

BIBLIOTECA CENTRAL

03040  
8

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

Centro de Neurobiología

**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL RECEPTOR A  
SEROTONINA DE CELULAS GLIALES DEL CEREBRO ADULTO**

297722

Tesis presentada por la pasante

**Norma Angelica Sánchez Avendaño,**

como requisito para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias (Neurobiología)**

ESTA TESIS EN DEBE  
VOLAR DE LA BIBLIOTECA

Asesor:

Dr. Ricardo Miledi Dau

Campus Juriquilla, Querétaro

octubre del 2001

BIBLIOTECA CENTRAL



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 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  
AVENIDA DE  
MEXICO

# CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

CAMPUS UNAM - UAQ JURQUILLA  
Km. 15 CARRETERA QRO.-S.L.P.  
JURIQUILLA, QRO. C.P. 76230

## MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ**

Director General de  
Administración Escolar  
Presente

Por este conducto me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: **"CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL RECEPTOR A SEROTONINA EN CÉLULAS GLIALES DEL CEREBRO ADULTO"**, que presentó como un requisito para la obtención del grado de Maestra en Ciencias (Neurobiología) la alumna **NORMA ANGÉLICA SÁNCHEZ AVENDAÑO**, con número de cuenta 98855034, cuyo plan de estudios realizó íntegramente.

Por lo anterior, en mi carácter de director de tesis y miembro del jurado revisor de la misma, doy mi voto aprobatorio para que la alumna pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
U.N.A.M.-Campus Juriquilla, Qro., a 29 de junio del 2001

DR. RICARDO MILEDI DAU



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

# CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

CAMPUS UNAM - UAQ JURIQUILLA  
Km. 15 CARRETERA QRO.-S.L.P.  
JURIQUILLA, QRO. C.P. 76230

## MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ**

Director General de  
Administración Escolar  
Presente

Por este conducto me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: **"CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL RECEPTOR A SEROTONINA EN CÉLULAS GLIALES DEL CEREBRO ADULTO"**, que presentó como un requisito para la obtención del grado de Maestra en Ciencias (Neurobiología) la alumna **NORMA ANGÉLICA SÁNCHEZ AVENDAÑO**, con número de cuenta 9885503-4, cuyo plan de estudios realizó íntegramente.

Por lo anterior, en mi carácter de miembro del jurado revisor de la tesis, doy mi voto aprobatorio para que la alumna pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Qro. a 29 de junio del 2001

DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

# CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

CAMPUS UNAM - UAQ JURQUILLA  
Km. 15 CARRETERA QRO.-S.L.P.  
JURIQUILLA, QRO. C.P. 76230

## MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ**

Director General de  
Administración Escolar  
Presente

Por este conducto me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: **"CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL RECEPTOR A SEROTONINA EN CÉLULAS GLIALES DEL CEREBRO ADULTO"**, que presentó como un requisito para la obtención del grado de Maestra en Ciencias (Neurobiología) la alumna **NORMA ANGÉLICA SÁNCHEZ AVENDAÑO**, con número de cuenta 9885503-4, cuyo plan de estudios realizó íntegramente.

Por lo anterior, en mi carácter de miembro del jurado revisor de la tesis, doy mi voto aprobatorio para que la alumna pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Qro. a 29 de junio del 2001

DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA LORENZO



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

# CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

CAMPUS UNAM - UAQ JURIQUILLA  
Km. 15 CARRETERA QRO.-S.L.P.  
JURIQUILLA, QRO. C.P. 76230

## MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ**

Director General de  
Administración Escolar  
Presente

Por este conducto me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: "**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL RECEPTOR A SEROTONINA EN CÉLULAS GLIALES DEL CEREBRO ADULTO**", que presentó como un requisito para la obtención del grado de Maestra en Ciencias (Neurobiología) la alumna **NORMA ANGÉLICA SÁNCHEZ AVENDAÑO**, con número de cuenta 9885503-4, cuyo plan de estudios realizó íntegramente.

Por lo anterior, en mi carácter de miembro del jurado revisor de la tesis, doy mi voto aprobatorio para que la alumna pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Qro. a 29 de junio del 2001

*M. Díaz Muñoz*  
DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

# CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

CAMPUS UNAM - UAQ JURIQUILLA  
Km. 15 CARRETERA QRO.-S.L.P.  
JURIQUILLA, QRO. C.P. 76230

## MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ**

Director General de  
Administración Escolar  
Presente

Por este conducto me permito comunicarle que he revisado a satisfacción el trabajo escrito intitulado: "**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL RECEPTOR A SEROTONINA EN CÉLULAS GLIALES DEL CEREBRO ADULTO**", que presentó como un requisito para la obtención del grado de Maestra en Ciencias (Neurobiología) la alumna **NORMA ANGÉLICA SÁNCHEZ AVENDAÑO**, con número de cuenta 9885503-4, cuyo plan de estudios realizó íntegramente.

Por lo anterior, en mi carácter de miembro del jurado revisor de la tesis, doy mi voto aprobatorio para que la alumna pueda obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Qro. a 29 de junio del 2001

DR. JULIO MORÁN ANDRADE

*Quiero redituvar su amor y amistad, a  
mi madre, a quien dedico este trabajo.*

*A ti, el amor de mi vida, que guió mis  
pasos a esta continua locura.*



## Resumen

El sistema nervioso central está compuesto por una enorme cantidad de neuronas y células gliales, principalmente. Las neuronas contienen una variedad de receptores y canales iónicos. Hacia 1970, se ha mostrado que algunos tipos de células gliales expresan diferentes canales ionotrópicos y algunos receptores a neurotransmisores. Se sabe que la serotonina, así como sus receptores localizados en casi todo el cerebro, ejercen un efecto modulador en el SNC. Sin embargo, se desconoce hasta el momento, tanto la función específica de los receptores gliales dentro de la fisiología cerebral como los subtipos de receptores que participan de manera indirecta en el circuito cerebral. Así, en la presente tesis se muestra que el mRNA aislado de células gliales provenientes de animales adultos y expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, inducen la expresión de al menos un subtipo de receptor a serotonina. Observamos que las corrientes inducidas por la aplicación de 5-HT en ovocitos que expresaron receptores para 5-HT, eran potenciadas por la aplicación de ketanserina, mientras que el 8-OH-DPAT no ejerce efectos en dosis en el rango nanomolar. Estos resultados sugieren la presencia del subtipo de receptor 5-HT<sub>2</sub> en las células gliales, por una parte, además que este receptor presenta un comportamiento eléctrico diferente al reportado para receptores neuronales.

## *Agradecimientos*

Quiero agradecer al Centro de Neurobiología por el préstamo de sus bellas y funcionales instalaciones, así como a los trabajadores por su invaluable ayuda y amistad. En especial, vaya este agradecimiento al personal del bioterio por su ayuda ilimitada.

A mis compañeros de laboratorio, Héctor, Paco y Elizabeth Hernández, en aquellas interminables tardes de discusión que tanto me ayudaron a valorar el trabajo en equipo.

A Elizabeth Hernández Echeagaray por que nunca permitió que un mal momento arruinara una buen platica amistosa frente a una taza de café.

A todos aquellos que me hicieron la vida placentera en las horas más pesadas de trabajo.

Muy en especial vaya mi agradecimiento, mi amistad y mi cariño a Verónica Mireya e Ivett Medina por aquellas interminables horas de discusión insomne que soportaron valientemente.

## Índice General

<b>Página de Título</b>	<b>i</b>
<b>Página de firmas</b>	<b>ii</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>vii</b>
<b>Resumen</b>	<b>viii</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>ix</b>
<b>Índice</b>	<b>x</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>4</b>
<b>Generalidades sobre la biología celular de las células gliales</b>	<b>4</b>
<b>a) Origen embrionario</b>	<b>4</b>
<b>b) Morfotipos y biología celular</b>	<b>5</b>
<b>Astroglía</b>	<b>5</b>
<b>Oligodendroglía</b>	<b>8</b>
<b>Microglía</b>	<b>9</b>
<b>c) Receptores para neurotransmisores en células gliales</b>	<b>10</b>
<b>d) Canales iónicos y propiedades electrofisiológicas de las células gliales</b>	<b>11</b>
<b>La serotonina</b>	<b>13</b>
<b>Química, síntesis y metabolismo</b>	<b>13</b>
<b>Origen</b>	<b>13</b>
<b>Almacenamiento y liberación</b>	<b>15</b>
<b>Recaptura</b>	<b>15</b>
<b>Receptores</b>	<b>16</b>
<b>Receptores para serotonina en células gliales</b>	<b>19</b>
<b>Efectos electrofisiológicos de la serotonina sobre células gliales</b>	<b>23</b>

<b>Hipótesis</b>	<b>25</b>
<b><u>Objetivo general</u></b>	
<b>Objetivo particular 1</b>	
<b>Objetivo particular 2</b>	
<b>Objetivo particular 3</b>	
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>26</b>
<b>Animales</b>	<b>26</b>
<b>Obtención de las muestras</b>	<b>26</b>
<b>Métodos electrofisiológicos</b>	<b>27</b>
<b>Reactivos</b>	<b>28</b>
<b>Resultados</b>	<b>29</b>
<i>Corrientes inducidas por distintos neurotransmisores en ovocitos inyectados con mRNA mensajero proveniente de células gliales de animales adultos</i>	<b>29</b>
<i>Características electrofisiológicas de las corrientes en los ovocitos inyectados con mRNA de células gliales de animales adultos</i>	<b>31</b>
<i>Características electrofisiológicas de las corrientes serotoninérgicas en los ovocitos inyectados con mRNA de células gliales proveniente de animales adultos</i>	<b>33</b>
<i>Identificación del subtipo (s) de receptor (es) serotoninérgicos en los ovocitos inyectados con mRNA de células gliales provenientes de animales adultos</i>	<b>35</b>
<b>Discusión</b>	<b>39</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>43</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>49</b>
<i>Estandarización de la técnica de Tiocianato de Guanidina-fenol-cloroformo</i>	<b>49</b>
<b><i>Procedimiento</i></b>	<b>49</b>

***Purificación de poli (A)<sup>+</sup> mRNA por cromatografía sobre columnas de celulosa-oligo***

<b><i>(dT)</i></b>	<b><i>52</i></b>
<b><i>Procedimiento</i></b>	<b><i>52</i></b>

## ***Introducción***

La comunicación celular constituye uno de los procesos más importantes en los organismos pluricelulares. Dicha comunicación no sólo permite mantener la homeostasis, sino también permite al organismo relacionarse y adaptarse al medio ambiente.

La transferencia de información entre las células se puede realizar de distintas maneras. Cuando las poblaciones celulares “intercomunicadas” se encuentran separadas por distancias considerables para las dimensiones corporales, se liberan mensajes químicos, denominados hormonas, que transfieren la información de un grupo de células que funcionan como los “emisores” al otro grupo de células que fungen como receptores. Este tipo de información tiene efectos lentos y crónicos sobre los procesos fisiológicos, y generalmente alteran el estado metabólico de las células con las cuales hacen contacto.

Cuando las células que se “comunican” están físicamente cercanas una de otra, la transferencia de información entre ellas puede realizarse a través de mensajes químicos liberados localmente. Estos mensajes pueden actuar sobre las células vecinas o bien sobre la célula misma que los liberó, y causan cambios metabólicos “lentos” o cambios rápidos electroquímicos de las células que los reciben. En algunos tejidos, como son el muscular y el nervioso, las formas de comunicación celular pueden ser tan estrechas que algunos grupos de células muestran continuidad citoplásmica formando así verdaderos sincicios funcionales, mediante el uso de un tipo especial de unión intercelular conocido como unión estrecha.

Uno de los sistemas corporales en los que la transferencia de información constituye la piedra angular de su funcionamiento es el sistema nervioso. Las neuronas han desarrollado complejos sistemas de comunicación y señalización celular e inter-celular que les permiten procesar cantidades inmensas de información en fracciones de segundo. Detrás de esta capacidad única entre los sistemas biológicos, descansa la propiedad de excitabilidad eléctrica que muestran las neuronas. Las neuronas integran, filtran y transfieren información al modificar, en respuesta a estímulos, la frecuencia, amplitud, organización espacio-temporal y probabilidad de ocurrencia de sus potenciales eléctricos, característica que depende de los canales iónicos y receptores intercalados a lo largo de sus membranas. Es esta la razón fundamental por la que cientos de grupos de investigación han intentado caracterizar las propiedades electrofisiológicas de las neuronas, y más recientemente, los tipos de canales iónicos y receptores que las determinan.

