



186
2 ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE LOS RECEPTORES A
AMINOACIDOS EXCITADORES EN CELULAS GLIALES
DE LA RETINA DE POLLO EN CULTIVO

TRABAJO DE TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA

MONICA ROMO DE VIVAR VILLASANA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUNIO DE 1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	página
I - ABREVIATURAS.....	6
II- INTRODUCCION.....	8
1 - MORFOLOGIA Y CLASIFICACION DE LAS CELULAS GLIALES.....	8
2 - FUNCIONES DE LA GLIA.....	11
a) En el Sistema Nervioso Central.....	11
b) En la retina.....	12
3 - LOS RECEPTORES EN LAS CELULAS GLIALES Y SU POSIBLE PARTICIPACION EN LA TRANSMISION.....	16
4 - RECEPTORES A AMINOACIDOS EXCITADORES.....	19
A) En el Sistema Nervioso Central.....	19
- Clase I Receptores ionotrópicos de respuesta rápida.....	20
- Clase II Receptores metabotrópicos de respuesta lenta.....	20
- Receptores de NMDA.....	21
- Receptores tipo no-NMDA.....	24
- Receptores a ácido Kainico.....	24
- Receptores a ácido quisquálico.....	26
- Receptores tipo APB.....	26
b) En la retina de los vertebrados.....	23
II - OBJETIVO.....	30
III - MATERIALES Y METODOS.....	31
IV - RESULTADOS.....	39
- Efecto de la concentración de proteína sobre la unión del ligando.....	39
- Comparación de receptores para L-aspartato-H ⁺ en células gliales y neuronas durante la diferenciación "in vitro".....	39
- Efecto de la temperatura y del Na ⁺	41
- Curva de saturación de la unión de L-aspartato-H ⁺ en glia.....	43
- Curva de saturación para L-aspartato-H ⁺ en neuronas.....	44

- Farmacología de la unión de L-aspartato-H⁺ a
membranas de glia47

V - DISCUSION.....51

VI - BIBLIOGRAFIA.....59

ABREVIATURAS:

ACC.- 1-amino-ciclopropano-carboxilato.

Agonista inverso.- Sustancia que por si sola tiene efectos opuestos al agonista y al aplicarse junto con el agonista reduce el efecto de este (Richards, et al., 1986).

AMOG.- "Adhesion molecule on glia" (Molécula de adhesión glial).

AMP.- Adenosin monofosfato.

AMPA.- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato.

APB.- Acido 2-amino-4-fosfonobutirico.

APH.- D ó L-amino-7-fosfonoheptanoato.

APV.- D ó L-2-amino-7-fosfonovalerato.

BSA.- Sero albúmina de bovino.

I 2-CA.- Indol-2-carboxilato.

CGS-19755.- Acido Cis-4-(fosfometil-2-piperidin carboxilico).

7-Cl-KYN.- 7-Cl-quinurenato.

CNOX.- L6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-dion.

CPP.- 3-[(+)-2-carbixipiperazin-4-il]-propil-1-fosfonato.

Desplazador.- Es la misma droga que se usa como ligando pero a una concentración por lo menos 100 veces mayor su K_D para definir la unión inespecifica de un ligando (Enna, 1980).

γ -DGG.- γ -glutamilglicina.

DIV.- Dias "in vitro".

Fab.- Fragmento de un anticuerpo con unión a antígeno.

FIITC.- Isotiocianato de fluoresceína.

G_1 .- Receptor a aminoácidos excitadores tipo NMDA.

G_2 .- Receptor a aminoácidos excitadores tipo no-NMDA.

G_A .- Receptor a aminoácidos excitadores que inducen la producción de ácido araquidónico.

GABA.- Acido γ -amino butirico.

G_e.- Receptor a aminoácidos excitadores que aumenta la conductancia de cationes.

GDEE.- Dietil ester de glutamato.

GFAP.- Proteína acidica fibrilar glial.

Gp.- Receptor a aminoácidos excitadores que aumenta la hidrolisis de fosfatidil inositol.

HA-966.- 3-amino-hidroxipirrolidona-2.

H-MEM.- Medio de Dulbecco Eagle modificado y con alto bicarbonato.

Homocys.- Homocisteato.

IgG.- Inmunoglobulina G.

JSTX.- Joro Spider Toxin.

KA.- Kainato.

KIN.- Kinurenato.

L-Asp.- L-aspartato.

L-Glu.- L-glutamato.

L-MEM.- Medio de Dulbecco Eagle Modificado y con bajo bicarbonato.

MK-801.- (+)-5-metil-10.11-dihidro-5H-dibenzo [a,d]ciclohepten-5.10-iminomaleato.

NMDA.- N-metil-D-aspartato.

"Patch clamp".- Fijación de voltaje en un parche de membrana.

PCP.- Fenilciclidina.

PDA.- Piperidín dicarboxilato.

SDS.- Dodecil sulfato de sodio.

SNC.- Sistema nervioso central.

Willardiina.- (1-(2-amino-carboxietil)-uracil.

I.- INTRODUCCION

En el Sistema Nervioso Central (SNC) se encuentran dos tipos de células, las neuronas y la neuroglia o glia (Darnell, et al. 1986).

Las neuronas tienen la capacidad de hacer contactos específicos, llamados sinapsis, con otras células nerviosas. Otra característica importante de las neuronas es su habilidad para conducir impulsos eléctricos sin disminuir la intensidad de estos. Morfológicamente, los rasgos más característicos de las neuronas son los grandes procesos que se extienden fuera del soma celular, llamados axones y dendritas. Los axones generalmente son largos (llegan a 1m o más) y algunas veces se encuentran cubiertos por una capa aislante de mielina. Las dendritas son usualmente más gruesas, cortas, muy ramificadas y no poseen cubierta de mielina (Darnell, et al, 1986). Otro rasgo de las neuronas es el potencial de reposo de su membrana de -70 mV negativo en el interior de la célula (Kuffler y Nichols, 1977).

En cuanto a la glia, también posee procesos que salen de sus cuerpos celulares pero, a diferencia de las neuronas, no reciben impulsos sinápticos ni generan potenciales de acción: su potencial de reposo de membrana es más electronegativo que el de las neuronas, -90mV (Brew y Atwell, 1987), y se encuentran acopladas eléctricamente con otras células vecinas por uniones comunicantes (gap junctions) (Kuffler y Nichols 1966).

1) Morfología y clasificación de las células gliales

La glia se clasifica, de acuerdo a su origen ontogenético, en

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

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

Macroglia. Como se mencionó anteriormente, las células macrogliales incluyen a los astrocitos y a los oligodendrocitos. Los oligodendrocitos son células que poseen pequeños cuerpos celulares y tienen algunos procesos delicados con pequeños alargamientos nodulares. Su núcleo es pequeño y la cromatina está comprimida. Los oligodendrocitos se encuentran tanto en la materia blanca como en la materia gris. Los oligodendrocitos que se encuentran en la materia blanca, son responsables de la producción de la mielina. La oligodendroglia de la materia gris, está en asociación con cuerpos celulares neuronales y se cree que proveen un aporte de nutrientes a las neuronas (Whittaker, 1984).

Existen dos subpoblaciones de astrocitos en el SNC: astrocitos tipo 1 y astrocitos tipo 2, los cuales se han identificado mediante el uso de criterios citoquímicos. Entre éstos se encuentra el uso del anticuerpo monoclonal contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que es una proteína del citoesqueleto cuya distribución está restringida a las células astrogliales (Bignami y Dahl., 1973), en adición al anticuerpo A2B5 que es específico para ciertos gangliósidos, y el anticuerpo monoclonal Ran-2 que se une a antígenos localizados en la superficie

celular. Los astrocitos tipo 1 son GFAP positivos, negativos al anticuerpo A2B5, y positivos Ran-2. Los astrocitos tipo 2 son GFAP positivos, el anticuerpo A2B5 se une a ellos y presentan reacción negativa al anticuerpo Ran-2.

Morfológicamente, también se pueden distinguir estas células; los astrocitos tipo 1 son células polimórficas y planas, mientras que los astrocitos tipo 2 tienen forma estrellada (Raff. et al., 1983). Estos dos tipos de células gliales también difieren en su localización, ya que los astrocitos tipo 1 se encuentran en la materia blanca y la materia gris, mientras que los astrocitos tipo 2 se encuentran únicamente en la materia blanca, y probablemente correspondan a los astrocitos fibrosos (Raff. et al., 1983) de los que se hablará a continuación.

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

Los astrocitos fibrosos son células elongadas, sus procesos son menos numerosos y largos que los de los astrocitos protoplásmicos, son relativamente más lisos y menos ramificados, algunos de sus procesos terminan en vasos sanguíneos (Privat, y Rataboul., 1986).

2) Funciones de la glía.

a) En el sistema nervioso central.

Por estudios bioquímicos se ha podido averiguar que las células gliales participan en la inactivación de transmisores químicos. Por ejemplo, en la transmisión glutamatergica, la glía posee un sistema de captación de alta afinidad dependiente de energía y de Na^+ , donde L-glutamato, L-aspartato, y D-aspartato emplean el mismo receptor de captación (Drejer, et al., 1983). Una vez que es captado el aminoácido excitador, en este caso el glutamato, la glía posee un sistema para transformar el glutamato en glutamina por medio de la enzima glutamino sintetasa, que cataliza la síntesis de glutamina a partir de glutamato, ATP, y el ión amonio; la glutamina resultante de esta reacción no sólo es necesaria para la síntesis de proteínas sino que también sirve como un almacén de nitrógeno en numerosos caminos biosintéticos. La glutamino sintetasa es muy importante en el cerebro, ya que constituye un precursor para el glutamato y el GABA, importantes aminoácidos neurotransmisores en el SNC. Se sabe que las neuronas glutamatergicas toman la glutamina que libera la glía, y dentro de la neurona, la glutamina se convierte en glutamato por medio de la enzima glutaminasa (De Vellis et al., 1986).

Por otra parte, las células gliales de tipo astrocítico contribuyen a la regulación de la concentración de K^+ extracelular. Por estudios hechos en cultivo de tejidos utilizando la técnica de "patch clamp" se ha podido averiguar que los astrocitos poseen al menos tres tipos de canales de K^+ (Jalonen y Holopainen, 1989). Un canal es independiente de voltaje,

permanece cerrado por largos periodos con aperturas muy breves de 1-20 milisegundos (ms), y es independiente del potencial de membrana (Jaloe y Holopaien, 1989). Los otros dos tipos de canales de K^+ son dependientes de voltaje, se abren repentinamente con una larga duraci3n, y en este periodo de apertura ocurren frecuentes cierres, bruscos, de menos de 1ms. Los periodos de cierre entre las explosivas aperturas, varian de acuerdo a la sensibilidad del canal a los diferentes potenciales (Jaloe y Holopaien, 1989).

Investigaciones hechas en cultivo de tejidos han demostrado que las células gliales tienen efecto trófico sobre algunas neuronas del SNC (Barbin et al., 1984). Se ha demostrado, que las neuronas del SNC sobreviven mejor al agregarles medio condicionado por células gliales (Maggs y Scholes., 1986); se sabe también que las células gliales poseen proteínas de superficie y proteínas que liberan a la matriz extracelular las cuales provocan crecimiento neuronal y adhesión glía-neurona (Grumet et al., 1985, Tomaselli et al., 1988 y Neugebauer, et al., 1988). Las células gliales también dan un soporte mecánico a las neuronas (Ranson y Carlini, 1986).

b) En la retina

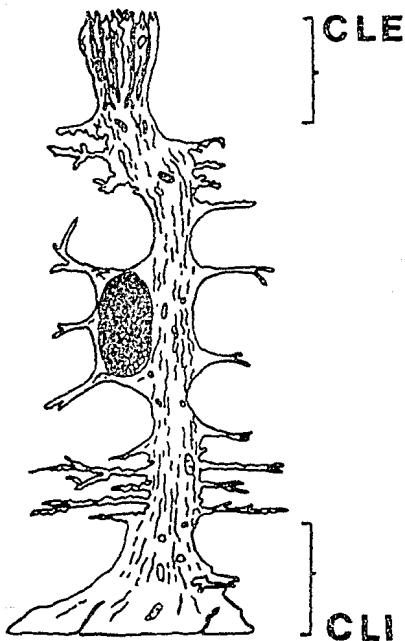
La retina de los vertebrados, como parte del SNC, posee dos subtipos de células gliales de tipo macroglial: las células de Müller y los astrocitos; estos últimos se encuentran asociados a vasos sanguíneos (Schnitzer, 1988), y por lo tanto los astrocitos retinales sólo se encontrarán en especies que posean retinas vascularizadas (caballo, conejo, primates etc. (Schnitzer,

1988). En el caso de las aves, al ser retinas no vascularizadas, poseen únicamente células de Müller (Moscona, 1983). Con respecto a las células de Müller (principal elemento glial de la retina), se expanden a través de toda la retina desde la capa limitante externa donde se encuentra la parte apical, hasta la capa limitante interna, donde se encuentra su pie terminal (Newman, 1986) (Esquema 1). Las células de Müller presentan características tanto de astrocitos como de oligodendrocitos. En común con los astrocitos, presentan una alta actividad de glutamino sintetasa (Sarthy y Lam, 1978), enzima que se usa como marcador de astrocitos; también poseen sistemas de captación de alta afinidad y enzimas que degradan algunos neurotransmisores como acetilcolinesterasa y γ -aminobutirato-transaminasa (Sarthy y Lam, 1978). Asimismo, tienen numerosas partículas de glucógeno y filamentos intermedios en el citoplasma (Newman, 1986). Por otro lado, presentan alta actividad de anhidrasa carbónica, marcador de oligodendrocitos (Ghandour, et al., 1979) y también presentan una glucoproteína asociada a la mielina (Newman, 1986).

Las células de Müller regulan la concentración de K^+ extracelular gracias a que su membrana posee una alta permeabilidad a este ión (Conner et al., 1985). Cambios de iluminación producen un aumento de K^+ extracelular en la retina que puede ser uniforme o localizado dependiendo del tipo de estímulo (Mobbs, et al., 1988). Cuando ocurre un cambio uniforme de K^+ extracelular, los iones K^+ entran a la célula por la parte apical desde donde son transportados a todo lo largo de la célula hasta el pie terminal de la célula que está en contacto con el humor vítreo;

en este lugar la membrana presenta una resistencia mucho menor ($12M\Omega$), a la que se presenta en el resto de la célula (190Ω) lo cual favorece la salida de K^+ al humor vitreo (Mobbs et al., 1988). Cuando ocurren cambios de iluminación no uniformes en la retina se induce un aumento de K^+ extracelular, que es tomado por la célula de Müller adyacente y difundido a las células de Müller vecinas gracias a que están en contacto por uniones comunicantes, reduciéndose así el aumento de K^+ extracelular (Mobbs et al., 1988).

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



Esquema 1

Esquema de una célula de Muller. La parte apical de la célula se encuentra en la capa limitante externa (CLE) de la retina, y el pie terminal se encuentra en la capa limitante interna (CLI) (Tomado de: Miller y Dowling, 1970)

3) Los receptores en las células gliales y su posible participación en la transmisión.

Los receptores de captación para aminoácidos excitadores se han medido en cultivos primarios de astrocitos, encontrándose que usan un sistema de alta afinidad que, como se mencionó anteriormente depende de Na^+ y energía (Drejer et al., 1983). Por otro lado, Bridges et al. a (1987) al medir receptores de captación en cultivos primarios de astrocitos, encontraron que el ácido glutámico se capta por un sistema dependiente de Cl^- e independiente de Na^+ ; Bridges et al. b en ese mismo año, comprobaron nuevamente por estudios autorradiográficos en astrocitos que fueron implantados en el colículo inferior de ratas, la unión de glutamato a astrocitos dependiente de Cl^- e independiente de Na^+ .

Resultados recientes han demostrado que algunos compuestos entre los que se encuentran los aminoácidos excitadores, producen en las células gliales respuestas similares a las que provocan en las neuronas durante la neurotransmisión como despolarización y activación de mecanismos de segundos mensajeros (Bowman y Kimelberg, 1984 y Gallo, et al., 1989). Se ha sugerido que estos cambios pudieran originarse a partir de la interacción de estos compuestos con receptores específicos en la membrana de las células gliales, cuyas propiedades aún se desconocen (Bowman y Kimelberg., 1984).

En estudios morfológicos hechos en cultivos primarios de astrocitos de hipocampo, al aplicarles ácido glutámico y algunos análogos de éste (ácido kainico y ácido quisquálico) se vió que

tiene un efecto tóxico sobre los astrocitos (Lehman y Hansson , 1988). Por otra parte, empleando colorantes de cianina para medir cambios en el potencial de membrana de cultivos de astrocitos en suspensión, se comprobó que alta concentración de K^+ , el ácido glutámico y dos de sus análogos, ácido quisquálico y ácido kainico, despolarizan a los astrocitos (Enkvist et al., 1988). Asimismo, estudios electrofisiológicos han demostrado que tanto el ácido glutámico como el ácido aspártico despolarizan astrocitos de cerebro mantenidos en cultivo primario (Bowman y Kimelberg, 1984).

Para explicar esta despolarización se han propuesto dos posibles mecanismos iónicos (Usowicz et al., 1989). Uno de los mecanismos sería la captación electrogénica de glutámico junto con Na^+ , lo cual se demostró en las células de Müller (Brew y Attwell, 1987 ; Barbour et al., 1988) y en astrocitos tipo 1 (Usowicz et al., 1989). Este acarreador electrogénico transporta análogos de glutamato tipo NMDA y tipo no-NMDA (Usowicz et al., 1989).

En las células de Müller de ajolote, se ha visto que se acarrean al menos dos iones Na^+ por cada anión glutamato que entra a la célula (Brew y Attwell, 1987). Análogos del glutamato como L-aspartato, D-aspartato, NMDA y Kainato también provocan corrientes entrantes en las células de Müller, mientras que el análogo al subtipo de receptor quisquálico, el ácido quisquálico, no provoca corriente de entrada (Brew y Attwell, 1987). En las células de Müller de salamandra también se ha medido la captación electrogénica de ácido glutámico, encontrándose que por cada molécula de L-glutamato, entran tres iones Na^+ al interior de la

célula y sale un ión K⁺. Esta captación se inhibe al aumentar la concentración de K⁺ extracelular (Barbour et al., 1988).

En astrocitos tipo I también se ha visto que poseen un receptor al ácido kainico el cual, al ser estimulado, provoca la apertura de canales iónicos; también poseen un receptor al ácido quisquálico (Condorelli et al., 1989) el cual provoca la hidrólisis de fosfolípidos de inositol (Nicoletti et al., 1988) y es insensible al agonista del receptor tipo quisquialato AMPA (Nicoletti et al., 1988; Condorelli et al., 1989).

El otro mecanismo iónico propuesto para explicar la despolarización de astrocitos es por medio de la apertura de canales iónicos asociados a receptores a aminoácidos excitadores (Backus, et al., 1989). Este mecanismo es sensible al ácido glutámico y a sus análogos quisquialato y kainato (Gallo et al., 1989; Usowicz et al., 1989; Backus et al., 1989), y es insensible al NMDA y al aspartato (Usowicz et al., 1989). Este tipo de receptor se encuentra en los astrocitos tipo 2; al activarse produce la apertura de canales Na⁺/K⁺, los cuales tienen un potencial de inversión cercano a los 0 mV (Backus et al., 1989). En cultivo de tejidos, se ha visto que los astrocitos tipo 2 tienen la capacidad de captar GABA y liberarlo por estimulación mediante ácido glutámico y sus agonistas kainato y quisquialato. La liberación de GABA provocada por kainato y quisquialato fue dependiente de Na⁺, y la del kainato fué además, parcialmente dependiente de Ca⁺⁺. Tanto los astrocitos tipo 1 como los tipo 2 captan el ácido D-³H-aspartico, pero sólo los astrocitos tipo 2 lo liberan por estímulo con ácido kainico (Gallo et al., 1989).

Por otra parte, Cambay-Deakin et al. (1988), han visto que mensajes neuronales como alta concentración de iones K^+ o neurotransmisores como la serotonina o la adrenalina, pueden provocar la ruptura de almacenes de glucógeno de los astrocitos; la glucosa resultante de esta ruptura se liberaría al medio extracelular y posteriormente sería usada por las neuronas.

Otros estudios hechos en cultivo de tejidos han demostrado que la superficie de los astrocitos es un buen sustrato para el crecimiento de axones de neuronas en el SNC (Maggs y Scholes, 1986). La laminina, una glucoproteína liberada por los astrocitos induce el crecimiento neuronal (Tomaselli et al., 1988); la glucoproteína citotactina, también es sintetizada y secretada por las células gliales, y se ha visto que promueve la adhesión neurona-glia "in vitro" (Grumet et al., 1985). Otras proteínas adhesivas expresadas "in vitro" en células gliales son: la trombospondina (Tomaselli et al., 1988) y la AMOG Molécula de adhesión en glía (Antonicek et al., 1987). Aparte de las proteínas de la matriz extracelular producidas por la glia, esta última posee también proteínas de superficie, las cuales intervienen en procesos de crecimiento y de reconocimiento en las neuronas: N-cadherina molécula de adhesión calcio dependiente, N-CAM molécula de adhesión, e integrinas (Neugebauer et al., 1988).

4) Receptores a aminoácidos excitadores.

a) En el sistema nervioso central.

Antes de hablar de los receptores a aminoácidos excitadores se explicará brevemente la clasificación de los mismos en el sistema nervioso central.

Los receptores en el SNC se han subdividido en dos grandes clases, dependiendo de la velocidad con la que se da la respuesta (Strange, 1983):

Clase I Receptores ionotrópicos de respuesta rápida. Estos receptores están acoplados directamente a un canal iónico, o bien son parte del mismo; generalmente son proteínas transmembranales oligoméricas que contienen un sitio o dos sitios de unión para agonistas y un canal iónico. La respuesta de estos receptores se da en milisegundos. Ejemplos: receptor tipo GABA_A, receptor a glicina, receptor a acetilcolina tipo nicotínico, y receptores glutamatérgicos (Strange, 1983).

Clase 2 Receptores metabotrópicos de respuesta lenta. La respuesta de esta clase de receptores presenta un retardo del orden de segundos. Su estructura consiste en un simple polipéptido asociado a una proteína reguladora (proteína G) que actúa como transductor del mensaje: al activarse este receptor se estimula la formación de un mensajero secundario (nucleótidos cíclicos o ciertos lípidos). El AMP cíclico activa una proteína cinasa dependiente de AMP cíclico, que a su vez fosforila proteínas dentro de la célula. Los segundos mensajeros lipídicos, como el diacil glicerol, activan cinasas de proteínas que dependen de los lípidos como la proteína cinasa C (Schwartz., 1982); ejemplos conocidos de estos receptores son el receptor GABA_B, receptor a serotonina, receptores glutamatérgicos, receptores a opiáceos etc (Strange, 1983).

Como se mencionó anteriormente los receptores glutamatérgicos (excitadores) pertenecen tanto a la clase I como a la clase II de

receptores. Dentro de esta transmisión existen dos grandes tipos de receptores, los activados por NMDA (N-metil-D-aspartato), los cuales dependen de voltaje y cuya acción se inhibe en presencia de Mg^{++} ; y un segundo tipo de receptor, activado por otros agonistas como kainato, quisqualato y L-APB (ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico); estos receptores son relativamente insensibles a altas concentraciones de Mg^{++} y no dependen de voltaje (Watkins, 1986). De acuerdo con el agonista más potente y con su perfil farmacológico, esta segunda clase de receptores a aminoácidos excitadores puede subdividirse en tres: tipo Kainato, tipo quisqualato y tipo L-APB. Existe otro tipo de clasificación para receptores de aminoácidos excitadores donde se toma en cuenta si son ionotrópicos o metabotrópicos y si son tipo NMDA o no-NMDA, esta clasificación fué ideada por el grupo de Costa (1988). De acuerdo con esta clasificación los receptores de NMDA son denominados G1 y los no-NMDA G2, con un subíndice que se refiere al mecanismo de transducción de la señal: Gc son los receptores que aumentan la conductancia a cationes, Gp aquellos que inducen la hidrólisis de fosfatidil inositol y Ga los que inducen la producción de ácido araquidónico.

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

El sitio de unión del NMDA puede ser llamado también complejo receptor NMDA y consiste de cinco partes: sitio de reconocimiento al transmisor, canal iónico, 2 unidades reguladoras (Honaré, 1989), sitio de unión al Mg^{++} dependiente del voltaje (Cotman y

Iversen, 1987) y sitio de unión al Zn^{++} no dependiente del voltaje (Peters, et al. 1987). La activación del receptor a NMDA depende de voltaje debido a la interacción de Mg^{++} con el canal (Cotman y Iversen, 1987). La activación del receptor de NMDA provoca la despolarización de las células, tanto por mecanismos ionotrópicos como metabotrópicos, aunque no se sabe si el mismo complejo molecular es responsable de los distintos mecanismos de transducción, o si se trata de receptores diferentes. Los mecanismos de transducción de este receptor pueden ser tipo GC_1 , GP_1 , y GA_1 (Costa et. al., 1988). También se ha visto que este receptor incrementa la concentración de guanosin monofosfato cíclico (GMP_c) en células granulares cerebelares (Smart., 1989). En este receptor, la glicina, transmisor inhibitor en la médula espinal (Curtis et. al. 1960), actúa como modulador alostérico positivo, provocando un aumento en la respuesta, la cual no es antagonizada por estricnina, inhibidor del receptor sináptico de glicina (Young y Snyder, 1974). Se sabe también que el Zn^{++} antagoniza alostéricamente la respuesta a NMDA (Honoré, 1989). En el siguiente cuadro se presenta los agonistas y antagonistas tanto en el sitio del neurotransmisor como en el sitio alostérico.

TABLA 1
RECEPTORES TIPO NMDA.

SITIO DEL NEUROTRASMISOR

AGONISTAS	ANTAGONISTAS
L-Asp	CPP
L-glu	APV
NMDA	APH
KIN	CGS-19755
HOMOCYS	

SITIO ALOSTERICO (+)

AGONISTAS	AGONISTA INVERSO	ANTAGONISTAS
Gly	7-CI-KYN	HA-966
D-serina	kYN	12-CA
D-cicloserina	CNQX	ACBC
ACC		

SITIO ALOSTERICO (-)

AGONISTAS

PCP
MK-801
Ketamina
Endopecosina

Abreviaturas:

L-Aspartato (L-Asp); L-Glutamato (L-Glu); N-Metil-D-Aspartato (NMDA); Quinurenato (KYN); 3-[(+)-2-carboxipiperidin-4-yl]-propil-1-fosfonato (CPP); D (o L)-2-Amino-fosfonoveralato (APV); DL-2-Amino-7-fosfonohexahidroato (APH); Glicina (Gly); Fenilciclidina (PCP); 3-Amino-hidroxipirrolidona- (HA-966); Cis-4-(fosfonometil-2-piperidin carboxilico) (CGS-19755); Homocisteato (HOMOCYS); 1-Amino-ciclo-propano-1-carboxilato (ACC); 7-CI-Quinurenato (7-CI-KYN); Indol-2-carboxilato (12-CA); 1-Amino ciclobutano-1-carboxilato (+)-5-Metil-10,11-dihidro-6H-dibenzo(a,d)ciclo-heptan-5,10-iminometilato (MK-801); 6-ciano-7-nitroquinoloxalina-2,3-dion (CNQX); acido 1 amino ciclobutano 1 carboxilico.

(Somohano y López-Colomé, en prensa).

Receptores tipo no-NMDA. Existen tres subtipos de receptores no-NMDA, que son los receptores tipo kainato (KA), tipo quisqualato (QA) y tipo 2-amino-4-fosfonobutirato (L-APB), de acuerdo con el agonista más fuerte para cada subtipo. Estos tres subtipos de receptores tienen como agonista el ácido glutámico y como antagonista la CNQX. La conductancia dada por la activación de receptores no-NMDA es independiente del voltaje (Honoré, 1989), poseen un mecanismo de transducción ionotrópico y metabotrópico, a través de los receptores GC2, y GP2 (Costa et. al. 1988). Estos subtipos pueden distinguirse entre sí, ya que existen diferencias farmacológicas y de distribución entre los mismos (Foster y Fagg, 1984).

Receptores a ácido Kainico. En estudios de cinética de saturación se ve que el ácido Kainico aparentemente se une a dos sitios con diferentes afinidades: uno con alta y otro con baja afinidad. La unión del KA al sitio de alta afinidad disminuye en presencia de iones Ca^{++} (Honoré, 1989). Puesto que en el fluido extracelular existen concentraciones milimolares de Ca^{++} , se ha sugerido que sólo los sitios de baja afinidad al Kainato pueden ser de relevancia funcional (Honoré, 1989). En la tabla 2 se enumeran los agonistas y antagonistas para este subtipo de receptores, así como su distribución.

TABLA 2

RECEPTORES TIPO KAINATO

AGONISTAS	ANTAGONISTAS	DISTRIBUCION
KA	PDA	Hipotálamo
Domoato	γ-D-GG	Capas corticales profundas
L-glu	GAMS	Núcleo reticular del tálamo
Ac.acromélico	CNQX	cuerpos mamilares
	KYN	Núcleo del puente
		Fibras Musgosas del Hipocampo

Abreviaturas:

Kainato (KA); L-glutamato (L-glu); Piperidin dicarboxilato (PDA); 4-D-Glutamyl glicina (4-D-GG); 6 Amino metil sulfonato (GAMS); Lá-clano-7-nitroxiquinolaxina 2,3-dion (CNQX); Quinurenato (KYN).

(Tomado de Somohano y López-Colomé, en prensa).

Receptores al ácido quisquálico. Estos receptores se encuentran en el area CA1 del hipocampo, en la corteza cerebral, ganglios basales y en areas sensoriales del SNC. El agonista principal para este subtipo de receptor es el AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) (Honoré, 1989); otros agonistas son: willardiina (1-(2-amino-2-carboxyethyl)-uracil), L-glutamato, y 4-bromoibotenato (Watkins y Evans, 1981). Sus antagonistas son: Dietilester de glutamato (GDEE) (Watkins y Evans, 1981), "Joro spider toxin" (JSTX) (Kawai et al., 1982), L6-ciano-7-nitroquinoxalín 2,3-dion (CNQX) (Honoré, 1989).

Receptores tipo APB. Este tipo de receptor sólo puede detectarse en presencia de Cl⁻, aumenta en presencia de Ca⁺⁺, y la unión del ligando al receptor puede inhibirse con bloqueadores de canales de Cl⁻ (Recasens et al., 1987). Se ha visto que la unión del ligando al receptor disminuye con la congelación de las membranas (Honoré et al., 1986). Por las características anteriormente citadas se cree que este receptor es un sitio de captación para el ácido glutámico (Honoré et al., 1986, Recasens et al., 1987), y posiblemente esté localizado en células gliales (Honoré et al., 1986). Los agonistas para este receptor son APB, y L-glutamato (Watkins, 1986) y su antagonista la CNQX (Honoré et al., 1989).

b) En la retina de los vertebrados.

Antea de hablar de los receptores a aminoácidos excitadores en la retina, se describirá brevemente la organización de ésta. La retina consiste esencialmente de cinco diferentes tipos de

neuronas: los fotorreceptores, las células horizontales, amacrinas, bipolares y ganglionares, y dos tipos de células gliales, los astrocitos y las células de Müller (Dowling, 1979). En la retina, los cuerpos celulares se localizan en dos capas nucleares (capa nuclear externa y capa nuclear interna), y la capa de células ganglionares, mientras que las sinápsis se establecen en dos capas plexiformes. Los cuerpos celulares de los fotorreceptores se encuentran en la capa nuclear externa, y hacen sinápsis con las células bipolares y horizontales en la capa plexiforme externa. Las células amacrinas se encuentran en la capa nuclear interna. En la capa plexiforme interna hacen sinápsis células amacrinas con células bipolares, y estas hacen sinápsis con las células ganglionares que se localizan en la capa nuclear interna. En cuanto a las células de Müller, como se mencionó anteriormente, se extienden radialmente a lo largo de toda la retina (Newman, 1986) (Esquema 2).

Se sabe que el glutamato representa del 10-15% de los aminoácidos libres en la retina, mientras que el aspartato representa del 2-10% (Pasantés-Morales et. al. 1972); también se sabe que este glutamato y/o aspartato puede ser liberado en la oscuridad por los fotorreceptores (Schwartz, 1982) hacia las neuronas de segundo orden. La transmisión excitadora también se puede dar entre células bipolares y ganglionares (Neal, 1976).

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

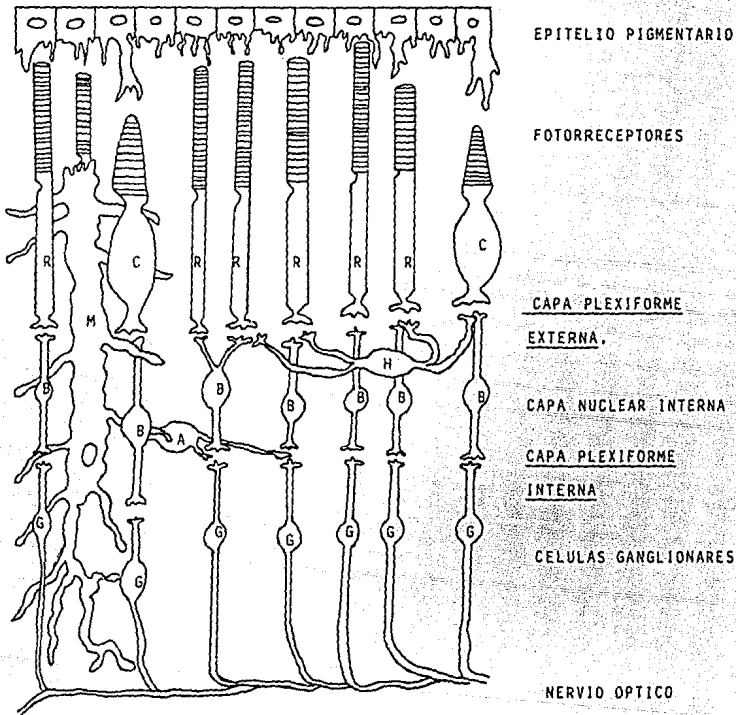
En la retina de pollo, López-Colomé y Somohano, (1982), demos-

traron por estudios de unión de L[3H]-aspartato como ligando, la presencia de dos poblaciones de receptores, una de alta afinidad ($K_m=40$ nM), independiente de Na^+ que se encuentra en la fracción P1. La otra población de receptores también de alta afinidad se encuentra en la fracción P2 y presenta una $K_m=11.8$ nM. En este estudio se observó que la unión de ácido aspártico independiente de sodio (a receptores sinápticos) no se afecta con la congelación, mientras que en la unión dependiente de sodio disminuye con la congelación.

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

Otra prueba de la existencia de receptores a aminoácidos excitadores en la retina, es el efecto neurotóxico selectivo que el glutamato y sus análogos, especialmente el ácido kainico, ejercen sobre las células amacrinas (Coyle et al., 1978), horizontales y bipolares así como sobre células gliales (Morgan y Inghan 1981; Schwartz, 1982 y López-Colomé y Somohano, 1984).

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



Esquema 2.

CAPAS DE LA RETINA. En esta figura se pueden apreciar las capas de la retina, y los diferentes tipos celulares que la componen: C, conos., R, bastones., H, células horizontales., B, células bipolares., A, células amacrinas., G, células ganglionares y M, células de Müller (Farber y Adler, 1986).

11.- OBJETIVO.

Teniendo estos antecedentes, y ya que los receptores a aminoácidos excitadores no se han caracterizado en la glía de la retina, existe la posibilidad de que los receptores a aminoácidos excitadores que se han caracterizado en la retina completa pertenezcan tanto a las neuronas como a la glía. De ser así se podría pensar en una interacción directa glía-neurona en el fenómeno de neurotransmisión (Barres., 1989); asimismo, la posible acción trófica ejercida por los aminoácidos excitadores (Condorelli, et al., 1989) podría tener como blanco tanto a las neuronas como a la glía.

Con el propósito de saber si realmente existen estos receptores en células gliales y si cambian durante el desarrollo embrionario, se midieron los receptores (utilizando un ligando marcado radioactivamente) en cultivos primarios de glía de retina de pollo y se compararon con receptores para aminoácidos excitadores medidos en cultivos primarios de neuronas.

Se escogió como modelo del SNC la retina, porque como tiene un origen embrionario común con el cerebro, se puede suponer que las sustancias que se proponen como mensajeros en el cerebro tienen funciones similares en la retina (Nowak, 1988). La retina de vertebrados posee grandes ventajas; ya que como se localiza extracranealmente es muy fácil su disección, se puede extraer íntegra y al extraerse ocurre menos daño en el tejido que en las rebanadas cerebrales.

Se escogió el cultivo de tejidos, porque es un método que sirve para aislar grupos homogéneos de neuronas ó glía (Henn,

1980), y es una buena herramienta para estudiar desarrollo y características de astrocitos maduros (Juurlink y Hertz, 1985), también sirve para estudios metabólicos, fisiológicos y farmacológicos (Sensenbrenner et al., 1980).

En el cerebelo se ha visto que su astrogliá "in vitro" se comporta de una forma parecida a como ocurre "in vivo", y que su maduración ocurre al mismo tiempo que "in vivo" (Hatten y Mason, 1986). Por otra parte se sabe que los astrocitos en cultivo de tejidos presentan una gran plasticidad "in vitro" dependiendo de las variables introducidas en el cultivo como son: procedimiento de disociación, medio de cultivo, y concentración de suero (Juurlink y Hertz, 1985). Por esta razón se debe tener cuidado al correlacionar los resultados obtenidos en cultivo con los obtenidos en preparaciones más íntegras del SNC (Juurlink y Hertz, 1985).

III MATERIALES Y METODOS.

El método de cultivo de tejidos empleado en este trabajo fué el descrito por Adler, et al., (1982) para células neuronales y no neuronales de retina de embriones de pollo, modificado en el laboratorio.

En este método de siembra la población celular en la que va a estar enriquecido el cultivo, depende, de la concentración en la que se siembren las células y el sustrato empleado. En el caso de las neuronas se emplea un sustrato de alta adhesividad y baja concentración celular; en cuanto a cultivos enriquecidos en glia se siembra a alta concentración y no se usa sustrato. Por todo lo

demás el método de cultivo es igual tanto para glia como para neurona.

Se usaron embriones de pollo white Leghorn de 7 días. Las retinas se extrajeron mecánicamente, separándolas del epitelio pigmentario y se lavaron dos veces en una solución Hank's libre de Ca^{++} y Mg^{++} (0.8g NaCl, 0.04g KCl, 0.006g KH_2PO_4 , 0.02g Na_2HPO_4 , 0.002g de rojo de fenol y 0.1g de glucosa en 100ml de agua). Después de lavadas las retinas se incubaron 10 min a 37°C en Hank's; la separación celular se realizó usando una enzima proteolítica, la tripsina (Lenhinger., 1984), incubando a las retinas 20 min a 37° en presencia de esta enzima. La reacción enzimática se paró utilizando L-MEM (1.338g de medio de Dulbecco Eagle Modificado al cual se le adicionó 0.05g de glucosa, 0.022g de $NaHCO_3$, 0.0125% de gentamicina, 0.0125% de penicilina, 0.125% de estreptomycin y 0.025% de neomicina en 100 ml de agua) + 1% de BSA (albúmina de bovino). Las células terminaron de disociarse mecánicamente utilizando una pipeta "pasteur"; las células ya disociadas se filtraron a través de una red de nylon, y se diluyeron con H-MEM sin suero (misma fórmula de L-MEM pero con 0.22g de $NaHCO_3$); mas tarde las células se sembraron en cajas petri de 60mm de diametro con 1ml de H-MEM 20% de suero de bovino fetal. En el caso de cultivos enriquecidos en neuronas se utilizó un sustrato de poli-D-lisina al 0.1% y las células fueron sembradas a una concentración de 1.5 millones de células por caja petri; con respecto a los cultivos enriquecidos en glia fueron sembradas directamente en la caja petri sin usar sustrato y a una concentración de 2 millones de células por caja petri y tanto

ra controlada 5% CO_2 , 95% de aire.

El medio de cultivo se cambió cada tercer día por 2ml de H-MEM 10% de suero de bovino fetal, en el caso de la glía; con respecto a las neuronas, a los cuatro días de cultivo se agregó 1ml de H-MEM 10% de suero y se cambió el medio cada tres días. Para preparar H-MEM 10% y H-MEM 20%, se usó suero de bovino fetal el cual permite que las células emigren de los agregados y formen una monocapa confluyente (Adler, et al., 1982).

Los cultivos se cosecharon a los 1,5,8,12 y 15 días "in vitro" (DIV) (Fotografía 1 y 2). La mayoría de los experimentos se realizó utilizando cosechas de cultivos de 12 (DIV) que es cuando las células alcanzan confluencia. Para tener la certeza de que los cultivos eran puros en glía, se usó una técnica citoquímica con el anticuerpo monoclonal contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Fotografías 3 y 4), este anticuerpo se une a las fibras de las células de Müller (Björklund, et al., 1985). El método consiste brevemente en lo siguiente: las células se fijan en metanol absoluto a -20°C por 5 minutos, se lavaron con PBS con 0.1% de tritón X 100 (0.8g NaCl, 0.02g KCl, 0.115g Na_2HPO_4 , 0.02g KH_2PO_4 , 0.1 ml de tritón X 100, en 100ml de agua), se incubaron 30 min con suero de cabra para eliminar el fondo, se incubaron toda la noche con el anticuerpo monoclonal contra la proteína ácida fibrilar Glial, se lavaron con PBS, y se incubaron 30 minutos con un segundo anticuerpo IgG (immunoglobulina G) anti-ratón específico para fragmento Fab (Fragmento con unión a antígeno) conjugado a FITC (Isotiocianato de fluoresceína), las células se volvieron a lavar en PBS y se montaron en glicerol en

PBS 1:9 y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Bignami y Dahl, 1979).

Para cosechar los cultivos se hizo lo siguiente; se cambió el H-MEM 10% de suero por HANK's y raspando las células con un gendarme de hule, la suspensión celular se puso en un tubo de ensayo y se centrifugó a 1000g por 5 minutos, pasados los 5 minutos se tiró el sobrenadante y se agregaron 10 ml de agua fría y se homogenizaron para romper las células por choque osmótico. Se dejaron en el hielo con el fin de completar el rompimiento y se centrifugó a 45'000g por 20' a 4°C, este procedimiento se repitió 3 veces y las membranas se congelaron a -70°C de 2 días a 1 mes.

Posteriormente se realizó la medición de los receptores utilizando el método reportado por López-Colomé y Somohano (1982) modificado.

Las membranas se descongelaron se resuspendieron y se homogenizaron en buffer (Tris-HCl p.H. 7.4, 0.05M ó 0.1M, + 0.118M NaCl ó sin NaCl).

Los receptores se midieron por la unión específica a las membranas de L-aspartato-³H 25 ó 50 nM (10µl a 175µl) concentración que está por debajo de la K_D (Enna, 1980). La unión inespecífica se tomó como la radioactividad que permanece unida a la membrana en presencia de 1mM de desplazador (Desplazador es la misma droga que se usa como ligando a una concentración por lo menos 100 veces mayor su K_D Enna, (1980)) o bien un agonista o antagonista. Las membranas se incubaron 10' a temperatura ambiente, y la reacción se paró por centrifugación a 45,000g (Enna., 1980). El sobrenadante se remueve y se lava superficialmente dos

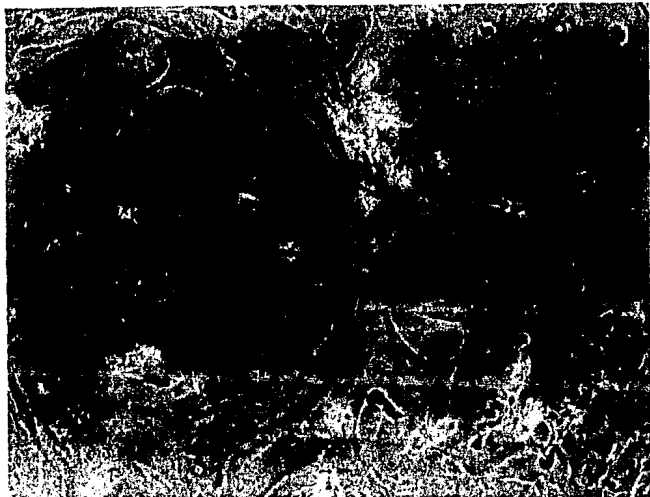
veces con agua fría; se digiere con SDS al 2% y se cuenta la radioactividad en un contador de centelleo líquido después de agregar 5ml de tritosol (Xileno 600ml, triton X-100 275ml, etilen glicol 37 ml, etanol absoluto 106ml, PPO 3g, Fricke., 1975).

La proteína se midió por el método de Lowry, et al. (1951).



Fotografía 1.

Cultivo primario enriquecido en células gliales de la retina de embrión de pollo de 7 días; donde se puede apreciar que las células no han alcanzado la confluencia. La fotografía está tomada en contraste de fases con un aumento de 400 veces.



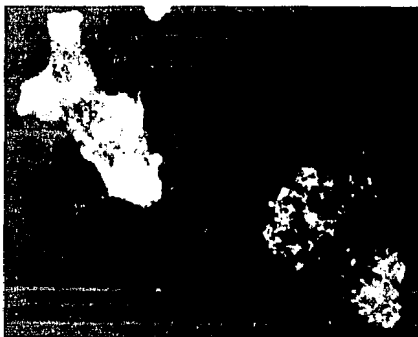
Fotografía 2

Cultivo primario de células gliales de la retina de embrión de pollo de 12 DIV. Se observa claramente que el cultivo ha llegado a la confluencia y que las células tienen una forma aplanada. La fotografía está tomada en contraste de fases, con un aumento de 400 veces.



Fotografía 3.

Fotografía 4



Fotografías 3 y 4.

Células de Muller con reaccion positiva al anticuerpo monoclonal contra GFAP con segundo anticuerpo conjugado a fluoresceina. Cultivo de células de 1 DIV de retina de embriones de pollo de 7 dias, donde se observa que las células se encuentran en agregados. Fotografía 3 Contraste de fases. Fotografía 4 microscopia de fluorescencia. Las dos fotografias fueron tomadas con un aumento de 400 veces.

IV RESULTADOS

Efecto de la concentración de proteína sobre la unión del ligando. Se observó que la unión específica aumenta en proporción directa a la concentración de proteína de membrana, (de 30 a 55 γ) hasta llegar a un punto de saturación (Fig 1) . Esta saturación puede deberse a que generalmente el número de receptores en la membrana es pequeño y por tanto al aumentar la concentración de proteína, la proporción receptor/proteína total disminuya. De la información obtenida de la curva de proteínas, se escogió para los siguientes ensayos una concentración que va de 55-75 μ g de proteína por ensayo (175 μ l).

Comparación de receptores para L-aspartato- H^2 en células gliales y neuronas durante la diferenciación "in vitro". Se midieron los receptores a L-aspartato a los 1,5,8,12 y 15 DIV (días "in vitro") que corresponden en tiempo a los días 8,12,15 y 22 de desarrollo embrionario en los que se sabe que las células presentan un comportamiento similar en el desarrollo tanto "in vitro" como "in vivo" (Juurlink y Hertz, 1985). Usando L-aspartato- H^2 como ligando estos receptores se midieron en membranas procedentes de cultivos de glia, congeladas y en ausencia de Na^+ ; los valores obtenidos fueron comparados con los obtenidos en cultivos de neuronas de la misma edad (Fig 2). Mientras que al inicio del desarrollo (1DIV) los receptores a L-aspartato están más concentrados en la glia, de los 5 a los 12 DIV, la diferencia neurona/glia no es significativa. Por otra parte se

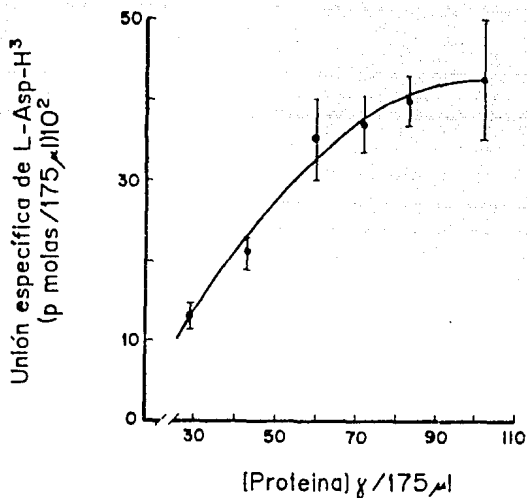


FIGURA 1

Efecto de la concentración de proteína sobre la unión específica de L-Asp-H³ a membranas congeladas de glia de 12 DIV. El ensayo se llevó a cabo empleando 50nM del ligando y 1mM de L-Asp como desplazador. Los datos son la media +/- error estándar de 5 datos por triplicado.

observa que a 1DIV existe una concentración elevada de receptores a L-aspartato tanto en neuronas como en la glia la cual decae tanto en neuronas como en glia a los 5 y 8 DIV, aumentando ligeramente a los 12 (DIV) edad en la cual se alcanza el nivel mostrado en la retina adulta (Somohano, et al., 1988).

Efecto de la temperatura y del Na⁺. Con el objeto de determinar si la unión de L-aspartato a la glia de Müller mostraba características similares a los receptores de tipo postsináptico o de recaptación, se midieron los receptores en membranas frescas a temperatura ambiente en presencia de Na⁺ (118mM NaCl) para medir sitios de transporte, así como en membranas congeladas en ausencia de Na⁺ para medir receptores con características postsinápticas (Enna y Snyder, 1976). Se pensó en hacer esta distinción, ya que aparte de los receptores de recaptación que se conocen en la glia (Drejer et al, 1983), existe el antecedente de que los aminoácidos excitadores inducen en estas células respuestas similares a las que producen en las neuronas durante la neurotransmisión, y que estos cambios pueden ser dados por la interacción de estos compuestos con receptores específicos de alta afinidad en la membrana de las células gliales (Bowman y Kimelberg, 1984).

En la Fig 3 se aprecia que en membranas frescas en presencia de Na⁺ existe una gran proporción de receptores, y en ausencia de Na⁺ la concentración de receptores disminuye más de 50% ; se puede deducir que la diferencia entre el ensayo con Na⁺ y el ensayo sin Na⁺ en membranas frescas corresponde a los sitios de recaptación que, como se mencionó anteriormente requieren Na⁺

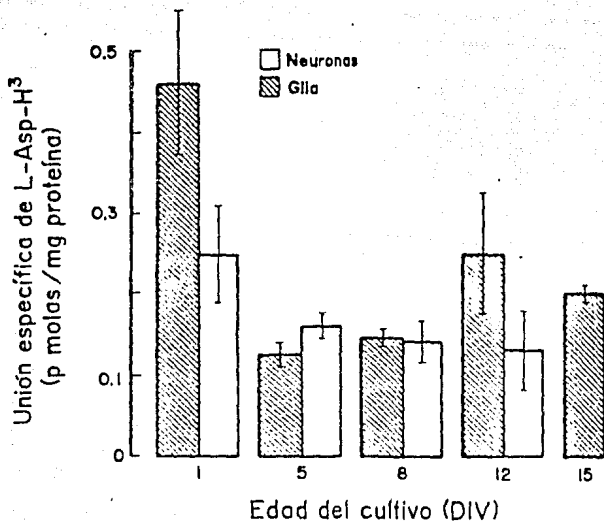


FIGURA 2

Comparación de receptores para L-aspartato- H^3 en células gliales y neuronas durante la diferenciación "in vitro". Se usó 50nM de L-Asp- H^3 , 1mM de L-Asp como desplazador. Las membranas congeladas de glia y neuronas se obtuvieron como se describe en "métodos". Los datos se expresan como la media +/- error estándar de 5-8 experimentos por triplicado en membranas procedentes de cultivos diferentes. Cada serie en el tiempo proviene de un misma siembra de células.

para unir al ligando.

En el caso de las membranas congeladas se observó la misma proporción de receptores tanto en presencia como en ausencia de Na^+ . Al comparar la cantidad de receptores encontrados en membranas frescas en ausencia de Na^+ con los receptores encontrados en membranas congeladas; con o sin Na^+ se ve que existen más receptores en membranas congeladas, esto puede deberse a que la congelación y posterior descongelación exponga más sitios receptores que puedan estar incluidos en la membrana (Enna y Snyder, 1975). La falta de efecto del Na^+ sobre la unión de L-aspartato a membranas congeladas podría indicar que estos receptores no son sitios de captación, ya que estos últimos son sensibles a la congelación (Schwarz., 1982) y requieren de la presencia de Na^+ .

Curva de saturación de la unión de L-aspartato- H^+ en glia.
Para comprobar que se estaba trabajando con receptores y no con sitios de unión inespecífica se midió la unión específica de L-aspartato- H^+ en membranas congeladas de cultivos de glia de 12DIV con NaCl en un rango de concentraciones entre 12.5 y 1200nM, demostrándose que el sistema es saturable (Fig 4 izq.). Se hizo el análisis de Scatchard de los datos (Fig 4 der.) y se demostró la presencia de dos sistemas: uno de alta afinidad con una $B_{\text{max}}=4.1$ p.molas/mg proteína y una $K_m=427$ nM y otro de baja afinidad con una $B_{\text{max}}=9.5$ p.molas/mg proteína y una $K_m=1.312\mu\text{M}$. Cuando el mismo experimento se realizó en ausencia de NaCl (no graficado), los resultados fueron similares observándose únicamente una disminución en la B_{max} del sitio de baja afinidad (de 9.5 a 6.9 p.molas/mg de proteína).

Curva de saturación para aspartato-H²⁺ en neuronas. Al comparar los resultados de la cinética en glia de 12DIV con la cinética a los 1,5 y 8 DIV sin Na⁺ en neuronas, se observó que a los diferentes días de desarrollo las neuronas también presentan dos sitios de unión (Fig 5): uno de baja afinidad que no cambia en el desarrollo su $B_{max}=0.95$ p.molas/mg prot y $K_D=429$ nM, y otro sitio de alta afinidad cuya K_D no cambia durante el desarrollo (≈ 37 nM), pero cuya B_{max} es mayor a 1 DIV (0.39 p molas/mg prot) y decrece a los DIV 5 y 8 (0.2 p molas/mg prot).

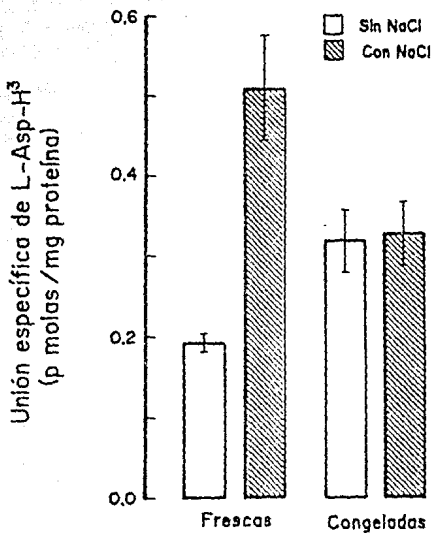


FIGURA 3

Efecto de la temperatura y del Na^+ sobre la unión de $\text{L-Asp-}^3\text{H}$ a membranas de glia de 12 DIV. El ensayo se llevó a cabo empleando 50nM de $\text{L-Asp-}^3\text{H}$ y 1mM de L-Asp como desplazador. se usó NaCl 118mM. Los datos son el promedio \pm error estándar mínimo de 5 determinaciones por triplicado, procedentes de cultivos diferentes.

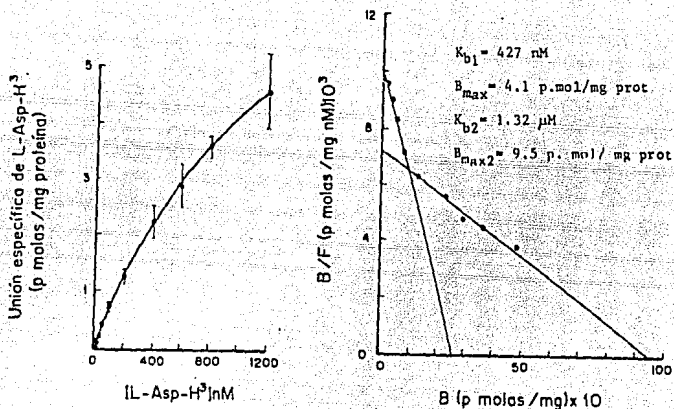


FIGURA 4

Curva de saturación de la unión de L-aspartato- H^3 a membranas congeladas de glia de 12 DIV. Se usaron concentraciones de L-Asp- H^3 de 12.5 a 1200nM. Los ensayos se realizaron como se describe en "métodos". Cada punto es la media \pm error estándar de 4-6 datos por triplicado.

Farmacología de la unión de L-aspartato- H^+ a membranas de glia de 12 DIV. Se probó la capacidad de numerosos compuestos, de competir con el sitio de unión del L-aspartato- H^+ a la membrana, llevando a cabo el ensayo en presencia de 1mM del desplazador correspondiente. Los compuestos se seleccionaron ya sea por su analogía estructural con el L-aspartato, como por ser agonistas o antagonistas de los diversos subtipos de receptores a aminoácidos excitadores caracterizados tanto en el SNC como en la retina (ver introducción). Asimismo se probaron los monohidroxamatos del aspartato y de L-glutamato, así como el D-aspartato, por unirse específicamente a los sitios de transporte compartidos por el L-glutamato y el L-aspartato; la glicina y el GABA se probaron por ser transmisores no relacionados con los sitios de aminoácidos excitadores que estudiamos.

Para poder distinguir las características farmacológicas de los receptores de captación con los receptores de tipo "sináptico" se hicieron experimentos en presencia y ausencia de Na^+ , ya que como se mencionó anteriormente, los primeros requieren de la presencia de este ion para unirse al ligando, mientras que como se ve en la figura 3, los sitios de tipo "sináptico" en la glia, unen al ligando independientemente de la presencia de Na^+ .

Como se ve en la Tabla 3, los desplazadores más potentes en presencia de Na^+ son el L-glutamato, el NMDA y los hidroxamatos del glutámico y del aspártico. En ausencia de Na^+ , el perfil farmacológico cambia, ya que con excepción del L-glutamato, el NMDA y el hidroxamato del glutámico, la capacidad de unión al receptor varía, disminuyendo notablemente la del hidroxamato del

aspártico (análogos no específicos), y aumentando la de los
análogos específicos QA y APB .

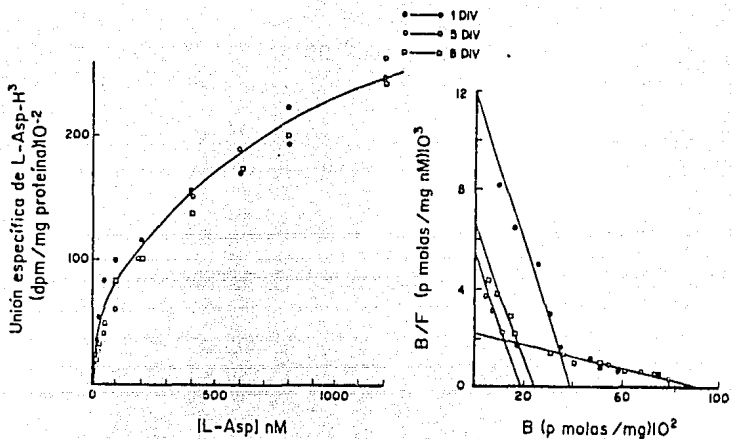


FIGURA 5

Curva de saturación para aspartato- H^3 en membranas congeladas de neuronas. Se probaron concentraciones crecientes de L-Asp- H^3 entre 12.5 y 1200nM, empleando L-Asp 1mM como desplazador. Cada punto corresponde al promedio de tres datos por triplicado. Cada serie en el tiempo corresponde a una misma siembra. Los valores obtenidos son: para 1,5 y 8 DIV, $K_{D1}=429$ nM, $B_{max1}=0.95$ p moles/mg proteína, para 1 DIV $B_{max2}=0.39$ p moles/mg proteína $K_{D2}=33$ nM; para los 5 DIV $K_{D2}=35$ nM, $B_{max2}=0.2$ p moles/mg proteína; para 8 DIV $K_{D2}=36$ nM $B_{max2}=0.2$ p moles/mg proteína.

TABLA 3

FARMACOLOGIA DE LA UNION DE L-ASPARTATO-H⁺
A MEMBRANAS DE GLIA DE 12 DIV.

DIV	(% del control)	
	*NaCl 118mM	-NaCl
Desplazador 1mM		
L-Aspartato	100 +/- 10	100 +/- 25
D-Aspartato	68 +/- 2	33 +/- 7
L-Glutamato	110 +/- 20	66 +/- 4
D-Glutamato	44 +/- 9	54 +/- 7
Kainato	29 +/- 9	29 +/- 10
Quiscualato	27 +/- 5	55 +/- 3
N-metil-DL-aspartato	61 +/- 10	44 +/- 6
α -amino-5-fosfonopentanoato (APV)	46 +/- 15	46 +/- 7
α -amino-4-fosfonobutirato (APB)	31 +/- 6	66 +/- 13
Dietyl ester del glutamato (GDEE)	42 +/- 10	56 +/- 5
Monohidroxamato del glutámico.	53 +/- 9	54 +/- 1
Monohidroxamato del aspártico.	72 +/- 13	27 +/- 13
Glicina	0	0
GABA	0	0

El ensayo se llevó acabo como se describe en la sección de métodos, empleando 50nM de L-Aspartato y membranas congeladas. Los resultados son la media +/- error std. mínimo de 3 determinaciones hechas por triplicado y con material procedente de cultivos independientes.

V- Discusión

Los astrocitos expresan ciertas características funcionales que se consideraban exclusivas de los elementos neuronales en el Sistema Nervioso tales como canales iónicos sensibles al voltaje (Reiser et al., 1983; Bowman et al., 1984; Mac Vicar, 1984; Bevan y Raff, 1985; Bevan et al., 1985; Nowak et al., 1987;), así como receptores y sistemas de transferencia de alta afinidad para algunos neurotransmisores (Pearce et al., 1986; Kettenman y Schachner, 1985; Pearce et al., 1986).

Particularmente en los últimos años se ha demostrado la presencia de receptores a aminoácidos excitadores, los cuales generan una despolarización directa de la membrana plasmática (Bowman y Kimelberg, 1984; Kettenman y Schachner, 1985; Barbour, Brew y Attwell, 1988), o bien inducen un incremento en el metabolismo de fosfolípidos de inositol, o ambos. Puesto que la célula de Müller de la retina de los vertebrados es una célula glial, los resultados mencionados se han extrapolado a las mismas. Sin embargo, estudios más recientes (Brew y Attwell, 1987) han generado ciertas dudas (Backus, et al, 1989) acerca de la equivalencia de los receptores a aminoácidos excitadores en ambos tipos de células y de sus funciones en las mismas.

En este trabajo se abordó la caracterización bioquímica de los receptores de L-aspartato empleando cultivos de glia (células de Müller) ya que la mayor parte de la información existente proviene de estudios electrofisiológicos o bien de liberación de transmisores por estimulación con aminoácidos excitadores.

Se comprobó la existencia de receptores a L-aspartato en células gliales de la retina, al encontrar que existen sitios específicos de unión, ya que se alcanza una saturación al incrementar la concentración de L-aspartato (Fig 4), siendo esta unión reversible y de alta afinidad. Estas características han sido descritas con anterioridad tanto para receptores de tipo postsináptico como de recaptación en el tejido nervioso (Enna y Snyder., 1976) (Fig 3).

Se demostró que los receptores para aspartato en la glia comparten ciertas características químicas con los de las neuronas, ya que en las membranas recién obtenidas se observa que la unión de ligando al receptor se incrementa en presencia de NaCl (Fig 3), lo cual es característico de la unión a sitios generales de captura del aminoácido (Enna y Snyder, 1976). La presencia de dichos sitios no es de extrañar, ya que una de las funciones establecidas de la glia es la de la remoción del glutamato liberado por las neuronas del espacio sináptico durante la neurotransmisión (Drejer, 1985). En las membranas previamente congeladas, estos sitios se destruyen en aproximadamente 80% (Schwarz, 1980), por lo que los sitios remanentes corresponden, en las neuronas, a receptores sinápticos de diferentes tipos, los cuales no requieren de Na^+ para unir al ligando. En la fig 3 se observa que en la glia existen sitios con estas características, los cuales podrían participar en la transmisión de señales (Barres, 1989).

El estudio farmacológico en presencia y ausencia de Na^+ que se presenta en la tabla 1, aunque no indica la potencia de los

diversos análogos para competir por el receptor. muestra diferente patrón de eficiencia en presencia y ausencia de Na^+ . En presencia de Na^+ , el L-Glu, L-Asp, el hidroxamato del aspartato (inhibidor de la captación de L-Glu, L-Asp y D-Asp) y el D-aspartato fueron los desplazadores más eficientes, seguidos de NMDLA y APV y éstos del KA y el QA que prácticamente no desplazan al ligando. En medio libre de Na^+ en cambio, el L-Asp, L-Glu y APB son seguidos por el QA y el GDEE, y éstos por el NMDLA, APV y KA, reduciéndose notablemente la capacidad de los hidroxamatos del glutamato y aspartato para inhibir la unión del ligando, comparando con el medio $+\text{Na}^+$.

Estos datos indican claramente que en la glia de Müller coexisten dos sistemas de receptores que unen a los aminoácidos excitadores. El primero que requiere de la presencia de Na^+ , presenta un perfil farmacológico (Tabla 3) que corresponde al descrito por Brew y Atwell (1987) para el transporte electrogénico de glutamato en las células de Müller del ajolote. Tanto en este estudio electrofisiológico como en nuestra preparación, el sistema no se estimula por KA. Así, aunque las células de Müller poseen características comunes con los astrocitos tipo 1 de diversas regiones del SNC, la despolarización causada en estas células por los aminoácidos excitadores parece llevarse a cabo por mecanismos diferentes. En los astrocitos tipo 1, parece deberse a la apertura de canales de Na^+/K^+ que responden a QA y KA (Backus et al., 1987 y Sontheimer et al., 1988) y no a un transporte electrogénico de L-glutamato. Estudios más recientes en astrocitos tipo 1 (Kimmelberg et al., 1989) han demostrado que tanto L-Glu como KA producen una despolarización acompañada de la

entrada de Na^{2+} , la cual no es atribuible a la actividad de un sistema de transporte, ya que el KA no penetra a las células (Johnston et al., 1986). No obstante, no se ha podido descartar la posibilidad de que el transporte de L-Glu contribuya a la despolarización. En este caso los receptores que se identificaron en la glía de Müller de la retina de pollo (^3Na), corresponderían a los de transporte de L-Glu, y nuestros datos confirman la idea de que la glía de Müller no posee el receptor que media la entrada de Na^+ inducida por KA. Esto no sería de extrañar ya que se ha demostrado con anterioridad que la unión de $^3\text{H-KA}$ al receptor en la retina completa no se detecta sino hasta después de la eclosión (Somohano et al., 1988), fenómeno que no tiene una equivalencia en el cultivo primario disociado.

El segundo tipo de receptor identificado, tanto por sus características farmacológicas (sensible a GA) como por unir al ligando en forma independiente de Na^+ , podría representar los receptores cuya activación induce la hidrólisis de fosfolípidos de inositol (Gp_2), que han sido descritos tanto en los astrocitos tipo 1 en el SNC (Nicoletti et al., 1988; Condorelli et al., 1989; Cornell-Bell et al., 1990), como en los oocitos de Xenopus (Rassendren et al., 1989 y Sugiyama et al., 1987). En ambos casos, el GA y no el KA estimulan el metabolismo de fosfatidil inositol, aún cuando ambos inducen una respuesta electrofisiológica. Así pues probablemente actúan a través de receptores diferentes y posiblemente los de KA no existan en la glía de Müller.

Por otra parte, el análisis de Scatchard de la curva de

saturación (Fig 4), muestra claramente la presencia de dos poblaciones de sitios de unión para $^3\text{H-L-Asp}$ en las membranas de las células de Muller uno de baja afinidad y alta capacidad, cuyo número disminuye considerablemente en ausencia de Na^+ (ver resultados) y otro de alta afinidad y baja capacidad cuyas propiedades no se modifican en presencia o ausencia de Na^+ . Estos datos apoyan la hipótesis de que estos receptores podrían corresponder a un sistema de captación (electrogénica ?) y a un sistema tipo postsináptico (Gp 2 ?) respectivamente.

Por estudios de unión de un ligando marcado radioactivamente a membranas de células en la retina de pollo se ha demostrado que los receptores a aspartato están en concentración muy baja aumentando en número a los 14 días de desarrollo embrionario y que los receptores a AMPA (agonista específico del receptor a quisqualato) presentan una gran proporción entre los días 7 y 8 de desarrollo embrionario (Somohano et al., 1988). En este trabajo se puede ver que la glia aislada presenta una mayor proporción de receptores a L-aspartato que las neuronas aisladas a los 8 días de desarrollo embrionario (1 DIV) los cuales decaen con el tiempo (Fig 2). El hecho de que la concentración de receptores en neuronas y de glia en cultivo no concida con los receptores para L-aspartato medidos en el desarrollo en la retina completa (Somohano et al., 1988), podría explicarse por una baja especificidad del receptor a L-aspartato a los 8 días de desarrollo embrionario, edad en la que se ha observado que el L-aspartato es un potente desplazador del AMPA en la retina completa (Somohano et al., 1988) Así posiblemente a los 8 días de desarrollo embrionario se midió el receptor de L-aspartato mas

el receptor de quisqualato, el cual mas adelante adquiere especificidad farmacológica, lo que se traduciría en una disminución de la unión de L-asp. El mecanismo que induce estos cambios en la especificidad se desconoce, en parte debido a que hasta ahora no se ha podido determinar la estructura de estos receptores. Por otra parte puesto que el cambio en la especificidad de los receptores marcados con AMPA va acompañado de un cambio importante en la afinidad de los mismos (Somohano et al. 1988), no podemos descartar la posibilidad de que disminuyera la concentración del receptor que unia AMPA/L-ASP y apareciera un nuevo tipo específico AMPA/QA.

Con el objeto de aclarar mas a fondo esta discrepancia, se estudió también la cinética de unión de L-ASP a receptores en las membranas de neuronas cultivadas "in vitro". Nuestros resultados indican que al igual que en la glia en la neurona existen dos sistemas de receptores con diferente afinidad y capacidad (Fig 5). En este caso, mientras que el sistema de baja afinidad no cambia durante el desarrollo, la capacidad (no la afinidad) del sistema de alta afinidad disminuye a una cuarta parte de su valor (de 0.95 a 0.24, p.molas/mg de proteína) entre los DIV 1 y 8 (fig 5). Consecuentemente, los resultados obtenidos en la retina completa durante el desarrollo puede deberse a cambios en el sistema de la glia (Somohano y López-Colomé en preparación) o bien a influencias reciprocas glia/neurona, las cuales están ausentes en el cultivo.

En conclusión, hemos caracterizado desde el punto de vista bioquímico 2 tipos de receptores para L-ASP en la glia de Müller

de la retina en cultivo primario. Tanto la cinética como la farmacología de la interacción Asp-Receptor sugieren que una de las poblaciones podría corresponder a un receptor tipo QA, posiblemente relacionado con el metabolismo de fosfoinosítidos descrito en astrocitos tipo 1 y en oocitos de *Xenopus*, mientras que la otra presenta características similares a las descritas para receptores de captación electrogénica tanto en células de Müller como en astrocitos tipo 1.

V- BIBLIOGRAFIA

- Adler, R., Magistretti, P., Hyndman, A y Shoemaker, W. (1982). Purification and cytochemical identification of neuronal and non-neuronal cells in chick embryo retina cultures. DEV. NEUROSCI. 5:27-39.
- Antonicek, H., Persohn, E. y Schachner, M. (1987). Biochemical and functional characterization of a novel neuron-glia adhesion molecule that is involved in neuronal migration. J. CELL. BIOL. 104:1587-1597.
- Backus, K.H., Kettenman, h., y Schachner, M., (1989). Pharmacological characterization of the glutamate receptor in cultured astrocytes. JOURNAL OF NEUROS. RES. 22: 274-282.
- Barbin, G., Selak, I., Manthorpe, M., y Varon, S. (1984). Use of neuronal cultures for the detection of neurotrophic agents. NEUROSCIENCE. 12: 33-43.
- Barres, B. (1989). A new form of transmission? NATURE. 339:343-344.
- Barbour, B., Brew, H., y Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells activated by intracellular potassium. NATURE. 335:29,433-435.
- Bevan, S. y Raff, M. (1985). Voltaje-dependent potassium currents in cultured astrocytes. NATURE. 315:229-232.
- Bevan, S., Chiu, S., Gray, P., y Ritchie, J. (1985). The presence of voltaje-gated sodium, potassium and chloride channels in rat cultured astrocytes. PROC. R. SOC. LOND. (BIOL.). 225,299-313.
- Bignami, A., y Dahl, D. (1973). Differentiation of astrocytes in the cerebular cortex and the pyramidal tracts of the new born rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. BRAIN. RES. 49:393-402.
- Bignami, A., y Dahl, D. (1979). The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillar acidic (GFAP) protein. EXPL. EYE. RES. 28:63-69.
- Björklund, H., Bignami, A., Dahl, D., (1985). Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Muller glia and retinal astrocytes. NEUROSCI. LETT. 54: 3363-3368.
- Bowman, C.L., y Kimelberg, H.K. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. NATURE. 311:5987,656-659.
- Brew, H., y Attwell, D. (1987). Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. NATURE. 327:25,707-709.

- a) Bridges,R.J., Kesslak,P.J., Nieto-Sampedro,M., Broderick, J.T., Yu,Y., y Cotman, C.W. (1987). A L-[³H] glutamate binding site on glia: an autoradiographic study on implanted astrocytes. BRAIN RES. 415, 163-168.

- b) Bridges,R.J., Nieto-Sampedro,M., Kadri,M., y Cotman,C.W. (1987). A novel CL⁻-dependent L-³H-glu binding site on glia: an autoradiographic study in astrocyte membrane. J.NEUROCHEM. 48(6) 87:1709-1706.

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

-Condorelli,D., Ingrao,F., Magri,G., Bruno,V., Nicoletti,F. y Avola,R. (1989). Activation of excitatory amino acid receptors reduces thymidine incorporation and cell proliferation rate in primary cultures of astrocytes. GLIA:2:67-69.

-Conner,J., Detwiter,P. y Sarty,P. (1985). Ionic and electrophysiological properties of retinal Muller (glial) cells of the turtle. J.PHYSIOL.362:79-92.

-Cornell-Bell,A., Finkbeiner,S., Cooper,M. y Smith,S. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: Long-range glial signaling. SCIENCE.247:470473.

-Costa,E., Fadda,E., Kozikoswki,AP., Nicoletti,F., y Wroblewski,J.T. (1988). Classification and allosteric modulation of excitatory amino acid signal transduction in brain slices and primary cultures of cerebellar neurons. En: NEUROBIOLOGY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND TROPHIC FACTORS. (Editado por: Ferrendelli,J., Colliny,R., y Jhonson,E.). Martinus Nighoff. Boston.

-Cotman,C.W., y Iversen,L.L. (1987). Excitatory amino acids in the brain: focus on NMDA-receptors. TINS. 10:7,263-265.

-Coyle,J.T., Biziere,K., y Shwarcz,R. (1978). Neurotoxicity of excitatory amino acids in the neural retina. En:KAINIC ACID AS A TOOL IN NEUROBIOLOGY.(Editado por: McGeer,E.G. et al.)Raven Press. New York. p.177-188.

-Curtis,D. y Watkins,J. (1960).The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. J.NEUROCHEM.6:117.

-Darnell,J., Lodish,H., y Baltimore,D.(1986). Nerve cells and the electrical properties of cell membranes. En:MOLECULAR CELL BIOLOGY.(Editado por:Darnell,J., Lodish,H., y Baltimore,D.) Scientific american books. New York. p.716-717.

-De Vellis,V., Wu,D.K., y Kumar,S., (1986). Enzyme induction and regulation of protein synthesis. En:ASTROCYTES BIOCHEMISTRY, PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY OF ASTROCYTES.Vol.2. (Editado por:

Fedoroff, S., y Vernadakis, A.) Academic Press Inc. Orlando. p.209-228.

-Dowling, J.E. (1979). Information processing by local circuits: The vertebrate retina as a model system. En: THE NEUROSCIENCES: FOURTH STUDY PROGRAM. (Editado por: Schmith, P.O., y Worden, F.G.) Mit Press. Cambridge. p.163-182.

-Drejer, J., Larsson, O. y Schousboe, A. (1983). Characterization of uptake and release processes for D- and L-aspartate in primary cultures of astrocytes and cerebellar granule cells. NEUROCHEM. RES. 8:2,231-243.

-Drejer, J., Meier, E., y Schousboe, A. (1985). Characterization of L-glutamate uptake processes for D-aspartate in primary cultures of astrocytes and cerebellar granule cells. NEUROCHEM. RES. 8:231-243.

-Enna, S.J. (1980). Basic receptor methods I. En: RECEPTOR BINDING TECHNIQUES. Society for neuroscience. Cincinnati, Ohio. p.p. 33-52.

-Enna, S.J. y Snyder, S.H. (1975). Properties of γ -aminobutyric acid (GABA) receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions. BRAIN. RES. 100: 81-97.

-Enna, S.J. y Snyder, S.H. (1976). Properties of γ -aminobutyric acid (GABA) receptor binding in mammalian retina. BRAIN. RES. 115: 174-179.

-Enkvist, K.M.O., Holopainen, I. and Akerman, K. (1988). The effect of K⁺ and glutamate receptor agonists on the membrane potential of suspensions of primary cultures of rat astrocytes as measured with a cyanine dye, Dis-(2-(5)). BRAIN RES. 462:67-75.

-Farber, D. y Adler, R. (1986). Issues and questions in cell biology of the retina. En: THE RETINA A MODEL FOR CELL BIOLOGY STUDIES PART I. (Editado por Adler, R. y Farber, D.) Academic press inc. Orlando. p.p. 2-16.

-Foster, A.C., y Fagg, G.E. (1984). Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes. Their characteristics and relationship to synaptic receptors. BRAIN RES. REVS. 7:103-164.

