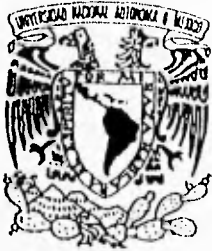


198  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVACION DE LA HIDROLISIS DE FOSFOINOSITIDOS  
POR GLUTAMATO EN LAS CELULAS DE BERGMANN DEL  
CEREBELO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ERIKA TRUEBA ELIZALDE

DIRECTOR DE TESIS DRA. ANA MARIA LOPEZ COLOME

MEXICO, D. F.

1996



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

DIRECCION DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
"Activación de la hidrólisis de fosfoinosítidos por glutamato  
en las células de Bergmann del cerebelo"

realizado por Erika Trueba Elizalde

con número de cuenta 9052239-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dra. Ana María López Colomé

*Ana María López Colomé*

Propietario Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

*María Eugenia Gonsebatt Bonaparte*

Propietario M. en IBB Gabriela Fragozo Contreras

*Gabriela Fragozo Contreras*

Suplente Dra. María Luisa Fanjul Peña

*María Luisa Fanjul Peña*

Suplente Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco

*Alicia Enriqueta Brechú Franco*

Consejo Departamental de Biología

*Alejandro Martínez Mena*

M. en C. Alejandro Martínez Mena

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

EN

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Ana María López Colomé, en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M. Se recibió apoyo del donativo CONACYT 400346-5-3375 N.

La alumna tuvo beca del Programa de Becas para tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (Fundación U.N.A.M.), durante el periodo de septiembre de 1994 a agosto de 1995.

**A mis padres Ing. Sergio Trueba Castillo y Esperanza Elizalde**

**Miranda por su apoyo incondicional.**

**A mis hermanos, Valentina, Irina, Tamara, Larissa y Aram.**

**A mis amigos**

**Bety y Angel Ramos**

**Suraya y Mónica Borrego Kim**

**Xóchitl, Irene, Angélica, Concepción, Iliana, Renata, Kenia, Gloria, Lorena,**

**Daniel y Emir**

**A mis compañeros de los laboratorios 223 N y 222N**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Dra. Ana María López Colomé por su apoyo, paciencia y comentarios en la realización de este trabajo.**

**A los miembros del Jurado, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, M. en I.B.D. Gabriela Fragoso Contreras, Dra. María Luisa Fanjul Peña y Dra. Alicia E. Brechú Franco por sus comentarios y correcciones.**

**A Gabi y Edith por su valiosa ayuda en el trabajo de laboratorio.**

**A la M. en I.B.B. Carmen Vitichis Quintero y al Taller de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., por su asesoría en los programas de computación.**

## INDICE

RESUMEN.....	2
ABREVIATURAS.....	3
I. INTRODUCCION.....	5
A. Estructura del cerebelo.....	5
1. Corteza cerebelar.....	8
B. Neuroglia.....	11
1. La neuroglia y la transmisión nerviosa.....	13
2. Glia del cerebelo.....	14
3. Receptores en las células gliales.....	15
4. Receptores a aminoácidos excitadores en las células de Bergmann.....	16
C. Receptores en el Sistema Nervioso.....	17
1. Receptores a aminoácidos excitadores.....	18
a) Receptores ionotrópicos.....	20
-Receptor NMDA.....	20
-Receptores NO NMDA.....	23
b) Receptores metabotrópicos.....	26
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO.....	30
III. MATERIALES Y METODOS.....	32
A. Cultivo de las célula de Bergmann.....	32
B. Medición de los fosfatos de inositol- $H^3$ .....	33
C. Reactivos.....	34
IV. RESULTADOS.....	36
A. Acumulación de $IPs-H^3$ por agonistas de receptores a glutamato.....	36
B. Efecto de antagonistas de los receptores a glutamato en la hidrólisis de fosfoinosítidos.....	39
C. Efecto del Calcio.....	48
D. Bloqueadores de canales de calcio.....	48
V. DISCUSION.....	53
VI. CONCLUSIONES.....	61
VII. APENDICE.....	62
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	63



## RESUMEN

Las células de Bergmann (glia radial del cerebelo), se localizan en la capa molecular de la corteza cerebelar. Los procesos de estas células están alrededor de las sinapsis que establecen las fibras paralelas y las células de Purkinje. Estas células gliales, tienen receptores a aminoácidos excitadores de tipo ionotrópico por lo que se ha sugerido una participación de la glia de Bergmann en la modulación de la sinapsis glutamatérgica mencionada. La presencia de receptores metabotrópicos, se ha demostrado en células gliales como astrocitos y células de Müller, pero no en las células de Bergmann. En el presente trabajo se investiga, si la glia radial del cerebelo presenta receptores a aminoácidos excitadores metabotrópicos acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítidos. Los resultados indican que el glutamato y sus análogos estimulan la hidrólisis de los fosfoinosítidos. El orden de potencia fué NMDA (N-metil-D-aspartato,  $EC_{50}=3.1\mu M$ )>L-glutamato ( $EC_{50}=14.8\mu M$ )>KA (Acido kaínico,  $EC_{50}=52.3\mu M$ )>QA (Acido quisquállico,  $EC_{50}=53.7\mu M$  y  $EC_{50}=69.2nM$ ) >t-ACPD (1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato,  $EC_{50}=160\mu M$ ). El orden de eficiencia fué L-glutamato, 81% > QA, 66% > NMDA, 48% > KA, 43% > t-ACPD, 32% (en % sobre el nivel basal). La estimulación producida por NMDA se bloqueó totalmente por AP5 y CPP antagonistas del sitio del neurotransmisor y MK-801 bloqueador de canal abierto del receptor tipo NMDA; la DNQX, bloqueador de los receptores NO NMDA bloqueó parcialmente (47%) y la MCPG, bloqueador de los receptores metabotrópicos no tuvo efecto. Esta estimulación requiere de la presencia de calcio externo y no se inhibe por los bloqueadores de canales de calcio tipo T y L, Verapamil y Nifedipina respectivamente, ni por Dantroleno que es un bloqueador de canales de calcio del retículo endoplásmico; la Tapsigargina, bloqueador de las ATPasas de calcio, estimuló la hidrólisis. El efecto de L-glutamato se inhibió totalmente con MK-801; el CPP bloqueó parcialmente (54%), la DNQX bloqueó débilmente y el AP5, el AP3 (antagonista no competitivo de los receptores metabotrópicos de glutamato) y la MCPG no tuvieron efecto. Estos datos sugieren la participación de receptores ionotrópicos de tipo NMDA así como de receptores metabotrópicos en la hidrólisis de los fosfoinosítidos.

## ABREVIATURAS

AAE	Aminoácidos excitadores
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5 metiloxazol-4-propionato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
1-ACPD	1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato
AP3	Acido-L-fosfonopropiónico
L-AP4	L-2-amino-4-fosfonobutanoato
AP5	Acido amino-7-fosfovalérico
L-asp	L-aspartato
L-CCG	2s,1's,2's-2-(2-carboxicilopropil)glicina
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalín-2,3-diona
(S)3C4HPG	(S)-3-carboxi-4-hidroxifenilglicina
(S)4C3HPG	(S)-4-carboxi-3-hidroxifenilglicina
(S)4CPG	(S)-4-carboxifenilglicina
CPP	Acido 3-( $\pm$ )-2-carboxypiperazin-4-il-propil-4-fosfónico
DAG	Diacilglicerol
DIV	Días <i>in vitro</i>
DNasa	Desoxiribonucleasa
DNQX	6,7-dinitroquinoxalín-2,3-diona
EDTA	Etilen diamino tetra acético
GABA	Acido $\gamma$ amino butírico
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
L-glu	L-glutamato
(S)3HPG	(S)-3-hidroxifenilglicina
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
KA	Acido kaínico
MCPG	(RS)- $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina
mGluR1-8	Receptores metabotrópicos para L-glutamato

MK-801	Maleato de dizocilpina
NFD	Nifedipina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
QA	Acido quisquálico
RE	Retículo Endoplásmico
RKB	Ringer Krebs Bicarbonato
SNC	Sistema Nervioso Central
TCP	1-(1-(2-tienil)-ciclohexil piperidina
VPM	Verapamil

## **I. INTRODUCCION**

El cerebelo y los ganglios basales participan de manera importante en el control de la función muscular, en conjunto con áreas corticales cerebrales. El cerebelo se relaciona con la coordinación del movimiento, y su extirpación o lesión no conlleva pérdida del movimiento, pero sí falta de control del mismo (Hill y Wyse, 1989). Asimismo, este órgano participa en la planeación, control y corrección de las actividades motoras.

El cerebelo recibe información acerca de la planeación de un movimiento, desde estructuras cerebrales relacionadas con la programación y ejecución del mismo; también recibe información acerca de su ejecución. Estas señales permiten al cerebelo, ser un centro de comparación, de manera que es capaz de corregir los movimientos en el momento de llevarse a cabo. Esto tiene importantes implicaciones, ya que estas correcciones dependen de la capacidad de la entrada de información para modificar los circuitos cerebelares en largos períodos de tiempo. Así la función del cerebelo puede modificarse por la experiencia, siendo relevante en el aprendizaje de las tareas motoras.

### **A. Estructura del Cerebelo.**

Anatómicamente el cerebelo se divide en 3 lóbulos: el anterior, el posterior y el flóclonodular. Los lóbulos anterior y posterior se pueden dividir longitudinalmente, observándose en la parte media del cerebelo una banda

estrecha, separada del resto del cerebelo por 2 surcos poco profundos y que se conoce como vermis. A cada lado del vermis se observan los hemisferios cerebelares: el izquierdo y el derecho. Cada hemisferio a su vez está compuesto por la zona lateral y la intermedia.

El cerebelo está organizado en tres regiones funcionales cada una con distintas conexiones anatómicas de cerebro y médula espinal. Cada región recibe información de diferentes fuentes y manda información a diferentes partes del cerebro. Estas regiones son el vestibulocerebelo, el espinocerebelo y el cerebrocerebelo (Fig. 1).

El vestibulocerebelo, que corresponde al lóbulo flóculonodular, recibe información de la médula a través de los núcleos vestibulares y manda información al núcleo vestibular lateral. A través de estas conexiones aferentes y eferentes con el núcleo vestibular, esta región controla el movimiento de los ojos y el equilibrio del cuerpo. Sus aferentes tienen como fuentes principales los canales semicirculares, que indican cambios en la posición de la cabeza, y los otolitos que indican la orientación de la cabeza con respecto a la gravedad. Estas aferentes son las únicas que llegan a la corteza cerebelar directamente de las células ganglionares de la periferia, sin relevo.

El espinocerebelo, que recibe información de la médula espinal, abarca la parte central del cerebelo denominada vermis y la zona intermedia de cada hemisferio. Las fibras del vermis hacen conexión el núcleo fastigio y la zona intermedia del hemisferio cerebeloso manda información hacia el núcleo

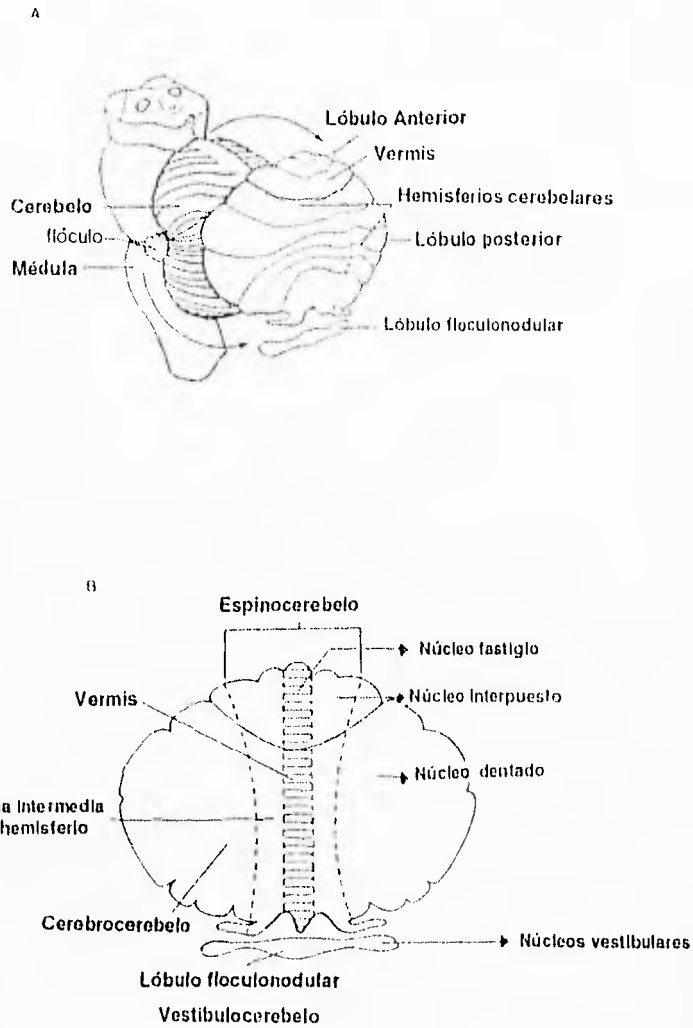


Figura 1. Regiones anatómicas (A) y funcionales del cerebelo (B). Las flechas (B) indican los núcleos, a dónde mandan información las regiones funcionales del cerebelo (Tomado de Chez, 1991 y modificado).

interpuesto. A través de estos dos núcleos profundos del tálamo, el espinocerebelo controla los componentes medio y lateral de los sistemas motores descendentes, participando en el control del movimiento de los miembros durante su ejecución.

El cerebrocerebelo es la parte lateral de cada hemisferio cerebelar, recibe información de la formación reticular pontina. El cerebrocerebelo manda información a su vez al núcleo dentado, la cual pasa al tálamo y finalmente a la corteza premotora y motora. Esta región del cerebelo tiene funciones relacionadas con la planeación e iniciación de los movimientos.