No obstante que la idea dominante sugiere que las neuronas juegan el papel central en el manejo de información en el sistema nervioso, evidencia reciente sugiere que las células gliales pudieran participar también en los mecanismos de transferencia de información (Whitaker-Azmitia, Clarke, Azmitia. 1993). Varias observaciones apoyan este argumento. Primero, se sabe que las células gliales regulan la excitabilidad neuronal a través de controlar los cambios en las concentraciones iónicas extracelulares. Por otro lado, se ha visto que, al menos en algunas condiciones, las células gliales secretan mensajeros químicos que funcionan como neurotransmisores o neuromodulares. El recambio de algunas de las sustancias neuroactivas utilizadas por las neuronas para transferir información ocurre con ayuda de las células gliales. En años recientes, se ha documentado la presencia de receptores a neurotransmisores y neuromodulares, generalmente utilizados en la

comunicación inter-neuronal, en distintos tipos de en células gliales (Whitaker-Azmitia, et al. 1993). Finalmente, también se han encontrado canales iónicos en las células gliales, lo que les confiere la propiedad de excitabilidad, característica que les permitiría, al menos conceptualmente, participar en procesos de transferencia de información. Las células gliales pueden generar pequeños potenciales de acción en respuesta a la presencia de diferentes neurotransmisores (e.g, glutamato). Por otro lado, las sustancias neuromoduladoras, como la serotonina y algunos péptidos, modulan la liberación de neurosustancias en células gliales transformadas en cultivo (Martín 1992).

Química como fisiológicamente la serotonina es una amina biogénica que, en la mayor parte de los casos, modula la actividad neuronal a través de su interacción con una familia de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. La serotonina también presenta acciones rápidas en algunas sinapsis al unirse a un receptor ionotrópico conocido como 5HT<sub>3</sub>. Estudios recientes han mostrado la presencia de receptores serotoninérgicos en células gliales (Matute y Miledi. 1993; Martín, 1992; Whitaker-Azmitia, et al. 1993). Sin embargo, no se conoce aún si estos son estructural y funcionalmente similares a aquellos localizados en las neuronas.

Así, el objetivo general de la presente tesis fue el tratar de identificar y caracterizar parcialmente en su caso, la presencia de receptores serotoninérgicos en células gliales obtenidas de animales adultos (rata y bovino), empleando técnicas de electrofisiología y biología molecular.

A continuación describiremos los antecedentes del trabajo realizado.



## ***Antecedentes***

### **Generalidades sobre la biología celular de las células gliales**

#### **a) Origen embrionario**

Las células gliales tienen su origen en las células derivadas de la zona subventricular en las crestas neurales. Las células precursoras de la capa germinal migran hacia lo que será la materia blanca. Las células (tanto neuronales como gliales) inmaduras tienen que encontrar la manera de pasar a través de la materia blanca y colocarse en las capas más profundas de la corteza. Algunos autores afirman que la glia radial podría servir como riel para el establecimiento de células gliales en la corteza y en otras estructuras cerebrales. Conforme llegan a sus destinos, un grupo de estas células se detienen e inician la diferenciación. Otro grupo de células continúa su migración hasta llegar a la zona subpial del sistema nervioso central. Se ha observado que las células que llegan a la corteza cerebral se convierten en astrocitos y oligodendrocitos. Se ha propuesto que las células se encuentran comprometidas para formar un tipo celular específico. Sin embargo, se ha encontrado que hay grupos de células heterogéneas que darán origen tanto a neuronas como a células gliales. Debemos considerar además que cada grupo celular está influenciado por las condiciones locales y temporales dentro de su microambiente celular. Esto es, que cada grupo celular responde a una combinación de señales que le permiten generar cambios morfológicos y funcionales. En el adulto, las células gliales mantienen su capacidad de duplicarse. Se ha reportado que bajo condiciones traumáticas, la glía puede inducir nuevas células gliales.

## **b) Morfotipos y biología celular**

La primera clasificación morfológica de las células gliales fue propuesta por Cajal alrededor de 1909. Este autor identificó dos clases de células que denominó astrocitos fibrosos y astrocitos protoplasmáticos. Ambos tipos celulares se encontraron ubicados en compartimentos diferentes del tejido nervioso; los astrocitos fibrosos se observaron en la materia blanca, mientras que los protoplasmáticos se localizaron en la materia gris. Más tarde, con base en las descripciones realizadas primero por Cajal y posteriormente por Pio Del Río Hortega (1919) se clasificó la neuroglía en: a) macroglía formada por astrocitos y oligodendrocitos; b) microglía.

### **Astroglía**

Los astrocitos son células con apariencia estelar, y que muestran un gran número de procesos que emergen de sus cuerpos (Figura 1). Mediante el empleo de técnicas de impregnación metálica se ha logrado la identificación de al menos 3 subtipos básicos de astrocitos, a saber, radiales, protoplasmáticos y fibrosos. El subtipo fibroso, como ya fue mencionado, se localiza en la sustancia blanca, mientras que el subtipo protoplasmático se encuentra relacionado con somas neuronales ubicados en la sustancia gris. También se han encontrado formas transicionales entre los protoplasmáticos y los fibrosos localizados en la interfase de la materia gris y la blanca. Observaciones realizadas con el microscopio electrónico indican que, en todos los subtipos celulares, su citoplasma contiene cúmulos de glucógeno y un gran número de gliofilamentos.



Figura 1. Fotomicrografía que muestra astrocitos fibrosos (A) y protoplasmáticos (B) impregnados con la técnica modificada de Del Río Hortega (Tomado de Kettenmann, 1995).

Los astrocitos radiales se distribuyen en el plano perpendicular al eje de los ventrículos en toda la materia blanca con un grupo de procesos apoyados en la pía madre, mientras que otros procesos se encuentran localizados en posiciones más profundas de la corteza cerebral. El pericarión de los astrocitos radiales está localizado muy cerca de la pía madre. Los procesos son poco ramificados, rectilíneos y en ocasiones corren en haces dentro de los ejes fibrosos de la materia blanca. Por su parte, los astrocitos fibrosos se encuentran distribuidos en la médula espinal y con pocos procesos en la superficie cerebral, los cuales no llegan a la pía madre. Algunas veces las células gliales están en contacto con vasos sanguíneos en donde extienden procesos en forma de pies. Los astrocitos fibrosos de

la materia blanca de la médula espinal son muy similares en todos los aspectos a los descritos por Sasaki, Sato y Mannen (1989) y por otros autores en otras regiones del SNC, Mory y Lebrond (1969) en el cuerpo calloso, y Peters y Vaughn (1967) en el nervio óptico. Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran localizadas en la materia gris, y poseen procesos muy ramificados de calibre variables. En el cerebro los astrocitos protoplasmáticos están asociados con el soma neuronal y alrededor de la sinapsis. Debido a su proximidad con los espacios sinápticos, este subtipo celular tiene una localización que le permite recibir información a través de los neurotransmisores liberados por la terminal nerviosa. Así se ha sugerido que pudieran participar en los procesos de transferencia de información (ver también abajo). Finalmente, se han observado morfotipos mixtos de astrocitos. Los procesos que se extienden hacia la materia gris especialmente son del tipo protoplasmático, mientras que aquellos que se extienden hacia la materia blanca son del tipo fibroso. Estos hallazgos sugieren que la estructura de los astrocitos es un reflejo de la organización del tejido en el que están localizados.

Fisiológicamente, se ha propuesto que los astrocitos son elementos aislantes del tejido mesodérmico, separando las meninges del tejido nervioso a través de la membrana glial limitante externa, formando la barrera hematoencefálica al generar aposiciones membranales sobre los vasos sanguíneos cerebrales. Se sabe que en el tejido nervioso no existe una matriz conjuntiva que mantenga la coherencia estructural, función mecánica que ha sido asignada a los astrocitos. Los astrocitos mantienen las condiciones necesarias en el medio intersticial que permiten el óptimo funcionamiento neuronal al amortiguar los cambios en las concentraciones del potasio extracelular. Así mismo, los astrocitos participan en los fenómenos de reciclaje de algunos neurotransmisores como lo es el ácido glutámico (Ceña, 1998). Durante el desarrollo, los astrocitos guían la migración de los

neuroblastos hacia su sitio final de deposición. Además, secretan factores de crecimiento que favorecen el desarrollo y diferenciación neuronales. Los astrocitos también funcionan como células presentadoras de antígenos, por lo que participan en la respuesta inmunitaria del tejido nervioso.

### **Oligodendroglía**

Los oligodendrocitos son células esféricas o poligonales con pocos procesos delgados, irregulares y poco ramificados (Figura 2). Su núcleo es redondo u oval y no presentan gránulos de glucógeno ni filamentos intermedios, característicos de los astrocitos. Los oligodendrocitos han sido clasificados en interfasciculares, perineurales y perivasculares. Los oligodendrocitos interfasciculares se localizan en la sustancia blanca y la gris, alineados en forma de filas que siguen los tractos nerviosos envolviendo a los axones de las neuronas. Los oligodendrocitos perineurales se encuentran en la sustancia gris adyacente a los somas de las neuronas. Finalmente, los perivasculares se encuentran asociados a vasos sanguíneos.

Independientemente de su denominación, los oligodendrocitos comparten una función que es la de formar las vainas de mielina. Se han documentado variaciones en composición de los lípidos de la mielina, dependiendo de la variedad de oligodendrocito que la forma. Martin (1992) ha sugerido que la variedad de formas de los oligodendrocitos se traduce en cierta diversidad funcional. Por ejemplo, Ludwin (1984) en un estudio inmunohistoquímico encontró que los oligodendrocitos perineuronales no forman mielina en condiciones normales, aunque pueden formar mielina en condiciones patológicas.

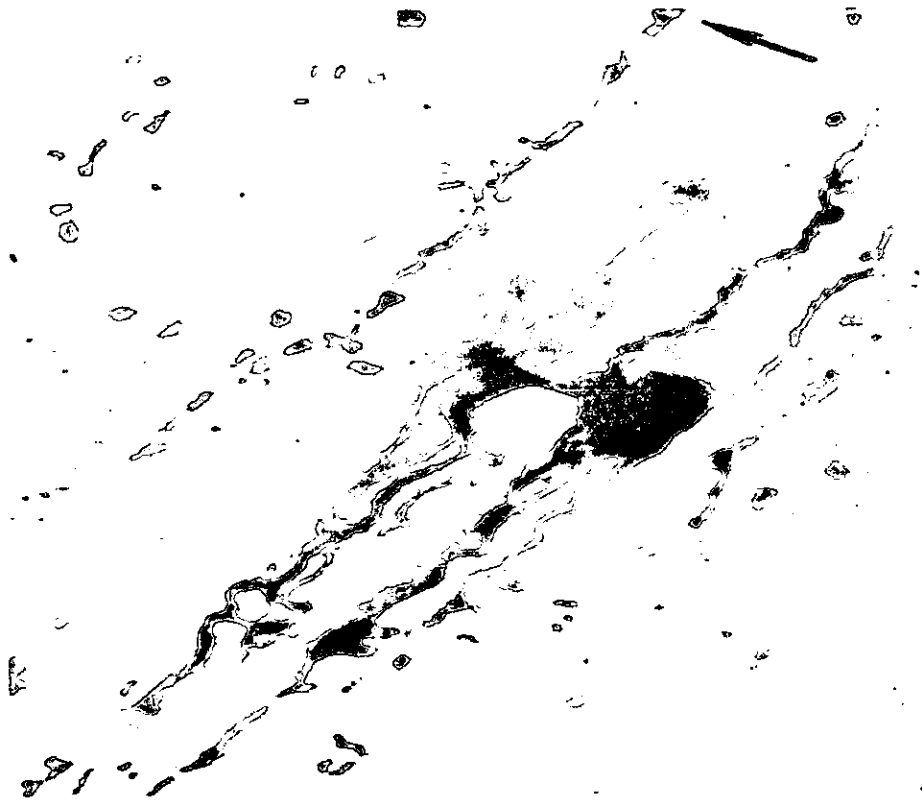


Figura 2. Fotomicrografía que muestra un oligodendrocito en la corteza cerebral (Tomado de Kettenman (1995)).

### **Microglía**

Las células microgliales muestran un cuerpo celular pequeño (5-10  $\mu\text{m}$ ) ocupado en su mayor parte por el núcleo, con un citoplasma denso del cual derivan 2 o más prolongaciones espinosas que emergen del soma celular. Un segundo tipo corresponde a las células con ramificaciones longitudinales alineadas con los tractos de fibras nerviosas, abundantes en la sustancia blanca. Finalmente existe un tercer tipo de células ramificadas de forma radial que se localiza en el neuropilo y en la vecindad de las neuronas, denominado microglía perineural. La microglía se encuentra habitualmente dispersa en el tejido nervioso; es muy abundante en la sustancia gris y menos en la sustancia blanca. Representa aproximadamente el 5-15 % del total de células cerebrales. Estos valores

pueden variar de acuerdo a la especie, área cerebral y edad del sujeto. El examen morfológico, su capacidad proliferativa y sus propiedades histoquímicas confirman que la microglía es una clase de fagocito mononuclear cerebral.

### **c) Receptores para neurotransmisores en células gliales**

Brevemente mencionare, que se han descrito un gran número de receptores a diferentes neurotransmisores en células gliales *in vivo* e *in vitro* (Martín, 1992). La presencia de varios canales iónicos y receptores metabotrópicos permiten suponer que las células gliales reciben la información, la analizan y generan una respuesta, tal y como lo hacen las neuronas. Sin embargo, aun es materia de debate.

