



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**VARIACIONES ESPONTÁNEAS DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO
INTRACELULAR EN ASTROCITOS HIPOCAMPALES AISLADOS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
MARÍA BERENICE SORIA ORTIZ

TUTOR
DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR
DR. MICHAEL CONRAD JEZIORSKI
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

QUERÉTARO, QRO., AGOSTO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutor certificamos que la tesis elaborada por: María Berenice Soria Ortiz, cuyo título es: “Variaciones espontáneas de la concentración de calcio intracelular en astrocitos hipocampales aislados” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario

Dr. José Jesús García Colunga

Vocal

Dr. Jorge Luis Flores Hernández

Suplente

Dr. Michael Conrad Jeziorski

Suplente

Dr. Fernando Peña Ortega

Aprobado por el Comité Académico

Dr. Alfredo Varela Echavarría

Coordinador del Programa

RESUMEN

VARIACIONES ESPONTÁNEAS DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR EN ASTROCITOS HIPOCAMPALES AISLADOS

Recientemente, los astrocitos son considerados como piezas importantes para la comunicación celular en el sistema nervioso central. La actividad de los astrocitos incluye cambios en la concentración de calcio intracelular, la cual existe aún en ausencia de estímulos neuronales. Aunque los astrocitos reciben todo tipo de estímulos, un astrocito, completamente aislado y sin estímulos extracelulares, tiene la propiedad intrínseca de generar variaciones espontáneas de la concentración de calcio intracelular. Los resultados muestran que la actividad espontánea no tiene origen en un sitio específico, pero se difunde en todas direcciones. No existe sincronía entre los eventos de un astrocito, sino que se secuencian para integrar una señal de calcio completa. Ocurren con distintos perfiles en cada parte de la célula: incrementos rápidos y transitorios, ondas lentas y variaciones lentas en forma de “mesetas”. Los eventos ocurren con mayor frecuencia en las ramificaciones y la mayoría del tipo transitorio. Además, la actividad espontánea se modifica en presencia de fármacos que interactúan con el receptor a inositol trifosfato, el receptor a rianodina y la bomba de calcio sarco-endoplásmica. Los resultados obtenidos, sugieren que una señal de calcio se origina espontáneamente en los astrocitos y se propaga de manera aleatoria e independiente a los estímulos del microambiente.

SUMMARY

SPONTANEOUS VARIATIONS OF THE INTRACELLULAR CALCIUM CONCENTRATION IN ISOLATED HIPPOCAMPAL ASTROCYTES

Astrocytes are considered important components for cellular communication in the central nervous system. The activity of astrocytes includes changes in intracellular calcium concentration, which exist even in the absence of neuronal stimuli. Although astrocytes receive stimuli from other sources, an astrocyte, completely isolated and without extracellular stimuli, has the intrinsic property of generating spontaneous variations in intracellular calcium concentration. Results show that such spontaneous activity has no origin at a specific site, but spreads in all directions. There is no synchrony between events within an astrocyte, but are sequenced to integrate a complete calcium signal. Different profiles in every part of the cell occur: rapid and transient increases, slow waves, and slow variations known as "plateaus". These events occur with more frequency in processes and the majority are transient. In addition, spontaneous activity is modified in the presence of drugs that interact with the inositol 1,4,5,-triphosphate receptor, ryanodine receptor and sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase pump. The results obtained here, suggest that spontaneous calcium signals originate in astrocytes, and are propagated in a random manner independently of microenvironment stimuli.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindar su apoyo al proyecto 81911. Becario No: 203633.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por su apoyo al proyecto PAPIIT IN201313.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al personal académico que me ha brindado siempre su cordial apoyo y asesoría. Número de Cuenta: 506009642.

Al M. V. Z. José M. García Servín, Responsable de Bioterio, por su gran apoyo en la planeación de los experimentos de este trabajo.

Agradezco al Dr. José Jesús García Colunga, por su valiosa enseñanza y entrenamiento, por su incomparable paciencia, confianza y amistad.

A la Dra. Elizabeth Vázquez Gómez, por su amistad y sus consejos académicos, técnicos y personales, tan valiosos y apreciados, brindados durante estos años en los que crecimos juntas en varios aspectos de nuestras vidas.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, Dra. Miriam Hernández y Dr. Marcelino Montiel, por su incondicional apoyo y amistad, porque han formado parte importante de mi vida, personal y profesional. Al Lic. Efrén Ruiz Alcívar, por ser mi primer entrenador técnico en esta parte de mi vida desde 2002 y por su increíble amistad.

Al Dr. Daniel Reyes Haro, por brindarme la oportunidad de conocer el mundo de la ciencia e impulsarme a creer que los sueños pueden ser realidad.

Agradezco a mis amigas del curso, Dra. Nela Monasterio, Dra. Melissa Calderón, Dra. Claudia García, Mtra. Inna García y Mtra. Vania Aldrete, por las largas horas de estudio que nos motivaron a seguir adelante siempre.

Agradezco al Dr. Luis Hernández y al Dr. Alejandro Valdés del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, por ser las personas más hermosas, maduras, congruentes y humanas que conocí durante mí servicio y que me brindaron toda su confianza y su incomparable apoyo para impulsarme a continuar mis estudios.

Dedico este logro a mi Papá, Mamá y hermanos, porque siempre creyeron en mí y porque fueron la razón de todos y cada uno de mis éxitos. Mis éxitos son sus éxitos ¡felicidades!

Dedico este logro principalmente a Melisa y a Iker porque aunque son tan pequeños para comprender, hicieron posible toda esa fuerza que me llevó a creer en mí misma. Porque siempre me recuerdan que la vida no es fácil, pero lo importante es encontrar la felicidad en ella. Y porque son las dos personitas que más me aman en el mundo y al menos hasta este momento, harían todo por verme feliz.

...Esto es por ustedes.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS.....	iii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
1. Origen y clasificación de las células gliales.....	2
2. Morfología de astrocitos, un patrón de maduración relacionado con sus funciones en diferentes regiones del cerebro.....	6
3. Otras funciones de los astrocitos: comunicación celular.....	12
4. Señalización de calcio en astrocitos.....	13
5. Variaciones espontáneas de la concentración de Ca^{2+} intracelular....	19
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	23
1. General.....	23
2. Específicos.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1. Cultivos primarios de astrocitos.....	25
2. Imagenología de calcio.....	25
3. Microscopía confocal.....	26
4. Análisis de datos.....	27
5. Análisis estadístico.....	27
6. Materiales.....	28
RESULTADOS.....	29
1. Los astrocitos del hipocampo tienen variaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$	29
2. Canales transmembranales sensibles a estímulos mecánicos.....	36
3. Canales de Ca^{2+} activados por voltaje.....	40
4. Depósitos de Ca^{2+} intracelular.....	41
4.1. Receptores de rianodina.....	41

4.2. Receptores de IP ₃	45
4.3. SERCA, bomba de Ca ²⁺ en el retículo endoplásmico.....	48
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIÓN.....	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
LISTA DE FIGURAS.....	68
APÉNDICE I. ABREVIATURAS.....	70

INTRODUCCIÓN

Los astrocitos son células gliales ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central (Savchenko et al., 2000). Cumplen con diversas funciones tanto en la barrera hematoencefálica como en espacios sinápticos (Nag, 2011). Estudios recientes indican que los astrocitos pueden interactuar con neuronas, a través de variaciones intracelulares de calcio provocadas por la estimulación de receptores de glutamato y adenosina 5' trifosfato (Verkhratsky et al., 2012). Se ha observado en estudios *in vitro*, *in situ* e *in vivo* que los astrocitos también presentan variaciones intracelulares de calcio en ausencia de estos estímulos neuronales (Hirase et al., 2004, Schipke et al., 2008). Sin embargo, hay una gran variedad de estímulos provocados entre células vecinas. Por esta razón obtuvimos cultivos muy poco confluentes, con el objetivo de tener un solo astrocito en al menos un radio de $200 \mu\text{m}^2$ en la cámara de registro, para determinar si los astrocitos tienen la propiedad intrínseca de generar variaciones espontáneas de la concentración de calcio intracelular y qué procesos intervienen en este evento. En este trabajo se encontró que un astrocito completamente aislado puede generar variaciones espontáneas en la concentración de calcio intracelular de manera intrínseca y con características interesantes. Por ejemplo, una señal espontánea de calcio puede generarse en un sitio único y propagarse a lo largo de toda la célula. Algunos eventos espontáneos de calcio se presentan de manera asincrónica. Otros eventos parecen estar secuenciados y coordinados para integrar una señal de calcio completa. Las señales de calcio tienen perfiles diferentes en cada área: incrementos rápidos y transitorios, ondas lentas y variaciones lentas en forma de “mesetas”. Estos eventos ocurren con mayor frecuencia en las ramificaciones y la mayoría son de tipo transitorio. Además, la actividad espontánea de Ca^{2+} se modifica en presencia de fármacos que interactúan con el receptor de IP_3 , el receptor a rianodina y la bomba de calcio del retículo endoplásmico.

ANTECEDENTES

1. ORIGEN Y CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES

En el estadio embrionario, las células neuroepiteliales que delinean los ventrículos cerebrales, el canal espinal, el canal óptico y la copa óptica, dan origen a todas las neuronas y células gliales del sistema nervioso central. Las células madre proliferan para hacer crecer la estructura cerebral, después se diferencian en precursores intermedios y migran radial o tangencialmente hacia sus regiones finales, a través de factores químicos atrayentes o repelentes. Finalmente ocurre la mielinización y el refinamiento sináptico (Cayre et al., 2009).

El neuroepitelio está segmentado por la expresión de factores de transcripción a lo largo de los ejes dorso-ventral y rostro-caudal, creando dominios progenitores neuronales y gliales, que dependen de la expresión temporal de proteínas proneuronales y/o progliales. Generalmente los factores proneuronales son represores de la gliogénesis; de modo que en un mismo dominio primero se producen neuronas y después glía. Tanto la neurogénesis como la gliogénesis persisten en la edad adulta en regiones específicas, siendo los precursores gliales la mayor población celular en mitosis (Cayre et al., 2009; Malatesta et al., 2000; Rowitch y Kriegstein, 2010).

Los precursores primarios en la neurogénesis embrionaria corresponden a la glía radial. Estas células se dividen durante todo el desarrollo, incluyendo la fase neurogénica, en donde sirven de guía para la migración celular (Fig. 1). La gliogénesis comienza después de que las células neuroepiteliales en mitosis se diferencian en neuronas y en glía radial (Fig. 1a). La glía radial se diferencia en precursores intermedios, que a su vez generan neuronas y precursores de oligodendrocitos (OPC's, por sus siglas en inglés); también pueden diferenciarse directamente en OPC's y en ambos casos, generar oligodendrocitos (Fig. 1b). Los OPC's son precursores bipotenciales, se diferencian en oligodendrocitos y astrocitos, se les conoce también como precursores O2A (Cayre et al., 2009; Rowitch y Kriegstein, 2010).

La glía radial también es precursora de los astrocitos, los cuales son el tema central de este trabajo. En edad embrionaria, la glía radial se diferencia primero en precursores intermedios, y éstos a su vez en astrocitos maduros. Además, se diferencia en células endimarias (Fig. 1b).

En edad adulta, la glía radial da lugar a astrocitos (células tipo B), que permanecen en la zona subventricular y son fuente de precursores intermedios en mitosis (Fig. 1c). Los oligodendrocitos pueden derivarse de células tipo B, que se diferencian en células de amplificación de tránsito (células tipo C), para luego producir OPC's y neuronas. O pueden derivarse de las OPC's ya residentes en la materia gris. La glía radial, los precursores intermedios, las células tipo B y las células tipo C, son células que tienen características de astrocitos maduros (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Doetsch et al., 1999; Rowitch y Kriegstein, 2010).

En la neurogénesis embrionaria, las primeras neuronas que se diferencian son las corticales. Las neuronas piramidales migran radialmente de la superficie ventricular hacia las diferentes capas de la corteza; mientras que las interneuronas corticales migran tangencialmente de las eminencias ganglionares hacia los tractos de la materia blanca (Cayre et al., 2009). En la edad adulta existen dos nichos neurogénicos, la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo. La glía radial que reside en estos nichos se diferencia en precursores neuronales y migran hacia sus destinos finales: el bulbo olfatorio y la capa granular del giro dentado (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Doetsch et al., 1999).

Los precursores gliales en estadios embrionarios migran desde la zona subventricular a la materia blanca, neocorteza, estriado, hipocampo y núcleos grises de la base; se detienen para entrar en mitosis, y la progenie continúa migrando en direcciones opuestas. Algunos OPC's se diferencian en oligodendrocitos y maduran, mientras que otros permanecen como fuente de precursores inmaduros. En adultos, algunos precursores gliales migran al cuerpo caloso, estriado y fimbria fórnix; pero la mayoría

se encuentra fuera de los nichos neurogénicos y migran únicamente en condiciones patológicas (Cayre et al., 2009).

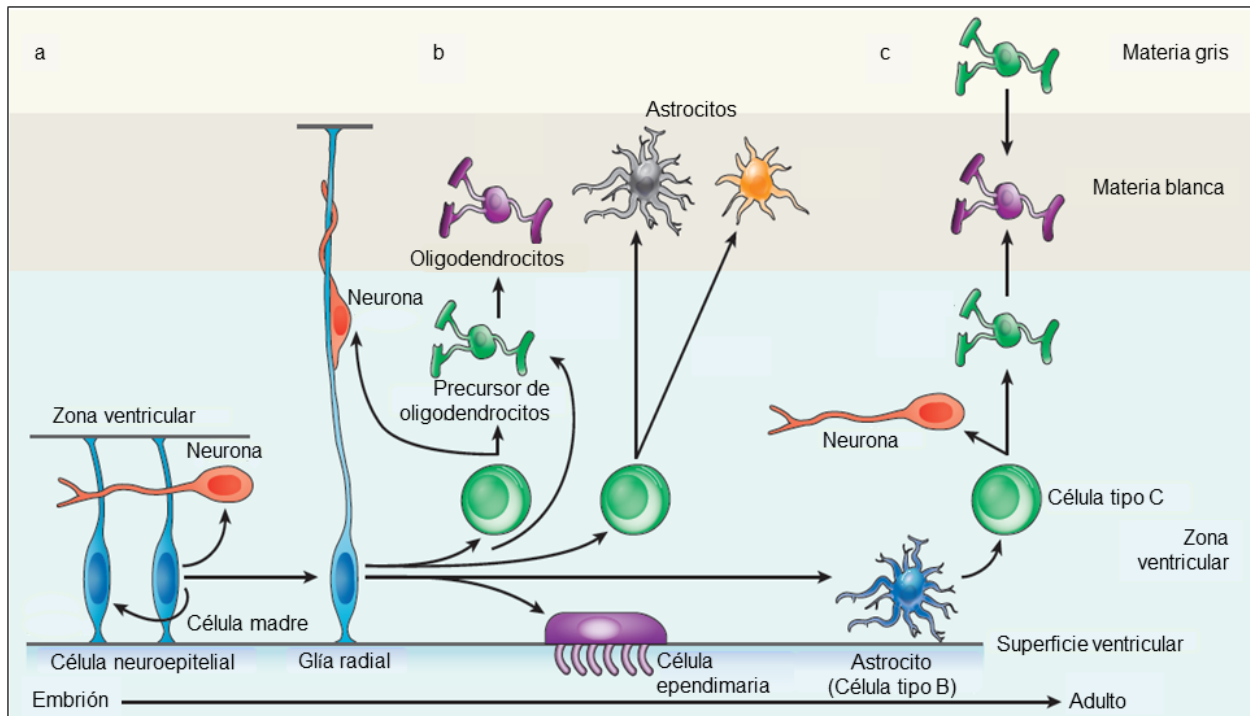


Figura 1. La gliogénesis en zonas progenitoras desde la edad embrionaria a la edad adulta. a) En el embrión, las células madre de la zona ventricular se dividen, se diferencian en neuronas y en glía radial, siendo estas últimas células guía para la migración neuronal. b) Más tarde, la glía radial se diferencia en células ependimarias, en células tipo B y precusores intermedios. Los precusores intermedios se diferencian en neuronas, astrocitos y en precusores de oligodendrocitos y estos a su vez en oligodendrocitos. Las células ependimarias permanecen formando la superficie ventricular hasta la edad adulta y las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos migran hacia la materia blanca. c) En el adulto, las células tipo B que permanecen en la zona ventricular se diferencian en células de amplificación de tránsito o células tipo C, que se diferencian en neuronas y precusores de oligodendrocitos. Los oligodendrocitos migran a la materia blanca y gris. Modificada de Rowitch y Kriegstein, 2010.

En el nervio óptico, en la primera semana postnatal, la mayoría de la glía generada son astrocitos; durante la segunda semana, la mayoría son oligodendrocitos, que están encargados de la mielinización de los axones. El citoesqueleto de los astrocitos

maduros se caracteriza por contener proteína ácido glío fibrilar (GFAP, por sus siglas en inglés) que se puede observar desde el día embrionario 17 y es la característica principal que comparte con sus precursores (Malatesta et al., 2000; Doetsch et al., 1999).

Para que la astrogénesis comience después de la neurogénesis, son necesarias señales intrínsecas y extrínsecas. En estadios tempranos del desarrollo, las proteínas proneuronales están activadas. Sin embargo, en estadios medios y tardíos, la inhibición de la expresión de las proteínas proneuronales desinhibe intrínsecamente la producción de astrocitos. Por otro lado, las neuronas que liberan proteínas proastrocitos activan la expresión del gen astrogénico y la vía de señalización Notch. Esto activa la expresión de GFAP por la unión de Nfia y activa extrínsecamente la astrogénesis (Freeman, 2010).

Se ha clasificado a la glía por su origen, por sus características morfológicas, fisiológicas y por la expresión de proteínas, particularmente de los filamentos; pero existen diferencias entre los sistemas nerviosos de mamíferos y especies no mamíferas. En el sistema nervioso central de vertebrados se reconoce como glía a los astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias y microglía; los tres primeros tipos celulares se clasifican como macroglía. En el sistema nervioso periférico se incluyen las células de Schwann y células satélite, que también se clasifican como macroglía. Por otro lado, las células de Müller en la retina y células de Bergmann del cerebelo también son consideradas como glía (Cuoghi y Mola, 2009; Hanani et al., 2010; Kettenmann y Verkhratsky, 2011; Xu et al., 2013). Algunos estudios consideran como cuarto tipo de macroglía central a los precursores bipotenciales NG2, y a los sinantocitos (NG2⁺) como el quinto tipo, los cuales son morfológica y fisiológicamente similares a los astrocitos, pero son GFAP negativos (Krawczyk y Jaworska-Adamu, 2010 y Oberheim et al., 2012).