### **1. Corteza Cerebelar**

El cerebelo está compuesto de un manto externo de materia gris que es la corteza cerebelar, materia blanca y 3 pares de núcleos profundos los cuales se proyectan fuera del cerebelo y son el núcleo fastigio, el núcleo interpuesto y el núcleo dentado.

La corteza cerebelar se divide en 3 capas en donde se localizan cinco tipos de neuronas: estrelladas, de canasta, de Purkinje, Golgi y granulares. La capa más externa es la molecular, compuesta por axones de las células granulares, a los que se ha denominado "fibras paralelas". En esta capa se localizan las células estrelladas y las células de canasta, que son interneuronas. A lo largo de esta capa se extienden los árboles dendríticos de las células de Purkinje en un sólo plano perpendicular al eje principal de un *folium*.

La capa intermedia es la de las células de Purkinje, compuesta por los somas de éstas células, arreglados en una sola hilera.

La capa interna denominada capa granular contiene numerosas neuronas pequeñas que son las células granulares así como células de Golgi en la zona cercana a la capa intermedia. En este estrato se forman unas estructuras llamadas glomérulos cerebelares, que son zonas en las que se establecen los contactos sinápticos de las células granulares y las células de Golgi con fibras aferentes denominadas fibras musgosas (Fig. 2).

Las fibras musgosas constituyen las fibras aferentes principales. Se originan de una variedad de núcleos del tallo cerebral y de neuronas en la médula espinal. Las fibras musgosas transmiten información indirectamente a las neuronas de Purkinje en el glomérulo, a través de la sinapsis que establecen con las células granulares que son interneuronas excitadoras. Los axones de las células granulares ascienden hacia la capa molecular, donde se bifurcan y forman las fibras paralelas, que hacen sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje, orientadas perpendicularmente a las mismas. Otro tipo de aferente al cerebelo son las fibras trepadoras, que se originan en el núcleo de la oliva inferior de la médula. Los axones entran a la corteza y envuelven el soma y las dendritas de las células de Purkinje, estableciendo contactos sinápticos de tipo excitador. Cada fibra trepadora hace contacto sólo con 1 a 10 neuronas de Purkinje y cada célula de Purkinje recibe la entrada sináptica de una sola fibra trepadora (Chez, 1991).



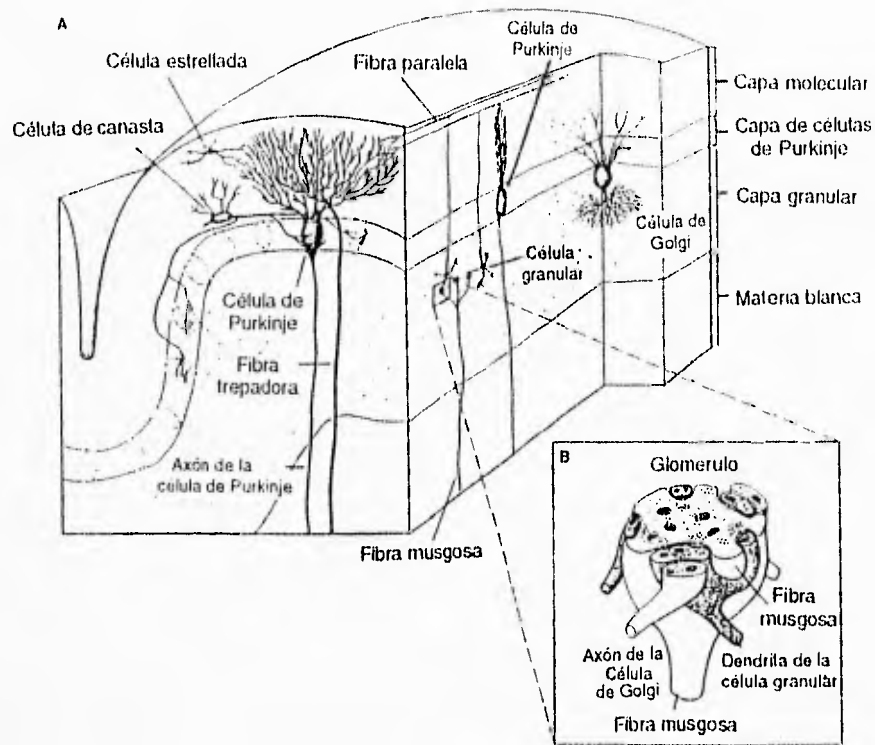


Figura 2. Corteza Cerebelar

La corteza cerebelar está dividida en 3 capas: molecular, de células de Pukinje y granular. En esta figura se puede observar a) la distribución de los cinco tipos de neuronas del cerebello y b) el glomérulo cerebelar en detalle (Tomado de Chez, 1991 y modificado).

Las fibras paralelas también hacen sinapsis con las dendritas de las células estrelladas, las células de canasta y las células de Golgi, interneuronas de tipo inhibitorio que modulan la actividad de las células de Purkinje, neuronas principales y única vía de salida de información del cerebelo.

Las células estrelladas presentan axones cortos que hacen contacto con las dendritas cercanas de las células de Purkinje en la capa molecular, mientras que las células de canasta alineadas perpendicularmente a las fibras paralelas hacen contacto con el soma de células de Purkinje distantes. Así cuando un grupo de fibras paralelas excita a una hilera de neuronas de Purkinje y las células de canasta vecinas, las células de canasta excitadas inhiben la onda de salida excitadora de las células de Purkinje. Las células de Golgi localizadas en la capa granular tienen un elaborado árbol dendrítico en la capa molecular, donde reciben su principal entrada (excitadora) de las fibras paralelas (Chez, 1991).

## **B. Neuroglía**

En el sistema nervioso, se han descrito células que se localizan alrededor de las neuronas y sus axones; estas células inicialmente descritas por Rudolf Virchow en 1846, se han llamado en general células gliales o neuroglia (Nicholls et al, 1992). Se calcula que hay entre 10 y 50 veces más de estas células que neuronas en el sistema nervioso central de los vertebrados.

Las células gliales se han dividido en 2 clases principales: microglia y macroglia. La microglia está formada por células fagocíticas que se movilizan después de un daño o infección. Estas células tienen un origen mesodérmico, ya que se originan de una población específica de leucocitos mononucleares, que penetran la barrera hemato-encefálica durante los períodos cercanos al nacimiento tanto fetales como postnatales (Jacobson, 1991). La macroglia son células de origen ectodérmico (Whittaker, 1984) y se han dividido en tres grupos: los oligodendrocitos, las células de Schwann y los astrocitos.

Los oligodendrocitos y las células de Schwann son células pequeñas con pocos procesos, que se encargan de formar la capa de mielina que aísla a los axones de las neuronas incrementando así la conducción de las señales eléctricas. Aunque tienen una misma función, la localización en el sistema nervioso es diferente; los oligodendrocitos están en el sistema nervioso central y las células de Schwann forman la mielina en el sistema nervioso periférico.

Los astrocitos tienen forma irregular y procesos relativamente largos. Se ha visto que estas células participan en varias funciones en el sistema nervioso. Aunque no son parte constitutiva de la barrera hemato-encefálica, los procesos de los astrocitos que hacen contacto con los capilares sanguíneos inducen la formación de las uniones estrechas en las células endoteliales, que impiden el paso de sustancias tóxicas al sistema nervioso. Algunos astrocitos tienen pies terminales que hacen contacto con neuronas y con vasos sanguíneos, por lo que se ha sugerido que tengan función de nutrir a las neuronas, aunque esto no

está comprobado. También se ha visto que al igual que la microglia, remueven restos neuronales y ayudan a sellar después de un daño. El potencial de reposo de los astrocitos está determinado exclusivamente por su alta permeabilidad al potasio; como consecuencia, los astrocitos amortiguan el exceso de potasio liberado por las neuronas cuando su actividad es alta (Kandel, 1991).

### **1. La neuroglia y la transmisión nerviosa**

Debido a que las células gliales no reciben ni forman sinapsis, es claro que no pueden participar en los circuitos locales de la manera que lo hacen las neuronas. Sin embargo, la presencia de receptores para neurotransmisores en las células gliales sugiere que podría existir una vía de comunicación con las neuronas. Además, las células gliales en algunos casos sintetizan y liberan neurotransmisores, como sucede en las células de Schwann del axón gigante de calamar que sintetiza y libera acetilcolina (Heumann *et al*, 1981). Se ha propuesto que células gliales podrían participar en la potenciación a largo plazo, ya que sintetizan y liberan ácido araquidónico. Este neuromodulador induce a largo plazo un incremento de la transmisión en el hipocampo (Williams *et al*, 1989). Las células gliales exhiben un alto grado de plasticidad en respuesta a las señales neuronales; cambios a largo plazo en las propiedades de membrana de las células gliales podrían mediar cambios a largo plazo en la función de la sinapsis (Barres, 1991). Ya que no se tiene una evidencia directa de la participación de la neuroglia en la transmisión nerviosa, el estudio de éstas

células es de gran importancia para el entendimiento integral del sistema nervioso.

## **2. Glia del Cerebelo**

Las tres principales clases de glia en el cerebelo se distribuyen en diferentes capas: los oligodendrocitos en la materia blanca, los astrocitos en la capa granular y las células de Bergmann en la capa molecular (Teichberg, 1991).

Las células de Bergmann: son células astrogiales especializadas, a las que también se les denomina células epiteliales de Golgi. El soma de estas células se encuentra en la capa de células de Purkinje y presentan numerosos procesos conocidos como fibras de Bergmann, que se extienden radialmente hacia la piamadre. Estas células tienen importancia en la migración de las células granulares en las últimas etapas del desarrollo, cuando ya se ha formado la capa molecular del cerebelo (Rakic, 1971). Tienen como origen al linaje celular de la glia radial (Choi y Lapham, 1980) y en el desarrollo se reporta que se originan del techo del IV ventrículo, una de las dos zonas germinales en el cerebelo (Jacobson, 1991). Recientemente se ha demostrado mediante técnicas de inmunohistoquímica, con marcadores astrogiales (Vimentina, GFAP y la proteína S-100) que existen células precursoras de las células epiteliales de Golgi en la capa granular externa del cerebelo, que es la segunda zona germinal en este órgano (Sievers, 1994).

Las células de Bergmann identificadas en cultivo se caracterizan, por su morfología fusiforme, por la unión de un anticuerpo monoconal para la proteína que une kainato, por la unión de un ligando de alta afinidad para el receptor a glutamato tipo kainato llamado kainil-albúmina sérica bovina y un marcador glial citoplásmico, la vimentina (Ortega *et al*, 1991).

Las células de Bergmann se ramifican en las sinapsis que establecen las fibras paralelas y las células de Purkinje (Somogy *et al*, 1990) y se ha estimado que una célula de Purkinje puede hacer contacto con alrededor de 14 células de Bergmann (Fisher *et al*, 1988). La relación de las células de Bergmann con las neuronas de Purkinje ha sido estudiada por Fisher (1993), quien ha sugerido que es indispensable esta asociación para la expresión fenotípica normal de la células de Bergmann.

### **3. Receptores en las células gliales**

En las células gliales se han encontrado *in vitro* e *in vivo*, receptores a neurotransmisores. Se han visto receptores para glutamato y GABA en astrocitos *in vitro*, con características similares a su contraparte en neuronas. Los astrocitos en cultivo también expresan receptores para neurotransmisores que activan sistemas de señales intracelulares como son: incremento de las concentraciones intracelulares de diacilglicerol, fosfatos de inositol, calcio, AMPc y GMPc, compuestos que pueden modular la actividad de canales iónicos y enzimas (Barres, 1991). En las células de Müller, glia radial de la retina, se ha

demostrado la estimulación de la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) por la activación de receptores a aminoácidos excitadores (López-Colomé *et al*, 1993).

#### **4. Receptores a aminoácidos excitadores en las células de Bergmann**

Se han localizado *in situ*, sitios de unión para kainato en las células de Bergmann (Somogy *et al*, 1990), que corresponden a receptores para glutamato tipo AMPA/kainato funcionales. Estos receptores podrían modular la eficiencia de las sinapsis glutamatérgicas entre las fibras paralelas y las espinas de las células de Purkinje, y por tanto tener un papel en los cambios plásticos de la transmisión sináptica (Ortega *et al*, 1991). Mediante estudios de unión específica de ésteres de forbol marcados, se ha demostrado que la estimulación de este receptor se traduce en la activación y translocación de la proteína cinasa C dependiente de Ca<sup>2+</sup> y diacilglicerol, del citosol a la membrana (Cid y Ortega, 1993), lo que implica una ruta de segundos mensajeros. Mediante técnicas de hibridación *in situ* y análisis de "Northern blot" con pruebas de oligonucleótidos para los RNA mensajeros que codifican las subunidades del receptor tipo AMPA/kainato, se encontró que las células de Bergmann expresan los RNA mensajeros para las subunidades GluR1 (GluRA), GluR3 (GluRC) y GluR4 (GluRD), pero no expresan la subunidad GluR2 (GluRB) (Burnashev *et al*, 1992a; López *et al*, 1994), lo que implica que el canal del receptor tiene una gran permeabilidad al Ca<sup>2+</sup>. Se han hecho registros mediante la técnica de

"patch-clamp" en las células de Bergmann, encontrándose que la relación corriente/voltaje del receptor de tipo kainato es sigmoide; también se demostró una corriente entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por kainato y bloqueada por CNQX así como por bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, lo que confirma que el canal del receptor de tipo kainato es permeable al calcio (Müller *et al*, 1992).