Se ha observado la existencia de receptores para GABA y glutamato en células gliales (Martín, 1992). Estos receptores actúan a través de la apertura de un canal iónico que permea iones de cloro y calcio, respectivamente. Se ha propuesto que la activación de estos receptores ejerce efectos directos sobre la conductancia iónica y consecuentemente sobre el potencial de membrana de las células gliales (Cooper, Bloom y Roth (1991). También se han reportado receptores metabotrópicos en células gliales (Whitaker-Azmitia, 1993). Whitaker-Azmitia reportaron los receptores para acetilcolina, norepinefrina, serotonina, VIP ejercen efectos en la producción de AMPc e IP<sub>3</sub> en astrositos en cultivo. Se sabe que en neuronas, los efectos sobre el potencial de membrana inducidos por segundos mensajeros son lentos y de larga duración, sin embargo, se desconoce las acciones fisiológicas tanto de AMPc como de IP<sub>3</sub> en células gliales.

Utilizando estudios de inmunocitoquímica se ha mostrado la presencia *in situ* de receptores para serotonina en astrocitos de distintas regiones cerebrales (Azmitia, Gannon, Kneck y Whitaker-Azmitia. 1993). Azmitia et al., mostraron que los astrocitos

inmunomarcados se encontraron en mayor concentración en el hipocampo, septum, amígdala, estriado, en la corteza cerebral y en el cuerpo calloso tanto de animales jóvenes como adultos. Por otro lado, Matute y Miledi, 1993, utilizando la técnica de transfección de receptores mediante la inyección de mRNA en ovocitos de *Xenopus laevis*, documentó la presencia de receptores para acetilcolina provenientes de sustancia blanca.

La descripción de los distintos receptores descritos para células gliales se realizará en el siguiente apartado.

#### **d) Canales iónicos y propiedades electrofisiológicas de las células gliales.**

En un trabajo realizado por Birks, Katz y Miledi (1960) describieron la existencia de receptores a acetilcolina en células de Schwann *in situ.*, y Orkand. (1966) y Orkand, Nicholls y Kuffler (1966) poco tiempo después mostraron las propiedades electrofisiológicas en células gliales *in situ* aunque no mencionaron la existencia de receptores a neurotransmisores. Sus registros revelaron que el potencial de membrana de células gliales de anfibio, se encuentra entre -60mV y -90 mV y son eléctricamente pasivos. Los trabajos de Orkand y su grupo develaron que las células gliales no son dependientes de voltaje, es decir, cuanto más corriente se inyecte a la célula mayor será la corriente de respuesta que se generará. Es decir, existe una relación lineal entre corriente y voltaje. El registro intracelular del sistema nervioso intacto indica que el potencial de membrana presenta alteraciones de unos cuantos milivoltios en respuesta a una despolarización neuronal. Es necesario aplicar un voltaje despolarizante mayor para modificar de manera significativa la apertura de la mayoría de los canales iónicos en las células gliales.

La permeabilidad de la membrana a los iones de potasio sugiere su participación dentro de la homeostasis en el microambiente celular. La idea de que la glía funcione como



un amortiguador iónico nos permite suponer que participa en la redistribución de diferentes iones, incluyendo los de potasio, mediante un mecanismo pasivo a manera de amortiguador espacial. Este proceso de amortiguamiento iónico se le ha denominado mecanismo sifón e intenta explicar la función de las células gliales en el proceso de captura de los iones liberados durante la excitosis neuronal. La importancia de este mecanismo depende de manera crítica del arreglo anatómico de las células gliales así como de la distribución y propiedades de los canales de potasio.

Existen otros canales iónicos (sodio, calcio y cloro) que ayudan a mantener la osmolaridad de las células gliales (Tang, Cohen y Orkand. 1980; Manor, Moran y Segal. 1992; Manor, y Moran. 1994). Tang et al., (1980) afirman que cuando las concentraciones extracelulares de potasio aumentan, la glía genera un potencial despolarizante, llegando un momento en donde no se pueda internalizar más potasio. Se sabe que la bomba electrogénica de sodio permite mantener el equilibrio iónico celular por un tiempo mayor regiones específicas de la célula. La misma bomba permite la activación de intercambiadores de protones por iones de sodio o potasio que ayudarán al mantenimiento de la homeostasis glial. Un mecanismo adicional, es la activación de canales de cloro los cuales limitan la despolarización inducida por potasio.

## **La Serotonina**

### **Química, síntesis y metabolismo**

La serotonina, 5-hidroxi-triptamina, es una amina biogénica constituida por un anillo indólico formado por un grupo amino. La serotonina resulta de la hidroxilación del L-triptófano en una reacción catalizada por la hidroxilasa de triptófano. Dicha reacción es dependiente de oxígeno extracelular y de un cofactor. Así, los ajustes en los requerimientos a corto plazo de serotonina pueden cubrirse al modificar la cinética de la enzima, sin tener que alterar la cantidad de moléculas de la misma. Por el contrario, los requerimientos a largo plazo, requieren de modificaciones en la cantidad de enzima disponible. Subsecuentemente, la serotonina debe ser retirada del espacio sináptico mediante procesos de descarboxilación de la la región amina. Sin embargo y debido a los intereses de la presente tesis no se mencionará mas al respecto.

### **Origen**

En el sistema nervioso central, la serotonina es producida en neuronas localizadas en el cerebro medio y la protuberancia, específicamente en los denominados núcleos del Rafe. Las neuronas serotoninérgicas son neuronas gigantes cuyas proyecciones inervan prácticamente todas las áreas del cerebro y la médula espinal. Estas células se encuentran concentradas en los núcleos del Rafé dorsal y medial. Las neuronas del núcleo Rafé medial proyectan hacia distintas estructuras límbicas como son el hipocampo y el septum. Por otro lado, aquellas neuronas localizadas en el núcleo del Rafé dorsal envían proyecciones a los ganglios basales, substancia negra mesencefálica, y corteza cerebral, entre otras. Así, aunque los núcleos del Rafé contienen un número reducido de neuronas (e.g., el núcleo dorsal B6-B7, contiene unas 15,000 neuronas en el cerebro de la rata y alrededor de 250,000 en el humano), estas

muestran un extenso y complejo patrón de conexiones con múltiples regiones a lo largo de neuroeje (Figura 3).

Dada una abundante y difusa distribución de las aferentes serotoninérgicas, no es raro que la liberación de serotonina se haya asociado con la regulación de la temperatura corporal, presión sanguínea, movimientos oculares rápidos durante el sueño y percepción del dolor, modulación de conducta agresiva, impulsiva y de ingesta de alimentos. También se han asociado con padecimientos psiquiátricos como la esquizofrenia y la depresión dependientes de la liberación, degradación y recaptura de la serotonina.

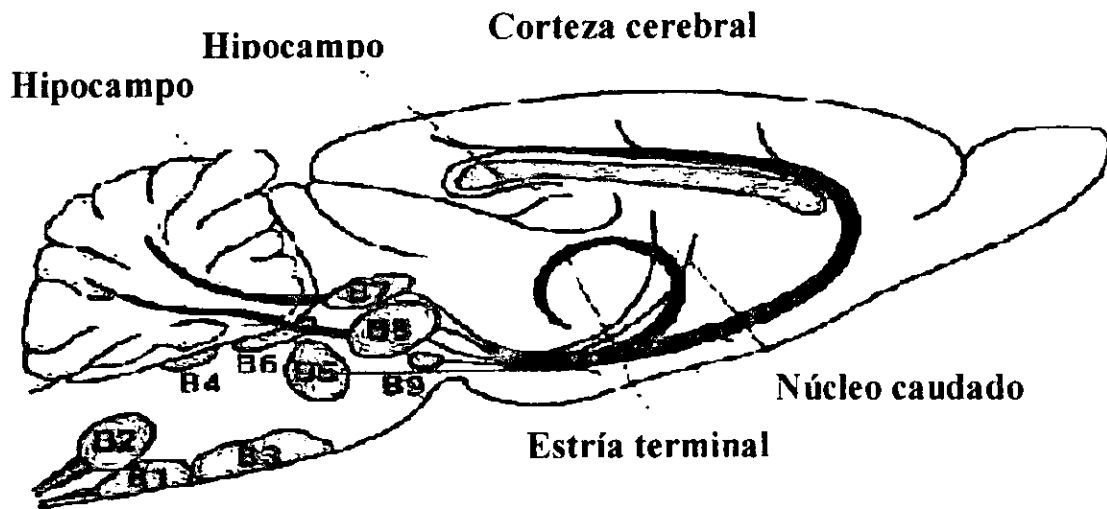


Figura 3. Esquema que muestra la distribución de las neuronas y fibras serotoninérgicas en un corte sagital del cerebro de rata. (Modificado de Ceña, 1998). B1-B3 núcleos dorsales posteriores que dan origen a proyecciones espinales descendentes; B5-B9 núcleos dorsales del Rafé que darán origen a proyecciones corticales y diencefálicas.

## **Almacenamiento y liberación**

Las neuronas centrales no constituyen la única fuente de serotonina en el cuerpo. Existe otro tipo de células, de naturaleza neuroendocrina, que liberan serotonina en la pared del tubo digestivo, en la glándula tiroides (células parafoliculares), etc. Estas células se han utilizado como modelo para estudiar los mecanismos de almacenamiento, liberación y recaptura de serotonina (Cooper, Bloom, Roth. 1991). Estos estudios permiten afirmar que la mayor parte de la serotonina está contenida en vesículas y es liberada por exocitosis dependiente de  $Ca^{2+}$  extracelular, y que una vez libre, la serotonina se encuentra en forma "ionizada" a pH fisiológico. En esta condición muestra una alta afinidad por el transportador localizado tanto en la membrana de las vesículas sinápticas como en la membrana celular.

## **Recaptura**

La recaptura constituye el medio principal de eliminación o inactivación de la serotonina una vez liberada a la sinapsis. Dicho proceso depende de energía y del co-transporte iónico de sodio y cloro. La serotonina tiene un sistema de captura mediado por transportadores. Estos transportadores son miembros de una familia de proteínas que muestran 12 dominios transmembranales y extremos amino y carboxilo intracelulares. El asa extracelular mayor encontrada entre los dominios 3 y 4 tiene varios sitios posibles de glicosilación. Además se ha reportado que estos transportadores presentan una estructura similar a los transportadores de norepinefrina y dopamina, con una mayor homología en los primeros 6-7 dominios transmembranales aunque una menor conservación en las regiones terminales. Considerando las constantes de afinidad del transportador se sabe que es saturable y de alta afinidad (Frazer and Hensler. 1994). Más aun se ha observado que ciertas toxinas que inhiben a la ATPasa de  $Na^+$ ,  $K^+$

disminuyen la velocidad de captura de la serotonina. Es importante mencionar que el sistema transportador para serotonina también ha sido observado en células gliales (Frazer and Hensler, 1994).

El estudio de los transportadores es de gran importancia farmacológica puesto que son uno de los sitios de acción de agentes antidepresivos.

## Receptores

La mayor parte de las acciones que ejerce la serotonina, son de naturaleza lenta, por lo que se comporta como un neuromodulador. De acuerdo a esto, existe una familia de receptores metabotrópicos que regula la mayoría de sus efectos sobre las células blanco. Se ha reportado además la existencia de un receptor ionotrópico (5-HT<sub>3</sub>) que media las acciones rápidas de neurotransmisión inducidas por serotonina a nivel neuronal. Este receptor contiene un canal iónico en su estructura localizado en la membrana post-sináptica (Tabla 1). Los receptores 5-HT<sub>3</sub> se encuentran distribuidos en los ganglios periféricos (e.g., ganglio cervical superior), así como en la sustancia gelatinosa de la médula espinal. Esta localización permite sugerir que los receptores 5-HT<sub>3</sub> participan en la transferencia de información nociceptiva.

La segunda familia esta formada por seis miembros conocidos como receptores 5-HT<sub>1 al 2</sub> y 5-HT<sub>4 al 7</sub>. Todos estos receptores son metabotrópicos, por lo que están asociados a cascadas de segundos mensajeros acopladas por proteínas G (Tabla 1). Cuando la serotonina actúa mediante la activación de cualquiera de estos receptores, juega un papel de neuromodulador. Es importante destacar, por otro lado, que cada subtipo de receptor es, en sí mismo, una familia. Por ejemplo, existen variantes de los receptores 5-HT<sub>1</sub> conocidos como A y B, y para el 5-HT<sub>2</sub> denominados como A, B, C (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los receptores para serotonina en roedores. Se describen el sistema de activación y la vía efectora, así como la constante de disociación ( $K_d$ ) del antagonista "específico" correspondiente (Modificada de Cooper et al. 1991; Segal. 1980; Ceña. 1998).

