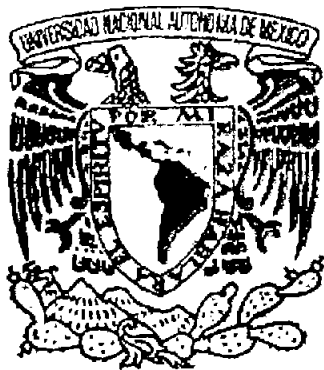


11281



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

TRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA
EN EL CUERPO CALLOSO DE LA RATA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
PRESENTA:

BIOL. DANIEL REYES HARO

TUTOR: DR. JESÚS GARCIA COLUNGA
CAMPUS UNAM - JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO.

MÉXICO 2004



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.

ÍNDICE

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	
El cuerpo caloso (CC)	9
El CC en el sistema nervioso central (SNC)	9
El CC y la evolución	11
Desarrollo del CC a nivel celular	11
Desarrollo del CC a nivel estructural	13
Agenesia del CC	15
El CC y algunas patologías	15
El CC y la glía	16
Células gliales	16
Corrientes de K^+ en la glía	17
1) Corrientes de potasio K_{DR}	17
2) Corrientes de potasio K_A	18
3) Corrientes de potasio K_{Ca}	18
4) Corrientes de potasio K_{IR}	19
Transmisión sináptica	19
Receptores a transmisores en la glía	20
Receptores a transmisores en el CC	22
Transmisión en el CC	23
Transmisión Serotoninérgica	24
Serotonina o 5-Hidroxitriptamina (5-HT)	24
Liberación de 5-HT	24

Receptores a 5-HT	25
Receptores a 5-HT en glía	27
Transporte de 5-HT	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
HIPOTESIS	29
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	
Cultivos de células gliales	31
Inmunofluorescencia a GFAP en las células en cultivo	33
Registro electrofisiológico de astrocitos	33
Acumulación de [³ H]-5-HT en rebanadas del CC	37
Liberación de [³ H]-5-HT en rebanadas del CC	39
RESULTADOS	
I. Características morfológicas de las células gliales in vitro e in vivo del CC de la rata	42
II. Corrientes de K ⁺ activadas por voltaje en astrocitos del CC de la rata	47
III. Respuestas a 5-HT en astrocitos del CC de la rata	59
IV. Acumulación de [³ H]-5-HT en el CC de la rata	72
V. Acumulación y Liberación de 5-HT en el CC de la rata	81

DISCUSIÓN

- I. Características morfológicas de las células gliales in vitro e in vivo del CC de la rata. 85
- II. Corrientes de K^+ activadas por voltaje en astrocitos del CC de la rata. 85
- III. Respuestas a 5-HT en astrocitos del CC de la rata. 88
- IV. Acumulación de [3H]-5-HT en el CC de la rata. 94
- V. Acumulación y Liberación de 5HT en el CC de la rata. 97

CONCLUSIONES

99

BIBLIOGRAFÍA

102

ABREVIATURAS

4 – aminopiridina – 4-AP

acetil colina – AcCo

ácido γ -aminobutírico – GABA

ácido ribonucleico mensajero – ARNm

adenosín monofosfato cíclico – AMPc

adenosín trifosfato – ATP

amortiguador de fosfatos de sodio – PBS

angiotensina II – Ang II

bario – Ba²⁺

calcio - Ca²⁺

cadmio – Cd²⁺

cloro - Cl

concentración de agonista necesaria para producir el 50% de la respuesta máxima -EC₅₀

concentración del antagonista necesaria para bloquear el 50% de la respuesta máxima - IC₅₀

corriente de potasio tipo A – corriente K_A

corriente de potasio con rectificador retardado – corriente K_{DR}

corriente de potasio activada por Ca²⁺ - corriente K_{Ca}

corriente de potasio con rectificador entrante – corriente K_{IR}

cuerpo calloso – CC

diacilglicerol - DAG

dopamina - DA

error estándar – E.E.

fosfolipasa C - PLC

glutamato – Glu

inositol trifosfato – IP₃

medio eagles modificado de Dulbecco – DMEM

medio neurobasal suplementado con G5 – NB-G5

monoaminoxidasa - MAO

N-metil-D-aspartato – NMDA

norepinefrina - NE

posnatal 0 ... posnatal n - P0 ... Pn

potasio - K⁺

proteína ácido-glio-fibrilar – GFAP

proteína cinasa A y C – PKA y PKC

receptor para 5-HT tipo n, n = 1-7 – 5-HT_n

relación corriente-voltaje – relación I-V

Ringer Krebs - RK

serotonina o 5-hidroxitriptamina – 5-HT

sistema nervioso central - SNC

sodio - Na⁺

tetra-etil-amonio - TEA

transportador de serotonina – SERT

transportador de dopamina – DAT

transportador de norepinefrina – NET

RESUMEN

El cuerpo caloso (CC) es parte de la sustancia blanca del cerebro y se constituye como la principal comisura que participa en la intercomunicación de los hemisferios cerebrales. Los componentes de este tracto son axones y células gliales; estas últimas constituyen el 99% del total de los somas celulares del tejido. La glía expresa receptores a distintos neurotransmisores y su activación entre otras cosas modula la principal corriente iónica que es la de K^+ . Una de las sustancias que podría funcionar como transmisor en el CC es la 5-HT.

Nuestro objetivo fue estudiar distintos aspectos de la posible transmisión serotoninérgica en el CC de la rata. Para ello se disociaron células del CC de ratas recién nacidas, las cuales fueron cultivadas y posteriormente registradas electrofisiológicamente. Los resultados obtenidos mostraron que ~99% de las células cultivadas fueron positivas a GFAP, lo que indicó que las células registradas eran astrocitos. Al evaluar las respuestas a la aplicación de pulsos y rampas de voltaje se encontraron corrientes de K^+ con rectificación retardada (K_{DR} ; corriente sensible a TEA) y tipo A (K_A ; corriente sensible a 4-AP pero insensible a TEA). Asimismo, se identificaron dos poblaciones celulares con distinta sensibilidad a Ba^{2+} : una en donde la K_{DR} y la K_A fueron bloqueadas selectivamente por el Ba^{2+} y la 4-AP respectivamente (55%), y otra en donde la K_{DR} y la K_A no fueron claramente identificadas y se presentó una menor sensibilidad al bloqueo con Ba^{2+} (45% de las células). Estos resultados demostraron la presencia de corrientes de K^+ activadas por voltaje en astrocitos del CC de la rata, que incluyen las corrientes K_{DR} y K_A .

Una vez que se caracterizó la principal corriente iónica de los astrocitos, se estudiaron las respuestas generadas por 5-HT y su efecto sobre la corriente de K^+ . Se encontró que el 34% de los astrocitos responde a 5-HT ($n = 111$) con una corriente entrante (entre -40 y -250 pA), el ión que genera la corriente podría ser el Cl⁻. Asimismo, la K_{DR} se redujo 30-50% a partir de una concentración de 300 μ M 5-HT. La cetanserina bloqueó el 85% de la corriente activada por 5-HT y de manera similar bloqueó la corriente de K^+ . Lo que sugiere que estas respuestas son mediadas por receptores 5-HT₂.

Adicionalmente, en algunas células, este antagonista no bloqueó la respuesta de 5-HT sino que la potenció en ~200%.

Además, se decidió estudiar otro elemento de la transmisión serotoninérgica, como es el transporte o la acumulación de 5-HT *in situ*. Para ello se utilizaron rebanadas del CC de la rata adulta y se encontró que existe un mecanismo de transporte de 5-HT que es dependiente de Na⁺ y sensible a la acción de algunos antidepresivos como la fluoxetina. Finalmente se evaluó si el CC es capaz de liberar 5-HT al ser despolarizado con una concentración extracelular elevada de K⁺ y se encontró que en la rata adulta la liberación de 5-HT depende de Ca²⁺, mientras que en etapas tempranas, día posnatal 6 (P6), el tejido no fue capaz de liberar 5-HT por estos mecanismos, lo que sugiere que esta monoamina podría provenir de fuentes externas al CC. Estos datos en conjunto apoyan fuertemente la existencia de la transmisión serotoninérgica en el CC de la rata.

INTRODUCCIÓN

El cuerpo calloso

El cuerpo calloso (CC), la comisura más grande del encéfalo, es una placa amplia y gruesa de fibras mielínicas empaquetadas, que conectan en forma recíproca extensas regiones de la corteza de un hemisferio con las regiones correspondientes al hemisferio opuesto. El CC está ubicado en el fondo de la cisura longitudinal, dividiéndose anatómicamente en pico, rodilla, tronco y rodete (Figura 1). En el s. XVIII Maurice Pito propuso que el CC era el sitio donde residía el alma, posteriormente en el siglo XIX se consideró que prevenía el colapso de los dos hemisferios. No fue sino hasta el siglo XX cuando la disección quirúrgica practicada en humanos aportó evidencia de que el CC funciona para comunicar o transferir información de percepción cognitiva, sensorial y motora entre los dos hemisferios (Bogen *et al.*, 1965). Esta transferencia de información ocurre de manera eficiente gracias a los 200 a 350 millones de fibras nerviosas que posee el CC humano (Aboitiz *et al.*, 1992 a,b).

El CC en el sistema nervioso central

Durante el desarrollo embrionario, una vez que el tubo neural está formado y que las flexiones iniciales del mismo aparecen, es posible identificar las estructuras primarias del cerebro: prosencéfalo, que se subdivide en telencéfalo y diencefalo, mesencéfalo y romboencéfalo. El telencéfalo da origen a los dos hemisferios cerebrales y a los ganglios basales. Los hemisferios cerebrales constan de un manto externo de sustancia gris denominado corteza cerebral y un manto interno de sustancia blanca denominado sustancia blanca cortical. La sustancia blanca está formada principalmente de haces de axones envueltos por la mielina producida por los oligodendrocitos, tipo celular que se incluye dentro de la neuroglía. La neuroglía constituye otro tipo de células diferentes a las neuronas, está en estrecho contacto con éstas así como con sus prolongaciones en los ganglios y nervios periféricos. Dentro de las fibras que conforman la sustancia blanca se encuentran las comisurales (Aboitiz *et al.*, 1992 a,b).



El cuerpo caloso de la rata

Figura 1. Corte coronal (imagen superior izquierda) y sagital (imagen superior derecha) del CC de la rata. En la imagen inferior se ilustran las partes en las que se divide el CC.

El CC y la evolución

El CC es una estructura exclusiva del cerebro de los mamíferos placentarios, que podría ser utilizada como carácter evolutivo diagnóstico, igual que la placenta. El CC fue descrito en 1836 por Owen, quien se dio cuenta que estaba ausente en el cerebro del wombat (marsupial australiano) y en su lugar estaba una comisura dorsal o hipocampal muy bien desarrollada, localizada ventralmente al hipocampo, misma que a diferencia del CC, se origina de una formación hipocampal. Por esto y debido a que el CC no tiene ninguna relación con el hipocampo, Owen lo consideró exclusivo de los placentarios.

La ausencia del CC en organismos no placentarios, desde un punto de vista evolutivo, implica un origen repentino del CC, al no existir estructuras ancestrales a él. Algo inesperado de acuerdo al concepto Darwiniano de la evolución, en el cual se esperaría que el CC apareciera como resultado de la acumulación sucesiva de pequeños cambios. De hecho, Huxley (gradualista del siglo XIX) diría en 1863 que el origen del CC significaba un salto mayor en la evolución. En la actualidad el CC sigue siendo un acertijo evolutivo, si la aparición de esta estructura no tuviera un valor adaptativo sería común encontrar líneas de placentarios en las que el CC hubiese desaparecido. Sin embargo, al seccionar el CC del humano o de otros animales no se observan efectos dramáticos a largo plazo en la conducta del individuo (revisado por Aboitiz y Montiel, 2003).

Desarrollo celular del CC

El crecimiento del CC ocurre de manera ordenada. En el humano inicia entre la 8-17 semana de gestación (Rakic y Yakovlev, 1968), con un engrosamiento del telencéfalo a lo largo de la pared rostral que forma la *lámina reuniens*, precursor de la sustancia blanca que origina la comisura anterior y el CC. Conforme las células de la *lámina reuniens* migran hacia arriba forman la *massa*, este aglomerado celular formará la "cama", sobre la cual descansarán las fibras que cruzan y se extienden a lo largo del CC (Barkovich y Kjos, 1988).

Las capas corticales 2-6, que usualmente contienen a las neuronas piramidales, dan lugar a los axones que cruzan la línea media (espacio físico que delimita a los dos hemisferios cerebrales) a través del CC. Estas capas o láminas surgen del plato cortical que a su vez se origina del primordio plexiforme del neuropilo.

El mecanismo por el cual los conos de crecimiento axonal migran a través del CC hasta encontrar su blanco correcto no está del todo entendido. Sin embargo, a la fecha se han identificado tres tipos de glía relacionados con la guía del crecimiento axonal: a) glía de lanzamiento (glial sling), b) glía tipo cuña (glia wedge) y c) glía dentro del *indusium griseum*.

La glía de lanzamiento está constituida por una población de células que se ubican en la línea media cortical, son negativas al inmunomarcaje de la proteína ácido gliofibrilar (GFAP) en roedores y migran de la zona ventricular lateral para extenderse por debajo del CC (Silver *et al.*, 1982), en el ratón este tipo de glía se forma totalmente hasta el día embrionario 17 (E17).

La glía tipo cuña se diferencia dorsomedialmente de los ventrículos laterales en E14, enviando proyecciones radiales largos hacia la línea media. En E15 estas proyecciones originan una estructura en forma de cuña sobre ambos lados de la línea media, la cual es muy evidente entre E17 y P0. Rostro-caudalmente la glía tipo cuña está presente de la *taenia tecta* a la comisura hipocampal (a una distancia de ~500 μm en E17). Los somas están localizados dentro de la zona ventricular, a diferencia de la glía de lanzamiento que migra hacia la línea media (Shu y Richards, 2001).

La glía dentro del *indusium griseum* se diferencia sobre el CC. Tanto la glía de lanzamiento como la glía dentro del *indusium griseum* forman una zona restringida dentro de la cual los axones del CC tienen un crecimiento con proyección ventral. La forma de la glía tipo cuña sugiere que ésta podría actuar para desviar los axones corticales hacia la línea media. Los axones corticales hacen una vuelta pronunciada hacia la línea media cuando se encuentran con la glía tipo cuña y se extienden por en medio en el canal formado por la glía de lanzamiento y el *induseum griseum*. La glía de lanzamiento y la glía tipo cuña aparecen a distintos tiempos y expresan distintas proteínas que pueden utilizarse como marcadores, entre los que se incluyen la GFAP y "slit-2" (Shu y Richards, 2001).

Las tres poblaciones gliales arriba mencionadas participan en la guía de los axones del CC, mientras que la glía tipo cuña y la glía del *indusium griseum* repelen los axones hacia y para cruzar la línea media por medio de la acción de moléculas como "slit-2" y "robo". La glía de lanzamiento podría participar proveyendo atracción axonal, quizás mediante un mecanismo de contacto (Figura 2) (revisado por Shu y Richards, 2001).

Desarrollo estructural del CC

El CC no se desarrolla homogéneamente, los axones de la rodilla se desarrollan primero y luego el tronco y el rodete. La única excepción a este paradigma de crecimiento, anterior-posterior, es el pico. Este es el último componente del CC que proyecta fibras, y en el humano ocurre a las 18-20 semanas de gestación (Rakic y Yakovlev, 1968).

Aunque los componentes principales del CC se establecen prenatalmente, el desarrollo está lejos de completarse al nacimiento. La mielinización de los axones corticales apenas inicia, va de posterior a anterior y podría ser el componente primario en el crecimiento del CC (Georgy *et al.*, 1993), ya que el CC duplica su tamaño entre el nacimiento y los dos primeros años de edad (Rakic y Yakovlev, 1968). El engrosamiento inicial se presenta en el rodete a los tres meses, un crecimiento más gradual se presenta en el pico y el tronco (Kier y Truwit, 1996). Este patrón de crecimiento en el CC favorece el desarrollo de áreas somatosensoriales (pico y rodilla) y visuales (rodete), justo cuando el neonato desarrolla la visión binocular y comienza a coordinar varios movimientos como tomar objetos (Von Huftsten, 1984; Barkovich y Kjos, 1988).

Durante el desarrollo, las proyecciones axonales del CC se presentan de manera transitoria hacia la corteza visual, auditiva y somatosensorial en primates y roedores (Ivy y Killackey, 1981; Feng y Brugge, 1983; Innocenti, 1994), y con la edad estas proyecciones son retraídas y eliminadas, proceso que se conoce como refinamiento sináptico, mismo que fue descrito para la corteza frontal y visual (Huttenlocher, 1990). Durante este proceso, el número de proyecciones en el CC se reduce y el área total se incrementa (Carlson *et al.*, 1988). Se piensa que el refinamiento sináptico, el incremento

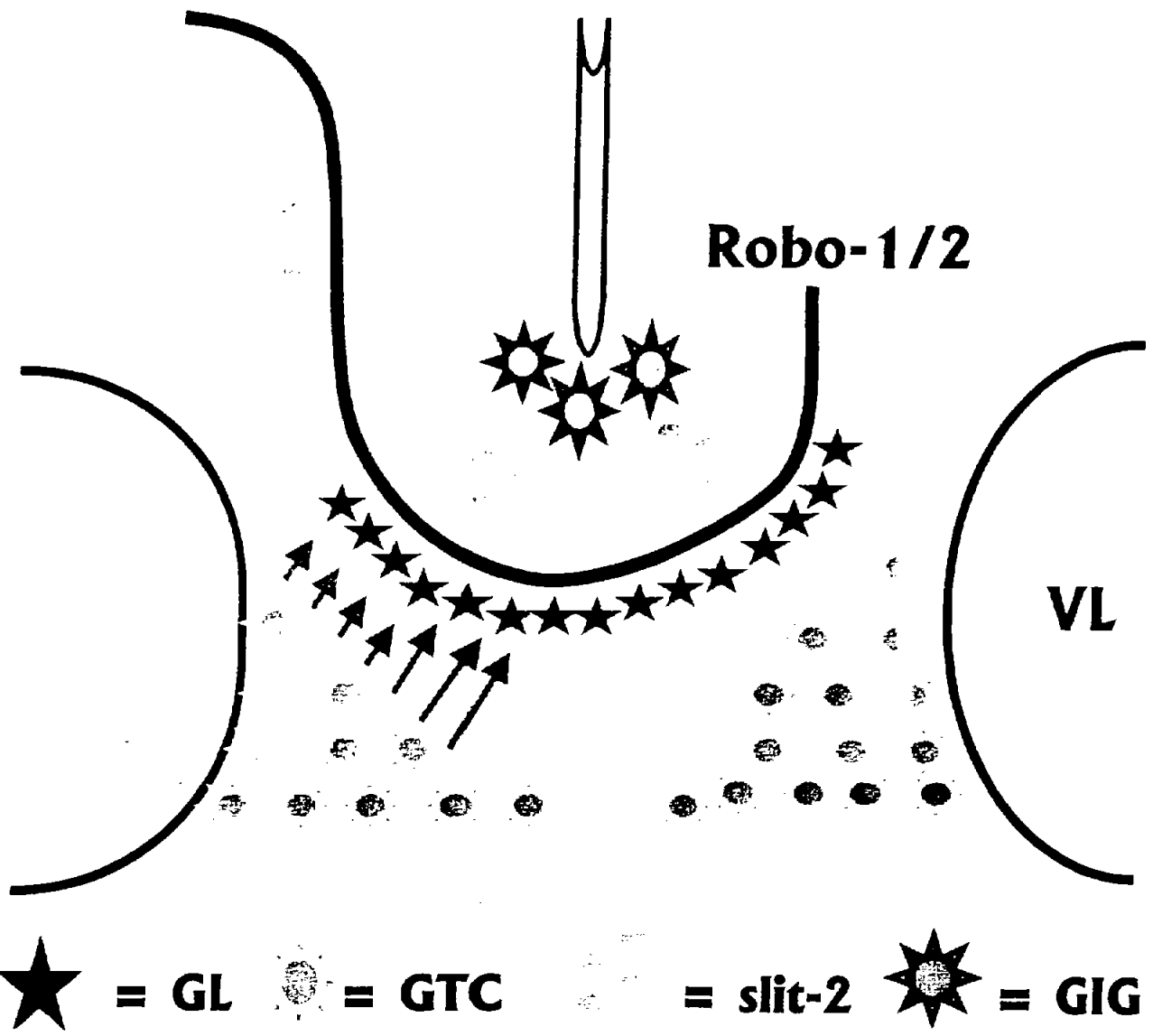


Figura 2. Modelo de guía axonal a través del CC por las poblaciones de glía de línea media. La glía tipo cuña (GTC) y la glía del *induseum griseum* (GIG) expresan "slit-2", molécula que repele los axones alejándolos de estos tipos de glía. Debido a que "slit-2" actúa como una señal-guía de corto alcance, los axones del CC (representados en rojo y que expresan los receptores "slit-2", "robo-1" y "robo-2") no son inhibidos por acercarse a la línea media, pero dan vuelta al toparse con la GTC. Los axones del CC podrían entonces usar señales-guía positivas de la glía de lanzamiento (GL) para cruzar la línea media y luego ser desviados dorsalmente por la GTC en el hemisferio opuesto. VL = ventrículo lateral (modificado de Shu y Richards, 2001).

en la mielinización y el diámetro de las proyecciones axonales favorecen la velocidad y la eficiencia de la transferencia de información interhemisférica.

El CC mantiene su forma y tamaño durante la tercera y cuarta década de la vida y comienza a presentar un declive gradual en el tamaño durante los siguientes años (Pujol *et al.*, 1992).

Agnesia del CC

La agnesia o ausencia del CC se asocia en el 85% de los casos con otras anomalías encefálicas, debido al desarrollo embrionario simultáneo de otras estructuras encefálicas como: quiste interhemisférico, anomalías de la migración y organización neuronal cortical cerebral, anomalías del cerebelo, lipoma, cefalocele, holoprosencefalia, arteria cerebral anterior ácidos, malformaciones de Dandy-Walker, de Chiari II, y quiste aracnoideo. En el 62% aparecen anomalías de tipo cardiovascular, respiratorio, muscular esquelético, gastrointestinal y urogenital. En el 20% se presentan anomalías cromosómicas, la mayoría trisomías 8, 13, 14, 15 y 18.

Todo esto sugiere que la agnesia del CC forma parte de una alteración generalizada del desarrollo. Sin embargo, la agnesia del CC puede ser asintomática, en cuyo caso solo puede ser detectada mediante pruebas neurológicas sofisticadas. Por otro lado, puede asociarse a alteraciones clínicas significativas que incluyen retraso en el desarrollo psicomotor de grado variable, alteraciones cognitivas (70%), epilepsia (39-60%), macrocefalia, hipertelorismo, exotropía e incapacidad para realizar la convergencia ocular, parálisis cerebral, déficit neurológicos focales y síndromes de desconexión (revisado por Goncalves-Ferreira *et al.*, 2003).

El CC y algunas patologías

Debido a que el CC constituye el sistema primario de proyección cortical, cualquier anomalía focal o difusa de las regiones corticales que están conectadas bilateralmente se espera que tengan efectos secundarios en las fibras del CC (Innocenti, 1994). Esto sucede en la esquizofrenia (Woodruff *et al.*, 1995; De Quardo *et al.*, 1996), el síndrome de hiperactividad con déficit de atención (Giedd *et*

al., 1994, Baumgardner *et al.*, 1996), esclerosis múltiple (Pozzilli *et al.*, 1991), la enfermedad de Alzheimer (Hofmann *et al.*, 1995; Vermersch *et al.*, 1996; Janowsky *et al.*, 1996), autismo (Saitoh *et al.*, 1995; Piven *et al.*, 1997), síndrome de Down (Wang *et al.*, 1992), dislexia (Duara *et al.*, 1991; Njokiktjien, 1994; Hynd, 1995) y el síndrome de Tourette (Peterson *et al.*, 1994; Baumgardner, 1996).

El CC y la glía

El CC del ratón fue caracterizado morfológica y fisiológicamente y los estudios mostraron que, a los cinco días postnatales, más del 99% de todos los somas son de origen glial y menos del 1% de los somas celulares corresponden a neuronas (Sturrock, 1976; Berger *et al.*, 1991). Entre el tercer y séptimo día postnatal más del 90% de las células poseen las características morfológicas de los progenitores gliales, mientras que la mayoría de las células, entre los 11 y los 18 días después del nacimiento, son oligodendrocitos (Sturrock, 1976).

Células gliales

El tubo neural, en su etapa temprana de desarrollo, consiste de un neuroepitelio. Está formado por células germinales que proliferan rápidamente durante el desarrollo y emigran lateralmente para formar una capa que recubre al tubo neural, estas células se conocen con el nombre de neuroblastos.

Los neuroblastos crecen rápidamente y se diferencian en neuronas funcionales. Los neuroblastos, al iniciar su migración, pierden la capacidad de dividirse. Una vez que se completa la producción de neuroblastos, el neuroepitelio produce glioblastos que son las células que se diferenciarán en astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales.

Las células endoteliales, junto con los astrocitos, son las primeras en diferenciarse. Posteriormente, los glioblastos originan a los oligodendrocitos y con esto se inicia la mielinización del SNC. Los glioblastos y la glía, a diferencia de las neuronas, conservan su capacidad para dividirse (Burt, 1993).

Corrientes de K⁺ en la glía.

Una de las características electrofisiológicas que distingue a las células gliales es la presencia y dominancia de las corrientes de K⁺ que incluyen corrientes salientes dependientes de voltaje con rectificación saliente (que comprende el rectificación retardada y la corriente tipo A), corrientes con rectificación entrante y corrientes activadas por Ca²⁺ (revisadas por Sontheimer, 1994).

1. *Corrientes de K⁺ con rectificación retardada (K_{DR}).* La K_{DR} fue descrita por primera vez en el axón gigante del calamar por Hodgkin y Huxley en 1952 y está presente en la mayoría de las células excitables, en donde es responsable de la repolarización (Kettenmann y Ransom, 1995). Asimismo, la K_{DR} ha sido asociada con la progresión del ciclo celular y la proliferación de las células gliales, debido a que su bloqueo inhibe estos procesos (Mac Farlane y Sontheimer, 2000). Existen diversos estudios en cultivos de astrocitos que reportaron la expresión de este tipo de corriente (Barres et al., 1988, 1990; Berger et al., 1991; Gibson y Bordey, 2002; Sontheimer et al., 1989; Sontheimer, 1994; Zhou y Kimelberg, 2000).

En el potencial de reposo los canales que originan la K_{DR} se encuentra cerrados y se abren por despolarización. El inicio de la activación ocurre a partir de -40 mV. El bloqueo de la K_{DR} se obtiene con Ba²⁺, tetraetil amonio (TEA) o 4-aminopiridina (4-AP). Estudios en astrocitos recién aislados (Barres et al., 1990; Tse et al., 1992) o en rebanadas del CC o del hipocampo (Berger et al., 1991; Bordey et al., 1997, 1999) expresan, al igual que en los cultivos (Bevan y Raff, 1985), la K_{DR} con propiedades cinéticas y farmacológicas similares.

En cuanto a la identidad molecular de los canales responsables de esta corriente y/o las subunidades de canales de K⁺ que participan en la K_{DR} solamente dos han sido identificadas en astrocitos de mamíferos (*in vitro*) y ambas pertenecen a la subfamilia de canales denominada *Shaker* (Kv1). La subunidad Kv1.6 fue encontrada mediante la reacción en cadena de la transcriptasa en reversa (RT-PCR) en astrocitos de corteza de ratón (Smart, et al., 1997), mientras que la subunidad

Kv1.5 se encontró en astrocitos de la médula espinal en donde se observó que tiene una participación predominante en la corriente K_{DR} (Roy *et al.*, 1996).

2. *Corriente de K^+ transitoria o tipo A (K_A)*. La corriente K_A fue descrita por primera vez en el soma neuronal de gasterópodos (Connor y Stevens, 1971) y se encontró en diversas células excitables en donde modula la frecuencia del potencial de acción (Hille, 1984; Kettenmann y Ransom, 1995). La corriente K_A se encuentra superpuesta a la K_{DR} y puede ser identificada por substracción, usando paradigmas de voltaje o manipulaciones farmacológicas (Connor y Stevens, 1971, Nakajima, 1966; Thompson, 1977), aunque en rebanadas del hipocampo se encontró que algunos astrocitos expresan casi exclusivamente la corriente K_A (Sontheimer y Waxman, 1993). La corriente K_A se ha encontrado tanto en astrocitos en cultivo, como en astrocitos recién aislados y astrocitos registrados en rebanadas de distintas regiones del cerebro como el hipocampo, nervio óptico, médula espinal y retina (revisado por Sontheimer, 1994).

La K_A se caracteriza por inactivarse rápidamente durante pulsos despolarizantes, típicamente se requiere un prepulso hiperpolarizante (de aproximadamente -110 mV) para remover la inactivación y activar así la corriente con pulsos despolarizantes. El inicio de la activación es de -40 mV. La corriente K_A posee una inactivación dependiente de voltaje con un curso temporal monoexponencial, es bloqueada por 4-AP y es relativamente insensible a TEA (Connor y Stevens, 1971, Nakajima, 1966; Thompson, 1977).

3. *Corrientes de K^+ dependientes de calcio (K_{Ca})*. La K_{Ca} requiere concentraciones intracelulares de Ca^{2+} elevadas para su activación (típicamente $> 10^{-6}$ M). La K_{Ca} ha sido descrita en astrocitos de hipocampo (Tse *et al.*, 1992), cerebro (Quandt y MacVicar, 1986) y nervio óptico (Barres *et al.*, 1988), así como en células de Müller (Newman, 1985). Estas corrientes son insensibles a 4-AP (Nowak *et al.*, 1987; Quandt y MacVicar, 1986). Basados en estudios farmacológicos y de conductancia se han identificado dos tipos de canales K_{Ca} : a) los canales tipo BK que poseen una conductancia de 200-300

pS, son sensibles a caribdotoxina, iberotoxina y TEA; b) los canales tipo SK que poseen conductancias de 10-14 pS y son sensibles a la apamina. Ambos tipos de canales se reportaron en astrocitos de la corteza cerebral del ratón (Nowak *et al.*, 1987).

4. *Corrientes de K⁺ con rectificación entrante (K_{IR})*. La corriente K_{IR} fue descrita en células de músculo por Katz en 1949, es una conductancia que incrementa su amplitud al hiperpolarizar a la célula. Esta corriente es la responsable del establecimiento del potencial de reposo en células gliales (Ransom y Sontheimer, 1995; Gibson y Bordey, 2002; Horio, 2001). Estos canales tienen una probabilidad de apertura grande a potenciales cercanos al reposo o hipéropolarizantes, mientras que la probabilidad de apertura es cercana a cero a potenciales despolarizantes. En consecuencia la corriente K_{IR} muestra una rectificación característica que despliega corrientes de mayor amplitud a potenciales negativos al potencial de reposo y corrientes de menor amplitud a potenciales positivos (Ransom y Sontheimer, 1995; Gibson y Bordey, 2002; Horio, 2001).

Su actividad es modulada por la proteína cinasa A, el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) o bien por la acitvación de los receptores adrenérgicos (Roy y Sontheimer, 1995). Los canales K_{IR} de astrocitos son sensibles a Cs⁺ y Ba²⁺. La K_{IR} ha sido encontrada en astrocitos del hipocampo, nervio óptico, médula espinal y retina (revisado por Sontheimer, 1994; Horio, 2001). La expresión de K_{IR} está regulada durante el desarrollo, aparece después de 7-10 días *in vitro* en astrocitos de la médula espinal (Sontheimer *et al.*, 1992) y hasta la segunda semana postnatal, *in vivo*, en astrocitos del nervio óptico y del hipocampo (Sontheimer y Waxman, 1993).

Transmisión sináptica.

El concepto de la transmisión sináptica en el SNC está basado, en buena parte, en la acción de la acetil colina (AcCo) en sinapsis periféricas, en particular la de la unión neuromuscular de la rana En donde la entrada de Ca²⁺ a la terminal axonal modula la liberación del neurotransmisor en la sinapsis (Miledi, 1973; Miledi y Reiser, 1983. Jeng, 2002).

Aquí, la AcCo es liberada al espacio sináptico en donde se difunde e interactúa con receptores post-sinápticos. La difusión de la AcCo está restringida por la unión rápida a los sitios del receptor, proceso conocido como "difusión de amortiguamiento" (Katz y Miledi, 1973). Esta difusión de amortiguamiento incrementa a su vez la posibilidad de que la AcCo liberada sea degradada por la acetilcolinesterasa (Magleby y Terrar, 1975). De esta manera la comunicación química en la que participa la AcCo está restringida espacialmente al volumen del espacio sináptico (Bunin y Wightman, 1998).

Esta información la podemos recapitular en el siguiente modelo. La transmisión sináptica es la comunicación neuronal, llevada a cabo mediante la liberación de un transmisor, de la neurona presináptica mismo que se difunde en la hendidura sináptica en donde se encuentran también la neurona postsináptica y la glía. El mensaje se recibe mediante el reconocimiento del transmisor por receptores específicos, traducándose en una despolarización o hiperpolarización de la neurona postsináptica, determinando así una respuesta excitadora o inhibitoria. La transmisión sináptica finaliza mediante la eliminación del transmisor del espacio sináptico, por difusión, a través del catabolismo enzimático o de su recaptura. La recaptura del transmisor se lleva a cabo por un sistema de transporte de alta afinidad, encontrándose en las terminales de las neuronas presinápticas y en las células gliales (Figura 3; Reyes-Haro y Salceda, 2000).

Receptores a transmisores en la glía

Las células gliales inicialmente fueron descritas por Virchow en 1858. Cien años después se realizaron los primeros estudios fisiológicos en el músculo esquelético desnervado de la rana, en donde se demostró que los potenciales post-sinápticos del músculo se perdían al desnervarlo y posteriormente aparecían con una amplitud menor (Birks *et al.*, 1960). Estos potenciales se producían debido a la liberación de AcCo por parte de las células de Schwann que, después de la degeneración axonal de las terminales nerviosas, eran las únicas células que permanecían en contacto estrecho con la membrana postsináptica de las fibras musculares (Bevan *et al.*, 1973a,b).

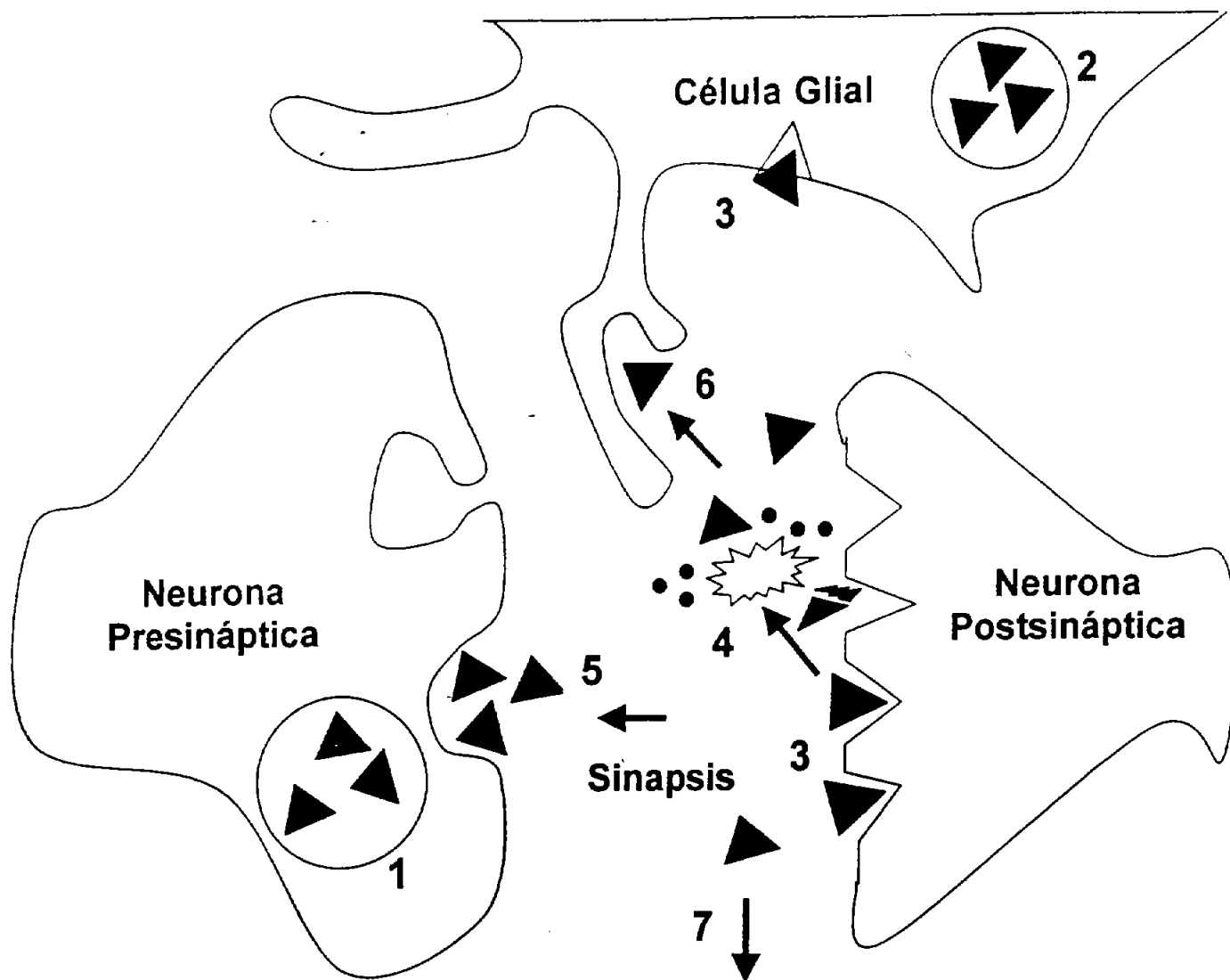


Figura 3. Esquema que representa los mecanismos de transmisión sináptica: 1. Liberación vesicular del transmisor de la terminal presináptica. 2. Liberación vesicular del transmisor de la glía. 3. Activación de receptores post-sinápticos o gliales 4. Catabolismo enzimático. 5. Transporte a la terminal presináptica. 6. Transporte a la glía. 7. Difusión.

Esto reveló una propiedad inédita para las células gliales: la liberación de AcCo (Dennis y Miledi, 1974; Ito y Miledi, 1977).

Con el establecimiento de las técnicas de cultivo fue posible estudiar las propiedades de las células gliales *in vitro* y en 1971 se reportó que las líneas celulares de origen glial respondían a agonistas de los receptores adrenérgicos, incrementando los niveles de AMPc (Clark y Perkins, 1971). Posteriormente se descubrieron proteínas que eran exclusivas de las células gliales como la GFAP o la glutamina sintetasa, que funcionaron como marcadores celulares y abrió la puerta para un estudio más detallado de las mismas (Bignami *et al.*, 1972; Norenberg y Martínez-Hernández, 1979). A estos estudios siguieron otros que sugerían la presencia de distintos receptores a transmisores en las células gliales: estudios autoradiográficos (McCarthy y Harden, 1981), estudios electrofisiológicos y de biología molecular por mencionar algunos (Berger *et al.*, 1992; Matute *et al.*, 1992-1995).

Actualmente se tiene evidencia de la existencia de receptores a diversos transmisores en los astrocitos: receptores a glutamato (Glu), ácido γ -amino-butírico (GABA), somatostatina, sustancia P, así como los receptores adrenérgicos, purinérgicos, serotoninérgicos, muscarínicos, histaminérgicos por mencionar algunos (revisado por Porter y McCarthy, 1997).

Receptores a transmisores en el CC

En el CC existen pocos estudios acerca de los receptores a transmisores expresados por los distintos tipos celulares presentes en esta comisura. Como se mencionó anteriormente, estos tipos celulares son principalmente de origen glial: astrocitos, oligodendrocitos y microglía.

En estudios electrofisiológicos en rebanadas del CC del ratón se encontró que las células gliales, como los glioblastos y los oligodendrocitos, expresan receptores a Glu y a GABA (Berger *et al.*, 1992). El uso de agonistas y antagonistas sugiere que los receptores a Glu expresados en el CC del ratón son de tipo NO-NMDA (conocido también como AMPA-Kainato), mientras que los receptores a GABA son de tipo A (Berger *et al.*, 1992).

Asimismo, en estudios efectuados en ovocitos de *Xenopus* inyectados con el RNAm del CC del bovino y del humano se reportaron respuestas a Glu. Las respuestas corresponden a receptores de Glu del tipo NMDA y No-NMDA (Matute y Miledi, 1993). Estudios de hibridación *in situ* mostraron que los RNAm's de las subunidades de los receptores a Glu (GluR1 y GluR3) que forman receptores funcionales del tipo No-NMDA, están presentes en los astrocitos del CC de bovino y de humano (Matute y Miledi, 1993).

Adicionalmente, se encontró que la aplicación extracelular de AcCo, 5-HT y angiotensina II (Ang II) en ovocitos de *Xenopus*, inyectados con RNAm del CC del bovino y del humano, generan la activación de receptores acoplados al sistema de segundos mensajeros de IP_3/Ca^{2+} que a su vez pueden activar corrientes oscilatorias de Cl^- (Matute y Miledi, 1993; Matute *et al.*, 1994). Posteriormente la presencia del receptor de Ang II se reportó en astrocitos del CC de la rata (Fogarty y Matute, 2001). Estos datos en conjunto muestran la diversidad de receptores que expresa el CC.

Por otro lado, en rebanadas del CC del ratón, se obtuvieron cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} al aplicar ATP, Glu, histamina, GABA, norepinefrina, 5-HT, Ang II, bradikina y sustancia P (Bernstein *et al.*, 1996). De esta manera, aunque se observaron un gran número de respuestas a distintos transmisores en el CC, queda por realizar la caracterización de los receptores implicados.

Transmisión en el CC.

La presencia de receptores para transmisores en el CC ha sido estudiada (Matute y Miledi, 1993-1994a,b; Berger *et al.*, 1995; Bernstein *et al.*, 1996; Xu y Pandey 2000; Fogarty y Matute 2001), y de acuerdo a algunos autores la presencia de sinapsis en los tractos de esta comisura es reducida (Bernstein, *et al.*, 1996). Con esta consideración, los transmisores que potencialmente pueden unirse a los receptores del CC seguirían un patrón de transmisión extrasináptica que, además de la liberación vesicular, incluiría la posibilidad de que el transmisor pudiera ser liberado por las células gliales o los axones en una forma no vesicular (Chiu y Kriegler, 1994). El significado funcional de la

transmisión extrasináptica comienza a ser explorado (Bernstein *et al.*, 1996; Bünin y Wightman 1998; Zhou *et al.*, 1998) y el CC podría ser un buen modelo para estudiar este proceso.

Transmisión Serotoninérgica.

Serotonina o 5-Hidroxitriptamina (5-HT).

La 5-HT es una amina biogénica que funciona como neurotransmisor, modulador, hormona y mitógeno se sintetiza a partir del triptófano con ayuda de la triptófano-5-hidroxilasa (Julius *et al.*, 1988). La mayor cantidad de la 5-HT del cuerpo se produce y actúa fuera del cerebro, solo el 1-2% del total de la 5-HT actúa como neurotransmisor o neuromodulador en el SNC. No es sino hasta los años 50's cuando se descubre en el SNC, antes se identificó su presencia en la sangre, como un factor vasoconstrictor, de ahí el nombre de serotonina. Las plaquetas contienen ~8% de la 5-HT total del organismo (todos estos datos se obtuvieron de Delgado *et al.*, 2000).

Las neuronas que liberan 5-HT se concentran en el núcleo del Rafé y se proyectan a la mayoría de las regiones del SNC, participando en diversas funciones neuronales. En la corteza cerebral, por ejemplo, las sinapsis serotoninérgicas están relacionadas con los estados emocionales y la percepción. Estas sinapsis son el principal sitio de acción de una gran variedad de fármacos antipsicóticos (Julius *et al.*, 1988; Barnes y Sharp, 1999; Torres *et al.*, 2003).

Liberación de 5-HT

La visión tradicional de la transmisión sináptica ha sido reconsiderada con el descubrimiento de que monoaminas como la 5-HT son liberadas al espacio extracelular de los núcleos que contienen los somas de las neuronas, en este caso el núcleo del Rafé (Hery *et al.*, 1982; Adell *et al.*, 2002). Esto sugiere una posible liberación somática de 5-HT, la cual ha sido descrita y visualizada en las neuronas Retzius de la sanguijuela (Bruns *et al.*, 2000; Trueta *et al.*, 2003).

Asimismo, en el tallo cerebral, las neuronas monoaminérgicas poseen varicosidades que se definen como porciones axonales abultadas con una dotación de vesículas sinápticas. Así que, las

moléculas de 5-HT pueden también ser liberadas de estas estructuras "semejantes a terminales", de manera parecida a lo que ocurre en las áreas de proyección de las terminales nerviosas (Adell *et al.*, 2002). Más aún, estas varicosidades pueden ser cubiertas por las proyecciones gliales como en el caracol, *Helix pomatia* y establecer así una comunicación de tipo "varicoso-gliial" (Elekes, 1991).

De este modo, la presencia de vesículas en las cuales la 5-HT puede ser almacenada y liberada por exocitosis ha sido demostrada en los somas, dendritas y más aún en las varicosidades axonales de las neuronas serotoninérgicas en el núcleo del Rafé (Steinbusch, 1981; Kapadia *et al.*, 1985; Liposits *et al.*, 1985; Chazal *et al.*, 1987), por lo que la liberación podría ocurrir en cualquier porción de las neuronas serotoninérgicas. Dicha liberación es dependiente de Ca^{2+} y los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo N y L participan en este evento, tanto en el núcleo del Rafé como en las neuronas Retzius de la sanguijuela (Bagdy *et al.*, 1995; Trueta *et al.*, 2003).

Adicionalmente, debe tenerse en cuenta que la 5-HT puede ser también liberada de una forma no vesicular, bien por un mecanismo estimulado por anfetaminas como la p-cloroanfetamina (Kuhn, *et al.*, 1985; Adell *et al.*, 1989) o por un mecanismo en el que participe el transportador (Levi y Raiteri, 1993).

Receptores a 5-HT

Los receptores a 5-HT, basados en su perfil farmacológico, secuencia de ADN y mecanismos de transducción de señales, se dividen en 7 tipos. A excepción del receptor 5-HT₃ que es de tipo ionotrópico, los otros receptores de 5-HT son de tipo metabotrópico (Barnes y Sharp, 1999; Delgado *et al.*, 2000). La tabla I muestra la clasificación de los receptores a 5-HT.

Receptores a 5-HT en la glía

Diversos estudios en las células gliales de mamíferos sugieren la presencia de los receptores: 5-HT_{2C} (Chen *et al.*, 1995); 5-HT_{1A} (Mercado y Hernández, 1992b; Azmitia *et al.*, 1996); 5-HT_{1A}, 5-HT_{1C}, 5-HT_{1D}, 5-HT₂, 5-HT₆ (Merzak *et al.*, 1996); 5-HT_{2A} (Yoder, *et al.*, 1996); 5-HT_{5A} (Carson *et al.*, 1996).

Tabla I. Receptores a Serotonina

Receptor	Subtipo	Vía efectora	Proteína G	Agonistas * Antagonistas **
5-HT ₁	<ul style="list-style-type: none"> 5-HT_{1A} 5-HT_{1B} 5-HT_{1D} 5-HT_{1E} 5-HT_{1F} 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Adenilato ciclase 	G _i /G _o	<ul style="list-style-type: none"> 8-Hidroxio-DPAT* (5HT_{1A}) CP94253* (5HT_{1B}) l-694,247* (5HT_{1D}) BRL 54443* (5HT_{1E/1F})
5-HT ₂	<ul style="list-style-type: none"> 5-HT_{2A} 5-HT_{2B} 5-HT_{2C} 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ PLC 	G _{q/11}	<ul style="list-style-type: none"> α-Methyl-5HT* (5-HT₂) Ketanserin** (5-HT₂)
5-HT ₃		Canal iónico (Na ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺)	---	<ul style="list-style-type: none"> Quipazine* RS16566 **
5-HT ₄		<ul style="list-style-type: none"> ↑ Adenilato ciclase 	G _s	<ul style="list-style-type: none"> RS67333* GR113808**
5-HT ₅	<ul style="list-style-type: none"> 5-HT_{5A} 5-HT_{5B} 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Adenilato ciclase ¿? 	<ul style="list-style-type: none"> G_s ¿? 	<ul style="list-style-type: none"> 5-Carboxamidotriptamine (high affinity for 5HT_{5A})
5-HT ₆		<ul style="list-style-type: none"> ↑ Adenilato ciclase 	G _s	<ul style="list-style-type: none"> 2-Methyl-5HT (potent 5HT₆ ligand)
5-HT ₇		<ul style="list-style-type: none"> ↑ Adenilato ciclase 	G _s	<ul style="list-style-type: none"> SB269970**

↑ =Modula positivamente ↓ = Modula negativamente (Tomado del catálogo de Tocris, 2003).

En el CC de los mamíferos solo existen dos trabajos que reportan respuestas a 5-HT, sin caracterizar sus propiedades (Matute y Miledi, 1993; Bernstein *et al.*, 1996).

Los estudios electrofisiológicos en glía son escasos, y en general sugieren que la 5-HT hiperpolariza a los astrocitos en líneas celulares de gliomas C6, astrocitos de corteza de la rata y células gliales de la sangüijuela (Walz y Schlue, 1982; Ogura y Amano, 1983, 1984). En otro estudio, realizado en astrocitos en cultivo de la médula espinal de ratas embrionarias (E17-18), se reportaron cambios en el potencial de membrana (de 1 a 8 mV) al aplicar exogenamente 5-HT. En este estudio fue posible detectar respuestas hiperpolarizantes (64%) y despolarizantes (8%), mientras que el resto no respondió a 5-HT (Hösli *et al.*, 1987b). También, en oligodendrocitos cultivados de la corteza cerebral de rata, la aplicación extracelular de 5-HT genera corrientes entrantes (Belachew *et al.*, 1998).

Transporte de serotonina

Una vez que es liberada al medio extracelular y activa a sus receptores, la 5-HT es removida por medio de un sistema de transporte de alta afinidad, dependiente de Na⁺ y sensible a fluoxetina. Al ser incorporada a las células nerviosas, la 5-HT es desaminada a través de la monoamino oxidasa (MAO), produciendo ácido 5-hidroxiindolacético (Bel *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2003). Este proceso ocurre tanto en las neuronas como en los astrocitos (Katz y Kimelberg, 1985; Ferre *et al.*, 1994; Bel *et al.*, 1997; Hirst *et al.*, 1998b; Inazu *et al.*, 2001).

El estudio del sistema de transporte para la 5-HT tiene gran importancia farmacológica y fisiopatológica, debido a que es un sitio de acción de antidepresivos y compuestos tricíclicos que inhiben la recaptura de 5-HT (Fuller, *et al.*, 1991; Blakely, 2001; Torres *et al.*, 2003). Además de desempeñar un papel central en la depresión, este transportador es también blanco de la acción de otras drogas, como la cocaína, 3,4-metilenodioxo-N-metilanfetamina (MDMA = "extasis") y las metanfetaminas (Zhou *et al.*, 1998; Corey *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2003).

El bloqueo de la recaptura de 5-HT por inhibidores selectivos en las células gliales es de gran relevancia en padecimientos psiquiátricos como la depresión, neurosis obsesiva compulsiva, los desórdenes de pánico, de personalidad con agresividad y características impulsivas, así como los desórdenes alimenticios (anorexia y bulimia), abuso de drogas, dolor pre-menstrual y crónico (Sur *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2003).

El transporte de 5-HT es el elemento fundamental en la regulación de la duración y el tono de la transmisión serotoninérgica (Zhou *et al.*, 1998). A la fecha solo se ha identificado una proteína responsable del transporte de 5-HT. El gen del transportador de serotonina (SERT) codifica para una cadena polipeptídica de 630 aminoácidos con 12 dominios transmembranales, regiones citoplasmáticas con un extremo amino y carboxilo terminal, sitios de glucosilación en la segunda asa transmembranal, un sitio potencial para la fosforilación a través de la proteína cinasa C (PKC) en el segundo dominio transmembranal (Zhou, *et al.*, 1996).

El peso molecular para SERT es de 74-78 KDa (Sur, *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996). Estudios inmunohistoquímicos mostraron que SERT está presente en el hipocampo, *globus pallidus*, estriado, amígdala, tálamo y vías axonales como la corteza cingulada. El CC no presentó un marcaje tan intenso como el de las regiones arriba mencionadas, aunque reveló su presencia en fibras axonales (Zhou, *et al.*, 1998). La presencia de un sistema de transporte para 5-HT en el CC, así como las características cinéticas del mismo, se desconocen. Por esto, el estudio del mecanismo, la localización y la regulación de la remoción de la 5-HT es importante para entender el papel de este transmisor en la fisiología del CC y su posible implicación en las patologías anteriormente descritas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CC es un tracto de fibras nerviosas que aparentemente carece de actividad serotoninérgica. Sin embargo, la presencia de fibras axonales inmunoreactivas a 5-HT, las respuestas a 5-HT en ovocitos inyectados con RNAm del CC del bovino y del humano, así como en rebanadas del CC de ratón sugieren que la 5-HT podría funcionar como transmisor en el CC de la rata.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La 5-HT se libera del CC y activa los receptores expresados en astrocitos para luego ser removida del espacio extracelular por medio de un transporte dependiente de Na^+ , sensible a la acción bloqueadora de algunos antidepresivos como la fluoxetina.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar el proceso de transmisión serotoninérgica en el CC de la rata

Objetivos particulares:

- A) Caracterizar los cultivos gliales del CC de la rata
- 1. Caracterizar inmunocitoquímicamente la presencia de astrocitos en los cultivos en DMEM y NB-G5 con el anticuerpo para la GFAP.
- 2. Analizar las corrientes de K^+ en astrocitos cultivados en DMEM y NB-G5.

B) Respuestas a 5-HT en astrocitos en cultivo del CC de la rata

1. Analizar las respuestas a 5-HT en los astrocitos en cultivo del CC de la rata.
2. Determinar el potencial de inversión de las corrientes iónicas producidas por 5-HT en los astrocitos en cultivo, para establecer que tipo de canal(es) está(n) implicado(s) en sus respuestas.
3. Identificar el o los tipos de receptores presentes en los astrocitos en cultivo con el empleo de agonistas y antagonistas de los receptores a 5-HT.

C) Recaptura de 5-HT en rebanadas del CC de la rata

1. Investigar la existencia de un posible sistema de recaptura para la 5-HT.
2. Determinar la dependencia de Na^+ del sistema de recaptura para la 5-HT.
3. Determinar la constante de afinidad (K_m) del sistema de recaptura para 5-HT y su velocidad máxima (V_{max}).
4. Obtener la constante de inhibición (K_i e IC_{50}) de al menos un inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT y observar el efecto de algunos antidepresivos en la recaptura de 5-HT en el CC.
5. Determinar el efecto del pH en la recaptura de 5-HT.
6. Investigar la recaptura de 5-HT durante el desarrollo.

D) Liberación de 5-HT en rebanadas del CC de la rata

1. Evaluar si la 5-HT es liberada del CC
2. Si existe tal liberación de 5-HT, evaluar si depende de Ca^{2+} .

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos de células gliales

Se utilizaron cinco ratas recién nacidas de la cepa Wistar en cada cultivo, las cuales fueron decapitadas y el cerebro removido en una solución extracelular (ver soluciones y microelectrodos) en hielo. Después, se hicieron dos cortes coronales para obtener dos rebanadas cerebrales de cada animal, la rebanada anterior se desechó, mientras que la rebanada posterior (que contenía principalmente el tronco del CC) se observó bajo el microscopio estereoscópico y se le removieron los vasos sanguíneos.

El CC fue identificado visualmente y la rebanada se sumergió en solución extracelular fría para facilitar su aislamiento. Posteriormente, el CC fue cortado en pequeños trozos y colocado en un tubo Eppendorf con medio de cultivo "Eagle modificado de Dulbecco" (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina. El tejido fue disociado en células individuales al pasarlo varias veces a través del orificio de una pipeta Pasteur, previamente púrida al fuego (para estrechar el diámetro del orificio) y cubierta con silicon (Sigmacote, Sigma) hasta alcanzar la densidad celular apropiada. El sobrenadante se resuspendió en un tubo Eppendorf con DMEM. La suspensión celular fue entonces sembrada en cubreobjetos barnizados con 0.01% de poli-L-ornitina (Sigma) y diluida en 2 ml de DMEM, dentro de una caja de Petri de 35 mm para cultivo. Las células sembradas fueron incubadas en una cámara de cultivo, a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO₂ (Figura 4).

Después del primer día los cultivos fueron selectivamente diferenciados a astrocitos cambiando el medio de cultivo DMEM por medio neurobasal (NB, libre de suero) suplementado con G5 (NB-G5), 0.5 mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. El suplemento G5 (100x) esta compuesto por transferrina humana 500 µg/ml, selenio 0.52 µg/ml, insulina 5000 µg/ml, biotina 100 µg/ml, hidrocortisona 0.36 µg/ml, factor de crecimiento fibroblástico 0.50 µg/ml,

factor de crecimiento epidermal 0.10 µg/ml. Este último medio de cultivo se cambió cada tercer día. Todos los reactivos para cultivo fueron de Gibco BR. Para confirmar que las células de los cultivos del CC de la rata correspondían a células de tipo glial se utilizó el anticuerpo que reconoce a la GFAP, marcador específico de las células gliales.

Inmunofluorescencia de GFAP en las células en cultivo

Las células crecidas por siete días en cubreobjetos fueron lavadas dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos de sodio (PBS; 0.1M, pH 7.4). Enseguida, las células fueron fijadas con metanol absoluto (100%) por ocho minutos, a -20°C, lavadas tres veces con PBS e incubadas con 10% de suero de caballo en PBS-Triton X-100 (0.1%) por una hora. Los cubreobjetos fueron lavados dos veces con PBS e incubados, por 2 horas a temperatura ambiente, con un anticuerpo policlonal de conejo contra la GFAP (Diasorin), a una dilución de 1:10. Después, las células fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, conjugado con fluoresceína isotiocianato (FITC), obtenido del chivo y dirigido contra las inmunoglobulinas de conejo (Sigma) a una dilución de 1:160. Finalmente, los cubreobjetos fueron lavados tres veces con PBS y montados con glicerol. Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon, E-600) y las imágenes digitalizadas con una cámara monocromática (Camara Cool SNAP, Photometrics). Las imágenes fueron editadas con los programas Iplab 3.5 (Scanalytics, Inc) y Photoshop 6.0 (Adobe).

Registro electrofisiológico

Un fragmento del cubreobjetos con células en cultivo fue colocado en una cámara de registro la cual fue continuamente perfundida, a una velocidad de flujo de 1-2 ml/min con solución extracelular, permitiendo la aplicación rápida de distintas sustancias. Las células aisladas (sin contacto con otras) fueron seleccionadas para el registro después del tercero y hasta el octavo día de cultivo. Las corrientes iónicas fueron obtenidas a temperatura ambiente (20-23°C) con la técnica de fijación de

voltaje en la configuración de la célula completa (Hamill *et al.*, 1981), utilizando un amplificador Axopatch-200B (Axon Instruments), filtrando a 5 KHz y adquiriendo a 3.3 KHz, a través de una interfase Digidata 1200 (Axon Instruments) conectada a una computadora (Lanix). La adquisición, almacenamiento y análisis fueron hechos utilizando el programa pClamp 8 (Axon Instruments). Las células fueron fijadas a un potencial de mantenimiento de -60 mV. Las corrientes capacitivas y de fuga fueron restadas con un protocolo P/4 (Almers *et al.*, 1983). Las amplitudes de las corrientes y los valores estadísticos (promedio \pm error estándar, con n siendo el número de células registradas) fueron evaluados con un programa gráfico-estadístico y con ajuste de curvas (Origin 4.0, Microcal). La figura 5 ilustra el equipo utilizado y una célula en registro.

Soluciones y microelectrodos.

La solución extracelular de perfusión contenía (en mM) 150 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES y 10 glucosa. El pH fue ajustado con NaOH a 7.2. En algunos experimentos 5, 10 ó 20 mM de NaCl fue sustituido por una cantidad equimolar de TEA o 4-AP para bloquear las corrientes de K⁺. Las micropipetas de registro fueron hechas con capilares de borosilicato (Sutter Instruments) con ayuda de un estirador de pipetas (puller, P-97 Flaming/Brown, Sutter Instruments). La solución con la que se llenaba la micropipeta (solución intracelular) contenía (en mM): 130 KCl, 0.5 CaCl₂, 5 EGTA, 1 MgCl₂, 10 HEPES; 3 ATP y 0.4 GTP. En algunos experimentos se redujo la concentración de Cl⁻ intracelular a 40 mM sustituyéndolo con gluconato de K⁺. Esta solución contenía (en mM): 35 KCl, 95 gluconato de K⁺, 0.5 CaCl₂, 5 EGTA, 2 MgCl₂, 10 HEPES; 3 ATP y 0.4 GTP. En ambas soluciones se utilizó 20 mM KOH para disolver el EGTA y ajustar el pH a 7.4. La actividad de Ca²⁺ calculada fue de ~ 11 nM, con las concentraciones de EGTA y Ca²⁺ utilizadas (Berger *et al.*, 1991). El pH se ajustó con KOH a 7.2. La resistencia de las pipetas fue de 3-5 M Ω .



Imagen que ilustra el registro de microáreas de membrana utilizando un microelectrodo.



Equipo para registro electrofisiológico, consta de: osciloscopio, amplificador, microscopio invertido, jaula de Faraday, computadora, micromanipulador y sistema de perfusión.

Figura 5. Equipo empleado para realizar la técnica de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa. La imagen superior ilustra una célula utilizada para el registro, la pipeta se observa del lado izquierdo. La imagen inferior ilustra el equipo utilizado para el registro electrofisiológico.

Protocolos para obtener las relaciones corriente-voltaje (I-V)

Las curvas I-V se construyeron, con las amplitudes obtenidas por la aplicación de pulsos de voltaje, con una duración de 200 ms, que iban de -120 a 40 mV con incrementos de 20 mV o por la aplicación de rampas de voltaje que iban de -100 a 50 mV, en 1 s. Estos protocolos se utilizaron en las figuras 12, 21-25.

Para explorar la presencia de la corriente K_A , se utilizaron pulsos de voltaje despolarizantes con una duración de 400 ms, de -60 a 80 mV, después de aplicar un prepulso de 400 ms a -110 mV (Figura 14 y 16).

Para la relación concentración-respuesta en presencia de 4-AP se aplicó el mismo protocolo pero solo con un pulso a 80 mV (Figura 15).

Para determinar el potencial de inversión de las corrientes, se utilizó un protocolo de fijación de voltaje en dos pasos, que consistía en fijar el voltaje de la célula en 10 mV por 40 ms y luego aplicar varios pulsos de voltaje, de 200 ms, que iban de -180 a 80 mV con incrementos de 20 mV (Figura 13).

Curvas de activación de la corriente de K^+

Para obtener las curvas de activación, la corriente pico (I) fue medida en cada potencial y la conductancia (G) correspondiente fue calculada con la siguiente ecuación: $G = I / (V - E_K)$, en donde V es el potencial de membrana y E_K es el potencial de equilibrio (Nernst) del K^+ , (-83 mV). Las amplitudes tanto de las corrientes como de las conductancias calculadas fueron normalizadas con respecto al valor máximo y graficadas en función del potencial de membrana durante el pulso de prueba. En el caso de la conductancia normalizada, las curvas de activación fueron obtenidas y ajustadas con la ecuación de Boltzmann: $G_i / G_{(max)} = 1 / \{ 1 + \exp [(V_{1/2} - V)] \}$, en donde $G_{i(max)}$ es la máxima conductancia iónica, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual G_i es la mitad de $G_{i(max)}$, y k es el factor de la pendiente que determina la relación corriente / voltaje de G_i . Este análisis se efectuó con los datos de la figura 16.

Respuestas eléctricas mediadas por 5-HT

Con el fin de determinar qué tipo de ión es el responsable de la corriente inducida por 5-HT, esta monoamina se aplicó a distintos potenciales de mantenimiento (desde -60 a 60 mV) y se estudió el potencial de inversión. El potencial de inversión es el potencial al cual la corriente cambia de signo, es decir, de entrante a saliente. Para determinarlo se realizaron curvas I-V. Posteriormente se utilizaron protocolos de pulsos de voltaje y rampas (descritos en la sección anterior) antes, durante la aplicación de 5-HT y después de la aplicación de 5-HT para evaluar el efecto de esta monoamina sobre la conductancia de K⁺. Asimismo se probaron distintas concentraciones de 5-HT (1 µM – 1 mM) para obtener la concentración de 5-HT que activa el 50% de la corriente máxima (EC₅₀). Las amplitudes de las corrientes obtenidas con las distintas concentraciones de 5-HT fueron normalizadas con la corriente máxima. Los valores fueron ajustados con la ecuación de Hill.

Acumulación de [³H]-5-HT en rebanadas del CC de la rata

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague Dowley (200-300 g), las cuales fueron anestesiadas con pentobarbital (40 mg/kg ip) y decapitadas. El pentobarbital no modifica la acumulación de 5-HT (Martin et al., 1998). El cerebro fue removido y aislado en una solución Ringer Krebs (RK) en hielo, con la siguiente composición (en mM): 118 NaCl; 4.7 KCl; 1.17 KH₂PO₄; 2.5 CaCl₂; 1.17 MgSO₄; 5.6 glucosa; 25 NaHCO₃ (pH 7.4). El CC fue disecado e incubado por 10 min a 37°C, en 1 ml de solución RK con 10 µM de pargilina, 60 µM de ácido ascórbico y en presencia o ausencia de alguno de los inhibidores de la recaptura de 5-HT (10 µM). Las rebanadas del CC fueron de 5-8 mg de tejido húmedo. La [³H]-5-HT a la concentración apropiada se añadió (actividad específica: 6.10 Ci/mmol) y se incubó por 10 min.

En el caso del pH, curva dosis-respuesta de fluoxetina y el uso de los inhibidores específicos de la recaptura de 5-HT; la concentración final de 5-HT fue de 500 nM, utilizando una mezcla de [³H]-5-

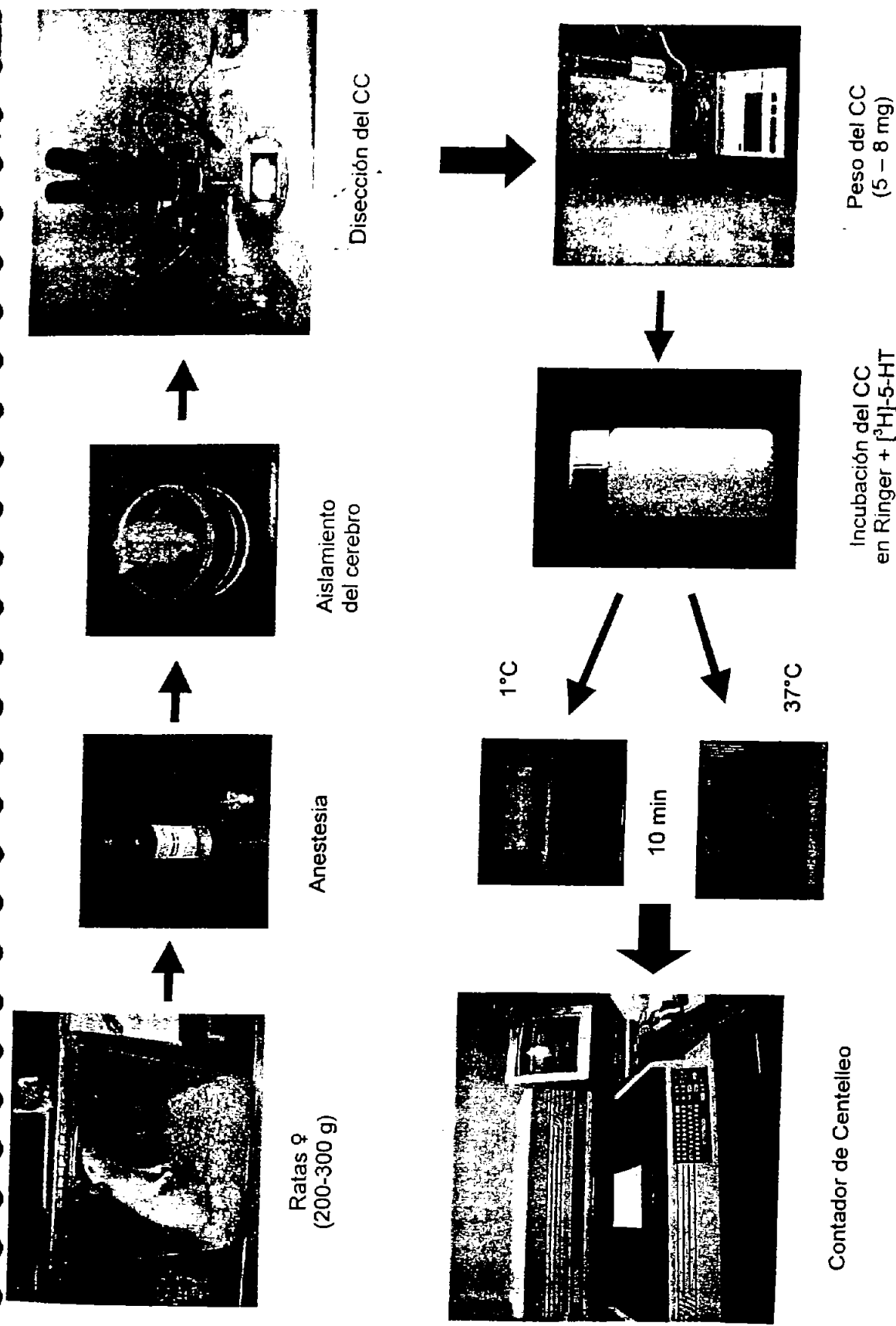


Figura 6. Diagrama de flujo para los experimentos de acumulación de [³H]-5-HT en el CC de la rata.

HT y 5-HT fría (o sin marcar) en una proporción aproximada de 1:12.5. Para los experimentos de pH ácido (pH 5 y 6) se sustituyó el NaHCO_3 por acetato de Na^+ ; para los experimentos de pH básico (pH 8 y 9) el NaHCO_3 se sustituyó por borato de sodio (Gadea *et al.*, 1999). Al final del experimento el tejido se lavó en 5 ml de solución RK en hielo para luego ser pesado, y finalmente disuelto en dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% para digerir el tejido a 40°C por 30 min. Después, se añadieron 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad incorporada con un contador de centelleo líquido. La acumulación no específica fue definida como aquella presente a 1°C (Figura 6). La acumulación específica (dependiente de temperatura) se determinó restando la acumulación a 1°C (acumulación no específica) de la acumulación total (a 37°C). La medición de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), en el que se usó albúmina como estándar.

Liberación de [^3H]-5-HT en rebanadas del CC de la rata

El tejido aislado fue procesado como en los experimentos de acumulación de [^3H]-5-HT, solo que al finalizar la acumulación por 10 min y después de ser pesado, el CC fue lavado por 12 min. Posteriormente se inició con los experimentos de liberación, los cuales consistieron en incubar el tejido durante 2 min en cinco viales distintos, los dos primeros contenían RK normal, mientras que el tercer vial contenía RK modificado con 70 mM de K^+ (el NaCl se redujo en la misma proporción que se aumentó el KCl), esto con el fin de estimular la liberación de [^3H]-5HT al despolarizar el tejido. Finalmente el tejido fue incubado en otros dos viales por 2 min con RK normal.

Al finalizar, el tejido fue solubilizado en un vial con 0.5 ml con 1% SDS, a 40°C . Al tejido solubilizado y a los viales de liberación se les agregó 5 ml de líquido de centelleo para cuantificar la [^3H]-5-HT liberada y la que quedó en el tejido (Figura 7). En los experimentos en los cuales se evaluó la dependencia de Ca^{2+} , el Ca^{2+} fue removido del RK y sustituido por 1 mM CdCl_2 .

Materiales

Los bloqueadores de las corrientes de K^+ fueron 4-AP (RBI), $BaCl_2$ y TEA (Sigma). Los inhibidores de la recaptura de 5-HT usados fueron: fluoxetina, zimelidina, imipramina, clomipramina y 6-nitroquipacina; estos inhibidores fueron comprados a RBI (Natick, MA). La cetanserina, quipacina y α -metil-5-HT fueron comprados a RBI también. La pargilina (inhibidor de la enzima que degrada a la 5-HT: monoaminooxidasa -MAO) y el ácido ascórbico fueron adquiridos en Sigma. La [3H]-5-HT se compró en "Amersham Life Sciences" (Amersham, UK).

Análisis de datos

Las constantes cinéticas de afinidad e inhibición (K_m , V_{max} , K_i , EC_{50} e IC_{50}) se calcularon utilizando métodos de regresión no lineal (ecuaciones Michaelis-Menten, Hill y Boltzmann) con ayuda del programa comercial Origin 4.0. La constante de inhibición (K_i) se determinó utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff (1973): $K_i = IC_{50} / (1 + [C] / K_m)$, donde $[C]$ es la concentración de 5-HT (500 nM) y K_m es la constante de afinidad para la recaptura de 5-HT.

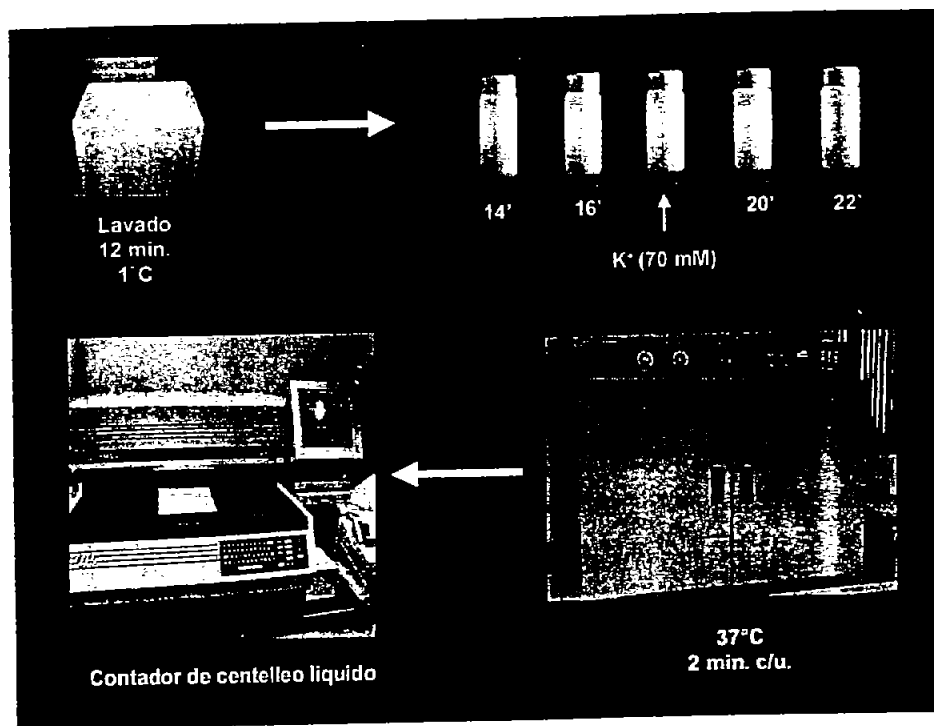


Figura 7. Experimentos de liberación de 5-HT. Después de incubar por 10 min el tejido (como en los experimentos de acumulación), éste se lavó 12 min y se incubó por cinco periodos de 2 min, a 37°C, para posteriormente cuantificar la [³H]-5-HT liberada en los cinco viales en los que se pasó el tejido.

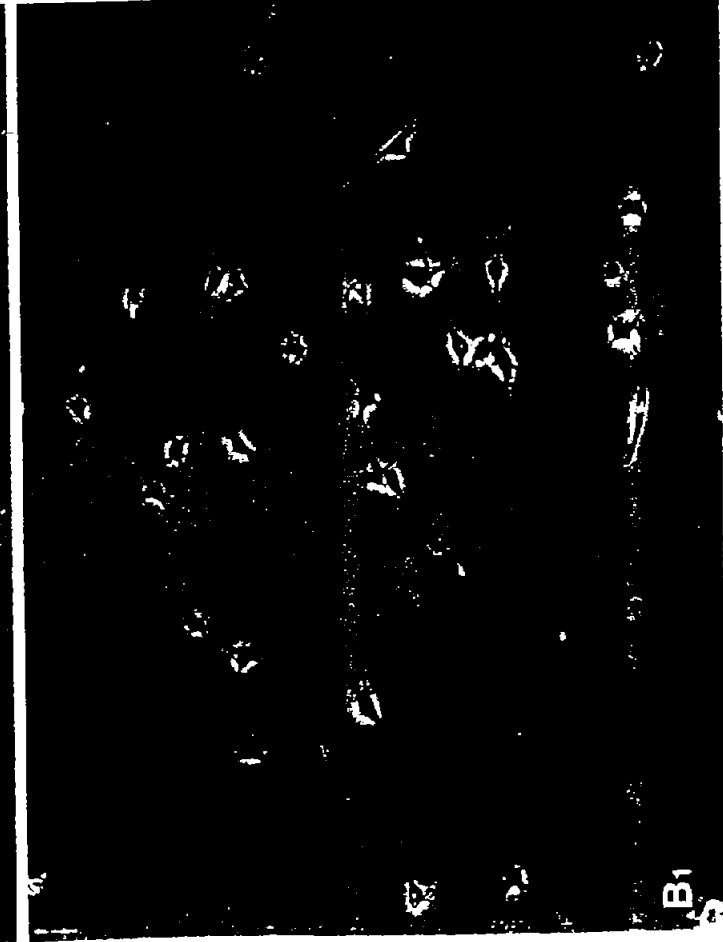
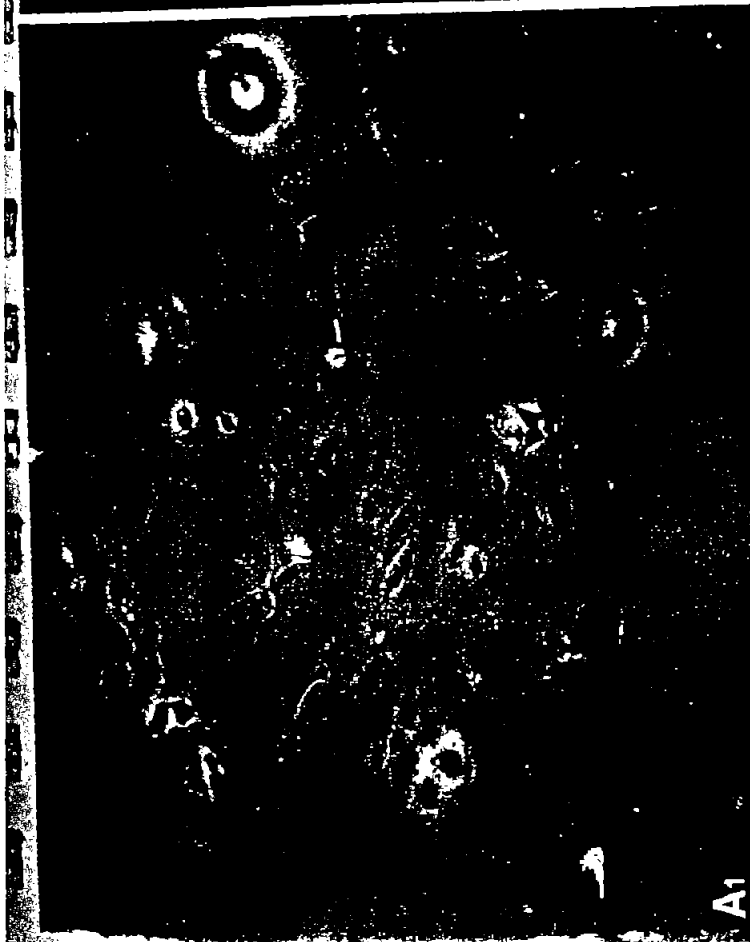
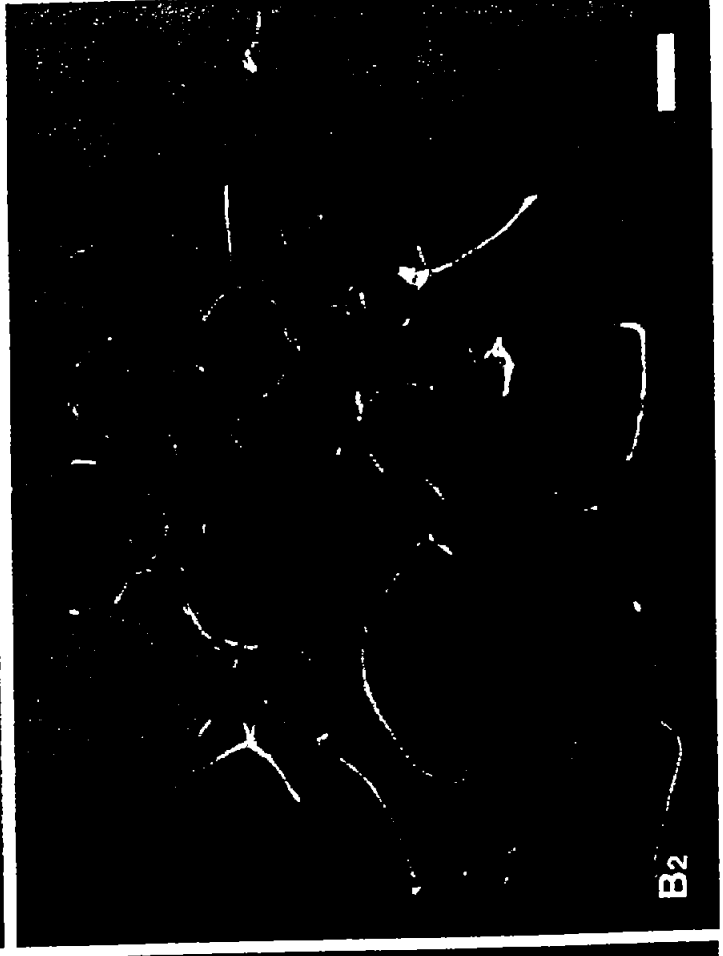
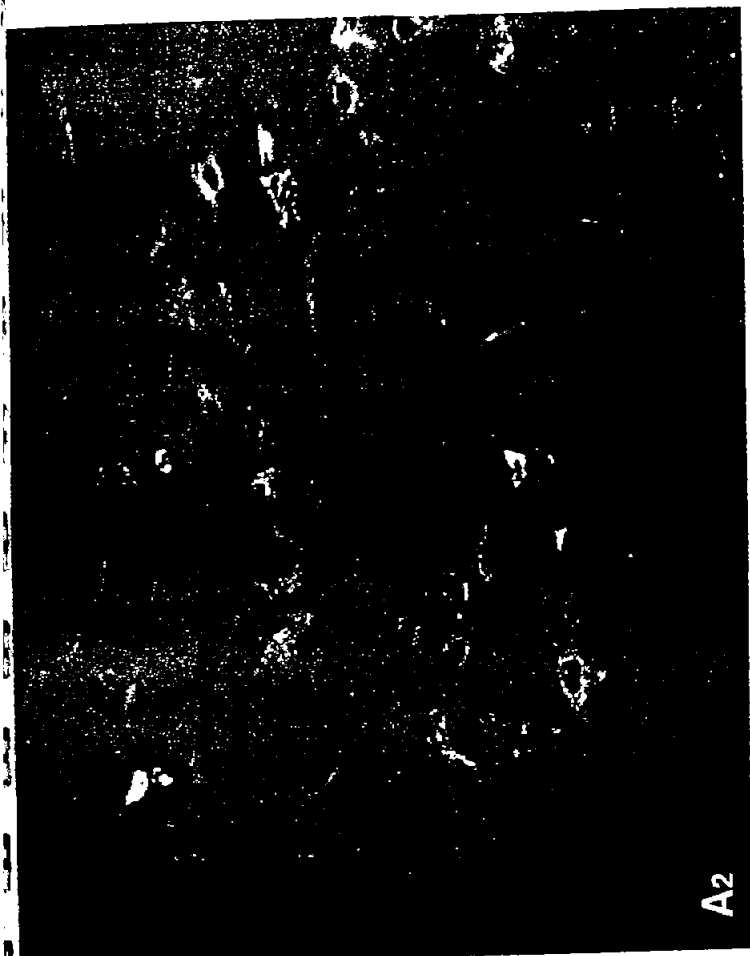
RESULTADOS

1. Características morfológicas de las células gliales in vitro e in vivo del CC de la rata

Inmunofluorecencia contra la GFAP

Varios estudios han mostrado que las células gliales pueden desarrollarse *in vitro* con formas celulares distintivas, dependiendo del tipo de medio de cultivo utilizado (Michler-Stuke *et al.*, 1982, 1984; Safavi-Abbassi *et al.*, 2001). Debido a esto, y teniendo en cuenta que la población celular predominante en etapas tempranas del desarrollo postnatal del CC son los glioblastos, se obtuvieron astrocitos del CC al utilizar el medio de cultivo y suplementos apropiados. De esta manera, los astrocitos se cultivaron por siete días a partir de suspensiones celulares del CC de ratas recién nacidas y se fijaron con metanol. Las imágenes en contraste de fase muestran células con proyecciones o células de apariencia epiteloide cuando se cultivaron en DMEM o NB-G5 (Figuras 8 A₁,A₂). Posteriormente se efectuaron estudios de inmunofluorescencia que revelaron la presencia de células GFAP positivas y en consecuencia la identidad celular de las células cultivadas tanto en NB-G5 como en DMEM. Más del 95% (227 de 234) de las células cultivadas en DMEM presentaron inmunomarcaje a GFAP, mientras que en NB-G5 fue >99% (79 de 79), lo que indicó que las células utilizadas para el registro eran astrocitos (Figura 8 B₁,B₂). En ambos casos el conteo celular se efectuó en 3 cultivos distintos, utilizando la imagen digital del campo visual observado con el aumento de 20x.

Figura 8. Imágenes representativas de las células del CC crecidas en NB-G5 o DMEM por 7 días. Las células se visualizaron en contraste de fases y con inmunofluorescencia contra la GFAP y mostraron células con proyecciones (NB-G5; figuras A₁,B₁) y de apariencia epitelial (DMEM; figuras A₂,B₂). La barra de escala es de 40 μ m.



a) Morfología de astrocitos en DMEM (medio con suero)

La morfología de los astrocitos del CC en estas condiciones fue diversa (Figura 9). En el cultivo fue posible identificar células poligonales y de tipo plano epiteloide, células con forma de estrella así como células alargadas y fusiformes. La figura 9A muestra la morfología de los astrocitos que normalmente se utilizaban para registro. Una célula alargada en forma de cáliz que presenta dos proyecciones, el soma midió $55.2 \pm 3.9 \mu\text{m}$ de largo por $24.64 \pm 2.08 \mu\text{m}$ de ancho y las proyecciones tienen una longitud de $35.3 \pm 5.56 \mu\text{m}$ y $63.2 \pm 8.31 \mu\text{m}$ ($n=5$). En el recuadro se observan células unipolares con un soma que midió $14.17 \pm 2.35 \mu\text{m}$ de largo por $8.12 \pm 0.96 \mu\text{m}$ de ancho ($n=8$), la proyección midió $10.17 \pm 1.48 \mu\text{m}$ ($n=8$). Las figuras 9B y 9D muestran dos células con al menos 3 proyecciones que en algunos casos presentaron bifurcaciones. Los somas midieron $26.52 \pm 4.12 \mu\text{m}$ de largo por $21.7 \pm 2.70 \mu\text{m}$ de ancho ($n=5$). Las proyecciones se agruparon con base a su longitud y se obtuvieron 4 mediciones: la mayor proyección midió $32.32 \pm 4.37 \mu\text{m}$ ($n=5$), la segunda $28.08 \pm 3.31 \mu\text{m}$ ($n=5$), la tercera $23.1 \pm 3.51 \mu\text{m}$ ($n=5$), la cuarta $15.7 \pm 0.95 \mu\text{m}$ ($n=3$). La figura 9C muestra una morfología celular plana y epiteloide en donde el núcleo es prominente y midió $20.16 \pm 1.26 \mu\text{m}$ de largo por $13.53 \pm 1.82 \mu\text{m}$ de ancho ($n=6$), mientras que el soma midió $97.99 \pm 10.69 \mu\text{m}$ de largo por $63.16 \pm 10.87 \mu\text{m}$ de ancho ($n=6$). En este tipo celular se puede apreciar la red de microtúbulos que proporcionan a la célula su morfología característica. A diferencia del resto de los tipos celulares éste fue el único que no pudo ser registrado.

b) Morfología de astrocitos en NB-G5 (medio sin suero)

En estas condiciones de cultivo se identificaron células con morfología de estrella, cáliz, triangular y bipolar. La figura 10A muestra una célula en forma de cáliz (similar a la identificada en DMEM) con tres proyecciones. El soma midió $33.42 \pm 3.16 \mu\text{m}$ de largo por $21.14 \pm 4.11 \mu\text{m}$ de ancho ($n=5$), mientras que la primera proyección midió $18.66 \pm 1.89 \mu\text{m}$ ($n=5$), la segunda midió $28.2 \pm 3.30 \mu\text{m}$ y la tercera solo se observó en dos células y midió 30.3 y $53.3 \mu\text{m}$. La figura 10B presenta células con varias proyecciones: la primera proyección midió $91.15 \pm 12.13 \mu\text{m}$ ($n=6$), la segunda midió 57.21

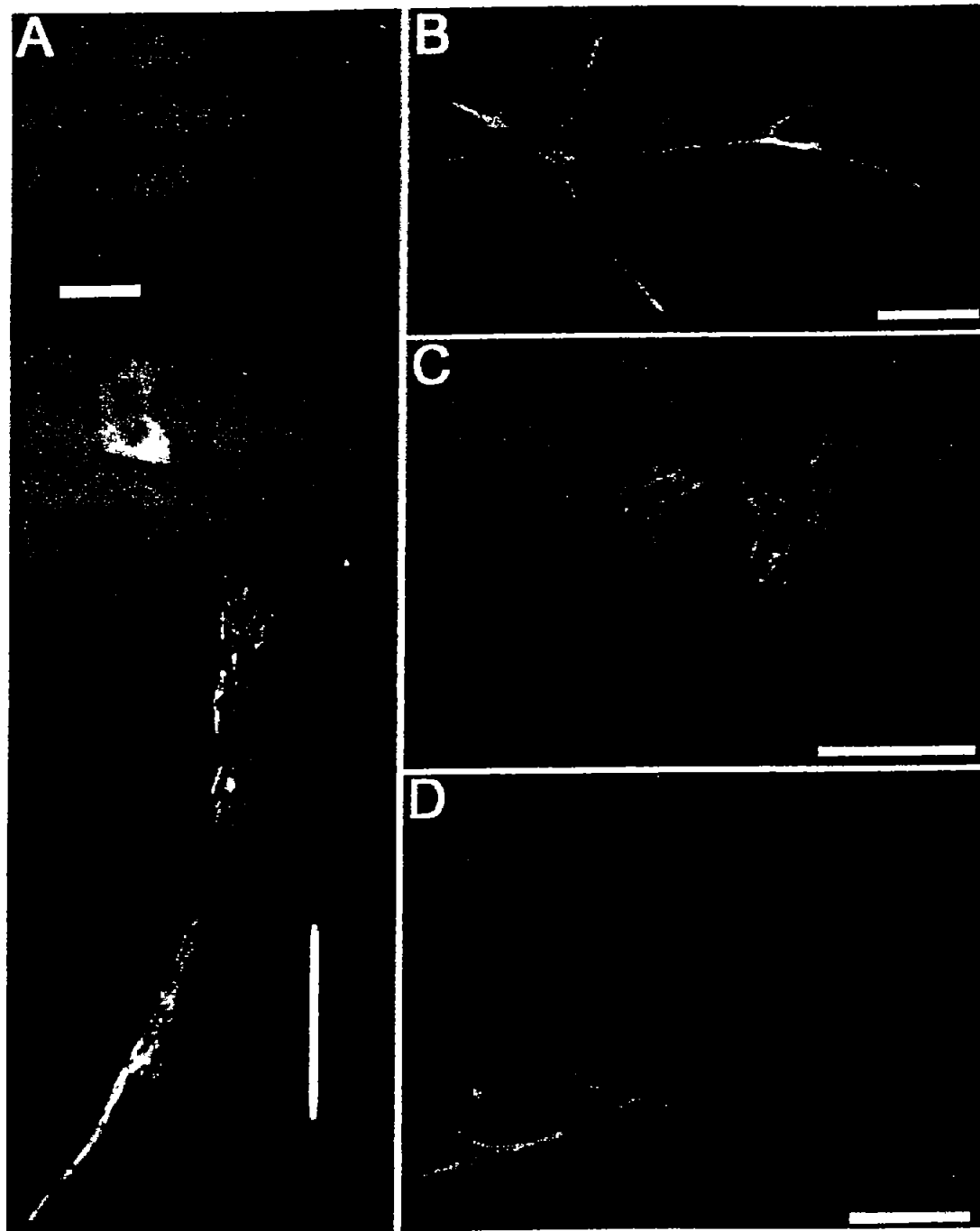


Figura 9. Diversidad de morfologías de los astrocitos GFAP (+) cultivados en DMEM (C3-C7). Las micrografías fueron tomadas utilizando el microscopio de fluorescencia con el aumento de 40 x . La barra de calibración utilizada equivale a 20 μ m.

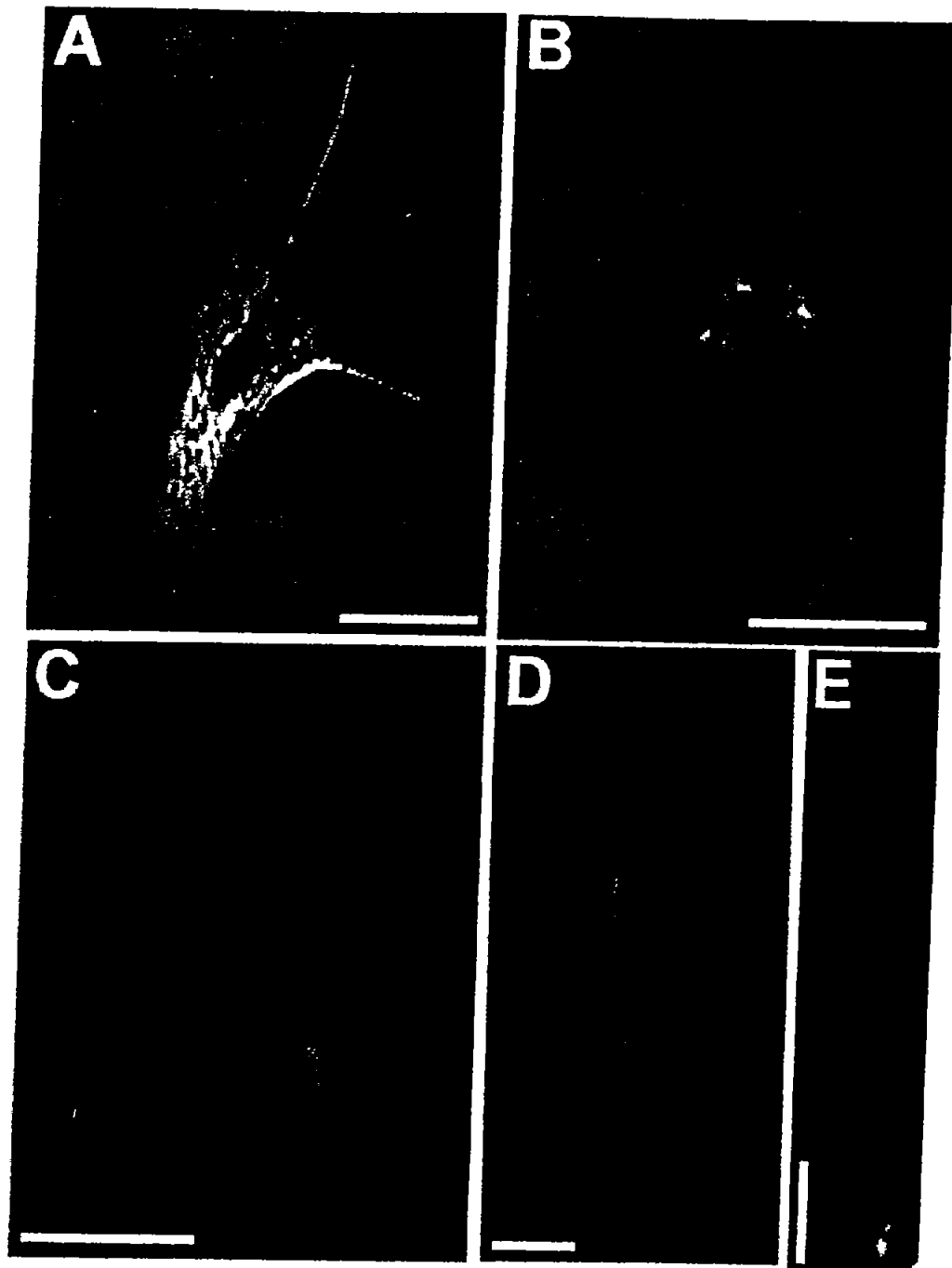


Figura 10. Diversidad de morfologías de los astrocitos GFAP (+) cultivados en NB-G5 (C3-C7). Las micrografías fueron tomadas utilizando el microscopio de fluorescencia con el aumento de 40 x . La barra de calibración utilizada equivale a 20 μ m.

$\pm 9.6 \mu\text{m}$ (n=6), la tercera midió $46.24 \pm 5.68 \mu\text{m}$ (n=6), la cuarta midió $39.66 \pm 5.12 \mu\text{m}$ (n=6), la quinta midió $32.05 \pm 4.74 \mu\text{m}$ (n=6). El soma de estas células midió $28 \pm 5.21 \mu\text{m}$ de largo por $20.46 \pm 2.95 \mu\text{m}$ (n=5). La figura 10C presenta una célula con un soma triangular que midió 23.68 ± 3.89 de altura por $17.62 \pm 2.69 \mu\text{m}$ en la base (n=5). La primera proyección midió $52.06 \pm 8.72 \mu\text{m}$ (n=5), la segunda $42.38 \pm 9.23 \mu\text{m}$ (n=5) y la tercera $24.15 \pm 3.12 \mu\text{m}$ (n=5). La figura 10D muestra una célula con una proyección de notable longitud que midió $172.48 \pm 38.45 \mu\text{m}$ (n=6), mientras que las otras proyecciones (al menos dos) se ubicaron en la parte opuesta del soma y midieron 44.18 ± 9.28 y $27.25 \pm 5.33 \mu\text{m}$ (n=6). El soma midió $27.11 \pm 4.74 \mu\text{m}$ de largo por $19.93 \pm 3.38 \mu\text{m}$ (n=6). La figura 10E muestra una célula con morfología bipolar, el soma es de tipo elipsoide y midió $22.72 \pm 2.41 \mu\text{m}$ de largo por $11.54 \pm 0.82 \mu\text{m}$ (n=5), las proyecciones midieron $113.81 \pm 18.97 \mu\text{m}$ y $77.35 \pm 10.43 \mu\text{m}$ (n=6),

II. Corrientes de K⁺ activadas por voltaje en astrocitos del CC de la rata

Corrientes iónicas de astrocitos cultivados en NB-G5 y DMEM

Con los astrocitos disponibles para el registro, se exploró si la expresión de corrientes activadas por voltaje se modificaba por la composición del medio de cultivo (DMEM y NB-G5) en células con morfología similar. En ambas condiciones, todas las células expresan corrientes con rectificación saliente (n = 30 para DMEM y n = 42 para NB-G5). Sin embargo, nosotros clasificamos estas células en dos grupos: uno sin decaimiento de la corriente saliente (87% para DMEM y 83% para NB-G5; figuras 11A₁ y 11B₁), y otro en donde la corriente presentó un ligero decaimiento (13% para DMEM y 17% para NB-G5; figuras 11A₂ y 11B₂).

La amplitud de la corriente fue graficada en función del potencial de membrana para obtener las relaciones corriente-voltaje (I-V), en las cuales se muestra que a potenciales más positivos que -40 mV estas relaciones son lineales. Por otra parte, las curvas I-V que se obtuvieron con el protocolo de

rampas de voltaje se comportaron de manera similar a aquellas obtenidas con pulsos de voltaje (Figura 11).

La amplitud promedio de la corriente a 40 mV fue de 1.21 ± 0.1 nA y 1.51 ± 0.16 nA para las células cultivadas en medio DMEM y NB-G5 respectivamente. En algunas células se detectó una corriente entrante transitoria que se activaba a potenciales mayores a -40 mV (15% para DMEM y 29% para NB-G5) con amplitud promedio, a los 3-4 ms, de -131 ± 31 pA y -175 ± 42 pA respectivamente, parámetros similares a aquellos descritos para corrientes de Na^+ activadas por voltaje en cultivos de oligodendrocitos de la médula espinal de rata (Sontheimer *et al.*, 1989), estas corrientes no las caracterizamos.

Ocasionalmente, se presentaron corrientes entrantes activadas a potenciales hiperpolarizantes (cultivos de 3-8 días), pero fueron más frecuentes después de dos semanas de cultivo (dato no mostrado). Debido a que la exposición de los astrocitos a DMEM o NB-G5 producía patrones de corriente similares, nuestro estudio se enfocó sobre los astrocitos cultivados en NB-G5 dado que la composición del medio está químicamente definida al ser libre de suero.

Potencial de inversión de la corriente iónica

Para determinar la naturaleza iónica de la corriente activada por voltaje en los astrocitos del CC de la rata, el potencial de inversión se determinó midiendo la amplitud de las corrientes al corte de pulso (la cola de corriente o corrientes de desactivación) (Hille, 1984; ver métodos) que consiste en despolarizar la membrana con un prepulso de 0 mV y repolarizarla gradualmente como se muestra en los trazos, en donde se observa corrientes de tipo saliente a potenciales despolarizantes, mientras que a potenciales hiperpolarizantes se encontraron corrientes entrantes que presentaron rectificación a valores más negativos a -90 mV, lo que sugiere la presencia de una corriente K_{IR} (Figura 12, inserto).

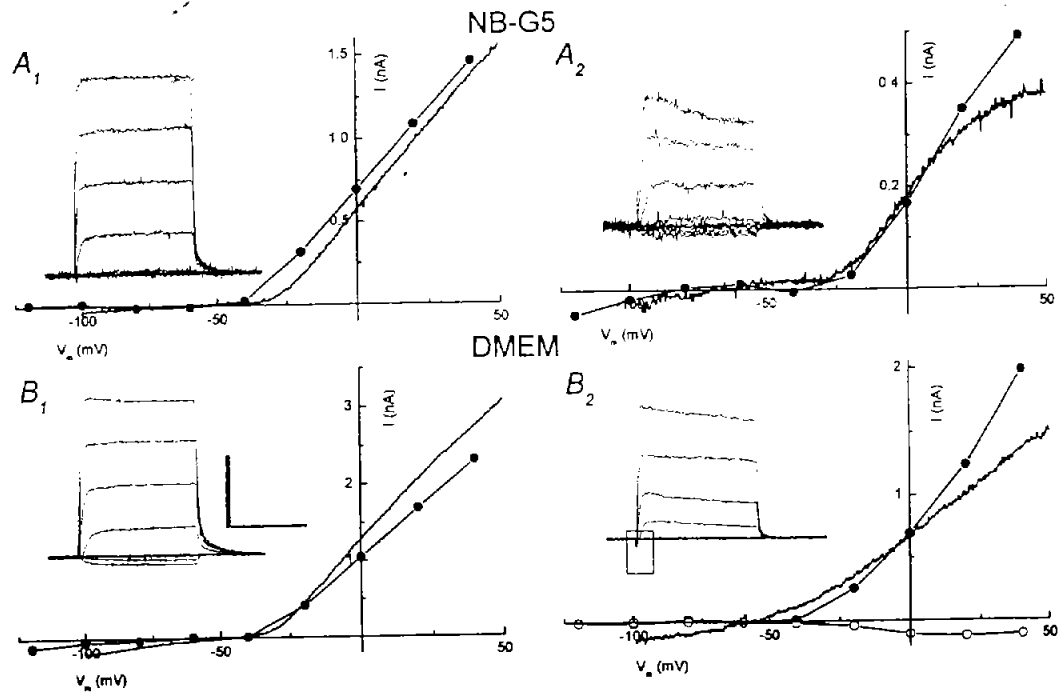


Figura 11. Corrientes iónicas activadas por voltaje en astrocitos. Se distinguieron dos poblaciones celulares en NB-G5 (A_1 , A_2) y DMEM (B_1 , B_2): a) células que no presentan inactivación y b) células que presentan una ligera inactivación. En todas las relaciones I-V (\bullet) se observa una rectificación saliente. En algunas células se detectaron corrientes entrantes a potenciales hiperpolarizantes (B_1) y corrientes entrantes transitorias a potenciales despolarizantes (B_2). La barra horizontal corresponde a 200 ms y la barra vertical a 0.5, (A_1), 0.25 (A_2) y 1 nA (B_1 , B_2).

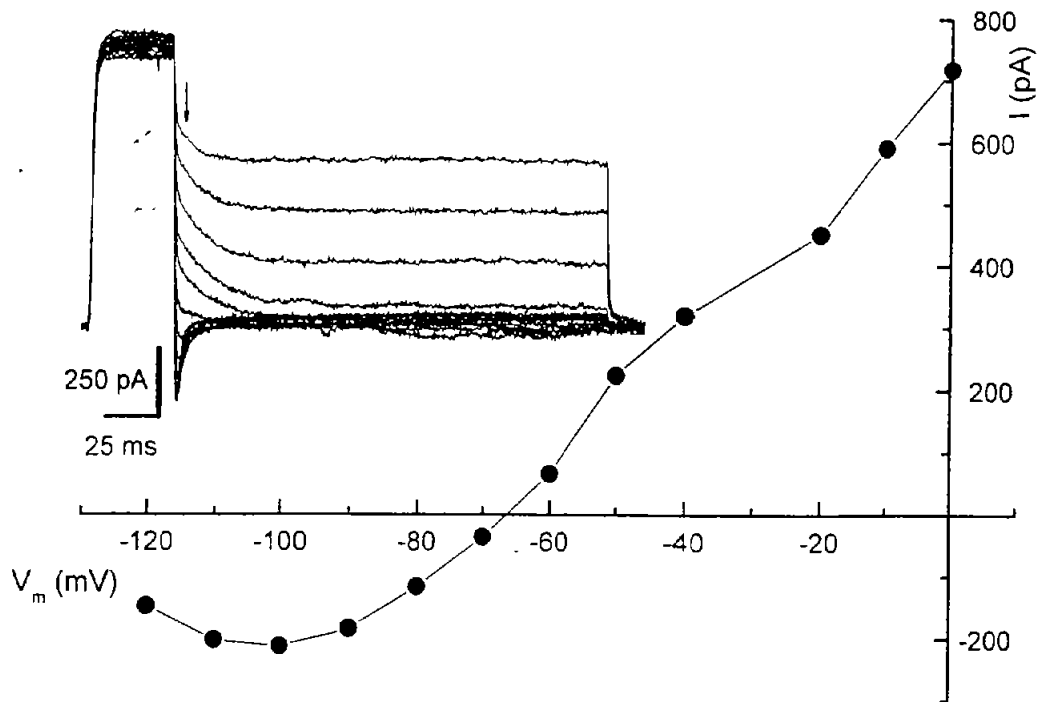


Figura 12. Potencial de inversión de la corriente iónica activada por voltaje. Se utilizó un protocolo de cola de corriente. Inserto: trazos obtenidos en una célula representativa. La amplitud de las corrientes corresponde a 2 ms después del pulso de repolarización y está señalado con la flecha, estos valores se graficaron para construir una relación I-V (\bullet). El potencial de inversión (E_{inv}) fue de -66 ± 0.57 mV ($n=3$).

Estudio farmacológico de la corriente de K⁺

La principal corriente en astrocitos es de K⁺. A pulsos de voltaje despolarizantes, la corriente dominante en varias preparaciones es la K_{DR} (Sontheimer, 1994; Bordey y Sontheimer, 2000; Verkhratsky y Steinhäuser, 2000). Sin embargo, en una pequeña fracción de astrocitos del CC de la rata, la corriente saliente presentó un ligero decaimiento, lo que podría deberse, además de la contribución de la corriente K_{DR}, a la corriente K_A. Debido a que la corriente K_A sólo puede ser activada por despolarización, después de remover la inactivación aplicando un pre-pulso hiperpolarizante (Connor y Stevens, 1971), se exploró la presencia de la corriente K_A en astrocitos (ver métodos).

La fracción de astrocitos que presentó corrientes salientes con decaimiento se incrementó considerablemente, comparada con la que se obtuvo sin el prepulso hiperpolarizante (de 15 a 81%; n = 48), lo que sugería la presencia de la corriente K_A y en consecuencia su coexistencia con la corriente K_{DR}. La amplitud promedio de esta corriente fue de 4.6 ± 0.8 nA a 80 mV.

Las corrientes K_{DR} y K_A fueron aisladas farmacológicamente usando 20 mM TEA (un bloqueador de la corriente K_{DR}) y 10 mM 4-AP (un bloqueador de la corriente K_A (Bordey y Sontheimer, 1999; Connor y Stevens, 1971; Hille, 1967; Korngreen y Sakmann, 2000; Martina *et al.*, 1998; Nakajima, 1966; Thompson, 1977)). Ambos bloqueadores fueron añadidos, por separado, al baño de perfusión durante un minuto. El TEA bloqueó el componente sostenido que correspondió al 65% de la corriente total a 80 mV, sin afectar el componente transitorio (Figura 13A₁, trazos superiores y medios).

La corriente sensible a TEA se hizo evidente al restar punto a punto la corriente insensible a TEA de la corriente total (Figura 13A₁, trazos inferiores). Las relaciones I-V, tanto de las amplitudes de las corrientes control como para aquellas en presencia de TEA mostraron una linealidad entre -40 y 80 mV (Figura 13A₂). Por otro lado, la aplicación de 4-AP bloqueó la corriente transitoria eficientemente (Figura 13B₁). El aislamiento de la corriente sensible a 4-AP se obtuvo también al restar punto a punto la corriente insensible a 4-AP de la corriente control (Figura 13B₁, trazos inferiores). Las relaciones I-V para las amplitudes de las corrientes control y aquellas en presencia de 4-AP mostraron un comportamiento lineal de -40 a 80 mV (Figura 13 B₂). La inactivación de la corriente se ajustó con

una ecuación exponencial, con constante de tiempo de 39.0 ± 0.6 ms para la corriente transitoria control y de 28.8 ± 0.5 ms para la sensible a 4-AP. Los valores obtenidos están en el intervalo de 15-50 ms, que es lo reportado para corrientes K_A en neuronas (Connor y Stevens, 1971a), confirmando que se trata de una corriente K_A .

Curva dosis-respuesta del bloqueo por 4-AP

Debido que a concentraciones altas de 4-AP (10 mM) la corriente de K^+ se bloqueó casi por completo, se hizo la caracterización farmacológica de este bloqueador para así usar las concentraciones óptimas que nos permitieran una inhibición selectiva de las corrientes de K^+ gliales (Bordey y Sontheimer, 1999), en particular de la K_A . Un pulso de voltaje de 80 mV, de 400 ms, se aplicó después de un prepulso de -110 mV en 400 ms, en ausencia (control) y presencia de distintas concentraciones de 4-AP que fueron de 5×10^{-6} a 1×10^{-2} M (Figura 14, inserto). La amplitud de la corriente bloqueada fue normalizada con la amplitud de la corriente máxima que se obtuvo sin 4-AP, y se graficó en función de la concentración de 4-AP utilizada. La concentración para bloquear el 50% de la amplitud de la corriente (IC_{50}) fue de 118 ± 26 μ M y el número de observaciones hechas para cada concentración de 4-AP empleada se ilustra entre paréntesis (Figura 14).

Sensibilidad a Ba^{2+} de la corriente de K^+

El Ba^{2+} es un catión divalente que es bien conocido como bloqueador de las corrientes K_{DR} y la K_{IR} (Armstrong y Taylor, 1980; Eaton y Browdick; Hagiwara *et al.*, 1978). Estudios previos en células gliales de rebanadas del CC de ratón mostraron que las corrientes salientes activadas con pulsos de voltaje despolarizantes eran bloqueadas por 10 mM Ba^{2+} y que este bloqueo era irreversible (Berger *et al.*, 1991). Con estos antecedentes, se evaluó el efecto del Ba^{2+} sobre la corriente iónica activada por voltaje en 20 astrocitos del CC de la rata, utilizando el protocolo de pulsos para activar una corriente tipo A (ver métodos).

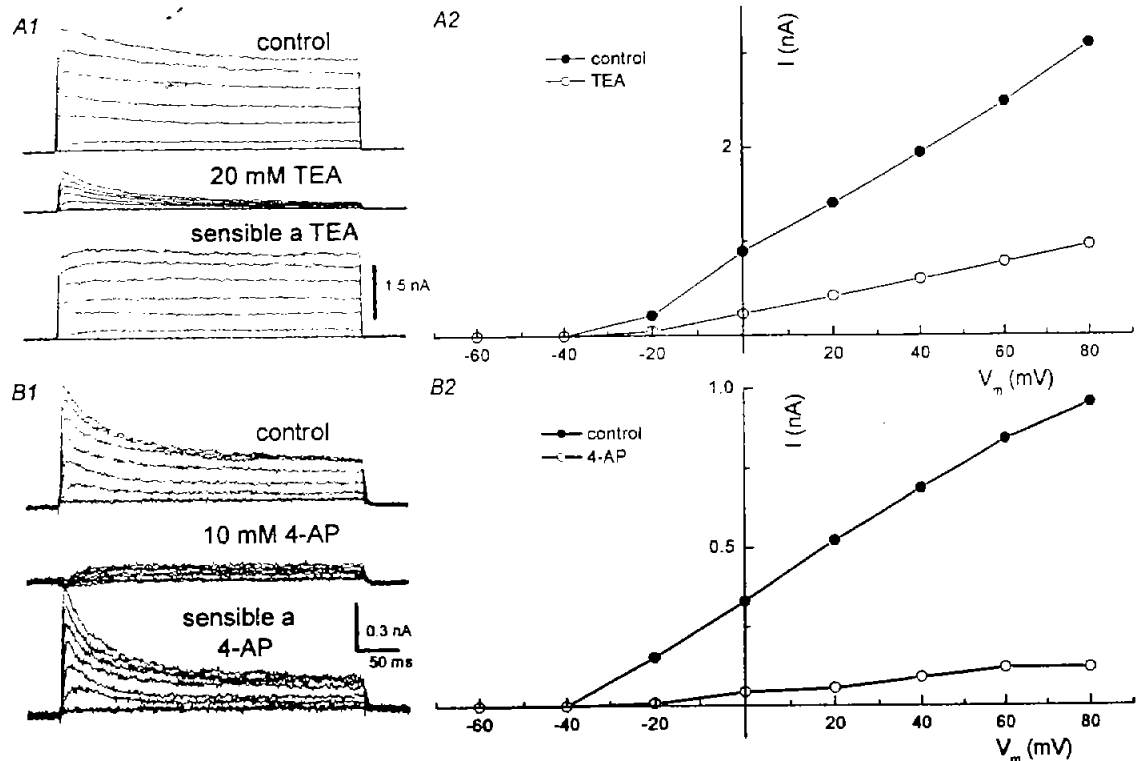


Figura 13. Identificación y bloqueo de las corrientes K_{DR} y K_A por TEA y 4-AP. A_1 y B_1 corrientes control de dos células (trazos superiores), la aplicación extracelular de TEA no afectó el componente transitorio, mientras que la 4-AP lo hizo por completo (trazos de enmedio), A_1 y B_1 . La corriente sensible a TEA y 4-AP (trazos inferiores), A_1 , B_1 se obtuvo después de restar la fracción bloqueada de la corriente control. Las relaciones I-V para el control (●), TEA (○) o 4-AP (□) se construyeron con la amplitud de la corriente para cada voltaje A_2 , B_2 .

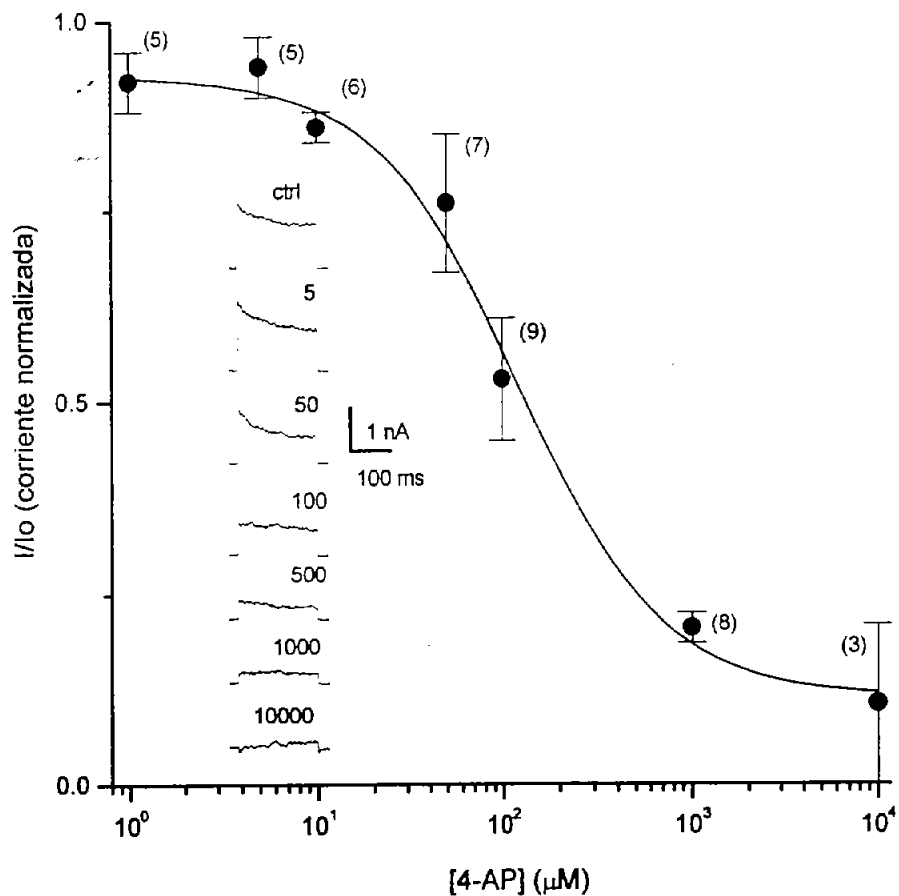


Figura 14. Relación concentración-respuesta del 4-AP. La aplicación de distintas concentraciones de 4-AP (5, 50, 500, 1000, 10000 μM) en una misma célula resultó en el bloqueo gradual de la corriente (inserto) que se obtuvo tras aplicar un pulso de voltaje a 80 mV. Los símbolos (●) corresponden a la amplitud promedio registrada a cada concentración de 4-AP. Los valores fueron normalizados con respecto a la amplitud máxima sin la aplicación de 4-AP. El número de observaciones con cada concentración está indicada entre paréntesis. La línea es un ajuste de la ecuación de Hill: $I/I_{\text{max}} = IC_{50}/IC_{50} + [4\text{-AP}]$. La IC_{50} fue de $118 \pm 26 \mu\text{M}$. Los datos son el promedio \pm el error estándar.

Las corrientes de K^+ control de todos los astrocitos registrados fueron muy parecidas, con un ligero decaimiento y una relación lineal de -40 a 80 mV. Esto último fue confirmado al aplicar un análisis de regresión lineal, el coeficiente de relación (r) fue de 0.99 . Sin embargo, la aplicación de 2 mM Ba^{2+} al baño de perfusión resultó en un bloqueo diferencial de las corrientes de K^+ y dos poblaciones fueron sorpresivamente identificadas (Figura 15 A₁, B₁, insertos).

La primera población (55% de las células) con una amplitud promedio control de 4.95 ± 0.67 nA, a 80 mV, que cuando el Ba^{2+} su amplitud se redujo a 2.37 ± 0.44 nA. Mientras que la segunda población (45% de las células) tuvo una amplitud promedio de 6.60 ± 0.65 nA a 80 mV para el control, y el Ba^{2+} la redujo a 5.04 ± 0.7 nA. A pesar de las pequeñas diferencias en amplitud, la forma de los trazos en presencia de Ba^{2+} identificó una población con un decaimiento marcado que evidenció un componente transitorio (Figura 15A₁, trazos inferiores). Por otra parte, la segunda población no presentó decaimiento y se identificó una corriente sostenida (Figura 15B₁, trazos inferiores).

Al graficar tanto la corriente máxima como en el estado estacionario en función del voltaje, se encontró una reducción del 57% y del 63% en la corriente a 80 mV y un patrón no lineal para la primera población (Figura 15A₁). Mientras que en la segunda población la curva I-V de la corriente insensible a Ba^{2+} es similar al control, aunque con una ligera disminución en la pendiente, que se traduce en un 24% de reducción de la corriente máxima y de 27% en el estado estacionario a 80 mV.

Para continuar con la caracterización de estas dos poblaciones y tratar de aislar el componente con decaimiento, se adicionó 100 μ M 4-AP en presencia de Ba^{2+} y se registró una reducción adicional de la amplitud en ambas poblaciones (Figura 15A₂, B₂; trazos superiores). Con estos experimentos fue posible aislar las corrientes sensibles a Ba^{2+} y a 4-AP, después de una resta punto a punto: a) la corriente sensible a Ba^{2+} es igual a la corriente control menos la corriente insensible a 2 mM Ba^{2+} y b) la corriente sensible a 4-AP es igual a la corriente control menos la corriente insensible a 2 mM Ba^{2+} más 100 μ M 4-AP (Figura 15A₂, B₂; trazos medios e inferiores). En las relaciones I-V se obtuvo un

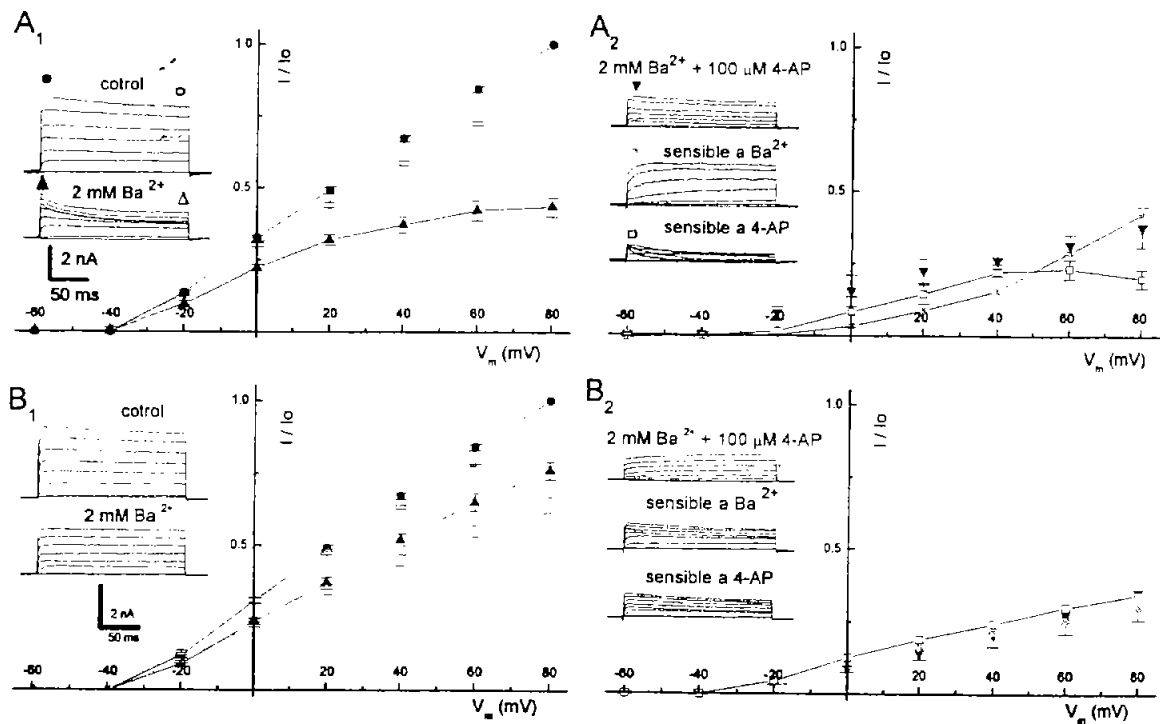


Figura 15. Dos poblaciones celulares con base al bloqueo por Ba^{2+} y 4-AP. Insertos: corrientes sensibles a Ba^{2+} y a 4-AP (A_1, A_2 y B_1, B_2). Las relaciones I-V se construyeron con la amplitud de la corriente normalizada al inicio (●, ▲) y 5 ms antes de finalizar el trazo (○, Δ), para los trazos control y en presencia de Ba^{2+} (A_1, B_1). Las relaciones I-V para Ba^{2+} más 4-AP (▼), corrientes sensibles a Ba^{2+} (■) y a 4-AP (□) se construyeron con la amplitud de la corriente normalizada al inicio.

patrón lineal para las corrientes insensibles a Ba^{2+} más 4-AP, pero al graficar las corrientes sensibles a cada uno de estos bloqueadores se obtuvo una relación no lineal para la primera población (Figura 15A₂), mientras que para la segunda población el patrón lineal se mantuvo similar al control (Figura 15B₂).

Activación de la corriente de K^+ insensible a Ba^{2+}

El análisis con regresión lineal permitió establecer la linealidad de la relación I-V para los controles de las poblaciones con mayor y menor sensibilidad al bloqueo con Ba^{2+} . Asimismo, en la población con menor sensibilidad al bloqueo con Ba^{2+} , la relación I-V en presencia de Ba^{2+} también se mantuvo lineal (segunda población, Figura 16B), no así para la de la población más sensible al bloqueo del Ba^{2+} (primera población, Figura 16A). Por esta razón se utilizó un análisis adicional en el que se comparó la cinética de activación entre ambas poblaciones.

Así pues, para cada población se obtuvieron las curvas de activación de los controles y las corrientes de K^+ en presencia de Ba^{2+} . Para ello, la amplitud de la corriente observada a cada potencial se utilizó para calcular la conductancia correspondiente (ver métodos). Las conductancias fueron normalizadas con la amplitud de la conductancia control de cada población, a 80 mV, y graficadas en función del voltaje. Los datos se ajustaron con la ecuación de Boltzmann y se obtuvo el voltaje al cual se obtiene el 50% de la conductancia ($V_{1/2}$) y el factor de la pendiente (k) determinado por el voltaje al cual se observa la conductancia. Para el control de la población con mayor sensibilidad a Ba^{2+} los valores fueron $V_{1/2} = -13.77 \pm 1.57$ mV y $k = 18.34 \pm 1.53$ mV, y para la población con menor sensibilidad al bloqueo con Ba^{2+} fueron $V_{1/2} = -11.20 \pm 2.11$ mV; $k = 16.94 \pm 1.55$ mV. Estos valores mostraron nuevamente que no existían diferencias significativas entre los controles de las dos poblaciones. Sin embargo, en presencia de Ba^{2+} la $V_{1/2}$ se incrementó mientras que la k disminuyó ($V_{1/2} = -21.78 \pm 3.48$ mV y $k = 7.99 \pm 1.03$) para la población con mayor sensibilidad al bloqueo con Ba^{2+} , mientras que para la población con menor sensibilidad al bloqueo con Ba^{2+} no hubo cambios significativos ($V_{1/2} = -9.44 \pm 2.50$ mV y $k = 16.41 \pm 2.19$) (Figura 16A, B).

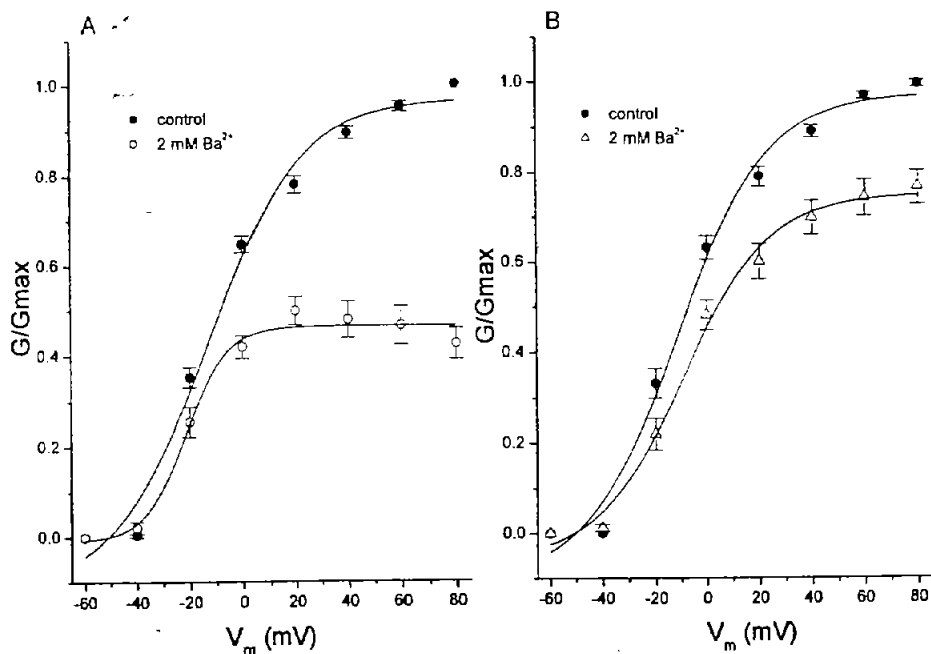


Figura 16. Curvas de activación de la corriente de K para las dos poblaciones identificadas con Ba²⁺. Las curvas de activación de la corriente de K para los controles de ambas poblaciones (●) mostraron una V_{1/2} y una k similares (V_{1/2} = -13.77 ± 1.57 mV y -11.20 ± 2.11 mV; k = 18.34 ± 1.53 y 16.94 ± 1.55). Sin embargo, en presencia de Ba²⁺ se obtuvieron distintos parámetros para la población con mayor sensibilidad a Ba²⁺ (○) (V_{1/2} = -21.78 ± 3.48 mV y k = 7.99 ± 1.03), mientras que para la población con menor sensibilidad a Ba²⁺ (Δ) no se encontraron cambios significativos (V_{1/2} = -9.44 ± 2.50 mV y k = 16.41 ± 2.19).

III. Respuestas a 5-HT en astrocitos del CC de la rata.

La respuesta de los astrocitos a la aplicación extracelular de distintas concentraciones de 5-HT (300, 600 y 1000 μM), fue evaluada utilizando la técnica de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa. El 40% de los astrocitos registrados ($n = 111$) respondieron a 5-HT desde 20 μM hasta 1 mM. El 34% respondió con una corriente entrante de 40 a 320 pA y una pequeña población (6%) presentó corrientes salientes en una amplitud similar. En el caso de las corrientes entrantes dominaron aquellas con amplitudes pequeñas, de 40-50 pA (Figura 17A), aunque ocasionalmente se observaron respuestas de ~ 300 pA (Figura 17B). Asimismo en las células con respuestas salientes las amplitudes variaban de 40-300 pA (Figura 17C). Todas las respuestas se obtuvieron 5-10 s después de la aplicación de 5-HT y no presentaron decaimiento. En cuanto el transmisor era retirado la corriente comenzaba a disminuir y después de 5-10 s regresaba a la basal (Figura 17). En algunos casos las respuestas presentaban oscilaciones (Figura 17B y 17C).

La corriente inducida por 5-HT también se observó en presencia de fluoxetina y al sustituir el Na^+ extracelular por cloruro de colina (datos no mostrados). Estas características sugieren que la 5-HT podría activar receptores de tipo metabotrópico.

Potencial de inversión

a) *Variación del potencial de mantenimiento.* Una primera aproximación a la naturaleza iónica de la corriente inducida por 5-HT se consiguió al aplicar 600 μM 5-HT. Al graficar la amplitud de la corriente en función de los distintos potenciales de mantenimiento (de -60 a 60 mV, con incrementos de 20 mV) se obtuvo una corriente entrante entre -60 y 0 mV, misma que invierte en ~ 3 mV, valor cercano al potencial de equilibrio del Cl^- , calculado con la ecuación de Nernst considerando la composición iónica de las soluciones utilizadas ($E_{\text{Cl}^-} = -5$ mV). Lo anterior sugiere que la corriente activada por 5-HT podría ser de Cl^- (Figura 18A).

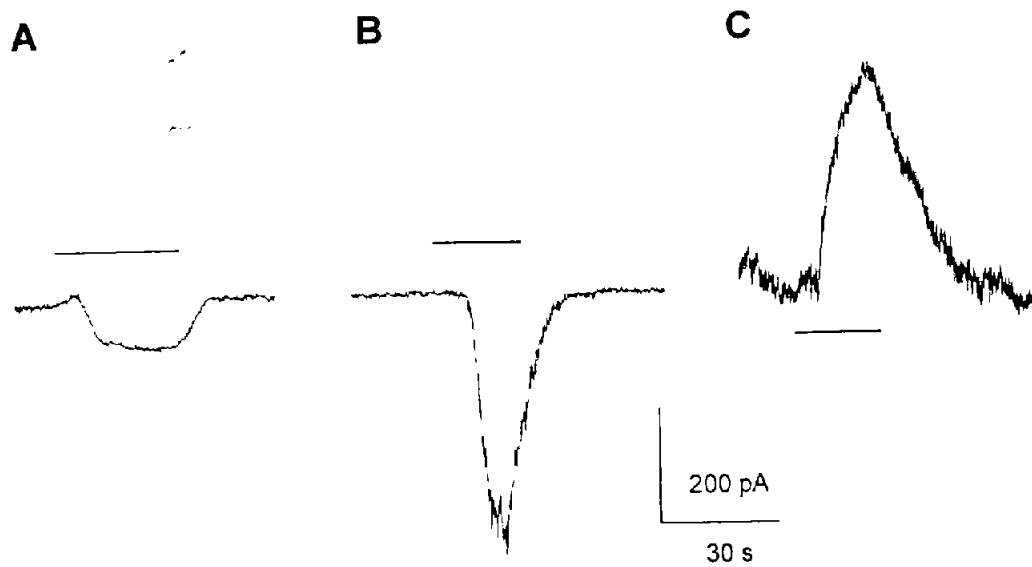


Figura 17. Respuestas representativas de los astrocitos del CC a la aplicación extracelular de 5-HT. Sólo el 40 % de las células registradas ($n = 111$) respondió a 5-HT y las respuestas predominantes fueron corrientes entrantes (34%; A y B), el resto presentó corrientes salientes (6%; C). La línea continua indica el inicio, duración y termino de la aplicación de 0.3-1 mM 5-HT.

b) Respuestas inducidas por 5-HT en presencia de TEA

Como se observó anteriormente la aplicación de pulsos de voltaje despolarizantes generó corrientes salientes de K^+ y con base al E_K , cualquier corriente saliente obtenida a un voltaje mayor que -83 mV podría corresponder a K^+ . Así pues, a potenciales de mantenimiento positivos la respuesta inducida con 5-HT podría ser debido a una corriente de K^+ , o bien a la suma de una corriente de K^+ y una corriente de Cl^- (de acuerdo al E_{Cl} , a potenciales mayores a -5 mV, las corrientes salientes observadas podrían corresponder también a este anión). Para descartar entre estas posibilidades se realizaron experimentos similares a los arriba descritos, en ellos se sustituyó 20 mM de NaCl por 20 mM de TEA en la solución extracelular. Así, se obtuvo una evidencia adicional de que esta corriente podría corresponder a Cl^- , toda vez que el potencial de inversión fue similar al encontrado sin TEA (2 mV; Figura 18B), además la corriente observada no fue bloqueada con 20 mM TEA.

La participación de iones como el Na^+ o el Ca^{2+} se descartó pues la corriente entrante inducida en presencia de 5-HT se observó incluso al utilizar una solución extracelular en donde el NaCl fue sustituido por cloruro de colina y el Ca^{2+} por 1mM de $CdCl_2$ (datos no mostrados).

c) Aplicación de rampas de voltaje.

Como se mostró anteriormente, al despolarizar la membrana de los astrocitos con pulsos o rampas de voltaje se activa una corriente saliente de K^+ . Al evaluar el efecto de la 5-HT sobre la corriente activada por rampas de voltaje, aplicadas antes (control), durante y después (recuperación) de la aplicación de 600 μ M 5-HT (Figura 19A, inserto), ésta redujo la corriente en un 30% a 40 mV ($n = 42$). Asimismo, se evidenció que la corriente en presencia de 5-HT cruza en un potencial cercano a 0 mV ($\sim E_{Cl}$). Otra forma de análisis fue la substracción de la corriente generada por la rampa de voltaje en presencia de 5-HT (que en teoría se debe a la corriente control más la corriente inducida por 5-HT) menos la corriente generada por la rampa control (Figura 19A). La resta corresponde a la corriente inducida por 5-HT.

Efecto del Cl⁻ intracelular sobre el potencial de inversión.

Si la corriente activada por 5-HT es de Cl⁻, al cambiar la concentración intracelular de este anión el potencial de inversión correspondería al nuevo valor calculado con la ecuación de Nernst (-5 mV para 135 mM y -35 mV para 40 mM de Cl⁻ extracelular; ver métodos). Nuevamente las rampas de voltaje fueron aplicadas antes, durante y después de la aplicación de 5-HT (Figura 19B, inserto). Para la solución intracelular con 135 mM de Cl⁻ el potencial de inversión experimental fue de 1.4 ± 1.36 mV (n = 5) (Figura 19B), mientras que en las células en las cuales se utilizó la solución intracelular de 40 mM el potencial de inversión experimental fue de -37 ± 1 mV (n = 5) (Figura 19B). De esta manera los valores experimentales son similares a los valores calculados, lo que apoyaría la hipótesis de que la naturaleza iónica de la corriente inducida con 5-HT corresponde al anión Cl⁻.

Equilibrio de Donnan. Otra opción podría ser que la corriente activada por 5-HT fuera el resultado del movimiento de KCl. Para tomar en cuenta esta posibilidad se utilizó la regla del equilibrio de Donnan y se consideró que el K⁺ y el Cl⁻ fueran los únicos iones permeables con el potencial de mantenimiento empleado (-60 mV):

$$\frac{[K^+]_{int} - x}{[K^+]_{ext} - x} = \frac{[Cl^-]_{ext} + x}{[Cl^-]_{int} + x}$$

en donde x se define como el KCl que sale del interior (int) al exterior (ext) de la célula.

Efectivamente, el K⁺ tendería a salir para poder mover el potencial de inversión de -83 mV al valor experimental encontrado (-37 ± 1 mV). Al despejar x se encontró un valor de 14.3158 mM que corresponde a la salida de KCl. El nuevo potencial de equilibrio calculado para ambos iones por separado, utilizando la ecuación de Nernst fue de -49 mV. Este valor es distinto al observado experimentalmente, por lo que también sugiere que la corriente inducida con 5-HT corresponde a Cl⁻.

NOTA: Los valores calculados se obtuvieron con las concentraciones de K⁺ (5.4 mM) y Cl⁻ (165.4 mM) presentes en la solución extracelular de registro y las concentraciones de K⁺ (150 mM) y Cl⁻ (40 mM) presentes en la solución intracelular en donde 95 mM de NaCl fue sustituido por 95 mM de gluconato de Na⁺ (ver métodos).

Efecto dual de la cetanserina sobre la respuesta inducida con 5-HT.

a) *Inhibición de la corriente inducida con 5-HT por la aplicación de cetanserina.* Los astrocitos del CC de la rata adulta expresan el receptor 5-HT_{2A} (Xu y Pandey, 2000), por lo tanto la corriente inducida por 5-HT podría ser mediada por la activación de estos receptores. Con objeto de explorar esta posibilidad se estudió el efecto de la cetanserina (antagonista de los receptores 5-HT₂) sobre la corriente inducida con 5-HT. De esta manera, se aplicó extracelularmente 600 μ M de 5-HT, activándose una corriente entrante.

Después de lavar la 5-HT durante al menos 1 min, se aplicó 1 μ M de cetanserina. La cetanserina al ser co-aplicada con la 5-HT redujo en un $86\% \pm 4\%$ ($n = 3$) la corriente entrante. Después de lavar ~ 2 min, la corriente inducida con 5-HT se recuperó (Figura 20, inserto). También, se aplicaron rampas de voltaje durante la aplicación de cetanserina y/o 5-HT (Figura 20, inserto). Las corrientes generadas por la aplicación de las rampas en las condiciones previamente descritas fueron graficadas en función del voltaje. Nótese cómo la corriente activada por la rampa de voltaje tiene un potencial cercano al E_{Cl} (Figura 20, flecha).

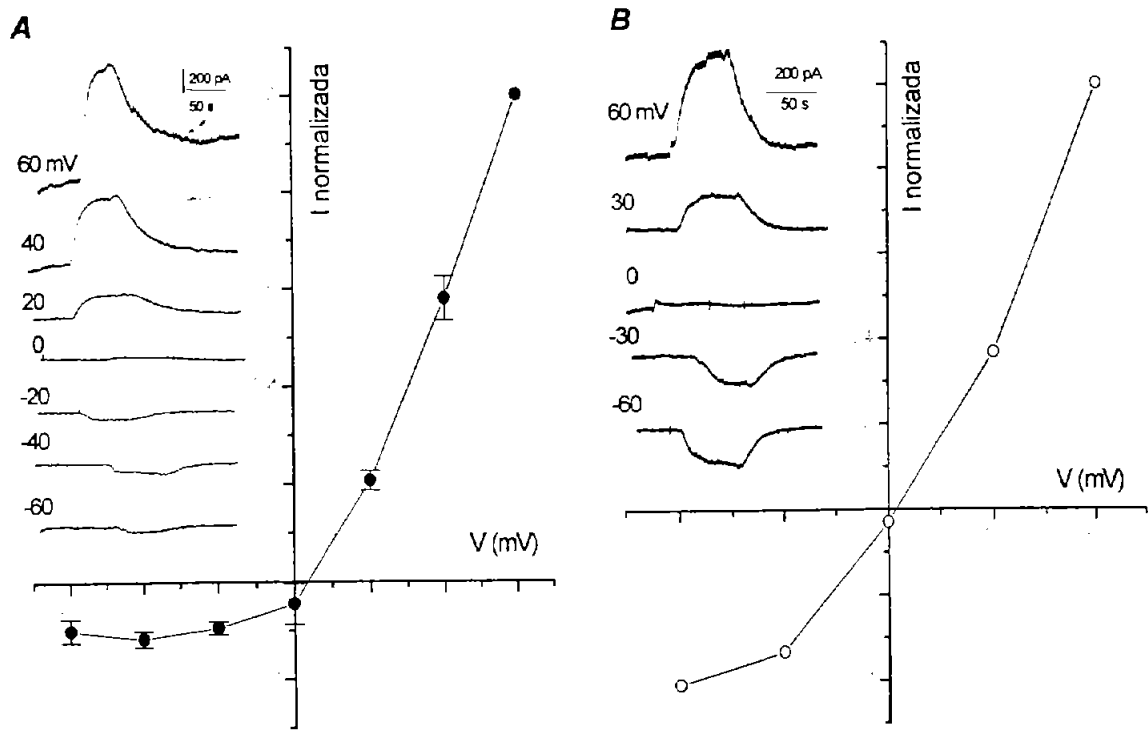


Figura 18. A, Corriente de membrana inducida con 600 μ M 5-HT (●) a los potenciales de mantenimiento mostrados junto a cada registro. La célula se mantuvo a cada potencial durante 1 min antes de la aplicación de 5-HT, y el lavado fue de al menos 1 min. La amplitud de la corriente activada por 5-HT se graficó en función del potencial de mantenimiento. Cada punto corresponde al valor promedio \pm E.E. para $n = 3$ células. B, Efecto de 20 mM TEA sobre las corrientes activadas por 5-HT (○) a distintos potenciales de mantenimiento. El experimento fue de una sola célula. El potencial de inversión de la corriente activada con 5-HT fue de 3 mV y al aplicar TEA más 5-HT fue de 2 mV.

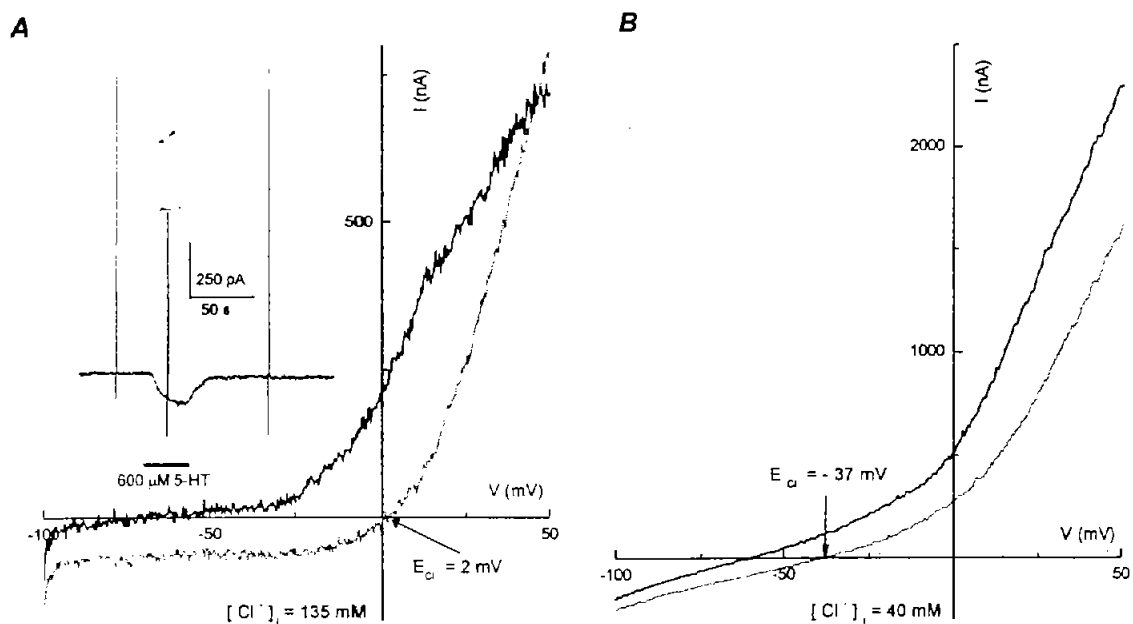


Figura 19. Relaciones I-V de la repuesta inducida por 5-HT. Inserto: corriente inducida con 600 μM 5-HT (—). Las rampas de voltaje (de -100 a 50 mV en 1s) se aplicaron antes, durante y después de la perfusión de 5-HT. Las relaciones I-V se obtuvieron con dos concentraciones de Cl⁻ intracelular, 138 y 35 mM. En el primer caso el potencial de inversión fue de 1.4 ± 1.36 mV (A); mientras que en el segundo caso fue de -37 ± 1 mV (B). Estos valores fueron aproximados a lo esperado para el E_{Cl^-} , de acuerdo con la ecuación de Nernst. Los datos son representativos cinco células.

Sin embargo, en presencia de cetanserina la corriente activada por la rampa de voltaje no modifica el potencial de inversión, el cual es similar a la corriente activada por la rampa control y la del lavado, muy próximo al potencial de mantenimiento previo a la rampa de voltaje (-60 mV).

Estos datos sugieren que la corriente inducida por 5-HT es mediada por los receptores 5-HT₂. Más aún, el bloqueo de la corriente de K⁺, que se obtiene en presencia de 5-HT es similar al que se obtiene en presencia de cetanserina, lo que sugeriría también la participación de los receptores 5-HT₂ en dicho efecto.

b) *Potenciación de las respuestas inducidas con 5-HT por cetanserina.* En algunos casos las respuestas inducidas con 5-HT (-122 ± 44 pA, n = 6) fueron potenciadas por cetanserina (-283 ± 65 pA), en un promedio de 131% (Figura 21). El intervalo de esta potenciación fue entre 35 y 434%. Esta potenciación se detectó incluso con 1 μM de cetanserina y fue de 57%.

Efecto de la 5-HT sobre la corriente K_{DR}.

La corriente dominante en los cultivos de astrocitos del CC de la rata es la K_{DR}, como se mostró anteriormente. Por ello, se utilizó un protocolo que solo favoreciera la activación de ésta corriente (ver métodos) aplicado antes (control), durante y al menos 1 min después de la aplicación de 5-HT. Los trazos muestran que con 1 mM de 5-HT se redujo la corriente control activada por pulsos de voltaje en 48% ± 3%, n = 3 (Figura 22, inserto). Este valor fue similar al porcentaje de bloqueo por 5-HT observado con las corrientes activadas por las rampas de voltaje. Este valor fue similar al porcentaje de bloqueo por 5-HT observado con las corrientes activadas por las rampas de voltaje (n=42; ver pág 62), lo que confirma que el bloqueo observado en las rampas efectivamente corresponde al bloqueo de la K_{DR} (inserto, Figura 22). Las amplitudes de las corrientes obtenidas fueron graficadas en función de los distintos pulsos de voltaje para así construir una relación I-V (Figura 22).

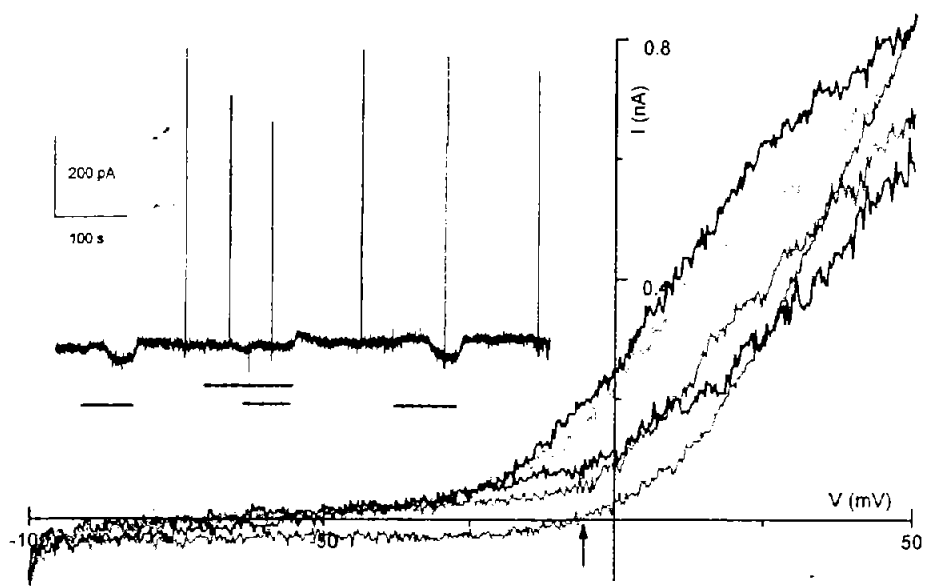


Figura 20. Inhibición de la corriente activada con 5-HT por cetanserina. Inserto: corriente inducida con 600 μM 5-HT (—), preincubación con 1 μM cetanserina (---) y recuperación de la respuesta. Relaciones I-V control (—), en presencia de 5-HT (---), de cetanserina (· · ·), de 5-HT más cetanserina (— · —) y la recuperación de la respuesta control (— — —). La flecha (1) indica el potencial de inversión que fue de -5 mV.

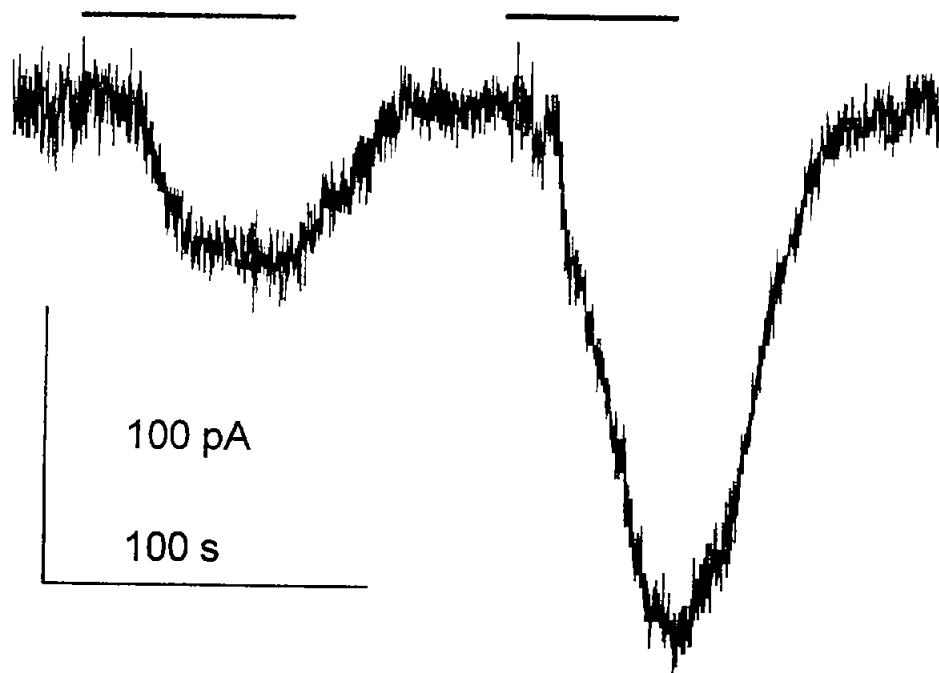


Figura 21. Potenciación de la corriente activada con 5-HT por cetanserina. La corriente fue inducida con 1 mM de GABA (—), 300 μM 5-HT (—) y 300 μM 5-HT más 10 μM cetanserina (—). La respuesta con 5-HT se potenció en $248\% \pm 72\%$ ($n = 6$).

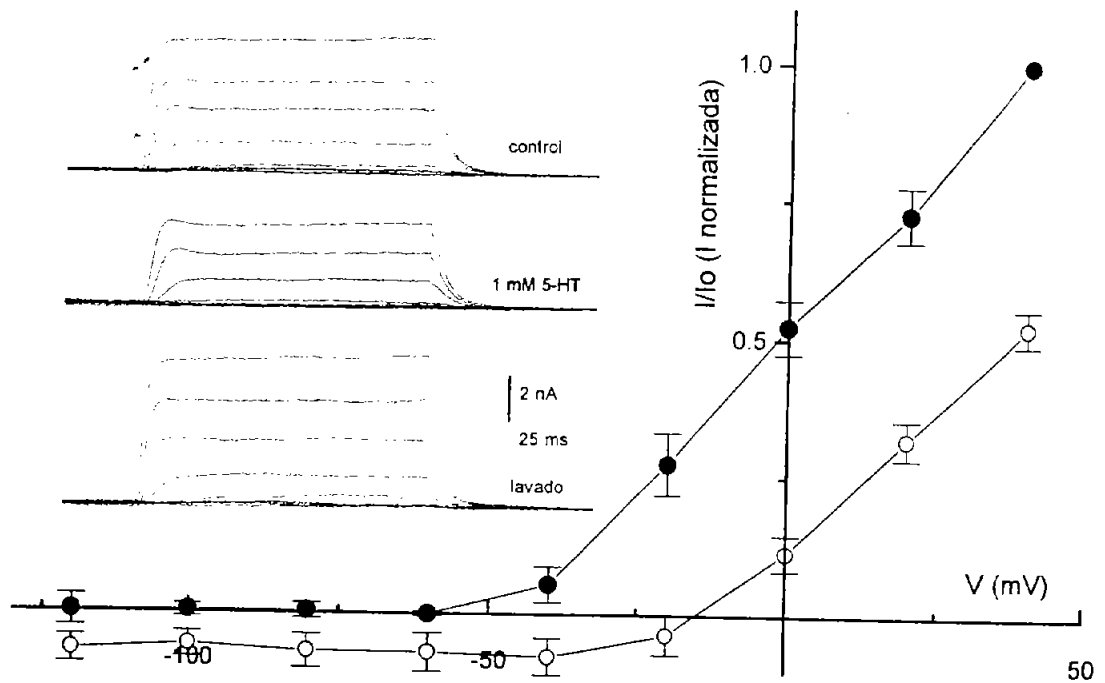


Figura 22. Efecto de la 5-HT sobre la K_{DR} . Inserto: corrientes obtenidas con pulsos de voltaje (de -120 a 40 mV) antes, durante y después de la aplicación de 5-HT. La 5-HT bloqueó la corriente K_{DR} en $\sim 50\%$ a 40 mV. La relación I-V muestra la corriente máxima a los distintos voltajes, para el control (●) y con 1 mM 5-HT (○).

Efecto de la quipacina y la α -metil 5-HT sobre la corriente K_{DR} .

La quipacina y la α -metil 5-HT, agonistas de los receptores 5-HT₂, se emplearon siguiendo el mismo razonamiento que se uso para utilizar la cetanserina. Los pulsos de voltaje se aplicaron de manera similar a lo descrito previamente para la 5-HT. La amplitud de la corriente control activada por los pulsos de voltaje y aquella en presencia de 10 μ M quipacina o 10 μ M α -metil 5-HT se graficaron en función del voltaje. Ambos agonistas redujeron la amplitud de la corriente control, la quipacina en 42% y la α -metil 5-HT en 27% (Figura 23 A, B).

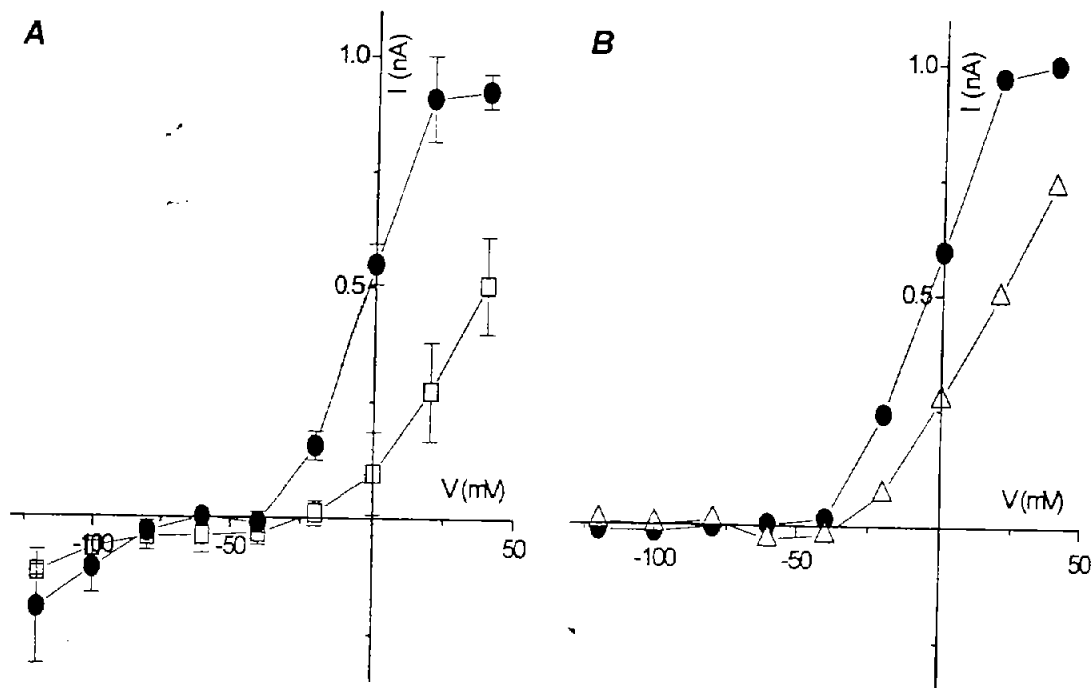


Figura 23. Efecto de algunos agonistas del 5-HT₂. Las relaciones I-V muestran la corriente máxima a los distintos voltajes para 10 μ M de quipacina (□) y de α -metil-5HT (Δ). Las corrientes fueron normalizadas utilizando la corriente máxima a 40 mV. En (A) se presenta el promedio \pm E.E. de 3 experimentos independientes, en (B) solo se ilustra un dato representativo.

IV. Acumulación de 5-HT (H^3) en el CC de la rata

Los astrocitos en cultivo pueden expresar receptores que normalmente no se expresarían *in situ*, de tal forma que las respuestas inducidas por 5-HT en los astrocitos *in vitro* no necesariamente apoyarían la idea de la existencia de la transmisión serotoninérgica en el CC de la rata. Una manera de evaluar si existe la transmisión serotoninérgica en el CC es estudiar elementos adicionales como el transporte y la liberación de esta monoamina *in situ*, para lo cual se utilizaron rebanadas del CC.

En la primera serie de experimentos se utilizó 2 μ M de 5-HT como una posible concentración saturable, dado que SERT tiene una K_m de 200 a 600 nM (Dave y Kimelberg, 1994; Bel *et al.*, 1997; Bunin y Wightman, 1998), las rebanadas del CC fueron incubadas a distintos tiempos y se encontró que la acumulación específica de 5-HT se incrementó a medida que el tiempo de incubación se aumentaba, hasta alcanzar su máximo a los 10 min, a partir de este tiempo la acumulación permaneció constante a los 20 y 40 min (Figura 24). Estos resultados sugerían la presencia de un sistema de transporte para 5-HT, por lo cual procedimos a su caracterización.

Con base en los resultados previos, incubamos las rebanadas de CC con [3H]-5-HT/5-HT por 10 min y buscamos los parámetros cinéticos: la constante de afinidad o de K_m y de V_{max} de la acumulación de 5-HT en el CC de la rata. Para ello se utilizaron distintas concentraciones de 5-HT (con una mezcla de 40 nM de [3H]-5-HT y el resto de 5-HT no radioactiva), que fueron de 25 a 1000 nM. La acumulación de 5-HT resultó ser un proceso saturable que dependía de la concentración. Los datos fueron ajustados con la ecuación de Michaelis-Menten y se obtuvo una K_m de 420 ± 84 nM, así como una V_{max} de 9.54 ± 0.78 pmol/mg prot/min (Figura 25).

De esta manera, los siguientes experimentos se realizaron incubando la rebanada por 10 min y utilizando una concentración de 5-HT cercana a la K_m calculada. Simultáneamente se exploró si la acumulación de 5-HT era un proceso dependiente de Na^+ , para ello se sustituyó el NaCl del Ringer por cloruro de colina. Bajo estas condiciones la acumulación se redujo ~80%, de 3.53 ± 0.66 pmol/mg

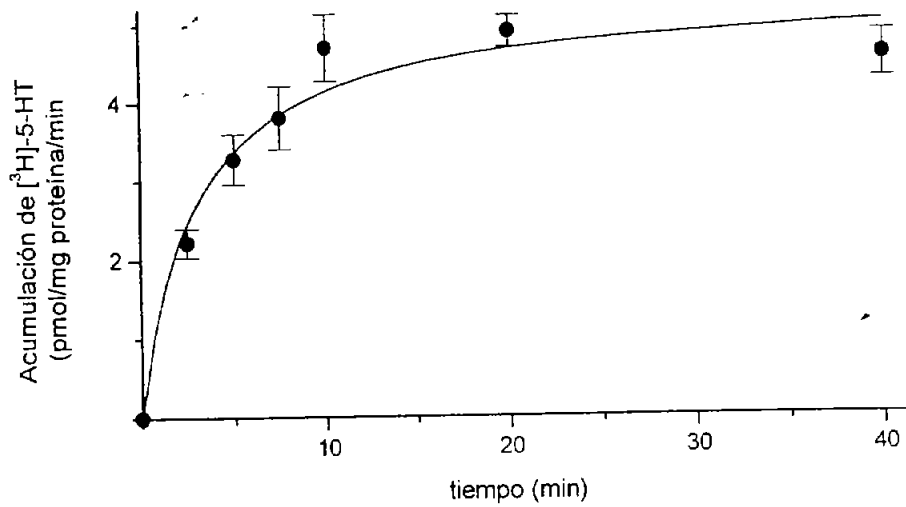


Figura 24. Acumulación de 5-HT en el CC. La acumulación de $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ en rebanadas del CC de la rata se graficó en función del tiempo de incubación con $2\ \mu\text{M}$ 5-HT. Cada punto es el promedio \pm E.E. de tres experimentos independientes.

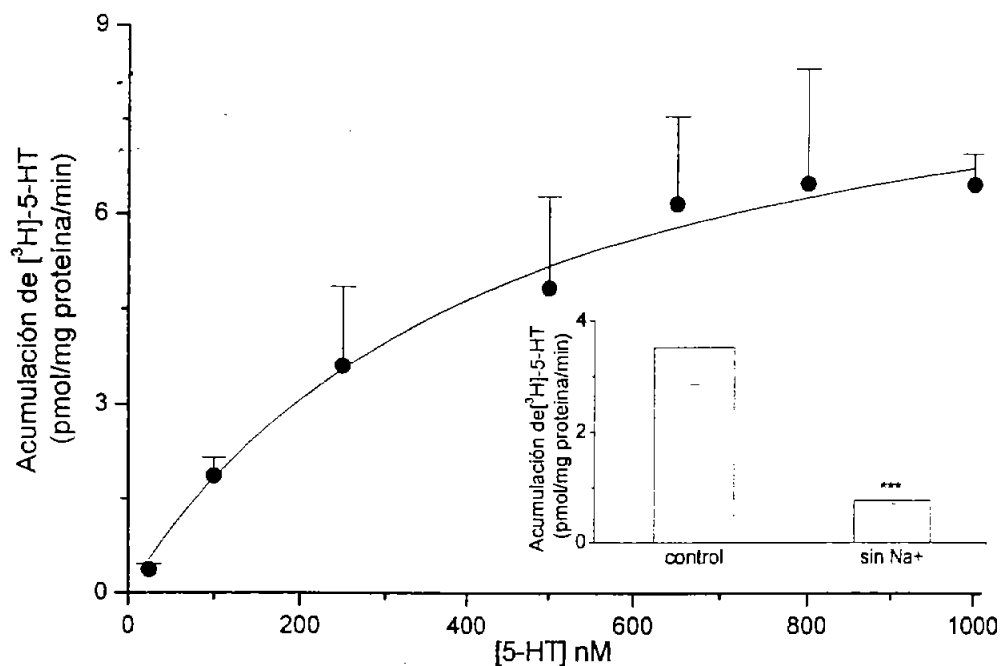


Figura 25. Dependencia de la velocidad de acumulación de $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ con la concentración de 5-HT. Inserto: dependencia de Na^+ de la acumulación de 5-HT en rebanadas del CC de la rata. La acumulación de 500 nM de 5-HT se midió en presencia de Na^+ (control) y sin Na^+ , sustituido por colina. En ambas gráficas, el eje de las ordenadas tiene las mismas unidades. Los datos son el promedio \pm E.E. de tres experimentos independientes. *** $P < 0.005$, prueba de Students.

prot/min a 0.77 ± 0.06 pmol/mg prot/min (Figura 25, inserto). En conjunto estos resultados indican que el CC posee un sistema de transporte para 5-HT que es de alta afinidad y depende de Na^+ .

Efecto del pH

Debido a que el pH desempeña un papel importante en cualquier proceso fisiológico, incluyendo el funcionamiento de los transportadores a distintos neurotransmisores (Cao *et al.*, 1997), era de nuestro interés saber si este sistema de transporte era afectado por cambios en el pH. La acumulación de 5-HT fue inhibida a pH ácido. Al comparar la acumulación de 5-HT a pH 5 *versus* la acumulación a pH 7 se observó que ésta disminuyó en 60%, mientras que con los otros pH probados no hubo diferencias significativas (Figura 26). Estos resultados fueron similares a los reportados previamente para el SERT de rata expresado en ovocitos (Cao *et al.*, 1998).

Efecto de algunos inhibidores de la recaptura de monoaminas sobre la acumulación de 5-HT

Continuando con la caracterización del sistema de transporte, se determinó la acción de algunos inhibidores que afectan la acumulación de 5-HT en otros modelos ya caracterizados (Hirst *et al.*, 1998b; Inazu *et al.*, 2001). Así, la fluoxetina (Prozac), inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT, redujo la acumulación de ^3H -5-HT a medida que se incrementaba su concentración, el porcentaje de inhibición se graficó con relación a la concentración de fluoxetina.

Los datos fueron ajustados con la ecuación de Hill determinando la concentración que inhibe el 50% de la acumulación total (IC_{50}) y ésta fue de 100 nM, con la ecuación de Cheng-Prusoff se calculó la K_i que fue de 44.7 ± 10 nM (Figura 27A). Sorpresivamente, la fluoxetina no inhibió en su totalidad la acumulación de 5-HT, incluso a la concentración más elevada (10 μM). La inhibición fue solamente de 43% del total de la acumulación dependiente de Na^+ . El efecto de otros inhibidores fue similar, la zimelidina (un bloqueador del transportador de 5-HT y antidepresivo); la imipramina (antidepresivo que inhibe el transportador de NE y en menor grado el de 5-HT); la domipramina (antidepresivo que

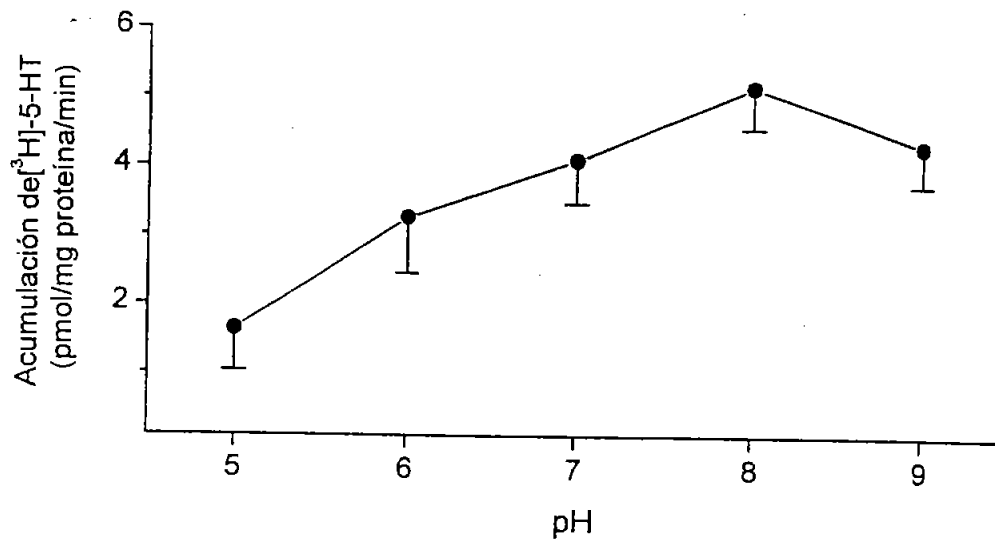


Figura 26. Efecto del pH en la acumulación de $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$. Las rebanadas del CC de la rata fueron incubadas 10 min en presencia de 500 nM $[^3\text{H}]\text{-5-HT:5-HT}$ (1:12.5) a diferentes pH. Cada punto es el promedio \pm E.E. de cuatro experimentos independientes.

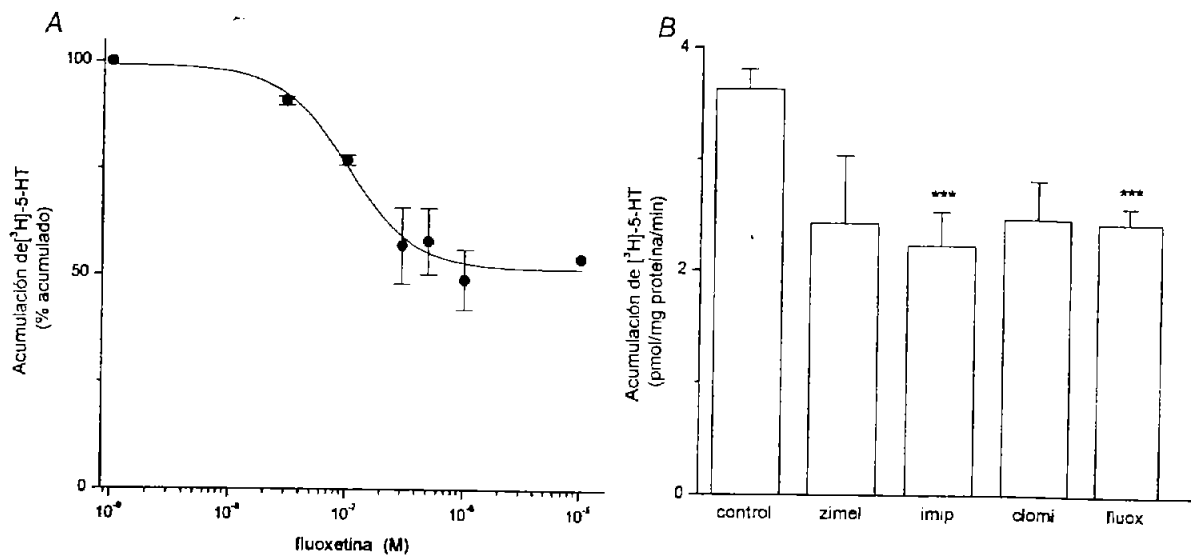


Figura 27. A: Inhibición de la acumulación de $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ a distintas concentraciones de fluoxetina. La línea es el ajuste de los datos con la ecuación de Hill. Cada punto es el promedio \pm E.E. de tres experimentos independientes. B: Inhibición de la acumulación $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ por distintos inhibidores de la recaptura de monoaminas. La acumulación de 5-HT se midió en presencia de $10\ \mu\text{M}$ de cada inhibidor (zimel, zimelidina; imp, imipramina; clomi, clomipramina; fluox, fluoxetina). Los datos representan el promedio \pm E.E. de tres experimentos independientes. Los efectos significativos se observaron para fluoxetina e imipramina. *** $P < 0.05$. Prueba de Dunnett.

bloquea el transportador de 5-HT y en menor grado el de NE). la fluoxetina fue nuevamente utilizada para comparar su efecto con el de otros inhibidores de la recaptura de 5-HT. Todos estos inhibidores fueron usados a una concentración de 10 μ M y disminuyeron el transporte de 32 a 39% (Figura 27B).

Acumulación de 5-HT en la sustancia blanca.

Para nosotros era importante evaluar si otra estructura con una composición celular similar a la del CC poseía un sistema de transporte para 5-HT. De esta manera, el nervio óptico fue seleccionado para realizar experimentos de acumulación de 5-HT en paralelo con el CC y el hipotálamo (este último es un tejido que recibe proyecciones serotoninérgicas del núcleo del Rafé y en principio podría presentar una acumulación notable de este transmisor), cuya composición celular difiere de las estructuras de la sustancia blanca. La tabla II muestra los valores de acumulación de 3 regiones distintas del SNC: hipotálamo, nervio óptico, estructura de composición celular similar a la del CC; y el CC. De esta forma el hipotálamo aparece como la estructura que presentó mayor acumulación de 5-HT, el CC acumuló el 40% de lo que acumuló el hipotálamo; mientras que el nervio óptico acumuló el 24%.

Efecto de la DA y la NE sobre la acumulación de 5-HT insensible al bloqueo con fluoxetina.

Algunos estudios mencionan que, en presencia de algún inhibidor de la recaptura de 5-HT o cuando el SERT no es funcional, la 5-HT puede ser acumulada en las neuronas de la rata por medio de los transportadores de DA (DAT) o NE (NET)(Suarez-Roca y Cubeddu, 2002; Zhou et al., 2002). Para explorar esta posibilidad, la acumulación de 5-HT fue estudiada en el CC de la rata en presencia de fluoxetina. Si la 5-HT es acumulada por DAT o NET, uno esperaría una reducción en la acumulación de 5-HT insensible al bloqueo con fluoxetina cuando esos transportadores son saturados por altas concentraciones de DA y NE. Como se mostró anteriormente, la fluoxetina sola inhibió la acumulación de 5-HT 54%. Sorpresivamente, ninguna inhibición adicional fue observada al añadir 10 μ M DA más 10 μ M NE (48%, Figura 28). Estos resultados sugieren fuertemente que la acumulación

TABLA II. Acumulación de serotonina en el hipotálamo, CC y nervio óptico de la rata adulta.

Tejido	Control (pmol/mg Proteína/min)	sin Na ⁺ (%)	10 μM fluoxetina (%)
Hipotálamo	7.15 ± 0.67	19	64
Cuerpo calloso	3.80 ± 0.78	19	67
Nervio óptico	2.60 ± 0.08	20	13

* Los datos son el promedio de 5 experimentos independientes ± E.S. El porcentaje de la acumulación de 5-HT, sin Na⁺ o en presencia de fluoxetina está basado en sus controles respectivos (100 %).

INSTITUTO
DE LA MENTE

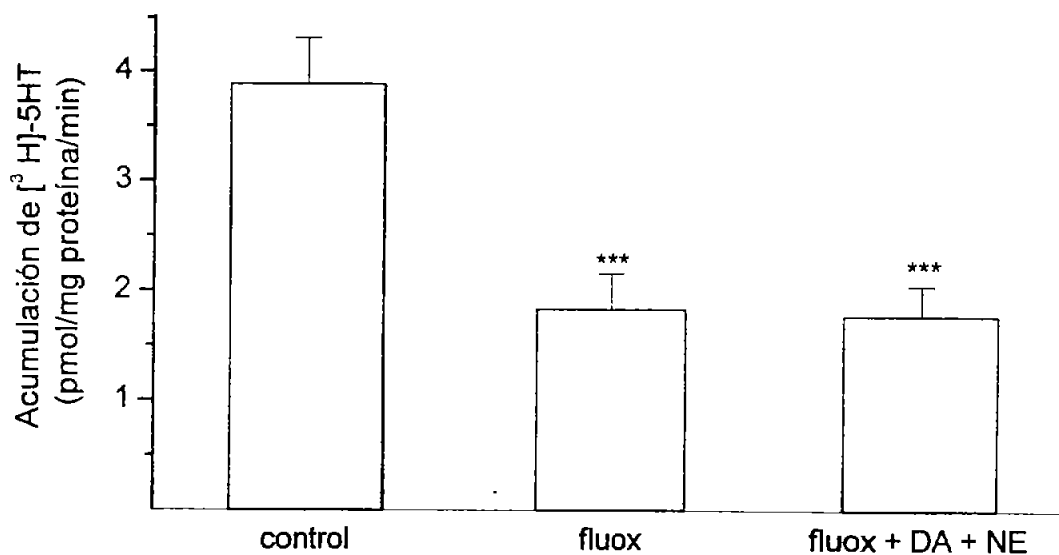


Figura 28. Efecto de las monoaminas sobre la acumulación de 5-HT insensible a fluoxetina. La acumulación se midió en el CC (control), en presencia de 10 μ M fluoxetina, y en presencia de fluoxetina + NE + DA (todos a 10 μ M). Las barras muestran el promedio \pm E.E. de al menos cuatro experimentos independientes. *** $P < 0.01$. Prueba de Dunnett.

de 5-HT no es mediada ni por DAT ni NET e indican que, al menos en el CC, la acumulación de 5-HT es altamente específica para 5-HT.

V. Acumulación y liberación de 5-HT en el CC de la rata

1) *Acumulación de 5-HT en el desarrollo.* Dado que los cultivos fueron hechos con ratas neonatas y registradas del tercero al octavo día de cultivo, esto podría equivaler al estadio posnatal P3-P8. Previamente se había caracterizado la acumulación de 5-HT en el adulto pero ¿cómo es ésta en el desarrollo?

En vista de que las respuestas a 5-HT presentaron mayor frecuencia entre los días cinco y ocho de cultivo, los experimentos de acumulación y liberación de 5-HT se realizaron con ratas adultas y P6 (edad representativa del tiempo de registro de los astrocitos). La acumulación de 5-HT fue mayor en ratas P6 (4.9 ± 0.5 pmol/mg proteína/min) que en adultas (2.88 ± 0.2 pmol/mg proteína/min; n=5) (Figura 29A).

Estos datos sugieren una mayor actividad serotoninérgica del CC en etapas tempranas del desarrollo, misma que se ve reducida en el CC adulto. Con base en este resultado, decidimos explorar cómo era la acumulación en distintas etapas del desarrollo (P0, P6, P12, P18, P30). Aunque la gráfica presenta una forma de campana con acumulación máxima en P12, no se encontraron diferencias significativas entre los cinco estadios estudiados (Figura 29B).

2) *Liberación de [³H]-5HT en el CC.* Si el CC expresa receptores a 5-HT y tiene un sistema de transporte dependiente de Na⁺ para esta monoamina, quedaba por explorar si el CC liberaba este transmisor. Para averiguarlo, las rebanadas del CC de la rata adulta y P6 fueron incubadas con [³H]-5-HT por 10 min, y después de lavar el tejido en frío (1°C) por 14 min, se incubaron por 5 períodos de 2 min (un vial por cada incubación) y se cuantificó la 5-HT liberada en cada período.

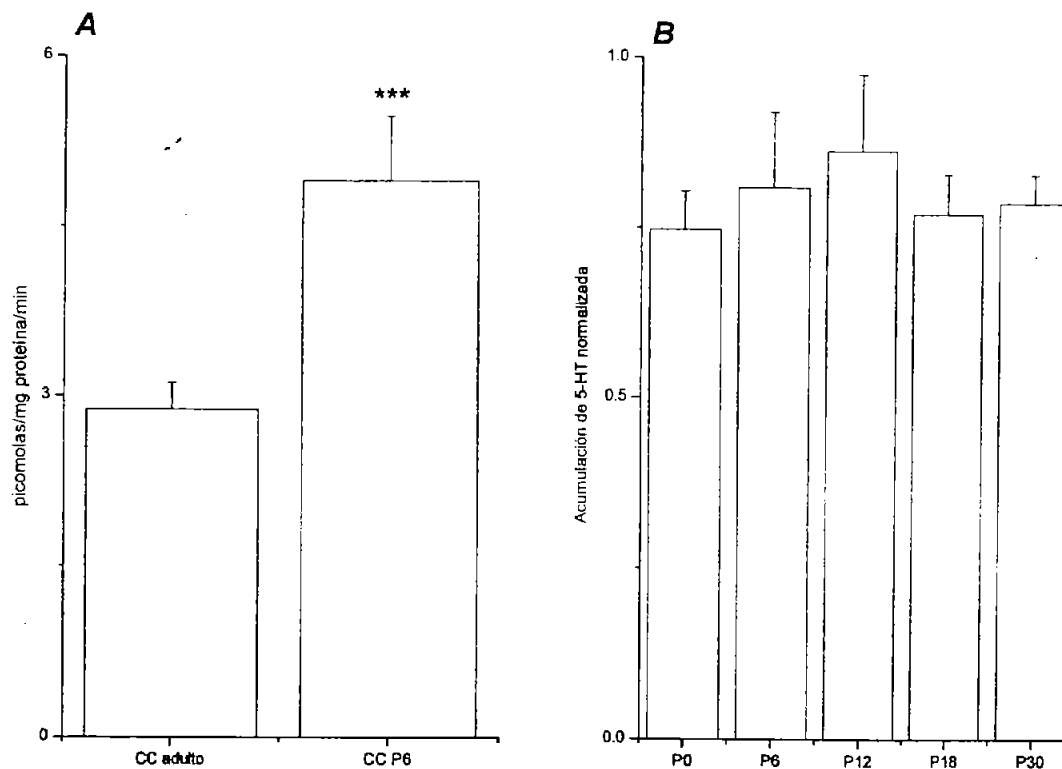


Figura 29. Acumulación de 5-HT durante el desarrollo postnatal. A, Comparación de la acumulación de 5-HT entre el CC de adulto y P6. B, Acumulación de 5-HT en distintos estadios del desarrollo postnatal (P): P0, P6, P12, P18 y P30. Las barras muestran el promedio \pm E.E. de cinco experimentos independientes. *** $P < 0.01$. Prueba de Students.

Los resultados mostraron que la liberación basal de 5-HT no presentó fluctuaciones significativas los primeros 4 min por lo que a los 18 min (14 min de lavado más 4 min de liberación basal), las rebanadas fueron incubadas por 2 min con RK modificado que contenía 70 mM KCl. El CC de la rata adulta liberó 5-HT al ser estimulado con alto K^+ , no así el CC de ratas P6 (Figura 30A).

La siguiente pregunta fue saber si esta liberación, en el adulto, era o no dependiente de Ca^{2+} , dado que la liberación vesicular en la transmisión sináptica depende de este catión (Friedman y Wang, 1988; Bagdy *et al.*, 1995; Trueta *et al.*, 2003). Para ello, los experimentos control consistieron en la liberación estimulada con alto K^+ y en paralelo se observó la liberación estimulada con alto K^+ en un medio sin Ca^{2+} , este catión fue sustituido por 1 mM de Cd^{2+} para eliminar la participación de cualquier canal de Ca^{2+} . La liberación de 5-HT, estimulada con alto K^+ resultó ser un proceso dependiente de Ca^{2+} , ya que al estimular con K^+ en un medio sin Ca^{2+} , no se incrementó la liberación y el porcentaje liberado fue similar al obtenido con el preestímulo y el postestímulo (Figura 30B).

De esta manera, los estudios de liberación de 5-HT estimulada por K^+ sugieren que la 5-HT solo es liberada en el CC de la rata adulta y que esta liberación es dependiente de Ca^{2+} (Figura 30A,B). Asimismo, los datos sugieren que aunque existe mayor acumulación de 5-HT en P6, ésta no es liberada por el CC, o al menos no de una manera dependiente de Ca^{2+} , lo que sugiere que la 5-HT proviene de fuentes externas al CC. Por otra parte, nuestros datos sugieren que en el adulto la 5-HT podría ser liberada del CC, por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} .

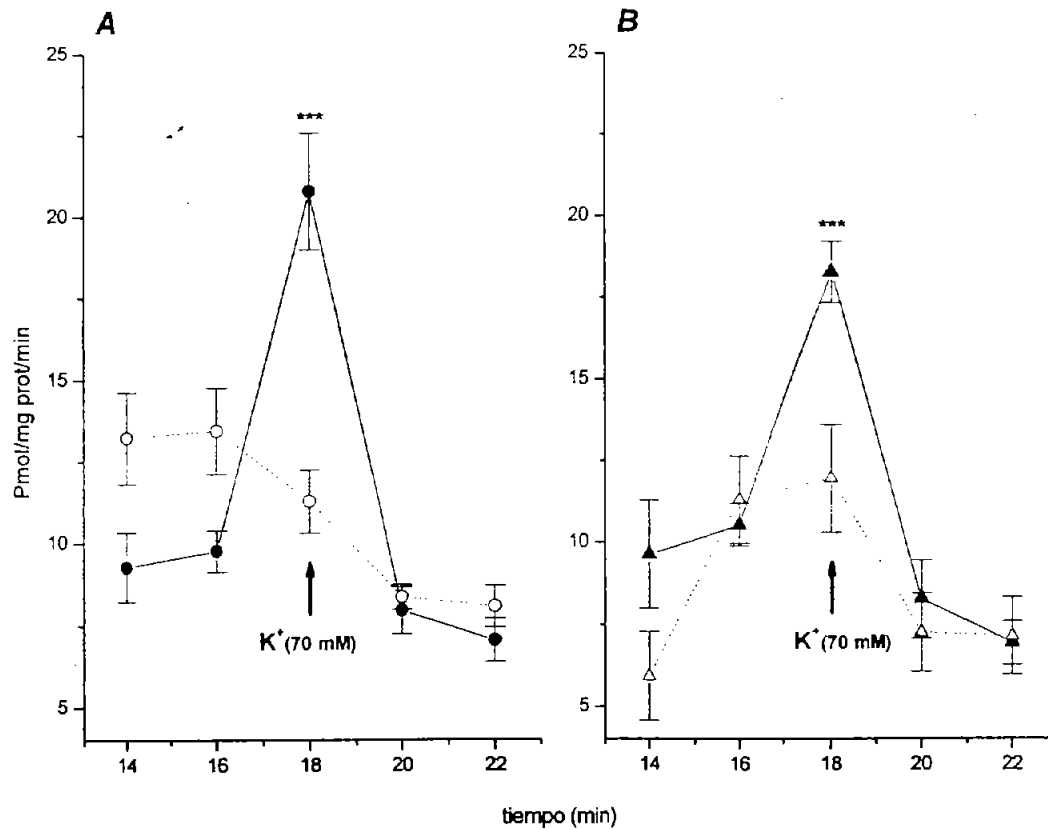


Figura 30. Liberación de 5-HT en rebanadas del CC de la rata P6 y adulto. A, Liberación estimulada con alto K^+ (70 mM) en el adulto (●) y P6 (○). B, Liberación de 5-HT estimulada con alto K^+ en rebanadas del CC de la rata adulta, con (▲) o sin Ca^{2+} (Δ). En ambos casos la flecha (↑) indica la incubación con alto K^+ . Cada punto es el promedio \pm E.E de los valores obtenidos en 5 experimentos. Se utilizó la prueba de Students para comparar el pre-estímulo con el estímulo (***) $P < 0.05$.

DISCUSIÓN

I. Características morfológicas de las células gliales in vitro e in vivo del CC de la rata

La principal razón para considerar a una célula nerviosa como astrocito es la expresión de la GFAP y los astrocitos en cultivo poseen un alto contenido de esta proteína (Walz, 2000). En nuestras células cultivadas, en DMEM o en NB-G5, casi el 100% son inmunoreactivas a GFAP. Los astrocitos poseen potencialmente la capacidad para reaccionar al ambiente proporcionado, sea el medio DMEM o NB-G5, adaptando su morfología con una redistribución de las proteínas de citoesqueleto pero sin una síntesis *de novo* o un catabolismo de sus respectivas proteínas (Safavi-Abassi *et al.*, 2001).

II. Corrientes de K⁺ activadas por voltaje en astrocitos del CC de la rata

Nosotros estudiamos si los astrocitos con morfología similar eran influenciados por la composición del medio de cultivo, en la expresión de las corrientes activadas por voltaje, encontrando que los astrocitos cultivados en medios DMEM o NB-G5 expresan corrientes muy similares en amplitud y forma. De esta manera, los astrocitos cultivados en el medio NB-G5 fueron seleccionados para estudiar las corrientes activadas por voltaje, y lo primero fue establecer la naturaleza iónica de la corriente con base al potencial de inversión.

Potencial de inversión de la corriente iónica

El potencial de inversión de la corriente activada por voltaje fue de 66 ± 0.57 mV, cercano al E_K y similar a lo observado en glioblastos del CC del ratón (-60 mV; Berger *et al.*, 1991), precursores de oligodendrocitos (-55.9 ± 1.2 mV; Chvatal *et al.*, 1997) y oligodendrocitos maduros (-75.9 ± 3.8 mV; Gibson y Bordey, 2002) de la rata.

Corrientes K_{DR} y K_A en astrocitos del CC de la rata

A la fecha los estudios en astrocitos del CC sobre corrientes activadas por voltaje son limitados, un estudio previo reportó un patrón de corrientes pasivas en rebanadas del CC del ratón (Bernstein *et al.*, 1996). Aquí se muestra ahora que los astrocitos del CC poseen corrientes de K^+ salientes activadas por voltaje y que son sensibles a TEA, 4-AP y Ba^{2+} . Estos bloqueadores nos permitieron identificar las corrientes K_{DR} y K_A . Resultados similares han sido reportados para astrocitos en cultivo del cerebro del ratón (Nowak *et al.*, 1987), astrocitos disociados e *in situ* del hipocampo (Zhou y Kimelberg, 2000), corteza cerebral y médula espinal (Bordey y Sontheimer, 2000) de la rata. Asimismo, las corrientes no bloqueadas por TEA observadas en nuestro estudio sugieren la participación de las subunidades Kv 4, pues se sabe que estas subunidades son insensibles al bloqueo por TEA (Pak *et al.*, 1994).

Sensibilidad a 4-AP

La sensibilidad a 4-AP se estudió en los astrocitos del CC de la rata y se obtuvo una $IC_{50} = 118 \pm 26 \mu M$, este valor es similar al reportado para células de astrocitoma C6 (200 μM ; Wang *et al.*, 1992). La sensibilidad de los astrocitos al bloqueo con 4-AP podría ser una característica específica del tipo celular, debido a que en las neuronas piramidales la IC_{50} es 4 mM (Martina *et al.*, 1998; Korngreen y Sakmann, 2000), mientras que en las interneuronas del giro dentado de la rata la IC_{50} fue menor a 100 μM (Martina *et al.*, 1998). Las concentraciones micromolares de 4-AP se conoce que bloquean selectivamente la subunidad Kv3 (Kirsch y Drewe, 1993; Grissmer *et al.*, 1994). Entonces el bloqueo del 50% del total de la corriente de K^+ con 100 μM de 4-AP sugiere la participación de la subunidad Kv3.

Sensibilidad a Bario

El efecto del Ba^{2+} fue evaluado sobre las corrientes salientes activadas por voltaje y sorprendentemente su aplicación permitió la separación de dos poblaciones: una que presentó alta

sensibilidad (~50% de bloqueo) y otra con baja sensibilidad (~25% de bloqueo). La reducción de la corriente que se observó en la relación I-V para ambas poblaciones es similar a lo reportado para astrocitos cultivados de la corteza cerebral de la rata (42%) en donde el bloqueo parcial de los canales de K^+ se obtuvo con 1 mM Ba^{2+} , lo que produjo una despolarización de 30 mV (Anderson *et al.*, 1995).

Asimismo, un caso similar al bloqueo diferencial que se observó con Ba^{2+} , fue el reportado en astrocitos recién aislados del hipocampo de la rata, en donde el TEA bloqueó el 71% de la corriente de K^+ , en la población conocida como astrocitos con rectificación saliente, mientras que en la otra población identificada (población de astrocitos con rectificación variable) solo bloqueó el 25% (Zhou y Kimelberg, 2000). Más aún, recientemente se identificaron dos tipos de oligodendrocitos en el CC de la rata con base en la presencia o ausencia de corrientes dependientes de voltaje y utilizando Ba^{2+} como estrategia farmacológica (Gibson y Bordey, 2002).

Ahora bien, los voltajes medios de activación ($V_{1/2}$) de los controles de las dos poblaciones de astrocitos del CC de la rata son similares (-13.7 ± 1.5 y -11.2 ± 2.1 mV). Caso contrario se presentó con los $V_{1/2}$ (-12 y 8 mV) de las dos poblaciones de astrocitos identificadas en el hipocampo de la rata (Zhou y Kimelberg, 2000). Los $V_{1/2}$ podrían orientarnos en cuanto a las subunidades que participan en las corrientes de K^+ , y nuestros valores son similares a los de las subunidades Kv1.4, Kv4.1, Kv4.2 y Kv4.3 que van de -10 a -22 mV (Baldwin *et al.*, 1991; Schroter *et al.*, 1991; Serodio *et al.*, 1994, 1996; Stuhmer *et al.*, 1989).

Sin embargo, en presencia de Ba^{2+} , el $V_{1/2}$ calculado para la población con mayor sensibilidad al Ba^{2+} fue de -21.7 ± 3.4 mV mientras que la de la población con menor sensibilidad al Ba^{2+} no cambió significativamente respecto a su control (-9.4 ± 2.5 mV). Estos resultados sugieren que las subunidades de los canales que participan en las corrientes de K^+ observadas, en los dos tipos de astrocitos identificados, son diferentes y esto origina una sensibilidad distinta al bloqueo con Ba^{2+} .

Estos resultados añaden información a los estudios hechos en astrocitos del CC de los roedores *in situ*. Particularmente, estos datos muestran que los astrocitos del CC de la rata expresan corrientes

de K⁺ activadas por voltaje que incluyen aquellas con rectificación retardada (KDR) y las tipo A (KA), mismas que podrían tener una participación importante en el desarrollo regulando el crecimiento y la proliferación celular (Chiu y Wilson, 1989; Pappas *et al.*, 1994)

III. Respuestas a 5-HT en astrocitos del CC de la rata

Nuestros resultados muestran que los astrocitos del CC de la rata responden a la aplicación extracelular de 5-HT. La amplitud de las corrientes fue de -40 a -320 pA, similar a la reportada para oligodendrocitos cultivados de la corteza cerebral de la rata (Belachew *et al.*, 1998), único antecedente de respuestas a 5-HT en células gliales utilizando la técnica de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa. Sin embargo, el porcentaje de células que responden a 5-HT fue mucho menor en el presente estudio (50% vs 100% en el día 7 de cultivo) aunque a mayor tiempo de cultivo un mayor porcentaje de células fueron sensibles a 5-HT.

En cuanto al GABA, tampoco se registraron cambios en cuanto a la amplitud de las corrientes con relación al tiempo de cultivo, aunque el porcentaje de células que respondieron a GABA fue menor al reportado en oligodendrocitos de la corteza cerebral de la rata (Belachew *et al.*, 1998). Estas diferencias podrían deberse al tipo celular o a la región cerebral.

Por otra lado, nuestros datos presentan cierta diferencia con los de rebanadas del CC de ratón, en donde la 5-HT produce incrementos en la concentración de Ca²⁺ intracelular (aunque son distintos abordajes experimentales) en menos del 10% de las células estudiadas entre P3-P7 (Bernstein *et al.*, 1996; que sería un estadio similar a los días de cultivo C3-C8). Asimismo, en estudios efectuados en glioblastos del CC de la rata, el porcentaje de células con corrientes inducidas con GABA fue del 80% (Berger *et al.*, 1992) y en el presente estudio un porcentaje similar se observó en el quinto día de cultivo. Cabe señalar que el estudio de las respuestas a 5-HT es el primero realizado en astrocitos del CC o de otra estructura del cerebro de la rata, utilizando la técnica de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa.

Las concentraciones de 5-HT para generar respuestas en células gliales son variadas y al parecer dependen de la técnica empleada. Así, cuando se evalúa el efecto de la 5-HT sobre los cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular, las concentraciones de 5-HT empleadas son de 0.5 a 10 μM (Yoder *et al.*, 1996; Hagberg *et al.*, 1998; Jalonen *et al.*, 1997). Mientras que en estudios electrofisiológicos en donde se miden los cambios de potencial inducidos por 5-HT las concentraciones varían de 1 a 100 μM (Hösli *et al.*, 1987; Walz y Schlue, 1982) o bien de 10 μM para el registro de canal unitario (Jalonen *et al.*, 1997).

En oligodendrocitos en cultivo de la médula espinal de la rata con estudios de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa, las concentraciones fueron de 0.5 a 1 mM (Belachew *et al.*, 1998). Nuestros datos, con esta última técnica, mostraron que la máxima amplitud de la corriente se obtuvo a partir de 300 μM , conservando la misma amplitud hasta 1000 μM , y la concentración necesaria para producir el 50% de la amplitud de la corriente (EC_{50}) fue de 92 μM (dato obtenido en una sola célula, no mostrado), estos datos son similares a los reportados en células gliales de la sanguijuela, en donde la máxima respuesta se observó a partir de 100 μM (Walz y Schlue, 1982).

La EC_{50} sugiere un sitio de baja afinidad para la 5-HT, o bien que la densidad de receptores expresados en la membrana de los astrocitos registrados es baja. Aunque otra posible explicación podría ser que la dificultad para observar las corrientes pequeñas inducidas con 5-HT se deba al límite de detección del sistema, o a la diálisis de segundos mensajeros al perfundir el interior de la célula con la solución de la pipeta (Jalonen *et al.*, 1997).

Potencial de inversión de la respuesta a 5-HT.

El potencial de inversión de la respuesta inducida por 5-HT fue similar al potencial de equilibrio del Cl^- (-5 mV). La posibilidad de que esta corriente fuera de K^+ parece poco probable, debido a los siguientes resultados: 1) El potencial de equilibrio del K^+ ($E_K = -83$ mV) es muy distinto al potencial de inversión de la corriente inducida con 5-HT al variar el potencial de mantenimiento (1.4 ± 1.36 mV). 2) El potencial de inversión de la respuesta a 5-HT es el mismo aún en presencia de TEA. 3) El

potencial de inversión de la respuesta a 5-HT cambió a -37 ± 1 mV cuando se varió la concentración intracelular de Cl^- (de 135 a 40 mM), lo que coincide con el valor calculado para el potencial de equilibrio del Cl^- con la ecuación de Nernst.

En apoyo a esta posibilidad, en las neuronas P (sensibles a la presión mecanosensorial) de la sanguijuela se observó que la 5-HT activa una corriente de Cl^- (Drapeau y Sanchez-Armass 1988). Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos por Walz (1982), en donde la 5-HT hiperpolariza la membrana de las células gliales de la sanguijuela por medio de un incremento en la conductancia de K^+ . También difieren de los resultados obtenidos en astrocitos de la corteza de rata, en donde se encontró que la 5-HT induce corrientes entrantes de K^+ sensibles a apamina y otras sensibles a nifedipina, lo que sugiere la participación de corrientes de K_{Ca} y de Ca^{2+} tipo L (Jalonen et al., 1997).

Un movimiento de KCl podría ser otra opción que reconciliara la participación de K^+ y Cl^- en la respuesta inducida con 5-HT. Esta posibilidad se evaluó utilizando la regla del equilibrio de Donnan y se encontró que el potencial de equilibrio para ambos iones era de -49 mV, distinto al valor experimental. Sin embargo, la resta de las rampas de 5-HT y control sugiere 2 eventos que bien podrían ser la entrada de Cl^- y una reducción en la corriente de K^+ que se observa a potenciales despolarizantes y que corresponde a la K_{DR} . Al respecto, Backus y colaboradores (1991) reportaron que las respuestas inducidas con sustancia P, en astrocitos en cultivo de la corteza cerebral de la rata, producen el cierre de canales de K^+ y la apertura de canales de Cl^- , mecanismo que apoyaría la interpretación de nuestros resultados.

De esta manera, el presente estudio describe por vez primera la corriente de Cl^- , activada por 5-HT en astrocitos u otro tipo de célula glial. Estos resultados son similares a los observados en ovocitos de *Xenopus* inyectados con RNAm del CC de bovino y humano, en donde la 5-HT genera una corriente oscilatoria de Cl^- que es activada por Ca^{2+} , en este mecanismo están implicados segundos mensajeros como el IP_3 y DAG (Matute y Miledi, 1993). Como posibilidad no explorada en

el presente estudio, los astrocitos del CC de la rata podrían poseer un mecanismo en el cual la corriente de Cl^- sea activada por Ca^{2+} .

Efecto dual de la cetanserina

1) *La cetanserina como antagonista.* La mayor parte de la evidencia disponible en astrocitos de mamíferos indica que la 5-HT activa la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos y no la de la adenilato ciclasa (Hansson *et al.*, 1987, 1990; Murphy y Welk, 1990; Ebersolt *et al.*, 1981; Chneiweiss *et al.*, 1984). Más aún, la participación de los receptores 5-HT₂ en dicha hidrólisis es fuertemente apoyada por distintos estudios (Hösli y Hösli, 1987; Hansson *et al.*, 1987, 1990; Nilsson *et al.*, 1991; Deecher *et al.*, 1993; Yoder *et al.*, 1996; Jalonen *et al.*, 1997; Hagberg *et al.*, 1998). Así, aunque la presencia de receptores a 5-HT_{1A} no se descarta del todo (Whitaker-Azmitia y Azmitia, 1989; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1990; Mercado y Hernández, 1992b; Azmitia *et al.*, 1996), no parece existir duda de que los receptores 5-HT₂ participan en la hidrólisis de fosfoinosítidos con una consecuente movilización de Ca^{2+} intracelular (McCarthy y Salm, 1991; Yoder *et al.*, 1996; Jalonen *et al.*, 1997; Hagberg *et al.*, 1998).

En congruencia con estos antecedentes, nuestros datos muestran que casi el total de la corriente inducida por 5-HT es bloqueada por cetanserina, lo que sugiere la participación de receptores 5-HT₂. Esta apreciación se ve reforzada porque en estudios de unión de ligando con cetanserina marcada radiactivamente, los astrocitos en cultivo de distintas regiones del cerebro de la rata (como el área del tálamo-hipotálamo, corteza cerebral, tallo cerebral, colliculus y cerebelo), presentaron una $K_D = 1.2 \text{ nM}$ (Hirst *et al.*, 1998a).

2) *La cetanserina como agonista inverso.* Los antagonistas neutrales o silentes puros (con actividad intrínseca cercana a cero) son raros, actualmente varios caen en la clasificación de agonistas inversos o agonistas parciales. Los agonistas inversos poseen acciones nuevas que se extienden más allá de reducir la actividad efectora o antagonizar la respuesta del agonista; se sabe

que el tratamiento prolongado con agonistas inversos puede incrementar la densidad del receptor y/o aumentar su respuesta (Pauwels, 2000).

Los resultados aquí obtenidos mostraron que además de actuar como antagonista puro, la cetanserina coaplicada con 5-HT es capaz de potenciar la respuesta inducida por la 5-HT sola, comportándose de esta manera como un agonista inverso. Este efecto podría explicarse por la interacción de la 5-HT y la cetanserina con el receptor y el cambio en la estructura tridimensional que en éste se produce (con la 5-HT y con la 5-HT más cetanserina), lo cual afectaría la interacción del receptor con la proteína G y esto en consecuencia repercutir en una mayor amplitud de la respuesta. Sin embargo, aunque por una parte se sabe mucho sobre la estructura tridimensional de las proteínas G (Bourne, 1997), por la otra se sabe muy poco acerca de los cambios conformacionales del receptor al ser activado por su(s) ligando(s). Esta información podría ayudar a explicar las interacciones de los agonistas inversos con el receptor.

Los dos efectos de la cetanserina sugieren que las respuestas podrían estar mediadas por receptores 5-HT₂, pero ¿cuál es la diferencia? y ¿por qué unas células responden de una manera a la aplicación de cetanserina y la otra población lo hace de otra forma? Una explicación sería la existencia de dos posibles isoformas del receptor, y para el caso de los receptores 5-HT₂ esto es muy posible ya que previamente se reportó que la edición de RNAm del 5-HT_{2C} es un proceso que ocurre en el cerebro de la rata y existe una expresión específica de siete isoformas codificadas por 11 especies distintas de RNAm (Burns *et al.*, 1997). La edición del RNAm que codifica para el receptor 5-HT_{2C} puede modificar la secuencia de aminoácidos del receptor, en especial aquellos del segundo dominio intracelular relacionados con el acoplamiento del receptor con sus proteínas G (Burns *et al.*, 1997), lo que llevaría a una reducción o aumento de mecanismos efectores secundarios, como en el caso de la fosfolipasa C y la liberación de calcio intracelular estimulada por agonistas (Niswender *et al.*, 1999; Price y Sanders-Bush, 2000).

Vías de señalización diversas para el 5-HT₂: corrientes de Cl⁻ independientes de Ca²⁺, otros mecanismos

La familia de receptores 5-HT₂ pertenece al grupo de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G e incluye tres subtipos (5-HT_{2A,B,C}) acoplados a la PLC que promueve la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana celular y conlleva a un incremento de IP₃ y DAG (Burns *et al.*, 1997). Estos segundos mensajeros a su vez activan la liberación de Ca²⁺ intracelular y a la proteína cinasa C (PKC). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales el incremento en los niveles de Ca²⁺ difícilmente se produciría ya que la solución de la micropipeta de registro contiene EGTA, a una concentración que mantiene la concentración de Ca²⁺ intracelular en ~11 nM. Bajo estas condiciones, las respuestas que se obtuvieron al aplicar 5-HT serían independientes del Ca²⁺ intracelular y el mecanismo efector podría ser entonces el de la PKC.

Al respecto, la vasopresina (transmisor que también activa receptores de tipo metabotrópico) activa corrientes de Cl⁻ en las células mesangiales del glomérulo por medio de vías dependientes e independientes de Ca²⁺, en la última vía la PKC es capaz de activar una corriente de Cl⁻ en ausencia de Ca²⁺. Sin embargo, el bloqueo de la PKC elimina solo parcialmente la conductancia de Cl⁻ activada por vasopresina, en ausencia de Ca²⁺ y cuando la producción de prostaglandinas es eliminada (Kremer *et al.*, 1992). Lo que sugiere mecanismos adicionales a los dependientes de Ca²⁺ en la activación de la conductancia de Cl⁻ activada por transmisores (Kremer *et al.*, 1992).

En la línea tumoral de células de la fibrosis quística los canales de Cl⁻ son regulados por la fosforilación de la PKA y la PKC, asimismo el ácido araquidónico modula la actividad de estos canales (Anderson y Welsh, 1990). Estos mecanismos podrían presentarse en los astrocitos en cultivo del CC de la rata ya que, al menos para el 5-HT_{2C}, se sabe de otras vías de señalización además de la PLC que incluyen a la vía de la fosfolipasa A₂ – ácido araquidónico y a la fosfolipasa D (Pauwels, 2000).

IV. Acumulación de 5-HT en rebanadas del CC de la rata

Los resultados del presente estudio indican que el CC y nervio óptico de la rata tienen la capacidad de acumular 5-HT, dependiente de Na⁺ y sensible al bloqueo con fluoxetina. En el CC, esta acumulación tiene una constante de Michaelis-Menten (420 ± 84 nM) que es comparable a las constantes del SERT clonado de la rata (530 y 320 nM; Blakely *et al.*, 1991; Hoffmann *et al.*, 1991) y de los astrocitos en cultivo (380 y 400 nM; Katz y Kimelberg, 1985; Hirst *et al.*, 1998b). La velocidad máxima de acumulación de 5-HT fue de 9.54 ± 0.78 pmol/mg proteína/min, mientras que estructuras del cerebro de la rata consideradas serotoninérgicas, como el estriado y el hipotálamo presentaron una V_{max} más alta (11.2 y 14.0 pmol/mg proteína/min) (Shaskan y Snyder, 1970). En contraste, los cultivos de astrocitos de la rata tienen una V_{max} de solamente 0.88 y 1.6 pmol/mg proteína/min (Katz y Kimelberg, 1985; Hirst *et al.*, 1998b), lo que probablemente refleja una baja capacidad de acumulación de 5-HT en estas células.

Acumulación de 5-HT en la sustancia blanca

El CC y el nervio óptico de la rata adulta tuvieron una velocidad en la acumulación de 5-HT dependiente de Na⁺ que fue menor que la del hipotálamo. Asimismo, se encontraron diferencias en la inhibición con fluoxetina para las regiones cerebrales estudiadas. Cabe resaltar que pocos estudios han mostrado inhibición completa de la acumulación de 5-HT dependiente de Na⁺ con fluoxetina (Katz y Kimelberg, 1985; Blakely *et al.*, 1991). Otros estudios mostraron una inhibición sobre la acumulación de 5-HT con fluoxetina similar a la que se observó para el nervio óptico (83%, aunque en algunos experimentos la inhibición fue total) (Chen *et al.*, 1998; Hirst *et al.*, 1998b; Inazu *et al.*, 2001). Por otra parte, la acumulación de 5-HT fue inhibida parcialmente (30-50%) con fluoxetina. Estas diferencias podrían ser el resultado de algunas variantes de "splicing" alternativo del SERT de la rata que pudieran ser expresadas de modo diferencial, dependiendo del tejido (Ozsarac *et al.*, 2002). Más aún, en pacientes con depresión, la existencia de variantes en los alelos de los cromosomas podrían

afectar la eficacia de los antidepresivos que pertenecen a los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (Lesch *et al.*, 1996; Pollock *et al.*, 2000; Eichhammer *et al.*, 2003).

Efecto del pH sobre la acumulación de 5-HT

Los resultados mostraron que la acumulación de 5-HT se redujó 60% cuando el pH fue de 5, comparado con la acumulación observada a pH 7. Esto es consistente con estudios hechos en ovocitos inyectados con el RNAm de SERT, en los cuales un pH ácido reduce la acumulación de 5-HT al tiempo que aumenta la corriente asociada al transportador (Cao *et al.*, 1997). Una posibilidad para explicar esta inhibición es que los iones H⁺ interaccionen con el mismo sitio que la 5-HT, lo que generaría la corriente asociada al SERT de rata que podría deberse al flujo de protones (Cao *et al.*, 1997).

Efecto de algunos inhibidores de la recaptura de monoaminas sobre la acumulación de 5-HT

La IC₅₀ de la fluoxetina en la inhibición de la acumulación de 5-HT en el CC fue de 100 nM (pIC₅₀ = 7.0), valor similar al reportado para sinaptosomas (7.4) y cultivos de astrocitos (7.2) de la corteza cerebral de la rata, mientras que la constante de afinidad, K_i, en el CC fue de 44.7 ± 10 nM, en el intervalo de 27-60 nM, que está dentro del rango reportado para sinaptosomas, cultivos de astrocitos y el SERT de la rata (Wong *et al.*, 1975; Hoffman *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1993; Hirst *et al.*, 1998b; Inazu *et al.*, 2001). Sin embargo, la fluoxetina bloqueó de manera parcial la acumulación de 5-HT en el CC. La acumulación de 5-HT que no fue bloqueada por fluoxetina tampoco fue reducida por la aplicación de otros inhibidores de la recaptura de monoaminas. Esta inhibición parcial de la acumulación de 5-HT también se reportó en sinaptosomas de la corteza y el cerebelo, rebanadas del hipocampo y cultivos primarios de astrocitos (Wong *et al.*, 1975; Azmitia y Marovitz, 1980; Dave y Kimelberg, 1994; Bel *et al.*, 1997), lo que apoya la presencia de una acumulación de 5-HT insensible al bloqueo por fluoxetina en el sistema nervioso central de la rata. La imipramina y la clomipramina,

que inhiben tanto a SERT como a NET, no redujeron en un mayor porcentaje que la fluoxetina la acumulación de 5-HT, lo que sugería que la acumulación de 5-HT no es mediada por NET.

Efecto de la DA y la NE sobre la acumulación de 5-HT insensible al bloqueo con fluoxetina

Una parte substancial de la acumulación de 5-HT podría ocurrir a través de transportadores de monoaminas distintos de SERT, cuando éste no se encuentra funcionalmente activo para remover la 5-HT extracelular (Kimelberg y Pelton, 1983; Suarez-Rocca y Cubeddu, 2002; Zhou *et al.*, 2002). Sin embargo, en el CC de la rata, la acumulación de 5-HT a través de DAT o NET puede descartarse debido a que la acumulación de 5-HT insensible al bloqueo con fluoxetina no se reduce en presencia de altas concentraciones de DA y NE (10 μ M). Estas concentraciones fueron saturantes ya que la K_m para DAT es de 560 nM (Prasad y Amara, 2001) y la de NET es de 100-400 nM (Ramamoorthy *et al.*, 1993; Galli *et al.*, 1995). Así que, al menos en el CC, la acumulación de 5-HT es selectiva y altamente específica para 5-HT, y no parece ser mediada por DAT o NET.

El SERT y el CC

El CC es algunas veces considerado como un tracto de fibras que aparentemente carece de SERT (Oleskevich y Descarries, 1990; Zhou *et al.*, 1998). En el cerebro del humano, la mayor densidad de sitios de unión de [3 H]-imipramina se encuentra en el hipotálamo y la sustancia nigra, mientras que la menor densidad de sitios se encontró en el cerebelo y la sustancia blanca (Langer *et al.*, 1981). En el cerebro de la rata, el [3 H]-citalopram (inhibidor de la acumulación de 5-HT) se une específicamente a fibras serotoninérgicas en distintas regiones cerebrales como el hipocampo, estriado y el tálamo, pero dicha unión está prácticamente ausente en el CC y la cápsula interna (Zhou *et al.*, 1998). Sin embargo, el mismo estudio mostró fibras positivas al inmunomarcaje de SERT en el CC, aunque con menor abundancia que aquellas en el hipocampo. Por otro lado, mediciones de remoción de 5-HT en el giro dentado y el CC sugieren que este proceso depende de la cantidad de transportadores presente (Daws *et al.*, 1997). De manera similar, el hecho de que la acumulación de

5-HT en el CC y el nervio óptico fuera más baja que en el hipotálamo probablemente refleje una cantidad menor de transportadores.

Más aún, varios datos apuntan a la existencia de actividad serotoninérgica en el CC: 1) la presencia de la MAO en el CC del cerdo (Tipton y Dawson, 1968), 2) inmunoreactividad de 5-HT en fibras axonales del CC (Bufa *et al.*, 1980), 3) las respuestas de 5-HT en ovocitos inyectados con RNAm del CC del bovino y del humano y en rebanadas del CC del ratón (Matute y Miledi, 1993; Bernstein *et al.*, 1996), 4) la presencia de receptores 5-HT_{2A} en los astrocitos del CC de la rata (Xu y Pandey, 2000), y 5) la acumulación de antidepresivos en el CC (Daniel *et al.*, 2001). Así que los datos de acumulación de 5-HT en el CC suman evidencia a la actividad serotoninérgica. Asimismo, la interacción de antidepresivos en el CC debe tenerse en mente cuando se considera la fisiopatología y tratamiento de algunos desórdenes mentales.

V. Acumulación y liberación de 5-HT en el CC

Los datos de acumulación y liberación de 5-HT en las rebanadas del CC aunado a las respuestas a 5-HT en los astrocitos en cultivo sugieren fuertemente que la transmisión serotoninérgica ocurre en el CC.

Esta transmisión podría no ser sináptica en etapas tempranas del desarrollo, ya que su liberación no es estimulada por K⁺ y en consecuencia no se observa dependencia de Ca²⁺. Sin embargo, una acumulación de 5-HT mayor en P6 que en el adulto sugiere que los niveles de 5-HT en el CC son mayores durante el desarrollo y que la 5-HT podría provenir del torrente sanguíneo (Vitalis y Pamavelas, 2003), produciendo un efecto parácrino con una acción de tipo mitótico que sucedería vía los receptores 5-HT₂.

Con relación a esta hipótesis la transfección del receptor 5-HT₂ en las células NIH3T3 resultó en la estimulación mitogénica de las mismas (Julius *et al.*, 1990, Kahan *et al.*, 1992), mientras que Seuwen y colaboradores (1988) mostraron que este efecto es mediado por la 5-HT sobre la acción mitogénica del factor de crecimiento para fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico o la insulina.

Además, al parecer existe una relación directa entre el nivel de 5-HT y el crecimiento del linfoma de Dalton en el ratón (Banik *et al.*, 1994).

Ciertamente, la expresión de 5-HT₂ parece presentarse en los primeros días postnatales y en el CC este suceso es congruente con el hecho de que durante las primeras 2 semanas postnatales se presenta una proliferación celular de glioblastos y cambios en la morfología celular (Sturrock, 1976; Azmitia, 2001). Posteriormente, estos glioblastos comienzan a diferenciarse en astrocitos y oligodendrocitos. Al respecto, el 5HT_{1A} ha sido relacionado con eventos en los que promueve la diferenciación celular, y aunque aparece en etapas tempranas del desarrollo no es funcional hasta el día posnatal 14 ó 15 (Zifa *et al.*, 1988; Azmitia, 2001). En el presente estudio no se registraron respuestas a 8-OH-DPAT, agonista de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇, aunque un 6% de las respuestas correspondieron a corrientes salientes que no fueron caracterizadas y podrían corresponder a estos receptores.

Otra función potencial de la 5-HT durante el desarrollo del CC podría ser la de participar en la migración de algunas células gliales progenitoras, desde la zona subventricular al hemisferio cerebral contralateral (Kakita *et al.*, 2003), así como en el crecimiento de los conos axonales actuando como un factor quimiotrófico (Mercado y Hernández, 1992a, 1998). Al respecto se ha determinado que la 5-HT participa en eventos de migración e invasión celular en gliomas *in vitro* (Merzak *et al.*, 1996).

Ahora bien, en el adulto nuestros datos muestran que la liberación de 5-HT es dependiente de Ca²⁺, lo que sugiere una liberación vesicular en el CC. Sin embargo, ¿de dónde es liberada esta 5-HT? ¿de las varicosidades de los axones o de la glía?. Un estudio inmunohistoquímico de la 5-HT en la rata mostró que las fibras axonales presentan inmunoreactividad contra la 5-HT (Buffa *et al.*, 1980), pero no se puede descartar que las células gliales liberen esta monoamina de manera vesicular como lo hacen para el glutamato y ATP (Jeftinijaa *et al.*, 1997; Bal-Price *et al.*, 2002; Coco *et al.*, 2003). Futuros estudios con técnicas inmunohistoquímicas y bioquímicas, entre otras, podrán ayudar a dilucidar este paradigma.

CONCLUSIONES.

1. Los medios de cultivo y los factores tróficos del suero o presentes en el NB-G5 alteran la morfología de los astrocitos pero no modifican la expresión ni las propiedades de las corrientes de K^+ .
2. Los astrocitos del CC de la rata expresan las corrientes K_{DR} y K_A .
3. Existen dos poblaciones de astrocitos: a) la corriente de K^+ que presenta alta afinidad al bloqueo por Ba^{2+} y b) la corriente de K^+ que presenta una baja afinidad al bloqueo por Ba^{2+} .
4. La 5-HT induce dos tipos de respuestas en los astrocitos: una corriente entrante de Cl^- y un bloqueo de la corriente saliente de K^+ activada por voltajes despolarizantes.
5. Los receptores 5-HT₂ probablemente sean los que participan en la acción de la 5-HT sobre la membrana de los astrocitos.
6. La cetanserina genera efectos opuestos: a) en algunos astrocitos bloquea la respuesta a 5-HT y b) potencia la respuesta a 5-HT en otros, lo que sugiere la presencia de dos mecanismos de acción de la cetanserina.
7. El CC de la rata posee un mecanismo de acumulación de 5-HT que es dependiente de Na^+ y sensible al bloqueo por algunos antidepresivos como el Prozac.
8. El CC de la rata acumula más 5-HT durante el desarrollo posnatal que en el estadio adulto.
9. El CC de la rata adulta es capaz de liberar 5-HT por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} .
10. El CC de la rata P6, aunque acumula mayor cantidad de 5-HT, no es capaz de liberarla de una manera dependiente de Ca^{2+} . La 5-HT entonces podría provenir de fuentes externas como el torrente sanguíneo y actuar como hormona (efecto parácrino).

Toda la información presentada en este estudio nos permite construir el siguiente modelo (Figura 31). El recuadro muestra un corte histológico transversal del CC en el que se aprecia la organización lineal de los núcleos celulares, que presumiblemente corresponden a las células gliales que presentan este alineamiento pues están muy cercanas a los axones (la mayoría son oligodendrocitos que producen la mielina que recubre a los axones). A la derecha del corte histológico se presenta una caricatura, la cual es ampliada y se ilustran los elementos de la transmisión serotoninérgica.

La 5-HT es liberada al espacio extracelular por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} , presumiblemente de los axones aunque no se descarta la participación glial, para así activar los receptores de los astrocitos, provocando una entrada moderada de Cl^- , así como una reducción en la salida de K^+ del astrocito cuando este es despolarizado. Este mecanismo podría ayudar tanto a modular la propagación de los estímulos nerviosos a través de los axones, elementos que constituyen las fibras nerviosas del CC (Swanson *et al.*, 1998), como a modular el tono vascular a través del astrocito (Zonta *et al.*, 2003) por medio de la movilización de K^+ (McCarron y Halpern, 1990). Una vez activados los receptores a 5-HT, esta monoamina es removida del espacio extracelular por los transportadores de 5-HT. El Zn^{2+} modula también este proceso incrementando la recaptura del transmisor y en caso de coincidir con algún antidepresivo revierte su efecto inhibitorio sobre el transportador (García-Godoy, 2002).

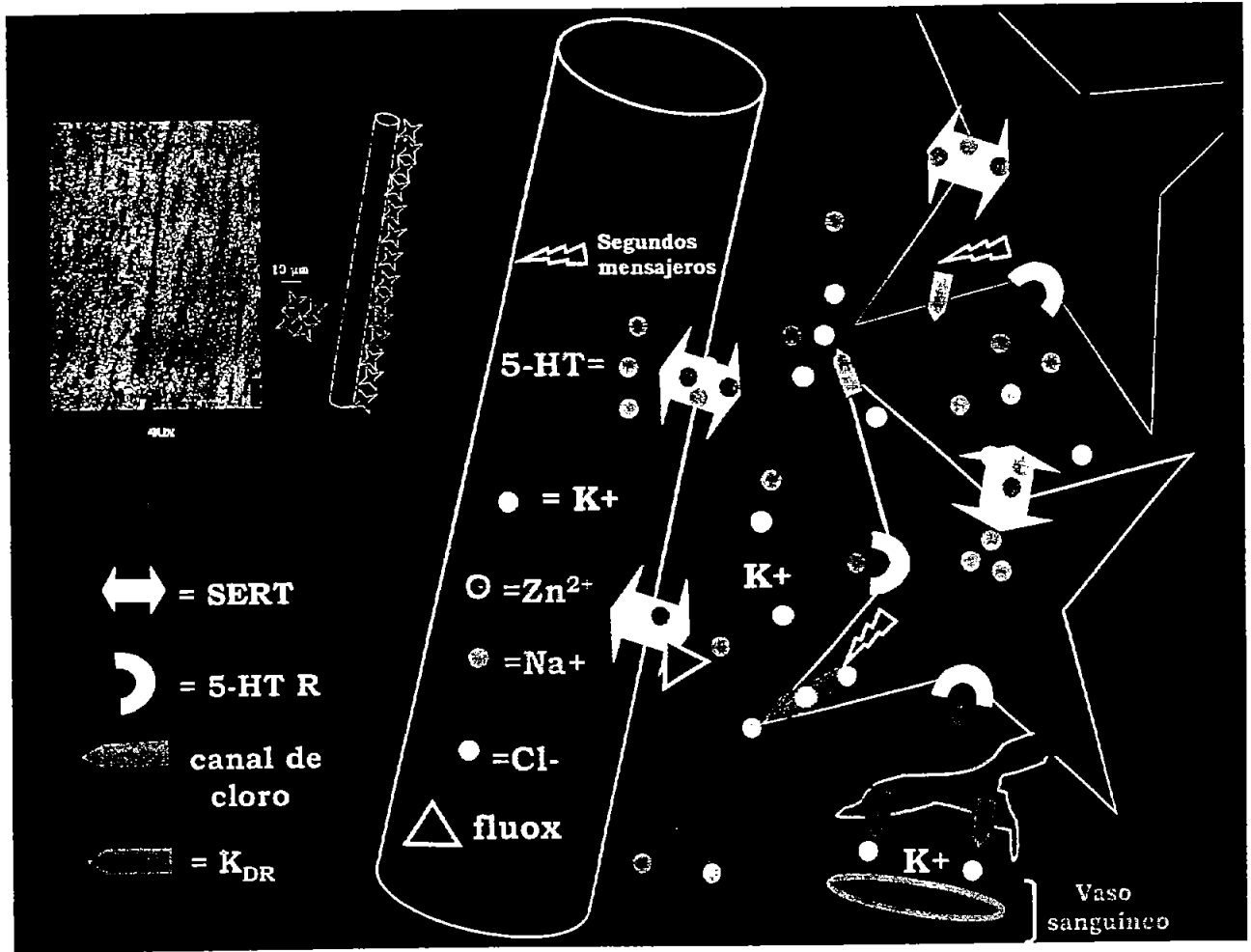


Figura 31. Modelo de transmisión serotoninérgica en el CC de la rata. El recuadro muestra un corte histológico del CC de la rata en el que se muestra la alineación de los núcleos, que presumiblemente corresponden a células gliales cercanas a los axones. La caricatura del recuadro se amplificó para añadir todos los elementos descritos en el presente estudio: 5-HT, su liberación, activación de receptores gliales y remoción del espacio extracelular.

BIBLIOGRAFIA

- Aboitiz F, Scheibel AB, Fisher RS, Zaidel E. 1992a. Fiber composition of the human corpus callosum. *Brain Res* 598:143-153.
- Aboitiz F, Scheibel AB, Fisher RS, Zaidel E. 1992b. Individual differences in brain asymmetries and fiber composition in the human corpus callosum. *Brain Res* 598:154-161.
- Aboitiz F, Montiel J. 2003. One hundred million years of interhemispheric communication: the history of the corpus callosum. *Braz J Med Biol Res* 36:411-419.
- Adell A, Sarna GS, Hutson PH, Curzon G. 1989. An in vivo dialysis and behavioural study of the release of 5-HT by p-chloroamphetamine in reserpine-treated rats. *Br J Pharmacol*. 97:206-212.
- Adell A, Celada P, Abellán MT, Artigas F. 2002. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Rev* 39:154-180.
- Almers W, Stanfield PR, Stuhmer W. 1983. Lateral distribution of sodium and potassium channels in frog skeletal muscle: measurements with a patch-clamp technique. *J Physiol* 336:261-284.
- Anderson MP, Welsh MJ. 1990. Fatty acids inhibit apical membrane chloride channels in airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7334-7338.
- Anderson S, Brismar T, Hansson E. 1995. Effect of external K^+ , Ca^{2+} , and Ba^{2+} , on membrane potential and ionic conductance in rat astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 15:439-450.
- Armstrong CM, Taylor SR. 1980. Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys J* 30:473-488.
- Azmitia EC, Marovitz WF. 1980. In vitro hippocampal uptake of tritiated serotonin (3H -5-HT): a morphological, biochemical, and pharmacological approach to specificity. *J Histochem Cytochem* 28:636-644.
- Azmitia EC, Gannon PJ, Kcheck NM, Withaker-Azmitia PM. 1996. Cellular localization of the 5HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacol* 14:35-46.

- Azmitia EC. 2001. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. *Brain Res Bull* 56:413-424.
- Backus KH, Berger T, Kettenmann H. 1991. Activation of neurokinin receptors modulates K⁺ and Cl⁻ channel activity in cultured astrocytes from rat cortex. *Brain Res* 541:103-109.
- Bagdy E, Harsing LG Jr. 1995. The role of various calcium and potassium channels in the regulation of somatodendritic serotonin release. *Neurochem Res* 20:1409-1415.
- Bal-Price A, Moneer Z, Brown GC. 2002. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia* 40:312-323.
- Baldwin TJ, Tsaur ML, Lopez GA, Jan YN, Jan LY. 1991. Characterization of a mammalian cDNA for inactivating voltage-sensitive K⁺ channel. *Neuron* 7:471-483.
- Banik S, Ray MR, Choudhury S, Lahiri T. 1994. Increase in the concentrations of brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid during growth of a transplanted murine lymphoma. *Neoplasma* 41:9-11.
- Barkovich AJ, Kjos BO. 1988. Normal postnatal development of the corpus callosum as demonstrated by MR imaging. *Am J Neurorad* 9:487-491.
- Barnes NM, Sharp T. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol* 38:1083-1152.
- Barres BA, Chun LL, Corey DP. 1988. Ion channel expression by white matter glia: I. Type 2 astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 1:10-30.
- Barres BA, Koroshetz WJ, Chun LL, Corey DP. 1990. Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. *Neuron* 5:527-544.
- Baumgardner TL, Singer HS, Denckla MB, Rubin MA, Abrams MT, Colli MJ, Reiss AL. 1996. Corpus callosum morphology in children with Tourette syndrome and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurology* 47:477-482.
- Bel N, Figueras G, Vilaró MT, Suñol C, Artigas F. 1997. Antidepressant Drugs inhibit a glial 5-Hydroxytryptamine transporter in rat brain. *Eur J Neurosci* 9:1728-1738.

Belachew S, Malgrange B, Rigo JM, Rogister B, Coucke P, Mazy-Servais C, Moonen G. 1998. Developmental regulation of neuroligand-induced responses in cultured oligodendroglia. *Neuroreport* 9:973-980.