Receptores tipo NMDA, considerados como exclusivos de las neuronas, se encontraron en células fusiformes de preparaciones de rebanadas de cerebelo de ratón. La aplicación de NMDA (1 mM) en estas células generó corrientes entrantes, respuesta obtenida también con homocisteato y bloqueada por ketamina pero no por CNQX. Utilizando Fura-2, colorante sensible al  $\text{Ca}^{2+}$ , no se observó cambio en la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  después de la aplicación de NMDA, cambio que sí se observa al aplicar kainato. Los receptores tipo NMDA de las células de Bergmann tienen características funcionales diferentes de las que presentan en las neuronas: la relación corriente voltaje es lineal, y la respuesta no se modula por glicina ni por  $\text{Mg}^{2+}$  (Muller *et al*, 1993).

### **C. Receptores en el Sistema Nervioso**

La comunicación en el sistema nervioso se debe al establecimiento de las sinapsis, contactos especializados entre las neuronas. Las sinapsis pueden ser de dos tipos: eléctricas y químicas. En el primer tipo la transmisión nerviosa se debe al flujo directo de corriente de la neurona presináptica a la neurona postsináptica mediante uniones comunicantes (gap junctions). En las sinapsis



químicas los neurotransmisores se liberan al espacio sináptico, llegan a la neurona postsináptica e interactúan con un receptor en la membrana. Los receptores son proteínas y se clasifican por su mecanismo de acción, en ionotrópicos y metabotrópicos.

Los receptores ionotrópicos son complejos de subunidades proteicas que al ser activados sufren un cambio conformacional que abre un canal iónico; están compuestos por 5 subunidades que se arreglan de manera pentagonal en la membrana. Cada subunidad presenta 4 dominios transmembranales, y el segundo segmento transmembranal constituye el canal (Nakanishi, 1992). Los receptores metabotrópicos están acoplados a las proteínas G, que desencadenan una vía metabólica con la producción de segundos mensajeros, los cuales pueden actuar sobre un canal o bien sobre enzimas denominadas Cinasas de Proteínas. Estas a su vez pueden fosforilar un canal o actuar sobre la proteína que regula el canal. Estos receptores consisten de una sola cadena polipeptídica, que tiene 7 dominios transmembranales (Kandel *et al*, 1991) (Fig. 3).

### **1. Receptores a aminoácidos excitadores**

Los receptores a aminoácidos excitadores son los receptores a neurotransmisores más abundantes en el sistema nervioso de los vertebrados (Barnes y Henle, 1992). La mayoría de las sinapsis excitadoras en el sistema nervioso central usan glutamato como neurotransmisor y estos receptores están

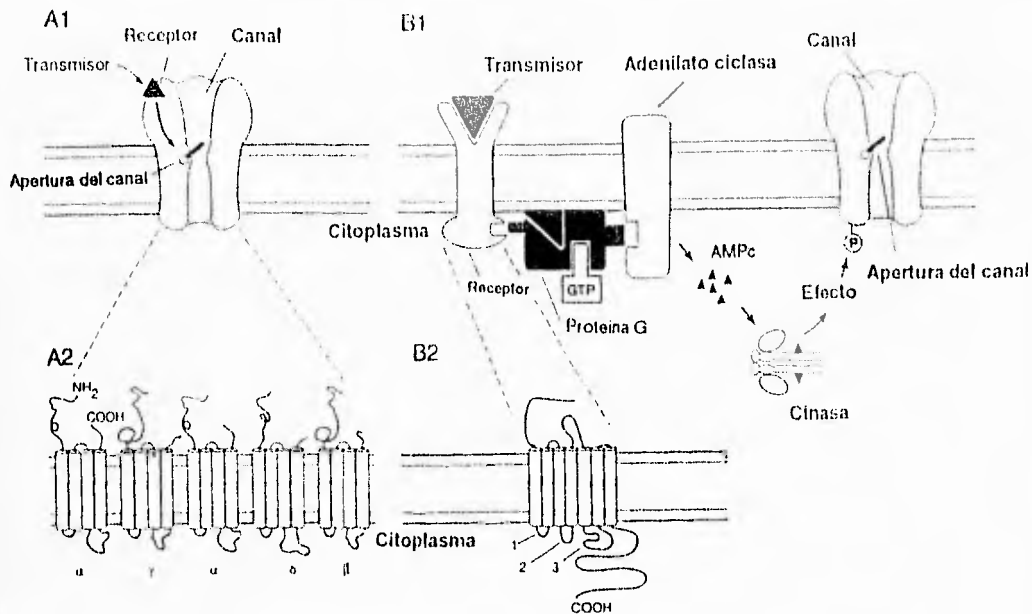


Figura 3. Receptores ionotrópicos y metabotrópicos

A) Los receptores ionotrópicos se activan y abren directamente el canal iónico que forma parte del receptor (A1). Este tipo de receptor está compuesto por 5 subunidades que se arreglan de manera pentagonal en la membrana. Cada subunidad presenta 4 dominios transmembranales, y el segundo segmento transmembranal constituye el canal (A2).

B) Los receptores metabotrópicos están formados por una cadena polipeptídica que presenta 7 dominios transmembranales (B2). Al estimular un receptor metabotrópico, se activa una proteína G, activándose una ruta de segundos mensajeros. La proteína G, estimula a la adenilato ciclasa, enzima que produce AMP cíclico (AMPc) a partir de ATP (B1). El AMPc activa a la cinasa de proteína dependiente de AMPc (Cinasa) que fosforila un canal iónico.

(Tomado de Kandel, 1991 y modificado).

implicados en la adquisición de la memoria, el aprendizaje y algunas enfermedades neurodegenerativas (Nakanishi, 1992).

Los receptores a aminoácidos excitadores se han clasificado con base en su mecanismo de transducción en ionotrópicos y metabotrópicos.

#### a) Receptores Ionotrópicos

Estos receptores se han dividido con base en características farmacológicas y electrofisiológicas en receptores tipo NMDA y tipo NO NMDA.

##### -Receptor NMDA.

Este receptor está formado por un complejo proteico que forma un canal catiónico poco selectivo y del que se pueden distinguir farmacológicamente 5 sitios diferentes del sitio de reconocimiento al neurotransmisor, a través de los cuales se modifica la actividad del receptor (Barnes y Henley, 1992). Los sitios en el receptor NMDA, son: sitio de glicina, sitio para antagonistas alostéricos, sitio de unión del  $Mg^{2+}$  dependiente de voltaje, sitio de unión del  $Zn^{2+}$  (Monaghan *et al*, 1989) y un sitio de unión para las poliaminas (Williams *et al*, 1991) Los receptores de NMDA se localizan preferentemente en la corteza, los ganglios basales y las áreas asociadas con los sistemas sensoriales, presentando las concentraciones más altas en el área CA1 del hipocampo (Monaghan y Cotman, 1985). El receptor tiene un peso molecular de 200 KD (Tomado de Somohano y López-Colomé, 1990). Por el análisis de unión de ligandos al receptor NMDA se ha concluido que hay 2 distintos sitios de unión (o

estados) en el sitio de reconocimiento del neurotransmisor, uno que une preferentemente agonistas y otro que une preferentemente antagonistas (Monaghan *et al*, 1989).

Johnson y Asher (1987) descubrieron que la glicina incrementa notablemente la acción de los agonistas de NMDA, aunque no activa por sí misma al receptor; esta estimulación no se inhibe por estriquina, bloqueador del receptor inhibitor de glicina. Se ha demostrado que la estimulación provocada por la glicina se debe tanto al aumento en la frecuencia de apertura del canal del receptor como a una disminución en el tiempo de inactivación del mismo (Monaghan *et al*, 1989).

El sitio para antagonistas alóstericos, se localiza en el lumen del canal del receptor: se ha visto que la unión de compuestos que se unen a este sitio como la fenilciclidina y el maleato de dizocilpina (MK-801) se incrementa por la presencia de glutamato y glicina (MacDonald y Nowak, 1990), por lo que se consideran como bloqueadores de canal abierto.

El  $Zn^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  bloquean las corrientes producidas por NMDA, al interactuar con sitios diferentes del receptor. El  $Mg^{2+}$  se une a un sitio en el interior del canal y produce un bloqueo dependiente del voltaje, mientras que el bloqueo por  $Zn^{2+}$  no es dependiente del voltaje y se ha sugerido que existen 2 sitios de unión para este ión en el exterior del canal (Williams *et al*, 1991).

Las poliaminas espermina y espermidina potencian la unión de los antagonistas no competitivos tales como el MK-801 y la TCP (Ransom y Stec,

1988) y afectan la unión de ligandos en los sitios de reconocimiento del neurotransmisor y de la glicina (Williams *et al*, 1991).

El canal iónico que forma el receptor es altamente permeable al  $\text{Ca}^{2+}$ , así como al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$ , esto tiene una importante implicación, ya que los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se alteran al activarse el receptor. Este incremento en  $\text{Ca}^{2+}$  inicia procesos bioquímicos que probablemente se relacionen tanto con la plasticidad neuronal como con la muerte celular (Monaghan *et al*, 1989).

Mediante técnicas de biología molecular se han clonado y expresado en ovocitos de *Xenopus*, los receptores de tipo NMDA. Se ha encontrado una familia de estos receptores. La subunidad NMDAR1 posee las propiedades características del receptor NMDA como la permeabilidad al calcio, el bloqueo por  $\text{Mg}^{2+}$  dependiente del voltaje y el sitio para glicina, así como el perfil farmacológico que se presenta en las neuronas. Esta subunidad puede formar una estructura homoligomérica que produce un complejo canal-receptor funcional. Existe otra subunidad, la NMDAR2 de la que existen 4 cadenas codificadas por genes diferentes, en las que no se observa una apreciable respuesta electrofisiológica a los agonistas del receptor. Por lo anterior se piensa que el receptor nativo es heteromérico y que la subunidad NMDAR1 es fundamental para la actividad del canal, mientras que los diferentes miembros de las subunidades NMDAR2 modulan esta actividad (Nakanishi, 1992).

#### -Receptores NO NMDA

En este grupo se encuentran varios tipos de receptores que tienen en común un agonista que es el glutamato, los antagonistas competitivos 6-ciano-7-nitroquinoxalín-2,3-diona (CNQX) y 6,7 dinitroquinoxalín-2,3-diona (DNQX), y su activación no depende del voltaje (Tomado de Somohano y López-Colomé, 1990; Bettler y Mulle, 1995). Los receptores NO NMDA están formados por subunidades de aproximadamente 900 residuos de aminoácidos y un peso molecular aparente de cerca de 100 kDa. El patrón de hidrofobicidad sugiere 4 dominios transmembranales. Estos receptores se han dividido en receptores tipo AMPA y receptores tipo Kainato y se han encontrado 4 genes que codifican las subunidades del primero y 5 que codifican las subunidades del segundo (Bettler y Mulle, 1995). Estas subunidades se han denominado para el receptor tipo AMPA: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4, y para el receptor Kainato: GluR5, GluR6, GluR7, KA-1 y KA-2 (Fig. 4). Los receptores que incorporan las subunidades GluR1/-2/-3/-4 presentan propiedades como las de los receptores nativos para AMPA. Las subunidades GluR5/-6/-7 y las subunidades KA-1 y KA-2 se ensamblan para formar receptores que presentan características de los receptores a kainato. Mediante estudios de unión específica en células transfectadas se ha comprobado que las subunidades del receptor a kainato no tienen afinidad por el [<sup>3</sup>H]-AMPA mientras que las subunidades del receptor AMPA no unen significativamente [<sup>3</sup>H]-kainato (Werner *et al*, 1991; Bettler *et al*, 1992). Con esta misma técnica se demostró que mientras que las subunidades

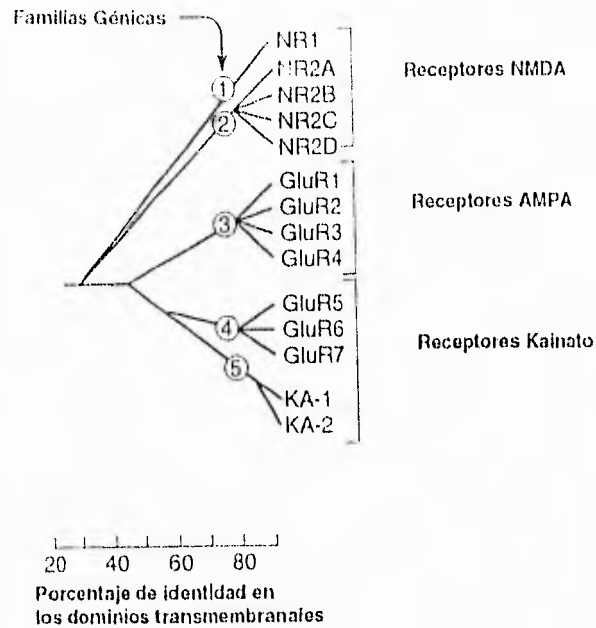


Figura 4. Relaciones estructurales de las subunidades de los tipos de receptores a glutamato clonadas. Las secuencias de las proteínas fueron comparadas en los dominios transmembranales. Cada subunidad presentada se codifica por un gen diferente. En las familias génicas (numeradas) se agrupan las subunidades que están estrechamente relacionadas (Tomado de Dingledine y McBain, 1994).

GluR5/-6/-7 unen kainato con baja afinidad, las KA-1/-2 lo hacen con alta afinidad; estas últimas se han descrito en neuronas. Las subunidades del receptor AMPA pueden ensamblarse tanto en configuraciones homoméricas como heteroméricas, con propiedades funcionales distintas. Lo anterior se ha corroborado en el caso de la subunidad GluR2, que confiere al receptor heteromérico la característica de baja permeabilidad al  $Ca^{2+}$  (Hollmann *et al*, 1991), mientras que receptores homoméricos y heteroméricos ensamblados de las subunidades GluR1/-3/-4 son significativamente permeables a  $Ca^{2+}$ . Esta propiedad única de la subunidad se debe al cambio de un aminoácido del segundo segmento transmembranal, por un mecanismo de edición que convierte el codon CAG (glutamina) presente en los transcritos de GluR1-4, en el codón CGG (arginina) que se encuentra en los RNA mensajeros maduros de la subunidad GluR2 (Burnashev *et al*, 1992b). Receptores sin la subunidad GluR2 se han encontrado en pequeñas poblaciones celulares: neuronas del hipocampo, células bipolares y glia de Müller de la retina y las células de Bergmann del cerebelo (Nakanishi, 1992).