	Señal de transducción	Vía efectora proteína G	Localización	Función	Agonista selectivo	Antagonista selectivo  Kd (nM)
<b>5-HT<sub>1A</sub></b>	Inhibición de la Adenilato ciclasa	G <sub>i/o</sub>	Núcleos del rafe  Hipocampo	Auto receptor	8-OH-DPAT	Way 100 135  (8.7)
<b>5-HT<sub>1B</sub></b>	Inhibición de la Adenilato ciclasa	G <sub>i/o</sub>	Subículo  Sustancia negra	Auto receptor	Sumatriptan	GR5562  (7.4)
<b>5-HT<sub>1D</sub></b>	Inhibición de la Adenilato ciclasa	G <sub>i/o</sub>	Vasos sanguíneos craneales	Vasoconstricci ón	Sumatriptan	----
<b>5-HT<sub>1E</sub></b>	Inhibición de la Adenilato ciclasa	G <sub>i/o</sub>	Corteza  Cuerpo estriado	----	----	----
<b>5-HT<sub>1F</sub></b>	Inhibición de la Adenilato ciclasa	G <sub>i/o</sub>	Encéfalo y periferia		LY334370	----

<b>5-HT<sub>2A</sub></b>	Estimula fosfolipasa C	G <sub>q/11</sub>	Plaquetas, músculo liso  Corteza cerebral	Agregación de plaquetas, contracción, excitación neuronal	α-Me-5-HT	Ketanserina (8-9)  MDL100907 (9.4)
<b>5-HT<sub>2C</sub></b>	Estimula fosfolipasa C	G <sub>q/11</sub>	Plexo coroideo	----	α-Me-5-HT	Mesulergine (9)  SB200646 (7)
<b>5-HT<sub>3</sub></b>	Canal iónico controlado por ligando		Nervios periféricos	Excitación neuronal	2-Me-5-HT  m-CPBG	Granisetron (10)  Ondansetron (8-10)  Tropisetron (10-11)
<b>5-HT<sub>4</sub></b>	Activación de la adenilato ciclasa	G <sub>s</sub>	Hipocampo	Excitación neuronal	BIMU8  RS67506  ML10302	GR113808 (9)  SB204070 (10)
<b>5-HT<sub>5A</sub></b>	----	----	Hipocampo	----	----	----
<b>5-HT<sub>5B</sub></b>	----	----	----	----	----	----
<b>5-HT<sub>6</sub></b>	Activación de la adenilato ciclasa	G <sub>s</sub>	Cuerpo estriado	----	----	----
<b>5-HT<sub>7</sub></b>	Activación de la adenilato ciclasa	G <sub>s</sub>	Hipotálamo	----	----	

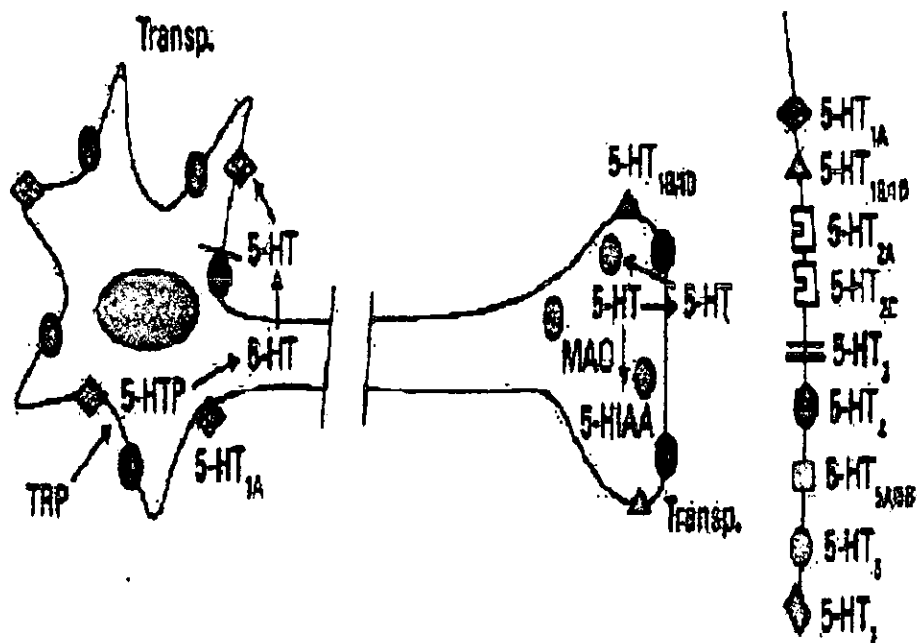


Figura 4. Representación esquemática de una unión sináptica que muestra la distribución de los diferentes subtipos de receptores a serotonina. Nótese que el receptor subtipo 5-HT<sub>1A</sub> es el único presináptico. (Tomado de Ceña, 1998).

### Receptores para serotonina en células gliales

Los receptores a serotonina antes mencionados son característicos de las poblaciones neuronales dentro del sistema nervioso central. Sin embargo, se ha documentado la presencia de diferentes receptores *in vivo* e *in situ* para neurotransmisores y neuromoduladores en células gliales, como aquellos que se muestran en la tabla 2 (Fillion, Beaudoin, Fillion, Rousselle, Robaut y Netter. 1983; Whitaker-Azmitia et al.; Azmitia, et



al., 1996; Wilson, Faber y Haring. 1998). Whitaker y Deakin mostraron en 1981 la existencia de sitios de unión mediante la utilización de serotonina [<sup>3</sup>H] en células gliales cancerosas. Asi mismo, Ding, Toth, Zhou, Parks, Hoffman y Shenk (1993) reportaron receptores a serotonina tipo 2 en células gliales derivadas de algunas líneas tumorales.

Se ha reportado en los trabajos realizados por el grupo de Hansson Simonsson y Alling (1990) y por Anath, Leli y Hauser (1987) que la activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub> en astrocitos conduce a la elevación de la hidrólisis de lípidos membranales, en particular del fosfatidil inositol trifosfato (ver también McCarthy y Salm. 1991). En apoyo a esto, se mostró que la aplicación de serotonina en cultivos de células gliales cancerosas, provocaba la elevación del calcio intracelular desde las pozas intracelulares, a través de la activación de un receptor del tipo 5-HT<sub>2</sub> (Reiser, Donie, y Binmöller. 1989).

La Tabla 2 muestra la clasificación de receptores a 5-HT encontrados en algunas líneas celulares gliales en cultivo.

Tabla 2: Clasificación de receptores a 5-HT reportados en cultivo de astrocitos. Tomado de Hirst, Cheung, Rattray, Price y Wilkin (1998).

Tipo de receptor	Vía efectora	Subtipos
5-HT <sub>1</sub>	Inhibidor de adenilato ciclasa (G <sub>i/o</sub> )	5-HT <sub>1A</sub> , 5-HT <sub>1B</sub> , 5-HT <sub>1D</sub> , 5-HT <sup>†</sup> <sub>1F</sub>
5-HT <sub>2</sub>	Estimula fosfolipasa C (G <sub>q/11</sub> )	5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2B</sub> , 5-HT <sup>†</sup> <sub>2C</sub>
5-HT <sub>3</sub>	Canal catiónico controlado por ligando	No reportado
5-HT <sub>4</sub>	Estimula adenilato ciclasa (G <sub>s</sub> )	5-HT <sub>4S</sub> y 5-HT <sub>4L</sub> (variantes)
5-HT <sub>5</sub>	Desconocido	5-HT <sub>5A</sub> y 5-HT <sub>5B</sub>
5-HT <sub>6</sub>	Estimula adenilato ciclasa (G <sub>s</sub> )	No reportado
5-HT <sub>7</sub>	Estimula adenilato ciclasa (G <sub>s</sub> )	5-HT <sub>7(a)</sub> , 5-HT <sub>7(b)</sub> , 5-HT <sub>7(c)</sub> (variantes)
† secuencia Homóloga del receptor 5-HT <sub>1E</sub> humano.		
† se reconocen más de siete isoformas funcionales del receptor 5-HT <sub>2C</sub> .		

(1993) mostraron que las células gliales del cuerpo calloso (CC) de cerebro adulto tanto bovino como humano, codifican para receptores para 5-HT. En este trabajo se sugiere la participación de receptores para serotonina del tipo 5-HT<sub>2</sub>, aunque no se realizaron los experimentos para corroborarlo. Sin embargo, aun se desconoce el significado funcional que podrían jugar los receptores a serotonina localizados en células gliales (ver Tabla 2). A este respecto, algunas teorías intentaron explicar la existencia de receptores a diferentes neurotransmisores tanto en astrocitos como en oligodendrocitos en el SNC. Las primeras teorías propusieron que dichos receptores participarían en el mantenimiento del equilibrio del microambiente sináptico, lo que permitiría la detección y reducción de daños traumáticos o patológicos. A este respecto, los trabajos realizados por Oosterink, Korte, Nyakas, Korf y Luiten (1998) mostraron que la aplicación de un agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-hidroxi-(2-N,N-dipropilamino-tetralina; 8-OH-DPAT), mostraba efectos neuroprotectores de daños inducidos por NMDA *in vivo*.

El sistema glia parece tener no sólo funciones protectoras, sino además ejerce efectos sobre la regulación de la función nerviosa. Recientemente, se ha propuesto además que la 5-HT regula el número de conexiones sinápticas. Wilson, et al., (1998), mostraron que la serotonina así como de NAN-190 (agonista del receptor subtipo 5-HT<sub>1A</sub>) ejerce efectos sobre la densidad sináptica en la capa molecular del hipocampo, sin muerte celular. Faber reportó que la 5-HT indujo modificaciones en los niveles de la proteína S100β en los astrocitos de la capa molecular del hipotálamo, acompañada por un rearrreglo de los contactos sinápticos en esta región cerebral (ver también Whitaker-Azmitia). Las alteraciones en los niveles de la S100β se han correlacionado con una facilitación en el crecimiento de procesos sobre neuronas serotoninérgicas. Griffin y Stanley (1993)

afirmaron que la ruptura de esta intercomunicación permite el desarrollo de patologías en las que existe una clara disminución de las terminales serotoninérgicas sobre sus órganos blanco en el hipocampo, como el Alzheimer, Síndrome de Down y algunos déficit inducidos por drogas durante el desarrollo (Bakus, Kettenmann y Schachner, 1988).

Las células gliales no sólo presentan receptores a diferentes neurotransmisores/neuromoduladores, también tienen la capacidad de sintetizar diferentes neurosustancias que pueden liberar al espacio sináptico en respuesta a la activación de los receptores localizados en sus membranas celulares (Martín, 1992). Levi y Patrizio (1992) reportaron que astrocitos *in vivo*, especialmente los del tipo I y II, sintetizan serotonina *in vitro*.

### **Efectos electrofisiológicos de la serotonina sobre células gliales**

La respuesta electrofisiológica a la administración de serotonina difiere de acuerdo al tipo celular que se evalúa. Por ejemplo, la aplicación de serotonina en neuronas del núcleo facial *in situ*, produce una despolarización lenta, acompañada de un pequeño incremento en la resistencia membranal. Esta condición facilita la respuesta neuronal a neurotransmisores excitatorios. En contraste, la aplicación de serotonina a explantes de tallo cerebral, estriado y médula espinal en cultivo, conduce a la hiperpolarización neuronal en un porcentaje elevado de células (64%) y a la depolarización neuronal en un porcentaje menor (13 %; Hösli y Hösli, 1987).

No todos los autores aceptan que los impulsos neuronales afectan a las células gliales. Kuffler y Potter (1964) realizaron registros del potencial de membrana en células gliales después de aplicar un estímulo eléctrico en las neuronas asociadas de Retzius en la

sanguijuela. Ni la descarga prolongada ni la descarga masiva sobre las neuronas de Retzius indujeron una modificación significativa del potencial de membrana de las células gliales. Este precedente pone de manifiesto, si la cantidad de neurotransmisor liberado de la terminal sináptica neuronal, es suficiente para inducir cambios en el potencial de membrana de las células gliales asociadas a estas neuronas.

A este respecto Butt y Tutton (1992) realizaron experimentos que mostraron en donde bajas concentraciones de ciertos neurotransmisores como glutamato o GABA (1  $\mu$ M) provocan la despolarización de astrocitos en cultivo (Butt y Tutton, 1992). Estos autores no mencionaron si esto podría suceder en toda la población de células gliales o sólo una pequeña muestra y en regiones específicas del SNC. La idea preconcebida por varios grupos de investigación sugiere que la principal acción de la glía es apoyar y coadyuvar a la función neuronal. Sin embargo, aun faltan por responder algunas preguntas como; ¿Cuál es el papel funcional de la presencia de receptores a serotonina y de otros neurotransmisores en células gliales? ¿Qué subtipos de receptores a serotonina se encuentran involucrados en la conducción de información en oligodendrocitos? ¿Los receptores a serotonina en oligodendrocitos tienen una cinética semejante a los reportados en astrocitos de otras áreas corticales?

Considerando estos antecedentes se ha postulado el siguiente objetivo de trabajo: estudiar las propiedades tanto farmacológicas como electrofisiológicas de los receptores a serotonina en ovocitos que expresan mRNA extraído de células gliales de bovino y rata.

## **Hipótesis**

El mRNA aislado del cuerpo calloso de animales adultos e inyectado a ovocitos de *Xenopus laevis*, induce la expresión de receptores a serotonina.

## **Objetivo general**

Estudiar las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores a serotonina codificados por el mRNA proveniente de células gliales del cuerpo calloso de rata y de bovino.

## **Objetivo particular 1**

Aislar mRNA del cuerpo calloso de rata y bovino adultos, usando la técnica de tiocianato de guanidina.