Berger T, Schnitzer J, Kettenmann H. 1991. Developmental changes in the membrane current pattern, K⁺ buffer capacity, and morphology of glial cells in the corpus callosum slice. *J Neurosci* 11:3008-3024.

Berger T, Walz W, Schnitzer J, Kettenmann H. 1992. GABA and glutamate activated currents in glial cells of the mouse corpus callosum slice. *J Neurosci Res* 31:21-27.

Bernstein M, Lyons SA, Möller T, Kettenmann H. 1996. Receptor-mediated calcium signalling in glial cells from mouse corpus callosum slices. *J Neurosci Res* 46:152-163.

Bevan S, Raff M. 1985. Voltage-dependent potassium currents in cultured astrocytes. *Nature* 315:229-232.

Bevan S, Grampp W, Miledi R. 1973a. The suppression of transmitter release from Schwann cells by actinomycin D. *Acta physiol Scand* 87:46A-47A.

Bevan S, Grampp W, Miledi R. 1973b. Further observations on Schwann cell m.e.p.p.s. *J Physiol* 232:88-89.

Bignami A., Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. 1972. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43:429-435.

Birks R, Katz B, Miledi R. 1960. Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration. *J Physiol* 150:145-168

Blakely RD, Berson HE, Fremeau RT, Caron MJ, Pekk MM, Prince HK, Bradley CC. 1991. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* 354:66-70.

Blakely RD. 2001. Physiological genomics of antidepressant targets: keeping the periphery in mind. *J Neurosci* 21:8319-8323.

Bogen JE, Fisher ED, Vogel PJ. 1965. Cerebral commissurotomy. A second case report. *JAMA* 194:1328-1329.

- Bordey A, Sontheimer H. 1997. Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes *in situ*. *J Neurophysiol* 78:461-477.
- Bordey A, Sontheimer H. 1999. Differential inhibition of glial K⁺ currents by 4-AP. *J Neurophysiol* 82:3476-3487.
- Bordey A, Sontheimer H. 2000. Ion channel expression by astrocytes *in situ*: comparison of different CNS regions. *Glia* 30:27-38.
- Bourne HR. 1997. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9:134-142.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bruns D, Riedel D, Klingauf J, Jahn R. 2000. Quantal release of serotonin. *Neuron* 28:205-220.
- Buffa R, Crivelli O, Lavarini C, Sessa F, Verme G, Solcia E. 1980. Immunohistochemistry of Brain 5-Hydroxytryptamine. *Histochem* 68:9-15.
- Bunin MA, Wightman. 1998. Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (5-HT) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *J Neurosci* 18:4854-4860.
- Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, Emeson RB. 1997. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* 387:303-308.
- Burt AM. Textbook of Neuroanatomy. 1993. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 541p.
- Cao Y, Mager S, Lester HA. 1997. H⁺ permeation and pH regulation at a mammalian serotonin transporter. *J Neurosci* 17:2257-2266.
- Cao Y, Li M, Mager S, Lester HA. 1998. Amino acid residues that control pH modulation of transport-associated current in mammalian serotonin transporters. *J Neurosci* 18:7739-7749.
- Carlson M, Earls F, Todd RD. 1988. The importance of regressive changes in the development of the nervous system: towards a neurobiological theory of child development. *Psych Dev* 1:1-22.
- Carson MJ, Thomas EA, Danielson PE, Sutcliffe JG. 1996. The 5-HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation of reactive astrocytes. *Glia* 17:317-326.

Clark RB, Perkins JP. 1971. Regulation of adenosine 3' :5' cyclic monophosphate concentration in cultured human astrocytoma cells by catecholamines and histamine. *Proc Natl Acad Sci USA*; 68:2757-2760.

Chazal G, Ralston HJ 3rd. 1987. Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: an ultrastructural analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminals. *J Comp Neurol*, 259:317-329.

Chen JX, Pan H, Rothman TP, Wade PR, Gershon MD. 1998. Guinea pig 5-HT transporter: cloning, expression, distribution, and function in intestinal sensory reception. *Am J Physiol* 275:G433-G448.

Chen Y, Peng L, Zhang X, Stelzenburg W, Hertz L. 1995. Further evidence that fluoxetine interacts with a 5-HT_{2C} receptor in glial cells. *Brain Res Bull* 38:153-159.

Cheng CHK, Costall B, Naylor RJ, Rudd JA. 1993. The effect of 5-HT receptor ligands on the uptake of (³H)5-hydroxytryptamine into rat cortical synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 239:211-214.

Cheng Y, Prussof WH. 1973. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-3108.

Chiu SY, Kriegler S. 1994. Neurotransmitter mediated signaling between axons and glial cells. *Glia* 11:191-200.

Chiu SY, Wilson GF. 1989. The role of potassium channels in Schwann cell proliferation in Wallerian degeneration of explant rabbit sciatic nerves. *J Physiol* 408:199-222.

Chneiweiss H, Prochiantz A, Glowinski J, Premont J. 1984. Biogenic amine-sensitive adenylate cyclases in primary culture of neuronal or glial cells from mesencephalon. *Brain Res* 302:363-370.

Chvatal A, Berger T, Vorisek I, Orkand RK, Kettenmann H, Sykova E. 1997. Changes in glial K⁺ currents with decreased extracellular volume in developing rat white matter. *J Neurosci Res* 49:98-106.

- Coco S, CalegariDagger F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C. 2003. Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture. *J Biol Chem* 278:1354-1362.
- Connor JA, Stevens CF. 1971. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J Physiol* 213:21-30.
- Corey JL, Quick MW, Davidson N, Lester HA, Guastella J. 1994. A cocaine-sensitive *Drosophila* serotonin transporter: cloning, expression, and electrophysiological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1188-1192.
- Daniel WA, Wojcikowski J, Palucha A. 2001. Intracellular distribution of psychotropic drugs in the grey and white matter of the brain: the role of lysosomal trapping. *British J Pharmacol* 134:807-814.
- Dave V, Kimelberg HK. 1994. Na⁺ dependent, fluoxetine-sensitive serotonin uptake by astrocytes tissue-printed from rat cerebral cortex. *J Neurosci* 14:4972-4986.
- Daws LC, Toney GM, Davis DJ, Gerhardt GA, Frazer A. 1997. *In vivo* chronoamperometric measurements of the clearance of exogenously applied serotonin in the rat dentate gyrus. *J Neurosci Meth* 78:139-150.
- Deecher DC, Wilcox BD, Dave V, Rossman PA, Kimelberg HK. 1993. Detection of 5-hydroxytryptamine 2 receptors by radioligand binding, northern blot analysis, and Ca²⁺ responses in rat primary astrocyte cultures. *J Neurosci Res* 35:246-256.
- Delgado JM y colaboradores. 2000. Manual de Neurociencia. Ed Síntesis, Madrid. 1015 p.
- Dennis MJ, Miledi R. 1974. Electrically induced release of acetylcholine from denervated Schwann cells. *J Physiol* 237:431-452.
- DeQuardo JR, Bookstein FL, Green WD, Brunberg JA, Tandon R. 1996. Spatial relationships of neuroanatomic landmarks in schizophrenia. *Psychiatry Res* 67:81-95.
- Drapeau P, Sanchez-Armass S. 1988. Selection of postsynaptic serotonin receptors during reinnervation of an identified leech neuron in culture. *J Neurosci* 8:4718-4727.

Duara R, Kushch A, Gross-Glenn K, Barker WW, Jallad B, Pascal S, Loewenstein DA, Sheldon J, Rabin M, Levin B, et al. 1991. Neuroanatomic differences between dyslexic and normal readers on magnetic resonance imaging scans. *Arch Neurol* 48:410-416.

Eaton DC, Brodwick MS. 1980. Effects of barium on the potassium conductance of squid axon. *J Gen Physiol* 75:727-750.

Ebersolt C, Perez M, Bockaert J. 1981. Neuronal, glial and meningeal localizations of neurotransmitter-sensitive adenylate cyclases in cerebral cortex of mice. *Brain Res* 213:139-150.

Eichhammer P, Langguth B, Wiegand R, Kharraz A, Frick U, Hajak G. 2003. Allelic variation in the serotonin transporter promoter affects neuromodulatory effects of a selective serotonin transporter reuptake inhibitor (SSRI). *Psychopharmacology* 166:294-297.

Elekes K. 1991. Serotonin-immunoreactive varicosities in the cell body region and neural sheath of the snail, *Helix pomatia*, ganglia: an electron microscopic immunocytochemical study. *Neuroscience* 42:583-591.

Feng JZ, Brugge JF. 1983. Postnatal development of auditory callosal connections in the kitten. *J Comp Neurol*, 214:416-426.

Ferre S, Cortes R, Artigas F. 1994. Dopaminergic regulation of the serotonergic raphe-striatal pathway: microdialysis studies in freely moving rats. *J Neurosci* 14:4839-4846.

Fogarty DJ, Matute C. 2001. Angiotensin receptor-like immunoreactivity in adult brain white matter astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 35:131-146.

Fuller RW. 1991. Role of serotonin in therapy of depression and related disorders. *J Clin Psychiatry* 52 Suppl:52-57.

Gadea A, López E, López-Colomé AM. 1999. Characterization of glycine transport in cultured Müller glial cells from the retina. *Glia* 26:273-279

Galli A, DeFelice LJ, Duke BJ, Moore KR, Blakely RD. 1995. Sodium-dependent norepinephrine-induced currents in norepinephrine-transporter-transfected HEK-293 cells blocked by cocaine and antidepressants. *J Exp Biol* 198:2197-2212.

García-Godoy U. 2002. Efecto del zinc sobre la recaptura de serotonina en el cuerpo caloso de la rata. Tesis de licenciatura, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro.

Georgy BA, Hesselink JR, Jernigan TL. 1993. MR imaging of the corpus callosum. *Am J Radiol* 160:949-955.

Gibson K, Bordey A. 2002. Analysis of the K⁺ current profile of mature rat oligodendrocytes *in situ*. *J Membrane Biol* 189:201-212.

Giedd JN, Castellanos FX, Casey BJ, Kozuch P, King AC, Hamburger SD, Rapoport JL. 1994. Quantitative morphology of the corpus callosum in attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 151:665-669.

Goncalvez-Ferreira T, Sousa-Guarda C, Oliveira-Monteiro JP, Carmo-Fonseca MJ, Filipe-Saraiva P, Goulão-Constâncio. 2003. Agenesia del cuerpo caloso. *Rev Neurol* 36:701-706.

Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Kamilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG. 1994. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45:1227-1234.

Hagberg GB, Blomstrand F, Nilsson M, Tamir H, Hansson E. 1998. Stimulation of 5-HT_{2A} receptors on astrocytes in primary culture opens voltage-independent Ca²⁺ channels. *Neurochem Int* 32:153-162.

Hagiwara S, Miyazaki S, Moody W, Patlak J. 1978. Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg. *J Physiol* 279:167-185.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.

Hansson E, Simonsson P, Alling C. 1987. 5-Hydroxytryptamine stimulates the formation of inositol phosphate in astrocytes from different regions of the brain. *Neuropharmacol* 26:1377-1382.

Hansson E, Simonsson P, Alling C. 1990. Interactions between cyclic AMP and inositol phosphate transduction systems in astrocytes in primary culture. *Neuropharmacol* 29:591-598.

Hery F, Faudon M, Ternaux JP. 1982. In vivo release of serotonin in two raphe nuclei (raphe dorsalis and magnus) of the cat. *Brain Res Bull.* 8:123-129.

Hille B. 1967. The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J Gen Physiol.* 50:1287-1302.

Hille B. 1984. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, MA: Sinauer.

Hirst WD, Cheung NY, Rattray M, Price GW, Wilkin GP. 1998a. Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Mol Brain Res* 61:90-99.

Hirst WD, Price GW, Rattray M, Wilkin GP. 1998b. Serotonin transporters in adult rat brain astrocytes revealed by [³H]5-HT-uptake into glial plasmalemmal vesicles. *Neurochem Int* 33:11-22.

Hodgkin AL, Huxley AF. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544.

Hofmann E, Becker T, Meixensberger J, Jackel M, Schneider M, Reichmann H. 1995. Disturbances of cerebrospinal fluid (CSF) circulation—neuropsychiatric symptoms and neuroradiological contribution. *J Neural Transm Gen Sect* 99:79-88.

Hoffman BJ, Mezey E, Browntein MJ. 1991. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* 254:579-580.

Horio Y. 2001. Potassium channels of glial cells: distribution and function. *Jpn J Pharmacol* 87:1-6.

Hösli L, Hösli E. 1987. Receptors for dopamine and serotonin on astrocytes of cultured rat central nervous system. *J Physiol* 82:191-195.

Hösli L, Hösli E, Baggi M, Bassetti C, Uhr M. 1987. Action of dopamine and serotonin on the membrane potential of cultured astrocytes. *Exp Brain Res* 65:482-485.

Huttenlocher PR (1990) Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia*, 28: 517-527.

Hynd GW, Hall J, Novey ES, Eliopoulos D, Black K, Gonzalez JJ, Edmonds JE, Riccio C, Cohen M. 1995. Dyslexia and corpus callosum morphology. *Arch Neurol* 52:32-38.

Inazu M, Takeda H, Ikoshi H, Sugisawa M, Uchida Y, Matsumiya T. 2001. Pharmacological characterization and visualization of the glial serotonin transporter. *Neurochem Int* 39:39-49.

Innocenti GM. 1994. Some new trends in the study of the corpus callosum. *Behav Brain Res* 64:1-8.

Ito Y, Miledi R. 1977. The effect of calcium-ionophores on acetylcholine release from Schwann cells. *Proc R Soc Lond* 196:51-58.

Ivy GO, Killackey H. 1981. The ontogeny of the distribution of callosal projection neurons in rat parietal cortex. *Comparative Neurology* 195:367-389.

Janowsky JS, Kaye JA, Carper RA. 1996. Atrophy of the corpus callosum in Alzheimer's disease versus healthy aging. *J Am Geriatr Soc* 44:798-803.

Jalonen TO, Margraf RR, Wielt DB, Charniga CJ, Linne ML, Kimelberg HK. 1997. Serotonin induces inward potassium and calcium currents in rat cortical astrocytes. *Brain Res* 758:69-82.

Jeftinijaa SD, Jeftinijaa KV, Stefanovicb G. 1997. Cultured astrocytes express proteins involved in vesicular glutamate release. *Brain Res* 750:41-47.

Jeng JM. 2002. Ricardo Miledi and the calcium hypothesis of neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci* 3:71-76.

Johnson, TD, Marrelli SP, Steenberg ML, Childres WF, Bryan RM, Jr. 1998. Inward rectifier potassium channels in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 274:R541-R547

Julius D, MacDermott AB, Axel R, Jessell TM. 1988. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* 241:558-564.

Julius D, Huang KN, Livelli TJ, Axel R, Jessell TM. 1990. The 5HT₂ receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:928-932.

Kahan C, Julius D, Pouyssegur J, Seuwen K. 1992. Effects of 5-HT_{1C}-receptor expression on cell proliferation control in hamster fibroblasts: serotonin fails to induce a transformed phenotype. *Exp Cell Res* 200:523-527.

Kakita A, Zerlin M, Takahashi H, Goldman JE. 2003. Some glial progenitors in the neonatal subventricular zone migrate through the corpus callosum to the contralateral cerebral hemisphere. *J Comp Neurol* 458:381-388.

Kapadia SE, de Lanerolle NC, LaMotte CC. 1985. Immunocytochemical and electron microscopic study of serotonin neuronal organization in the dorsal raphe nucleus of the monkey. *Neuroscience* 15:729-746.

Katz. 1949. Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 2:285-299.

Katz B, Miledi R. 1973. The binding of acetylcholine to receptors and its removal from the synaptic cleft. *J Physiol* 231:549-573.

Katz DM, Kimelberg HK. 1985. Kinetics and autoradiography of high affinity uptake of serotonin by primary astrocyte cultures. *J Neurosci* 3:1901-1908.

Kettenmann H, Ransom BR. *Neuroglia*. 1995. Ed. Oxford University Press, New York. 1079p.

Kuhn DM, Wolf WA, Youdim MB. 1985. 5-Hydroxytryptamine release in vivo from a cytoplasmic pool: studies on the 5-HT behavioural syndrome in reserpinized rats. *Br J Pharmacol*. 84:121-129.

Kier EL, Truwit CL. 1996. The normal and abnormal genu of the corpus callosum: an evolutionary, embryologic, anatomic and MR analysis. *Am J Neurorad* 17:1631-1641.

Kimelberg HK, Pelton EW. 1983. High-affinity uptake of (³H) norepinephrine by primary astrocyte cultures and its inhibition by tricyclic antidepressants. *J Neurochem* 40:1265-1270.

Kirsch GE, Drewe JA. 1993. Gating-dependent mechanism of 4-aminopyridine block in two related potassium channels. *J Gen Physiol* 102:797-816.

Knot HJ, Zimmermann PA, Nelson MT. 1996. Extracellular K⁺-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁺ channels. *J Physiol* 492:419-430.

Korngreen A, Sakmann B. 2000. Voltage-gated K⁺ channels in layer 5 neocortical pyramidal neurons from young rats: subtypes and gradients. *J Physiol* 525:621-639.

Kremer SG, Zeng W, Sridhara S, Skorecki KL. 1992. Multiple signaling pathways for Cl(-)-dependent depolarization of mesangial cells: role of Ca²⁺, PKC, and G proteins. *Am J Physiol* 262:F668-678.

Kuschinsky W, Wahl M, Bosse O, Thurau K. 1972. Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. A microapplication study. *Circ Res* 31:240-247.

Langer SZ, Javoy-Agid F, Raisman R, Briley M, Agid Y. 1981. Distribution of specific high-affinity binding sites for [³H] imipramine in human brain. *J Neurochem* 37:267-71.

Levi G, Raiteri M. 1993. Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci* 16:415-419.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274:1527-1531

Liposits Z, Gorcs T, Trombitas K. 1985. Ultrastructural analysis of central serotonergic neurons immunolabeled by silver-gold-intensified diaminobenzidine chromogen. Completion of immunocytochemistry with X-ray microanalysis. *J Histochem Cytochem* 33:604-610.

MacFarlane SN, Sontheimer H. 2000. Modulation of Kv1.5 currents by Src tyrosine phosphorylation: potential role in the differentiation of astrocytes. *J Neurosci* 20:5245-5253.

McCarron JG, Halpern W. 1990. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *Am J Physiol* 259:H902-H908.

McCarthy KD, Harden TK. 1981. Identification of two benzodiazepine binding sites on cells cultured from rat cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 216:183-191.

McCarthy KD, Salm AK. 1991. Pharmacologically-distinct subsets of astroglia can be identified by their calcium response to neuroligands. *Neuroscience* 41:325-333.

Magleby KL, Terrar DA. 1975. Factors affecting the time course of decay of end-plate currents: a possible cooperative action of acetylcholine on receptors at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 244:467-495.

Martin DC, Watkins CA, Adams RJ, Nason LA. 1988. Anesthetic effects on 5-hydroxytryptamine uptake by rat brain synaptosomes. *Brain Res* 455:360-365.

Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Monyer H, Jonas P. 1998. Functional and molecular differences between voltage-gated K⁺ channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J Neurosci* 18:8111-8125.

Matute C, Arellano RO, Conde-Guerri B, Miledi R. 1992. mRNA coding for neurotransmitter receptors in a human astrocytoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3399-3403.

Matute C, Miledi R. 1993. Neurotransmitter receptors and voltage dependent calcium channels encoded by mRNA from the adult corpus callosum. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3270-3274.

Matute C, García-Barcina JM, Miledi R. 1994a. Expression of neurotransmitter receptors and calcium channels in the adult fornix and optic nerve. *Neuroreport* 5:1457-1460.

Matute C, Pulakat L, Río C, Valcárcel C, Miledi R. 1994b. Properties of angiotensin II receptors in glial cells from the adult corpus callosum. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3774-3778.

Matute C, Miledi R. 1995. NMDA Receptors in glial cells of the adult brain white matter. *Fourth IBRO World Congress of Neuroscience*, 9-14 July 1995, Kyoto, Japan.

Mercado R, Hernández J. 1992a. A molecular recognizing system of serotonin in rat fetal axonal growth cones: uptake and high affinity binding. *Dev Brain Res* 69, 133-137.

Mercado R, Hernández J. 1992b. Regulatory role of a neurotransmitter (5-HT) on glial Na⁺/K⁺ - ATPase in the rat brain. *Neurochem Int*, 21:119-127.

Mercado R, Floran B, Hernandez J. 1998. Regulated release of serotonin from axonal growth cones isolated from the fetal rat brain. *Neurochem Int*, 32:103-106.

Merzak A, Koochekpour S, Fillion MP, Pilkington GJ. 1996. Expression of 5-HT receptors in human fetal astrocytes and glioma cell lines: a possible role in glioma cell proliferation and migration. *Brain Res Mol Brain Res* 41:1-7.

Michler-Stuke A, Bottenstein JE. 1982. Proliferation of glial-derived cells in defined media. *J Neurosci Res* 7:215-228.

Michler-Stuke A, Wolff JR, Bottenstein JE. 1984. Factors influencing astrocyte growth and development in defined media. *Int J Dev Neurosci* 2:575-584.

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

Miledi R, Reiser G. 1983. Time-course of miniature endplate currents evoked by acetylcholine quanta released from frog Schwann-cells. *J Physiol* 343, 27-28.

Murphy S, Welk G. 1990. Serotonin inhibits ATP-induced mobilization of arachidonic acid but not phosphoinositide turnover in astrocytes. *Neurosci Lett* 109:152-156.

Nakajima S. 1966. Analysis of K inactivation and TEA action in the supramedullary cells of puffer. *J Gen Physiol*. 49:629-640.

Newman EA. 1985. Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature* 317:809-811.

Nilsson M, Hansson E, Ronnback L. 1991. Heterogeneity among astroglial cells with respect to 5-HT-evoked cytosolic Ca^{2+} responses. A microspectrofluorimetric study on single cells in primary culture. *Life Sci* 49:1339-1350.

Niswender CM, Copeland SC, Herrick-Davis K, Emeson RB, Sanders-Bush E. 1999. RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J Biol Chem* 274:9472-9478.

Njiokiktjien C. Dyslexia: a neuroscientific puzzle. 1994. *Acta Paedopsychiatr* 56:157-167.

Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161:303-310.

Nowak L, Ascher P, Berwald-Netter Y. 1987. Ionic channels in mouse astrocytes in culture. *J Neurosci* 7:101-109.

Ogura A, Amano T. 1983. Transmitter responsiveness in two newly isolated clones of neuroblastoma X glioma hybrid. *Brain Res* 258:243-249.

Ogura A, Amano T. 1984. Serotonin-receptor coupled with membrane electrogenesis in a rat glioma clone. *Brain Res* 297:387-391.

Oleskevich S, Descarries L. 1990. Quantified distribution of the serotonin innervation in adult rat hippocampus. *Neuroscience* 34:19-33.

Ozsarac N, Santha E, Hoffman BJ. 2002. Alternative non-coding exons support serotonin transporter mRNA expression in the rat brain and gut. *J Neurochem* 82:336-344.

Pak MD, Baker K, Covarrubias M, Butler A, Ratcliffe A, Salkoff L. 1991. Mshal, a subfamily of A-type K⁺ channel cloned from mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4386-4390.

Pappas CA, Ullrich N, Sontheimer H. 1994. Reduction of glia proliferation by K⁺ channel blockers is mediated by changes in pH. *Neuroreport* 6:193-196.

Pauwels PJ. 2000. Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem Pharmacol* 60:1743-1750.

Peterson BS, Leckman JF, Duncan JS, Wetzles R, Riddle MA, Hardin MT, Cohen DJ. 1994. Corpus callosum morphology from magnetic resonance images in Tourette's syndrome. *Psychiatry Res* 55:85-99.

Piven J, Bailey J, Ranson BJ, Arndt S. 1997. An MRI study of the corpus callosum in autism. *Am J Psychiatry* 154:1051-1056.

Pollock BG, Ferrell RE, Mulsant BH, Mazumdar S, Miller M, Sweet RA, Davis S, Kirshner MA, Houck PR, Stack JA, Reynolds CF, Kupfer DJ. 2000. Allelic variation in the serotonin transporter promoter affects onset of paroxetine treatment response in late-life depression. *Neuropsychopharmacology* 23:587-590.

Porter JT, McCarthy KD. 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. *Progress Neurobiol* 51:439-455.

Pozzilli C, Bastianello S, Padovani A, Passafiume D, Millefiorini E, Bozzao L, Fieschi C. 1991. Anterior corpus callosum atrophy and verbal fluency in multiple sclerosis. *Cortex* 27:441-445.

Prasad BM, Amara SG. 2001. The dopamine transporter in mesencephalic cultures is refractory to physiological changes in membrane voltage. *J Neurosci* 21:7561-7567.

Price RD, Sanders-Bush E. 2000. RNA editing of the human serotonin 5-HT_{2C} receptor delays agonist-stimulated calcium release. *Mol Pharmacol* 58:859-862.

Pujol J, Vendrell P, Junque C, Marti-Vilalta JL and Capdevila A. 1992. When does human brain development end? Evidence of corpus callosum growth up to adulthood. *Ann Neurol* 34:71-74.

Qian Y, Melikian HE, Rye DB, Levey AI, Blakely RD. 1995. Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. *J Neurosci* 15:1261-1274.

Quandt FN, MacVicar BA. 1986. Calcium activated potassium channels in cultured astrocytes. *Neuroscience* 19:29-41.

Rakic P, Yakovlev PI. 1968. Development of the corpus callosum and cavum septi in man. *J Comp Neurol* 26: 100-104.

Ramamoorthy S, Prasad PD, Kulanthaivel P, Leibach FH, Blakely RD, Ganapathy V. 1993. Expression of a cocaine sensitive norepinephrine transporter in the human placental syncytiotrophoblast. *Biochemistry* 32:1346-1353.

Ransom CB, Sontheimer H. Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K⁺ currents in rat spinal cord astrocytes. *J Neurophysiol* 73:333-346.

Reyes-Haro D, Salceda R. 2000. Los transportadores de glutamato de alta afinidad en el sistema nervioso: estructura, función y relevancia fisiológica. *Arch Neurocienc* 5:96-102.

Roy ML, Sontheimer H. 1995. Beta-adrenergic modulation of glial inwardly rectifying potassium channels. *J Neurochem* 64:1576-1584.

Roy ML, Saal D, Perney T, Sontheimer H, Waxman SG, Kaczmarek LK. 1996. Manipulation of the delayed rectifier Kv1.5 potassium channel in glial cells by antisense oligodeoxynucleotides. *Glia* 18:177-84.

Saitoh O, Courchesne E, Egaas B, Lincoln AJ, Schreibman L. 1995. Cross-sectional area of the posterior hippocampus in autistic patients with cerebellar and corpus callosum abnormalities. *Neurology* 45:317-324.

Safavi-Abbasi S, Wolff JR, Missler M. 2001. Rapid morphological changes in astrocytes are accompanied by redistribution but not by quantitative changes of cytoskeletal proteins. *Glia* 36:102-115.

Schroter KH, Ruppertsberg JP, Wunder F, Rettig J, Stocker M, Pongs O. 1991. Cloning and functional expression of a TEA-sensitive A-type potassium channel from rat brain. *FEBS Lett* 278:211-216.

Seuwen K, Magnaldo I, Pouyssegur J. 1988. Serotonin stimulates DNA synthesis in fibroblasts acting through 5-HT_{1B} receptors coupled to a G_i-protein. *Nature* 335:254-256.

Shaskan EG, Snyder SH. 1970. Kinetics of serotonin accumulation into slices from rat brain: relationship to catecholamine uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 175:404-418.

Shu T, Richards LJ. 2001. Cortical axon guidance by the glial wedge during development of the corpus callosum. *J Neurosci* 21:2749-2758.

Silver J, Lorenz SE, Wahlsten D, Coughlin J. 1982. Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies, *in vivo*, on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol* 210:10-29.

Smart SL, Bosma MM, Tempel BL. 1997. Identification of the delayed rectifier potassium channel, Kv1.6, in cultured astrocytes. *Glia* 20:127-134.

Sontheimer H, Trotter J, Schachner M, Kettenmann H. 1989. Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursor cells in culture. *Neuron* 2:1135-1145.

- Sontheimer H, Black JA, Ransom BR, Waxman SG. 1992. Ion channels in spinal cord astrocytes *in vitro*. I. Transient expression of high levels of Na⁺ and K⁺ channels. *J Neurophysiol* 68:985-1000.
- Sontheimer H. 1994. Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia* 11:156-172.
- Sontheimer H, Waxman SG. 1993. Expression of voltage-activated ion channels by astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampal slice. *J Neurophysiol* 70:1863-1873.
- Steinbusch HW. 1981. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6:557-618.
- Stuhmer W, Ruppersberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Giese KP, Perschke A, Baumann A, Pongs O. 1989. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J* 8:3235-3244.
- Sturrock RR. 1976. Light microscopic identification of immature glial cells in semithin sections of the developing mouse corpus callosum. *J Anat* 122:521-537.
- Suarez-Roca H, Cubeddu LX. 2002. The selective serotonin reuptake inhibitor citalopram induces the storage of serotonin in catecholaminergic terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 302:174-179.
- Sur C, Betz H, Schloss P. 1996. Immunocytochemical detection of the serotonin transporter in rat brain. *Neurosci* 73:217-231.
- Swanson TH, Krahl SE, Liu YZ, Drazba JA, Rivkees SA. 1998. Evidence for physiologically active axonal adenosine receptors in the rat corpus callosum. *Brain Res* 784:188-98.
- Thompson SH. 1977. Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones. *J Physiol*. 265:465-488.
- Tipton KF, Dawson AP. 1968. The distribution of monoamine oxidase and α -glycerophosphate dehydrogenase in pig brain. *Biochem J* 108:95-99.
- Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. 2003. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Neurosc Rev* 4:13-25.
- Trueta C, Mendez B, De-Miguel FF. 2003. Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. *J Physiol*. 547:405-416.

Tse FW, Fraser DD, Duffy S, MacVicar BA. 1992. Voltage-activated K⁺ currents in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 12:1781-1788.

Verkhatsky A, Steinhauser C. 2000. Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev* 32:380-412.

Vermersch P, Roche J, Hamon M, Daems-Monpeurt C, Pruvo JP, Dewailly P, Petit H. 1996. White matter magnetic resonance imaging hyperintensity in Alzheimer's disease: correlations with corpus callosum atrophy. *J Neurol* 243:231-234.

Virchow R. 1858. Cellularpathologie in ihre Bergundung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. A. Hirschwald, Berlin.

Vitalis T, Parnavelas JG. 2003. The role of serotonin in early cortical development. *Dev Neurosci*. 25:245-56.

Von Hufsten C. 1984. Developmental changes in the organization of prereaching movements. *Dev Psychol* 20: 369-382.

Walz W, Schlue WR. 1982. Ionic mechanism of a hyperpolarizing 5-hydroxytryptamine effect on leech neuropile glial cells. *Brain Res* 250:111-121.

Walz W. 2000. Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia* 31:95-103

Wang PP, Doherty S, Hesselink JR, Bellugi U. 1992. Callosal morphology concurs with neurobehavioral and neuropathological findings in two neurodevelopmental disorders. *Arch Neurol* 49:407-411.

Wang S, Castle NA, Wang GK. 1992. Identification of RBK1 potassium channels in C6 astrocytoma cells. *Glia* 5:146-153.

Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. 1989. Stimulation of astroglial serotonin receptors produces culture media which regulates growth of serotonergic neurons. *Brain Res* 497:80-85.

Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC. 1990. Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 528:155-158.

Wong DT, Bymaster FP, Horng JS, Molloy BB. 1975. A new selective inhibitor for uptake of serotonin into synaptosomes of rat brain: 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *J Pharmacol Exp Ther* 193:804-811.

Woodruff PW, McManus IC, David AS. 1995. Meta-analysis of corpus callosum size in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58:457-461.

Xu T, Pandey SC. 2000. Cellular localization of serotonin_{2A} (5-HT_{2A}) receptor in the rat brain. *Brain Res Bull* 51:499-505.

Yoder EJ, Tamir H, Ellisman MH. 1996. 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptors on cultured rat Schwann cells. *Glia* 17:15-27.

Zhou FC, Xu Y, Bledsoe S, Lin R, Kelley MR. 1996. Serotonin transporter antibodies: production, characterization, and localization in the brain. *Mol Brain Res* 43:267-278.

Zhou FC, Tao-Cheng JH, Segu L, Patel T, Wang Y. 1998. Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res* 805:241-254.

Zhou FC, Lesch KP, Murphy DL. 2002. Serotonin uptake into neurons via dopamine transporters: a compensatory alternative. *Brain Res* 942:109-119.

Zhou M, Kimelberg HK. 2000. Freshly isolated astrocytes from rat hippocampus show two distinct current patterns and different [K⁺]_o uptake capabilities. *J Neurophysiol* 84:2746-2757.

Zifa E, Hernández J, Fayolle C, Fillion G. 1988. Postnatal development of 5HT₁ receptors: [³H]5-HT binding sites and 5-HT induced adenylate cyclase activations in rat brain cortex. *Dev Brain Res* 44:133-140.

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. 2003. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*. 6:43-50.