Las subunidades del receptor kainato GluR5 y GluR6 pueden formar receptores homoméricos así como receptores heteroméricos en combinación con las subunidades KA-1 o KA-2 (Bettler y Mülle, 1995).

Proteínas que unen kainato (KBP- kainate-binding protein) con secuencias homólogas a las subunidades identificadas en mamíferos se han clonado en pollo y rana. En comparación con las subunidades del receptor a



glutamato, estas proteínas parecen estar truncadas por aproximadamente 250 residuos de aminoácidos en el extremo amino terminal. La KBP une [<sup>3</sup>H]-kainato con alta afinidad, y esta unión se inhibe por agonistas glutamatérgicos (Wada *et al*, 1989; Gregor *et al*, 1989).

Los receptores AMPA tienen un perfil farmacológico para los agonistas diferente del que se observa en los de kainato. Para los receptores kainato estudiados por unión de radioligandos el orden en potencia de los agonistas es kainato>glutamato>AMPA mientras que para los receptores AMPA es AMPA>glutamato>kainato (Dingledine y McBain, 1994). Los receptores tipo AMPA (antes denominados quisqualato) se localizan en el área CA1 del hipocampo, corteza cerebral, ganglios basales y áreas sensoriales en el sistema nervioso central. Los receptores tipo kainato se localizan en el hipotálamo, capas corticales profundas, núcleo reticular del tálamo, cuerpos mamilares, núcleo del puente y fibras Mossy del hipocampo (Somohano y López-Colomé, 1990).

#### b) Receptores Metabotrópicos.

Estos receptores como ya se mencionó, son proteínas estructurales con 7 regiones transmembranales, están acoplados a una proteína G, y tienen un dominio extracelular largo.

Se han clonado 8 receptores metabotrópicos para glutamato y se han denominado mGluR1- mGluR8 (Pin y Duvoisin, 1995). Estudios en rebanadas de cerebro, en cultivos de neuronas y cultivos de glia, sugieren que los mGluRs

están acoplados a sistemas de segundos mensajeros como son la activación de hidrólisis de fosfoinosítidos, activación de la fosfolipasa D, incremento o disminución en la formación de AMP cíclico, y modulación de canales iónicos (Shoep y Conn, 1993).

La relación de los mGluR con vías de segundos mensajeros se muestra en la tabla siguiente:

Clona	Longitud (aminoácidos)	Vía Efectora
mGluR1 $\alpha$	1199	Hidrólisis de fosfoinosítidos Aumento en la producción de AMP cíclico Aumento de ácido araquidónico
mGluR1 $\beta$	906	Hidrólisis de fosfoinosítidos.
mGluR2	872	Disminución en la producción de AMP cíclico
mGluR3	879	Disminución en la producción de AMP cíclico
mGluR4	912	Disminución en la producción de AMP cíclico
mGluR5	1171	Hidrólisis de fosfoinosítidos.
mgluR6	871	Disminución en la producción de AMP cíclico
mGluR7	915	Disminución en la producción de AMP cíclico
mGluR8	881	Disminución en la producción de AMP cíclico

(Según Schoepp y Conn, 1993; Nakajima *et al*, 1993; Okamoto *et al*, 1994; Duvoisin *et al*, 1995)

Por sus características, los diferentes mGluRs clonados se han dividido en 3 grupos. El primero contiene a los mGluR1 y mGluR5 cuyo agonista más potente es el quisqualato. El segundo contiene a los mGluR2 y mGluR3, siendo la L-CCG su más potente agonista. Y el tercer grupo abarca al resto de los mGluR (4,6,7 y 8) en los que el L-AP4 es el agonista principal. Los grupos I y II son sensibles a t-ACPD, no así el grupo III. Otros compuestos que afectan a los mGluRs son los derivados de fenilglicina como son: la MCPG (antagonista del efecto de t-ACPD), la (S)3HPG (agonista de los mGluRs acoplados a la vía de IPs); la (S)4C3HPG, la (S)3C4HPG y la (S)4CPG son antagonistas para el mGluR1, pero son agonistas para el mGluR2 (Pin y Duvoisin, 1995).

La distribución de los receptores metabotrópicos para glutamato en el cerebro es diferencial. Mediante localización *in situ* se ha encontrado que el mensajero para mGluR1 está concentrado en el giro dentado y áreas CA2-CA4 del hipocampo de rata, mientras que el RNA mensajero para mGluR5 está específicamente localizado en las células piramidales de las áreas CA1-CA7 del hipocampo y células granulares del giro dentado (Schoepp y Conn, 1993).

Como ya se mencionó, los receptores metabotrópicos están acoplados a vías de segundos mensajeros. Una de éstas vías es la producción de IP<sub>3</sub>: al interactuar los neurotransmisores con su receptor la proteína G a la que están acoplada activa a la fosfolipasa C, que hidroliza al fosfatidil 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC), que se transloca del citosol a la membrana y fosforila

a proteínas específicas. El  $IP_3$  interactúa con receptores específicos en la membrana del retículo endoplásmico de donde el  $Ca^{2+}$  es liberado al citosol, aumentando así las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Agranoff y Fisher, 1994) (Fig. 5).

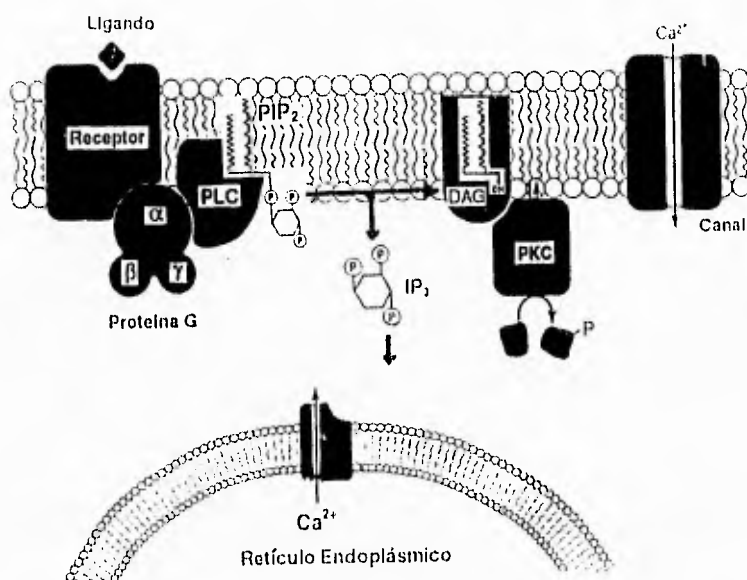


Figura 5. Producción de  $IP_3$  (Tomado de Agranoff y Fisher, 1994 y modificado).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO

Los receptores para neurotransmisores no son exclusivos de las neuronas; se ha visto que las células gliales presentan receptores para glutamato y GABA, entre otros (Barres, 1991). Esto implica que la glia tiene la capacidad de responder a los estímulos externos, aunque de manera diferente a como lo hacen las neuronas.

Las células de Bergmann (glia radial del cerebelo), presentan una disposición particular en la arquitectura del cerebelo, atravesando la capa molecular de la corteza cerebelar. Los procesos de estas células envuelven a la sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (Somogy et al, 1990) por lo que se ha sugerido una participación de la glia de Bergmann en la dinámica de esta vía de comunicación (Teichberg, 1991).

Se han identificado receptores ionotrópicos a aminoácidos excitadores en las células de Bergmann (Müller y Kettenmann, 1995). Aunque se ha demostrado la presencia de receptores metabotrópicos en astrocitos (Barres, 1991), en la glia radial del cerebelo no se han localizado.

La hidrólisis de fosfoinosítidos está asociada a los receptores metabotrópicos a glutamato mGluR1 y mGluR5 (Schoepp y Conn, 1993), sin embargo, en las células de Müller, glia radial de la retina, se sugiere que los receptores ionotrópicos son los responsables de la síntesis de fosfatos de inositol (López-Colomé et al, 1993).

El objetivo de este trabajo es demostrar la presencia de receptores metabotrópicos a glutamato acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítidos en las células de Bergmann y caracterizarlos farmacológicamente. Estos datos permitirán establecer una comparación con los receptores a aminoácidos excitadores en neuronas, y tratar de esclarecer la función de la glia radial en el proceso de la neurotransmisión.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### A. Cultivo de las células de Bergmann

Las células de Bergmann se cultivaron según el método descrito por Ortega y col. (1991). Se obtuvieron los cerebelos de embriones de pollo de 15 días, se cortaron en pequeños trozos y se incubaron en medio Puck (NaCl 8 g/l, KCl 0.40 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0.012 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0.154 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.39 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15g/l, Glucosa 1.10 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 0.35 g/l y Rojo de fenol 0.005 g/l) con tripsina 0.125% y DNasa a 0.1%, para disociar el tejido. El medio de Puck se retiró por decantación y se sustituyó por medio Eagle, modificación de Dulbecco, con 10% de suero bovino fetal, glutamina 2mM y 0.2% de antibióticos (50,000 U de penicilina, 50 mg de streptomina, 5000 U de nistatina/ml de solución stock) y DNasa 0.1%. En este medio se trituró el tejido por aspiración con una pipeta Pasteur y se pasó por una malla del no. 21. La masa celular triturada se dejó sedimentar por 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se descartó el sedimento. El sobrenadante se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. El botón que se obtuvo se resuspendió en el medio Eagle, modificación de Dulbecco<sup>1</sup> (sin DNasa). Se cuantificó el número de células con un contador Coulter Modelo ZB1 (Coulter Electronics, Inc.), y se comprobó su viabilidad por el método de exclusión con azul de Tripano (Adams, 1988). La suspensión celular se diluyó a un millón de células/ml. Las células se sembraron en placas de 6 pozos con

---

<sup>1</sup> Ver apéndice.

36mm de diámetro y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 6). Durante 7 DIV (días *in vitro*).

Las células de los cultivos fueron identificadas como células de Bergmann, ya que los cultivos fueron inmunopositivos para el anticuerpo monoclonal de la proteína que une kainato (KBP), para el anticuerpo de la vimentina y para el ligando de alta afinidad kainil-albúmina sérica bovina para el receptor a glutamato tipo kainato (Como se reporta en Ortega *et al*, 1991).

#### **B. Medición de los fosfatos de inositol-H<sup>3</sup>.**

Cultivos primarios confluentes de células de Bergmann con 7 DIV, se incubaron en presencia de 2μCi de mio-inositol-[<sup>3</sup>H] (precursor del fosfatidil inositol 4,5- bifosfato) por 16-24 horas, a 37°C. Al final de la incubación se eliminó el medio y los cultivos se lavaron 3 veces con 1.5 ml de Ringer Krebs Bicarbonato (RKB) que contenía NaCl 118 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucosa 5.6 mM y LiCl 10 mM. Posteriormente, cada cultivo se incubó con 1.5 ml del RKB 10 mM durante 10 minutos, para inhibir con el Li<sup>+</sup> a la monofosfatasa, que convierte al IP<sub>1</sub> en inositol. Después de ese tiempo se añadieron los antagonistas y agonistas. En el caso de los antagonistas, 10 minutos antes que los agonistas para bloquear su efecto. El tiempo de estimulación fué 30 minutos. Al finalizar el período de incubación con los antagonistas y/o agonistas, el medio se eliminó por aspiración. Se añadió un mililitro de Cloroformo/Metanol (1:2) a cada pozo para parar la reacción, y



después de 20 minutos, las células se levantaron por fricción con un agitador de vidrio y se colectó la suspensión. Los pozos se lavaron con 0.75 ml de agua y 0.5 ml de cloroformo sucesivamente, y se juntaron los extractos. La mezcla se agitó y centrifugó a 1000 g por 10 minutos. Se colectó 1 ml de la fase superior acuosa, se diluyó con 2 ml de agua, y se aplicó a columnas con 0.5 g de resina Dowex AG1-X8 (forma formiato). La columna se lavó sucesivamente con 10 ml de mio-inositol 5 mM, con 10 ml de una solución de formiato de sodio 60 mM y tetraborato de sodio 5 mM, y finalmente con 2 ml de formiato de amonio 1 M y ácido fórmico 0.1 M, para eluir los fosfatos de inositol (IP<sub>1</sub>, IP<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub>) (Berridge et al, 1983). A los eluados se les añadió 10 ml de Tritosol y la radiactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido (Fricke, 1975).

De cada experimento se determinó la cantidad de proteína de 2 multipozos, por el método de Lowry *et al* (1951).

### **C. Reactivos.**

El mio-inositol [<sup>3</sup>H] (Actividad Específica= 20-23.45 Ci/mmol) fué de DuPont NEN Research Products, los agonistas y antagonistas de los receptores a aminoácidos excitadores empleados fueron de Trocris-Cookson, excepto glutamato, kainato y nifedipina que fueron de Sigma y el MK-801 obtenido de Research Biochemicals International. El suero bovino fetal, los antibióticos, la Dnasa, el mio-inositol, el formiato de sodio, el tetraborato de sodio, el ácido fórmico, el formiato de amonio se obtuvieron de Sigma. El medio Eagle modificación de Dulbecco se obtuvo de Gibco BRL Life Technologies.