## **Objetivo particular 2**

Caracterizar electrofisiológicamente el receptor a serotonina del cuerpo calloso de animales adultos utilizando como modelo de expresión heteróloga al ovocito de *Xenopus laevis*.

## **Objetivo particular 3**

Caracterizar electrofisiológicamente los efectos de agonistas 8-OH-DPAT (selectivo al receptor 5-HT<sub>1A</sub>) en receptores serotoninérgicos expresados en el ovocito de *Xenopus laevis* por la inyección de mRNA de células gliales de animales adultos.

## **Hipótesis**

El mRNA aislado del cuerpo caloso de animales adultos e inyectado a ovocitos de *Xenopus laevis*, induce la expresión de receptores a serotonina.

## **Objetivo general**

Estudiar las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores a serotonina codificados por el mRNA proveniente de células gliales del cuerpo caloso de rata y de bovino.

### **Objetivo particular 1**

Aislar mRNA del cuerpo caloso de rata y bovino adultos, usando la técnica de tiocianato de guanidina.

### **Objetivo particular 2**

Caracterizar electrofisiológicamente el receptor a serotonina del cuerpo caloso de animales adultos utilizando como modelo de expresión heteróloga al ovocito de *Xenopus laevis*.

### **Objetivo particular 3**

Caracterizar electrofisiológicamente los efectos de agonistas 8-OH-DPAT (selectivo al receptor 5-HT<sub>1A</sub>) en receptores serotoninérgicos expresados en el ovocito de *Xenopus laevis* por la inyección de mRNA de células gliales de animales adultos.

## **Materiales y métodos**

### **Animales**

Para la realización de este trabajo, las muestras de cuerpo calloso (CC) fueron obtenidas de cerebros de bovino (macho) y de ratas de la cepa Wistar (macho) adultas. Las muestras de bovino se obtuvieron del rastro municipal del estado de Querétaro. Las muestras de bovino fueron tomadas y congeladas en un tiempo promedio de 45 minutos posteriores al sacrificio de los animales. Se observó el mayor de los cuidados de higiene bajo las condiciones disponibles en el lugar. Por otro lado, las muestras de ratas se obtuvieron de animales de la colonia mantenida en el bioterio del Centro de Neurobiología. Antes de la obtención de muestras, las ratas de aproximadamente 200 gramos de peso corporal, fueron mantenidas en condiciones controladas de luz/oscuridad (12/12) y con libre acceso al agua y alimento.

### **Obtención de las muestras**

El cerebro de bovinos adultos fue extraído íntegro de la cavidad cefálica a través de una craneotomía. El cerebro se colocó en posición dorso-ventral sobre una charola con hielo con la finalidad de disminuir la actividad catalítica. Se procedió a separar con los dedos cuidadosamente los lóbulos cerebrales por la línea interhemisférica. En cuanto observamos la aparición de materia blanca, se eliminó la mayor cantidad de materia gris que se encontraba adosada a la parte superior del CC. Una vez disecada la corteza, ésta se cortó lateralmente sobre los bordes del ventrículo lateral, en las direcciones frontal y posterior. Ventralmente, se cortó en la zona superior del fornix, liberando así un fragmento del CC. Las muestras de CC se transfirieron a una solución salina fría para bovino (concentración en mM; KCl 2.8; NaCl 140; MgCl 2; CaCl 2; Na-HEPES 10; Glucosa 2mg/ml; pH 7.2), con el objeto de eliminar los residuos de sustancia gris adheridos a las muestras.

Para el caso de las ratas, los animales fueron anestesiados (pentobarbital 50 mg/kg), decapitados y sus cerebros rápidamente disecados. El CC se extrajo removiendo la corteza cerebral, y las muestras del mismo se colocaron en solución salina para rata (concentración en mM; NaCl 136.7; KCl 5; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2; CaCl 2; HEPES 9.84; D-Glucosa 1.66 % ó sucrosa 2.19 % para tener un pH final de 7.3). Todas las muestras fueron

congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extracción y conservadas a -80°C hasta su uso.

La extracción y purificación de mRNA se realizaron de acuerdo a las técnicas establecida por Chomczynski y Sacchi (1987) que se describe en el anexo 1.

### **Métodos electrofisiológicos**

El registro de las corrientes inducidas por agonistas se realizó utilizando la técnica de célula completa con fijación de voltaje. Se extrajeron porciones del lóbulo ovárico de la rana *Xenopus laevis* los cuales fueron disecados mediante la utilización de un microscopio estereoscópico. La separación de los ovocitos se realizó manualmente con la ayuda de pinzas de relojero dentro de una solución de Barth (en mM: NaCl 88; KCl 1; NaHCO<sub>3</sub> 24; MgSO<sub>4</sub> 0.82; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.33; CaCl<sub>2</sub> 0.41; HEPES 5; gentamicina 1 mg; pH 7.4). Para la inyección, se utilizaron aquellos ovocitos cuyo desarrollo correspondió a los estadios V o VI. Los ovocitos seleccionados se mantuvieron en la solución de Barth en una incubadora a 16°C por un tiempo mínimo de dos horas. Se inyectó a cada ovocito una concentración de 1 µg/µl, y dos días después, los ovocitos fueron sometidos a un tratamiento con 0.5 mg/ml de colagenasa tipo I (SIGMA) para eliminar las células foliculares. El grupo de investigación del Dr. Miledi que 1 a 4 días posteriores a la inyección se presenta la máxima expresión de receptores a neurotransmisores (Miledi, Parker y Sumikawa (1989). Los ovocitos pudieron mantenerse vivos hasta 10 días posteriores a la inyección, dependiendo de la calidad de los ovocitos. De cuatro a 7 días posteriores a la inyección, los ovocitos fueron impalados usando el sistema de dos electrodos. Los ovocitos fueron colocados en una cámara de registro y mantenidos con una perfusión continua de una solución Ringer (en mM; NaCl 115; KCl 2; CaCl<sub>2</sub> 1.8; HEPES 5; pH 7.0). Usamos el sistema de perfusión para aplicación de las drogas.

La técnica de fijación de voltaje consiste en la colocación de electrodos de vidrio llenos con una solución de KCl 3M (2 MΩ de resistencia) (ver Figura 5). El sistema de electrodos se encuentra conectado a un amplificador Oocyte Clamp OC 725C (Warner Instruments Inc.), el cual se encargó de sensar e inyectar la corriente necesaria para llevar al ovocito a un potencial estable (-60 mV). El primer electrodo que se introduce dentro de la célula permite conocer el potencial de reposo de la membrana del ovocito. El segundo



electrodo que se introduce inyecta corriente que mantiene el potencial de membrana a  $-60$  mV. Los registros se realizaron a temperatura ambiente. Los registros de las corrientes fueron almacenados en una computadora conectada a un osciloscopio DSO de 200Ms/sec, y en segundo osciloscopio Nicolet 310. Los registros obtenidos fueron analizados utilizando el programa Origin 4.1.

### Reactivos

Algunas drogas fueron adquiridas en RBI, y aplicadas en las dosis que se indican a continuación: serotonina ( $1 \times 10^{-3}$  M); 8-OH-DPAT ( $5 \times 10^{-8}$  M). Los siguientes compuestos fueron obtenidos de Sigma: ácido glutámico ( $1 \times 10^{-3}$  M); ácido kaínico ( $1 \times 10^{-4}$  M); angiotensina II ( $1 \times 10^{-6}$  M); acetilcolina ( $1 \times 10^{-4}$  M); GABA ( $1 \times 10^{-3}$  M).

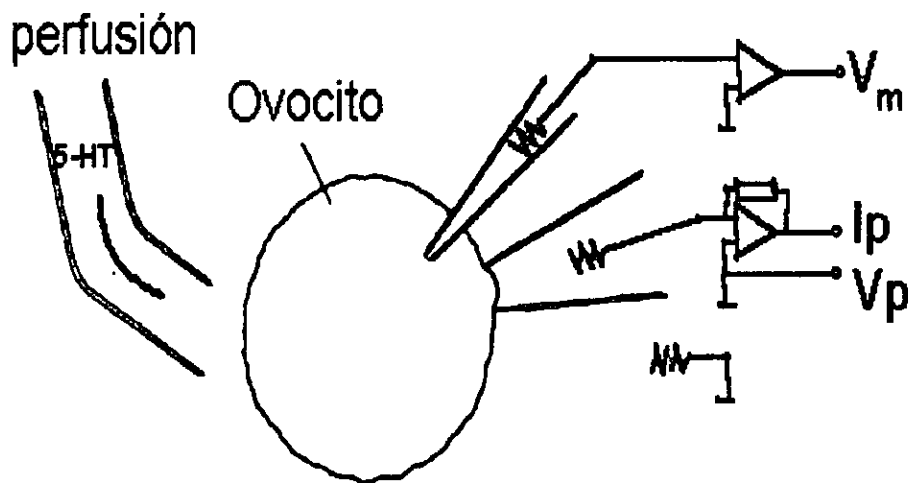


Figura 5. Esquema que ilustra el arreglo de electrodos utilizado para obtener los registros en la configuración de fijación de voltaje.  $V_m$ = potencial de reposo;  $V_p$ = potencial de registro;  $I_p$ = Inyección de corriente. (Tomado de Miledi, Parker y Sumikawa (1989).

## Resultados

### *Corrientes inducidas por distintos neurotransmisores en ovocitos inyectados con mRNA de células gliales proveniente de animales adultos*

La primera serie de experimentos se realizó tomando como base la identificación de receptores expresados por la inyección de mRNA aislado del cuerpo caloso de animales adultos. Así, probamos varios neurotransmisores, de los cuales reportamos sólo las respuestas que se muestran en la figura 6.

La figura 6a muestra el promedio de la corriente máxima de membrana de los ovocitos inyectados, en respuestas a la aplicación de GABA, kainato, Ach o serotonina (1 mM excepto para kainato en donde aplicó una concentración de 100  $\mu$ M). El efecto de la aplicación de diferentes neurosustancias en ovocitos inyectados produjeron una corriente cuya amplitud fue de  $36 \pm 26$  nA como resultado de la aplicación de GABA, de  $121 \pm 22$  nA por la aplicación de kainato, de  $200 \pm 75$  nA por la administración de Ach, y finalmente, de  $31 \pm 25$  nA en respuesta a 5-HT (media  $\pm$  std).

Por otro lado, los ovocitos inyectados con mRNA extraído de CC de bovino (figura 6b), mostraron corrientes cuya amplitud fue de  $68 \pm 40$  nA durante la aplicación de kainato (100  $\mu$ M), de  $127 \pm 42$  nA debido a la administración de Ach (1 mM), y de  $16 \pm 8$  nA como resultado de la exposición a serotonina (1 mM). En contraste con lo observado en ovocitos inyectados con mRNA de rata, aquellos ovocitos inyectados con mRNA de bovino no mostraron respuestas al GABA. Estos resultados confirman hallazgos previos reportados por Matute y Miledi (1993) que documentan la presencia de corrientes activadas por kainato, glutamato, Ach y 5-HT en ovocitos inyectados con mRNA del CC de bovinos y humanos pero no de GABA (Figura 6c). La corriente, sin embargo, difiere entre nuestros

resultados y aquellos previamente publicados. Los ovocitos inyectados con mRNA de rata y bovino mostraron una corriente promedio mayor a los 50 nA para kainato en contraposición a la respuesta promedio reportada por Matute y Miledi (menor a los 50 nA) utilizando las mismas dosis que en nuestros experimentos. Nosotros encontramos que la aplicación de Ach (1 mM) indujo una corriente promedio mayor a los 120 nA en los ovocitos inyectados con mRNA de ambas especies en contraposición a un valor menor a 20 nA reportados por Matute et al. Por otro lado, 5-HT (1 mM) indujo una respuesta promedio mayor a los 16 nA en los ovocitos inyectados por nosotros, mientras que el mismo neurotransmisor indujo un valor menor a los 5 nA en sus ovocitos tratados ( ver figura 6).