En contraste, Emsley y Macklis (2006) definen nueve tipos de astrocitos basándose en una mezcla de expresión de proteínas de los filamentos, donde incluyen a la glía de

Bergmann, glía ependimaria, astrocitos fibrosos, glía marginal, glía perivascular, astrocitos protoplásmicos, glía radial, tanicitos y glía velada.

La diversidad glial, en particular la de astrocitos, comienza en la formación de dominios en el tubo neural, depende de factores microambientales a lo largo de la diferenciación y de la maduración celular en regiones muy particulares del cerebro. Como veremos adelante, existe diversidad en la expresión de proteínas transmembranales o intracelulares, que les confieren sus principales características, que van desde morfológicas hasta funcionales para cada región cerebral.

2. MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS, UN PATRÓN DE MADURACIÓN RELACIONADO CON SUS FUNCIONES EN DIFERENTES REGIONES DEL CEREBRO

Los astrocitos deben su nombre a la morfología que presentan en estadios maduros, tienen forma estrellada, su soma mide ~10 μm de diámetro y es rico en gránulos de glucógeno. Del soma surgen prolongaciones que se ramifican hasta tener una morfología esponjiforme. El citoesqueleto está conformado por filamentos intermedios que contienen la proteína GFAP, que es utilizada como marcador celular para diferenciar a los astrocitos de otros tipos de células gliales. Sin embargo, esta proteína sólo se encuentra en ~15% de los filamentos de la célula, por lo que actualmente se utiliza en conjunto con otras proteínas marcadoras como S100 β , vimentina, nestina o acuaporina-4. Con este marcaje se logra ver la forma esponjiforme de las ramificaciones (Bushong et al., 2004; Freeman, 2010; Nag, 2011).

Las terminaciones de las ramificaciones se unen con vasos sanguíneos, sinapsis u otros tipos celulares vecinos y tienen una alta densidad de mitocondrias. Presentan dos tipos de uniones, que dependen de la distancia y la posición entre la terminación del astrocito y la célula vecina. Las uniones comunicantes se caracterizan porque permiten la conexión con otros astrocitos (uniones autocelulares), ya que se dan a lo largo de las ramificaciones a una distancia de ~3 nm, esta característica facilita la difusión de iones,

moléculas o metabolitos como inositol trifosfato. Las uniones *puncta adherentia* se observan entre las terminaciones de los astrocitos y células vecinas en forma paralela y a una distancia de ~30 nm (Nag, 2011).

En roedores, las primeras prolongaciones astrocíticas comienzan a crecer a partir de la primera semana postnatal del desarrollo, no tienen una membrana uniforme y se traslapan con las ramificaciones de los astrocitos vecinos. En la segunda semana, las ramificaciones se reducen o encogen y se desarrollan prolongaciones finas con membrana uniforme. Para la tercera semana comienzan a dividirse haciéndose cada vez más finas y esponjiformes, pero no se traslapan con las de otros astrocitos (Fig. 2b). Comienzan a construir un dominio espacial único. En la cuarta semana, los astrocitos ya presentan su morfología madura y construyen una monocapa en forma de mosaico.

Los dominios organizados en mosaico se han observado únicamente en corteza e hipocampo. En algunas patologías como la epilepsia estos dominios se pierden, provocando el traslape entre las ramificaciones de astrocitos vecinos, contrario a lo que ocurre en la enfermedad de Alzheimer (Aguilhon et al., 2008; Wilhemsson et al., 2006; Oberheim et al., 2012).

La morfología de los astrocitos varía en cada región del cerebro y existen subtipos de astrocitos en una misma región, que posiblemente está relacionada con las funciones neuronales de la región cerebral en donde se encuentran. Además, la complejidad morfológica del astrocito incrementa a través de la evolución. Por ejemplo, los astrocitos de humanos son más grandes, tienen más prolongaciones ramificadas y la cobertura de sus dominios es 30 veces más que en roedores, ya que contactan con ~2 millones de sinapsis (Freeman, 2010, Oberheim et al., 2012). Este trabajo se centra en astrocitos de la región CA1 del hipocampo. Sin embargo, es importante señalar las diferencias entre astrocitos de otras regiones y su relación con la estructura a la que pertenecen.

En la corteza cerebral de humanos hay astrocitos protoplásmicos, interlaminares, polarizados y fibrosos. Los astrocitos protoplásmicos se encuentran de la capa II a la VI, su dominio alcanza de 200 a 300 μm , y éste es 27 veces más grande que en roedores. Los astrocitos interlaminares se encuentran en la capa I, algunas de sus ramificaciones van hacia la superficie pial y una o dos se extienden hacia las capas III o IV de la corteza; estas últimas llegan a medir hasta 1 mm, son onduladas y ricas en mitocondrias; generalmente no se ramifican, pero algunas colaterales hacen contacto con vasos sanguíneos, se sugiere que participan en la comunicación a larga distancia e integración interlaminar.

Los astrocitos polarizados se encuentran en las capas V y VI, cerca de la materia blanca; son escasos y morfológicamente similares a los astrocitos interlaminares. La particularidad son sus ramificaciones, que viajan hacia otras capas corticales sin respetar los dominios de otros astrocitos protoplásmicos, lo cual sugiere una comunicación entre dominios astrocíticos y/o entre la materia blanca y gris. Los astrocitos fibrosos se encuentran en la materia blanca, tienen finas y escasas prolongaciones que se ramifican muy poco, estos astrocitos son equidistantes entre sí, pero no forman dominios. Por su morfología simple se sugiere que sirven únicamente como soporte metabólico (Nag, 2011).

En el cuerpo calloso de ratas hay astrocitos fibrosos, que en los primeros días postnatales son irregulares, poseen un par de prolongaciones finas, poco ramificadas y muy largas que proyectan radialmente, son paralelas a las de otros astrocitos y a las fibras de axones. Sin embargo, esta organización no se presenta en P30; a esta edad los astrocitos tienen de cuatro a cinco prolongaciones cortas, ramificadas y los cuerpos celulares son más definidos (Reyes-Haro et al., 2013).

En el hipocampo de ratas adultas, los astrocitos presentan un soma generalmente triangular que mide entre 5-10 μm , sus prolongaciones se ramifican hasta tomar una morfología esponjiforme (Fig. 2). En la región CA1 las ramificaciones se extienden paralelamente a las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Presenta una

morfología con dominios únicos y en mosaico que favorece sus relaciones tridimensionales con otros astrocitos, neuronas y vasos sanguíneos (Bushong et al., 2002; Oberheim et al., 2012; Wilhemsson et al., 2006).

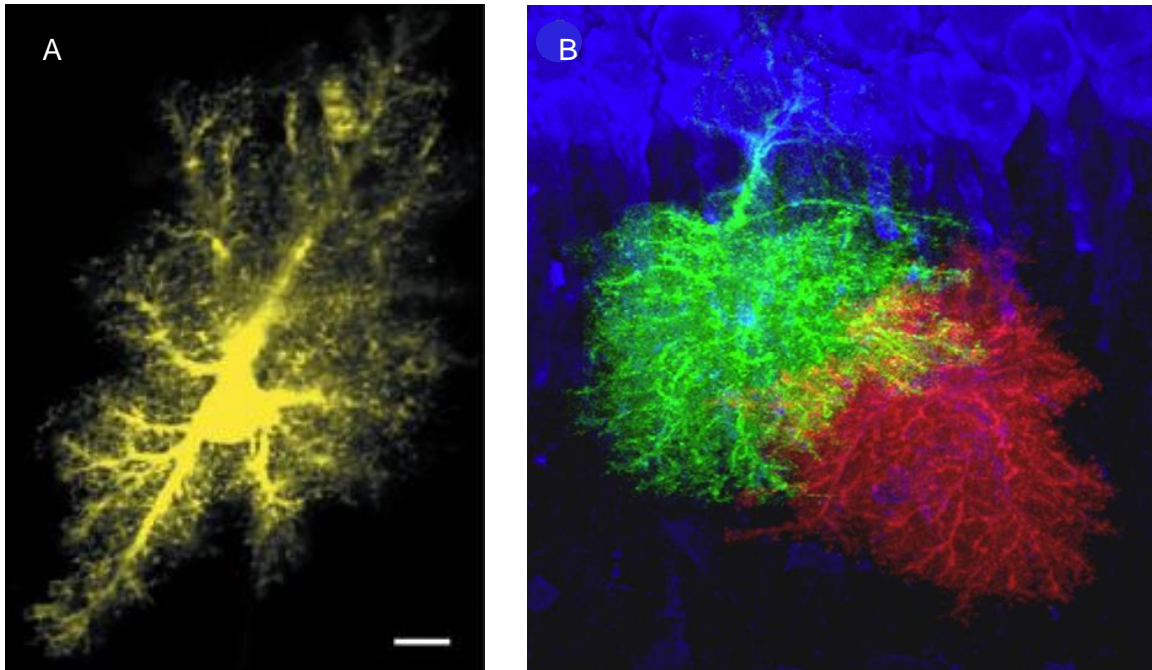


Figura 2. Astrocitos protoplásmicos del *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo. A) Astrocito llenado iontoforéticamente con el marcador fluorescente Alexa 488, se observan ramificaciones densas y esponjiformes. Barra de calibración, 10 μm (Bushong et al., 2002). B) Astrocito verde llenado con Alexa 488 y astrocito rojo llenado con Alexa 568, se observa que las ramificaciones densas no se traslapan y solo las terminaciones finas periféricas se traslapan ligeramente una con otra (amarillo). Se observan las neuronas piramidales en azul (Agulhon et al., 2008).

Los astrocitos se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y su densidad es otro parámetro anatómico-funcional. En ratas, la densidad de astrocitos es mayor en la sustancia blanca que en la gris y el número promedio es ~ 3 veces más grande que el de microglía en la mayoría de las regiones del cerebro (Savchenko et al., 2000). El hipotálamo e hipocampo son las estructuras con mayor número de astrocitos del encéfalo (~ 260 células/ mm^2); mientras que en corteza, neocórtex, cerebro medio,

médula *oblongata* y cerebelo la densidad de astrocitos es menor a 200 células/mm² (Savchenko et al., 2000). Cabe resaltar que el *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo es rica en astrocitos GFAP-positivos (Walz, 2000).

Sin embargo, en diversas regiones del cerebro se existen cambios en la densidad de astrocitos hacia la edad adulta. Por ejemplo, el cuerpo calloso presenta diferencias regionales en la densidad de astrocitos (*genu*, cuerpo y *splenium*) que proyectan a la neocorteza, áreas de asociación, motoras y sensoriales primarias y secundarias, donde la densidad de los astrocitos disminuye a través de la edad en las partes posterior y media del cuerpo calloso, a excepción del *splenium* donde incrementa significativamente (Reyes-Haro et al., 2013).

En el hipocampo de roedores se sigue un patrón de maduración que consiste en un incremento en la expresión de GFAP, incremento del tamaño celular y una arborización expansiva; estas características se observan desde el día 11 hacia el día 30 postnatal (P11 a P30). Estos parámetros se estabilizan hacia P90 y comienzan a descender para P150. A los cinco meses de edad aún existen cambios dinámicos, pero los astrocitos son escasos y delgados (Catalani et al., 2002; Kimoto et al., 2009).

Sin embargo, las diferencias a través de la edad no son significativas cuando se analiza el área total del hipocampo, a pesar del incremento en volumen que presenta esta área durante el desarrollo; sino que se localizan en pequeñas áreas hipocampales, como el *stratum lacunosum-moleculare* de la parte dorsal de las regiones CA1 y CA3, donde el número de astrocitos incrementa hacia la edad adulta. Mientras que en el *stratum oriens* de la parte dorsal de la región CA3, el número de astrocitos disminuye con la edad. En contraste con el resto de las áreas hipocampales donde no se presentan cambios en el número de astrocitos a través de la edad (Jinno et al., 2011).

De manera interesante, la expresión heterogénea de GFAP y S100 β es otro parámetro funcional. Particularmente en la región CA3 ventral del hipocampo de ratas residen

astrocitos GFAP negativos en el *stratum pyramidale* y *lucidum*. Mientras que en el *hilus* del giro dentado dorsal y ventral residen astrocitos S100 β negativos (Jinno et al., 2011).

Los estrógenos regulan la expresión de GFAP, de tal manera que en la región CA1 del hipocampo de hembras el tamaño celular y el contenido de GFAP es mayor que en machos. También, el descenso de estos parámetros hacia la vejez es mayor en hembras que en machos. Las diferencias en el número de astrocitos y en el contenido de GFAP son más evidentes cuando se compara el hipocampo de ratas hembras en proestro con el de machos, o con el de ratas hembras en fase diestro. Además, el giro dentado y la región CA1 del hipocampo de ratas en proestro tiene el mayor contenido de GFAP y el mayor número de astrocitos; mientras que la región CA3 tiene la menor densidad de astrocitos y GFAP, en ambos sexos (Arias et al., 2009; Catalani et al., 2002).

Los astrocitos hipocampales se describen como protoplásmicos. Sin embargo, estas características cambian durante el ciclo estral. Por ejemplo, en la fase diestro las ramificaciones se hacen delgadas y largas, con un contenido de GFAP menor en comparación con la fase proestro, cuando la densidad de astrocitos y de GFAP está en su límite máximo, los astrocitos se vuelven redondeados, con ramificaciones cortas, lo cual se hace más evidente en la región CA1 y en el giro dentado (Arias et al., 2009).

Las ramificaciones astrocíticas tienen cambios morfológicos y aumento en la motilidad en respuesta a estímulos neuronales. Por ejemplo, la epinefrina modula la maduración de la espina dendrítica y de las ramificaciones astrocíticas en minutos. La expresión temprana de receptores y transportadores de glutamato sugiere que los astrocitos se preparan para la neurotransmisión y la secreción astrocítica de trombospondinas (inductores de la formación sináptica), sugiere que los astrocitos participan en la sinaptogénesis (Freeman, 2010).

Durante la lactancia, las ramificaciones astrocíticas se retraen, provocando un incremento de glutamato en el espacio sináptico, debido a que los transportadores de

glutamato están alejados. Esta plasticidad astrocítica activa interneuronas inhibitorias, debido a la disminución de la liberación de neurotransmisores. Esto sugiere que los astrocitos pueden modular las sinapsis y a su vez regular la lactancia (Oberheim et al., 2012).

3. OTRAS FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS: COMUNICACIÓN CELULAR

A los astrocitos se les relaciona con una amplia diversidad de funciones como la regulación del flujo sanguíneo, metabolismo oxidativo de glucosa, homeostasis del agua y iones como potasio, defensa inmunológica, funciones fagocíticas, la producción de los factores de crecimiento epidermal, de crecimiento neural y neurotrófico ciliar (Gee y Keller, 2005), la síntesis y remoción de neurotransmisores como glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés), dopamina, norepinefrina y serotonina (Catalani et al., 2002). En humanos, los astrocitos producen apolipoproteína E isoforma 3, la cual tiene una función protectora contra la toxicidad. Otros factores sinaptogénicos como el colesterol, el factor de necrosis tumoral alfa se derivan también de los astrocitos (Cedazo y Cowburn, 2001; Oberheim et al., 2012).

Hay una gran variedad de transportadores en la membrana plasmática de los astrocitos como transportadores de glutamato de alta afinidad (GLAST en astrocitos fibrosos y GLT1 en protoplásmicos y fibrosos), transportadores de aminoácidos excitadores, transportador tipo 3 de urea, y transportadores de nucleótidos. Contienen proteínas transportadoras de salida como las proteínas de resistencia a multidroga 1-6 y la proteína de resistencia al cáncer de mama. Sin embargo, la expresión difiere entre especies y edades (Nag, 2011; Oberheim et al., 2012).

Las terminaciones de los astrocitos cubren el 99% de los vasos sanguíneos y se sugiere que mantienen las propiedades de la barrera hematoencefálica. En las ramificaciones se expresa acuaporina-4, una proteína necesaria para mover el agua de la sangre a las membranas endoteliales; los canales de potasio, como el de rectificación entrante 4.1, responsable de mantener el potencial de membrana entre -85 y -90 mV; el

transportador GLT1 provee de glucosa a las dendritas de acuerdo a su demanda; la glicoproteína P remueve moléculas lipofílicas y participa en la diferenciación de la barrera hematoencefálica (Nag, 2011).

Tanto la liberación de neurotransmisores como la expresión de receptores en los astrocitos difiere regionalmente. Por ejemplo, los astrocitos corticales expresan receptores de glutamato, de norepinefrina y de potencial transitorio de vaniloide tipo 4; mientras que los astrocitos del hipocampo expresan receptores de ATP, GABA, glutamato, acetilcolina, prostaglandinas y endocannabinoides; los astrocitos de cerebelo expresan receptores de ATP, norepinefrina, glutamato y óxido nítrico (Benfenati et al., 2007; Oberheim et al., 2012).

Los astrocitos pueden liberar gliotransmisores; en la corteza y en el hipocampo liberan ATP y glutamato, permitiendo la excitación y la inhibición de la actividad neuronal. En el hipocampo, la liberación de estos transmisores y otros como adenosina, D-serina y factor de necrosis tumoral alfa modulan de la plasticidad sináptica (Newman, 2003; Oberheim et al., 2012).

Las sinapsis están compuestas de tres elementos, la terminal presináptica, la neurona postsináptica y el astrocito. Los astrocitos de la corteza cerebral y cerebelar pueden liberar glutamato y activar la terminal presináptica a través de receptores metabotrópicos o del receptor de kainato, provocando a su vez la liberación de neurotransmisores de la terminal presináptica. También, pueden liberar ATP y activar la neurona postsináptica a través del receptor P2X, provocando un incremento en la cantidad de calcio intracelular, y de esta manera participar en la modulación sináptica. La recaptura de neurotransmisores del espacio sináptico por parte de los astrocitos, es una manera de finalizar la actividad sináptica (Nag, 2011; Nedergaard et al., 2003).

4. SEÑALIZACIÓN DE CALCIO EN ASTROCITOS

Aun cuando los astrocitos expresan un gran repertorio de receptores, canales iónicos y transportadores, las células gliales no poseen los canales iónicos para generar potenciales de acción, razón por la que se les conoce como células no excitables. Sin embargo, en la región CA1 del hipocampo los astrocitos pueden ser activos o pasivos. Los astrocitos activos son GFAP negativos que expresan canales iónicos dependientes de voltaje y los astrocitos pasivos son GFAP positivos que carecen ellos (Walz, 2000).

La excitabilidad de los astrocitos se basa en el flujo de iones de calcio (Ca^{2+}) y son capaces de responder a una gran variedad de estímulos (químicos, eléctricos y mecánicos), generando cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático. Por lo tanto, la señalización de Ca^{2+} puede ser el instrumento por el cual estas células integran y propagan las señales en el sistema nervioso central.

El Ca^{2+} actúa como un segundo mensajero celular muy importante: interviene en la regulación de la transcripción de genes, en el crecimiento y mantenimiento de neuritas, en la regulación de la contracción muscular, en la secreción de hormonas y neurotransmisores, participa en la supervivencia celular; un incremento en su concentración intracelular puede desencadenar varios mecanismos de apoptosis, tanto los que ocurren normalmente durante el desarrollo como en condiciones patológicas (Berridge et al., 2003; Verkhratsky et al., 2012).

Es de vital importancia que el Ca^{2+} presente en el citosol esté altamente controlado, ya que, por su cinética de unión rápida, alta afinidad por el oxígeno carboxílico o el efecto de fluidez y fusión de la membrana, el Ca^{2+} se vuelve muy reactivo. El retículo endoplásmico o sarcoplásmico y la mitocondria, son los principales organelos intracelulares que almacenan Ca^{2+} . Sin embargo, existen otros almacenes como el complejo de Golgi, el núcleo, lisosomas y gránulos secretores. Además, el Ca^{2+} presente en el citosol está preferentemente unido a proteínas amortiguadoras, que en

conjunto con los organelos intracelulares mantienen en equilibrio las concentraciones de Ca^{2+} citosólico (Nedergaard et al., 2010).

El flujo de iones Ca^{2+} entre el espacio extracelular, los organelos intracelulares y el citosol provocan variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), generando una señal de Ca^{2+} . Esta señal puede ocurrir intracelularmente, de manera local o global, a través de incrementos rápidos transitorios o repetitivos; o bien, propagarse en forma de ondas en el sincicio, a través de uniones comunicantes (Berridge et al., 2003; Verkhratsky et al., 2012).

Las señales de Ca^{2+} están reguladas por diferentes mecanismos (Fig. 3), incluyendo canales iónicos dependientes de voltaje y de ligando, receptores ionotrópicos y metabotrópicos, intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, bomba plasmática de la ATPasa de Ca^{2+} , canales operados por almacenes intracelulares de Ca^{2+} , proteínas citosólicas amortiguadoras de Ca^{2+} , bomba de Ca^{2+} del retículo sarco-endoplásmico, intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, poro de permeabilidad transitoria mitocondrial y transportador de Ca^{2+} mitocondrial (Verkhratsky et al., 2012).

La activación de receptores metabotrópicos en astrocitos genera variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se incluyen receptores de glutamato tipos 1 y 5, muscarínicos tipos 1 y 3, de ATP tipo P2Y, epinefrina y norepinefrina tipos $\alpha 1$ -AR y $\alpha 2$ -AR, de GABA_B, histamina tipo H1, sustancia P tipo NK1, bradicinina tipo B₂, endotelina tipos ET_A y ET_B, serotonina tipo 5-HT_{2C}, vasopresina V1, prostanoides FP-R, angiotensina II tipo AT₁ y a opioides tipos μ y κ (Verkhratsky et al., 1998; Verkhratsky et al., 2012).

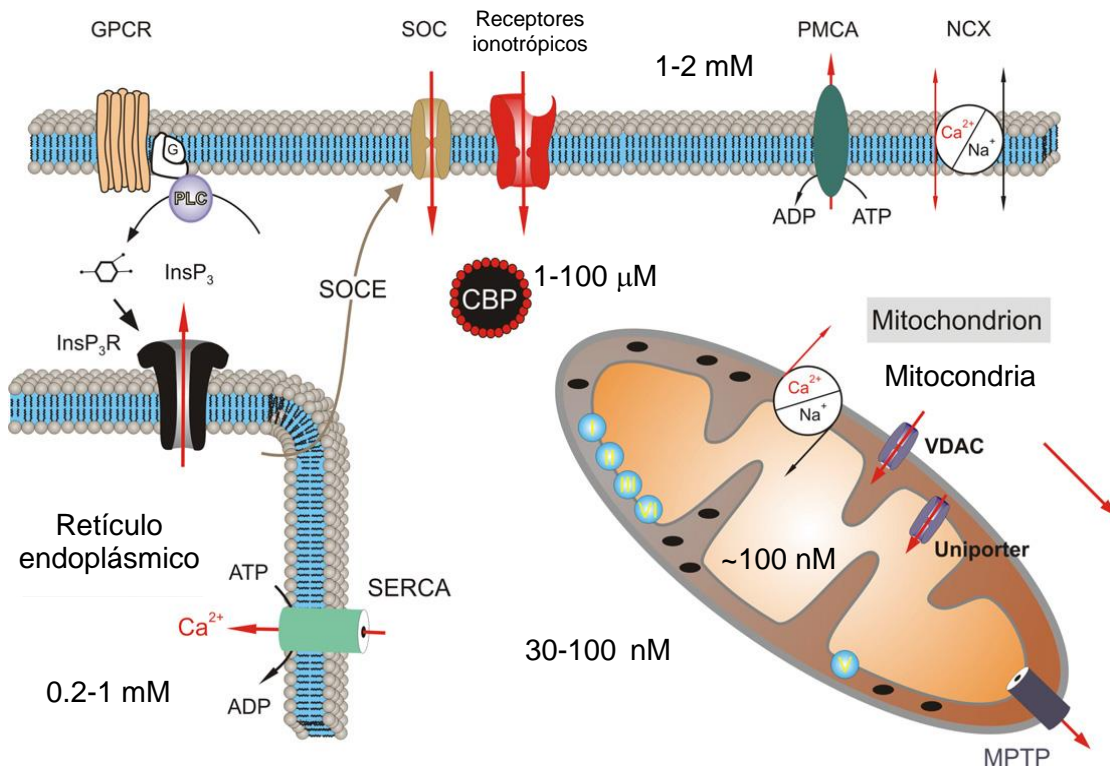


Figura 3. Mecanismos de la señalización de Ca^{2+} en astrocitos. La base de la señalización de Ca^{2+} consiste en el repertorio de proteínas transmembranales y endomembranales que expresa un astrocito, además del gradiente de concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) a través de estos compartimentos. Las flechas rojas indican la dirección del flujo de Ca^{2+} y las cantidades molares corresponden a la $[\text{Ca}^{2+}]$ en esa región. GPCR, receptores acoplados a proteínas G; SOC, canales operados por almacenes; PMCA, bomba plasmática de Ca^{2+} ; NCX, intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; SOCE, entrada capacitiva de Ca^{2+} operada por almacenes; CBP, proteínas citosólicas amortiguadoras de Ca^{2+} ; PLC, fosfolipasa C; IP₃, inositol 1, 4, 5, fosfato; ATP, adenosina 5' trifosfato; ADP, adenosina 5' difosfato; SERCA, bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico; MPTP, poro de permeabilidad transitoria mitocondrial; VDAC, canales aniónicos dependientes de voltaje y uniporter, transportador de Ca^{2+} . Modificada de Verkhratsky et al., 2012.

Los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G y cuando se activan, la proteína G activa una cascada de señalización, que provoca la producción de IP₃, que a su vez activa los receptores de IP₃ del retículo endoplásmico permitiendo la liberación de Ca^{2+} (Verkhratsky et al., 1998; Verkhratsky et al., 2012). Esta liberación de Ca^{2+}

inducido por Ca^{2+} en astrocitos tiene efectos sobre las perisinapsis (Fig. 4) y puede generar respuestas en neuronas (Lee y Haydon, 2011).

El factor neurotrófico tumoral α liberado por los astrocitos es necesario para la liberación vesicular de neurotransmisores como glutamato y sus niveles plasmáticos están modulados por el ciclo sueño-vigilia. Por lo tanto, es posible que los astrocitos puedan modular la liberación de gliotransmisores de manera diurna (Santello et al., 2011).

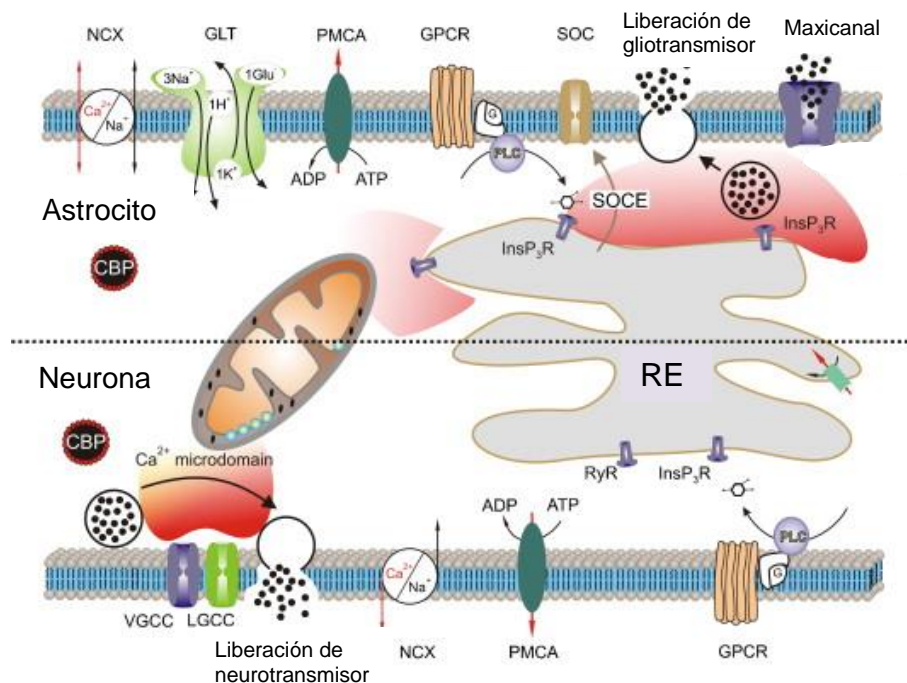


Figura 4. Mecanismo de liberación de gliotransmisores a través de la estimulación de receptores metabotrópicos. En astrocitos, este mecanismo es dependiente de la activación de receptores de IP_3 del retículo endoplásmico, permitiendo la liberación de IP_3 al citosol y a su vez se activa la liberación de gliotransmisores vía vesicular y por maxicanales. En neuronas la liberación de neurotransmisores es dependiente de la activación de VGCC y LGCC. Las zonas rosas son microdominios donde se libera Ca^{2+} y se eleva su concentración. RE; retículo endoplásmico; VGCC, canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; LGCC, canales de Ca^{2+} dependientes de ligando (Nedeergard et al., 2010).

La activación de receptores ionotrópicos permeables a Ca^{2+} (receptores de glutamato tipo kainato, AMPA y NMDA, de ATP $\text{P2X}_{1/5}$ y los receptores nicotínicos $\alpha 7$) permite la entrada de Ca^{2+} por difusión simple, generando variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En el hipocampo, la activación de receptores nicotínicos genera incrementos transitorios rápidos de Ca^{2+} (Sharma y Vijayaraghavan, 2001; Verkhratsky et al., 2012).

Los astrocitos también expresan otras proteínas, permeables a Na^+ como el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ tipo NCX1, 2 y 3; permeables a Cl^- como receptores de GABA tipos A y C. El intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es sensible al gradiente de $[\text{Na}^+]$ y a la despolarización, permitiendo tanto la entrada como la salida de Ca^{2+} . La bomba plasmática de la ATPasa de Ca^{2+} saca Ca^{2+} al espacio extracelular en contra del gradiente, debido a la hidrólisis del ATP.

Existen varios tipos de canales de Ca^{2+} activados por voltaje, los tipo P/Q, N, L, R de alto umbral y T de bajo umbral (Pichon et al., 2004). Los canales iónicos dependientes de voltaje sólo se han observado en astrocitos en cultivo, en rebanadas de tálamo y de la zona subventricular; no se han detectado en la corteza visual y en la región CA1 del hipocampo (Verkhratsky et al., 2012).

La mitocondria de los astrocitos es uno de los principales almacenes de Ca^{2+} , en su membrana externa expresan canales aniónicos dependientes de voltaje y unitransportadores en la membrana interna que operan por gradientes electroquímicos para capturar Ca^{2+} citosólico. También posee el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y poros de permeabilidad transitoria que debido a su alta conductancia y a la apertura transitoria del poro capturan Ca^{2+} de manera rápida.

El principal almacén de Ca^{2+} es el retículo endoplásmico, su membrana expresa receptores de IP_3 tipo 2, de rianodina tipo 3 y la bomba SERCA. La liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares es el mecanismo principal por el cual los astrocitos presentan variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por la activación de receptores metabotrópicos. La liberación de Ca^{2+} , a un nivel constante de IP_3 citosólico, permite la apertura

subsecuente de los receptores, provocando ondas de Ca^{2+} que se propagan a través de las uniones comunicantes.

Los receptores de IP_3 son sensibles a IP_3 , ATP y a Ca^{2+} y son permeables a cationes, predominantemente de Ca^{2+} . Los receptores de rianodina liberan Ca^{2+} del retículo endoplásmico y se activan por el propio Ca^{2+} . La bomba SERCA captura Ca^{2+} citosólico en contragradiante, por la hidrólisis del ATP (Nedergaard et al., 2010).

El Ca^{2+} liberado del retículo endoplásmico puede activar otras proteínas transmembranales, los canales operados por almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC, por sus siglas en inglés) como canales Orai o canales receptores de potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés), ambos canales meten Ca^{2+} al citosol, generando un incremento tipo meseta (SOCE, por sus siglas en inglés; Dirksen et al., 2009; Motiani et al., 2013; Pivneva et al., 2008).

5. VARIACIONES ESPONTÁNEAS DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR

En varias regiones del cerebro, los astrocitos tienen variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ independientes a la estimulación mediada por neuronas; a lo que se le llama actividad espontánea de Ca^{2+} . Estas variaciones espontáneas de Ca^{2+} pueden propagarse hacia otras células vecinas como ondas de Ca^{2+} , que provocan actividad neuronal.

En el cerebro vivo, los astrocitos presentan actividad espontánea de Ca^{2+} en la corteza de ratas, cuantitativa y cualitativamente similares a las observadas en cultivo. Además, las señales se propagan entre astrocitos cercanos de manera coordinada y esta característica mejora cuando existe un estímulo químico (Hirase et al., 2004).

En rebanadas de neocorteza, estriado, hipocampo y tálamo de ratones GFP/GFAP transgénicos, la actividad espontánea de Ca^{2+} astrocítico depende tanto del Ca^{2+} extracelular como del Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y desaparece cuando existe

una lesión. Se sugiere que existen redes de astrocitos que presentan actividad espontánea de Ca^{2+} coordinada. Por ejemplo, en el hipocampo algunos astrocitos localizados en diferentes capas, inician variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al mismo tiempo. En estas redes astrocíticas coordinadas se incluyen neuronas y su coordinación aumenta en condiciones epilépticas (Aguado et al., 2002). En cultivos de neuronas y astrocitos, las neuronas pueden modular las oscilaciones de Ca^{2+} que se generan espontáneamente en los astrocitos sin provocar la generación de nuevas oscilaciones ni modificando su frecuencia (Wu et al., 2014).

En rebanadas del tálamo ventrobasal, las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} que se propagan a otros astrocitos, pueden provocar potenciales de acción que se sincronizan con la actividad espontánea de Ca^{2+} astrocítica. Esta sincronización aumenta cuando se activan receptores de glutamato tipo NMDA (Parri et al., 2001). Además, los receptores de IP_3 de los almacenes intracelulares participan en la generación de estas oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} , a través de un mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (Parri y Cruneli, 2003).

En la corteza las oscilaciones de Ca^{2+} se deben a la liberación Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina (Tashiro et al., 2002). El mecanismo CICR a través de los receptores de IP_3 , también está implicado en el hipocampo (Nett et al., 2002).

En rebanadas de cerebro y cultivos confluentes de astrocitos corticales, los eventos espontáneos de Ca^{2+} disminuyen en frecuencia, amplitud y duración a temperaturas cercanas a la fisiológica, con un umbral de temperatura entre 30° y 28° C que provoca las variaciones de Ca^{2+} . Debido a que el óxido nítrico produce una respuesta similar a la baja de temperatura, algunos consideran que la señalización de Ca^{2+} en astrocitos ocurre en respuesta a condiciones no fisiológicas, consideradas como un factor estresante. Sin embargo, cuando la perfusión se elimina con una temperatura superior a 30° C, se crean condiciones más cercanas a la fisiológica y la frecuencia de los eventos de Ca^{2+} incrementa (Schipke et al., 2008).

En cultivos confluentes de astrocitos hipocampales, las variaciones espontáneas de Ca^{2+} dependen de la liberación Ca^{2+} de receptores de IP_3 y de rianodina del retículo endoplásmico, la frecuencia de las oscilaciones espontáneas es de un evento por minuto (Wang et al., 2006). Sin embargo, en cultivos confluentes de astrocitos tipo I de la corteza cerebral de ratas, las variaciones espontáneas de Ca^{2+} intracelular no dependen de los receptores de rianodina ni de las oscilaciones del potencial de membrana. Además, no tienen una periodicidad específica, ya que se presentan 3-4 eventos cada 400 s, y hasta más de 20 eventos en el mismo tiempo. En cultivos confluentes, los astrocitos presentan más eventos que en los cultivos poco confluentes. Además, al aumentar la temperatura de 23° C a 37° C, estas variaciones espontáneas aumentan en frecuencia y en amplitud (Fatatis y Russell, 1992).

Se ha estudiado mucho acerca de las variaciones espontáneas de Ca^{2+} intracelular, *in vivo*, *in situ* e *in vitro*, con densidades celulares confluentes y poco confluentes, observándose que los orígenes y mecanismos que están implicados en las variaciones espontáneas de Ca^{2+} intracelular son diferentes en cada área cerebral. Aun así, es posible que las células vecinas influyan de alguna manera para que se lleven a cabo estos cambios. Así, en este trabajo se explora la posibilidad de que los astrocitos tengan la propiedad intrínseca de generar variaciones espontáneas de Ca^{2+} intracelular, estando en un medio completamente aislado. Además, explorar los mecanismos que los provocan y regulan dichos eventos.

HIPÓTESIS

Un astrocito de la región CA1 del hipocampo completamente aislado tiene la propiedad intrínseca de generar variaciones espontáneas de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si hay variaciones espontáneas en la concentración de Ca^{2+} intracelular en astrocitos *in vitro* y completamente aislados de la región CA1 del hipocampo de ratas. Además, determinar qué mecanismos están involucrados para la generación de estas variaciones espontáneas: el Ca^{2+} extracelular y/o los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener cultivos de astrocitos de la región CA1 del hipocampo de ratas, con una densidad muy baja, de tal manera que estén completamente separados uno de otro.
- Determinar si hay variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos completamente aislados, a través del indicador fluorescente de Ca^{2+} libre, fluo-4.
- Determinar si los canales de Ca^{2+} activados por voltaje participan en la generación de las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$.
- Determinar farmacológicamente si las proteínas de las membranas de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , como lo son los receptores de rianodina, receptores de IP_3 , la bomba de Ca^{2+} del retículo sarco-endoplasmático, participan en la generación de las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS

Para cada cultivo se decapitaron tres ratas Wistar, machos y recién nacidos. Se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en solución fisiológica (NaCl 138 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 0.5 mM, CaCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM y glucosa 10 mM) a 4°C y un pH de 7.4. Las células de la región CA1 del hipocampo, se obtuvieron disociando mecánicamente los pequeños pedazos del tejido, pasándolo varias veces a través de una pipeta Pasteur previamente tratada con silicona (sigmacote, SIGMA). Este proceso se realizó en 200 µL de medio cultivo de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) adicionado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomycin y 11 µg/mL de piruvato.

De las células suspendidas en DMEM (Invitrogen Gibco), se colocó una alícuota de 100 µL en una caja de Petri de 35 mm sobre un cubreobjetos de 22X22 mm tratado previamente con 0.01 % de poli-L-orinitina (SIGMA). El volumen sembrado contenía $<1 \times 10^8$ células/mL. Una vez que las células sedimentaron, se agregaron otros 2.5 mL de medio DMEM y se mantuvo en incubación a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue sustituido por medio Neurobasal (Invitrogen Gibco) adicionado con 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomycin y suplemento G5 (Invitrogen Gibco). Este suplemento favorece únicamente la diferenciación, crecimiento y mantenimiento de los astrocitos (Vermeiren et al., 2005). El medio de cultivo se cambió cada 3 días. Al cuarto día se obtiene un cultivo de astrocitos y la producción se mantiene hasta el día 7. Más del 90% de los astrocitos de estos cultivos son GFAP positivos. Todos los astrocitos se registraron entre los días 4 y 7 de cultivo.

2. IMAGENOLOGÍA DE CALCIO

Para medir la concentración de Ca^{2+} intracelular, se cortaron fragmentos del cubreobjetos donde se hizo crecer el cultivo primario, utilizando pinzas de mirodisección, lográndose tener un solo astrocito por trozo de vidrio, es decir completamente aislado.

El fragmento se incubó con 10 μM del indicador de Ca^{2+} , fluo-4AM (Molecular Probes) durante 30-40 minutos. Todos los experimentos se perfundieron a una rapidez de ~ 2 mL/min con solución extracelular compuesta (en mM) de NaCl 138, KCl 2.5, MgCl_2 0.5, CaCl_2 2, HEPES 10 y glucosa 10 (pH de 7.4).

El trozo de vidrio se colocó en la cámara de registro con un volumen de 46 mm^3 , perfundiéndose continuamente por gravedad con la solución extracelular durante el registro, pasando por un canal de 7 mm de ancho, que tenía un trozo de $\sim 4 \times 4$ mm del cubreobjetos con el astrocito. El canal se conectó por un extremo a un sistema de alimentación y por el otro a un sistema de vacío, para extraer las soluciones.

3. MICROSCOPIA CONFOCAL

Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 y se utilizaron objetivos ACHROPLAN de 40x (apertura numérica de 0.80 W). Se incidió sobre la célula con un láser de argón a 488 nm de longitud de onda de excitación y a 505 nm de longitud de onda de detección. Los tiempos de exposición fueron de 300 a 500 s para los registros control y de 500 a 1000 s para perfundir antagonistas. Se capturó una imagen cada 0.99 s. Los resultados se analizaron con el programa Zeiss LSM Image Browser. La fluorescencia se midió dibujando el área de interés, el soma y las ramificaciones primarias y secundarias se delinearon por separando. Las respuestas se presentan en $\% \Delta F/F_b$, donde F_b es la fluorescencia basal de las células y ΔF es el cambio relativo en la fluorescencia sobre los niveles basales. Los datos se presentan como el porcentaje de incremento de fluorescencia relativa. La fluorescencia basal se

definió para cada astrocito, como la fluorescencia mínima presente en el tiempo en el que duró el experimento.

Para este tipo de experimentos, donde se registra por más de 15 minutos, se utilizó el 7% de la potencia de láser, la cual es menor a la potencia óptima recomendada para el láser que es 10%. De esta manera, se puede prolongar el tiempo de registro sin que la señal de Ca^{2+} se debilite.

4. ANÁLISIS DE DATOS

Los cambios de la fluorescencia (ΔF) en función del tiempo fueron exportados y graficados con el programa OriginPro 7. El nivel de ruido se determinó para cada astrocito, utilizando de 15 – 40 s de la F_b de cada registro. Para los eventos espontáneos de Ca^{2+} , se obtuvo un nivel de ruido mínimo de 3% y máximo de 12% de ΔF , es decir el promedio de $\Delta F \pm 2.5$ veces la desviación estándar ($n = 25$). Para los registros de eventos espontáneos de calcio sin perfusión se obtuvo un nivel de ruido de 50% de ΔF ($n = 3$).

Los eventos espontáneos de Ca^{2+} de tipo transitorio se definieron como incrementos de la fluorescencia con una duración de 4 - 50 s, los incrementos en forma de ondas lentas con una duración de 51 - 100 s y los incrementos tipo mesetas con una duración mayor a 100 s. La duración de los eventos espontáneos se midió sobre la amplitud media de cada evento.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los eventos espontáneos de Ca^{2+} con y sin perfusión, se utilizó la prueba de t de Student para muestras pareadas con una significancia de 0.05. Los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar de la media, para el número de eventos y su frecuencia.

6. MATERIALES

Las sales se consiguieron de J. T. Baker y Sigma. Se utilizó 1 μM y 20 μM de rianodina (Tocris) como agonista y antagonista de los receptores de rianodina, respectivamente; 50 μM de timerosal (Sigma) y 100 μM de 2-Aminoetoxidifenil borato (Calbiochem) como agonista y antagnoista de los receptores a IP_3 , respectivamente; y 10 μM de ácido ciclopiazónico (Tocris) y 20 μM de tapsigargina (Tocris) como antagonistas de la bomba SERCA.

RESULTADOS

1. LOS ASTROCITOS DEL HIPOCAMPO TIENEN VARIACIONES ESPONTÁNEAS DE LA $[Ca^{2+}]_i$

Obtuvimos cultivos de astrocitos de hipocampo de ratas recién nacidas, ya que es una de las regiones del sistema nervioso central con mayor densidad de astrocitos en comparación con otras áreas como la corteza frontal. Por ejemplo, la región CA1 del hipocampo de ratas adultas tiene ~ 244 astrocitos/ mm^2 (Savchenko et al., 2000).

Algunos trabajos reportan actividad espontánea de Ca^{2+} astrocítica (Fatatis y Russell, 1992; Hirase et al., 2004; Nett et al., 2002; Parri et al., 2001; Parri y Cruneli, 2003; Tashiro et al., 2002; Wang et al., 2006) donde las condiciones experimentales (cultivos confluentes, rebanadas de cerebro o cerebro *in vivo*), podrían sugerir estímulos provenientes de células vecinas (neuronas o células gliales), con las que el astrocito podría estar interactuando. Por lo anterior, en este trabajo se obtuvieron cultivos poco confluentes, de tal manera que los astrocitos estuvieran separados de otras células al menos por $200 \mu m^2$.

Así, el objetivo consistió en determinar si los astrocitos de la región CA1 del hipocampo, en condiciones completamente aisladas, tienen la propiedad intrínseca de generar variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$.

La Figura 5 muestra dos astrocitos de la región CA1 del hipocampo en la cámara de registro. Cada uno de ellos se encuentra en un cultivo diferente y se puede observar que por lo menos a $200 \mu m^2$ alrededor de un astrocito no se encuentra ninguna célula.

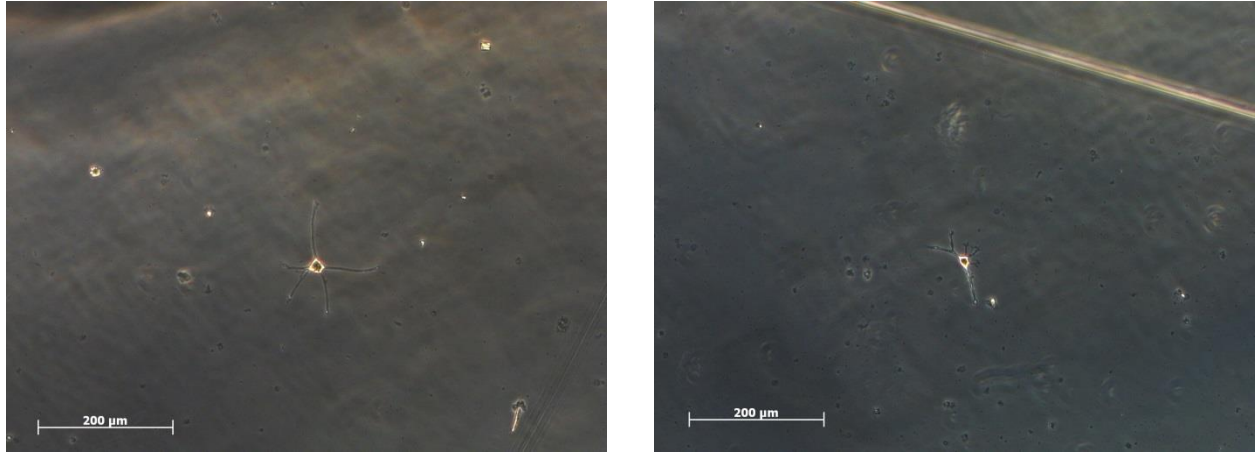


Figura 5. Astrocitos en cultivo de la región CA1 del hipocampo. Al centro de cada imagen se muestra un astrocito completamente aislado. Los cuerpos celulares de ambos brillan. En el astrocito de la izquierda se delinean 5 ramificaciones primarias, en el de la derecha se delinean 2 ramificaciones primarias y 1 ramificación secundaria. Nótese que no hay otro astrocito alrededor. Imágenes en contraste de fases. Barra de calibración: 200 μm .

En estas condiciones, 25 de 38 astrocitos del hipocampo generaron variaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, con una frecuencia de 0.015 ± 0.003 Hz (~ 1 evento por minuto). Estos astrocitos (66%) presentaron tres tipos de eventos espontáneos de Ca^{2+} , los cuales se clasificaron por su duración como: 1) eventos transitorios con una duración de 4 - 50 s, 2) ondas lentas con una duración de 51 - 100 s y 3) incrementos tipo meseta con una duración mayor a 100 s. Encontrándose que los eventos transitorios espontáneos de Ca^{2+} fueron los más frecuentes (0.011 ± 0.002 Hz) en comparación con las ondas lentas (0.003 ± 0.001 Hz) y mesetas (0.001 ± 0.0004 Hz). Lo que significa que mientras que ocurren 20 eventos transitorios en 30 min, ocurren 5 ondas lentas y 2 mesetas en el mismo tiempo (Fig. 6A).

Asimismo, los cambios de la fluorescencia se midieron de manera separada en los somas y las ramificaciones, encontrándose que los eventos espontáneos de Ca^{2+} ocurren con mayor frecuencia en las ramificaciones (0.012 ± 0.003 Hz) que en los somas (0.003 ± 0.001 Hz). Lo que significa que mientras que en las ramificaciones

ocurren 22 eventos cada 30 min en los somas ocurren 6 eventos en el mismo tiempo (Fig. 6B).

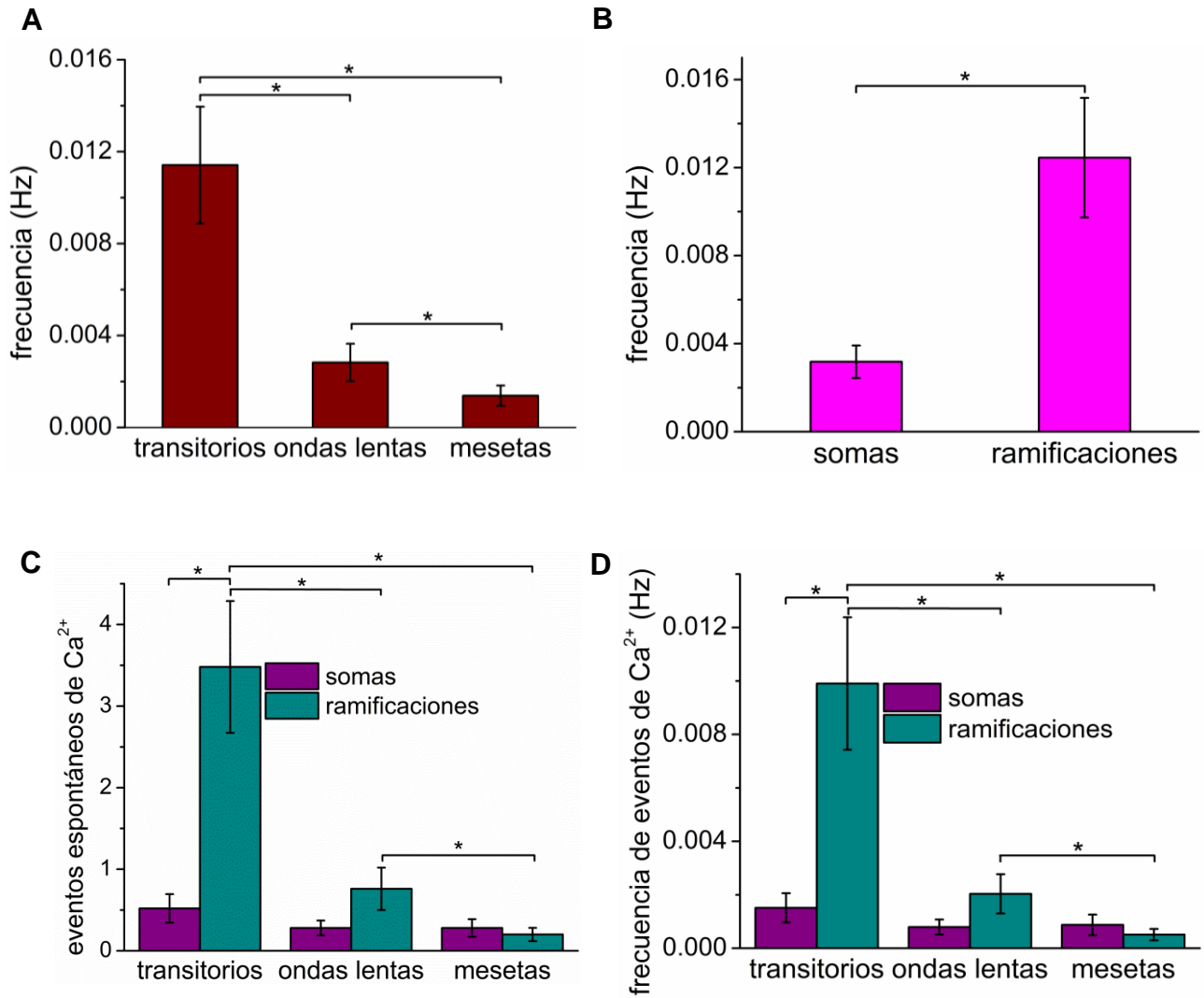


Figura 6. Perfiles diferentes de eventos espontáneos de Ca^{2+} . A) Se grafica la frecuencia de los eventos transitorios, ondas lentas y mesetas en los somas. B) Frecuencia de los eventos en somas y en ramificaciones. C) Promedio de los eventos transitorios, ondas lentas en las dos regiones de un astrocito (somas y ramificaciones). D) Frecuencia de los tres perfiles en ambas áreas del astrocito. La estadística se realizó con la prueba t de Student pareada (* $p < 0.05$, $n = 25$).

Entonces, los eventos espontáneos de Ca^{2+} que se presentan con mayor frecuencia son los eventos de tipo transitorio en las ramificaciones (0.01 ± 0.002 Hz) y los eventos que se presentan con menor frecuencia son los de tipo meseta en las ramificaciones (0.0005 ± 0.0002 Hz). Lo que significa que en las ramificaciones ocurren 18 eventos transitorios contra un evento tipo meseta (Figs. 6C y D).

La Figura 7 muestra un ejemplo en el que se observan los cambios de la fluorescencia en función del tiempo en las diferentes regiones de un astrocito: soma (S1) y las ramificaciones primarias (p2 - p6). Las imágenes de la Figura 7A fueron tomadas a diferentes tiempos ($t = 0$, inicio del registro). En la imagen de arriba se marca el soma con un asterisco y se observa que la intensidad de la fluorescencia es casi homogénea en toda la célula. En la imagen del centro tomada 4 s después, se marcan las ramificaciones p2, p3, p4 y p6, observándose que la ramificación p3 tiene mayor intensidad con respecto a la imagen tomada a los 128 s. Y en la imagen de abajo, tomada a los 471 s, la mitad derecha del astrocito aumenta su intensidad. Esta área incluye el soma y las ramificaciones p5 y p6. También se puede observar que la intensidad de la ramificación p3 disminuye considerablemente.

En este caso las ramificaciones adyacentes muestran sincronía. Por ejemplo, la respuesta de la ramificación primaria 2 (p2) tiene el mismo perfil que la ramificación p3, aunque con menor intensidad. Se presenta un incremento rápido y transitorio a los 132 s, seguido de otros dos en los 50 s posteriores (de 10 s cada uno), ambas respuestas suceden antes que en el resto de la célula. Sugiriendo que existe sincronización entre estas dos ramificaciones, ya que se presentan en el mismo periodo de tiempo y con el mismo perfil, a diferencia del resto de la célula.

Por otra parte, la ramificación p4 presenta un pequeño incremento transitorio a la mitad del registro, el cual está desincronizado con el resto de la célula y también presenta una onda lenta (80 s) que ocurre antes del transitorio. Lo mismo pasa con la ramificación p5 que permaneció prácticamente silenciada durante todo el experimento y presenta su primer transitorio de Ca^{2+} hasta el final del registro (470 s) y también es independiente.

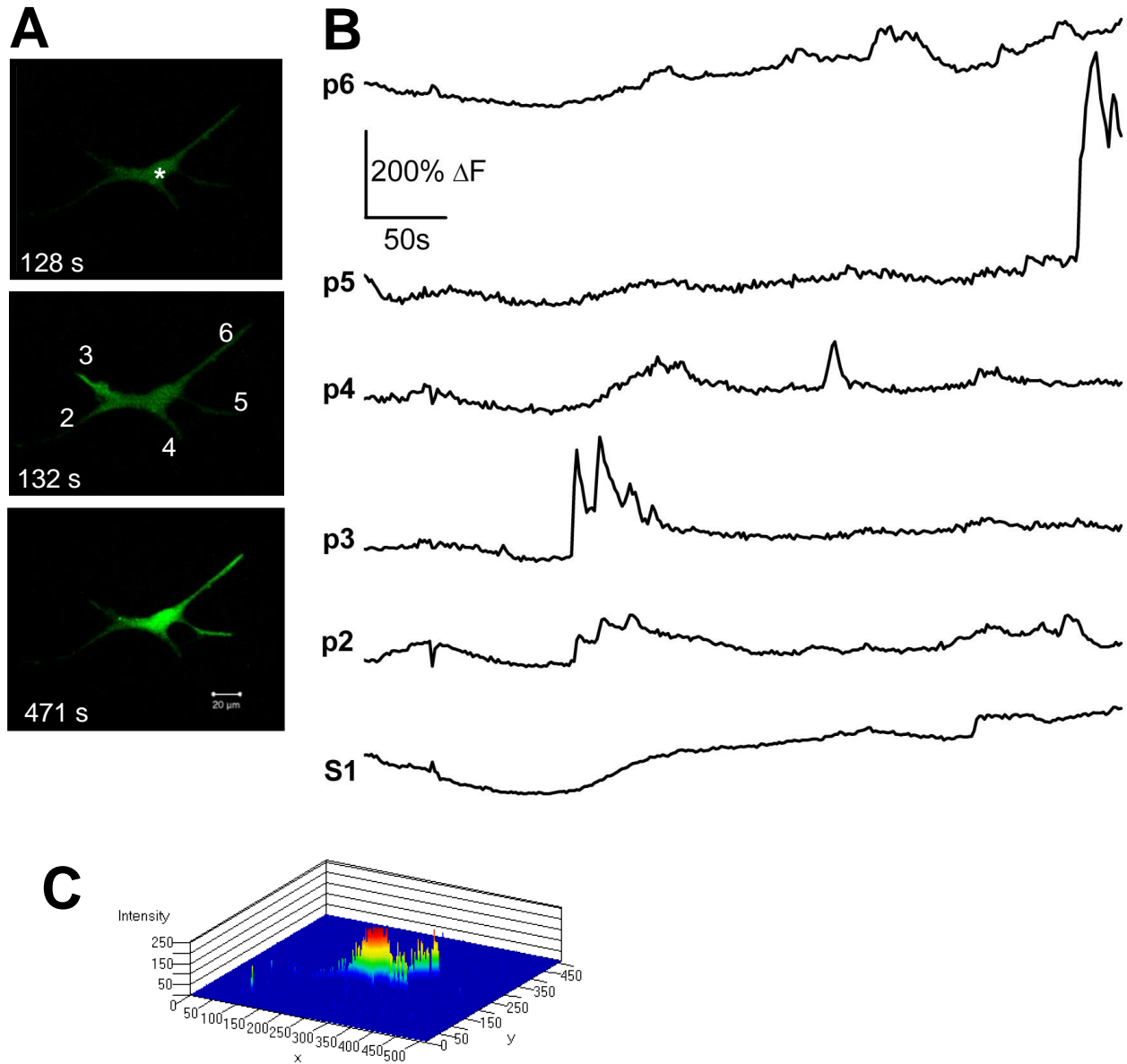


Figura 7. Variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos de hipocampo. A) Imágenes de un astrocito con 5 ramificaciones primarios tomados los tiempos indicados. El soma está marcado con un asterisco. En la imagen central se enumeran las ramificaciones astrocíticas. B) Porcentaje del incremento relativo de la fluorescencia en función del tiempo del astrocito en (A), del soma (S1) y ramificaciones primarias (p2-p6) de un astrocito. B) Imágenes de la misma célula registrada en (A), tomadas a los tiempos indicados. C) Imagen tridimensional del mismo astrocito, que corresponde a la imagen de la derecha en (B) donde se observan cambios heterogéneos. 25 células de 12 cultivos.

Las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en el soma y en p6 suceden lentamente. En el soma se observa un incremento constante que forma una meseta hacia el final del registro y la ramificación p6 presenta dos incrementos lentos durante todo el experimento. Es posible que estas variaciones hayan ocurrido como consecuencia de los transitorios en p2 y p3, por lo que se realizó un segundo análisis de este registro. Para dicho análisis, se midieron las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en cuadrantes más pequeños a lo largo de la célula, desde p3 a p6 se pudo observar que el incremento de la intensidad de fluorescencia a través del tiempo, recorre esta distancia como una ola. Lo anterior se ejemplifica en la Figura 8, donde se observa que cada uno de los cuadrantes presenta el mismo incremento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$ a través del tiempo. Se describe más adelante.

Finalmente, cuando la $[Ca^{2+}]_i$ se incrementa espontáneamente en una región del astrocito, por ejemplo en p5 y p6 a los 471 s del registro, la intensidad de la fluorescencia incrementa de manera heterogénea a lo largo de las ramificaciones. Incluso existen pequeñas áreas en las que no se detecta el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. La Figura 6C muestra la representación tridimensional del mismo astrocito a los 471 s, en la que se representa la intensidad de la fluorescencia en una escala de color. Donde la intensidad de la fluorescencia de menor a mayor va del azul al rojo. Se observa que a lo largo de las ramificaciones p5 y p6 existen diferentes intensidades de fluorescencia e incluso pequeñas áreas sin incrementos.

Por otra lado, dado que los transitorios de Ca^{2+} de p2 y p3 ocurren primero en todo el registro y al parecer la señal se propaga al otro extremo de la célula, se realizó un segundo análisis del mismo experimento de la Figura 7, en donde se midieron las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ mediante cuadrantes muy pequeños que atraviesan la célula desde la ramificación p3 hasta p6 cruzando el soma. Lo anterior se ejemplifica en la Figura 8.

La Figura 8A corresponde a la imagen tomada a los 132 s del registro, cuando ocurre el primer incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, y los trazos de la Figura 8B representan los incrementos transitorios de la $[Ca^{2+}]_i$, en los cinco cuadrantes de colores alineados de p3 a p6 en la Figura 8A. La duración del registro de este astrocito fueron 500 s.

El primer cuadrante (verde) se tomó en p3 mostrando un transitorio de Ca^{2+} único. El segundo cuadrante (azul) se tomó en p3 pero cerca del soma y se observa otro transitorio de Ca^{2+} único. El tercer cuadrante (magenta) se tomó del soma y sorprendentemente se observa otro transitorio de Ca^{2+} único y no un incremento tipo meseta. El cuarto cuadrante (anaranjado) se tomó cerca de p6 y el quinto cuadrante café en p6, el final de la señal de Ca^{2+} . De manera interesante, todos los incrementos transitorios de Ca^{2+} en cada cuadrante presentan el mismo perfil, en cuanto a amplitud y duración, incluso en el soma.

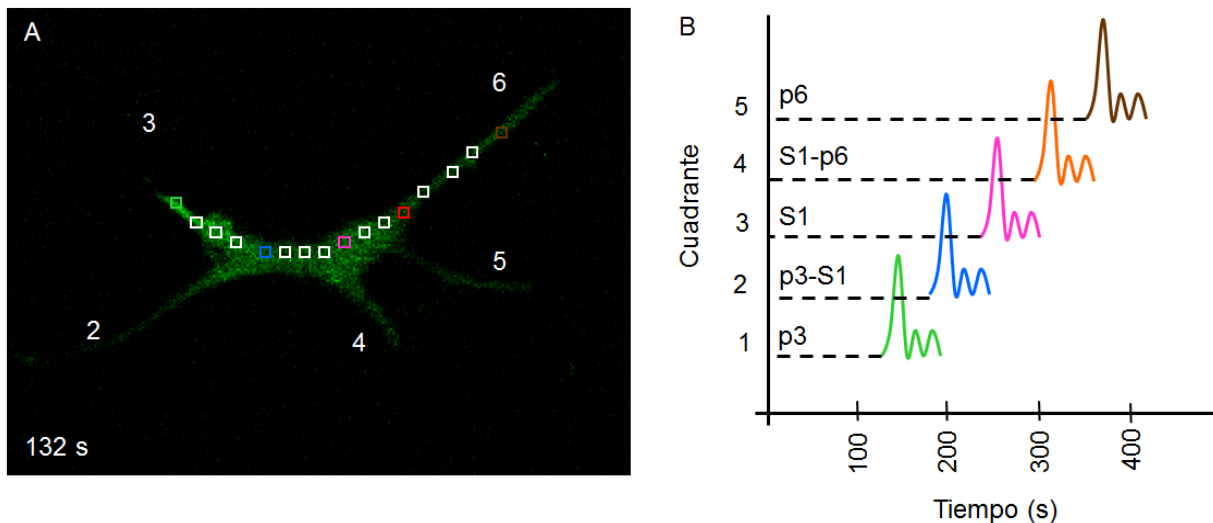


Figura 8. Ejemplificación de una señal de Ca^{2+} espontánea que se propaga a lo largo del astrocito. A) Imagen del astrocito a los 132 s del registro, los números indican sus ramificaciones. Los cuadrantes dibujados por un costado del astrocito indican el área por donde la señal de Ca^{2+} se propaga y los cuadrantes de colores se tomaron en cuenta para los trazos en B. B) El registro de cada cuadrante de color muestra transitorios espontáneos de Ca^{2+} que ocurren uno tras otro a través del tiempo y de izquierda a derecha.

El análisis entre las Figuras 7 y 8, permite suponer que existe una señal espontánea de Ca^{2+} que se propaga en una dirección específica en 339 s, esta se puede ver en los trazos de la Figura 7B. Si observamos los registros de acuerdo al orden de aparición de los transitorios de Ca^{2+} podemos replicar lo que sucede en el registro, primero hay incrementos en p3 y p2, después en p4, luego en S1 y al final en p5 y p6. Lo que sugiere que hay dos flujos de Ca^{2+} , uno que va de p3 hacia p6 y p5 y otro que va de p2 a p4. Estos flujos ocurren en momentos diferentes y por lo tanto son independientes o asincrónicos.

Asimismo, es importante mencionar que la mayoría de las variaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en todos los experimentos ($n = 25$), tienen diferentes intensidades en distintas partes de la célula, presentándose valores altos en el soma, que van disminuyendo conforme se avanza a regiones distales de las ramificaciones, hacia ramificaciones secundarias (s).

De acuerdo con estos resultados, podemos decir que un astrocito separado de todo estímulo extracelular en cultivos de la región CA1 del hipocampo, presenta variaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de manera intrínseca. En el 66% de los astrocitos registrados ($n = 38$) ocurre 1 evento por minuto. Los eventos se presentan a diferentes tiempos con diferente amplitud y en distintas partes de la célula (soma y ramificaciones).

Sin embargo los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se presentan en forma de meseta, resultan de la suma de muchos transitorios de Ca^{2+} que no se observan cuando el área de interés es más grande. Por otro lado, las ramificaciones presentan mayor número de variaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de tipo transitorio en comparación con el resto de la célula.

2. CANALES TRANSMEMBRANALES SENSIBLES A ESTÍMULOS MECÁNICOS

Se ha observado en astrocitos del nervio óptico que la estimulación mecánica provoca indirectamente cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ similares a la respuesta de 100 μM de ATP y que

además lo hacen a través de los receptores metabotrópicos purinérgicos P2Y₁ (Hamilton et al., 2008).

Entonces, para descartar que el flujo de la solución que perfunde al astrocito provoque un estímulo mecánico significativo como para generar variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$, se registraron astrocitos sin perfusión. Se montó una alberca con la misma cámara de registro y en estas condiciones se observaron variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en el 67% de los astrocitos registrados (n = 3).

En estos astrocitos se observó el mismo perfil de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, transitorios, ondas lentas y mesetas, en el soma y en las ramificaciones. Y de la misma manera, los eventos transitorios ocurren con mayor frecuencia (0.007 ± 0.001) en comparación con las ondas lentas (0.001 ± 0.0003) y mesetas (0.0003 ± 0.0002). Significa que en una hora ocurren 25 eventos transitorios, 4 ondas lentas y 1 mesetas (Fig. 9).

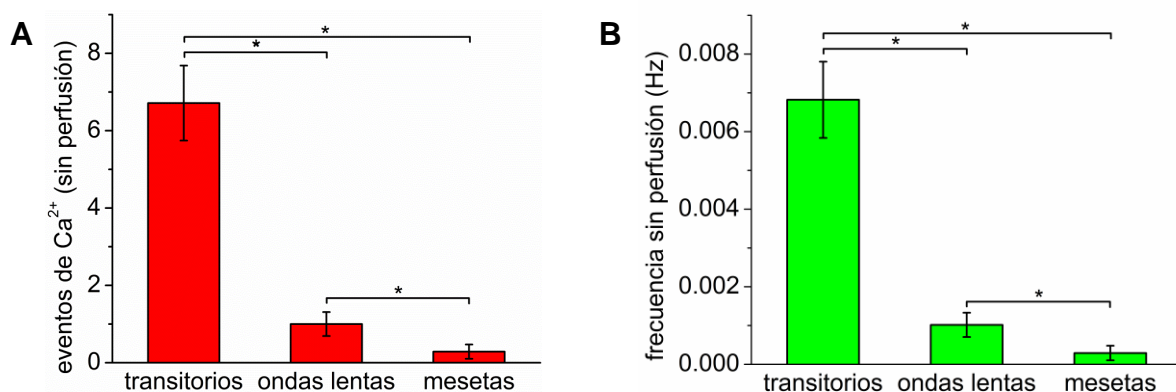


Figura 9. Eventos transitorios, ondas lentas y mesetas en astrocitos completamente aislados sin perfusión. En A y B se grafica el promedio y la frecuencia de los tres perfiles de los eventos espontáneos de Ca^{2+} en astrocitos sin perfusión. La estadística se realizó con la prueba de *t* de Student pareada (* $p < 0.05$, n = 3).

La Figura 10 ilustra un ejemplo de un astrocito en estas condiciones. En el registro se observaron incrementos transitorios en todas las ramificaciones y existen sincronizaciones entre las ramificaciones primarias y sus correspondientes ramificaciones secundarias (p2, s3; p4, s5; y p6, s7). Por ejemplo, la ramificación p2

presenta dos incrementos lentos de la $[Ca^{2+}]_i$ casi al final del registro (780 s, líneas punteadas azules) la ramificación s3 presenta un incremento transitorio de Ca^{2+} pocos segundos después del segundo transitorio de p2, como si en p2 se originara y al mismo tiempo, potenciara a s3. La ramificación p4 presenta transitorios a lo largo del registro, de menor intensidad y que coinciden con la ramificación s5, aunque también ocurren otros que no son simultáneos. Del mismo modo, ocurren algunos eventos en la ramificación p6 que coinciden con s7, pero s7 presenta incrementos transitorios de mayor intensidad.

Particularmente en este experimento existe sincronía a la mitad del registro entre los tres grupos de ramificaciones (p2 y s3, p4 y s5, p6 y s7). En dichos transitorios sincronizados, la amplitud de la actividad espontánea de Ca^{2+} no obedece a ningún patrón y es posible que dependa simplemente de la intensidad basal relativa que da la cantidad de reservorios de Ca^{2+} en la célula, lo cual no podría ser comparable con otras partes de la célula. Sin embargo, en el trazo de la ramificación p6 y su secundaria s7, se observa que tanto la frecuencia como la amplitud de la actividad espontánea de Ca^{2+} van aumentando conforme se aleja del soma (líneas punteadas moradas y roja).

En la Figura 10B podemos observar el perfil del astrocito registrado inmerso en solución extracelular y la distribución de las ramificaciones primarias de p2 a p6 y sus respectivas ramificaciones secundarias de s3 a s7. La sincronización de las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ entre la ramificación primaria y la secundaria, hace pensar que la señal de Ca^{2+} viaja a lo largo de la célula hacia las ramificaciones.

En la imagen de la derecha en la Figura 10B se presenta la gráfica tridimensional del mismo astrocito registrado, donde podemos observar pequeñas áreas de incrementos de la señal de Ca^{2+} , lo cual nos da una idea de la distribución o actividad de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} .

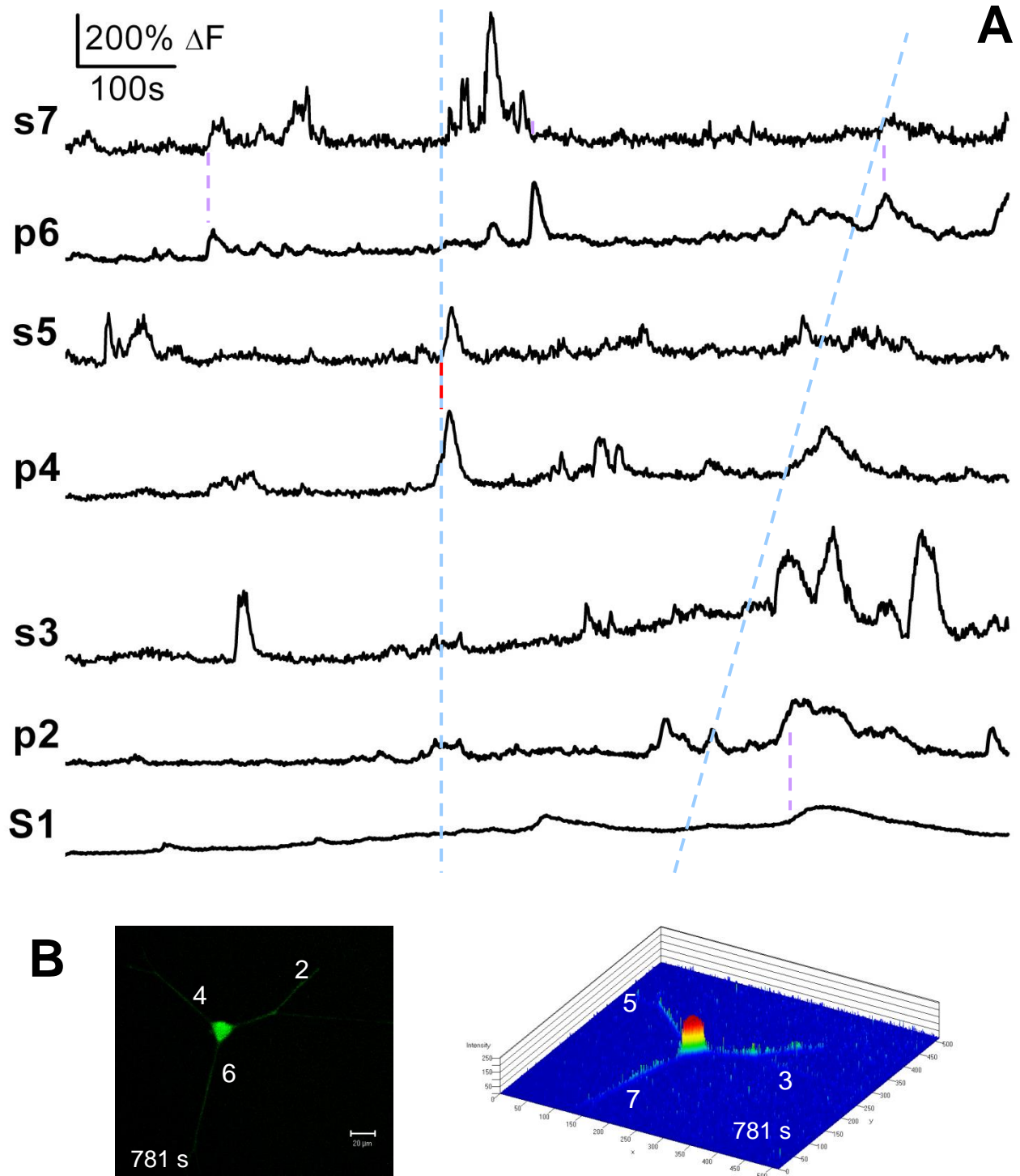


Figura 10. Variaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en un astrocito sin perfusión. A) Porcentaje de los cambios de la fluorescencia en el soma, ramificaciones primarias y secundarias. B) Imagen y gráfica tridimensional del mismo astrocito registrado en (A). Los números corresponden a las ramificaciones primarias y secundarias del astrocito registrado.