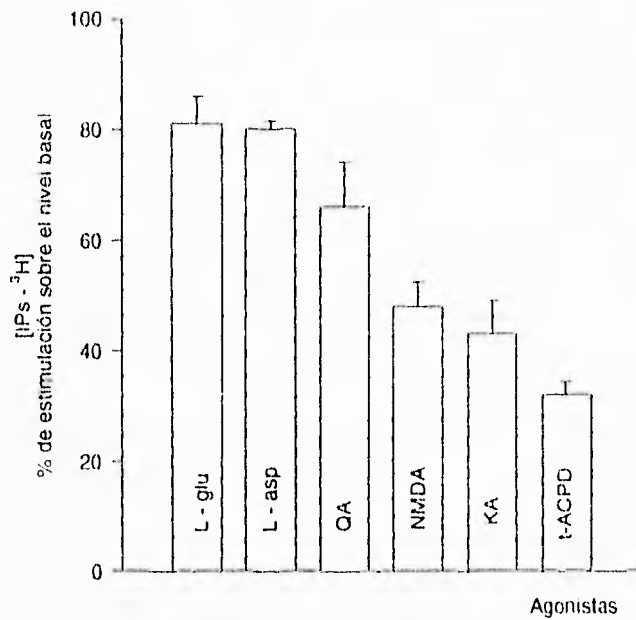
Figura 6. La fotografía muestra a un cultivo representativo de células de Bergmann, con 4 días *in vitro* (DIV); a esta edad se pueden ver los límites celulares. Los cultivos se incubaron en medio Eagle, modificación de Dulbecco, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Aumento 20X.

#### IV. RESULTADOS

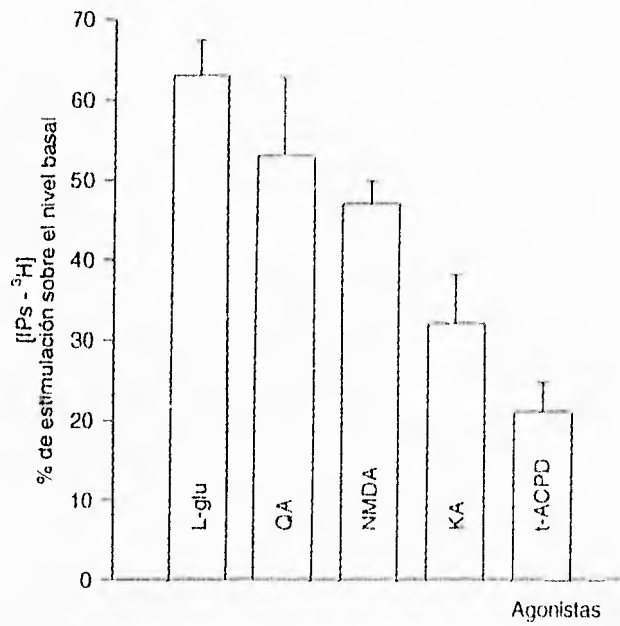
##### A. Acumulación de $IPs-H^3$ producida por agonistas de receptores a glutamato

Se presenta el efecto de los agonistas de los diferentes subtipos de receptores a glutamato, sobre la hidrólisis de los fosinosítidos en la glia radial del cerebelo (glia de Bergmann), en cultivos primarios confluentes de 7 DIV. Las células se estimularon con agonistas a dos concentraciones, 1 mM y 200  $\mu$ M, por 30 minutos a 37°C. El orden de eficiencia obtenido a una concentración de 1 mM fué: L-glu (81%)>L-asp (80%)>OA (66%)>NMDA (48%)>KA (43%)>t-ACPD (32%) (Gráfica 1). El perfil de eficiencia a 200  $\mu$ M fué el mismo L-glu (63%)>QA (53%)>NMDA (47%)> KA (32%)>t-ACPD (21%); el porcentaje de estimulación sobre el nivel basal fué ligeramente menor que a 1 mM (Gráfica 2). El L-asp sólo se probó a una concentración de 1 mM, debido a que es un agonista general de los receptores a AEE. El agonista general del receptor metabotrópico, t-ACPD, fué el menos eficiente. El NMDA, agonista de uno de los tipos de receptores ionotrópicos, tuvo la misma eficiencia a ambas concentraciones.

Para determinar la potencia de los agonistas en la producción de  $[IPs H^3]$  se hicieron curvas dosis-respuesta, a partir de las cuales se calculó el orden de potencia: NMDA ( $EC_{50}=3.1 \mu$ M)>L-glu ( $EC_{50}=14.8 \mu$ M)>KA ( $EC_{50}=52.3 \mu$ M)>QA ( $EC_{50}=53.7 \mu$ M y  $EC_{50}=69.2$  nM)>t-ACPD ( $EC_{50}=160 \mu$ M). El tiempo de estimulación fué de 30 minutos a 37°C (Gráficas 3-7).



Gráfica 1. Efecto de agonistas (1mM), sobre la producción de fosfatos de inositol en cultivos primarios de células de Bergmann. El orden de eficiencia L-glutamato (L-glu, n=12)=L-asp (n=2)>QA (n=5)>NMDA (n=10)>KA (n=6)>t-ACPD (n=7). El tiempo de estimulación fué de 30 minutos. Cada experimento fué realizado por triplicado. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES.



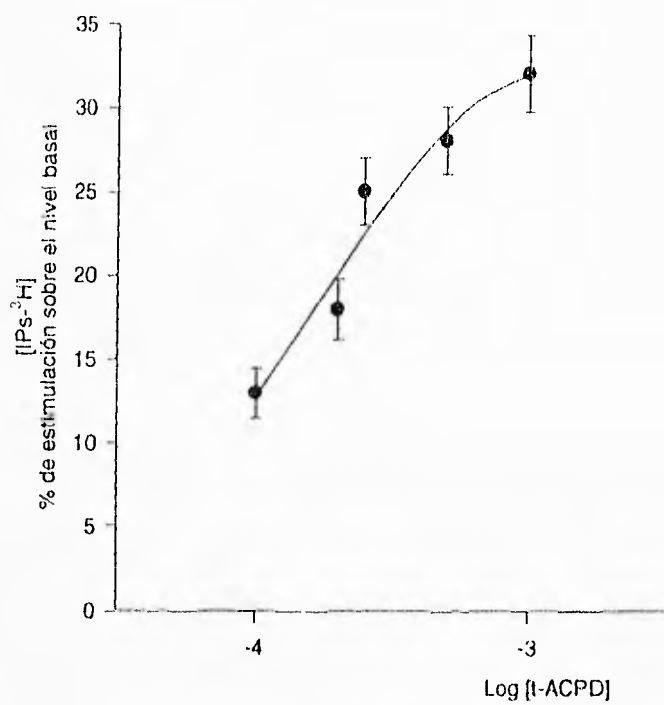
Gráfica 2. Efecto de agonistas (200 $\mu$ M) sobre la producción de fosfatos de inositol en cultivos primarios de células de Bergmann. El orden de eficiencia fue L-glu (n=10)>QA(n=3)>NMDA (n=21)>KA (n=3)<t-ACPD (n=5). Cada experimento se realizó por triplicado. El tiempo de estimulación fue de 30 minutos. Los resultados son la media  $\pm$  ES.

Para ver el tiempo en que se empiezan a producir los fosfatos de inositol, así como, el tiempo en que se tiene una estimulación máxima se hizo una curva de tiempo. La producción de fosfatos de inositol en células de Bergmann se observó desde 1 minuto de incubación con NMDA 200  $\mu$ M, con 18 % de estimulación sobre el nivel basal, alcanzando un máximo a los 20 minutos con 49% de estimulación (Gráfica 8).

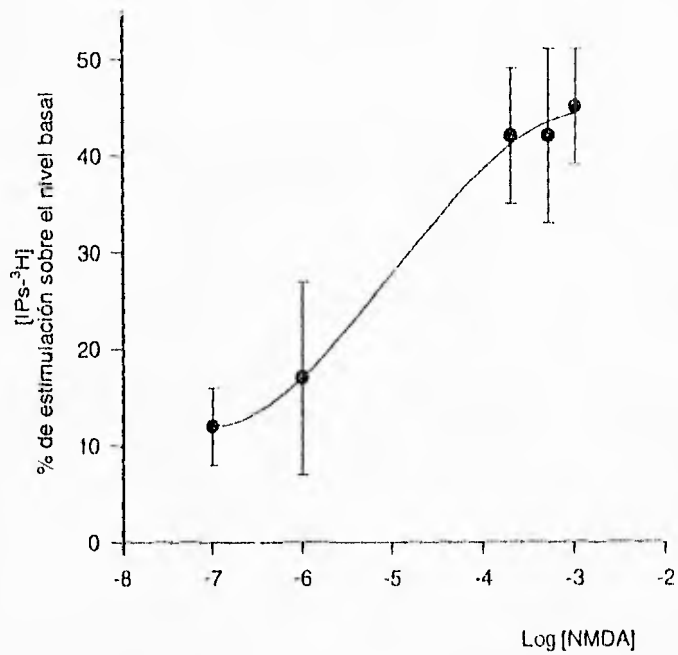
#### **B. Efecto de antagonistas de los receptores a glutamato en la hidrólisis de fosfoinosítidos**

Para determinar las características farmacológicas del receptor implicado en la producción de fosfatos de inositol (IPs- $H^3$ ) en cultivos de células de Bergmann, se estudió el efecto de antagonistas sobre la estimulación producida por NMDA (200  $\mu$ M) y L-glutamato (200  $\mu$ M).

El CPP (200  $\mu$ M), antagonista del sitio del neurotransmisor del receptor de tipo NMDA bloqueó totalmente el efecto del NMDA (Gráfica 10); la estimulación provocada por L-glutamato sólo se afectó parcialmente, disminuyendo 54% (Gráfica 11). Al investigar el efecto de otro antagonista del mismo tipo, se encontró que a una dosis de 200  $\mu$ M el AP5 inhibía totalmente la estimulación provocada por NMDA (200  $\mu$ M), mientras que no tuvo efecto sobre la estimulación por L-glutamato (Gráficas 10 y 11).

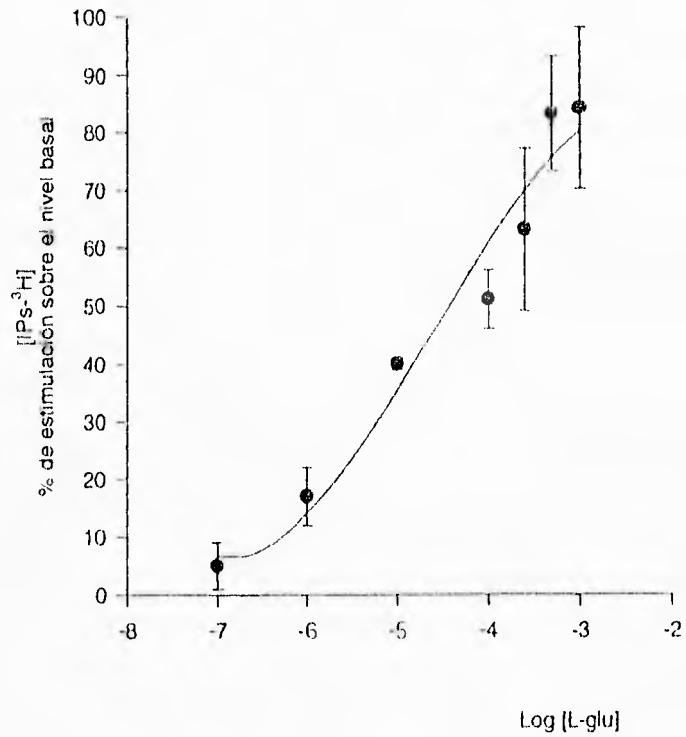


Gráfica 3. Curva dosis-respuesta de t-ACPD. Los cultivos se incubaron por 30 min. en presencia del agonista. Cada punto es el promedio de por lo menos 3 experimentos realizados por triplicado  $\pm$  ES.

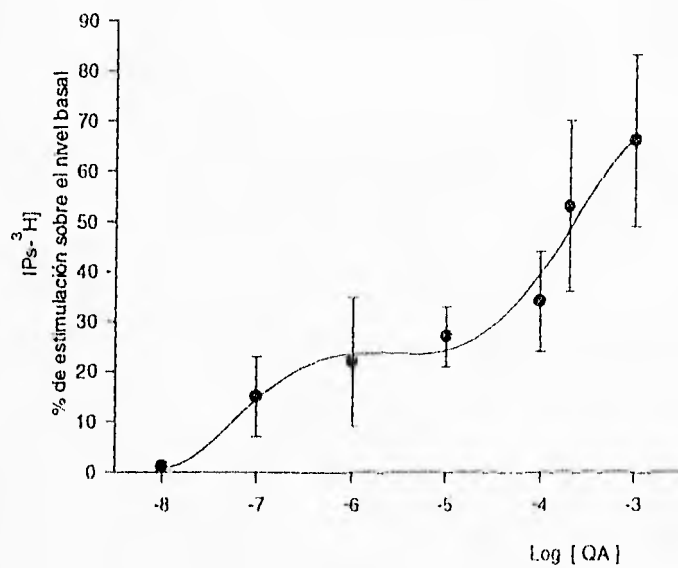


Gráfica 4. Curva dosis-respuesta de NMDA. Los cultivos se incubaron por 30 minutos en presencia del agonista. Cada punto es el promedio de por lo menos 3 experimentos realizados por triplicado  $\pm$  DS.