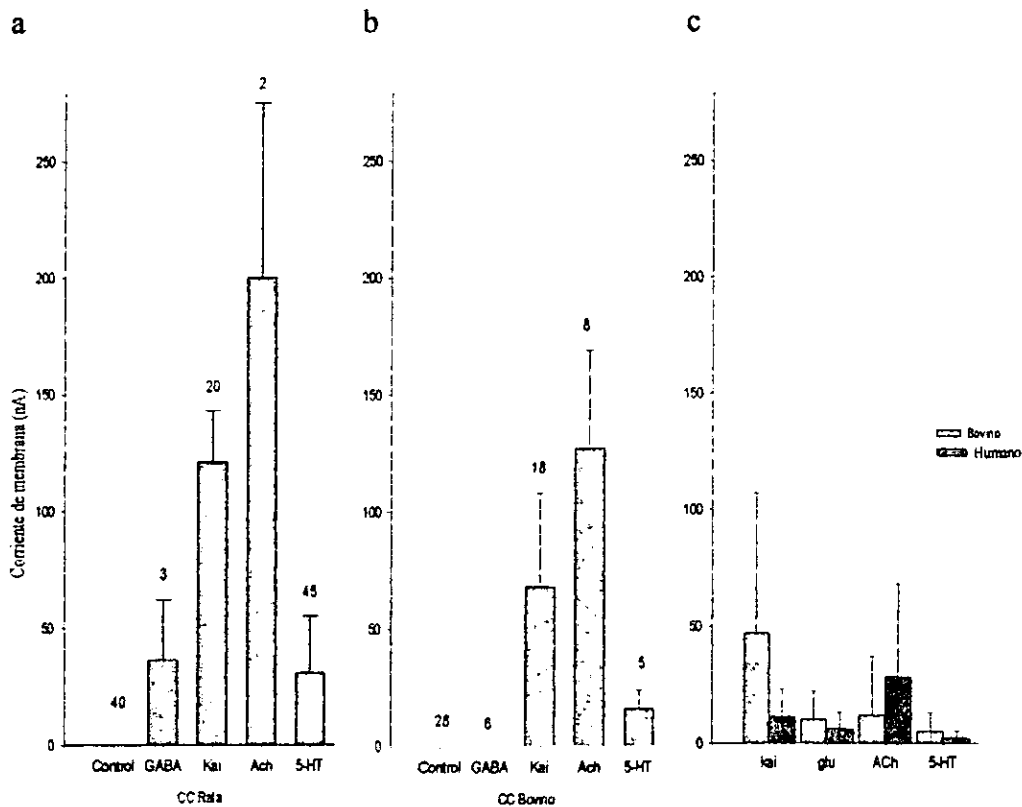


Figura 6. Resultados promedio de la corriente iónica inducidos por diferentes neurotransmisores/ neuromoduladores: GABA (1 mM), kainato (100  $\mu$ M), Ach (1 mM), glutamato (1 mM; Matute y Miledi, 1993) y serotonina (1 mM) en ovocitos inyectados con mRNA de cuerpo calloso de rata (a), bovino (b y c) y humano (Matute y Miledi). Los números sobre las barras indican el número de ovocitos registrados / número de donadores.

### ***Características electrofisiológicas de las corrientes en los ovocitos inyectados con mRNA de células gliales proveniente de animales adultos***

Para la identificación de los tipos de receptores expresados en ovocitos inyectados, procedimos a la caracterización electrofisiológica de cada uno de ellos. Probamos aplicando sólo 3 tipos de neurotransmisores en ovocitos inyectados con mRNA de corteza cerebral de rata y lo comparamos con las corrientes observadas en aquellos ovocitos inyectados con mRNA de cuerpo calloso de bovino. Nuestros resultados muestran algunas corrientes representativas obtenidas de ovocitos que fueron inyectados con mRNA de cuerpo calloso de bovino.

En la figura 7 se muestran corrientes representativas, inducidas por diferentes neurotransmisores, registradas en ovocitos inyectados con mRNA de CC bovino. La aplicación de kainato, provocó una corriente entrante que alcanza su valor máximo aproximadamente a los 30 segundos. Después de este tiempo, la respuesta muestra una recuperación de la línea basal que genera una caída lenta en el trazo de la corriente, probablemente debida al cambio en la cinética de una población de receptores.

El segundo registro de la figura 7 representa la corriente inducida por Ach (1 mM). Esta corriente entrante muestra un comportamiento oscilatorio. Por otro lado, se observa un

aumento en la frecuencia e intensidad de las oscilaciones de la corriente conforme se acerca al máximo.

El último registro de la figura 7 ilustra la corriente inducida por la perfusión de 5-HT que generó una corriente oscilatoria entrante. Alcanza su valor máximo de intensidad alrededor de los 60 segundos. En algunos registros observamos un componente que se presenta alrededor de los 30 segundos después de iniciada la administración con 5-HT.

Finalmente, en los ovocitos inyectados con mRNA del CC bovino no se encontró respuesta a GABA (1 mM; ver Figura 6).

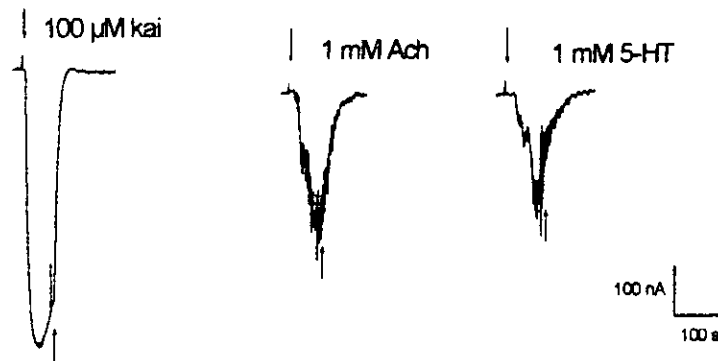


Figura 7. Corrientes obtenidas en varios ovocitos inyectados con mRNA de cuerpo calloso de bovino por la aplicación de ácido kaínico, de acetilcolina ó de serotonina. Las drogas fueron administradas por perfusión sobre el ovocito en Ringer normal. El potencial se mantuvo en -60 mV durante todos los registros. Las flechas indican el inicio y fin de la perfusión de cada agonista en todos los registros.

*Características electrofisiológicas de las corrientes serotoninérgicas en los ovocitos inyectados con mRNA de células gliales proveniente de animales adultos*

Con el objeto de dilucidar si las corrientes inducidas por 5-HT en los ovocitos inyectados con mRNA de CC, guardan similitud con aquellas expresadas en la sustancia gris, se inyectó un grupo de ovocitos con mRNA proveniente de la corteza cerebral (Figura 8). En los ovocitos inyectados con mRNA de corteza cerebral de la rata, la corriente inducida por la 5-HT presenta un componente entrante rápido, seguida de una disminución de la corriente la cual fue dividida en dos fases, una rápida y la otra oscilatoria lenta. La máxima intensidad de la corriente se alcanza después de transcurrido un segundo aproximadamente después de aplicado el agonista, y su valor fue de alrededor de 680 nA (Figura 8). En contraste, la corriente activada por 5-HT en ovocitos inyectados con mRNA de CC de la rata mostró un componente entrante lento, y un componente de disminución de la corriente también lento. La máxima intensidad de la corriente se alcanzó alrededor de los 100 segundos después de aplicado el agonista, y su valor fue de 105 nA (Figura 8).

En aquellos ovocitos inyectados con mRNA de corteza cerebral de bovino, la corriente inducida por la 5-HT presenta un componente entrante lento, seguido de un proceso de cierre de canales de manera lenta, progresivo y oscilatorio. La corriente máxima se alcanza después de transcurridos aproximadamente sesenta segundos después de aplicado el agonista, y su valor fue de alrededor de 140 nA. En contraste, la corriente activada por 5-HT en ovocitos inyectados con mRNA de CC de bovino (5 ovocitos provenientes de 2 donadores) mostró un componente entrante lento (figura 8), ligeramente más rápido que el observado en ovocitos inyectados con mRNA de la corteza cerebral (4 ovocitos provenientes de 3 donadores). Una vez alcanzada la intensidad máxima, la corriente mostró una meseta cuya duración fue de 113 segundos, seguida de un componente

de una recuperación de la basal de manera más rápido que el observado en los ovocitos inyectados con mRNA obtenidos de corteza cerebral (un ovocito). La máxima intensidad de la corriente se alcanzó alrededor de los 40 segundos después de aplicado el agonista, y su valor fue de 55 nA aproximadamente. Adicionalmente, los ovocitos que fueron inyectados con mRNA de CC, tanto de rata como de bovino, presentaron un retardo variable al inicio de la respuesta.

Finalmente, aunque no tenemos suficientes datos para confirmar las diferencias observadas en los registros obtenidos de ovocitos inyectados con mRNA de CC y de corteza cerebral de ratas y bovinos, existe una tendencia que nos sugiere diferencias entre cada especie. El significado funcional de dichas diferencias es desconocido.

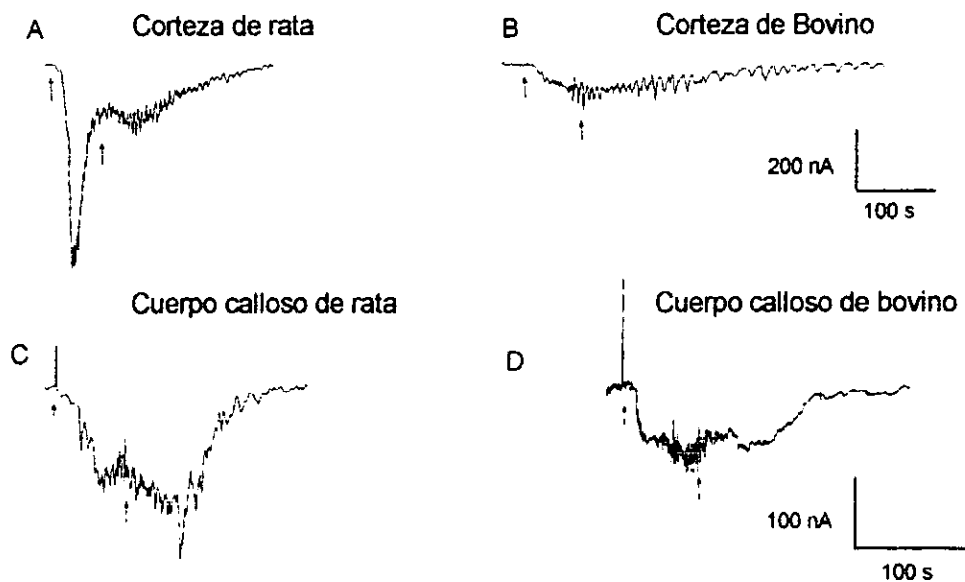


Figura 8. Corrientes provocadas por la aplicación de 1 mM de serotonina en ovocitos inyectados con mRNA proveniente de corteza cerebral de rata y bovino (mostrados de A y B). Los registros C y D muestran las corrientes de membrana provocadas por la aplicación de serotonina en ovocitos inyectados con mRNA de cuerpo calloso de rata y bovino.

***Identificación del subtipo (s) de receptor (es) serotoninérgico (s) en los ovocitos inyectados con mRNA de células gliales proveniente de animales adultos***

La Figura anterior muestra algunas diferencias en la forma de corriente registrada, sin embargo, es necesario conocer los tipos de receptores involucrados en la respuesta total, después de la aplicación de 5-HT. Para lo cual se decidió utilizar agonistas y antagonistas selectivos a un subtipo de receptor 5-HT. Farmacológicamente, se sabe que el 8-hidroxi-2(di-n-propilamino) es el agonista más específico de cualquiera de los agonistas de los receptores para serotonina. Este agonista se une selectivamente al receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Tabla 2). En la figura 9 se muestran los efectos de la 8-hidroxy-2 (di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT; 10 nM), agonista específico de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, en ovocitos inyectados con mRNA de CC de la rata. La dosis aplicada para 5-HT fue de 1 mM en combinación con una dosis de 10 nM del agonista al receptor fue 5-HT<sub>1A</sub>. Tras la aplicación de 5-HT se produjo una corriente con características similares a las antes descritas. Sin embargo, cuando se administró el agonista a ovocitos que expresaron receptores para serotonina de CC de rata no se obtuvo respuesta alguna.



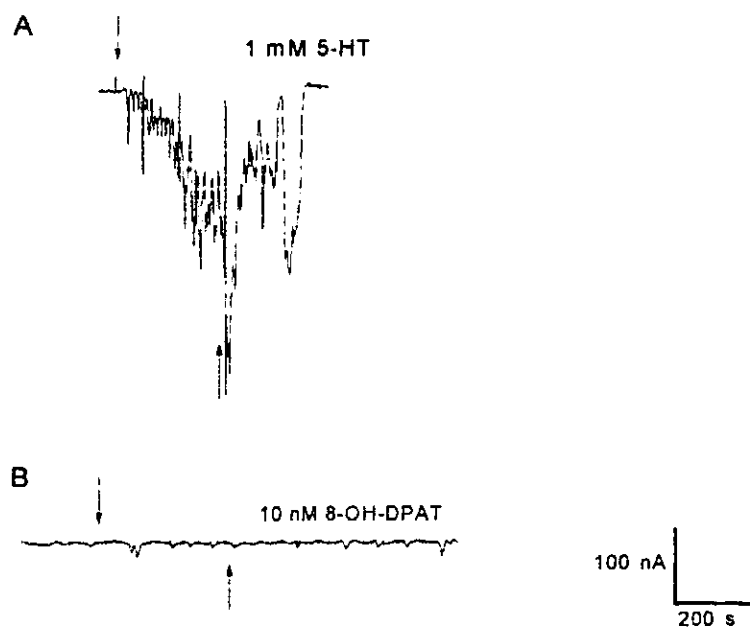


Figura 9. (A) Corriente generada por la aplicación de serotonina (1 mM), en un ovocito inyectado con mRNA obtenido de CC de rata. (B) Corrientes provocada por la administración de 8-OH-DPAT (agonista selectivo para el receptor  $5\text{-HT}_{1A}$ ) en el mismo ovocito. El 8-OH-DPAT no indujo ninguna corriente de membrana en dos ovocitos inyectados.