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

-Gallo, V., Giovannini, C., Suergiu, R., y Levi, G. (1989). Expression of excitatory amino acid receptors by cerebellar cells of the type-2 astrocyte cell lineage. J. NEUROCHEM. 52:1, 1-9.

-Ghandour, M.S., Langley, O.K., Vicendon, G., y Gombos, G. (1979). Double labeling immunohistochemical technique provides evidence of specificity of glial cell markers. J. HISTOCHEM. CYTOCHEM. 27: 1634-1637.

- Grumet, M., Hoffman, S., Crossin, K.I. y Edelman, G.M. (1985). Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and nonneural tissue that mediates glia-neuron interactions. PROC. NATL. ACAD. SCI. 82:8075-8079.
- Hatten, M.E. y Mason, C.A. (1986). Neuron-astroglia interactions in vitro and in vivo. TINS. 168-174.
- Henn, F.A. (1980). Separation of neuronal and glial cells and subcellular constituents. En: ADVANCES IN CELLULAR NEUROBIOLOGY. Vol 1. (Editado por: Fedoroff, S. y Hertz, L.) Academic Press. New York. p.373-400.
- Honore, T. (1989). Excitatory amino acid receptor subtypes and specific antagonist. MEDICAL RESEARCH REVIEWS. 9:1,1-23.
- Honore, T., Drejer, J., Nielsen, M., y Braestrup, C., (1986). Differentiation of Cl^-/Ca^{++} dependent 3H glutamate binding to cortical membranes from rat brain by high energy. JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION. 65:93-101.
- Jaloc, J., y Holopainen, I. (1989). Properties of single potassium channels in cultured primary astrocytes. BRAIN RESEARCH. 488:177-183.
- Johnstone, S. Levi, G. Wilkin, G. Schneider, K. y Ciotti, M. (1986). Subpopulations of rat cerebellar astrocytes in primary culture: morphology, cell surface antigens and 3H -GABA transport. DEV BRAIN RES. 24:63-75.
- Juurink, B.H. y Hertz, L. (1985) Plasticity of astrocytes in primary cultures: an experimental tool and a reason for methodological caution. DEV. NEUROSCI. 7:263-277.
- Kawai, N., Niwa, K. y Abe, T. (1982). Spider venom contains specific receptor blocker of glutamnergic synapses. BRAIN RES. 247: 169-171.
- Kettenman, H. y Schachner, M. (1985). Pharmacological properties of GABA, glutamate and aspartate induced depolarizations in cultured astrocytes. J. NEUROSCI. 5:3295-3301.
- Kuffler, S.W. y Nichols, J.G. (1966). The physiology of neuroglial cells. ERGEB. PHYSIOL. 57:1-90.
- Kuffler, S.W. y Nichols, J.S. (1977). Physiology of neuroglial cells. En: FROM NEURON TO BRAIN (Editado por: Kuffler, S.W. y Nichols, J.G.) Sinauer associates inc. Massachusetts. p. 255-288.
- Lehmann, A. y Hansson, E., (1986). Morphological effects of excitatory amino acid analogs on primary astroglial cultures. NEUROCHEM. INT. 13:1,105-110.
- Lehninger, A.L. (1984). Aminoácidos y peptidos. En: PRINCIPIOS DE

BIOQUIMICA. Omega. Barcelona. 95-116.

-López-Colomé, A.M. (1981) High-affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. NEUROCHEM. RES. 6: 1019-1033.

-López-Colomé, A.M., y Somohano, F. (1982). Characterization of [L - 3H]Aspartate binding to chick retinal subcellular fractions. VISION RES. 22: 1495-1501.

-López-Colomé, A.M. y Somohano, F. (1984). Localization of L-glutamate and L-aspartate synaptic receptors in chick retinal neurons. BRAIN. RES. 298:159-162.

-Lowry, O.H., Rosebrough, W.J., Farr, A.L. and Randall, R.S. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. BIOL. CHEM. 193: 265-275.

-Mac Vicar, B. (1984). Voltage-dependent calcium channels in glial cells. SCIENCE. 226:1345-1347.

-Maggs, A., y Scholes, J. (1986). Glial domains and nerve fiber patterns in the fish retinotectal pathway. J. NEUROSCI. 6: 424-438.

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

-Miller, R.F. y Dowling, J.E. (1970). Intracellular responses of the Müller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. J. NEUROPHYSIOL. 33:323-341.

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

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

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

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

-Neal, M.J. (1976). Amino acid transmitter substances in the vertebrate retina. GEN. PHARMAC. 7:321-332.

-Neugebauer, K.W., Tomaselli, K.J., Lillien, J., y Reichardt, F.L. (1988). N-cadherin, N-CAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. J. CELL. BIOL. 7:1177-1187.

-Newman, E.A. (1986). The Muller cell. En: ASTROCYTES DEVELOPMENT, MORFOLOGY AND REGIONAL SPECIALIZATION OF ASTROCYTES VOL I. (Editado por: Fedoroff, S., y Vernadakis, A.). Academic Press, inc. Orlando. p. 149-166.

-Nicoll, R., Malenka, R., y Kauer, J. (1980). Mechanisms involved in long term potentiation of synaptic transmission. CELLULAR AND MOLECULAR APPROACHES TO SYNAPTIC PLASTICITY. Society of Neuroscience. Toronto. pp:3-15.

-Nicoletti, F., Condorelli, D.F., Magri, G., Ingrao, F., Bruno, V., Catania, M.V. y Avola, R. (1988). Stimulation of inositol phospholipid hydrolysis by glutamate in glial cells: A possible role in the regulation of growth and differentiation. Abstract of the 18th annual meeting of the American Society for Neuroscience, November 13-18.

-Nowak, L., Ascher, P. y Berwald-Netter, Y. (1987). Ionic channels in mouse astrocytes in culture. J. NEUROSCI. 7:101-109.

-Nowak, J.Z. (1988). The isolated retina as a model of the CNS in pharmacology. TIPS. 9:80-82.

-Pasantes-Morales, H., Kleithi, J., Leding, M., y Mandel, P. (1972). Free amino acids of chicken and rat retina. BRAIN RES. 41,479-497.

-Pearce, B., Albrecht, J., Orrow, C., y Murphy, S. (1986). Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. NEUROSCI. LETT. 72: 335-340.

-Pearce, N., Morrow, C. y Murphy, S. (1986). Receptor-mediated inositol phospholipid hydrolysis in astrocytes. EURO. J. PHARMACOL. 121:231-243.

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

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

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

-Ranson, B.R., y Carlini, W.G. (1986). Electrophysiological properties of astrocytes. En: ASTROCYTES BIOCHEMISTRY, PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY OF ASTROCYTES VOL II. (Editado por: Fedoroff, S., y Vernadakis, A.) Academic Press, inc. Orlando. p.1-49.

-Rassendren, F., Lory, P., Pin, J., Bockaert, J. y Nargeot. (1989). A specific quisqualate agonist inhibit kainate responses induced in

Xenopus oocytes injected with rat brain RNA. NEUROSCI. LETT. 99:333-339.

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

-Reiser, G., Loffer, F. y Hampracht, B. (1983). Tetrodotoxin-sensitive ion channels characterized in glial and neuronal cells from rat brain. BRAIN. RES. 261:335-390.

-Richards, J.G., Schuch, R., Möhler, H. y Haefely, W. (1986). Benzodiazepine receptors resolved. EXPERIMENTIA. 42:121.126.

-Sarthy, P.V., y Lam, D.M. (1978). Biochemical studies of isolated glial (Muller) cells from the turtle retina. J. CELL. BIOLOGY. 78: 675-684.

-Schinitzer, J. (1988). Astrocytes in guinea pig, horse and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. GLIA. 174-89.

-Schwarcz, R. (1980). Effects of tissue storage and freezing on brain glutamate uptake. LIFE SCIENCES. 28: 1147-1154.

-Schwartz, E.A. (1982) Identification and function of synaptic transmitters used in the outer synaptic layer of the toad retina. En: NEUROTRANSMITTERS IN THE RETINA AND THE VISUAL CENTERS. (Editado por: Kaneko, A., Tsukahara, N., y Uchizono, K.). Biomedical research foundation. Tokkyo. p. 51-59.

-Schwartz, J.H. (1982) Chemical basis of synaptic transmission. En: PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE. (Editado por: Kandell, E.R., y Schwartz, J.H.). Elsevier/North-Holland. New York. p. 106--120.

-Sensenbrenner, M., Labourdette, G., Delaunoy, J.P., Petteman, B., De Villiers, G., Moonen, G., y Bock, E. (1980) Morphological and biochemical differentiation of glial cells in primary culture. En: TISSUE CULTURE IN NEUROBIOLOGY. (Editado por: Giacobini, E., Vernadakis, A., y Shahar, A.). Raven press. New York. p385-396.

-Smart, T. (1989). Excitatory amino acids: the involvement of second messengers in the signal transduction process. CELL AND MOLECULAR. NEUROBIOL. 9:193-205.

-Somohano, F. y López-Colomé, A.M. Aminoácidos excitadores y plasticidad neuronal. en prensa.

-Somohano, F. y López-Colomé, A.M. Regulation of extracellular glutamate by uptake during development. J. NEUROSCI. RES. (En prensa).

-Somohano, F., Roberts, P.J., y López-Colomé, A.M. (1988). Maturation changes in retinal excitatory amino acid receptors. DEV. BRAIN RES. 42, 59-67.

- Sontheimer, H., Kettenman, H., Backus, K. y Schachner, M. (1988). Glutamate opens Na^+/K^+ channels in cultured astrocytes. 1328-336.
- Strange, P.G. (1988). The structure and mechanism of neurotransmitter receptors. *BIOCHEM. J.* 249, 309-318.
- Sugiyama, H., Ito, I. y Hirono, Ch. (1987). A new type of receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *NATURE.* 325:531-533.
- Tomaselli, K.J., Neugebauer, K.M., Bixby, J.L., Lilien, J., y Reichardt, K.F. (1988). N-cadherin and integrins: two receptors systems on astrocyte surfaces. *NEURON.* 1,33-43.
- Trotter, J. y Schachner, M. (1989). Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. *DEV. BRAIN. RES.* 46:115-122.
- Usołowicz, M.M., Gallo, V., y Cull-Candy, S.G. (1989). Multiple conductance channels in type-2 cerebellar astrocytes activated by excitatory amino acids. *NATURE.* 339,380-383.
- Vaughan, D.W. (1984). The structure of neuroglial cells. En: *CEREBRAL CORTEX. VOL. II.* (Editado por: Jones, E.G., y Peters, A.). Plenum Press. New York. p.285-327.
- Watkins, J.C. (1986). Twenty-five years of excitatory amino acids research. En: *EXCITATORY AMINOACIDS.* (Editado por Roberts, P.J., Storm-Mathisen., y Bradford, H.F.). Mc Millan Press. London. P.1-40.
- Watkins, J.C., y Evans, R.H. (1981). Excitatory amino acid transmitters. A. *REV. PHARMACOL. TOXICOL.* 21-165.
- Whittaker, V.D. (1984). The structure of neuroglial cell. EN: *CEREBRAL CORTEX. VOL. II.* (Editado por, Jones, E.G., y Peters, A.). Plenum Press. New York. p. 285-329.
- Young, A.B., y Snyder, S.H. (1974). The glycine receptor: evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism. *PROC. NATL. ACAD. SCI.* 71:4002.