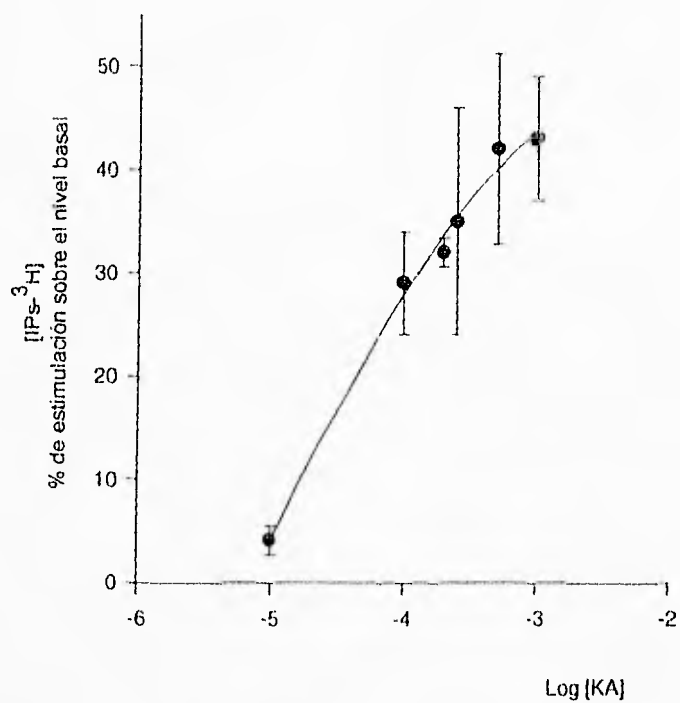




Gráfica 5. Curva dosis-respuesta de L-glutamato. Los cultivos se incubaron por 30 min en presencia del agonista. Cada punto es el promedio de por lo menos 3 experimentos realizados por triplicado  $\pm$  DS.



Gráfica 6. Curva dosis-respuesta de QA. Los cultivos se incubaron por 30 min. en presencia del agonista. Cada punto es el promedio de por lo menos 3 experimentos realizados por triplicado  $\pm$  D.S.



Gráfica 7. Curva dosis-respuesta de KA. Los cultivos se incubaron 30 min. en presencia del agonista. Cada punto es el promedio de por lo menos 3 experimentos  $\pm$  ES.

El MK-801 es un bloqueador de canal abierto del receptor NMDA y en las células de Bergmann inhibió totalmente tanto la estimulación con NMDA como la estimulación por L-glutamato (Gráficas 10 y 11).

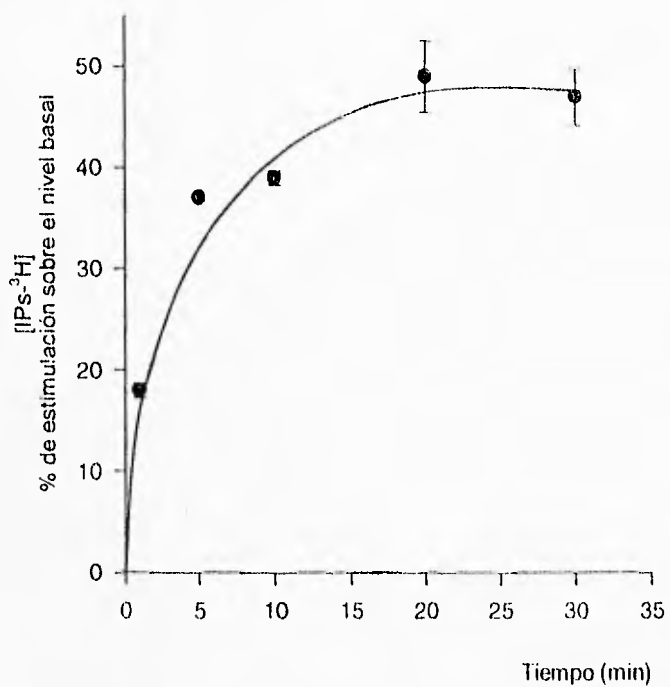
Como ya se mencionó, se han identificado receptores tipo AMPA/kainato funcionales que permiten la entrada de calcio y se bloquean por antagonistas del tipo de las quinoxalinas. Para ver si la hidrólisis de fosfoinosítidos estaba relacionada con este receptor, se probó la DNQX (50  $\mu\text{M}$ ) que bloqueó en un 47% el efecto de NMDA (200  $\mu\text{M}$ ), y un efecto poco significativo sobre el L-glutamato (200  $\mu\text{M}$ ) (Gráficas 10 y 11). El AP3 (200  $\mu\text{M}$ ) antagonista no competitivo (Tomado de López-Colomé *et al*, 1993) o agonista parcial (Schoepp, 1993) en los receptores metabotrópicos de glutamato, no tuvo efecto sobre la estimulación provocada por L-glutamato (200  $\mu\text{M}$ ) (Gráfica 11).

Recientemente se han sintetizado agonistas y antagonistas del receptor metabotrópico de glutamato (Walkins y Collingridge, 1994). Con el fin de ver si el receptor relacionado con la activación de la fosfolipasa C, era sensible a estos compuestos, se investigó si la MCPG considerada como antagonista, afectaba la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato. Los resultados muestran, que la MCPG (250  $\mu\text{M}$ ) no inhibió el efecto de los agonistas L-glu (200  $\mu\text{M}$ ) y NMDA (200  $\mu\text{M}$ ) en las células de Bergmann; por el contrario se observa un incremento en la estimulación provocada por los agonistas (Gráficas 10 y 11).

Tabla 1. Eficiencia y potencia de los agonistas para AAE para inducir la síntesis de IPs

Agonista	EC50 ( $\mu\text{M}$ )	Estimulación máxima (% de estimulación)
NMDA	3.1	48 $\pm$ 4.4
L-glu	14.8	81 $\pm$ 5
KA	52.3	32 $\pm$ 6
QA	53.7	66 $\pm$ 8
	0.0692	23.5
t-ACPD	160	32 $\pm$ 2.3

Los resultados de la eficiencia están en porcentaje de estimulación sobre el nivel basal, y son la media  $\pm$ ES. El número de experimentos realizados fue: NMDA (N-metil-D-aspartato), n=10; L-glu (L-glutamato), n=12; KA (kainato), n=6; QA (quisqualato), n=5 y t-ACPD (1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato), n=7. Cada experimento se hizo por triplicado. La curva de concentración de los agonistas, abarcó un intervalo de  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-3}$  M. Los resultados son el promedio de por lo menos 3 experimentos realizados por triplicado.



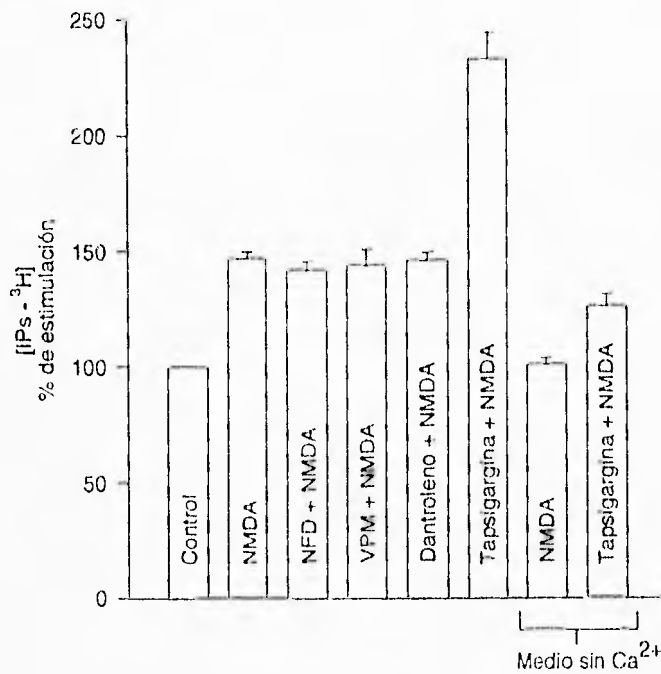
Gráfica 8. Curva de Tiempo de NMDA (200  $\mu$ M). Cada punto es el promedio de dos experimentos realizados por triplicado. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES.

### **C. Efecto del calcio**

La regulación de la concentración de calcio en el citoplasma es de gran relevancia, ya que se sabe hay proteínas que dependen para su activación de concentraciones precisas de este ión. De hecho la fosfolipasa C, la enzima responsable de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato para producir  $IP_3$  y DAG, se activa por el incremento en la concentración de este catión. Con el propósito de ver si el calcio está relacionado con la producción de fosfatos de inositol en las células de Bergmann, se estimuló con NMDA  $200 \mu M$  en ausencia de calcio externo, agregando el quelante EDTA (1 mM), así como  $MgSO_4$  (1.17 mM) para evitar el daño celular producido por la remoción de  $Ca^{2+}$ . Se observó que en estas condiciones el NMDA no estimuló la hidrólisis de  $PIP_2$  (Gráfica 9), en contraste con la estimulación de 47% inducida por este agonista en presencia de  $Ca^{2+}$  (Gráfica 2).

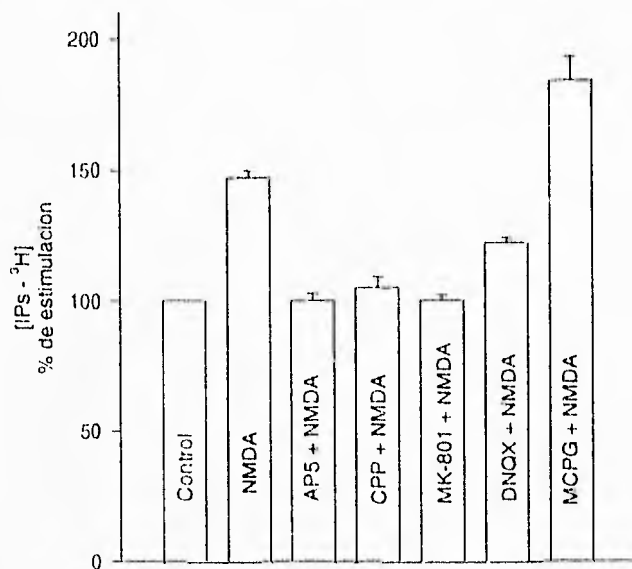
### **D. Bloqueadores de canales de Calcio**

Puesto que la hidrólisis de  $PIP_2$  inducida por NMDA, depende de  $Ca^{2+}$  externo (Gráfica 9) se trató de establecer el tipo de canal de  $Ca^{2+}$  relacionado con el fenómeno. Con este fin se estudió el efecto de bloqueadores específicos tanto de canales de calcio de la membrana como de aquellos que controlan pozas intracelulares.

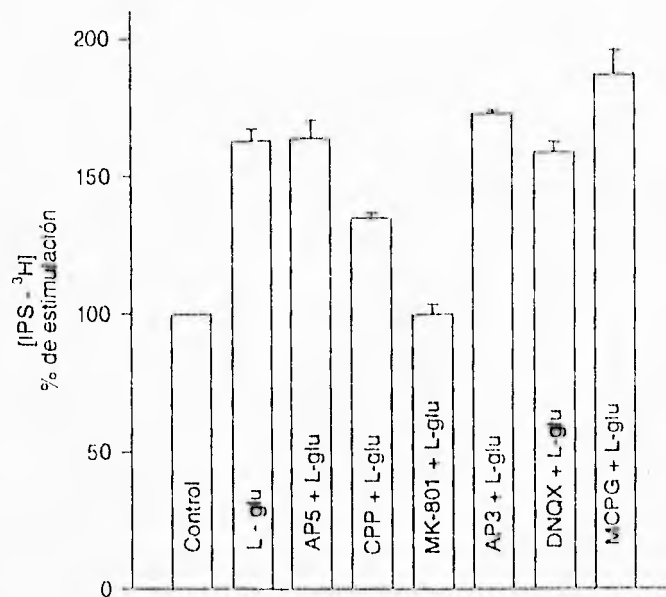


Gráfica 9. Efecto de inhibidores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los bloqueadores de calcio se añadieron 10 min antes que el NMDA ( $200\mu\text{M}$ ). Las dosis empleadas fueron: Dantroleno,  $30\mu\text{M}$  ( $n=2$ ); Tapsigargina,  $10\mu\text{M}$  ( $n=2$ ); Nifedipina (NFD),  $10\mu\text{M}$  ( $n=2$ ) y Verapamil (VPM),  $10\mu\text{M}$  ( $n=4$ ). El medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  contenía  $\text{Mg}^{2+}$  ( $1.17\text{mM}$ ), EDTA ( $1\text{mM}$ ). Cada experimento se realizó por triplicado y el tiempo de estimulación fué de 30 min. Los datos son la media  $\pm$ ES.





Gráfica 10. Farmacología de la estimulación por NMDA (200 $\mu$ M, n=21). El AP5 (200 $\mu$ M, n=2), el CPP (200 $\mu$ M, n=5) y el MK-801 (5 $\mu$ M, n=4) bloquean la respuesta inducida por NMDA. La DNQX (50 $\mu$ M, n=5) bloquea parcialmente y la MCPG (250 $\mu$ M, n=4) aumenta el efecto de NMDA. Los antagonistas se añadieron 10 min. antes que el agonista. El tiempo de Estimulación fué de 30 min. Cada experimento se realizó por triplicado. Los datos son la media  $\pm$  ES.



Gráfica 11. Efecto de antagonistas sobre la estimulación por L-glu (200 $\mu$ M). Los antagonistas se añadieron 10 minutos antes que el agonista. Las dosis fueron las siguientes: AP5, 200 $\mu$ M (n=4); CPP, 200 $\mu$ M (n=5); MK-801, 5 $\mu$ M (n=5); AP3, 200 $\mu$ M (n=2); DNQX, 50 $\mu$ M (n=5) y MCPG, 250  $\mu$ M (n=3). Cada experimento se realizó por triplicado y el tiempo de estimulación fué de 30 min. Los datos son la media  $\pm$  ES.

La estimulación por NMDA 200  $\mu\text{M}$  no se afectó por Nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), bloqueador de los canales de calcio tipo L, ni tampoco por Verapamil (10  $\mu\text{M}$ ) que es un bloqueador de los canales de calcio tipo T.

Por lo que respecta a bloqueadores de canales de calcio de pozas intracelulares, se investigó el efecto del Dantroleno. Este compuesto inhibe específicamente la liberación de calcio inducida por calcio sin afectar la liberación de calcio mediada por  $\text{IP}_3$ ; por otra parte, inhibe la interacción de la ryanodina pero no la de  $\text{IP}_3$  con los sitios de unión en membranas intracelulares. En las células de Bergmann, no afectó la síntesis de fosfatos de inositol producida por NMDA.