Una vez analizado lo anterior y dado que las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ entre experimentos con y sin perfusión muestran una gran similitud, de aquí en adelante todos los experimentos se realizaron perfundiendo continuamente a los astrocitos con la solución extracelular control. Esto tiene la ventaja de poder aplicar diversas sustancias para explorar los posibles mecanismos y orígenes de estos cambios espontáneos de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos del hipocampo.

3. CANALES DE Ca^{2+} ACTIVADOS POR VOLTAJE

Una concentración alta de potasio extracelular ($[K^+]_e = 150$ mM), provoca la despolarización de la membrana, lo cual activa canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC), permitiendo así la entrada de Ca^{2+} (Verkhatsky et al., 1998).

En la Figura 11 se muestra un ejemplo representativo de datos preliminares ($n = 4$). Los resultados muestran que las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ tienden a incrementar su frecuencia y a disminuir la duración de los eventos. Inmediatamente después de aplicar el alto K^+ ocurrieron muchos transitorios en ráfagas sobrepuestos a una meseta, con una duración de 2.6 ± 0.6 s y una frecuencia de 0.235 ± 0.13 Hz, que corresponde a 15 veces más que los eventos espontáneos de Ca^{2+} .

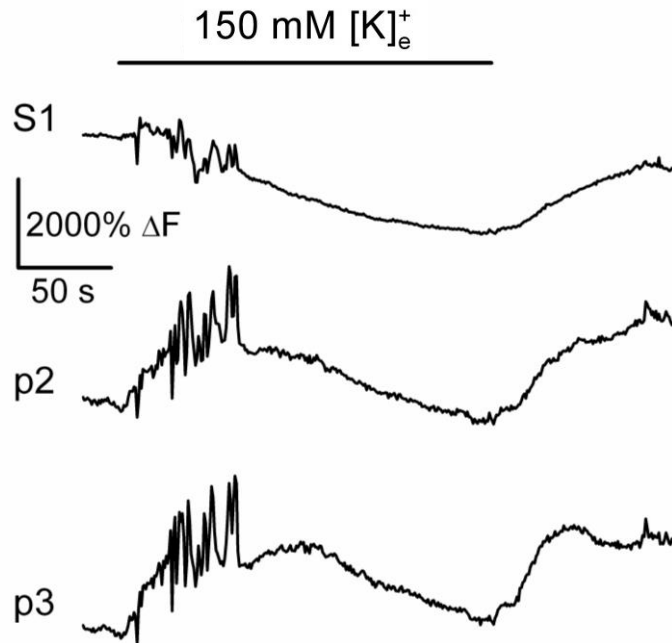


Figura 11. Variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de 150 mM de K^+ extracelular. Los tres trazos corresponden a las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en el soma y en las ramificaciones de un astrocito hipocampal completamente aislado en función del tiempo. La línea horizontal arriba indica el tiempo de exposición a alto K^+ (200 s).

4. DEPÓSITOS DE Ca^{2+} INTRACELULAR

4.1 RECEPTORES DE RIANODINA

El siguiente paso fue determinar si el Ca^{2+} contenido en los almacenes intracelulares (mitocondrias, retículo endoplásmico o aparato de Golgi) participa en las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$. Se incidió sobre la actividad de los receptores de rianodina, administrando diferentes concentraciones de rianodina. Se sabe que esta sustancia, a concentraciones menores a 10 μM , estimula estos receptores; mientras que a concentraciones mayores a 10 μM los inhiben (Parri et al., 2003).

La estimulación de los receptores de rianodina provocó principalmente transitorios con una amplitud de $21.1 \pm 2.9\%$ ($n = 5$). El bloqueo de estos receptores provocó la

disminución de la señal de Ca^{2+} en forma de mesetas, con una amplitud de $-54.26 \pm 7.1\%$ en el 79.76 % de los trazos ($n = 11$). En la Figura 12 se muestran los registros representativos de dos astrocitos hipocampales completamente aislados en presencia de 1 y 20 μM de rianodina. Los trazos de la izquierda de la Figura 12A corresponden al registro de un astrocito perfundido con solución extracelular (registro control), donde la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ varió espontáneamente en p4 de forma lenta y desincronizada. Este astrocito presenta pocos eventos espontáneos, ya que el registro dura 400 s a diferencia de los registros mostrados en las figuras 7 y 10. Sin embargo para las distintas pruebas, se registraron únicamente células con variaciones espontáneas en menos de 400 s antes de la aplicación de los fármacos.

Cuando se aplicó 1 μM de rianodina (trazos de en medio), la ramificación p2 presentó un incremento de Ca^{2+} en forma de onda lenta de apenas 9% de amplitud y la ramificación s3 se mantuvo sin cambios, sin embargo la ramificación p4 presentó tres transitorios de Ca^{2+} con una amplitud promedio durante la aplicación (207 s). Las líneas diagonales entre cada trazo indican una discontinuidad de 1 min en el registro.

Cuando se aplicaron 20 μM de rianodina en el mismo astrocito, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuyó en toda la célula con una amplitud promedio (trazos de la derecha). Lo mismo ocurre en el astrocito de la Figura 12B, donde la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuye en toda la célula. A pesar de que se observan pequeños transitorios de Ca^{2+} no fueron significativos.

Cuando se suspende la aplicación de 20 μM de rianodina se observa que el perfil de la actividad espontánea de Ca^{2+} se modifica en comparación con los trazos control, incrementando la frecuencia de los transitorios de Ca^{2+} durante los siguientes 200 s, véase amplificación en la Figura 12B. Estas variaciones espontáneas de Ca^{2+} tienen un perfil interesante, en el que se observa primero una pequeña disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, seguido de un incremento transitorio rápido y una onda lenta, repitiéndose varias veces.

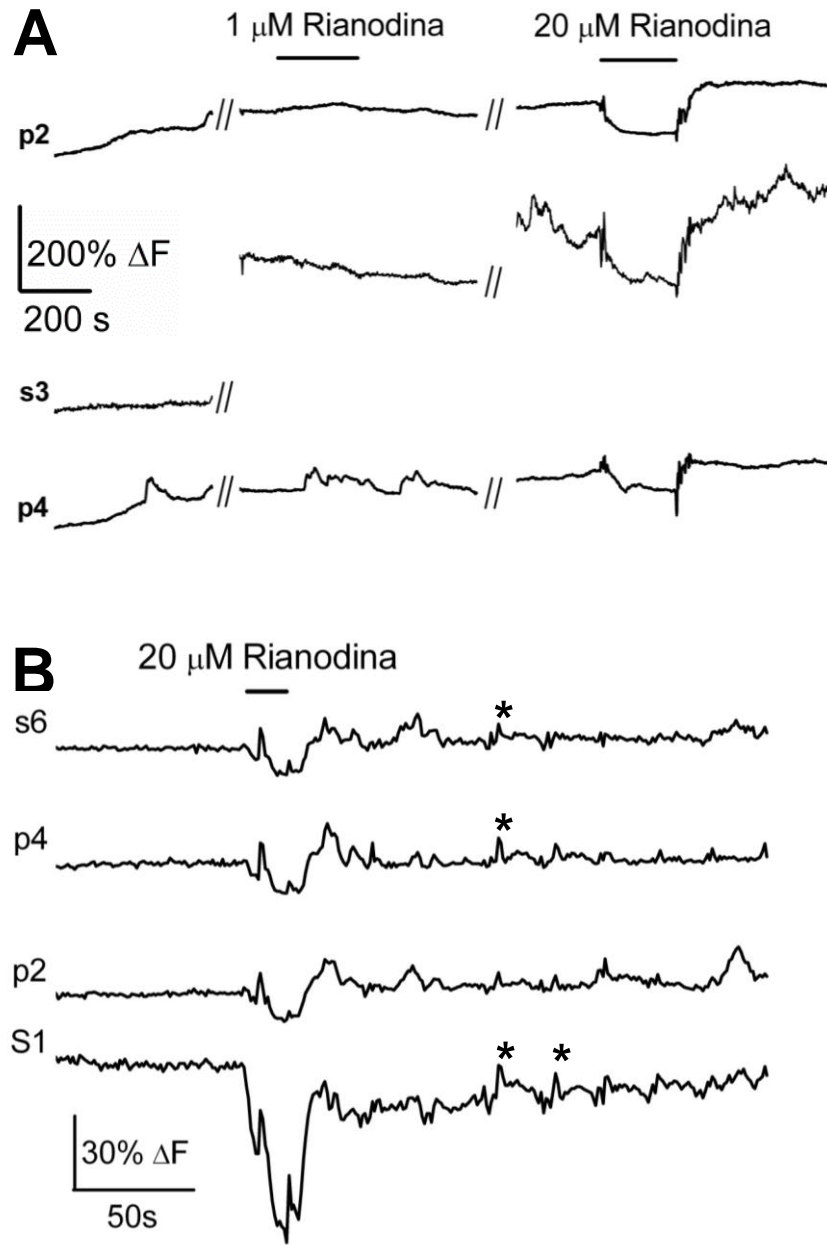


Figura 12. Participación de los receptores de rianodina en la modulación de las variaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A) Variaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ asincrónicas de un astrocito hipocampal completamente (trazos de la izquierda). La respuesta con el agonista se presentó en s3 y p4 (trazos de en medio). En presencia del antagonista se observan cambios transitorios durante una disminución de la señal de Ca^{2+} basal. Posterior a la aplicación del antagonista, a frecuencia de los eventos transitorios incrementó en comparación con el control (asteriscos). B) Amplificación de la respuesta de Ca^{2+} de otro astrocito en presencia del antagonista. Las barras de calibración aplican para todos los registros.

Con más detalle, en la Figura 12B se observan cambios transitorios durante una inhibición rápida de los receptores de rianodina en toda la célula. Cuando se retira el antagonista, se observan transitorios rápidos de Ca^{2+} seguidos de un incremento lento que se repiten con una frecuencia mayor al inicio del experimento (asteriscos). Por otro lado, el nivel basal en el soma se recupera más lentamente en comparación con las ramificaciones.

Es posible que el perfil oscilatorio durante la recuperación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se deba a la activación de otros mecanismos implicados. Por lo que el siguiente paso fue probar si estas variaciones fueron el resultado de la activación de los receptores de IP_3 . Se realizó un experimento en donde se provocaron los transitorios de Ca^{2+} aplicando el antagonista para receptores de rianodina durante un tiempo de ~50 s y justo después de la aparición de los transitorios se aplicaron 100 μM de 2-aminoetoxi-difenilborato (2-APB, por sus siglas en inglés) un antagonista de los receptores de IP_3 y de canales SOC.

La Figura 13 muestra los datos preliminares ($n = 1$), donde el bloqueo de los receptores de rianodina provoca una respuesta promedio, disminuyendo la señal de Ca^{2+} y la aplicación de 2-APB parece eliminar el perfil oscilatorio presente en la recuperación de la señal de Ca^{2+} . El soma S1 y la ramificación s5 del astrocito registrado presenta variaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mostradas en los trazos de la izquierda como registro control. En los trazos de la derecha, se observa que la aplicación de 20 μM de rianodina disminuye la señal de Ca^{2+} .

Durante la recuperación de la señal de Ca^{2+} se aplicaron 100 μM de 2-APB y se observaron solo dos picos al inicio de la aplicación sobrepuestos a una onda lenta, después la señal de Ca^{2+} vuelve a disminuir durante el resto de la aplicación.

El tiempo de exposición a 2-APB fue de 400 s, el cual es el tiempo necesario para saber si un astrocito presenta variaciones espontáneas y durante este tiempo se observó que

el antagonista de receptores de IP_3 , inhibe completamente cualquier señal de Ca^{2+} . Es posible que ambos receptores participen en la modulación de la actividad espontánea de Ca^{2+} .

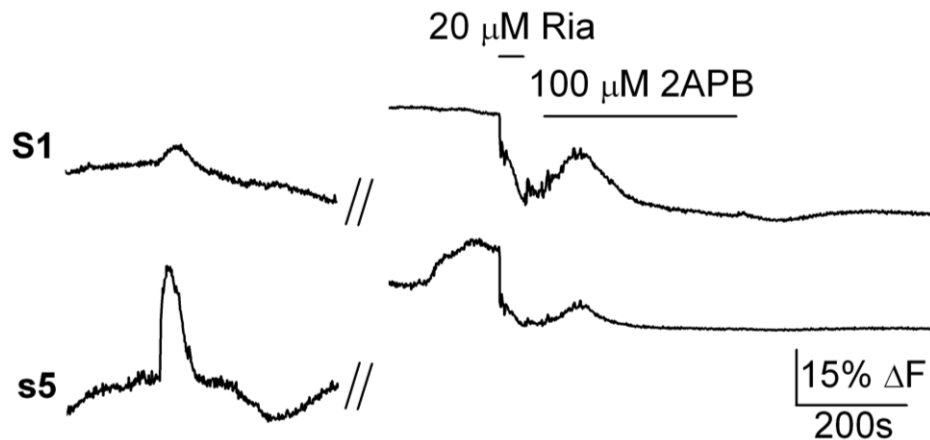


Figura 13. Acoplamiento de los receptores de rianodina e IP_3 para la modulación de las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$. Registro control del soma y la ramificación de un astrocito con variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ (trazos de la izquierda). Después de la aplicación de $20 \mu M$ de rianodina, se presentan transitorios de Ca^{2+} que son inhibidos por la aplicación del antagonista 2-APB de receptores de IP_3 (trazos de la derecha).

4.2 Receptores de IP_3

De acuerdo con los resultados de los experimentos anteriores, se realizaron otros experimentos para observar de manera independiente, la participación de los receptores de IP_3 en la generación de las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$. Los resultados preliminares con $50 \mu M$ de timerosal sugieren la presencia de receptores de IP_3 , ya que se observaron incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ de tipo meseta en el soma y de tipo transitorio en ramificaciones con una amplitud promedio de $87.93 \pm 10.8\%$ ($n = 1$). Por otro lado, el bloqueo de los receptores de IP_3 tiende a disminuir la señal de Ca^{2+} un $25.47 \pm 6.9\%$ de ΔF durante la aplicación de $100 \mu M$ de 2-APB ($n = 1$).

En la Figura 14 se muestran los datos preliminares de la estimulación de receptores de IP_3 . Los trazos del lado izquierdo corresponden a los registros con solución extracelular

control, en los que se observa que en 400 s, tanto el soma como las ramificaciones primarias y secundarias presentan variaciones espontáneas, siendo la ramificación p6 la de mayor actividad espontánea de Ca^{2+} , ya que presenta 4 incrementos transitorios de Ca^{2+} . Mientras que las ramificaciones p8 y s3, presentan ondas lentas. De manera interesante, la ramificación s3 presenta un evento espontáneo con el mismo perfil observado en los trazos de la derecha de la Figura 12.

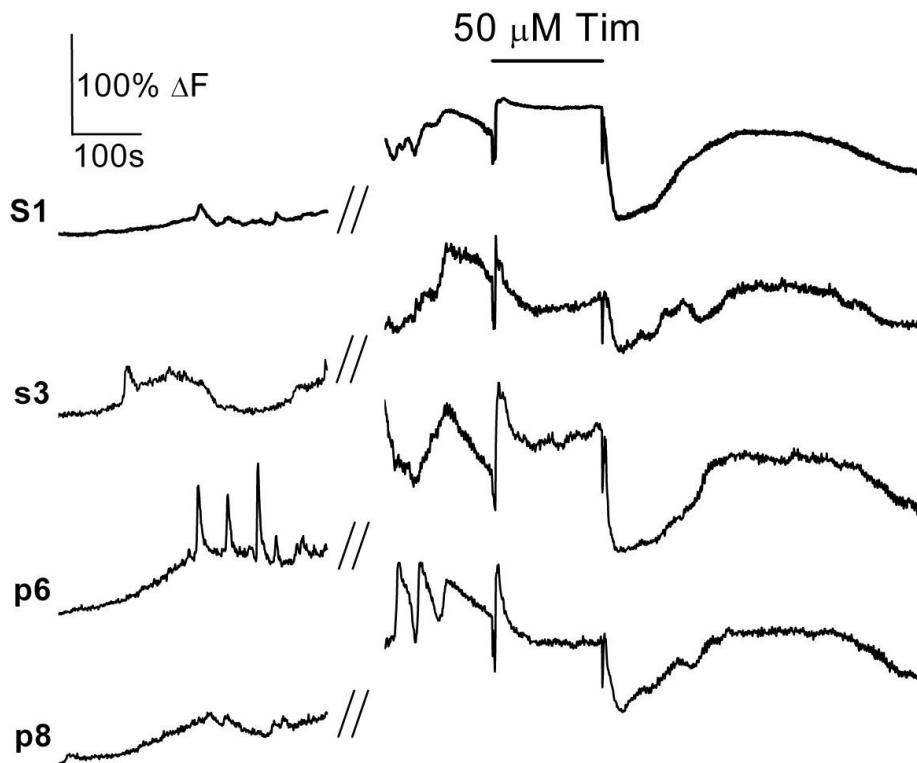


Figura 14. Actividad de los receptores de IP_3 de un astrocito completamente aislado. Los trazos de la izquierda corresponden a la actividad espontánea de Ca^{2+} , nótese que la ramificación s3 presenta un incremento transitorio seguido de una onda lenta que es asincrónico con el resto de la célula. Los trazos de la derecha corresponden a la activación receptores de IP_3 , en el soma se observa un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sostenido e incrementos rápidos y transitorios en el resto de la célula.

Los trazos de la derecha de la Figura 14, muestran tanto la presencia como la activación de los receptores de IP_3 por la aplicación de timerosal (Tim), agonista de

receptores de IP_3 . En el soma S1, incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ formando una meseta que se mantiene durante toda la aplicación. En el resto de la célula, también se observa una activación inmediata seguida de una disminución lenta en presencia del agonista, parecido a una desensibilización del receptor. En p6, la $[Ca^{2+}]_i$ varía muy poco con tendencia a aumentar hacia el final de la aplicación.

Enseguida se muestran los datos preliminares con el antagonista de receptores de IP_3 , 2-APB. En la figura 15 se observa que el astrocito registrado tiene actividad espontánea de Ca^{2+} , ya que en 400 s presenta al menos un transitorio de Ca^{2+} en todas las partes de la célula, véanse los trazos de la izquierda.

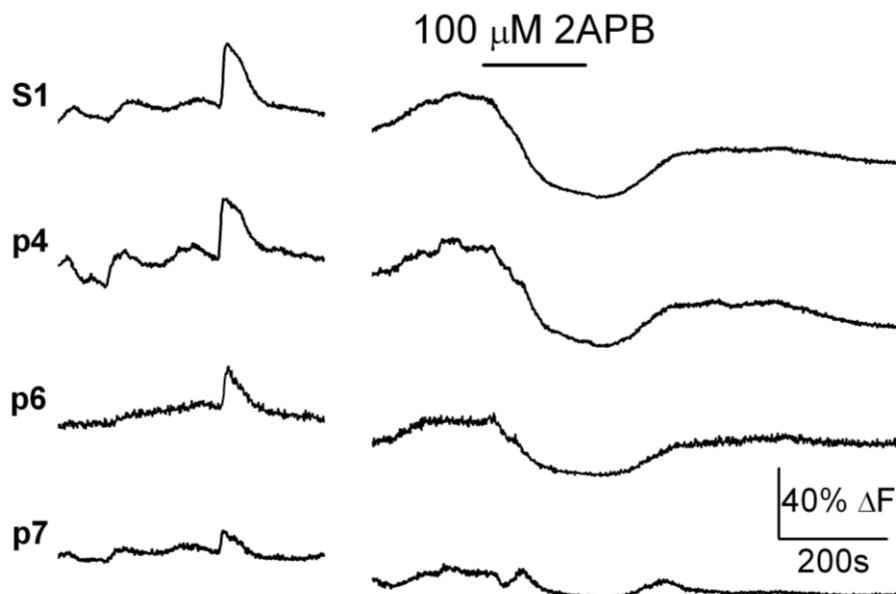


Figura 15. Participación de los receptores de IP_3 en la modulación de la actividad espontánea de Ca^{2+} . Un astrocito que presenta al menos un incremento espontáneo en todas sus regiones, siendo la ramificación p4 el de mayor actividad. Se observa sincronización entre ramificaciones y soma (trazos de la izquierda). La aplicación del antagonista de receptores de IP_3 bloquea las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$, excepto en la ramificación p7.

La aplicación de 100 μM de 2-APB durante 200 s, provocó una disminución lenta de la $[Ca^{2+}]_i$ principalmente. Sin embargo, en el último trazo se observó un pequeño

incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. Finalmente, la recuperación del nivel basal de la $[Ca^{2+}]_i$ formó una onda lenta en toda la célula. Lo anterior sugiere que el antagonista de los receptores de IP_3 bloquea el 75% de la actividad espontánea de Ca^{2+} .

4.3 SERCA, bomba de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico

Para determinar la participación tanto del retículo endoplásmico como de la bomba de Ca^{2+} , SERCA, en la modulación de las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$, se aplicaron dos antagonistas de la bomba de Ca^{2+} , ácido ciclopiazónico (ACP) y tapsigargina (Tap). La aplicación de ACP eliminó la actividad espontánea de Ca^{2+} , disminuyendo la señal de Ca^{2+} en forma de meseta con una amplitud de $-17.47 \pm 1.7\%$ en el 90.9% de los trazos ($n = 8$). Mientras que la aplicación de Tap disminuye la actividad espontánea de Ca^{2+} con una amplitud de $-34.2 \pm 12.8\%$ en el 64% de los trazos ($n = 13$).

En la Figura 16 se muestra un ejemplo de estos experimentos, los trazos de la izquierda corresponden a 800 s de registro control, donde se observan dos transitorios de Ca^{2+} , lo cual indica que el astrocito tiene actividad espontánea de Ca^{2+} . La aplicación de $10 \mu M$ de ACP provocó la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ en el soma, mientras que en las ramificaciones se observa que la señal de Ca^{2+} tiende a recuperarse durante la aplicación, pero continúa disminuyendo hacia el final de la misma. De manera interesante, en el resto del astrocito se observaron transitorios de Ca^{2+} con el nivel bajo de la $[Ca^{2+}]_i$ basal. Después de la aplicación se recupera el nivel de la $[Ca^{2+}]_i$ basal.

Al bloquear la bomba SERCA con ACP los almacenes intracelulares se vacían a través de los receptores de IP_3 (Golovina y Blaustein, 2000), lo cual elimina las señales espontáneas de Ca^{2+} , a pesar de que la $[Ca^{2+}]$ extracelular se mantiene en 2 mM , sugiriendo que el Ca^{2+} de los almacenes intracelulares capturado por la bomba SERCA es necesario para la generación de la actividad espontánea de Ca^{2+} en astrocitos completamente aislados.

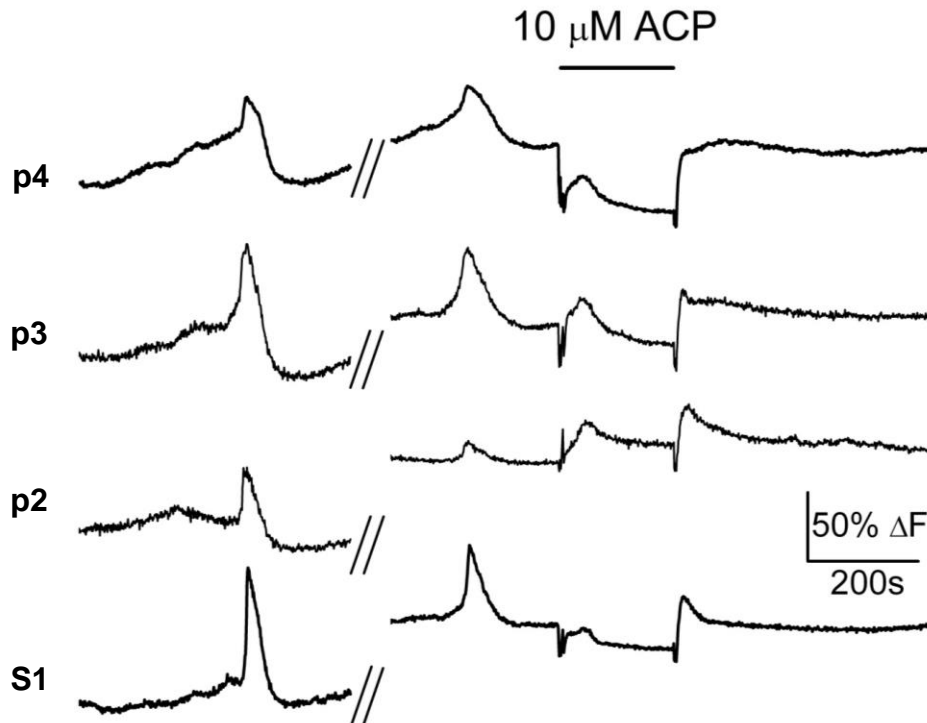


Figura 16. El bloqueo de la bomba de Ca^{2+} con ACP provoca el vaciamiento de los reservorios. Astrocito con dos incrementos transitorios (trazos de la izquierda), previos a la aplicación de 10 μM de ACP. En los trazos de la derecha, se observa que el antagonista de SERCA disminuye la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pero aumenta en p2 incluso en presencia de ACP.

Finalmente, en la Figura 17 se muestra un ejemplo de los experimentos con 20 μM de tapsigargina ($n = 13$). Se trata de un astrocito que presenta actividad espontánea en forma de incrementos lentos de Ca^{2+} con la solución extracelular control (trazos de la izquierda). En los trazos de la derecha se observa la respuesta del astrocito a 20 μM de Tap. La línea azul punteada indica de manera más clara, el inicio de la aplicación de este antagonista.

En las ramificaciones p2 y p3 se observa que 20 s antes de la aplicación del antagonista, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ comenzaba a aumentar, pero cuando se aplica tapsigargina la señal se mantiene a 20% con respecto a la basal y dura 50 s.

Asimismo, en el 36% de los astrocitos registrados, se presentaron incrementos de Ca^{2+} al inicio de la aplicación pero la señal de Ca^{2+} disminuye posteriormente de manera lenta durante la aplicación del antagonista. Por otra parte, en la ramificación p1 y el soma S1 se observan pequeños incrementos de Ca^{2+} (5 y 14% de ΔF , respectivamente) que se presentan 10 s después.

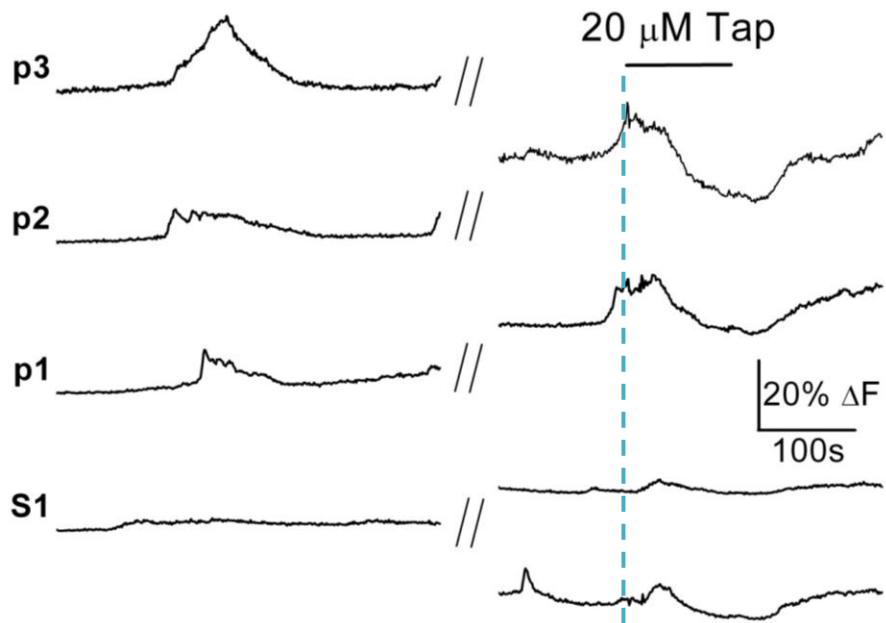


Figura 17. Diferentes perfiles de la actividad de Ca^{2+} en presencia de tapsigargina. Astrocito con actividad espontánea de Ca^{2+} en forma de incrementos lentos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y sincronizados, trazos de la izquierda. Durante la aplicación de tapsigargina (Tap), el astrocito presenta incrementos de Ca^{2+} lentos y después disminuye lentamente en presencia de Tap. Respuesta observada en el 93% de los experimentos.

DISCUSIÓN

Se le llama actividad espontánea de Ca^{2+} a las variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que no dependen o que no son consecuencia de estímulos principalmente neuronales. La actividad espontánea de Ca^{2+} intracelular en astrocitos se han observado en cultivos confluentes (Fatatis y Russell, 1992; Schipke et al., 2008; Wang et al., 2006), en rebanadas de cerebro (Aguado et al., 2002; Nett et al., 2002; Parri et al., 2001; Parri y Crunelli, 2003; Schipke et al. 2008; Tashiro et al., 2002) y en el cerebro vivo (Hirase et al., 2004).

Para estudiar estos eventos, las células se diferencian morfológicamente y se bloquean los potenciales de acción. Además, la frecuencia de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es un parámetro importante para diferenciar la actividad espontánea de Ca^{2+} de astrocitos de la de neuronas. Sin embargo, se sabe que los astrocitos no sólo interactúan con neuronas, sino que también lo hacen con otros tipos celulares, como células endoteliales, oligodendrocitos y microglía (Nag, 2011). Así, en una red celular tan compleja como el cerebro, en donde existen estímulos de tipo químico, eléctrico o incluso mecánico, el estudio de las variaciones espontáneas de Ca^{2+} en astrocitos es una tarea complicada.

En este trabajo se muestra que los astrocitos completamente aislados, presentan variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como una propiedad intrínseca, se generan de manera espontánea e independiente a los estímulos del microambiente. Se ha observado que la actividad de Ca^{2+} de los astrocitos es modulada por la estimulación neuronal y de manera contraria, que los astrocitos pueden modular la respuesta neuronal a través de su actividad de Ca^{2+} (Lee y Haydon, 2011). Sin embargo, la estimulación glutamatérgica sólo incrementa la distancia de propagación y la duración de un evento de Ca^{2+} astrocítico, sin generar nuevos eventos ni incrementar su frecuencia (Wu et al., 2014).

La dinámica de Ca^{2+} es la herramienta básica con la que los astrocitos interactúan con el ambiente (Verkhratsky et al., 2012); y en condiciones completamente aisladas, las

variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ se presentan en el 66% de los astrocitos registrados, similar a lo observado en rebanadas de hipocampo, donde el 64% de los astrocitos presentaron actividad espontánea de Ca^{2+} (Nett et al., 2002).

La frecuencia de las variaciones espontáneas de Ca^{2+} difiere en cada preparación. En astrocitos completamente aislados fue de 0.015 ± 0.003 Hz, mientras que en el cerebro vivo la frecuencia de los eventos fue de 0.002 Hz (Hirase et al., 2004). En este trabajo, se encontró que los eventos transitorios son los más frecuentes en comparación con las ondas lentas y las mesetas. En el cerebro vivo los eventos en meseta son más frecuentes.

Las variaciones de Ca^{2+} suelen clasificarse por su duración, pero tratándose de eventos espontáneos, la duración es otro parámetro que varía en cada preparación. Por ejemplo, en rebanadas de cerebro se observan picos únicos, oscilaciones, oscilaciones superpuestas, transitorios de Ca^{2+} seguidos de mesetas y mesetas con oscilaciones superpuestas (Schipke et al., 2008). Aquí, los tres tipos de eventos espontáneos (transitorios, ondas lentas y mesetas) se presentan en todas las regiones de la célula, pero en las ramificaciones, los eventos transitorios ocurren con mayor frecuencia. Los eventos transitorios pueden presentarse como: 1) picos únicos, localizados y asincrónicos, 2) picos sincronizados y 3) picos secuenciados con otros eventos incluso con ondas lentas y mesetas.

En estudios de células estimuladas, se ha observado que los eventos únicos y localizados se deben a la apertura de una pequeña cantidad de receptores de IP_3 en una pequeña región del retículo endoplásmico y que no se propagan (Barhoumi et al., 2010). Sin embargo, un nivel constante de IP_3 o de Ca^{2+} en el citosol provoca la apertura de otros canales de Ca^{2+} cercanos, liberando más Ca^{2+} al citosol (Verkhatsky et al., 2012). Ambos tipos de eventos se observaron en este trabajo, sugiriendo el mismo mecanismo de activación pero de manera espontánea. Asimismo, algunos trabajos sugieren que la sincronía de la actividad espontánea de Ca^{2+} astrocítica favorece la integración celular (Aguado et al., 2002).

El mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} , suele formar una onda que se propaga y amplifica a lo largo de la célula (Barhoumi et al., 2010; Berridge, 2012). Aquí se observó que los eventos de Ca^{2+} secuenciados forman parte de una señal que se propaga a lo largo de la célula en forma de una onda. Esta señal de Ca^{2+} se origina en una región específica del astrocito, recorre la célula provocando incrementos de Ca^{2+} en las regiones vecinas, hasta finalizar en un punto distinto.

Los eventos sostenidos tipo meseta se podrían formar por la suma de muchos transitorios rápidos y suelen estar secuenciados con otros eventos. Tanto la formación de mesetas como la propagación de una señal de Ca^{2+} son eventos poco frecuentes en astrocitos completamente aislados, sugiriendo que la formación de mesetas favorece la propagación de la señal de Ca^{2+} . Así, la probabilidad de que una señal de Ca^{2+} se propague en el citoplasma de un astrocito completamente aislado es baja. En contraste, en el cerebro vivo los eventos largos tipo meseta ocurren con mayor frecuencia en comparación con eventos cortos, sugiriendo que la cantidad de estímulos del microambiente provocan la formación de eventos más largos (Hirase et al., 2004). De manera similar, se ha observado que los astrocitos que reciben estímulos de terminales glutamatérgicas, incrementan la duración de los eventos espontáneos de Ca^{2+} y su distancia de propagación. De modo que, todos los eventos aislados están correlacionados entre sí y forman parte de una señal de Ca^{2+} que se propaga, llevando información de manera continua hacia células vecinas (Wu et al., 2014).

De manera interesante, en astrocitos completamente aislados la señal de Ca^{2+} viaja en una dirección específica. Algunos estudios muestran que en las zonas donde las ramificaciones astrocíticas hacen contacto con las sinapsis, la membrana plasmática se une a la membrana del retículo endoplásmico formando unidades activas llamadas microdominios PL-jER (por sus siglas en inglés). En las membranas que forman las unidades activas se expresan canales de alta y baja afinidad a Ca^{2+} , que remueven este ion después de una activación (Blaustein et al., 2002). ¿Es posible que estos microdominios tracen la dirección de la señal de Ca^{2+} en astrocitos completamente

aislados? Si fuera así, posiblemente la formación de estas unidades activas ocurriría de manera aleatoria pero predeterminada y se modificarían al encontrar una zona receptora.

Por otra parte, la población de mitocondrias y del retículo endoplásmico en astrocitos, es más densa en el área perinuclear que en la periferia (Collins et al., 2002; Golovina y Blaustein, 1997; Pivneva et al., 2008). En astrocitos completamente aislados, los eventos espontáneos de Ca^{2+} son más frecuentes en las ramificaciones, posiblemente debido a la distribución del retículo endoplásmico. Lo anterior es factible, ya que a pesar de que la apertura de canales de Ca^{2+} acoplados a almacenes intracelulares permite la entrada de grandes cantidades de Ca^{2+} (Verkhatsky et al., 2012), en rebanadas de cerebro no se aprecia un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, debido a que el retículo endoplásmico se expresa cerca de la membrana plasmática; a diferencia de astrocitos en cultivo, donde se aprecia un claro incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ya que el retículo endoplásmico está distribuido en el área perinuclear (Pivneva et al., 2008).

Asimismo, en cultivos de astrocitos corticales se han observado microdominios de recaptura de Ca^{2+} , independientes a la bomba SERCA, alternados con microdominios de liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares (Laskey et al., 1998). Es posible que los microespacios que se omiten cuando la señal de Ca^{2+} se propaga, se deban a la expresión alternada de estas proteínas.

Así, la heterogeneidad morfológica de las mitocondrias, la distribución de las proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} y los microalmacenes de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico pueden asociarse con propiedades funcionales distintas (Collins et al., 2002; Golovina y Blaustein, 1997; Pivneva et al., 2008; Verkhatsky et al., 2012).

Por otra parte, en astrocitos completamente aislados, un estímulo mecánico no fue suficiente para modificar el perfil de la señal espontánea de Ca^{2+} . De manera similar, en rebanadas corticales sin perfusión se observan señales espontáneas de Ca^{2+} con cinco

perfiles diferentes, que suceden preferentemente de manera asincrónica (Schipke et al., 2008).

El perfil de la señal espontánea de Ca^{2+} se modificó tras la despolarización de la membrana plasmática de astrocitos completamente aislados, sugiriendo la participación del Ca^{2+} extracelular y de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje. Es factible lo anterior, ya que se ha observado que la actividad espontánea de Ca^{2+} ocurre a valores muy cercanos al potencial de membrana; además, las variaciones de este potencial incrementan la frecuencia de los eventos espontáneos de Ca^{2+} , sugiriendo la participación de canales de Ca^{2+} tipo L y N (Zeng et al., 2009). Además, al bloquear los canales activados por voltaje se eliminan las variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Aguado et al., 2002).

El Ca^{2+} liberado por los almacenes intracelulares a través de los receptores de IP_3 y rianodina, activa canales transmembranales que permiten la entrada capacitiva de Ca^{2+} para rellenar los almacenes, a través del acoplamiento conformacional de ambos canales en microdominios PL-jER (Dirksen et al., 2009). Por ejemplo, en el músculo esquelético, los receptores de rianodina e IP_3 se acoplan a canales TRP tipo 3 y son mutuamente excluyentes (Kiselyov et al., 2000). En este trabajo, el antagonismo de receptores de rianodina provoca una disminución de los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} , sugiriendo que el Ca^{2+} liberado por estos receptores es necesario para activar canales SOC y que no existen vías alternas para contrarrestar este efecto. Sin embargo no se descarta la posibilidad de la participación de los receptores de IP_3 , ya que el antagonismo de los receptores de rianodina también disminuye la liberación de Ca^{2+} vía receptores de IP_3 (MacMillan et al., 2005).

La apertura de los receptores de IP_3 también es dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se activan a concentraciones de Ca^{2+} muy bajas (100 – 300 nM) y se cierran a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mayores (Dickson et al., 2013). Es posible que el componente oscilatorio observado tras el antagonismo de los receptores de rianodina, se deba a la activación de receptores de IP_3 , el cual se elimina con 2-APB sin disminuir el nivel basal de Ca^{2+} . Además, en el

musculo liso se ha observado que el Ca^{2+} liberado por receptores de rianodina puede activar receptores de IP_3 , y no al contrario (MacMillan et al., 2005). Este perfil puede ser una particularidad de astrocitos completamente aislados, ya que en otras preparaciones no se observa la participación de los receptores de rianodina, incluso en cultivos confluentes de astrocitos hipocampales (Wang et al., 2006).

Por otra parte, tanto en rebanadas de cerebro como en cultivos confluentes de astrocitos de varias regiones del cerebro, se considera que los receptores de IP_3 son la vía principal para el control de la actividad espontánea de las señales de Ca^{2+} (Parri et al., 2003; Wang et al., 2006). En astrocitos completamente aislados, tanto la inhibición como la estimulación de los receptores de IP_3 modifican la actividad espontánea de Ca^{2+} sugiriendo la participación de estos receptores. A pesar de que el 2-APB bloquea los canales SOC, la inhibición de los receptores con heparina disminuye la entrada de Ca^{2+} por SOC, debido al acoplamiento conformacional entre ambos canales (Dirksen et al., 2009).

Los astrocitos expresan receptores de IP_3 tipo II en varias regiones del cerebro incluyendo el hipocampo, una de las áreas del cerebro con mayor cantidad de astrocitos (Hertle y Yeckel, 2007; Savchenko et al., 2000). En ratones transgénicos, el receptor de IP_3 tipo II es funcional e importante para la generación de la señalización de Ca^{2+} ; además, se relaciona principalmente con los procesos de aprendizaje y memoria (Navarrete et al., 2012). En contraste, la isoforma III del receptor de rianodina, que se expresa en astrocitos, se relaciona con procesos celulares como la migración astrocítica (Matyash et al., 2002). Estas premisas sugieren que, aun en condiciones aisladas, se conservan gran parte de los mecanismos asociados a la liberación de Ca^{2+} , principalmente aquellos relacionados con procesos complejos como la comunicación neurona-glía, y no sólo con procesos celulares elementales como la supervivencia celular.

El vaciamiento de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} con ACP (inhibidor de SERCA) elimina las variaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en astrocitos completamente aislados.

Debido a que el ACP provoca la liberación de Ca^{2+} vía receptores de IP_3 (Golovina y Blaustein, 1997), los resultados sugieren que el Ca^{2+} liberado por estos receptores es necesario para generar la actividad espontánea en astrocitos completamente aislados. Además el antagonismo con tapsigargina, también provocó incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y es posible que se deba a la activación de canales Orai1. Los astrocitos expresan la proteína STIM1 y canales Orai1, que se activan por el vaciamiento de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} posterior al bloqueo de SERCA con tapsigargina. La oligomerización de STIM1 en la membrana del retículo endoplásmico y su posterior acoplamiento conformacional con los canales Orai1 de la membrana plasmática, activa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales Orai1 (Motiani et al., 2013), lo cual podría sugerir que estos canales participan en la actividad espontánea de Ca^{2+} en astrocitos completamente aislados.

La dinámica de Ca^{2+} de astrocitos es un sistema complejo en el cual, un astrocito en condiciones aisladas, utiliza gran parte de su maquinaria para generar actividad espontánea en forma de incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, acoplando las respuestas de varios canales de Ca^{2+} , mientras que en otras preparaciones la participación de los receptores de IP_3 es la única vía. En condiciones completamente aisladas, el IP_3 sigue siendo el contribuyente mayoritario en la generación de la actividad espontánea de Ca^{2+} . Por lo que este método, podría ser útil para el estudio de la dinámica de Ca^{2+} .

Es sorprendente que la señalización de Ca^{2+} de un astrocito completamente aislado conserve el mismo perfil que en un ambiente lleno de estímulos y que la señal puede viajar aleatoriamente en todas direcciones sin un estímulo previo, sugiriendo que la dinámica de Ca^{2+} no depende de los estímulos del microambiente.

Si las señales espontáneas de Ca^{2+} son independientes a estímulos neuronales ¿por qué la señal viaja con una dirección?, ¿existe direccionalidad en el cerebro intacto?, ¿la dirección de la señal correlaciona con las zonas activas entre astrocitos y neuronas?, ¿o el astrocito estaría simplemente en el momento y lugar indicado para interactuar con las neuronas a través de señales espontáneas de Ca^{2+} con perfiles específicos?, ¿es

posible que las sinapsis sean atraídas a regiones astrocíticas con actividad espontánea de Ca^{2+} ?

CONCLUSIÓN

Un astrocito en condiciones completamente aisladas tiene la propiedad intrínseca de generar variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$. La señal de Ca^{2+} se genera de manera aleatoria, está integrada por varios eventos individuales y se propaga a lo largo de la célula en una dirección específica pero independiente al microambiente. Los receptores de IP_3 son el principal mecanismo para generar señales de Ca^{2+} . Sin embargo, en condiciones completamente aisladas, se acopla con receptores de rianodina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA y Soriano E. 2002. Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes *in situ*. *J. Neurosci.* 22, 9430-9444.

Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiacco TA, McCarthy KD. 2008. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron.* 59, 932-946.

Álvarez-Buylla A y Garcia-Verdugo JM. 2002. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *J. Neurosci.* 22, 629-634.

Arias C, Zepeda A, Hernández- Ortega, Leal-Galicia P, Lojero C y Camacho-Arroyo. 2009. Sex and estrous cycle-dependent differences in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the adult rat hippocampus. *Horm. Behav.* 55, 257-263.

Barhoumi R, Qian Y, Burghardt RC y Castiglioni ET. 2010. Image analysis of Ca^{2+} signals as a basis for neurotoxicity assays: Promises and challenges. *Neurotoxicol Teratol.* 32, 16-24.

Benfenati V, Amiry-Moghaddam M, Caprini M, Mylonakou MN, Rapisarda C, Ottersen OP y Ferroni S. 2007. Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid-related channel 4 (TRPV4) in rat cortical astrocytes. *Neuroscience.* 148, 876-892.

Berridge MJ, Bootman MD y Roderick HL. 2003. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 517-529.

Berridge MJ. 2012. Calcium signaling remodeling and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 297-309.

Blaustein MP, Juhaszova M, Goovina VA, Church PJ y Stanley EF. 2002. Na/Ca Exchanger and PMCA localizacion in neurons and astrocytes. Functional implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 976, 356-366.

Bushong EA, Martone ME y Ellisman MH. 2004. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 73-86.

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ y Ellisman MH. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22, 183-192.

Catalani A, Sabbatini M, Consoli C, Cinque C, Tomassoni D, Azmitia E, Angelucci L y Amenta F. 2002. Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mech. Ageing. Dev.* 123, 481-490.

Cayre M, Canoll P y Goldman JE. 2009. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 88, 41-63.

Cedazo MA y Cowburn RF. 2001. Apolipoprotein E: A major piece in the Alzheimer's disease puzzle. *J. Cell. Mol. Med.* 5, 254-266.

Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P y Bootman MD. 2002. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* 21, 1616-1627.

Cuoghi B y Mola L. 2009. Macroglial cells of the teleost central nervous system: a survey of the main types. *Cell Tissue Res.* 338, 319-332.

Dickson EJ, Falkenburger BH y Hille B. 2013. Quantitative properties and receptor of the IP₃ and calcium branch of Gq-coupled receptor signaling. *J. Gen. Physiol.* 141, 521-535.

Dirksen RT. 2009. Checking your SOCCs and feet: the molecular mechanisms of Ca^{2+} entry in skeletal muscle. *J. Physiol.* 587, 3139-3147.

Doetsch F, García-Verdugo JM y Álvarez-Buylla A. 1999. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 11619-11624.

Emsley JG y Macklis JD. 2006. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol.* 2, 175-186.

Fatatis A y Russell JT. 1992. Spontaneous changes in intracellular calcium concentration in type I astrocytes from rat cerebral cortex in primary culture. *Glia.* 5, 95-104.

Freeman MR. 2010. Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science.* 330, 774-778.

Gee JR y Keller JN. 2005. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1145-1150.

Golovina VA y Blaustein MP. 1997. Spatially and functionally distinct Ca^{2+} stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science.* 275, 1643-1648.

Hanani M. 2010. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: In search of function. *Brain Res. Rev.* 64, 304-327.

Hertle DN y Yeckel MF. 2007. Distribution of inositol-1, 4, 5-triphosphate receptor isoforms and ryanodine receptors isoforms during maturation of the rat hippocampus. *Neuroscience.* 150, 625-638.

Hirase H, Qian L, Bartho P y Buzsaki G. 2004. Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS. Biol.* 2, 494-499.

Jinno S. 2011. Regional and laminar differences in antigen profiles and spatial distributions of astrocytes in the mouse hippocampus, with reference to aging. *Neuroscience*. 180, 41-52.

Kettenmann H y Verkhratsky A. 2011. Neuroglia-living nerve glue. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 79, 588-597.

Kimoto H, Eto R, Abe M, Kato H, Araki T. 2009. Alteration of glial cells in the mouse hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol*. 29, 1181-1189.

Kiselyov KI, Shin DM, Wang Y, Pessah IN, Allen PD y Muallem S. 2000. Gating of store-operated channels by conformational coupling to ryanodine receptors. *Mol. Cell*. 6, 421-431.

Krawczyk A y Jaworska-Adamu J. 2010. Synantocytes: the fifth type of glia? In comparison with astrocytes. *Folia Histochem. Cytobiol*. 48, 173-177.

Laskey AD, Roth BJ, Simpson PB y Russell JT. 1998. Images of Ca^{2+} flux in astrocytes: evidence for spatially distinct sites of Ca^{2+} release and uptake. *Cell Calcium*. 23, 423-432.

Lee SY y Haydon PG. 2011. A cytokine dependent switch for glial-neuron interactions. *Neuron*. 69, 835-837.

MacMillan D, Chalmers S, Muir TC y McCarron JG. 2005. IP_3 -mediated Ca^{2+} increases do not involve the ryanodine receptor, but ryanodine receptor antagonists reduce IP_3 -mediated Ca^{2+} increases in guinea-pig colonic smooth muscle cells. *J. Physiol*. 569, 533-544.

Malatesta P, Hartfuss E y Götz M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*. 127, 5253-5263.

Matyash M, Matyash V, Nolte C, Sorrentino V y Kettenemann H. 2002. Requirement of functional ryanodine receptor type 3 for astrocyte migration. *FASEB J*. 16, 1-25.

Motiani RK, Hyzinski-García MC, Zhang X, Henkel MM, Abdullaev IF, Kuo YH, Matrougui K, Mongin AA y Trebak M. 2013. STIM1 y Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Eur. J. Physiol*. 465, 1249-1260.

Nag S. 2011. Morphology and properties of astrocytes. *Methods. Mol. Biol*. 686, 69-100.

Navarrete M, Perea G, Fernández de Sevilla D, Gómez-González M, Núñez A, Martín ED, Araque A. 2012. Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol*. 10, 1-12.

Nedergaard M, Ransom B y Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. 26, 523-530.

Nedergaard M, Rodríguez JJ y Verkhratsky A. 2010. Glial calcium and diseases of the nervous system. *Cell Calcium*. 47, 140-149.

Nett WJ, Oloff SH y McCarthy KD. 2002. Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J. Neurophysiol*. 87, 528-537.

Newman EA. 2003. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J. Neurosci*. 23, 1659-1666.

Oberheim NA, Goldman SA y Nedergaard M. 2012. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol. Biol*. 814, 23-45.

Parri HR y Crunelli V. 2003. The role of Ca²⁺ in the generation of spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations. *Neuroscience*. 120, 979-992.

Parri HR, Gould TM y Crunelli V. 2001. Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat. Neurosci.* 4, 803-812.

Pichon Y, Prime L, Benquet P y Tiaho F. 2004. Some aspects of the physiological role of ion channels in the nervous system. *Eur. Biophys. J.* 33, 211-226.

Pivneva T, Haas B, Reyes-Haro D, Laube G, Veh, RW, Nolte C, Skibo G y Kettenmann H. 2008. Store-operated Ca²⁺ entry in astrocytes: Different spatial arrangement of endoplasmic reticulum explains functional diversity *in vitro* and *in situ*. *Cell Calcium* 43, 591-601.

Reyes-Haro D, Mora-Loyola E, Soria-Ortiz B y García-Colunga J. 2013. Regional density of glial cells in rat corpus callosum. *Biol. Res.* 46, 27-32.

Rowitch DH y Kriegstein AR. 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*. 468, 214-222.

Santello M, Bezzi P, Volterra A. 2011. TNF α controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal. *Neuron*. 69, 988-1001.

Savchenko VL, McKanna JA, Nikonenko IR, Skibo GG. 2000. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience*. 96, 195-203.

Schipke CG y Kettenmann H. 2008. Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia*. 47, 226-232.

Sharma G y Vijayaraghavan S. 2001. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98, 4148-4153.

Tashiro A, Goldberg J y Yuste R. 2002. Calcium oscillations in neocortical astrocytes under epileptiform conditions. J. Neurobiol. 50, 45-55.

Verkhratsky A, Orkand RK y Kettenmann H. 1998. Glial calcium: Homeostasis and signaling function. Physiol Rev. 78, 99-141.

Verkhratsky A, Rodríguez JJ y Parpura V. 2012. Calcium signalling in astroglia. Mol. Cell. Endocrinol. 353, 45-56.

Vermeiren C, Najimi M, Maloteaux JM y Hemans E. 2005. Molecular and functional characterization of glutamate transporters in rat cortical astrocytes exposed to a defined combination of growth factors during *in vitro* differentiation. Neurochem. Int. 46, 137-147.

Walz W. 2000. Controversy Surrounding the Existence of Discrete Functional Classes of Astrocytes in Adult Gray Matter. Glia. 31, 95-103.

Wang TF, Zhou C, Tang AH, Wang SQ y Chai Z. 2006. Cellular mechanism for spontaneous calcium oscillations in astrocytes. Acta. Pharmacol. Sin. 27, 861-868.

Wilhemsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V y Terada M. 2006. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103, 17513-17518.

Xu H, Yang Y, Tang X, Zhao M, Liang F, Xu P, Hou B, Xing Y, Bao X y Fan X. 2013. Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. Mol. Neurobiol. 47, 833-844.

Zeng S, Li B, Zeng S y Chen S. 2009. Simulation of spontaneous Ca^{2+} oscillations in astrocytes mediated by voltage-gated calcium channels. *Biophys. J.* 97, 2429-2437.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. La gliogénesis en zonas progenitoras desde la edad embrionaria a la edad adulta.....	4
Figura 2. Astrocitos protoplásmicos del <i>stratum radiatum</i> de la región CA1 del hipocampo.....	9
Figura 3. Mecanismos de la señalización de Ca^{2+} en astrocitos.....	16
Figura 4. Mecanismo de liberación de gliotransmisores a través de la estimulación de receptores metabotrópicos	17
Figura 5. Astrocitos en cultivo de la región CA1 del hipocampo, completamente aislados.....	30
Figura 6. Perfiles diferentes de eventos espontáneas de Ca^{2+}	31
Figura 7. Variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos de hipocampo.....	33
Figura 8. Ejemplificación de una señal de Ca^{2+} espontánea que se propaga a lo largo de la célula.....	35
Figura 9. Eventos transitorios, ondas lentas y mesetas en astrocitos completamente aislados sin perfusión.....	37
Figura 10. Variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en un astrocito sin perfusión.....	39
Figura 11. Variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de 150 mM de K^+ extracelular.....	41
Figura 12. Participación de los receptores de rianodina en la modulación de las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$	43
Figura 13. Acoplamiento de los receptores de rianodina e IP_3 en la modulación de las variaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$	45
Figura 14. Presencia de los receptores de IP_3 activos.....	46
Figura 15. Participación de los receptores de IP_3 en la modulación de la actividad espontánea de Ca^{2+}	47
Figura 16. El bloqueo de la bomba SERCA con ACP provoca el vaciamiento de los almacenes.....	49
Figura 17. Diferentes perfiles de la actividad espontánea de Ca^{2+} en presencia de	

Tap.....

APÉNDICE I. ABREVIATURAS

(2 – Aminoetoxi) Difenil borato	2 - APB
Ácido ciclopiazónico	ACP
Adenosina-1, 4, 5-trifosfato	ATP
Bomba de calcio del retículo endo – sarcoplásmico	SERCA
Calcio	Ca ²⁺
Canales de calcio activados por voltaje	VGCC
Concentración de calcio	[Ca ²⁺]
Concentración de calcio extracelular	[Ca ²⁺] _e
Concentración de calcio intracelular	[Ca ²⁺] _i
Concentración de potasio extracelular	[K ⁺] _e
Día embrionario	E
Día postnatal	P
Incremento de la intensidad de fluorescencia relativa	% ΔF
Inositol 5'trifosfato	IP ₃
Liberación de calcio inducido por calcio	CICR
Potasio	K ⁺
Primario	p
Proteína ácido glicofibrilar	GFAP
Receptor de IP ₃	R-IP ₃
Receptor de rianodina	R-Ria
Rianodina	Ria
Secundario	s
Soma	S
Tapsigargina	Tap
Timerosal	Tim