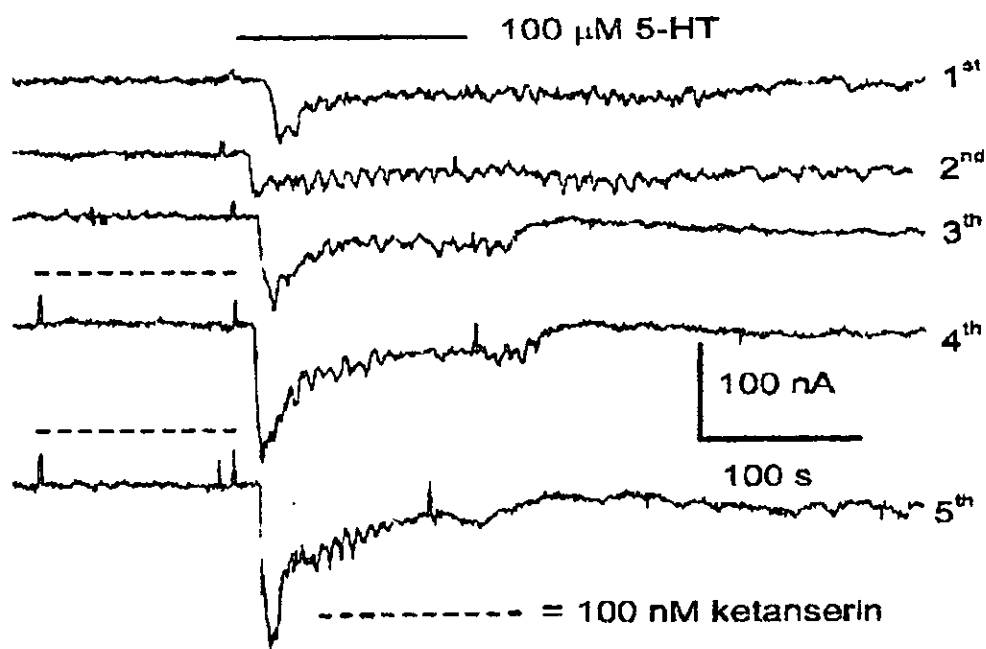


Figura 10. Corrientes generadas por la aplicación de  $100 \mu\text{M}$  de 5-HT en un ovocito que expresó el mRNA de CC de rata. Cada registro representa una aplicación de una dosis de serotonina utilizando el mismo ovocito ( $1^{\text{st}}$  al  $3^{\text{th}}$ ). El tiempo entre cada aplicación fue de 30 minutos. Los registros 4 y 5 muestran una corriente mediante la pre-incubación con  $100 \text{ nM}$  de ketanserina (antagonista selectivo para el receptor  $5\text{-HT}_2$ ), seguida de la perfusión de una dosis de serotonina en el mismo ovocito.

La Figura 10 muestra las corrientes inducidas por la aplicación de  $100 \mu\text{M}$  de serotonina en un ovocito que expresó el mRNA obtenido de células gliales de rata. El primer registro presenta una corriente al pico de aproximadamente  $50 \text{ nA}$ . Al realizar la segunda y tercera

aplicación de serotonina en el mismo ovocito no se encontró diferencias en el tamaño de la corriente al pico. Sin embargo, cuando se realizó la aplicación del neurotransmisor en este ovocito preincubado con 100 nM de ketanserina, observamos un pequeño incremento en la corriente. Una nueva aplicación d este protocolo sobre el mismo ovocito, mostró que la corriente al pico se ve facilitada, teniendo ahora un valor mayor a los 150 nA.

## Discusión

Las células gliales, en su conjunto, constituyen el tipo celular más abundante del sistema nervioso. En años recientes, evidencia acumulada ha documentado que estas células no son solamente los elementos pasivos de sostén, como hasta hace unos años eran consideradas, sino que participan en una gran diversidad de funciones tanto en el cerebro en desarrollo como en el maduro y senescente (ver antecedentes).

Una de las funciones que llevan a cabo las células gliales corresponde a la regulación de la excitabilidad neuronal. Esto lo logran, mediante el amortiguamiento de las concentraciones extracelulares de potasio, además de participar de manera directa en el recambio de algunos neurotransmisores. Así mismo, se ha documentado que las células gliales modulan la transmisión de información entre las neuronas, al permitir un mayor o menor grado de aposiciones entre las membranas neuronales a nivel sináptico y extra-sináptico (LePrince, et al., 1990; Wilson, et al., 1998).

La idea de que las células gliales pueden participar en los procesos de transferencia de información se ha extendido en años recientes. El descubrimiento de canales iónicos, receptores para distintas sustancias neuroactivas, y la posibilidad de éstas de modular las corrientes y conductancia iónicas gliales, han abierto la posibilidad de que las células gliales pudieran jugar un papel importante en el procesamiento de la información en el sistema nervioso central. En apoyo a esta idea, nuestros resultados muestran la existencia de receptores a kainato, Ach y 5-HT en ovocitos inyectados con mRNA derivado de CC de rata y bovino, región enriquecida en astrocitos y oligodendrocitos. Nuestros resultados confirman así observaciones previas que documentan la presencia de receptores a distintos neurotransmisores/ neuromoduladores en diferentes linajes de células gliales (Bevan, Miledi, y Grampp 1973; Decher, Wilcox, Dave, Rossman, y Kimelberg 1993; Ding, et al.,

1993; Brismar 1995; Azmitia, et al., 1996; Carson, et al., 1996). Adicionalmente, la aplicación de GABA a ovocitos inyectados con mRNA extraído del CC mostró diferencias relacionadas con la especie. En ovocitos inyectados con mRNA de CC de rata, el GABA activó una corriente entrante. En contraste, en aquellos inyectados con mRNA de CC de bovino, no logramos evidenciar la existencia de esta corriente. Los resultados obtenidos con el mRNA de rata difieren de aquellos obtenidos por Matute y Miledi. Estos autores indujeron corrientes de 1-3 nA tanto en ovocitos no inyectados como en ovocitos inyectados con mRNA de CC bovino y humano, tras la aplicación de GABA. La aparente diferencia entre nuestros resultados y aquellos de Matute y Miledi pueden ser debida a diferencias especie-específicas. Bureau, Laschet, Bureau-Heeren, Hennuy, Minet, Wins, y Grisar (1995) reportaron la existencia de receptores GABAérgicos mediante el uso de ensayos de unión a ligandos al receptor GABA-A en fracciones corticales enriquecidas con astrocitos aislados de cerebro de bovino adulto.

Una de las preguntas importantes en esta área del conocimiento es responder si las corrientes activadas por las sustancias neuroactivas utilizadas (Ach, kai, 5-HT, etc.) en este proyecto en ovocitos inyectados con mRNA de CC muestran semejanza con aquellas observadas en neuronas. Con relación a las corrientes activadas por kainato y ACh en nuestros ovocitos, la forma de los trazos es similar a los reportados previamente por (Matute, Arellano, Conde-Guerri y Miledi (1992); Matute, García-Barcina y Miledi (1994) en ovocitos inyectados con mRNA de cerebro total, y a los obtenidos en registros neuronales. Dicha semejanza sugiere que las células gliales del CC muestran subtipos de receptores para ACh y kainato semejantes a los observados en linajes neuronales, o bien que nuestras muestras pudieran haberse contaminado con tejido cortical. Esto último, sin

embargo, es poco probable pues la disección del CC, tanto en la rata como en el bovino, se realizó removiendo totalmente el manto cortical.

Como se mencionó anteriormente, las corrientes activadas por 5-HT observadas en ovocitos inyectados con mRNA de CC de rata y bovino, y aquellos inyectados con mRNA extraído de corteza cerebral de ambas especies, mostraron diferencias importantes en su forma tamaño y velocidad de activación (Figura 3).

Este hallazgo sugiere que las células gliales del CC muestran receptores serotoninérgicos tienen la tendencia a ser diferentes de aquellos neuronales. Se requiere sin embargo, de una caracterización más profunda para validar esta propuesta.

Con el objetivo de iniciar la identificación y caracterización del subtipo de receptor serotoninérgico que media los efectos del agonista sobre las corrientes mostradas por ovocitos inyectados con mRNA de CC de rata, se probaron la acciones de 8-OH-DPAT, agonista selectivo para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Van Nueten, Janssen, Van Beek, Xhonnex, Verbeuren, y Vanhoutte (1981). Se eligió este antagonista porque; 1) estudios previos han mostrado que la aplicación de 8-OH-DPAT induce la activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> en astrocitos en cultivo (Carson et al., 1996; Azmitia et al., 1996; Whitaker-Azmitia) y 2) se conoce que las corrientes oscilatorias activadas después de la administración de 5-HT, como las observadas en el presente trabajo, son mediadas por receptores metabotrópicos.

Nuestros resultados sugieren que el receptor serotoninérgico del subtipo 5-HT<sub>1A</sub> no media los efectos de la serotonina sobre las corrientes observadas en los ovocitos inyectados. Esto es confirmado por la ausencia de efectos sobre las corrientes inducidas por 5-HT, en respuesta a la aplicación de 8-OH-DPAT.

.....

Finalmente, debido a que Carson et al. han mostrado la existencia de mRNA que codifica para receptores serotoninérgicos del subtipo 5-HT<sub>5A</sub> en cultivos de astrocitos, así como en el fornix, fimbria y cuerpo calloso, todas ellas consideradas como sustancia blanca, parecería importante como un paso futuro, tratar de establecer si las respuestas a 5-HT observadas en ovocitos inyectados con mRNA de CC de rata son mediadas por éste subtipo de receptor.

## **Bibliografia**

- Anath, US., Leli, U. and Hauser, G. (1987) Stimulation of phosphoinositide hydrolysis by serotonin in glioma C6 cells. *J neurochem.* **48**:253-261.
- Awouters, (1985) The pharmacology of ketanserin, the first selective serotonin S<sub>2</sub>-antagonist. *Drug Development* **6**:263.
- Azmitia, E. C., Gannon, P. J., Knecht, N. M. Whitaker-Azmitia, P. M. Cellular localization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in primate brain neurons and glial cells. En: *Neuropsychopharmacology* volumen **14** (1996) New York: NY. pp. 35-46.
- Bakus, K.H., Kettenmann, H. and Schachner, M. (1988) Effect of benzodiazepine and pentobarbital on the GABA- induced depolarization in culture astrocytes. *Glia*, **1**:132-140.
- Bernstein, M., Lyons, S.A., Möller, T. and Kettenmann H. (1996) Receptor-mediated calcium signalling in glial cells from mouse corpus callosum slices. *Journal of Neuroscience Research* **46**:152-163.
- Bevan, S., Miledi, R., and Grampp, W. (1973) Induced transmitter release from schwann cells and its suppression by actinomycin D. *Nature New Biology* **241**:85-86
- Birks, R., Katz, B., and Miledi, R (1960) Physiological and structural changes at the amphibian mioneuronal junction in the course of nerve degeneration. *J. Physiol.* **150**:145-168.
- Brismar, T. (1995) Physiology of transformed glial cells. *Glia* **15**:231-245.
- Butt, A.T. and Tutton, M. (1992) Response of oligodendrocytes to glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid in the intact mouse optic nerve. *Neurosci. Lett.* **146**:108-110.
- Cajal, S.R. (1909) *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebrés.* A. Maloine. Paris.



- Carson, M.J., Thomas, E. A., Danielson P.E. and Sutcliffe, J.G. (1996) The 5-HT<sub>5A</sub> receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation. A mechanism for neural suppression of reactive astrocytes. *Glia* **17**:317-326.
- Ceña, V., Comunicación interneural. Tipos de sinapsis. En: Delgado, JM., Ferrús, A., Mora, F., y Rubia, FJ. (eds.) *Manual de Neurociencia*. Editorial Síntesis. (1998) pp.218.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E., and Roth, R. H. The biochemical basis of neuropharmacology. Chapter 11. Sixth edition. Oxford University Press (1991).
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:1 156-9.
- Decher, D.C., Wilcox, B.D., Dave, V., Rossman, P.A., and Kimelberg, H.K. (1993) Detection of 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptors by radioligand binding, Northern blot analysis, and Ca<sup>2+</sup> responses in rat primary astrocyte cultures. *J. Neurosci. Res.*, **35**:246-256.
- Del Río Hortega, P. (1919) El "tercer elemento" de los centros nerviosos. *Biol. Soc Espan. Biol.* **9**:69-120.
- Ding, D., Toth, M., Zhou, Y., Parks, C., Hoffman, B.J., Shenk, T. (1993) Glial cell-specific expression of the serotonin 2 receptor gene: selective reactivation of a repressed promoter. *Mol. Brain Res.* **20**:181-191.
- Fillion, G., Beaudoin, D., Fillion, M. P., Rousselle, J.C., Robaut, C., Netter, Y. (1983) 5-hydroxytryptamine receptors in neurons and glia. *J. Neural Transm. Suppl.* **18**:307-317.