La Tapsigargina bloquea las ATPasas de calcio, produciendo la salida de calcio de pozas intracelulares sensibles a  $\text{IP}_3$ , además de inhibir la recaptura de calcio por el retículo. La Tapsigargina (10  $\mu\text{M}$ ) agregada a cultivos primarios de células de Bergmann, 10 minutos antes que NMDA (200  $\mu\text{M}$ ) aumentó en 2.8 veces la estimulación provocada por el agonista en presencia de calcio, y produjo una estimulación de 25% sobre el nivel basal de  $\text{IP}_3$  en ausencia de calcio (Grafica 9).

## V. DISCUSION

En la glia de Bergmann se ha encontrado receptores para aminoácidos, de dos tipos: receptores a glutamato tanto del tipo AMPA/kainato como de NMDA, y receptores a GABA (Müller y Kettenmann, 1995). En este trabajo encontramos que el glutamato y otros agonistas de los aminoácidos excitadores estimulan la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> en estas células. El perfil farmacológico de esta estimulación sugiere la participación tanto de receptores ionotrópicos de tipo NMDA, como de receptores metabotrópicos, con características diferentes de las descritas en neuronas, así como en las células de Müller, otro tipo de glia radial de origen astrocítico (Müller y Kettenmann, 1995; López-Colomé *et al*, 1993).

### a) Receptores Ionotrópicos.

Encontramos que en las células de Bergmann el agonista más eficiente es el L-Glu (Gráfica 1), debido probablemente a su interacción con todos los subtipos de receptores, dado que se trata de un agonista general. Sin embargo, el NMDA es el agonista más potente, y el t-ACPD, aunque estimula significativamente es el menos potente (Gráfica 3), seguido por el KA (Gráfica 7) y el QA (Gráfica 6). En concordancia con la presencia de receptores de tipo NMDA, el AP5 y el CPP, antagonistas del sitio del NMDA, así como el bloqueador del canal del receptor MK-801, inhibieron la estimulación inducida por el NMDA.

La estimulación por L-glu, sin embargo, no se inhibe en presencia de AP5 como sería de esperarse, sino únicamente en forma parcial (54%) por CPP y totalmente por el MK-801. Una posible explicación para este resultado sería que el L-glu al activar los receptores metabotrópicos, simultáneamente a los NMDA, pudiera modular a estos últimos aumentando la afinidad del sitio del agonista, o bien disminuyendo la afinidad del sitio del antagonista. La activación de los receptores metabotrópicos daría como resultado la formación de  $IP_3$  y DAG (Schoepp y Conn, 1993); este último activa a la proteína cinasa C (PKC) de manera sinérgica con el calcio, el que podría entrar a través del canal de los receptores NMDA al ser estimulados por glutamato. Esta enzima a su vez podría catalizar la fosforilación de las subunidades del receptor NMDA e incrementar su función (Schoepp y Conn, 1993). La activación del canal del receptor tipo NMDA por fosforilación, se ha demostrado en experimentos en que la activación de la proteína cinasa C por ésteres de forbol, resulta en una potenciación de la despolarización provocada por NMDA en la médula espinal de rata (Gerberg *et al*, 1989). La activación fisiológica de la PKC por agonistas del receptor  $\mu$ -opioide (Chen *et al*, 1991) o por la activación del receptor metabotrópico a glutamato (Kelso *et al*, 1992) produce efectos similares a los obtenidos con ésteres de forbol. Aunque la evidencia citada sugiere la potenciación de la actividad del receptor NMDA por la PKC, el mecanismo preciso por el que la cinasa altera al receptor NMDA no se conoce (McBain y Mayer, 1994).

Por otra parte, también se ha demostrado que la activación de mGluRs con t-ACPD en neuronas del estriado, atenúa tanto la amplitud como la duración de las respuestas excitadoras inducidas por NMDA (Colwell y Levine, 1994). Asimismo, se ha demostrado que los receptores ionotrópicos AMPA/KA se modulan por fosforilación, y la forma fosforilada tiene menor capacidad de interacción con el antagonista CNQX (Lanius *et al*, 1993).

#### b) Receptores metabotrópicos.

La estimulación de la hidrólisis de IPs por t-ACPD, permite proponer que además de los receptores de tipo NMDA, las células gliales de Bergmann tienen receptores metabotrópicos ya sea de tipo mGluR1 o bien mGluR5, ya que ambos tipos se relacionan con la hidrólisis de IPs. El perfil farmacológico de los agonistas apoya esta hipótesis, ya que el QA (Gráfica 6) es más potente que el t-ACPD (Gráfica 3). En cuanto a los antagonistas, el AP3 no bloqueó la estimulación por L-glu, sin embargo, el mecanismo de acción de este compuesto no se conoce, y su efecto varía desde antagonista no-competitivo hasta agonista o antagonista parciales, dependiendo de la preparación (Schoepp y Conn, 1993). Por otra parte, este compuesto tampoco inhibe a los mGluRs acoplados a IP en otro tipo de glia radial, las células de Müller de la retina (López-Colomé *et al*, 1993).

El desarrollo de antagonistas y agonistas específicos de los tipos de receptores permite discriminarlos espacial, temporal y funcionalmente, lo que es de gran importancia para el conocimiento del funcionamiento de las diferentes

áreas del sistema nervioso. Recientemente se han sintetizado antagonistas y agonistas más específicos de los receptores metabotrópicos de glutamato, derivados de la fenilglicina. La (RS)- $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina (MCPG), se ha caracterizado como un antagonista del mGluR1 (Watkins y Collingridge, 1994) tanto en células de ovario de Hamster chino (CHO) transfectadas con el mGluR1 $\alpha$ , por análisis de la movilización de calcio intracelular debida a la aplicación de 1S,3R-ACPD, como en rebanadas de hipocampo de rata donde la MCPG revierte la inhibición producida por el 1S,3R-ACPD (Bashir *et al*, 1993). También es un antagonista selectivo y competitivo de los mGluRs respecto a la estimulación de hidrólisis de fosfoinosítidos por t-ACPD y la respuesta electrofisiológica despolarizante inducida, por t-ACPD en neuronas talámicas de cerebro de rata y motoneuronas de la médula espinal (Eaton *et al*, 1993). Los receptores metabotrópicos representan una familia de receptores acoplados a proteínas G. Se han aislado 8 clonas de receptores metabotrópicos para glutamato (mGluRs) que se han agrupado con base en la sensibilidad que presentan por algunos agonistas. Así se distinguen 3 grupos: en el grupo I se localizan los mGluR1 y mGluR5, de los que el agonista más potente es el quisqualato; el grupo II comprende a los mGluR2 y 3, siendo la 2s,1's,2's-2-(2-carboxiciclopropil) glicina (L-CCG) el agonista más potente para este grupo. Los receptores de los grupos I y II son sensibles a t-ACPD. El grupo III está representado por los mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8, y su agonista más potente es el L-2-amino-4-fosfonobutanoato (L-AP4) (Pin y Duvoisin, 1995). La

síntesis de nuevos compuestos nos ayuda a una mejor discriminación de estos receptores, pero, en relación con los derivados de la fenilglicina Thoreson y colaboradores (1995) han demostrado recientemente que el efecto de estos compuestos no es el mismo en diferentes regiones y tipos celulares. Así, la MCPG que se ha clasificado como un antagonista de la despolarización por 1S,3R-ACPD en la médula espinal, no lo es en los receptores L-AP4 de la retina o en los mGluR4 clonados. Con base en esos datos podría proponerse que el receptor metabotrópico en las células de Bergmann fuera del tipo insensible a la MCPG ya que no se observó un bloqueo en la producción de fosfatos de inositol inducida por L-glutamato y NMDA en cultivos primarios de las mismas (Gráficas 10 y 11).

Aunque todavía carecemos de evidencia directa para afirmarlo, suponemos que estos receptores pertenecen al tipo mGluR5, ya que mediante hibridación *in situ* e inmunocitoquímica en rebanadas de cerebro, se ha demostrado que los mGluR1 se localizan únicamente en neuronas (Martin *et al*, 1992; Gores *et al*, 1993); adicionalmente, los mGluR5 son relativamente insensibles a la MCPG (Roberts, 1995), como fué el caso de nuestra preparación.

Demostramos en este trabajo que, la estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos estimulada por AAE requiere de la presencia de calcio externo (Gráfica 9). Este  $Ca^{2+}$  podría entrar a las células a través del canal del receptor y posteriormente, de manera indirecta, a través de la activación de las cinasas



correspondientes, por canales sensibles al voltaje. En las células de Bergmann los receptores del tipo AMPA/kainato son permeables al calcio, y la respuesta provocada por estimulación con kainato se bloquea con CNQX. Sin embargo, la participación de este tipo de receptor en la hidrólisis de fosfoinosítidos en nuestra preparación no queda clara, ya que la DNQX no bloquea la estimulación de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> inducida por L-glutamato. Nuestros datos sugieren, en cambio, que el Ca<sup>2+</sup> podría entrar a través de los receptores de tipo NMDA. En los astrocitos, se han descrito dos tipos de canales de Ca<sup>2+</sup>: un canal que se activa a -60 mV, de inactivación rápida y dependiente de voltaje, y otro que tiene un umbral de activación de -30 mV y de inactivación lenta. Estos dos tipos de canal comparten las propiedades de los canales de Ca<sup>2+</sup> T y L, respectivamente, que se han descrito en muchos otros tejidos (Barres *et al*, 1990).

Con el fin de determinar la participación de tipos específicos de canales de Ca<sup>2+</sup>, se estudió el efecto del verapamil y la nifedipina, bloqueadores de los canales tipo T y tipo L, respectivamente. Puesto que estos compuestos no afectaron la estimulación por NMDA (Gráfica 9), se infiere que algún otro tipo de canal podría estar involucrado en el proceso, como podrían ser los de tipo N (Bowman *et al*, 1992), o bien algún canal inespecífico activado por tensión (Sontheimer, 1994). Nuestros resultados apoyan la sugerencia previa (Müller y Kettenmann, 1995), de que las células de Bergmann carecen de canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a voltaje. Sin embargo, en astrocitos de diferentes regiones del SNC (línea celular a la cual pertenece la glía de Bergmann), se ha comprobado

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

la presencia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto de tipo T como de tipo L (Barres, 1990), mismos que no se observan en preparaciones de astrocitos en cultivo (Barres, 1989).

Se podría pensar que no hubo estimulación al aplicar NMDA debido a la presencia de magnesio en el medio en los experimentos realizados en ausencia de calcio, con el fin de evitar daño celular; sin embargo, se ha demostrado que el receptor tipo NMDA en las células de Bergmann tiene características diferentes a las de sus homólogos en neuronas, ya que la actividad de los receptores de NMDA no se modula por magnesio (Müller *et al*, 1993).

El  $\text{IP}_3$ , producto de la hidrólisis del  $\text{PIP}_2$ , es un segundo mensajero que provoca la salida de calcio del retículo endoplásmico (RE), al interactuar con un receptor específico en el mismo. Para determinar la participación del calcio procedente de pozas intracelulares en el aumento de concentración de  $\text{IP}_3$ , se probó el efecto del Dantroleno y la Tapsigargina. El Dantroleno, que bloquea la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE por canales de calcio sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  y bloqueados por ryanodina, no modificó la estimulación por L-glu (Gráfica 9). La Tapsigargina es un inhibidor general de las ATPasas de calcio encargadas de la recaptura del ión por el RE (Charles *et al*, 1993). Al inhibirse, aumenta la concentración citoplásmica de calcio, ya que adicionalmente hay una salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, que corresponde a la poza liberable por  $\text{IP}_3$ . En nuestra preparación la tapsigargina aumentó 26% la hidrólisis de  $\text{IP}_3$ , probablemente debido a la activación de la PLC por el aumento de calcio citoplásmico (Gráfica 9).

Los resultados que aquí se describen demuestran que el glutamato y algunos de sus análogos pertenecientes al grupo de los aminoácidos excitadores, inducen la hidrólisis de fosfoinosítidos de la membrana a través de la estimulación de receptores específicos. Por la evidencia obtenida hasta el momento, sugerimos que estos receptores pertenecen al grupo de los ionotrópicos tipo NMDA, así como al de los metabotrópicos sensibles a t-ACPD, los cuales podrían actuar en forma coordinada.

Experimentos futuros empleando nuevos agonistas y antagonistas de cada tipo de receptor, así como el uso de técnicas de biología molecular para identificar las cadenas que los componen, permitirán aclarar más a fondo los mecanismos y la función de los receptores a AAE en células de la glia radial, y la posible participación de estas células en la modulación de la neurotransmisión.

## VI. CONCLUSIONES

La hidrólisis de fosfoinosítidos se activa por agonistas de los receptores a aminoácidos excitadores, de tipo ionotrópico (sensible a NMDA y KA), así como de tipo metabotrópico (sensible a t-ACPD), en las células de Bergmann del cerebelo, en cultivo, con el siguiente orden de potencia: QA >NMDA> L-glu > KA = QA >> t-ACPD.

Las características farmacológicas de la activación de la hidrólisis de fosfoinosítidos, difieren de las encontradas en neuronas y en la glia radial de la retina. La estimulación inducida por NMDA, se inhibe por antagonistas del receptor NMDA (CPP y AP5) y por un bloqueador de canal (MK-801); la inducida por L-glu se inhibe por los antagonistas de NMDA y débilmente por los de AMPA/KA (DNQX). Los antagonistas (MCPG y AP3) del receptor metabotrópico no tuvieron efecto sobre la estimulación inducida por L-glutamato.

La estimulación requiere de calcio externo y no está relacionada con canales de calcio tipo T y L, ya que los bloqueadores Verapamil y Nifedipina no tuvieron efecto. La Tapsigargina estimuló la hidrólisis de fosfoinosítidos.

La localización de las células de Bergmann en el cerebelo, sugiere que podrían modular la sinapsis glutamatérgica que se establece entre las fibras paralelas y las células de Purkinje, a través de la activación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítidos.

## VII. APENCIDE

### Medio Eagle Modificación de Dulbecco

	mg/l
CaCl <sub>2</sub>	200.00
Fe(NO <sub>3</sub> ).9H <sub>2</sub> O	0.10
KCl	400.00
MgSO <sub>4</sub>	97.67
NaCl	6400.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	125.00
D-glucosa	4500.00
Rojo de fenol	15.00
L-Arginina	84.00
L-Cisteina	63.00
L-Glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-Histidina	42.00
L-Isoleucina	105.00
L-Leucina	105.00
L-Lisina	146.00
L-Metionina	30.00
L-Fenilalanina	66.00
L-Serina	42.00
L-Treonina	95.00
L-Triptofano	16.00
L-Tirosina	104.00
L-Valina	94.00
D-Ca pantotenato	4.00
Cloruro de colina	4.00
Acido fólico	4.00
i-inositol	7.20
Niacinamida	4.00
Pirodoxal	4.00
Tiamina	4.00
Riboflavina	0.40

### VIII. BIBLIOGRAFIA

Adams, R.L.P. (1988) Cell culture for biochemist. En: *TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY* (Editado por Burdon, R.H. y P.H. van Knippenberg) Elsevier, Netherlands. 64, 122-123.

Agranoff, B.W. y S.K. Fisher (1994) Phosphoinositides. En: *BASIC NEUROCHEMISTRY*. (Editado por: Siegel, G.J., B.W. Agranoff, R.W. Albers y P.B. Molinoff) Raven Press, New York. 417-428.

Barnes, J.M. y J.M. Henley (1992) Molecular characteristics of excitatory amino acid receptor. *PROGRESS IN NEUROBIOLOGY* 39:113-133.

Barres, B.A., L.L.Y. Chun y D.P. Corey (1989) Calcium current in cortical astrocytes: induction by cAMP and neurotransmitters and permissive effect of serum factors. *THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE* 9(9):3169-3175.

Barres, B.A., W.J. Koroshetz, L.L.Y. Chun y D.P. Corey (1990) Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. *NEURON* 5(4):527-544.

Barres, B.A. (1991) New roles for glia. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE* 11(12):3685-3694.

Bashir, Z.I., A.Z. Bortolotto, C.H. Davies, N. Berretta, A.J. Irving, A.J. Seal, J.M. Henley, D.E. Jane, J.C. Watkins y G.L. Collingridge (1993) Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *NATURE* 363:347-350.

Berridge, M.J., R.M. Dawson, C.P. Downes, J.P. Heslop y R.F. Irvine (1983) Changes in the level of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phospho-inositides. *BIOCHEMICAL JOURNAL* 212:473-483.

Bettler, B., J. Egebjerg, G. Sharma, G. Pecht, Y. Hermans-Borgmeyer, C. Moll, C. F. Stevens y S. Heinemann (1992) Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate binding subunit. *NEURON* 8:257-265.

Bettler, B. and C. Mülle (1995) AMPA and Kainate receptor. *NEUROPHARMACOLOGY* 34(2):123-129.

Bowman, C.L., J.-P. Ding, F. Sachs y M. Sokabe (1992) Mechanotransducing ion channels in astrocytes. *BRAIN RESEARCH* 584(1-2):272-286.

Burnashev, N., H. Moyer, P.H. Seeburg y B. Sakmann (1992a) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. NEURON 8:189-198.

Burnashev, N., A. Khodorova, P. Jonas, P.J. Helm, W. Wisden, H. Monyer, P.H. Seeburg y B. Sakmann (1992b) Calcium-permeable AMPA-kainate receptor in fusiform cerebellar glial cells. SCIENCE 256:1566-1570.

Charles, A.C., E.R. Dirksen, J.E. Merrill y M.J. Sanderson (1993) Mechanisms of intercellular calcium signaling in glial cells studied with dantrolene and thapsigargin. GLIA 7:134-145.

Chen, L. y L.-Y.M. Huang (1991) Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate response through activation of protein kinase C by a  $\mu$ -opioid. NEURON 7:319-326.

Chez, C. (1991) The cerebellum. En PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE (Editado por Kandel R. E., J.H. Schwartz y M.T. Jessell) Elsevier, U.S.A. 627-646.

Cid, M.E. y A. Ortega (1993) Glutamate stimulates [<sup>3</sup>H]phorbol 12,13-dibutyrate binding in cultured Bergmann glial cells. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY-MOLECULAR PHARMACOLOGY SECTION 245:51-54.

Choi, B.H. y L. W. Lapham (1980) Evolution of Bergmann glia in developing human fetal cerebellum: a Golgi electron microscopic and immunofluorescent study. BRAIN RESEARCH 190:369-383.

Coldwell, C.S. y M.S. Levine (1994) Metabotropic glutamate receptors modulate N-methyl-D-aspartate receptor function in neostriatal neurons. NEUROSCIENCE 61(3):497-507.

Dingledine, R. y C. McBain (1994) Excitatory Amino Acid Transmitters. En: BASIC NEUROCHEMISTRY (Editado por Siegel, G.J., B.W. Agranoff, W.R. Albers y P.B. Molinoff) Raven Press, New York. 367-387.

Duvoisin, R.M., C. Zhang y K. Ramonell (1995) A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE 15(4):3075-3083.

Eaton, S.A., D.E. Jane, P.L. St.J. Jones, R.H.P. Porter, P.C.-K. Pook, D.C. Sunter, P.M. Udvarhelyi, P.J. Roberts, T.E. Salt y J.C. Watkins (1993) Competitive antagonism at metabotropic glutamate receptors by (S)-4-carboxyphenylglycine

and (RS)- $\alpha$ -methyl-4-carboxyphenylglycine. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY-MOLECULAR PHARMACOLOGY SECTION 244:195-197.

Fisher, M., P. Trimmer y G. Ruthel (1993) Bergmann glia require continuous association with Purkinje cells for normal phenotype expression. GLIA 8:172-182.

Fricke, V. (1975) A new scintillation cocktail based on Triton-X-100. ANAL. BIOCHEM 63:555-558.

Gregor, P., I. Mano, I. Maoz, M. McKeown y V.I. Teichberg (1989) Molecular structure of the chick cerebellar kainate-binding subunit of a putative glutamate receptor. NATURE 342:689-692.

Gorberg, G., I. Kangrga, P.D. Ryu, J.S. Larew y M. Randic (1989) Multiple effects of phorbol esters in the rat spinal dorsal horn. THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE 9(10):3606-3617.

Görcs, T.J., B. Penke, Z. Böti, Z. Katarova y J. Hámamori (1993) Immunohistochemical visualization of a metabotropic glutamate receptor. NEUROREPORT 4(3):283-286.

Heumann, R., J. Villegas y D.W. Herzfeld (1981) Acetylcholine synthesis in the Schwann cell and axon in the giant nerve fiber of the squid. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 36:765-768.

Hill, R. y G. Wyse (1989) FISILOGIA ANIMAL. Ediciones Akal, España. 655 pp.

Hollmann, M., M. Hartley y S. Heinemann (1991)  $Ca^{2+}$  permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. SCIENCE 252:851-853.

Jacobson, M. (1991) DEVELOPEMENTAL NEUROBIOLOGY. Plenum Press, U.S.A. 776

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

Kandel, R.E. (1991) Nerve cells and behavior. En: PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE (Editado por Kandel, R. E., J.H. Schwartz y M.T. Jessell) Elsevier, U.S.A. 18-32.



Kandel, R.E., S.A. Siegelbaum y J.H. Schwartz (1991) Synaptic transmission. En: PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE (Editado por Kandel, R.E., J.H. Schwartz y M.T. Jessell) Elsevier, U.S.A. 123-134.

Kelso, S.R., T.E. Nelson y J.P. Leonard (1992) Protein kinase C-mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptor in *Xenopus* oocytes. JOURNAL OF PHYSIOLOGY 449:705-718.

Lanius, R.A., B.A. Pasqualotto y C.A. Shaw (1993) A novel mechanism of AMPA receptor regulation: ionically triggered kinases and phosphatases. NEUROREPORT 4(6):795-798.

López, T., A.M. López-Colomé y A. Ortega (1994) AMPA/KA receptor expression in radial glia. NEUROREPORT 5:504-506.

López-Colomé, A.M., A. Ortega y M. Romo-de-Vivar (1993) Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hydrolysis in Müller glia. GLIA 9:127-135.

Lowry, O.H., W.H. Rosebrough, A.L. Farr y R.S. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 193:265-275.

Martin, L.J., C.D. Blackstone, R.L. Huganir y D.L. Price (1992) Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. NEURON 9:259-270.

McBain, C.J. y M.L. Mayer (1994) N-methyl-D-aspartate receptor structure and function. PHYSIOLOGICAL REVIEWS 74(3):723-760.

MacDonald, J.F. y L.M. Nowak (1991) Mechanisms of blockade of excitatory amino acid receptor channels. TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES 11(4):167-172.

Monaghan, D.T. y C.W. Cotman (1985) Distribution of NMDA-sensitive L-<sup>3</sup>H-glutamate binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography JOURNAL OF NEUROSCIENCE 5:2909-2919.

Monaghan, D.T., R.J. Bridges y C.W. Cotman (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. ANNU. REV. PHARMACOL. TOXICOL. 29:365-402.

Müller, T., T. Möller, T. Berger, J. Schinitzer y H. Kettenmann (1992) Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. SCIENCE 265:1563-1566.

Müller, T., J. Grosche, C. Olhemeyer y H. Kettenmann (1993) NMDA-activated currents in Bergmann glial cells. *NEUROREPORT* 4:671-674.

Müller, T. y H. Kettenmann (1995) Physiology of Bergmann glial cells. *INTERNATIONAL REVIEW OF NEUROBIOLOGY* 38:341-359.

Nakajima, Y., H. Iwakabe, C. Akaxawa, H. Nawa, R. Shigemoto, N. Mizuno y S. Nakanishi (1993) Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. BIOL. CHEM.* 268(16):11868-73.

Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *SCIENCE* 258:597-603.

Nicholls, J.G., A.R. Martin, y B.G. Wallace (1992) From neuron to brain. A cellular and molecular approach to the function of the nervous system. Sinauer, Massachusett. 147 pp

Ortega, A., N. Eshhar y V.I.Teichberg (1991) Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *NEUROSCIENCE* 41(2-3):335-349.

Okamoto, N., S. Hori, C. Akazawa, Y. Hayashi, R. Shigemoto, N. Mizuno y S. Nakanishi (1994) Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J. BIOL. CHEM.* 269(2):1231-1236.

Pin, J.P. y R. Duvoisin (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *NEUROPHARMACOLOGY* 34(1):1-26.

Rakic, P. (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A golgi and electronmicroscopic study in *Macacus rhesus*. *J. COMP. NEUR.* 141:283-312.

Ransom, R.W. y N.L. Stec (1988) Cooperative modulation of [<sup>3</sup>H] MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and plyamines. *JOURNAL OF NEURCHEMISTRY* 51:830

Roberts, P.J. (1995) Pharmacological tools for the investigation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs): phenylglycine derivatives and other selective antagonists-an update. *NEUROPHARMACOLOGY* 34(8):813-819.

Saugstad, J.A., J.M. Kinzie, E.R. Mulvihill, T.P. Segerson y G.L. Westbrook (1994) Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-

phosphonobutyric acid-class of metabotropic glutamate receptors. *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 45(3):367-372.

Schoepp, D.D. y P.J. Conn (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES* 14:13-20.

Sievers, J., F.W. Pehlemann, S. Gude, D. Hartmann y M. Berry (1994) The development of the radial glial scaffold of the cerebellar cortex from GFAP-positive cells in the external granular layer. *JOURNAL OF NEUROCYTOLOGY* 23:97-115.

Somogy, P., N. Eshhar, V.I. Teichberg y J.D.B. Roberts (1990) Subcellular localization of a putative kainate receptor in Bergmann glial cells using a monoclonal antibody in the chick and fish cerebellar cortex. *NEUROSCIENCE* 35(1):9-30.

Somohano, F. y A.M. López-Colomé (1990) Aminoácidos excitadores y plasticidad neuronal. *CIENCIA* 41:111-122.

Sontheimer, H. (1994) Voltage-dependent ion channels in glial cells. *GLIA* 11(2):156-172.

Teichberg, V.I (1991) Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *THE FASEB JOURNAL* 5:3086-3091.

Thoreson, W.B., T.J. Vette y R.F. Miller (1995) Actions of phenylglycine derivatives at L-AP4 receptors in retinal ON bipolar cells. *NEUROPHARMACOLOGY* 34(1):27-34.

Wada, K., C.J. Dechesne, S. Shimasaki, R.G. King, K. Kusano, A. Buonanno, D.R. Hampson, C. Banner, R.J. Wenthold y Y. Nakatani (1989) Sequence and expression of a frog brain complementary DNA encoding a kainate-binding protein. *NATURE* 342:684-689.

Werner, P., M. Voight, K. Keinänen, W. Wisden y P.H. Seeburg (1991) Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *NATURE* 351:742-744.

Wittaker, V.D. (1986) The structure of neuroglial cells. En: *CEREBRAL CORTEX*. Vol. 2 (Editado por: Jones, E.G. y A. Peters) Plenum Press, New York. 285-329.

Watkins, J. y G. Collingridge (1994) Phenylglycine derivatives as antagonist of metabotropic glutamate receptors. *TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES* 15(9):333-342.

Williams, J.H., M.L. Errington, M.A. Lynch y T.V.P. Bliss (1989) Arachidonic acid induces a long term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. NATURE 341: 739-742.

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