farmacológica para tratar de discernir la clase de receptores a aminoácidos excitadores presentes en las células de Müller. Con este fin se investigó el efecto de algunos compuestos así como diferentes condiciones de cultivo capaces de inducir la diferenciación celular como son: dibutiril AMP cíclico (dBu AMPc), aminoácidos excitadores (L-glutamato y quisqualato) y medio con baja concentración de suero (Moonen et al, 1975; Moonen et al, 1976; Hyndman 1984, Nicoletti et al 1989) sobre las características de los receptores de L-asp-H³. Estos experimentos se realizaron en cultivos primarios enriquecidos (90%) en células de Müller (serie de fotografías 2). Es difícil determinar la contribución de los sitios de unión a L-asp-H³ pertenecientes a las células neuronales contaminantes, sin

embargo si se comparan las Bmax de cultivos neuronales (Somohano, 1990) contra las obtenidas en nuestros cultivos a diferentes etapas del desarrollo in vitro se observa que el número de sitios de unión existentes en las células neuronales representa en el mejor de los casos un 10% del total. De esta manera nuestros resultados no se modifican de manera substancial por la presencia de las neuronas en nuestros cultivos.

Inicialmente probamos el efecto de dBu AMPc, dado que se ha demostrado que la adición de los compuestos que aumentan la concentración de AMP cíclico en la célula producen importantes cambios morfológicos en cultivos de astrocitos en confluencia, los cuales se han asociado con la diferenciación de los mismos (Moonen et al, 1975, Barres et al 1989, Moonen et al, 1986 y Fedoroff et al 1984). Sin embargo en nuestros cultivos de células de Müller la presencia de dBu AMP cíclico mantenido durante todo el desarrollo "in vitro" de los mismos, no produjo ningún cambio morfológico apreciable (serie de fotografías 3); asimismo no se modificó la unión específica de L-asp-H³ por la presencia de este análogo no hidrolizable del AMP cíclico (gráfica 1). Esta falta de efecto del dBu AMPc podría deberse a la etapa de desarrollo en la cual fueron obtenidas nuestras células, o bien a que no alcanzaron a llegar al grado de madurez, in vitro necesario para responder a este compuesto. A este respecto se ha observado que en cultivos de astroblastos de cerebro de ratón, las células gliales no responden al dBu AMPc si estas son obtenidas en las primeras etapas del desarrollo fetal (Fedoroff et al, 1984). Además los astroblastos de cerebro de ratón al igual qu

las células de Müller, no responden al dBu AMPc en los primeros 10 días de desarrollo in vitro; cuando las células han llegado a confluencia; etapa a partir de la cual reponen al dBu AMPc con cambios morfológicos (Moonen et al, 1975).

Estudios morfológicos y bioquímicos han demostrado que los aminoácidos excitadores inhiben la proliferación celular de astrocitos en cultivos primarios (Hyndman, 1984; Nicoletti et al, 1990; Condorelli et al, 1989), provocan asimismo cambios morfológicos (Cornell-Bell et al, 1989) y diferenciación en estas células (Nicoletti et al, 1990; Condorelli et al, 1989).

En este trabajo se probó la influencia de L-glutamato y L-quisqualato sobre la diferenciación morfológica de las células de Müller. Con este objetivo se estudió tanto la morfología como la unión específica de L-asp-H³ a membranas aisladas obtenidas de estas células. Los resultados indican que ninguno de estos dos compuestos provocan cambios en la morfología (serie de fotografías 4 y 5) o en la unión específica de L-asp-H³ durante el desarrollo in vitro (gráfica 2 y 3). La falta de efecto del ácido glutámico en las células de Müller podría deberse a que la captura activa de este compuesto (Somohano y López-Colomé, 1990), disminuya de manera importante la concentración del mismo del medio extracelular, impidiendo de esta manera la activación de los receptores al mismo (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991). Sin embargo este no puede ser el caso del quisqualato, dado que este análogo del glutamato no se transporta por los sitios de captura (Brew y Atwell, 1987). La falta de efecto del ácido quisquálico en las células de Müller in vitro podría deberse a que los

cultivos se realizaron en medio con suero, y se ha reportado que el efecto de los aminoácidos excitadores, en especial del ácido quisquálico en astrocitos en cultivo, se amplifica cuando las células crecen en medio sin suero o bien con baja concentración del mismo (Haas y Erdo, 1991; Nicoletti et al, 1991).

Por estudios morfológicos y bioquímicos se sabe, que el bajo suero o ausencia de este en el medio induce la diferenciación fenotípica en cultivo (Murakami y Masui, 1980; Orly et al, 1980; Moonen et al, 1976). En nuestro sistema experimental el sembrar a las células de Müller en medio con 1% de suero y un posterior cambio por medio con 10% de suero a las 48 hrs en cultivo, provoca un cambio morfológico notable (serie de fotografías 6) con respecto a los cultivos control. Desde 1 DIV las células presentan una forma fusiforme similar a la de los cultivos maduros de 12 DIV (serie de fotografías 1 y 6). El bajo suero y el suero inactivado producen un aumento en la unión específica de L-asp-H³ en las células de Müller (gráfica 4 y gráfica 9). Este incremento no puede explicarse por una estimulación en la proliferación celular ya que únicamente a los 5 DIV, se observa un aumento significativo en el número de células sembradas en medio con bajo suero con respecto a los cultivos control (gráfica 5), mientras que el incremento de la unión específica de L-asp-H³ se mantiene hasta los 12 DIV (gráfica 4). Estos resultados sugieren un aumento en el número de sitios específicos para L-asp-H³ por mg de proteína.

Las células de Müller sembradas en medio de cultivo con baja concentración de suero a 1 DIV, no sólo poseen una forma parecida

a la de los cultivos maduros a 12 DIV, sino que también presentan un sitio de unión de baja afinidad para L-asp-H³ (gráfica 6) semejante al que se encuentra tanto en cultivos maduros a 12 DIV como en retina completa (gráfica 7, López-Colomé y Romo de Vivar, 1991 y Somohano et al, 1988), el cual no se encuentra presente en cultivos control a 1 DIV (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991). Este sitio de unión de baja afinidad podría corresponder a un sitio de transporte ya que se inhibe competitivamente por el HM-asp (gráfica 6 y 7), compuesto que inhibe competitivamente el transporte electrogénico de aminoácidos excitadores en la glía de Müller de salamandra (Barbour et al, 1991). Otra evidencia de que este sitio de baja afinidad corresponde a un sitio de captura, es el aumento en la eficiencia para competir por el L-asp-H³ observado en compuestos que interactúan preferentemente con sitios de captura, mismo que no se revierte al cambiar el medio por otro conteniendo 10% de suero.

En células sembradas en medio con baja concentración de suero a 1 y 12 DIV también aumenta la eficiencia del desplazamiento del L-asp-H³ por compuestos que interactúan preferentemente con receptores de tipo quisqualato, con características postsinápticas.

Todos estos datos sugieren que la presencia de suero en el medio de cultivo, impide la expresión de sitios de baja afinidad (posiblemente de sitios de captura) y altera la eficiencia con la que diferentes compuestos desplazan al L-asp-H³ en las membranas de las células de Müller en cultivo.

Una de las principales funciones de las células gliales es la de remover el glutamato y aspartato del medio extracelular (Logan

y Snyder, 1971; Balcar y Johnston, 1972) evitando que estos compuestos lleguen a ser neurotóxicos para las neuronas (Baudry et al, 1983). La captura de L-asp-H³ ha sido medida en cultivos primarios de células de Müller observandose un aumento en la capacidad del sistema a los 5 DIV (Somohano y López-Colomé, 1990), lo cual coincide con el tiempo in vivo en que comienza la sinaptogénesis (Grosse et al, 1987). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la aparición de los sitios de captura de alta afinidad se puede regular por la concentración extracelular de suero; si en etapas tempranas del desarrollo de la retina, ocurre un accidente vascular por ejemplo la isquemia/anoxia que trae como consecuencia la extravasación de proteínas y aminoácidos del suero, o ruptura de la barrera hematoencefálica (Glumerlock, 1989), la alta concentración de suero en el fluido extracelular podría impedir la expresión de sitios de captura en las células gliales. Al no existir estos sitios de captura, no se podría retirar del medio extracelular el ácido glutámico y aspártico que se producen por un aumento de la liberación neuronal, produciéndose muerte neuronal por excitotoxicidad (Choi, 1988).

Por el momento no sabemos cual es el mecanismo intracelular que dispara la diferenciación de las células de Müller y la aparición de sus sitios de captura, una hipótesis puede ser, que se esté induciendo una especie de choque térmico. Ya que se ha visto que las proteínas asociadas a choque térmico se pueden inducir además de con choque térmico, con altas temperaturas, por estimulación con suero, por análogos de aminoácidos, por isque-

mia, o bién por procesos normales del desarrollo celular (Stoklosinski et al, 1992). En células de neuroblastoma se ha comprobado que al inducirles choque térmico se puede producir diferenciación celular (Stoklosinski et al, 1992). Se ha visto que la proteína de choque térmico Hsc70 aumenta mucho cuando las células están creciendo dividiéndose o por leves choques térmicos (Pelham, 1986, Sorger y Pelham, 1987). En la línea celular HeLa se puede inducir choque térmico al incubar estas células en ausencia de suero y después estimularlas con alto suero, en estas mismas células el gene que codifica la proteína de choque térmico Hsp70 tiene una secuencia transcripcional regulada por estimulación por suero o por choque térmico (Wu y Morimoto, 1985). En el SNC la isquemia, puede producir en neuronas y astrocitos la aparición de proteínas de choque térmico (Sprang y Brown, 1987), probablemente el aumento en la concentración de suero en el medio extracelular como consecuencia de la isquemia (Gumerlok, 1989), active la secuencia transcripcional que regula la aparición de las proteínas de choque térmico como sucede en las células HeLa (Wu y Morimoto, 1985). Todas estas evidencias llevan a pensar que los cambios morfológicos y bioquímicos observados al inducir madurez en las células de Müller en cultivo variando la concentración de suero, pueden estar relacionados con la inducción de una o unas proteínas de choque térmico las cuales no siempre están relacionadas con situaciones de tensión celular, ya que aparecen en procesos normales del desarrollo (Pelham, 1986). Para resolver esta pregunta haría falta hacer experimentos adicionales, buscando estas proteínas de choque térmico cuando las células están en presencia o en ausencia de suero, comparados con culti-

vos sometidos a choque térmico.

A 1 y 12 DIV en células de Müller sembradas en medio con 1 % de suero existe un sistema de alta afinidad que se inhibe no-competitivamente por HM-asp (gráfica 6 y 7), compuesto que inhibe no competitivamente la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato en las neuronas (Ormandy, 1992). Asimismo el perfil farmacológico de la unión específica de L-asp-H3 en membranas de células de Müller, coincide con el descrito para receptores metabotrópicos en células gliales (López-Colomé y Romo de Vivar, 1991; Nicoletti et al, 1990; Murphy y Pearce, 1988, Jensen y Chiu, 1991; Glaum et al, 1990; Cornell-Bell et al, 1990), en este trabajo se investigó la presencia de receptores metabotrópicos asociados a la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato. Nuestros resultados indican que las células de Müller tienen receptores a aminoácidos excitadores acoplados al metabolismo de fosfoinositidos con el siguiente perfil de eficiencia L-glu=L-asp>NMDA=QA=KA y el trans-ACPD el agonista mas selectivo para el receptor metabotrópico en neuronas (Schoepp et al, 1990; Farroqui y Horrocks, 1991), no induce hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato en estas células (tabla 2). En las células de Müller, astrocitos tipo 1 y células granulares del cerebelo, el L-glu, KA y QA producen hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (Nicoletti et al, 1990; Jensen y Chiu, 1991; Glaum et al, 1990; Pearce et al, 1990; Cornell-Bell, 1990; Nicoletti et al, 1986; Rauli y Wroblewski, 1991; Wroblewski et al, 1987). A diferencia de astrocitos tipo 1, la glía de Müller y las células granulares del cerebelo responden al L-asp y NMDA activando el metabolismo de

fosfoinosítidos, aunque con diferente eficiencia dependiendo del tipo celular (Nicoletti et al,1990; Jensen y Chiu,1991; Glaum et al,1990; Pearce et al,1990; Cornell-Bell, 1990; Nicoletti et al, 1986; Raulli y Wroblewski, 1991; Wroblewski et al,1987).

El hecho de que las células gliales de Müller posean un receptor asociado a la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato con características farmacológicas diferentes a las que posee el receptor encontrado en astrocitos tipo 1 se puede explicar con base en la existencia de una familia de receptores metabotrópicos de glutamato clonados recientemente (Tanable et al, 1992), la cual está codificada por genes diferentes (Tanable et al, 1992).

Los receptores a glutamato que activan el metabolismo de los fosfolípidos de inositol en neuronas, poseen características farmacológicas diferentes dependiendo del área de SNC donde se encuentren (Schoepp et al, 1990). Es posible que en las células gliales suceda lo mismo, que sus receptores posean características diferentes dependiendo del lugar donde se encuentren.

Uno de los resultados mas importantes de este trabajo fué demostrar que la glía de Müller posee sitios de unión de alta afinidad para L-asp- 3 H, que es un agonista para el receptor NMDA (rev. Watson y Abbot, 1991) (gráficas 6 y 7). La unión específica de L-asp- H_3 puede ser desplazada por NMDA y su antagonista el AP5 (rev. Watson y Abbot, 1991) (tabla 1). Tanto el NMDA como el L-asp producen hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (tabla 2). Todas estas evidencias llevan a pensar que la glía de Müller en cultivo posee receptores funcionales de NMDA acoplados a la cascada de los fosfoinosítidos. Este hallazgo es importante ya que hasta ahora solamente se han encontrado receptores no-NMDA

en las células gliales (Nicoletti et al 1990; Pearce et al, 1990; Cornell-Bell et al, 1990).

En conclusión se ha caracterizado bioquímicamente dos sitios de interacción de aminoácidos excitadores en la glia de la retina: Un sitio de interacción de baja afinidad que podría corresponder a sitios de captura electrogénica, ya que se inhibe competitivamente por el HM-asp, y otro de alta afinidad el cual posiblemente corresponde a un receptor asociado a la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato, el cual comparte características farmacológicas con el receptor expresado en astrocitos tipo 1 y en células granulares del cerebelo (Jensen y Chiu, 1991; Nicoletti et al, 1986; Wroblewski et al, 1987; Rauli y Wroblewski, 1991; Glaum et al 1990, Nicoletti et al 1990, Pearce et al 1990 y Cornell-Bell 1990). Estas dos poblaciones de receptores sufren cambios tanto durante el proceso normal de diferenciación in vitro como cuando se induce este proceso mediante cambios en la composición del medio de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adler,R., Magistretti,P, Hyndman,A. y Shoemaker,W. (1982). Purification and cytochemical identification of neuronal and non-neuronal cells in chick embryo retina cultures. DEV.NEUROSCI.5:27-39.
- 2.- Agullo,L. Picatoste,F. y Garcia,A. (1990) Histamine stimulation of cyclic AMP accumulation in astrocyte-enriched and neuronal primary cultures from the rat brain.J.NEUROCHEM.55:1592-1598.
- 3.- Anis,N. Berry,S. Busto,N. y Lodge,D. (1983) The dissociative anesthetics, ketamine and phenylclidine,selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-D-aspartate.J.PHARMACOL.79:565-575.
- 4.- Backus,K.H. Kettenman,H. y Schachner,M. (1989). Pharmacological characterization of the glutamate receptors in cultured astrocytes. J.NEUROSCI.RES. 22:274-282.
- 5.- Balcar,V. y Johnston,G. (1972) The structural specificity of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices.J.NEUROCHEM.19:2657-2666.
- 6.- Barbour,B. Brew,H. y Atwell,D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells activated dy intracelular potassium. NATURE. 335,29:433-435.
- 7.- Barbour,B. Brew,H. y Atwell,D. (1991). Electrogenic uptake of glutamate in to glial cells isolated from the salamander (ambistoma) retina. J.PHYSIOL.436:169-193.
- 8.- Barnard,E. (1992). Will the real NMDA receptor please stand up? TIPS.13:11-12.
- 9.- Barres,B. Chun,L. y Corey,D. (1989) Glial and neuronal forms of voltage-dependent sodium channel: characteristics and cell-type distribution. NEURON. 2:1375-1388.
- 10.- Barres,B. Koroshetz,W. Swartz,K. Chun,L. y Corey,D. (1990). Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. NEURON.4:507-524.
- 11.- Barres,B.(1989) A new form of transmission? NATURE. 339:343-344.
- 12.- Barres,B. (1991). New roles for glia. J.NEUROSCI. 11(12):3685-3694.
- 13.- Barres,B.(1991) Glial ion channels. CURRENT.BIOL.1:354-359.
- 14.- Barnard,E. y Henley,J. (1990). The non.NMDA receptors: types, protein structure and molecular biology. TIPS. 11:500-507.
- 15.- Barnes,D. y Sato,G. (1980) Serum-free cell culture: a

unifying approach. CELL.22:649-655.

16.- Baudry,M. Kramer,K. y Lynch,G. (1983) Classification and properties of acidic amino acid receptors in hippocampus III Supersensitivity during the postnatal period and following denervation.MOL.PHARMACOL.24:229-234.

17.- Berridge,M. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. BIOCHEM.J. 220:345-360.

18.- Berridge,M. Downes,P. y Hanley,M. (1982). Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. BIOCHEM.J. 206:587-595.

19.- Bevan,S. Chiu,S. Gray,P. y Ritchie,J. (1985). The presence of voltage-gated sodium, potassium and chloride channels in rat cultured astrocytes.PROC.R.SOL.LOND.(BIOL) 225:229-313.

20.- Bignami,A. (1984). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of goldfish retina. BRAIN.RES. 300:175-178.

21.- Bjorklund,H. Bignami,A. y Dahls,D. (1985) Immunochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Müller glia and retinal astrocytes. NEUROSCI.LETT. 54:3365-3368.

22.- Brew,H. y Attwell,D. (1987). Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. NATURE. 327,25:707-709.

23.- Brightman,M.W. y Palay,S.L. (1963) The fine structure of ependyma in the brain of the rat. J.CELL.BIOL. 19:415-439.

24.- Bowman,C. y Kimelberg,H.(1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. NATURE. 311(5987):656-659.

25.- Burke,J. (1989) Growth in retinal glial cells *in vitro* is affected deifferentially by two types of cell contact-mediated interactions.EXP.CELL.RES.180:13-19.

26.- Cambray-Deakin,M. Pearce,B. Monrrow,C. y Murphy,S.(1988) Ionic and electrophysiology properties of the retinal Müller (glial) cells of the turtle. J.PHYSIOL.362:79-92.

27.- Ćarmankrzan,M. Vigie,X. y Wise,B. (1991) Regulation by interleukin-1 of nerve growth factor secretion and nerve growth factor messenger RNA expression in rat primary astroglial cultures. J.NEUROCHEM.56:636-643.

28.- Choi,D. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. NEURON.1:623-634.

29.- Cholewisnki,A. y Wilkin,G. (1988) Bradykinin and vasopressin both stimulate phosphoinositide turnover in astrocytes in high

- serum and low serum-containing media but have no effect on (³H)thymidine incorporation. NEUROCHEM.INT. 13(3):393-396.
- 30.- Condorelli, D. Ingrassia, F. Magri, G. Bruno, V. Nicoletti, F. y Avola, R. (1989). Activation of excitatory amino acid receptors reduces thymidine incorporation and cell proliferation rate in primary cultures of astrocytes. GLIA. 2:67-69.
- 31.- Conner, J. Detwiler, P. y Sarthy, P. (1985) Ionic and electrophysiological properties of retinal Müller (glial) cells on the turtle. J. PHYSIOL. 362:79-92.
- 32.- Cornell-Bell, A. Thomas, P. y Smith, S. (1990). The excitatory neurotransmitter glutamate causes filopodia formation in cultured hippocampal astrocytes. GLIA. 3:322-334.
- 33.- Corvalan, V. Cole, R. De Vellis, J. y Hagiwara, S. (1990) Neuronal modulation of calcium channel activity in cultured rat astrocytes. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 87:4345-4348.
- 34.- Cotman, C. e Iversen, L. (1987). Excitatory amino acids in the brain: focus on NMDA-receptors. TINS. 10(7):236-265.
- 35.- Coyle, J. Biziere, K. y Shwarcz, R. (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids in the central retina. En: KAINIC ACID AS A TOOL IN NEUROBIOLOGY. (Editado por: McGeer, E. et al) Raven Press, New York. pp.177-188.
- 36.- Cuendod, M. Do, K. Grandes, P y Streit, S. (1990) Neural modulation of calcium channel activity in cultured rat astrocytes. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 87:4345-4348.
- 37.- Curtis, D. y Watkins, J. (1960) The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids. J. NEUROCHEM. 6:117.
- 38.- Delumeau, J.C. Marin, P. Cordier, J. Glowinski, J y Permont, J. (1991). Synergistic effects in alpha-adrenergic and beta 1-adrenergic regulations of intracellular calcium levels in striatal astrocytes. CELL. MOL. NEUROBIOL. 11:236-276.
- 39.- De Vellis, J. Wu, D.K. y Kumar, S. (1986) Enzyme induction and regulation of protein synthesis. En: ASTROCYTES BIOCHEMISTRY, PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY OF ASTROCYTES. Vol. II (Editado por: Fedoroff, S. y Vernadakis, A.) Academic Press. Inc. Orlando. 209-228.
- 40.- Drejer, J. Meier, E. y Schousboe, A. (1985) Characterization of uptake and release processes for D- and L-aspartate in primary cultures of astrocytes and cerebellar granule cells. NEUROCHEM. RES. 8:231-243.
- 41.- Dowling, J. (1979) Information processing by local circuits: the vertebrate retina as a model system. En: THE NEUROSCIENCES: FOURTH STUDY PROGRAM (Editado por: Smith, P. y Worden, F.) Mit

Press. Cambridge. 163-182.

- 42.- Eng, L.F. Vanderhaeghen, J.J. Bignami, A. y Gerst, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. BRAIN RES.28:351-354.
- 43.- Enna, S.J. (1980) Basic receptor methods I. En: RECEPTOR BINDING TECHNIQUES. Society for Neuroscience. Cincinnati, Ohio. 33-52.
- 44.- Eriksson, P. Hansson, E. Ronnback, L. (1990) Delta and kappa-opiate receptors in primary astroglial cultures from rat cerebral cortex. NEUROCHEM. RES. 15:1123-1126.
- 45.- Farooqui, A. y Horrocks, L. (1991) Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. BRAIN RES. REVIEWS. 16:171-191.
- 46.- Fedoroff, S. McAuley, W. Houle, J. y Devon, R. (1984) Astrocyte cell lineage. V. similarity of astrocytes that form in the presence of dBcAMP in cultures to reactive astrocytes in vivo. J. NEUROSCI. RES. 12:15-27.
- 47.- Fricke, V. (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on triton X-100. ANNAL. BIOCHEM. 63:555-558.
- 48.- Gallo, V. Guiovanini, C. Suergiu, R. y Levi, G. (1989) Expression of excitatory amino acid receptors by cerebellar cells of the type-2 astrocyte cell lineage. J. NEUROCHEM. 52(1):1-9.
- 49.- Giulian, D. y Young, D. (1986) Brain peptides and glia growth. II. Identification of cells that secrete glia-promoting factors. J. NEUROSCI. 102:814-820.
- 50.- Giulian, D. Vaca, K. y Johnson, B. (1988) Secreted peptides as regulators of neuron-glia and glia-glia interactions in the developing nervous system. J. NEUROSCI. RES. 21:487-500.
- 51.- Glaum, S. Holzwarth, J. Miller, R. (1990) Glutamate receptors activate Ca-2⁺ mobilization and Ca-2⁺ influx in to astrocytes. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 87:3454-3458.
- 52.- Gregor, P. Mano, I. Maoz, I. Mc Keown, M. y Teichberg, V. (1989) Molecular structure of the chick cerebellar kainate binding subunit of a putative glutamate receptor. NATURE. 342:689-692.
- 53.- Grosse, G. Wenzel, M. Linder, G. Meyer, U. (1987) Scanning EM observations of retina cells in culture. J. HIRNFORSCH. 28(5):479-485.
- 54.- Grüm, G. (1982) The development of vertebrate retina a comparative survey. In: ADVANCES IN ANATOMY, EMBRIOLOGY AND CELL BIOLOGY
- 55.- Gumerlok, M. (1989) Cerebrovascular disease and the blood-

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

brain barrier. En: IMPLICATIONS OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER AND ITS MANIPULATION VOL 2. (Editado por: Neuwelt, E.) Plenum medical. New York. 495-557.

56.- Hansson, E. Simonsson, P. y Alling, C. (1987). 5-hydroxytryptamine stimulates the formation of inositol phosphate in astrocytes from different regions of the brain. NEUROPHARMACOLOGY. 26:1377-1382.

57.- Haas, J. y Erdo, E. (1991) Quisqualate-induced excitotoxic death of glial cells: transient vulnerability of cultured astrocytes. GLIA. 4:111-114.

58.- Hollmann, M. O'Shea-Greenfield, A. Rogers, S. Zensen, C. Beyreuther, K. Gundelfinger, E. y Betz, H. (1989) Cloning by functional expression of a member of a glutamate receptor family. NATURE. 342:643-648.

59.- Honoré, T. (1989) Excitatory amino acid receptor subtypes and specific antagonist. MED. RES. REVIEWS. 9(1):1-23.

60.- Honoré, T. Drejer, J. Nielsen, M. y Braestrup, C. (1986) Differentiation of Cl^-/Ca^{++} dependent 3H glutamate binding to cortical membranes from rat brain by high energy. J. NEURAL TRANSMISSION. 65:94-101.

61.- Hosli, L. Hosli, E. Heuss, L. y Rojas, J. (1989) Electrophysiological evidence for receptors for vasoactive intestinal peptide and angiotensin II on astrocytes of cultured rat central nervous system. NEUROSCI. LETT. 102:217-222.

62.- Hosli, E. Hosli, L. Lefkovits, M. y Wagner, S. (1991) Electrophysiological evidence of receptors for endothelin and vasopressin on cultured astrocytes of rat spinal cord and brainstem. NEUROSCI. LETT. 131:193-195.

63.- Huettner, J. y Bean, B. (1988) Block of NMDA-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 85:1307-1311.

64.- Hydman, A. (1984) The effects of glutamate and kainate on cell proliferation in retinal cultures. OPHTHALMOL. 25:558-563.

65.- Jensen, A.M. y Chiu, S. (1990). Fluorescence measurement of changes in intracellular calcium induced by excitatory amino acids in cultured cortical astrocytes. J. NEUROSCI. 10:1165-1175.

66.- Jensen, A.M. y Chiu, S.Y. (1991). Differential intracellular calcium responses to glutamate in type 1 and type 2 cultured brain astrocytes. J. NEUROSCI. 11(6):1674-1684.

67.- Johnson, J.W. y Ascher, P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse neurons. NATURE. 325:529-531.

68.- Juurlik, B. y Hertz, L. (1985) Plasticity of astrocytes in

- primary cultures: an experimental tool and a reason for methodological caution. DEV. NEUROSCI. 7:263-277.
- 69.- Kimelberg, H.K. Pang, S. y Treble, D.H. (1989) Excitatory amino acid-stimulated uptake of $^{22}\text{Na}^+$ in primary astrocyte cultures. J. NEUROSCI. 9(4):1141-1149.
- 70.- Kuffler, S.W. y Nichols, S.S. (1977) Physiology of neuroglial cells. ERGB. PHYSIOL. 57:1-90.
- 71.- Kumar, K. Tilakaratne, P. Johnson, S. Allen, A. y Michaelis, E. (1991) Cloning of cDNA for the glutamate-binding subunit of an NMDA receptor complex. NATURE. 354:70-73.
- 72.- Lehmann, A. y Hansson, E. (1988). Morphological effects of excitatory amino acid analogs on primary astroglial cultures. NEUROCHEM. INT. 13(1):105-110.
- 73.- Logan, W. y Snyder, S. (1972) High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissue of the rat. NATURE. 234:413-431.
- 74.- López-Colomé, A.M. (1981) High-affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. NEUROCHEM. RES. 6:1019-1033.
- 75.- López-Colomé, A.M. y Romo de Vivar, M. (1991). Excitatory amino acid receptors in primary cultures of glial cells from the retina. GLIA. 4:431-439.
- 76.- López-Colomé, A.M. y Somohano, F. (1982). Characterization of (^3H)Aspartate binding to chick retinal subcellular fractions. VIS. RES. 22:1495-1501.
- 77.- López-Colomé, A.M. y Somohano, F. (1984). Localization of L-glutamate and L-aspartate synaptic receptors in chick retinal neurons. BRAIN. RES. 298:159-162.
- 78.- Lowry, O.H. Rosenbrough, W.J. Farr, A.L. y Randall, R.S. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. BIOL. CHEM. 193:256-275.
- 79.- Manor, D. Moran, N. Menehem Segal, M. (1992) Calcium dependence of serotonin-evoked conductance in C6 glioma cells. GLIA. 6:118-126
- 80.- Marriot, D. Wilkin, G. y Wood, J. (1991) Substance P-induced release of prostaglandins from astrocytes-regional specialization and correlation with phosphoinositol metabolism. J. NEUROCHEM. 56:259-265.
- 81.- Masu, M. Tanabe, Y. Tsuchida, K. Shigemoto, R. y Nakanishi, S. (1991). Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. NATURE. 349:760-765.
- 82.- Mayer, M. Westbrook, G. y Guthrie, P. (1984) Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones.

83.- Milani,D. Facci,L. Guidolin,D. Leon,A. y Skaper,S. (1989) Activation of polyphosphoinositide metabolism as a signal transducing system coupled to excitatory amino acid receptors in astroglial cells.GLIA.2:161-169.

84.- Mobbs,P. Brew,H. y Atwell,D. (1988) A quantitative analysis of glial cell coupling in the retina of the axolotl (Ambistoma mexicanum).BRAIN RES. 460:235-245.

85.- Moonen,G. Cam,Y. Sensebrenner,M. y Mandel,P. (1975) Variability of the effects of serum-free medium, dibutiryl-cyclic AMP or theophylline on the morphology of cultured new-born rat astroblasts.CELL.TISS.RES. 163:365-372.

86.- Moonen,G. Heinen,E. y Goessens,G. (1976) Comparative ultrastructural study of the effects of serum-free medium and dibutiryl-cyclic AMP on newborn rat astroblasts.CELL.TIS.RES. 167:221-267.

87.- Moriyoshi,K. Masu,M. Ishii,T. Shigemoto,R. Mizuno,N. y Nakanishi,S. (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor.NATURE.354(6348):31-37.

88.- Morgan,I. y Inghan,K. (1981). Kainic acid affects both layers of chicken retina.NEUROSCI.LETT.21:275-280.

89.- Moscona,A.A. (1983) On glutamate synthetase, carbonic anhydrase and Müller glia in the retina. En:PROGRESS IN RETINAL RESEARCH.Vol II (Editado por: Osborne,N. y Chander,G.) Pergamon Press. Oxford. 111-136.

90.- Mugnaini,E. y Walberg,F. (1964) Ultrastructure of neuroglia.ERGEB.ANAT.ENTWICKLUNGSGESCH.37:194-236.

91.- Murakami,H. y Masui,H. (1980) Hormonal control of human colon carcinome cell growth in serum-free medium.PROC.NATL.ACAD.SCI.USA.77:3464-3468.

92.- Murphy,S. y Pearce,B. (1987) Funtional receptors for neurotransmitters on astroglial cell. NEUROSCI. 22(2):381-394.

93.- Musser,G.L. y Rosen,S. (1973) Localization of carbonic anhydrase activity in the vertebrate retina.EXP.EYE.RES. 15:105-119.

94.- Nakanishi,N. Shneider,N. y Axel,R. (1990) A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties.NEURON.5:569-581.

95.- Newman,E.A. (1986) The Müller cell. En:ASTROCYTES DEVELOPMENT, MORPHOLOGY AND REGIONAL SPECIALIZATION OF ASTROCYTES.Vol.I.(Editado por:Fedoroff,S. y Vernadakis,A.)

Academic Press, inc. Orlando. 149-166.

96.- Nicoletti, F. Iadarola, J. Wroblewski, T. y Costa, E. (1986) Excitatory amino acid recognition sites coupled with inositol phospholipid metabolism: Developmental changes and interaction with α_1 -adrenoceptors. 83:1931-1935.

97.- Nicoletti, F., Magri, G., Ingrao, F., Bruno, V., Catania, M.V., Dell'Albani, P., Condorelli, D.F. y Avola, R. (1990). Excitatory amino acids stimulate inositol phospholipid hydrolysis and reduce proliferation in cultured astrocytes. J.NEUROCHEM. 54:771-777.

98.- Ogura, A. y Amano, T. (1984) Serotonin-receptor coupled with membrane electrogenesis in rat glioma clone. BRAIN.RES.297:387-391.

99.- Orkland, R.K. Nichols, J.G. y Kuffler, S. (1986) Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. NEUROSCI.LETT.72:335-340.

100.- Orly, J. y Sato, G. (1979). Fibronectin mediates cytokinesis and growth of rat follicular cells in serum-free medium. CELL.17:295-305.

101.- Ormandy, G. (1992) Inhibition of excitatory amino acid-stimulated phosphoinositide hydrolysis in rat by L-aspartate-B-hydroxamate. BRAIN RES.572:103-107.

102.- Pearce, B., Morrow, C. y Murphy, B. (1990). Further characterization of excitatory amino acid receptors coupled to phosphoinositide metabolism in astrocytes. NEUROSCI.LETT. 113:298-303.

103.- Perham, H. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. CELL.46:959-961.

104.- Rank, J. (1963) Specific impedance of rabbit cerebral cortex. EXP.NEUROL. 13: 441-474.

105.- Peters, S. Koh, J. y Choi, D. (1987). Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. SCIENCE. 236:589-592.

106.- Privat, A. y Rataboul, P. (1986) Fibrous and protoplasmic astrocytes. En: ASTROCYTES BIOCHEMISTRY, PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY OF ASTROCYTES. Vol II (Editado por Fedoroff, S. y Vernadakis, A.) Academic Press, inc. Orlando. 209-228.

107.- Raff, M. Miller, R. y Noble, M. (1983) A glial progenitor cell that develops "in vitro" in to astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. NATURE.303:390-396.

108.- Rauli, R. y Wroblewski, J. (1991) Stimulation of phosphoinositide hydrolysis by ibotenic acid in cerebellar neurons via two glutamate receptors subtypes. DRUG.DEVELOP.RES.24:375-384.

109.- Recasens, M. Pinan, J. y Bokaert, J. (1987) Chloride transport blockers inhibit the chloride dependent glutamate binding to rat brain membranes. *NEUROSCI.* 74:211-216.

110.- Robinson, S. y Dreher, Z. (1990) Müller cells in adult rabbit retinae: morphology, distribution and implications for function and development. *J.COMP.NEUROL.* 292:178-192.

111.- Sarantis, M. y Attwell, D. (1990) Glutamate uptake in mammalian retinal glia in voltage- and potassium-dependent. *BRAIN.RES.* 516:322-325.

112.- Sheardown, M. Nielsen, E. Hansen, A. Jacobsen, P. y Honoré, T. (1990) 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(F)-quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *SCIENCE.* 247:571-574.

113.- Schagner, M. Hendley-Whyte, E.T. Hsu, D.W. Schoonmaker, G. y Bignami, A. (1977). Ultrastructural localization of glial acidic protein in glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling. *J.CELL.BIOL.* 75:67-73.

114.- Schnitzer, J. (1988) Astrocytes in guinea pig, horse and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *GLIA.* 1:74-89.

115.- Schnitzer, J. Franke, W.W. y Schachner, M. (1981) Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J.CELL.BIOL.* 90:435-447.

116.- Schoepp, D. Johnson, B. Smith, E. y McQuaid, L. (1990) Stereo selectivity and mode of inhibition of phosphoinositide coupled excitatory amino acid receptors by 2-amino-3-phosphonopropionic acid. *MOL.PHARMACOL.* 38:222-223.

117.- Semple-Rowland, S. (1991) Expression of glial fibrillary acidic protein by Müller cells in rd chick retina. *J.COMP.NEUROL.* 305:582-592.

118.- Shain, W. Madelain, V. Martin, D. Kimelberg, H. Perrone, M. y Lepore, R. (1986) Activation of β -adrenergic receptors stimulates release of an inhibitory transmitter from astrocytes. *J.NEUROCHEM.* 46:1298-1303.

119.- Shain, W. Bausback, A. Fiero, A. Madelian, V. y Turner, J. (1992) Regulation of receptor-mediated shape change in astroglial cells. *GLIA.* 5:223-238.

120.- Sheardown, M. Nielsen, E. Hansen, A. Jacobsen, P. y Honoré, T. (1990) 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(F)-quinoxaline: neuroprotectant for cerebral ischemia. *SCIENCE.* 247:571-574.

121.- Somohano, F. (1990) Diferenciación de los receptores para aminoácidos excitadores en la retina. TESIS DE DOCTORADO EN

INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA (NEUROCIENCIAS).

- 122.- Somohano, F. y López-Colomé, A. (1990) Aminoácidos excitadores y plasticidad neuronal. CIENCIA. 41:111-122.
- 123.- Somohano, F. Roberts, P. y López-Colomé, A.M. (1988). Maturational changes in retinal excitatory amino acid receptors. DEV.
- 124.- Somogy, P. Eshar, N. Teichberg, V. y Roberts, J. (1990) Subcellular localization of a putative kainate receptor in bergmann glial cells using a monoclonal antibody in chick and fish cerebellar cortex. NEUROSCI. 35:9-30.
- 125.- Sontheimer, H. Kettenman, H. Bakus, K.H. y Schachner, M. (1988) Glutamate opens Na^+/K^+ channels in cultured astrocytes. GLIA. 1:328-336.
- 126.- Sontheimer, H. Black, B. Ranson, B. y Waxman, S. (1992) Ion channels in spinal cord astrocytes In Vitro I. Transient expression of high levels of Na^+ and K^+ channels. 68,4:985-1000.
- 127.- Sorger, P. y Pelham, R. (1987) Cloning and expression of a gene encoding hsc 73, the mayor hsp 70-like protein in unstressed rat cells. EMBO. J. 6:993-998.
- 128.- Sprang, G. y Brown, I. (1987) Selective induction of a heat shock gene in fibre tracts and cerebellar neurons of the rabbit brain detected by in situ hybridization. MOL. BRAIN. RES. 3:89-93.
- 129.- Stewart, P. y Coomber, B. Astrocytes and blood-brain barrier. EN: ASTROCYTES DEVELOPMENT, MORPHOLOGY, AND REGIONAL SPECIALIZATION OF ASTROCYTES VOL 1. (Editado por: Fedoroff, S. y Vernadakis, A.) Academic Press. New York. 1986. 311-323.
- 130.- Stoklosinski, A. Kruse, H. Ritcher-Landsberg, C. y Rensing, L. (1992) Effects of heat shock on neuroblastoma (NE 115) cell proliferation. EXP. CELL. RES. 200:89-96.
- 131.- Szatkowski, M. Barbour, B. y Atwell, D. (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. NATURE. 348:443-446.
- 132.- Tanabe, Y. Masu, M. Ishii, T. Shigemoto, R. y Nakanishi, S. (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. NEURON. 8:169-179.
- 133.- Usowicz, M. Gallo, V. y Cull-Candy, S. (1989) Multiple conductance channels in type-2 cerebellar astrocytes activated by excitatory amino acids. NATURE. 399:380-383.
- 134.- Vaughan, D.W. (1984) The structure of neuroglial cells. EN: CEREBRAL CORTEX. Vol. II (Editado por Jones, E.G. y Peters, A.) Plenum Press. New York. 285-327.
- 135.- Walz, W. (1989) Role of glial cells in the regulation of the

brain ion microenvironment. *PROG. NEUROBIOL.* 33:309-333.

136.- Watkins, J. (1986) Twenty-five years of excitatory amino acids research. *EN: EXCITATORY AMINO ACIDS.* (Editado por Roberts, P. y Storn-Mathisen, y Bradford, H.) Mc Millan Press. London. 1-40.

137.- Watson, S. y Abbot, A. (1991) Excitatory amino acids receptors. *TIBS. Receptor nomenclature suplement.* 3:13.

138.- Whitaker, V.D. (1984) The structure of neuroglial cell. *EN: CEREBRAL CORTEX. Vol II.* (Editado por: Jones, E.G. y Peters, A.) Plenum Press. New York. 285-329.

139.- Wilkin, G. y Levi, G. (1986). Cerebellar astrocytes. *EN: ASTROCYTES DEVELOPMENT, MORPHOLOGY, AND SPECIALIZATION OF ASTROCYTES. VOL. 1.* (Editado por: Fedoroff, S. y Vernadakis, A.). Academic Press. (1986). 245-264.

140.- Williams, K. Romano, C. Ditcher, M. y Molinoff, P. (1991) Modulation of the NMDA receptor of polyamines. *LIFE. SCI.* 48:469-498.

141.- Willie, D. Mathie, A. Symonds, C. y Cull-Candy, S. (1991) Activation of glutamate receptors and glutamate uptake in identified macroglial cells in rat cerebellar cultures. *J. PHYSIOL.* 432:235-258.

142.- Wroblewski, J. Nicoletti, E. Fadda, E. y Costa, E. (1987) Phencyclidine is a negative allosteric modulator of signal transduction at two subclasses of excitatory amino acid receptors. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* 84:5068-5072.

143.- Wu, B. y Morimoto, R. (1985) Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* 82:6070-6074.

144.- Young, A. y Snyder, S (1974) The glycine receptor: evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism. *PROC. NATL. ACAD. SCI.* 71:4002.

145.- Zhang, N. Walberg, F. Laake, J. Meldrum, B. y Ottersen, O (1990). Aspartate-like and glutamate-like immunoreactivities in the inferior olive and climbing fibre system. *NEUROSCI.* 38:61-80.