- Frankfurt, M., O'Callaghan, J. And Beaudet, A. (1991) 5,7-dihydrotryptamine injection increases glial fibrillary acidic protein in the hypothalamus of adult rats. *Brain Res*, **549**:138140.
- Frazer, A. and Hensler, J.G. (1994) 5-HT<sub>1A</sub> receptors and 5-HT<sub>1A</sub>-mediated responses: effect of treatments that modify serotonergic neurotransmission. *Ann N Y Acad. Sci.* **600**:460-74.
- Griffin, W.S.T. and Stanley, L.C. Glial activation as a common denominator in neurodegenerative disease: A hypothesis in neuropathophysiology. In: *Biology and Pathology of Astrocytes-Neuron interactions*. Fedoroff et al., eds. Plenum Press, New York (1993) pp 359-381.
- Hansson, E., Simonsson, P., and Alling, C. (1990) Interaction between cyclic AMP and inositol phosphate transduction systems in astrocytes in primary culture. *Neuropharmacol.* **29**:591-598.
- Hirst, W.D., Cheung, N.Y., Rattray, M., Price, G.W., and Wilkin, G.P. (1998) Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Molecular Brain research.* **61**:90-99.
- Hösli, L. and Hösli, E. (1987) Receptors for dopamine and serotonin on astrocytes of culture rat CNS. *J. Physiol. Paris.* **82**:191-195.
- Kettenmann, H. The morphology and ultrastructure of oligodendrocytes and their functional implications. In: *Nueroglia*. Kettenmann, H and Ransom, R (eds.) Oxford University Press. (1995) pp.23-70.
- Kuffler, S.W., Potter, D.D. (1964) Glia in the leech central nervous system: physiological properties and neuron-glia relationship. *J. Neurophysiol.* **27**:290-320.

- Kuffler, S.W., Nicholls, J.G., and Orkand, R.K. (1966) Physiologic properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol.* **29**; 768-787
- LePrince, G., Copin, M.C., Hardin, H., Belin, M.F., Bouilloux, J.P. and Tardy, M. (1990) Neuron-glia interactions: Effect of serotonin on the astroglial expression of GFAP and its encoding message. *Dev. Brain Res.* **51**:295-298.
- Levi, G., Patrizio, M. (1992) Astrocyte heterogeneity: endogenous amino acids levels and release evoked by non N-methyl-D-aspartate receptor agonists and by potassium-induced swelling in type-I and type-2 astrocytes. *J Neurochem.* **58**:1943-1952.
- Ludwin, S. K. (1984) The function of perineuronal satellite oligodendrocytes: an immunohistochemical study. *Neurophatol. Appl. Neurobiol.* **10**:143-149.
- Manor, D., Moran, N. and Segal, M. (1992) Calcium dependence of serotonin-evoked conductance in C6 glioma cells. *Glia* **6**:118-126.
- Manor, D. and Moran, N. (1994) Modulation of small conductance calcium-activated potassium channels in C6 glioma cells. *J Membr. Biol.* **140**:69-79.
- McCarthy, K.D. And Salm, A.K. (1991) Pharmacology-distinct subsets of astroglia can be identified by their calcium response to neuroligands. *Neuroscience* **41**:325-333.
- Martin, D.L. (1992) Synthesis and release of neuractive substances by glial cells. *Glia* **5**:81-94.
- Matute, C., Arellano, R.O., Conde-Guerri, B., Miledi, R. (1992) mRNA coding for neurotransmitter receptors in a human astrocytoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:3399-3403.
- Matute, C., Miledi, R. (1993) Neurotransmitter receptors and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels encoded by mRNA from the adult corpus callosum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3270-3274.

- Matute, C., García-Barcina, J. and Miledi, R. (1994) Expression of neurotransmitter receptors and  $Ca^{2+}$  channels in the adult fornix nerve and optic nerve. *Mol. Neurosci.* **5**:1457-1460.
- Miledi, R., Parker, I and Sumikawa, K. Transplanting receptors from brains into oocytes. In: Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures Volumen 3. Raven Press. (1989) pp.57-90.
- Mory, S., and Lebrond, C.P. (1969) Electron microscopic features and proliferation of astrocytes in the corpus callosum of the rat. *J. Comp. Neurol.* **137**:197-226.
- Oosterink, B.J., Korte, S.M., Nyakas, C., Korf, J., and Luiten, PGM. (1998) Neuroprotection against N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in rat magnocellular nucleus basalis by the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT. *European Journal of Pharmacology.* **358**:147-152.
- Orkand, R.K., Nicholls, J.G., Kuffler, S.W. (1966) Effects of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* **29**:788-806
- Peters, A., and Vaughn, T.E. (1967) Microtubules and filaments in the axons and astrocytes of early postnatal rat optic nerves. *J. Cell Biol.* **32**:113-119.
- Reiser, G., Donie, F. and Binmöller, F.-J. (1989) Serotonin regulates cytosolic  $Ca^{2+}$  activity and membrane potential in a neuronal and in a glial cell line via 5-HT<sub>2</sub> receptors by different mechanisms. *J. Cell Sci.* **93**:545-555.
- Sasaki, H., Sato, F., and Mannen, H. (1989) Morphological analyses of single astrocytes of the adult cat central nervous system visualized by HRP microinjection. *Brain Res.* **501**:339-354.
- Segal, M. (1980) The action of serotonin in the rat hippocampal slice preparation. *J. Physiol.* **303**:423-439.

- Tang, C-M., Cohen, M.W., and Orkand, R.K. (1980) Electrogenic pumps in axons and neuroglia and extracellular potassium homeostasis. *Brain Res.* **194**:283-286.
- Van Nueten, J. M., Janssen, P.A.J., Van Beek, J., Xhonnex, R., Verbeuren, T.J. and Vanhoutte P.M. (1981) Vascular effects of ketanserin (R 41 468), a novel antagonist of 5-HT<sub>2</sub> serotonergic receptors. *J. Pharmacol and exp. Therap.* **218(1)**: 217-230.
- Whitaker, PM. Y Deakin JFW. (1981) Does <sup>3</sup>H-serotonin label presynaptic receptors in rat frontal cortex? *Eur. J. Pharmacol.* **73**:349-353.
- Whitaker-Azmitia, P.M. and Azmitia, E.C. (1986) <sup>3</sup>H 5-hydroxytryptamine binding to brain astroglial cells: differences between intact and homogenized preparations and mature and immature cultures. *J. Neurochem.* **46**: 1186-1191.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Clarke, C., Azmitia, E. C. (1993) Localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action. *Synapse* **14**:201-205.
- Wilson, C.C., Faber, K.M. and Haring, J.H. (1998) Serotonin regulates synaptic connections in the dentate molecular layer of adult rats via 5-HT<sub>1A</sub> receptors: evidence for a glial mechanism. *Brain Res.* **782**:235-239.

## **ANEXO 1**

### **Estandarización de la técnica de Tiocianato de Guanidina-fenol-cloroformo**

La técnica permite la extracción del RNA total, los pasos se describen a continuación:

El total de RNA será extraído de tejido por un proceso de lisis de tejido (cuerpo calloso, corteza) utilizando un volumen de una solución desnaturalizante.

#### **Solución de trabajo**

100 gr. de tiocianato de guanidina. 4 M

4.74 ml de citrato de sodio. 1M, pH 7.0

10.56 ml. de sarcosyl, 0.5%

117.2 ml. de agua desionizada tratada con dietil pirocarbonato al 0.05% (DEPC).

360µl de β-mercaptoetanol por cada 50 ml de solución desnaturalizante.

Después de preparar la solución se filtra usando papel Wathmann con un poro de (0.2 µm).

#### **Procedimiento:**

Se utilizó 1 gr de tejido congelado en nitrógeno líquido en el momento de extracción. En un tubo con capacidad para 50 ml se colocaron 10 ml de la solución de trabajo. Se coloca la porción de tejido congelado en la solución de trabajo. El paso inmediato es la lisis o disociación aguda utilizando un homogeneizador (Ultra Turrax T25). Debe tener cuidado de usar las soluciones frías o una cama de hielo.

Se homogeniza durante 2 minutos seguida de 2 minutos de reposo en hielo. A la mezcla resultante se adicionaron 0.1 volumen de 2 M de acetato de sodio pH 4 y un volumen de

fenol saturado. Debe agita suavemente el tubo después de agregar cada solución. Finalmente se adiciona 0.2 volúmenes de cloroformo-alcohol-isoamílico 49:1.

Se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se deja reposar durante 18 minutos sobre hielo. Tras el reposo, los ácidos nucleicos se separarán de la fracción proteica mediante centrifugación diferencial (10,000 rpm durante 35 minutos a 4°C).

El primer paso implica la desnaturalización total de los complejos de proteínas estructurales de membrana y los ácidos nucleicos y separar el RNA de DNA. El paso crítico en este punto es disminuir al máximo la acción de las RNAsas que son liberadas desde los órganos intracelulares cuando se produce la lisis. La técnica se utiliza tiocianato de guanidina y el  $\beta$ -mercaptoetanol, dos de los principales agentes inhibidores de RNAsas. Todo el proceso se realiza además utilizando una cama de hielo para reducir la temperatura y con ello reducir al máximo la actividad enzimática. Además la solución desnaturalizante con tiocianato de guanidino contiene N-lauryl-sarcosine, que rompe las uniones proteína-ácidos nucleicos. La centrifugación favorece que la mezcla se separe en tres fases o capas. La fase inferior fenólica, la fase intermedia proteínica y la fase superior o acuosa. La fase acuosa contiene suspendidos todas aquellas moléculas de bajo peso molecular

El siguiente paso consiste en tomar la fase acuosa o superior que contiene los ácidos nucleicos cuidando de no llevarse la interfase. La fase acuosa se mezcla entonces con un volumen igual de isopropanol. Deje precipitar la mezcla durante 1.5 hrs. o toda la noche a -20°C. Después de transcurrido este tiempo se realizó una segunda centrifugación (10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C) y el botón de color gris claro adherido al fondo del tubo se resuspende en 0.3 volúmenes de solución D y un volumen igual de isopropanol.

La mezcla se precipita por segunda vez durante 1.5 hrs o toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Después de precipitar se procede a centrifugar (10,000 rpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ ). El botón resultante se lavó con 5 ml de etanol al 75% dos veces y se deja secar al ambiente el botón resultante. El RNA se resuspende en 1000  $\mu\text{l}$  de agua.

Durante la realización de extracción de RNA se debe tener los mayores cuidados para evitar la contaminación de RNAsas, por lo que emplean guantes, cubre bocas y sobre todo soluciones tratadas con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.05%, que es un potente agente inhibidor de ribonucleoproteínas.

La concentración y pureza de las muestras de RNA se determina midiendo la absorbancia relativa de luz UV en un espectrofotómetro Pharmacia Biotech (Ultrospec 3000). La cuantificación de muestras de ácidos nucleicos se predice por que presentan una absorbancia máxima a 260 nm. Este valor nos permite el cálculo directo de la concentración de ácidos nucleicos:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g/ml} = A_{260} \times 40 \times 100$$

$A_{260}$  = absorbancia (en densidades ópticas) a 260 nm

40 = coeficiente de extinción de RNA

100 = factor de dilución (1:100)



El cálculo provee poca información acerca de la pureza y calidad de la muestra, El cálculo de la relación de absorbancia ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ) se determina para un valor estándar de la pureza y calidad de la preparación de  $2 \pm 0.05$ .

La muestra de RNA puede entonces ser almacenada en tubos eppendorf a una temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una solución HEPES 10 mM.

### **Purificación de poli (A)<sup>+</sup> mRNA por cromatografía sobre columnas de celulosa-oligo (dT).**

La purificación de RNA tiene la finalidad de aislar el poli (A)<sup>+</sup> del RNA extraído por el método descrito. La técnica sólo presenta un inconveniente de que sólo el 2-3% del RNA total es mRNA.

#### **Procedimiento:**

La técnica se fundamenta en eliminar la repulsión electrostática natural entre el RNA y los residuos de timidina unidos a la celulosa. Bajo las condiciones de altas concentraciones de sales, el sodio formará puentes iónicos que neutralizan la carga neta negativa intrínseca de las uniones fosfodiéster de los polinucleótidos. En presencia de un medio rico en sales, la atracción de cargas pudiera ser de suficiente magnitud para permitir el apareo de bases del poli (A)<sup>+</sup> mRNA a la secuencia de poli T, presente en la malla de celulosa. La capacidad de unión de la celulosa oligo-dT incrementa con una concentración de sales mayores a 500 mM de NaCl<sub>2</sub> o de KCl. El incremento en la capacidad de unión está acompañado por un incremento en la hibridación no específica de la matriz. La eliminación de sodio o potasio estabilizará el sistema, favoreciendo la disociación del RNA

híbrido. Una vez que ha corrido por el cromatógrafo o columna, el mRNA colectado puede precipitarse en una solución de cloruro de sodio y 2-propanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El pellet en la suspensión de alcohol y sal se incuba por 1.5 a 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al finalizar se centrifuga 15-20 minutos a 10 000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . El procedimiento de lavado se repite dos veces. En el segundo lavado el exceso de líquidos se decanta y el botón se deja secar a temperatura ambiente. El botón se resuspende en un volumen de 30-500  $\mu\text{l}$  de HEPES 10 mM.

La concentración de RNA suspendido en HEPES, se puede usar un espectrofotómetro para determinar la densidad óptica de la muestra a 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ).