

03040
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

RECEPTORES PURINERGICOS TIPO P2 EN
NERVIO ÓPTICO DE RATA

TESIS QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)
PRESENTA

Biol. Gisela Edith Rangel Yescas

DIRECTORES DE TESIS: DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA.
DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS.

Campus Juriquilla, Querétaro. Noviembre del 2003.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: GABELA EDITH

ROSEL VESCO

FECHA: 19/NOVIEMBRE/2003

FIRMA: _____

Esta tesis fue dirigida por el Dr. Rogelio Arellano Ostoa y la Dra. Teresa Edith Garay Rojas, y se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Celular del Instituto de Neurobiología. UNAM.

El presente trabajo fue apoyado por:

Beca de Maestría CONACyT No.165456

Beca de DGEP No. de Cuenta 940367-1

Proyecto de DEGAPA 221902

Proyecto de CONACyT 32364-N

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN.

Uno de los neurotransmisores que está involucrado en la comunicación entre neuronas y las células neurogliales es el trifosfato de adenosina o ATP. Hasta el momento se tienen importantes evidencias sobre el papel que juega el ATP en la fisiopatología de las neuronas, astrocitos y microglía, así como los subtipos de receptores P2 que median estos efectos. Sin embargo, aún no se ha caracterizado el papel de la estimulación por ATP en oligodendrocitos. Como un primer acercamiento al estudio del papel del ATP en la fisiología de los oligodendrocitos, en el presente trabajo determinamos los subtipos de receptores purinérgicos P2X presentes en la neuroglía utilizando el nervio óptico como modelo celular. Para caracterizar los receptores purinérgicos P2X expresados en este tejido, utilizamos técnicas de biología molecular (RT-PCR) e inmunohistoquímica. Con las técnicas de RT-PCR, identificamos a nivel de ARNm la expresión de todas las subunidades de P2X reportadas. Así mismo, detectamos la expresión de tres nuevas variantes de receptores P2X, dos corresponden al subtipo P2X₅ y otra al P2X₁. En los ensayos de inmunohistoquímica se demostró la expresión P2X₂₋₇ en oligodendrocitos, y de P2X₁ en astrocitos, axón y/o en vasos sanguíneos. De acuerdo al patrón de expresión de receptores P2X observado en oligodendrocitos, podemos sugerir que el ATP pudiera jugar un papel importante en el mantenimiento del número de oligodendrocitos maduros, así como en la homeostasis de glutamato. Aunado a esto, proponemos que en condiciones patológicas, el ATP pudiera llegar a inducir apoptosis en oligodendrocitos, lo que podría contribuir en la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

TESIS CON
FIRMADO BIEN

ABSTRACT

BACKGROUND: Adenosine triphosphate (ATP) is a neurotransmitter involved in neuronal and glial cell communication. In addition, there is strong evidence for a role of ATP in neurons, astrocytes and microglia physiopathology, as well as on the different P2 receptor subtypes mediating these effects. However, the role of ATP-mediated stimulation on oligodendrocytes remains unclear. **OBJECTIVES:** In the present work the P2X purinergic receptor subtypes in neuroglial cells has been determined, employing the optic nerve as the cellular model. **METHODS:** To characterize the P2X purinergic receptor(s) expressed in this tissue, we employed molecular biology (RT-PCR) and immunohistochemical techniques. **RESULTS:** With RT-PCR, all P2X reported subunits were found. Three new P2X variants were identified also, two corresponding to the P2X₅ subtype, and one to P2X₁. The immunohistochemical assays revealed expression P2X₂₋₇ on oligodendrocytes, and P2X₁ in astrocytes, axon and blood vessels. **CONCLUSIONS:** From our results we propose that ATP play a important role in the number of mature oligodendrocytes and on glutamate homeostasis. Moreover, we propose that under pathological conditions, ATP can induce apoptosis in oligodendrocytes, and this could contribute to the progression of neurodegenerative diseases.

0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rogelio Arellano y a la Dra. Edith Garay por toda su confianza, dedicación y apoyo.

A mi comité tutorial, Dr. Gonzálo Martínez de la Escalera y Dr. Juan Riesgo Escovar por sus consejos y críticas durante la realización de este trabajo.

A los miembros de mi jurado Dr. Julio Morán Andrade, Dr. Juan Riesgo Escovar y Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Al Dr. Carlos Matute Almau por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio.

A la Dra. Carmen Clapp, por facilitarme el equipo necesario para realizar el análisis de imágenes.

A las unidades de Biología Molecular, de Documentación, de Imágenes y Bioterio, por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.

A mis hermanos Fernando, Adrián, Angeles, Cecilio y Rodolfo (y familias) por todo su confianza y cariño.

A mis compañeros de laboratorio Bere, Carlos, Luis, Miriam y Paco por su amistad y apoyo.

A Horacio Ramírez Leyva por su invaluable apoyo técnico.

A Bertha, Carlota, Ceci, Gloria, J.C., Lety, Lucy, Lupe, y Sofy por todos los buenos momentos.

A mis padres Celso y Natalia...

A Miguel Angel... Gracias por compartir mis sueños.



INDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
I. CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO	2
I.A. NEURONAS.	2
I.B. NEUROGLÍA.	4
I.B.1. ASTROCITOS	4
I.B.2. OLIGODENDROCITOS	5
I.B.3. CELULAS DE SCHWANN	6
I.B.4. MICROGLIA	6
II. INTERACCIONES NEURONA-NEUROGLIA.	7
II.A. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO	8
II.B. MADURACIÓN AXONAL Y MIELINIZACIÓN	10
II.C. TRANSMISIÓN SINÁPTICA Y PLASTICIDAD CEREBRAL	11
II.D. RESPUESTA INFLAMATORIA	12
III. EL ATP EN EL SISTEMA NERVIOSO	12
III.A. FUNCIÓN DEL ATP EN EL SISTEMA NERVIOSO	15
III.B. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES P2	18
III.C. RECEPTORES P2 EN LA FISIOLÓGÍA	
DEL SISTEMA NERVIOSO	25
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y MÉTODOS	31
I. DISECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO	31
II. EXTRACCIÓN DE ARN	31
III. TRANSCRIPCIÓN INVERSA	32
IV. AMPLIFICACIÓN POR PCR	33
V. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	35
VI. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	36
VII. CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	36
VIII. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO	38
IX. SECUENCIACIÓN	38
X. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	39
XI. HISTOQUÍMICA	40
XII. INMUNOHISTOQUÍMICA	40
RESULTADOS	42
I. EXTRACCIÓN DE RNA	42
II. TRANSCRIPCIÓN INVERSA	43
III. AMPLIFICACIONES DE RECEPTORES P2X CON INICIADORES DEGENERADOS.	44
IV. AMPLIFICACIONES DE RECEPTORES P2X CON INICIADORES ESPECÍFICOS.	47
V. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES P2X₁ Y P2X₅.	48
VI. INMUNODETECCIÓN EN EL NERVIÓ ÓPTICO DE LOS SUBTIPOS DE P2X IDENTIFICADOS POR RT-PCR.	53
DISCUSIÓN	61
I. ATP EN LA FISIOLÓGÍA DE LOS OLIGODENDROCITOS	61
II. EXCITOTOXICIDAD EN OLIGODENDROCITOS Y ATP	63
III. RECEPTORES P2X EN ASTROCITOS	63
IV. VARIANTES DE RECEPTORES P2X EN NERVIÓ ÓPTICO	64

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CONCLUSIONES	69
PARTICIPACIÓN EN EL CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA	69
PERSPECTIVAS	70
REFERENCIAS	71

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS		Pag.
Tabla I.	Características generales de los subtipos de receptores P2Y.	20
Tabla II.	Características generales de los receptores P2X.	23-24
Tabla III.	Funciones celulares asociadas a los receptores P2.	26
Tabla IV.	Inmunoreactividad de receptores P2X en el nervio óptico.	60

FIGURAS		Pag.
Figura 1.	Molécula de trifosfato de adenosina o ATP.	13
Figura 2.	Receptor tipo P2Y.	19
Figura 3.	Receptor P2X.	21
Figura 4.	Nervio óptico.	28
Figura 5.	Electroforesis en gel de agarosa-formadehído de ARN total de nervio óptico.	42
Figura 6.	Amplificación de la secuencia de GAPDH a partir del ADNc de nervio óptico.	43
Figura 7.	Amplificación de secuencias que codifican para receptores P2X utilizando los iniciadores P2X5'-P2X3'.	44
Figura 8.	Amplificación de plásmidos recombinantes utilizando los iniciadores M13R-M13F	45
Figura 9.	PCR con los iniciadores DEGPX5'-DEGPX3'.	46
Figura 10.	PCR con los iniciadores específicos para los subtipos P2X2, P2X3, P2X5 y P2X7.	47
Figura 11.	Amplificación del receptor P2X1 utilizando iniciadores específicos.	48
Figura 12.	Southern blot P2X ₁ .	49
Figura 13.	Comparación de secuencias P2X ₁ .	50
Figura 14.	Amplificación del receptor P2X ₅ utilizando iniciadores específicos.	51
Figura 15.	Comparación de secuencias P2X ₅ (1).	51
Figura 16.	Comparación de secuencias P2X ₅ (2).	52
Figura 17.	Morfología de cortes longitudinales de nervio óptico.	53
Figura 18.	Inmunohistoquímica de cortes longitudinales de nervio óptico (40X).	54
	A. Marcaje con anti-AB7 (oligodendrocitos).	
	B. Marcaje con anti-GFAP (astrocitos).	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figuras	Pag.
Figura 19. Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes longitudinales de nervio óptico (100X). A. Marcaje con el anticuerpo AB7 (oligodendrocitos); B. Marcaje con anticuerpo P2X ₄ . C. Imágenes A y B empalmadas.	56
Figura 20. Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes longitudinales de nervio óptico (100X). A. Marcaje con el anticuerpo GFAP (astrocitos); B. Marcaje con anticuerpo P2X ₄ . C. Imágenes A y B empalmadas.	57
Figura 21. Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes longitudinales de nervio óptico (100X). A. Marcaje con el anticuerpo AB7 (oligodendrocitos); B. Marcaje con anticuerpo P2X ₁ . C. Imágenes A y B empalmadas.	58
Figura 22. Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes longitudinales de nervio óptico (100X). A. Marcaje con el anticuerpo GFAP (astrocitos); B. Marcaje con anticuerpo P2X ₁ . C. Imágenes A y B empalmadas.	59

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN.

El estudio del sistema nervioso (SN), se había enfocado principalmente en las propiedades de las neuronas y en los mecanismos de comunicación que existen entre ellas. Sin embargo, como sabemos, las neuronas no son ni el único tipo celular ni el más abundante que conforma este importante sistema. Actualmente es reconocida la importancia de las células neurogliales, que se encargan no sólo de dar soporte estructural a las redes neuronales sino que participan en otras funciones esenciales del SN. Lo anterior ha planteado la necesidad de conocer las propiedades fisiológicas de los tipos celulares que conforman la neuroglía y de tratar de comprender como es que se llevan a cabo las interacciones neurona-neuroglia. En este análisis, es importante conocer el tipo de moléculas que están involucradas, así como los mecanismos de señalización que permiten que las células neurogliales interactúen con las neuronas en condiciones normales. La identificación de las moléculas y de los mecanismos que participan en la comunicación neurona-neuroglia, también ayudará en la comprensión cabal de los eventos que desencadenan estados patológicos (Ransom & Orkand, 1996).

Utilizando técnicas de biología molecular y de morfología, en el presente estudio describimos en detalle la identidad molecular y la localización de los receptores purinérgicos tipo P2X expresados en la neuroglia del nervio óptico y discutimos su posible papel fisiológico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES

I. CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO

I.A. NEURONAS

El sistema nervioso esta formado por dos grandes grupos celulares principales: las neuronas y la neuroglía. Las neuronas son células de origen ectodérmico que se caracterizan por tener cuatro regiones definidas morfológicamente: el cuerpo celular (soma), las dendritas, el axón y las terminales sinápticas. Cada una de estas áreas cumplen con una tarea específica en el funcionamiento neuronal. El soma es el centro metabólico de las neuronas, en él se encuentra el núcleo, el retículo endoplásmico, y la mayoría de los organelos celulares. Desde el soma se proyectan dos tipos de prolongaciones: las dendritas y el axón. La mayoría de las células neuronales tienen varias dendritas, las cuales son el aparato receptor de las señales procedentes de otras células. Por el contrario, en general, el cuerpo celular da lugar a un único axón, el cual es una prolongación tubular que se origina a partir de una región especializada en el soma que se denomina cono axónico. El axón es la principal unidad conductora de la neurona, capaz de transmitir señales eléctricas con velocidades en el rango de 1 a 100 m/seg. Algunos axones se dividen en varias ramas, y por lo tanto transmiten la información a varias células y áreas diferentes. Las señales eléctricas propagadas a lo largo del axón son generalmente potenciales de acción, que son impulsos eléctricos rápidos y transitorios que siguen la ley de todo o nada, y que se caracterizan por tener una amplitud de alrededor de 100 mV y una duración de 2 ms. Los potenciales de acción se inician en el cono axónico y son conducidos a lo largo del axón. La velocidad de conducción de los potenciales de acción en los axones se incrementa por la presencia de una vaina de proteolípidos denominada mielina que rodea a los axones prácticamente en toda su longitud. Dicha cubierta presenta interrupciones periódicas que son denominadas nodos de Ranvier; en estos nodos se regeneran los potenciales de acción a medida que son propagados por el axón. El axón se divide cerca de su extremo en ramas que contactan a otras neuronas. El punto de contacto con otras neuronas se denomina sinapsis. La célula que transmite la señal se denomina célula presináptica y aquella que la recibe célula postsináptica (Kandel 1997; Carpenter 1998; Zigmond *et al.*, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Basándose en el número de prolongaciones que parten del cuerpo celular, las neuronas se clasifican en general en tres grandes grupos: unipolares, bipolares y multipolares. Las células unipolares son las neuronas más simples, generalmente tienen una prolongación primaria única, que se divide en muchas ramas, una de ellas sirve como axón y otras funcionan como dendritas. Las células unipolares carecen de dendritas que emerjan del soma, este tipo celular predomina en el sistema nervioso de los invertebrados. Las neuronas bipolares tienen un soma de forma ovoide que da lugar a dos prolongaciones: una dendrita que transporta la información de la periferia al soma, y el axón que conduce la información hacia la célula postsináptica. Muchas neuronas bipolares son sensoriales, como las bipolares de la retina o del bulbo olfatorio. Las células sensoriales que aportan información sobre tacto, presión y dolor son modelos especiales de células bipolares, ya que inicialmente se desarrollan como células bipolares, pero a partir de cierto momento del desarrollo, las dos prolongaciones se fusionan para formar un axón único que emerge del soma y se divide en dos. Un segmento se dirige a la periferia (órganos sensoriales de la piel, articulaciones y músculos), mientras que el otro se dirige a la médula espinal, por ello estas neuronas sensoriales se denominan pseudobipolares. Las neuronas multipolares son muy abundantes en el sistema nervioso de los vertebrados. Estas células poseen un axón único y una o más dendritas que emergen de cualquier zona del cuerpo celular. El tamaño y la morfología de las células multipolares varían enormemente (Kandel 1997, Carpenter 1998; Zigmond *et al.*, 1999).

Las neuronas pueden clasificarse además por su función en tres grupos principales: sensoriales, motoras e interneuronas. Las sensoriales o aferentes, transmiten al sistema nervioso la información perceptiva. Las motoras transmiten ordenes a los músculos y las glándulas. Las interneuronas constituyen el grupo más abundante y se dividen en: interneuronas de relevo o de proyección, que son aquellas que tienen axones largos y portan información a grandes distancias, o en interneuronas locales que tienen axones cortos y procesan información al interior de circuitos locales (Kandel 1997, Carpenter 1998; Zigmond *et al.*, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I.B. NEUROGLIA

Las células neurogliales fueron identificadas originalmente por Virchow en 1858, quien describe “una sustancia intersticial no neuronal” que denomina “pegamento neuronal”. Con base en su morfología y función las células neurogliales se clasifican en macroglia y microglia. La macroglia esta compuesta por astrocitos y oligodendrocitos; ambos tipos celulares tienen un origen ectodérmico común con el de las neuronas. Embriológicamente, estas células se originan en las zonas ventriculares y subventriculares del tubo neural, como precursores gliales, que posteriormente se diferencian (Skoff & Knapp, 1995). El linaje astroglial está constituido por los proastroblastos que contienen vimentina como filamento intermedio, los astroblastos que además expresan la proteína ácido fibrilar glial (GFAP), y finalmente los astrocitos completamente diferenciados. Los oligodendrocitos se diferencian a partir de progenitores bipotenciales O2A (oligodendrocito-tipo-2-astrocito) que también pueden generar un subtipo de astrocitos *in vitro*, o bien, a partir de los oligodendroblastos que son células con capacidad proliferativa que expresan galactocerebrósidos y algunos constituyentes de la mielina. La microglia, en cambio, está formada por un solo tipo celular de origen mesodérmico, son células pequeñas, y proliferan cuando son estimuladas por lesiones del sistema nervioso (Kettenmann 1999; Steward 2000; Nicholls *et al.*, 2001).

I.B.1. ASTROCITOS

Los astrocitos se caracterizan por estar en estrecho contacto con el soma de las neuronas y con las paredes de los vasos sanguíneos, esto último a través de prolongaciones membranales llamados “pies chupadores”. Se clasifican en fibrosos y protoplasmáticos, los primeros se localizan principalmente en la materia blanca. Son células de morfología estrellada, relativamente transparentes, con núcleo regular y largas prolongaciones de la membrana escasamente ramificadas. Sus gránulos no están muy desarrollados en comparación con los de otros tipos de células gliales. Contienen numerosos filamentos en el citoplasma formados principalmente de GFAP y vimentina (Eng *et al.*, 1971). Por otra parte los astrocitos protoplasmáticos, se encuentran en la sustancia gris, son células con numerosas prolongaciones membranales muy

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ramificadas. Estas ramificaciones salen del soma en todas direcciones. Su núcleo es regular con forma esférica u ovoide, y presentan mayor densidad de gránulos que los astrocitos fibrosos. Presentan poca cantidad de filamentos formados por GFAP. (Kettenmann 1999; Steward 2000; Nicholls *et al.*, 2001).

Existen otros tipos astrogliales *in vivo* que forman la glia radial, esta se extienden a lo largo de la sustancia blanca con una prolongación membranal o grupos de prolongaciones. Dichas prolongaciones no tienen ramificaciones, y a menudo corren en paralelo con los ejes de las fibras nerviosas en la sustancia blanca. En este tipo celular también se detecta la expresión de GFAP. Otros tipos de glía radial que presentan mucha semejanza con los astrocitos, son las células de Müller de la retina, y las células de Bergman (células epiteliales de golgi del cerebelo) que se extienden radialmente a través de la capa molecular de la corteza del cerebelo. Finalmente, en este grupo se encuentran los tanicitos que se localizan en el revestimiento ependimal de los ventrículos, estos poseen una prolongación membranal sin ramificaciones que está en contacto con los vasos sanguíneos cercanos.

I.B.2. OLIGODENDROCITOS

Se caracterizan por tener forma esférica o poligonal y presentar pocas prolongaciones. Tienen un núcleo redondo u oval, y no presentan gránulos de glucógeno ni filamentos intermedios. Se clasifican en interfasciculares, perineurales y perivasculares. Los primeros se encuentran en la sustancia blanca y gris, alineados en filas ubicadas en paralelo a los tractos nerviosos para formar mielina que recubre los axones en el sistema nervioso central. Los oligodendrocitos perineurales se encuentran en la sustancia gris, como células satélites adyacentes a los somas de las grandes neuronas, y los perivasculares se encuentran asociados a los vasos sanguíneos (Del Río Hortega 1919).

Basándose en las características morfológicas, como el tamaño del soma, número, propiedades de las prolongaciones membranales, distribución y el modo de interacción con los axones, Del Río Hortega estableció otra clasificación agrupándolos en cuatro categorías (I, II,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

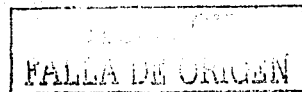
III, IV). Estudios morfológicos posteriores comprobaron que la oligodendroglía constituye una familia de células polimórficas, donde la mayor parte de ellas tienen la función común de formar la mielina (Friedman *et al.*, 1989; Mori de Moro *et al.*, 1990). Esta diversidad aparece incluso en los oligodendrocitos interfasciculares y podría ser la base de una diversidad funcional. Por ejemplo, los oligodendrocitos perineurales no forman mielina en condiciones normales pero sí en condiciones patológicas. En los oligodendrocitos perivasculares se ha observado una delgada lámina formada por la membrana del astrocito que se interpone entre éste y el vaso sanguíneo, lo cual sugiere interacciones complejas entre estos tipos celulares (Mugnaini & Walberg, 1964).

I.B.3. CELULAS DE SCHWANN

Las células de Schwann comparten muchas características con los oligodendrocitos. Son células pequeñas con escaso número de prolongaciones. Estas células producen las vainas de mielina que aíslan a los axones del sistema nervioso periférico. Cada célula de Schwann está situada a lo largo del axón y forma un segmento de la vaina de mielina de alrededor de 1 mm de largo (Kandel 1997).

I.B.4. MICROGLIA

La microglía fue identificada como un elemento del sistema nervioso central por Del Río Hortega (1919) quien la visualizó con la tinción de carbonato de plata. Estas son células más pequeñas que los astrocitos, con un núcleo alargado o triangular y un soma que a menudo se extiende con amplias prolongaciones que invaden el neuropilo cercano. Se encuentran tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris aunque son más abundantes en esta última. La mayor parte están dispersas y unas pocas se encuentran próximas a las neuronas y a los vasos sanguíneos. Constituyen el 5-20% de las células gliales en el sistema nervioso central. Se pueden encontrar en dos estados morfológicos y funcionales: 1) quiescente o microglía ramificada presente en condiciones normales, y 2) microglía activada o reactiva, que se encuentra en estados patológicos y tienen capacidad fagocítica. Dependiendo del estado funcional de la microglía, ésta expresa marcadores antigénicos y enzimas distintas, como el complejo mayor de



histocompatibilidad (MHC) que se expresa en mucho mayor grado bajo condiciones patológicas. También existen marcadores comunes para ambos estados como las lectinas, que se unen a residuos glicosilados de la membrana. Otra característica de estas células es su capacidad para absorber colorantes, se sabe también que las células *in vitro* son diferentes a las observadas *in vivo*, ya que *in vitro* se asemejan más a macrófagos, esto probablemente debido a la presencia de altos niveles de suero en el medio de cultivo. En células en cultivo se ha comprobado que este tipo glial es capaz de secretar citocinas (Sawada *et al.*, 1989). Dada la expresión de determinantes antígenicos de la línea de monocito/macrófago se piensa que este grupo celular interviene en la vigilancia inmunológica del sistema nervioso central.

II. INTERACCIONES NEURONA-NEUROGLIA

Como se ha mencionado, inicialmente a la neuroglía se le atribuyó un papel principalmente estructural, actuando como soporte de las neuronas (Barres 1991). Sin embargo, desde que se aisló la neuroglía y se pudo estudiar *in vitro*, se ha observado que presenta características funcionales muy diversas. Algunas de ellas, inclusive, eran atribuidas exclusivamente a las neuronas, por ejemplo: a) liberación y captura de iones y neurotransmisores (Madelian *et al.*, 1985; Huxtable 1989; Martín *et al.*, 1990; Levi & Patricio, 1992; Laschet *et al.*, 1992), b) secreción de factores neurotróficos (Furukawa *et al.*, 1986; Manthorpe *et al.*, 1986; Bock 1978; Ballotti *et al.*, 1987; Stockli *et al.*, 1989; Wittingham-Mayor *et al.*, 1989; Gonzalez *et al.*, 1990; Zafra *et al.*, 1990; Frautschy *et al.*, 1991; Rudge *et al.*, 1991; Wahl *et al.*, 1991), c) mantenimiento del microambiente del cerebro (Koelle 1950; Berl & Clarke, 1983; Westlund *et al.*, 1990; Orkand 1995; Orkand *et al.*, 1966), d) formación de la barrera hematoencefálica y regulación del metabolismo del glucógeno (Cataldo & Broadwell, 1986; Larrabee 1992; Magistretti *et al.*, 1993). e) Expresión de canales modulados por ligando y dependientes de voltaje (Barres *et al.*, 1990; Blannkenfeld & Kettenmann, 1991; Matute *et al.*, 1992), así como receptores a diversos neurotransmisores acoplados a sistemas de segundos mensajeros (Jensen & Chiu, 1991; Matute *et al.*, 1992), sugiriendo que pueden ser blanco de señales originadas en las neuronas. Todas estas propiedades permiten a la neuroglía participar como un elemento clave en el funcionamiento del sistema nervioso (Vesce *et al.*, 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las interacciones neurona-neuroglia están involucradas en procesos tan complejos como la proliferación neuronal durante el desarrollo del SN, el mantenimiento de la homeostasis, y la plasticidad sináptica en el adulto. Dichas interacciones pueden ser clasificadas como sigue: 1) neuroglia-neuroglia, involucrando entre otros mecanismos a la señalización mediada por iones y moléculas pequeñas que pasan de una célula neuroglial a otra a través de uniones comunicantes. Este tipo de uniones entre células gliales se ha descrito en regiones como la médula espinal, la corteza, el hipotálamo, el hipocampo, así como el nervio óptico y el cerebelo (Vernadakis 1996), 2) Interacciones neurona-neuroglia las cuales están mediadas por neurotransmisores como el glutamato. Este tipo de interacciones se dan principalmente en regiones cercanas a los botones sinápticos (Barres 1991), y 3) neuroglia-neurona mediadas principalmente por neurotransmisores y por cambios en la concentración extracelular de Na^+ , K^+ y Ca^{++} (Vernadakis 1996). Actualmente se han identificado un gran número de moléculas, de diferente naturaleza química, que median las interacciones neurona-neuroglia, así como el papel fisiológico que juegan en el funcionamiento del SN. Algunos ejemplos de esto se describen a continuación.

II.A. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO.

La formación de las conexiones neuronales específicas representa una etapa crucial durante el desarrollo del sistema nervioso. En este contexto, las células neurogliales juegan un papel fundamental ya que los astrocitos y oligodendrocitos secretan diferentes moléculas que participan de manera activa en el establecimiento adecuado de dichas conexiones. Un ejemplo de las moléculas que participan son las tenasinas; éstas son un grupo de glicoproteínas expresadas en la matriz extracelular, que promueven o inhiben la proliferación y migración neuronal. Existen cuatro subtipos de tenasinas, TN-C, TN-R, TN-X y TNY. Todas ellas se caracterizan por presentar un segmento rico en cisteínas, una región muy similar a la fibronectina tipo III en la región del amino terminal, y una región homóloga con los fibrinógenos- β y γ en la región del carboxilo terminal. El efecto de las tenasinas en las neuronas depende del estado de desarrollo y del subtipo expresado; por ejemplo, la TN-C se expresa en estadios tempranos del desarrollo y promueve el crecimiento dendrítico en las neuronas (Faissner 1997). Otra molécula que está involucrada en el desarrollo del sistema nervioso es la llamada NOGO, ésta forma parte de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mielina en oligodendrocitos, y se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que inhibe el crecimiento axonal (Goldberg & Barres, 2000).

La proliferación, la diferenciación y la muerte celular, tanto de neuronas como de neuroglia, son fenómenos de gran relevancia en diferentes estadios del desarrollo del SN. Se han identificado diversas moléculas producidas por la neuroglia que actúan como factores de crecimiento neuronal. Por ejemplo, se ha demostrado que los astrocitos producen y liberan factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de astrocitos (GFs) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los cuales promueven la proliferación y diferenciación de neuronas que producen la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) (Avola *et al.*, 2000). Otro grupo de moléculas que son fundamentales en el desarrollo del sistema nervioso son las hormonas tiroideas. El efecto de estas hormonas sobre la maduración celular depende de las interacciones neurona-neuroglia. Mediante estudios de cocultivos de neuronas y astrocitos, se ha podido establecer que la hormona triyodotironina o T3 promueve la proliferación neuronal, pero de una manera indirecta. La T3 actúa directamente sobre los astrocitos, induciendo en éstos la liberación de factor de necrosis tumoral- β (TNF- β) y factor de crecimiento epidermal (EGF). Estos dos mediadores químicos actúan vía autócrina sobre los astrocitos promoviendo su proliferación y diferenciación, y al mismo tiempo actúan vía parácrina sobre las neuronas induciendo la proliferación celular (Alcántara *et al.*, 1999).

Por otra parte, la muerte celular durante el desarrollo es un fenómeno importante para el establecimiento correcto de las conexiones sinápticas. De igual manera, para que se pueda generar un adecuado proceso de mielinización, es necesario regular el número de células mielinizantes requerida en una zona determinada. En este contexto se han identificado moléculas producidas por las neuronas que modulan la muerte celular en células mielinizantes. Un ejemplo de ellas son las neuroregulinas (NRG). Hasta el momento se han identificado 12 distintas NRG; todas ellas tienen una región en común que es parecida al factor de crecimiento epidermal (EGF). Estas moléculas son expresadas en niveles altos en axones durante estadios tempranos del desarrollo, y ha sido demostrado *in vitro* que previenen la apoptosis en precursores de células de Schwann. La

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

evidencia reunida sugiere que estas moléculas participan en la maduración del sistema nervioso central, manteniendo el número adecuado de células mielinizantes (Syroid *et al.*, 1996).

II.B. MADURACIÓN AXONAL Y MIELINIZACIÓN

Como parte del proceso de maduración del SN, es importante que el mismo axón madure y sea mielinizado de forma correcta. Para que estos procesos se lleven a cabo, se requiere que las diversas proteínas expresadas en el axón sean ubicadas en la zona adecuada. Por ejemplo, una de las moléculas que promueve la distribución correcta de estas proteínas axonales es el galactolípido GalC. Esta molécula es producida en los oligodendrocitos y se ha demostrado *in vivo* que está involucrada en la correcta distribución de canales de Na⁺ y K⁺ en las regiones paranodales del axón (Vadnick & Shrager, 1998; Dupree *et al.*, 1999).

El proceso de mielinización también está modulado por las interacciones entre neurona-neuroglía y neuroglía-neuroglía. La proliferación, diferenciación y la sobrevivencia de oligodendrocitos está mediada por un importante número de moléculas de diferente naturaleza, que son producidas por las neuronas o por astrocitos. Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que factores como: dopamina, péptidos opioides, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos-2), NT-3 (neurotrofina-3) y CNTF (factor neurotrófico ciliar), están involucrados en la proliferación de células precursoras de oligodendrocitos (Knapp *et al.*, 1998; Barres & Raff, 1999; Butt & Berry, 2000; Fruttiger *et al.*, 1999). Así mismo, se sabe que la IL-2 (interleucina-2), IL-6 (interleucina-6) y T3, promueven la diferenciación y la sobrevivencia de este tipo celular (Baumann & Pham, 2001). La proliferación, diferenciación y la sobrevivencia de oligodendrocitos son fundamentales para un correcto proceso de mielinización, por lo que la ausencia de alguna de estas moléculas se ve reflejada en la expresión de diferentes anomalías en la transmisión eléctrica, como se observa en algunos modelos experimentales de enfermedades desmielinizantes.

FALLA DE ORIGEN

II.C. TRANSMISIÓN SINÁPTICA Y PLASTICIDAD CEREBRAL

La neuroglía participa de una manera activa en la modulación de la transmisión sináptica. Las células neurogliales expresan una gran cantidad de receptores y transportadores de neurotransmisores, además de que son capaces de sintetizar y liberar algunos de ellos. Dentro de los receptores a neurotransmisores que expresan las células gliales son: receptores a GABA, a glutamato (Blannkenfeld *et al.*, 1995), a acetilolina, tanto muscarínicos como nicotínicos (Hosli & Hosli, 1988) a serotonina (Hertz *et al.*, 1979, a dopamina (Bongarzone *et al.*, 1998; Zanassi *et al.*, 1999) receptores adrenérgicos (Burguess & MacCarthy, 1985), a péptidos opioides (Ruougon *et al.*, 1983), a oxitocina y a vasopresina (Hatton *et al.*, 1992), y receptores purinérgicos (Verkhatsky & Steinhauser, 2000). La expresión de todos estos receptores le permite a la glia ser blanco de mensajes originados en las neuronas.

En diferentes preparaciones *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado que las células neurogliales, responden al estímulo de neurotransmisores, movilizándolo calcio intracelular y generando corrientes eléctricas (Barres, 1991; Newman & Zahs, 1998). El incremento de calcio intracelular en la neuroglía puede inducir la liberación de neurotransmisores como el glutamato (Newman & Zahs, 1998). Este neurotransmisor, por ejemplo, puede actuar sobre las terminaciones pre y postsinápticas, y modificar de esta manera la transmisión de la información entre las neuronas. Por la existencia de un gran número de evidencias en este sentido, actualmente ya es aceptado un nuevo modelo de transmisión sináptica, formado por tres elementos: neurona presináptica-neurona postsináptica-neuroglía (Araque *et al.*, 1999; Rochon *et al.*, 2001; Vesce *et al.*, 2001).

La neuroglía interviene en la regulación del número de sinapsis y en la actividad eléctrica espontánea que presenta una neurona. Ha sido demostrado que la presencia de la neuroglía en un cultivo neuronal, incrementa el número de dendritas y de vesículas sinápticas por neurona; así mismo se observa un incremento en la generación de corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (mEPSCs) (Ullian *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha observado que el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), liberado por astrocitos, induce la expresión de receptores a

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

glutamato tipo AMPA en neuronas del hipocampo, modulando así la respuesta de éstas células ante la estimulación con glutamato (Beattie *et al.*, 2002). Estos datos son sólo algunos ejemplos de una gran cantidad de estudios que indican que la neuroglía juega un papel activo en la modulación de la transmisión sináptica durante el desarrollo del sistema nervioso, y durante procesos plásticos en el individuo adulto.

II.D. RESPUESTA INFLAMATORIA

La activación de la microglía, es uno de los primeros fenómenos que se observan después de un daño neurotóxico en el sistema nervioso. Este fenómeno tiene como finalidad reparar el sitio dañado; sin embargo, en algunos casos la activación prolongada de la microglía puede tener un efecto negativo en el sistema y favorecer con ello la progresión de enfermedades neurodegenerativas. Aún no se conocen totalmente los factores que determinan la dirección que toma la respuesta inflamatoria después de algún tipo de daño. Sin embargo, ha sido sugerido que moléculas como las interleucinas, median las interacciones neurona-neuroglía durante este fenómeno. Por ejemplo, cuando la IL-6 es liberada por la microglía activada como respuesta al daño neurotóxico, promueve la proliferación celular de astrocitos e incrementa la sobrevivencia en neuronas (Eskes *et al.*, 2002).

Todo lo anterior muestra que las interacciones neurona-neuroglía son fundamentales para el funcionamiento del sistema nervioso, por lo que el caracterizar las diferentes moléculas y los mecanismos involucrados en dichas interacciones permitirá entender mejor la fisiología del SN y en algunos casos identificar las bases moleculares de las patologías en este importante sistema.

III. EL ATP EN EL SISTEMA NERVIOSO

Entre las moléculas transmisoras que están involucradas en los diferentes tipos de interrelaciones entre las neuronas y las células neurogliales, se encuentra el trifosfato de adenosina o ATP (Fig.1). El ATP es la "moneda energética" en el metabolismo celular; además, esta importante molécula puede ser liberada de las células tanto en condiciones fisiológicas como

patológicas, y actuar como mediador químico en un gran número de sistemas celulares (Bodin & Burnstock, 2001). El ATP es una molécula que cuenta con las propiedades necesarias para ser un buen mediador químico: es una molécula pequeña, difunde rápidamente, es inestable y no es abundante en el espacio extracelular (Fields & Stevens, 2000).

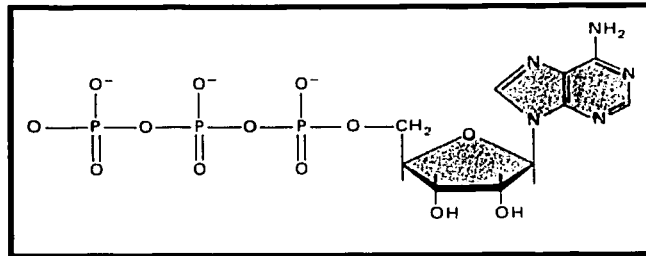


Figura 1. Molécula de trifosfato de adenosina o ATP.

En el SN el ATP se libera durante la estimulación nerviosa. Esta molécula es un importante neurotransmisor en el sistema nervioso autónomo, principalmente en el sistema nervioso simpático (Kennedy 1996; Sneddon 2000). Así mismo, mediante estudios de microdiálisis y utilizando ensayos de luciferina-luciferasa, se ha determinado que existe una liberación basal de ATP en el cerebro de rata de 1.43 ± 0.14 fmol/min/mm². Después de una estimulación eléctrica (5 mA durante 10 minutos), se observó un incremento en los niveles de ATP extracelular, alcanzando una concentración de 45.5 ± 4.23 fmol/min/mm² (Wu & Phillis, 1978).

Por otra parte, también se ha demostrado mediante diferentes ensayos, que los niveles de ATP extracelular se incrementan durante fenómenos patológicos como la isquemia. La isquemia cerebral es una reducción en el flujo sanguíneo en una determinada zona del tejido. Este fenómeno puede presentarse después de algún tipo de trauma, o como consecuencia de alteraciones en la microvascularización del cerebro. Por ejemplo, en pacientes con Alzheimer, se presentan alteraciones morfológicas en los capilares cerebrales como consecuencia de la

acumulación anormal de proteínas como la β -amiloide; esto provoca una reducción en el flujo sanguíneo en diferentes zonas del cerebro, y por lo tanto una disminución tanto en los nutrientes celulares como en el oxígeno que llegan a esa zona, lo que finalmente induce muerte celular (De la Torre & Mussivand, 1993). Se ha demostrado en anfibios, que la disminución del oxígeno en el cerebro, ocasiona un incremento excesivo en la liberación de ATP en el espacio extracelular. En condiciones normales la concentración de ATP en el cerebro de anfibio es de $1.21 \pm 0.12 \text{ nM l}^{-1}$; después de someter a estos organismos a condiciones de hipoxia durante aproximadamente 240 min, se encontró que los niveles de ATP extracelular alcanzaban una concentración hasta de $7.85 \pm 3.7 \text{ nM l}^{-1}$ (Lutz & Kabler, 1997), lo que sugiere que este nucleótido pudiera actuar como mediador químico en el sistema nervioso en condiciones de estrés como lo es un estado de isquemia.

El ATP es liberado por las neuronas mediante diferentes mecanismos. Igual que el resto de los neurotransmisores puede liberarse a través de la exocitosis de vesículas sinápticas. Ha sido sugerido que esta molécula también puede ser liberada a través de proteínas transportadoras de ATP denominadas proteínas ABC (por su nombre en inglés: ATP-binding cassette proteins), principalmente por el transportador CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Zimmermann 1994; Rathbone *et al.*, 1999; Bodin & Burnstock, 2001). Las células neurogliales también liberan ATP. Se ha demostrado por ejemplo que los astrocitos *in vitro* liberan ATP como respuesta a la activación de receptores a glutamato tipo AMPA. El mecanismo de liberación observado en astrocitos parece estar mediado principalmente por los transportadores CFTR. Además, en este mismo tipo celular también se ha identificado un mecanismo de liberación de ATP parecido a la exocitosis (Queiroz *et al.*, 1999). Otro tipo celular en donde se ha identificado la expresión de transportadores de ATP es la microglia. Mediante estudios de biología molecular y de fisiología celular se ha demostrado que estas células expresa transportadores de ATP de la familia ABC (las proteínas *mdr1a*, *mdr1b*, *mrl1* y *mrl4*). Lo anterior sugiere que la microglia pudiera participar de manera importante en el mantenimiento de los niveles extracelulares de ATP (Ballerini *et al.*, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una vez en el espacio extracelular, el ATP es hidrolizado por la activación de una familia de ecto-ATPasas, formando ADP, AMP y adenosina, los cuales a su vez también podrían actuar como mediadores químicos. No se tienen datos exactos sobre la vida media del ATP extracelular (*in vivo*) en el SN. Hasta el momento se sabe que, las ecto-ATPasas se localizan en la región externa de la membrana celular, tienen una masa molecular de 50 kDa aproximadamente, presentan su máxima actividad a un pH de 7.5-8.5, y pueden ser moduladas por iones como Mg^{2+} y Ca^{2+} . Por análisis de Northern blot, se ha determinado que este tipo de enzimas son expresadas por neuronas y astrocitos, principalmente en hipocampo y cerebelo (Hohmann *et al.*, 1993; James & Richardson, 1993; Zimmermann *et al.*, 1996; Zinchuk *et al.*, 1999). Se han realizado ensayos de actividad enzimática, purificando la membrana plasmática de sinaptosomas de cerebro de rata, y se ha demostrado que las ecto-ATPasas presentes en esta preparación, pueden hidrolizar de 0.08 ± 0.02 a 0.35 ± 0.05 μM de ATP/min/mg de proteína.

El papel del ATP extracelular en la fisiología del sistema nervioso se ha estudiado de dos maneras: por una parte se han realizado un importante número de trabajos que se han enfocado en la caracterización del efecto del ATP sobre la fisiología de los diferentes tipos celulares que conforman el sistema nervioso. Sin embargo, existen también un gran número de estudios orientados hacia la caracterización del tipo de receptores a ATP que son expresados tanto en las neuronas como en la neuroglia, esto último, como una manera indirecta de conocer el efecto de dicha molécula en la fisiología de estas células.

III.A. FUNCIÓN DEL ATP EN EL SISTEMA NERVIOSO.

El ATP juega un papel importante en la fisiología del SN. Esta molécula actúa como un neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central y periférico. Además puede actuar como co-transmisor en el sistema de señalización de acetilcolina, noradrenalina y de ácido gamma amino butírico (GABA) (Poelchen *et al.*, 2001; Jo & Role, 2002). El ATP también tiene el papel de neuromodulador; por ejemplo, la estimulación neuronal con dicho nucleótido inhibe la liberación de noradrenalina y serotonina en corteza de rata (Kugelgen *et al.*, 1994, 1997), e

induce la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Krugel *et al.*, 1999) y en el estriado (Zhang *et al.*, 1995), así como de GABA y de glutamato en el hipocampo (Sperlagh *et al.*, 2002).

La participación del ATP como factor liberador también es importante para el funcionamiento del SN. Se ha demostrado *in vitro* que este nucleótido estimula la liberación de hormonas como prolactina o la hormona luteinizante en células de la adenohipófisis (Chen *et al.*, 1995; Nunez *et al.*, 1997). Por otra parte, también se ha demostrado que la presencia de ATP incrementa la liberación de vasopresina y oxitocina en neurohipófisis aislada. Estos datos apoyan la idea de que el ATP participa de manera activa en el control local del sistema neuroendocrino (Sperlagh *et al.*, 1999).

Por otra parte, al ATP también se le ha relacionado con fenómenos plásticos en el sistema nervioso. Por ejemplo, la potenciación a largo plazo o LTP en el hipocampo se han relacionado con fenómenos plásticos involucrados en procesos como aprendizaje y memoria. El principal neurotransmisor involucrado con la generación de LTP es el glutamato. Mediante diferentes estudios, se ha demostrado que el ATP es un transmisor que induce un incremento en los LTP en el hipocampo. Sin embargo, cabe mencionar que aún no se han caracterizado las bases moleculares de tal efecto (Wieraszko & Ehrlich, 1994; Fujii *et al.*, 1995; Wieraszko 1996).

Las células neurogliales también responden a la estimulación con ATP. Por ejemplo, en astrocitos se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la exposición a este nucleótido produce un incremento en la concentración de calcio intracelular (Kirischuk *et al.*, 1995; King *et al.*, 1996; Troadec *et al.*, 1999). La proliferación celular (astrogliosis) como respuesta al ATP, es uno de los fenómenos celulares más importante que se han identificado en astrocitos (Abbraccio *et al.*, 1994; Ciccarelli *et al.*, 1994). Se ha propuesto que el fenómeno de astrogliosis observado después de algún tipo de lesión cerebral es consecuencia de la liberación excesiva de ATP durante estas lesiones. Por otra parte, se ha demostrado que el ATP promueve la liberación de glutamato en este tipo celular. El glutamato es un neurotransmisor excitatorio involucrado en fenómenos como: generación de LTP y citotoxicidad. Es probable entonces que algunos de los

efectos atribuidos al ATP, como el incremento en LTP en el hipocampo, sea un efecto indirecto mediado por la liberación de glutamato desde la neuroglia (Jeremic *et al.*, 2001).

El papel del ATP en la función de la microglia está relacionada con la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso. Como ya se mencionó, la concentración de ATP extracelular se incrementa como respuesta a fenómenos como traumatismos cerebrales o isquemia. Como parte del mecanismo involucrado en la reparación del daño tisular, después de la presencia de estos insultos celulares, se inicia una respuesta inflamatoria. En este sentido, se ha propuesto que el ATP juega un papel de inmunomodulador, el cual favorece el inicio y mantenimiento de dicha respuesta (Le Feuvre *et al.*, 2002). A continuación se describirá un modelo de cómo este nucleótido modula la respuesta inflamatoria en el cerebro: El incremento de ATP extracelular (después de algún tipo de lesión celular), promueve el reclutamiento de la microglia en la zona lesionada, y posteriormente induce la activación de este tipo celular. Como consecuencia de esa activación, la microglia/macrofago produce y libera interleucina-1 β (IL-1 β) (Morigiwa *et al.*, 2000; Inoue 2002; Le Feuvre *et al.*, 2002). La IL-1 β actúa vía autócrina favoreciendo la síntesis y liberación de diferentes mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la IL-6 (Hide *et al.*, 2000). El ATP y la interleucina 6 (IL-6), inducen la proliferación celular en los astrocitos. Este fenómeno se denomina astrogliosis, es un mecanismo que participa en la reparación del tejido. Dado que las neuronas no se pueden dividir en el organismo adulto, la formación de la cicatriz glial (astrogliosis), es parte del sistema que actúa para reparar el tejido dañado (Abbracchino *et al.*, 1994; Ciccarelli *et al.*, 1994). Así mismo, el ATP también promueve la liberación de moléculas proinflamatorias en astrocitos, entre ellas algunos metabolitos del ácido araquidónico, también inhibe la síntesis y liberación de TNF, IL-6 y óxido nítrico en este tipo celular. Por lo anterior se sugiere que el ATP juega un papel en la respuesta inflamatoria, regulando las concentraciones de los mediadores inflamatorios en el espacio extracelular (Stella *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000). Este mecanismo de reparación celular modulado por el ATP, es de principal importancia para conservar la estructura tisular y por lo tanto para recuperar, en la medida de la posible, el funcionamiento del SN después de una lesión celular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuando la respuesta inflamatoria es de tipo crónico, se convierte en un fenómeno agresivo, ya que la estimulación sostenida de algunos mediadores proinflamatorios puede llegar a ser tóxica para el tejido (Cotran *et al.*, 1995). La respuesta inflamatoria crónica, es una característica que comparten enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, Alzheimer y la de Parkinson, entre otras (Rothwell 1999). En condiciones de respuesta inflamatoria crónica, se ha demostrado que el ATP puede inducir directamente la muerte celular en neuronas y en microglia (Amadio *et al.*, 2002; Cavaliere *et al.*, 2002). Finalmente, es importante recordar que el ATP puede inducir la liberación de glutamato en astrocitos, y que este neurotransmisor es reconocido como una molécula citotóxica en el SN (Jeremic *et al.*, 2001). Por lo anterior se propone que la respuesta inflamatoria crónica por si misma, es un fenómeno que favorece la progresión de enfermedades neurodegenerativas, y por lo tanto, el bloqueo de la liberación de ATP y/o de sus receptores específicos, que podrían ser un blanco clínico importante en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Rothwell 1999; Ziganshin *et al.*, 2002).

El efecto del ATP en la fisiopatología de las células mielinizantes aún no esta bien caracterizado. Por ejemplo, en células de Schwann, se ha demostrado *in vitro* que la estimulación con ATP, induce un incremento en el calcio intracelular, y que este fenómeno promueve la liberación de glutamato (Jiftinija & Jeftinija, 1998). En el caso de los oligodendrocitos, se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, que el ATP también induce movilización de calcio intracelular, fenómeno observado exclusivamente en oligodendrocitos maduros. Actualmente, aún se desconoce el papel fisiológico o patológico que el ATP pudiera tener en estas células (Kirischuk *et al.*, 1995; James & Butt, 1999, 2001).

III.B. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES P2

La actividad del ATP está mediada por receptores de membrana denominados P2. Basados en análisis de tipo fisiológico, farmacológico, bioquímico y molecular, este grupo de receptores se ha subdivido en P2X y P2Y. Funcionalmente P2X son receptores ionotrópicos, mientras que los P2Y pertenece al grupo de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN^s

(Ralevic & Burnstock, 1998). Los receptores P2Y son proteínas de 308 a 377 amino ácidos (a.a.) y tienen siete dominios transmembranales formados por α -helices. Las asas extracelulares formadas entre los dominios transmembranales III, VI y VII están involucradas en la interacción con el ligando, y se ha observado que los dominios III y VII son los más conservados. El grupo amino terminal se encuentra en la región extracelular, mientras que el grupo carboxilo se ubica en la región intracelular (Fig.2) (Ralevic & Burnstock, 1998).

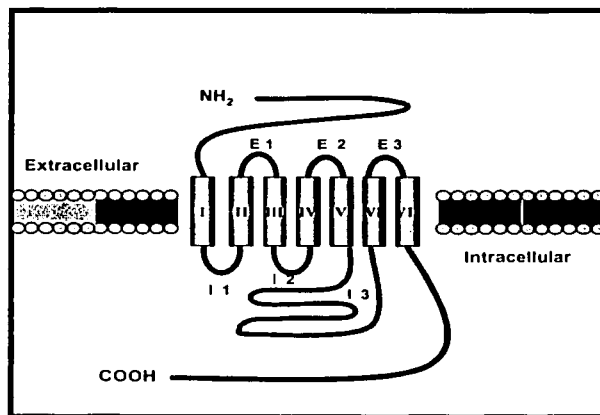


Figura 2. Receptor tipo P2Y (Modificada de Ralevic & Burnstock, 1998).

El mecanismo de acción de los receptores P2Y es el siguiente: cuando el receptor es activado por su ligando, éste se acopla a proteínas G heterotriméricas, lo cual provoca que la subunidad- α de la proteína G se disocie de las subunidades β y γ . La subunidad α actúa sobre un canal iónico o sobre otra proteína efectora, estimulando o inhibiendo su actividad. Una de las proteínas efectoras es la fosfolipasa C, que al ser estimulada promueve la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, generando inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). Ambas moléculas funcionan como segundos mensajeros: el IP₃ provoca la liberación de calcio del retículo endoplásmico, mientras que el DAG activa a la proteína cinasa C. Esta cinasa activa una cascada de reacciones de fosforilación que puede conducir a una modificación en la expresión

génica. Finalmente, la activación celular mediada por IP_3 y DAG tiene como posible consecuencia una modificación en la respuesta celular ante otras señales externas.

Los receptores P2Y acoplados a proteínas G también pueden actuar regulando la actividad de la adenilato ciclasa, y con ello las concentraciones de AMPc. El AMPc regula, a su vez, la actividad de la proteína cinasa A que conduce a una activación o inhibición de un gran número de proteínas que son reguladas por fosforilación. Estas reacciones de fosforilación desencadenan una cascada de señalización que modifica los niveles de transcripción de un grupo determinado de genes. Este mecanismo de señalización se ha visto en numerosos tejidos entre los que se encuentra el cerebro. Se han descrito hasta el momento 6 subtipos del receptor P2Y; algunas de las propiedades farmacológicas de estos receptores se muestran resumidos en la tabla I.

Subtipo	ADNc clonados a partir de	Agonistas	Antagonistas
P2Y ₁	Células epiteliales, endotelio, plaquetas, células de sistema inmune.	2meSADP>2meSATP >ADP>ATP	MRS 2279
P2Y ₂	Células del sistema inmune, epitelio, endotelio, tubulos renales.	UTP=ATP	Suramina
P2Y ₄	Endotelio.	UTP>ATP	RB2, PPADS
P2Y ₆	Epitelio, placenta, células T.	ADP>UTP>>ATP	RB2, PPADS, suramina.
P2Y ₁₁	Bazo, intestino, granulocitos.	Bz>ATP γ S>ATP	Suramina, RB2.
P2Y ₁₂	Plaquetas	ADP	Clopidogrel, ATP

Tabla I. Características generales de los subtipos de receptores P2Y (Ziganshiin *et al.*, 2002)

Por su parte, los receptores P2X son proteínas formadas por 384 a 595 amino ácidos. Presentan dos dominios transmembranales, el segundo dominio está involucrado en la formación del poro (Rassendren *et al.*, 1997; Migita *et al.*, 2001; Nakazawa *et al.*, 2002). El grupo amino y carboxilo terminales, se encuentran en la región citoplasmática (North 2002). Presentan un sitio de fosforilación en la treonina 18, reconocido por la proteína cinasa C. En el dominio

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

extracelular, se ha identificado una región conservada que se caracteriza por presentar 10 cisteínas (Clyne *et al.*, 2002; Ennion & Evans, 2002). A través de esta región la actividad de los receptores P2X puede ser modulada por metales como el Zinc y por protones. En general, la formación de puentes disulfuros entre las cisteínas conservadas son fundamentales para la formación tridimensional de las regiones asociadas con la unión al ATP (K68, 70, 309 y R 292) (Ennion *et al.*, 2000), a metales (H120-H213) y a protones (H314) (Clyne *et al.*, 2002a). En la región extracelular también existen de 2 a 6 sitios de glicosilación, los cuales pueden ser importantes para el transporte de la proteína a la membrana y para la formación del canal funcional (Rettinger *et al.*, 2000). Finalmente, la región cercana al carboxilo terminal, se ha involucrado con el control de desensibilización del canal (Koshimizu *et al.*, 1998; 1999; He *et al.*, 2002) (Fig.3).

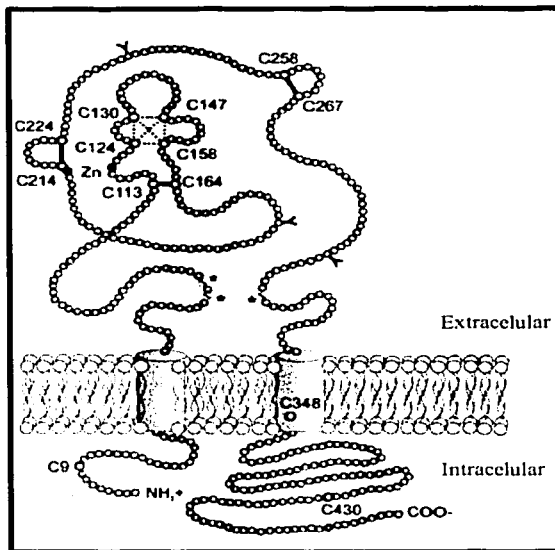


Figura 3. Receptor P2X. (Modificado de Clyne *et al.*, 2002). C indica las cisteínas conservadas en la proteína; Y muestran los posibles sitios de glicosilación; * marca la región donde se une el ligando.

Hasta el momento se han identificado siete subunidades, P2X₁ al P2X₇, estas proteínas muestran una identidad del 40 al 55%. La estructura cuaternaria de los receptores P2X al parecer

esta formada por tres o múltiplos de tres subunidades, sin embargo, aún no se tienen evidencias contundentes sobre el número de subunidades que conforman un canal funcional (Ralevic & Burnstock, 1998; Nicke *et al.*, 1998; North 2002). En la tabla II se presentan algunas de las características principales de los diferentes canales funcionales P2X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUBTIPO P2X	ADNe CLONADO A PARTIR DE	PRINCIPALES AGONISTAS	PRINCIPALES ANTAGONISTAS	MODULACIÓN POR IONES Y METALES	MODULACIÓN POR pH	DESENSIBILIZACIÓN	Permeabilidad a iones
P2X ₁	Vasos sanguíneos de rata (Humano, rata, ratón)	2-MeSATP, ATP, $\alpha\beta$ me-ATP, BzATP, $\beta\gamma$ MeATP (ATP EC50:3 μ M)	TNP-ATP, NF023, NF279, PPADS, Suramina		pH 6.3 reduce la corriente.	Rápida 60 ms	PCa ⁺⁺ /PNa ⁺ = 4
P2X ₂	Células PC12 (Humano, rata, y puerco de guinea)	ATP, BzATP, $\alpha\beta$ me-ATP (ATP EC50: 45 μ M)	NF023, TNP-ATP, PPADS, Suramina,	Aumento de la actividad: Zn (6.9 μ M) y Cu (16 μ M) Bloqueo de la actividad del canal: Ca (87mM), Mg, Ba, Mn.	pH 7.3 aumenta la actividad	Lenta 111 s (Fosforilación constitutiva en Thr-18)	PCa ⁺⁺ /PNa ⁺ = 2.5
P2X ₃	Ganglio de la raíz dorsal de rata (Humano, rata, puerco de guinea y pez cebra).	2-MeSATP, ATP, $\alpha\beta$ me-ATP (ATP EC50: 0.7-1.5 μ M)	TNP-ATP, PPADS,, NF023, Suramina	Aumento de la actividad: Zn Bloqueo de la actividad del canal: Ca (15mM).	pH 6.0 reduce la corriente.	Rápida < 100 ms	PCa ⁺⁺ /PNa ⁺ = 1.2
P2X ₄	Hipocampo de rata (Humano, rata, ratón, pollo y pez cebra).	ATP, 2-MeSATP (ATP EC50: 10 μ M)	TNP-ATP, Suramina, PPADS	Aumento de la actividad del canal: Zn (2 μ M). Reducción la amplitud de la corriente: Mg	pH 7 reduce la corriente.	Lenta 5-10 s	PCa ⁺⁺ /PNa ⁺ = 4.2
P2X ₅	Ganglio cefálico (coeliac) y corazón de rata (Humano, rata, ratón, pollo)	ATP, 2-MeSATP (ATP EC50: 3 μ M)	PPADS, Suramina	Reducción de la actividad del canal: Ca (7 mM)		Lenta 5 s	*** No selectivo

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

	pollo)						
P2X ₅ (no forma homómeros)	Ganglio cervical superior de rata (Humano, rata, ratón)						
P2X ₇	Macrófagos y cerebro de rata. (Humano, rata, ratón)	BzATP, 2-MeSATP, ATP, ADP, AMP (ATP EC50: 300-500µM)	o-ATP, NF279, PPADS, TNP-ATP, suramina	Reducción de la actividad del canal: Ca (3mM), Zn (10 µM) Mg (500µM), Cu (05µM) y Ni.	pH 6.1 reduce la corriente	No se desensibiliza	Ca ⁺⁺
P2X _{1,5}	Ovocitos, células HEK Y COS-7	ATP, 2-MeSATP, αβme-ATP, (ATP EC50:1µM)	TNP-ATP, PPADS, Suramina	Reducción de la corriente del canal: Ca ⁺⁺	pH 7.3 bloquea la corriente	10 s	PCa ⁺⁺ /PNa ⁺ = 1.1
P2X _{2,3}	Sistema nervioso	ATP, 2-MeSATP, αβme-ATP, ATPγ S, βγMeATP (ATP EC50:3µM)	TNP-ATP, PPADS, Suramina	Aumento de la actividad del canal: Zn Bloqueo de la corriente del canal: Ca (15mM).	pH 6.3 aumenta la corriente, pH 8.3 bloquea la corriente	>10 s	PCa ⁺⁺ /PNa ⁺ = 1.2-1.5
P2X _{2,6}	Células HEK293	ATP, 2-MeSATP, αβme-ATP, (ATP EC50: 30µM)	Suramina	Aumento de la actividad del canal: Zn (6 µM)	pH 7 aumenta la corriente, pH 6.5 bloquea la corriente.	Bifásica	Ca ⁺⁺
P2X _{4,6}	Células HEK293	ATP, 2-MeSATP, αβme-ATP, (ATP EC50: 6µM)	Suramina, PPADS	Aumento de la actividad del canal: Zn (10 µM).	pH básico bloquea la corriente	Moderada.	Ca ⁺⁺

Tabla II. Características generales de los receptores P2X. (Ralevic y Burnstock, 1998; North y Surprenant, 2000; Dunn et al, 2001 ; Khakh, *et al.*, 2001; North 2002). *** Thomas & Home, 1990; Ruppelt *et al.*,2001

Además de los subtipos de receptores P2X ya mencionados, se han identificado variantes generadas por el proceso de corte y empalme, conocido como "splicing alternativo". Hasta el momento han sido reportadas variantes para los subtipos P2X₁ (Hardy *et al.*, 2000; Ohkubo *et al.*, 2000), P2X₂ (Brändle *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1997; Koshimizu *et al.*, 1998a; Parker *et al.*, 1998), P2X₃ (Dhulipala *et al.*, 1998; Carpenter *et al.*, 1999; Townsend *et al.*, 1999), P2X₄ (Le *et al.*, 1997) y P2X₆ (Urano *et al.*, 1997). La mayoría de estas variantes han sido identificadas en el SN (Brändle *et al.*, 1997; Le *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1997; Koshimizu *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 1998; Townsend *et al.*, 1999), y algunas de ellas en células tumorales (Urano *et al.*, 1997; Hardy *et al.*, 2000). Estas proteínas tienen propiedades farmacológicas diferentes a las subunidades completas; sin embargo, aún no se ha caracterizado el papel fisiológico o patológico que podría tener la expresión de estas variantes en los diferentes sistemas celulares. Es importante mencionar que los receptores purinérgicos son un grupo muy heterogéneo y comúnmente la caracterización de un nuevo receptor (o de alguna variante) puede explicar las respuestas al ATP en un tejido en particular (Ralevic & Burnstock, 1998; Rathbone *et al.*, 1999).

III.C. RECEPTORES P2 EN LA FISIOLOGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO

Como ya se mencionó, una manera indirecta de conocer el papel que juega el ATP en los diferentes tipos celulares, es caracterizar el tipo de receptores P2 que expresa la célula, ya que a cada subtipo de receptor se le ha relacionado con algún papel fisiológico en particular. En la tabla III se presentan algunos ejemplos de las funciones que se les ha atribuido a los receptores P2 en diferentes sistemas celulares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUBTIPO	FUNCIÓN
P2Y ₁	Producción de óxido nítrico en el SN, Agregación de plaquetas. Vasodilatación.
P2Y ₂	Vasodilatación.
P2Y ₄	Proliferación de microglia
P2Y ₁₁	Diferenciación de células sanguíneas
P2Y ₁₂	Agregación de plaquetas
P2X ₁	Contracción muscular (músculo liso).
P2X ₂	Transmisión de información sensorial en el SN
P2X ₃	Transmisión de información asociada al dolor.
P2X ₄	Contractilidad del músculo cardiaco. Liberación de insulina.
P2X ₅	Desarrollo del músculo esquelético. Metamorfosis de anfibios
P2X ₇	Apoptosis y liberación de citocinas.

Tabla III. Funciones celulares asociadas a los receptores P2. (Morigiwa *et al*, 2000; Mutafova *et al*, 2000; Hu *et al*, 2001 ; Vial & Evans, 2001; Burvinic *et al*, 2002; Chizh & Illes, 2001; Ziganshin *et al*, 2002; Jagroop *et al*, 2003; Sak *et al*, 2003; Kittner *et al*, 2003.)

Actualmente ya se han identificado una cantidad importante de los receptores P2 que median la respuesta al ATP en el sistema nervioso. Mediante el uso de técnicas de biología molecular, electrofisiología e inmunolocalización, se sabe por ejemplo, que el papel del ATP como neurotransmisor en el sistema nervioso puede estar mediado por los receptores P2X₂, P2X₃ y P2X₄ (Burnstock 2000). Estos subtipos de receptores están involucrados en la transmisión de información sensorial. Particularmente el P2X₂ ha sido ampliamente asociado a la transmisión de información auditiva (Housley *et al.*, 1999), mientras que el subtipo P2X₃ esta asociado con la transmisión de tipo sensorial, de manera particular en la información asociada al dolor (Chizh & Illes, 2001; North 2002). El ATP también actúa como neuromodulador induciendo liberación de GABA y glutamato. En diferentes ensayos, se ha visto que este tipo de respuesta esta mediada por el receptor P2X₇ (Deuchars *et al*, 2001). La liberación de hormonas hipofisiarias está regulada por la presencia de ATP extracelular; los receptores involucrados en este fenómeno son P2X₂ y P2X₇ (North 2002). Finalmente, se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que, el efecto citotóxico del ATP en neuronas, al igual que en otros tipos celulares está mediado por el subtipo P2X₇ (Amadio *et al.*, 2002; Cavaliere *et al.*, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Algunos de los receptores purinérgicos que median el efecto del ATP tanto en astrocitos como en microglia ya han sido identificados. Como ya se mencionó, uno de los fenómenos que promueve el ATP en los astrocitos es la proliferación celular. Actualmente se sabe que el fenómeno de astrogliosis está mediado por los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂ (Franke *et al.*, 2001). Como parte de los mecanismos de reparación celular, el ATP inhibe la liberación de mediadores proinflamatorios en este tipo celular, a través de receptores del subtipo P2X₂. (Stella *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000). Finalmente, el ATP también puede inducir la liberación de glutamato en astrocitos, es importante resaltar que dicho efecto está mediado por los receptores tipo P2X₂ y P2X₃ (Jeremic *et al.*, 2001).

En relación al tipo de receptores que median la acción del ATP en la fisiopatología de la microglia, se encuentra el receptor P2Y₂, el cual media el proceso de activación y liberación de IL-1 β . Al igual que en las neuronas y otros tipos celulares, el papel citotóxico del ATP observado en la microglia durante una respuesta inflamatoria crónica, es dependiente de la expresión de receptores tipo P2X₇ (Morigiwa *et al.*, 2000; Inoue 2002; Le Feuvre *et al.*, 2002).

Es poco lo que se conoce acerca de la participación del ATP en la fisiopatología de las células mielinizantes y los tipos de receptores purinérgicos que expresan estas células. Como ya se mencionó, se ha demostrado *in vitro* que en células de Schwann el ATP induce la liberación de glutamato hasta en un 200% en comparación con el grupo control. Sin embargo, no se ha identificado el subtipo o subtipos de receptores involucrados en este fenómeno (Jiftinija & Jiftinija, 1998).

El papel del ATP en oligodendrocitos aún no se ha caracterizado. Hasta el momento, sólo se tienen evidencias *in vitro* e *in vivo*, de que el ATP induce un incremento en la concentración intracelular de calcio en oligodendrocitos maduros. Se desconoce aún si el incremento de calcio observado después de la estimulación con ATP tiene algún efecto en la fisiología de este tipo celular, o este nucleótido pudiera llegar a ser citotóxico en oligodendrocitos (Kirischuk *et al.*, 1995; James & Butt, 1999; 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como ya se ha comentado, una manera indirecta de caracterizar el papel que tiene el ATP en la fisiología celular, es identificar los receptores tipo P2 expresados. En este sentido, James y Butt (2002) caracterizaron farmacológicamente los receptores P2 expresados en el nervio óptico de rata. Este tejido es uno de los modelos que han sido utilizados para el estudio de las células neurogliales *in vivo*, ya que tiene características importantes que lo hacen ideal para ello. Este nervio es considerado como una estructura accesible, además de tener una composición sencilla, ya que sólo consta de los axones originados de las células ganglionares de la retina, además de las células neurogliales y algunos capilares. Los axones están mielinizados por lo que se considera a esta área como materia blanca. Las células neurogliales que están presentes en el nervio óptico son principalmente astrocitos y oligodendrocitos (Fig. 4) (Ransom & Orkand, 1996).

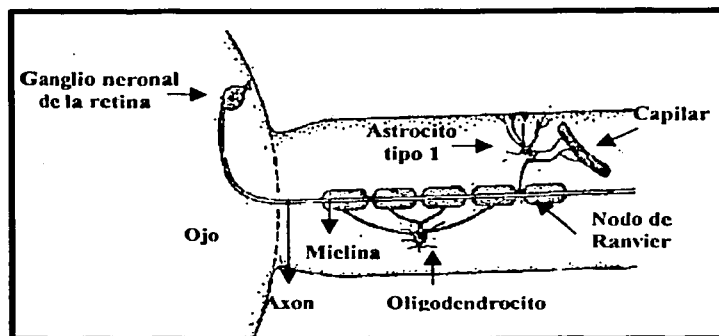


Figura 4. Nervio óptico (Modificado de Ransom & Orkand, 1996).

James y Butt (1999, 2001, 2002) han realizado diferentes estudios en nervio óptico, enfocados en caracterizar el efecto del ATP en la movilización de calcio intracelular. De acuerdo con los resultados farmacológicos, este grupo de trabajo ha propuesto que la movilización de calcio intracelular observada después de la estimulación con ATP, está mediada por los receptores P2X₇ y P2Y₂. Finalmente, es importante mencionar que hasta el momento no se ha realizado la caracterización a nivel molecular de los receptores P2 expresado en oligodendrocitos, ni se ha estudiado el papel fisiopatológico que pudieran tener estos receptores en la respuesta a la estimulación con ATP. El obtener esta información permitirá conocer más sobre la importancia de éste nucleótido en la comunicación neurona-neuroglia (Salter & Hicks, 1994; Kirischuk *et al.*, 1995; Fiels & Stevens, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN

El sistema nervioso está formado por dos importantes grupos celulares, las neuronas y la neuroglía; este último conformado por astrocitos, oligodrocitos, células de Schwann y microglía. Las interacciones neurona-neuroglía son fundamentales en un gran número de fenómenos fisiológicos en el sistema nervioso, dentro de los que se pueden mencionar el desarrollo del sistema nervioso, la transmisión sináptica y la plasticidad cerebral. Se ha caracterizado un gran número de moléculas de diferente naturaleza química que median dichas interacciones y que están involucradas directamente en fenómenos fisiológicos como los ya mencionados. Una de las moléculas que está involucrada en las interacciones neurona-neuroglía es el ATP. Este nucleótido es liberado en el sistema nervio central y periférico, y cumple el papel de neurotransmisor, neuromodulador, co-transmisor y factor trófico. Además, en condiciones de isquemia o de algún tipo de lesión celular, los niveles basales de ATP extracelular se elevan de manera importante. En estas condiciones, se ha propuesto que el ATP puede jugar un papel importante como inmunomodulador, promoviendo la respuesta inflamatoria y participando de manera activa en la reparación de la zona dañada. Es importante mencionar que, en el caso de que la respuesta inflamatoria sea de tipo crónico, como ocurre en algunas enfermedades neurodegenerativas, este nucleótido puede tener un papel citotóxico en el sistema y potenciar con ello la progresión de dichas enfermedades.

La respuesta celular a la estimulación con ATP depende del tipo celular que se esté estudiando y del tipo de receptores P2 implicados. Los receptores P2 son activados por ATP, y se dividen de acuerdo a su mecanismo de acción en P2Y (metabotrópicos) y P2X (ionotrópicos). Se han reportado seis subunidades para los receptores tipo P2Y y siete para los P2X, además de que se han identificado variantes generadas por "splicing" de algunos de los receptores. Cada uno de los subtipos de receptores presenta características farmacológicas y fisiológicas diferentes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El papel del ATP en la fisiología y patología de neuronas, astrocitos y microglia, ha sido estudiado ampliamente; también se conoce el tipo de algunos de los receptores P2 que median dichos efectos. A pesar de la importancia que tienen los oligodendrocitos en el funcionamiento del sistema nervioso, aún se desconoce el tipo de respuesta que pudieran tener estas células ante estímulos tanto fisiológicos como patológicos que involucran liberación de ATP. Una manera de comenzar a conocer la función del ATP en los oligodendrocitos es el describir qué tipos y subtipos de receptores P2 se expresan en estas células.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como finalidad aportar información acerca de los tipos de receptores tipo P2 expresados en oligodendrocitos *in situ*. Como un primer acercamiento a la caracterización del papel del ATP en la fisiología de este tipo celular, en este estudio nos enfocaremos a los receptores tipo P2X.

HIPÓTESIS

Los oligodendrocitos que conforman el nervio óptico expresan receptores tipo P2X.

OBJETIVO

* Caracterizar molecularmente los receptores purinérgicos tipo P2X en el nervio óptico de rata e identificar el tipo de células neurogliales en donde son expresados.

Objetivos particulares.

- 1.- Caracterizar la expresión de ARNm de receptores P2X en nervio óptico mediante las técnicas de RT-PCR.
- 2.- Determinar la distribución de los receptores purinérgicos identificados, utilizando ensayos de inmunohistoquímica en nervio óptico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y MÉTODOS

I. DISECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO

El nervio óptico fue extraído de ratas Sprague Dawley de 11-13 días de edad. Para la obtención del tejido, las ratas fueron decapitadas, y con la ayuda de material quirúrgico, se le retiró la piel de la cabeza, así como la parte dorsal del cráneo. Una vez que se tenía expuesto el cerebro, se realizó un corte con bisturí en la parte posterior de ambos globos oculares para liberar parcialmente el nervio óptico. Posteriormente, se levantó el cerebro y se realizó un segundo corte antes del quiasma óptico para liberar por completo el tejido de interés. El nervio óptico se mantuvo a 37°C en medio L15 adicionado con BSA (10 µg/ml), gentamicina (100 µg/ml) y L-glutamina (2 µM), hasta que se inició la extracción del ARN total. Todas las disecciones se realizaron en menos de 5 minutos.

II. EXTRACCIÓN DE ARN

El análisis del ARNm nos permite determinar el grado de expresión de un gen de interés. Es por ello que una de las metodologías ampliamente utilizadas en el estudio de un gen específico es la caracterización de su ARNm correspondiente. Para realizar la extracción de ARN se requieren las siguientes condiciones: lisis total de las células, desnaturalización de los complejos formados por los ácidos nucleicos y las proteínas, inactivación de las ARNsas endógenas y eliminación de cualquier ADN contaminante.

Protocolo

El ARN total de nervio óptico de ratas Sprague Dawley de 11-13 días de edad se extrajo utilizando el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Por cada 100 mg de tejido se adicionó 1 ml de solución "D" (Tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM, Sarcosyl 5% y β-mercaptoetanol 0.1 M), y se homogenizó el tejido. Posteriormente se le adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio (2 M, pH 4), un volumen de fenol saturado en agua y 0.2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1); esta mezcla se homogenizó enérgicamente por 10 seg, y se mantuvo en hielo por 15 min. Después la mezcla se centrifugó por 20 min a 10,000 rpm a 4°C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El sobrenadante se transfirió a otro tubo, posteriormente se le agregó un volumen de isopropanol, incubando la muestra a -20°C por al menos una hora. La muestra se centrifugó 20 min a 10,000 rpm a 4°C , la pastilla fue resuspendida en 0.8 ml de solución "D" más un volumen de isopropanol, e incubada por una hora a -20°C . Nuevamente la muestra fue centrifugada por 30 min a 10,000 rpm a 4°C . Posteriormente la pastilla se resuspendió en etanol al 75% y se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm a 4°C . Finalmente, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió el ARN en agua libre de ARNasas para su posterior cuantificación y análisis en gel de agarosa.

III. TRANSCRIPCIÓN INVERSA

El estudio sobre la expresión de un gen en particular puede apoyarse en el análisis de su ARNm correspondiente. Para ello, uno de los métodos más utilizados es la retrotranscripción *in vitro*, en donde una vez que se obtiene el ARN, éste es empleado como molde por la enzima transcriptasa inversa, usando oligo dT y hexanucleótidos al azar como iniciadores, y de esta manera sintetizar el ADN complementario o ADNc.

Protocolo

Una vez que se extrajo el ARN, se le dió un tratamiento con ADNasa utilizando las siguientes condiciones: a $1\mu\text{g}$ de ARN se le adicionó $1\mu\text{l}$ de ADNasa ($1\text{ U}/\mu\text{l}$) y $1\mu\text{l}$ de solución amortiguadora (10X), llevando la reacción a un volumen final de $20\mu\text{l}$ con agua. Esta mezcla se incubó por 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se le adicionó $1\mu\text{l}$ de EDTA (25 mM), incubando la reacción por 10 min a 65°C , y posteriormente se transfirió la mezcla a hielo. Una vez que concluyó el tratamiento con ADNasa, se inició la reacción de transcripción inversa utilizando el siguiente protocolo: A la mezcla anterior se le adicionó $1\mu\text{l}$ de Oligo-dT ($0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y $0.5\mu\text{l}$ de hexanucleótidos al azar (10X), incubando la muestra 5 min a 65°C , y pasandola posteriormente a hielo. Después se adicionó $0.5\mu\text{l}$ de inhibidor de ARNasa, $10\mu\text{l}$ de amortiguador (5X-RT), $5\mu\text{l}$ de DTT(100 mM), $5\mu\text{l}$ de dNTPs (2.5mM) y $1\mu\text{l}$ de la enzima Super Script II (transcriptasa inversa $50\text{ U}/\mu\text{l}$). Se dejó incubar por 1 hora a 42°C ,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

posteriormente se incubó 5 min a 65°C, y finalmente almacenó la muestra a -20°C. Es importante mencionar que antes de adicionar la enzima Super Script II, se tomó una alícuota de la mezcla para utilizarla como control negativo en la PCR.

IV. AMPLIFICACIÓN POR PCR

Una de las metodologías más utilizadas para amplificar un fragmento de ADN específico, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En esta reacción se puede amplificar específicamente una región del ADN, hasta llegar a tener un gran número de copias en poco tiempo, aún y cuando el ADN original se presente en cantidades muy pequeñas. Esta reacción es catalizada por una ADN polimerasa que sintetiza una hebra de ADN en dirección 5' a 3', usando como molde una de las hebras de ADN. Con esta reacción sólo se amplifica el fragmento de interés, ya que los iniciadores específicos se complementan con las regiones de ADN que limitan dicho fragmento. El proceso se realiza mezclando el ADN (o ADNc) con: dNTPs, iniciadores y ADN-polimerasa. Inicialmente se desnaturaliza el ADN a 94-95°C, que separa las dos hebras o bien el híbrido ADN-ARN producto de la transcripción inversa; después se baja la temperatura (variable) para que los iniciadores se unen a la secuencia ADN correspondiente, y finalmente se sube la temperatura a 72°C que es la temperatura óptima para la enzima Taq polimerasa. Así el proceso se repite 30-40 ciclos, llegando a obtener 2ⁿ moléculas de doble hebra (siendo n igual al número de ciclos) a partir de cada molécula molde.

Protocolo

A partir del ADNc sintetizado, se realizó la amplificación por PCR de fragmentos que codifican para receptores P2X, utilizando dos juegos de iniciadores degenerados e iniciadores específicos para cada uno de los subtipos de receptores P2X. La mezcla de PCR contenía: 1.5 µl de ADNc (20 ng), 2 µl dNTPs (2.5 mM), 0.5 µl de MgCl₂ (50 mM), 2 µl de iniciadores (2.5 µM) y 0.3 µl de Taq polimerasa, todo en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación en general fueron 92°C por 2 min, 92°C durante 45 seg, temperatura de alineación por 45 seg y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

72°C por 45 seg. La temperatura de alineación fue determinada en función de cada oligonucleótido como se muestra en la siguiente lista.

* Oligonucleótidos degenerados para los subtipos de receptores P2X

PX3' GGRATGATGTGRAACTTSCCAGC

PX5' AACTTCACCMTBTTSRMAARAAC

Se amplificó utilizando el método de "touch down" en un ciclo, en cada una de las siguientes temperaturas 61 a 51°C y 30 ciclos a 51°C.

DEGPX3' ARTRHKTGGCDRWCCTGAARTTGTASC

DEGPX5' ACCTGTGAGATSTBKRSYTGTTGCC

Se amplificó utilizando un ciclo en cada una de las siguientes temperaturas 65°C a 56°C variando un grado por ciclo y finalmente 25 ciclos a 55°C

* Oligonucleótidos específicos para los subtipos de receptores P2X

P2X13' CCAGATCACACTTCCAGTCA

P2X15' TGTAGAGGTGGATGACAAGA

Se utilizaron 35 ciclos a 53°C

P2X23' TCACAGGCCATCTACTTGAG

P2X25' GAATCAGAGTGCAACCCCAA

Se utilizaron 35 ciclos a 53°C

P2X33' AGGCCTTGTCTAGATCGCACA

P2X35' GCGCTATGCCAACAGAGTCAT

Se utilizaron 35 ciclos a 63°C

P2X53' GGACAGTAGAGATTTGTGGAGC

P2X55' GACATTGACACTTCCCTGCAGA

Se utilizaron 35 ciclos a 63°C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

P2X63' TGCCTGCCCAGTGACAAGAATGTCAA

P2X65' AAAGACTGGTCAGTGTGTGGCGTTC

Se utilizaron 35 ciclos a 53°C

P2X73' CATTGGTGTACTTGTCTGTC

P2X75' AGGAGCCCCTTATCAGCTCT

Se utilizaron 35 ciclos a 63°C

Como control de la calidad del ADN, se amplificó por PCR un fragmento del ARNm que codifica para la proteína GAPDH.

V. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

De las diferentes técnicas empleadas para separar fragmentos de ácidos nucleicos, la electroforesis en gel de agarosa es una de las más utilizadas. Esta técnica permite separar ácidos nucleicos de acuerdo a su tamaño. En ella, las muestras se ven sometidas a la acción de un campo eléctrico de intensidad y dirección constantes. Los ácidos nucleicos poseen carga negativa en un pH neutro, por lo que migran hacia el ánodo con una velocidad que depende del peso molecular de la muestra, la concentración de agarosa, la conformación del ADN, el voltaje aplicado, la presencia de agentes intercalantes y la composición del amortiguador de electroforesis.

Protocolo

Para el análisis electroforético del ARN se utilizaron geles de agarosa 1.4% en MOPS 1X (La solución MOPS 10X contiene: MOPS 0.2 M, acetato de sodio 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7) y formaldehído (5.55 %). La muestra de ARN (1 µg) se mezcló con amortiguador de carga (glicerol 50%, azul de bromofenol 0.4 % y bromuro de etidio 1 µg/µl). Antes de colocar la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

muestra en el gel, ésta se calentó 5 min a 65°C y después se colocó en hielo 5min. Como buffer de corrida se utilizó MOPS 1X.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X (un litro de solución TBE 0.5X contiene: 5.4 g de Tris base, 2.75g de ácido bórico y 2 ml EDTA 0.5 M a pH 8).

VI. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Para esta estrategia se utilizó el Kit de QIAGEN "QIAquick PCR Purification" (No. 28104). La metodología utilizada fue la siguiente: Se cortó el fragmento de gel que contenía el fragmento de ADN de nuestro interés y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se adicionaron 3 volúmenes de amortiguador QG por volumen del gel (100 mg = 100 µl), y la muestra se incubó 10 min a 65°C. Una vez que la agarosa se disolvió por completo, se le adicionó un volumen de isopropanol, se colocó en un columna y se centrifugó 1 min a 14000 rpm. Se agregó a la columna 500 µl de amortiguador QG y se centrifugó 1 min a 14000 rpm. Posteriormente se adicionó 0.75 ml de amortiguador PE y se mantuvo a temperatura ambiente por 5 min, y después se centrifugó 2 veces por 1 min a 14000 rpm. Para eluir el fragmento de ADN se adicionó a la columna 30 µl de H₂O (37°C) y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm.

VII. CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

La clonación de ADN es una técnica fundamental para producir grandes cantidades de un fragmento de ADN específico. El fragmento que debe clonarse primero se une a un vector, que es un vehículo para transportar ADN exógeno y después se introduce a una célula huésped adecuada, como lo es la bacteria *Escherichia coli*. Los plásmidos bacterianos son uno de los vectores más utilizados para esta estrategia molecular. Estos son moléculas de ADN de doble cadena, circulares, con un tamaño que va de 1 Kb hasta más de 200 Kb. Se encuentran en diferentes especies bacterianas, y se caracterizan por tener una replicación independiente al cromosoma bacteriano, y por conferirle a la bacteria propiedades especiales, como la resistencia a

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

los antibióticos. El plásmido puede ser introducido a la bacteria por un proceso llamado transformación, en donde una vez que las bacterias son tratadas con cationes divalentes para permeabilizar su membrana, se le pone en contacto con el ADN plasmídico para su incorporación al citoplasma de la bacteria.

Protocolo:

Los fragmentos de ADN purificados se clonaron en el plásmido pGEM-T (Promega, No. de catalogo A3600), mediante una inserción no direccional. La reacción de ligación se realizó de la siguiente manera:

Reactivo	Volumen de reacción
Amortiguador de la enzima 10X	1 μ l
pGEM-T vector (50 ng)	1 μ l
Producto de PCR (150 ng)	3 μ l
T4 DNA ligasa 3U/ μ l	1 μ l
H ₂ O	4 μ l
Volumen final	10 μ l

La reacción se incubó a 4°C toda la noche, y posteriormente se utilizaron 4 μ l de ésta para la transformación. Se transformaron bacterias DH5 α competentes, utilizando la siguiente metodología: A 50 μ l de bacterias competentes se les adicionaron 4 μ l de la construcción previamente descrita, y se incubaron en hielo durante 20 min. Posteriormente se sometieron a un choque térmico (42°C por 40-50 seg) y se transfirieron a hielo durante 2 min. Posteriormente se les adicionaron 950 μ l de medio LB y se incubaron una hora y media a 37°C en agitación. Finalmente se sembraron 400 μ l de las bacterias transformadas en placas de Petri con LBagar adicionadas con Ampicilina (50 mg/ml), IPTG (31 μ g/ml) y X-Gal (40 μ g/ml), en donde se incubaron a 37°C toda la noche. La selección de las clonas se realizó con base en el ensayo de la α -complementación (Sambrook, *et al*, 1989). Se consideró como clonas positivas aquellas que fueron resistentes a ampicilina y presentaron una coloración blanca. Al día siguiente se eligieron

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

una de las colonias positivas y se cultivaron en 20 ml del medio LB ampicilina (80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en agitación a 37°C toda la noche.

VIII. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO

Una vez que se obtuvo el cultivo bacteriano (50 ml), se realizó la recuperación del plásmido mediante la cosecha de las bacterias por centrifugación, su posterior lisis y la purificación del plásmido. En este trabajo se realizó la purificación del plásmido utilizando el método de lisis alcalina. Se recuperaron las bacterias mediante una centrifugación por 5 min a 5000 rpm; posteriormente la pastilla se resuspendió en 4 ml de solución I (conteniendo: Tris 25mM pH8, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y lisozima 5 mg/ml). Se incubó la reacción 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 8 ml de solución II (conteniendo: SDS 1%, NaOH 0.2N), se mezcló suavemente y se incubó 5 min en hielo. Después de la incubación se le adicionó 6 ml de solución III (solución que contiene: acetato de potasio 5 M pH 8, 11.5 ml de ácido acético y 28.5 ml de H_2O), se homogenizó vigorosamente, se incubó 5 min en hielo y se centrifugó 15 min a 9000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de gasa y se mezcló con 0.6 volúmenes de isopropanol y se mantuvo 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 15 min a 9000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó en etanol al 70%. La pastilla se resuspendió en 2 ml de TE (1X) y se trató con ARNasa (19 mg/ml) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionó un volumen de 13% de polietilenglicol (en NaCl 1.6 M), se mezcló y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó 10 min a 13000 rpm. La pastilla se resuspendió en 1 ml de etanol al 75% y se repitió la centrifugación. Finalmente se resuspendió la pastilla en 80 μl de agua y se almacenó la muestra a 4°C.

IX. SECUENCIACIÓN

Los fragmentos clonados fueron secuenciados por el método de Sanger (Sanger, *et al.*, 1977) y los productos de la reacción fueron analizados con el secuenciador automático marca 310 ABI Prism Genetic Analyser (Perkin Elmer). Con el fin de determinar la naturaleza molecular de las secuencias codificadas por los fragmentos de ADN clonados, las secuencias obtenidas fueron comparadas con las existentes en el banco de datos Genbank empleando el algoritmo Blast (Altschul *et al.*, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. HIBRIDACIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La hibridación de ácidos nucleicos es un término que se utiliza para describir varias técnicas relacionadas, que se basan en la observación de que dos moléculas de ácidos nucleicos de cadena simple con secuencia de bases complementarias pueden formar un híbrido. Este híbrido se puede formar por cadenas de ADN con ADN (Southern blot) y de ADN con ARN (Northern blot).

Análisis de Southern blot.

Se tomaron 10 μ l de la mezcla de reacción del RT-PCR y se fraccionaron en geles de agarosa al 1.2%. Las muestras se transfirieron a membranas de Nylon (Hybond, Amersham). La transferencia se realizó de la siguiente manera: el gel se colocó en una solución de desnaturalización (NaOH 0.5 N y NaCl 1.5 M) donde se mantuvo por 10 min, posteriormente se cambió a la solución de transferencia (Tris base 1 M y NaCl 1.5 M, pH8), donde se mantuvo por 10 min. Una vez transcurrida la incubación, se montó en un recipiente con SSC 10X el sistema de transferencia. Dicho sistema estuvo formado de la siguiente manera, se colocó el gel sobre un soporte de plástico cubierto por papel filtro, posteriormente se colocó una membrana de nylon sobre el gel, y sobre ella 2 capas de papel filtro y varias capas de papel absorbente. La transferencia se realizó durante toda la noche.

Las membranas se hibridaron con las diferentes sondas. Las sondas se marcaron con (α - 32 P) d-ATP (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando el kit Random Primers DNA Labeling (Boehringer Mannheim). La membrana se bloqueó durante 1 hora con solución de prehibridación (Denhardt 5X, SSC 6X, SDS 0.5% y 100 μ g/ml de esperma de salmón) a 65°C, posteriormente se adicionó la sonda previamente marcada, purificada y desnaturalizada, y se hibridó toda la noche a 65°C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XI. HISTOQUÍMICA

La tinción de Nissl es una de las técnicas histológicas más utilizadas para realizar estudios morfológicos en tejido nervioso. El reactivo de Nissl (violeta de cresilo), se caracteriza por ser un compuesto cationico, por lo que se une a moléculas con carga negativa, como lo son los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Por lo anterior, esta tinción permite evidenciar la región del núcleo y el citoplasma de neuronas y células gliales, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Protocolo.

Ratas Sprague-Dawley fueron anestesiadas con hidrato de cloral (650 mg/Kg de peso) y se perfundieron transcárdicamente con 0.1 M de buffer fosfato (PB: 75 mM de Na_2HPO_4 y 25 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4) seguido de paraformaldehído al 4% en PB pH 7.4. El nervio óptico fue extraído y post fijado durante 3 hr a 4°C en la solución previamente descrita. Posteriormente se transfirió el tejido a sacarosa 30% para su crioprotección. Se realizaron cortes longitudinales de 16 μm en criostato (Leica CM1850). Cada corte fue recuperado en un portaobjetos gelatinizado y congelados a -20°C . Para teñir los cuerpos celulares presentes en el nervio óptico, se sumergieron los cortes durante 5 min, en un recipiente que contenía el reactivo de Nissl (1 % de Violeta de cresilo en Agua a pH 3.5-3.8). Posteriormente se paso el tejido a diferentes concentraciones de alcohol y Xilol, con la finalidad de deshidratar la muestra (Alcohol: 50% - 2 min; 75% - 2 min; 96% - 5 min; 100% - 2 min. Xilol: 100% - 10min; Xilol 100% - 10 min). Después de deshidratar el tejido, se le adiciona una gota de permount y finalmente se cubrió el tejido con un cubreobjetos. Las muestras se analizaron en un microscopio óptico (Olympus).

XII. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los estudios de inmunohistoquímica permiten identificar, caracterizar y cuantificar *in situ* moléculas de interés. Gracias a que las interacciones antígeno-anticuerpo son muy específicas se puede identificar la expresión de alguna proteína (antígeno) en un tejido determinado. Para que un anticuerpo pueda ser detectado en el tejido, éste tiene que estar acoplado ya sea a enzimas, a moléculas fluorescentes o a compuestos electrodenso.



Protocolo de inmunohistoquímica

Para los ensayos de inmunohistoquímica, se realizaron las estrategias de fijación y corte de nervio óptico antes mencionadas. Se realizaron lavados con PBS 1X (1.8mM de Na₂HPO₄, 0.6mM de NaH₂PO₄ y 142mM de NaCl, a pH 7.4) y posteriormente se bloqueó el tejido con suero normal de cabra al 4% en PBS 1X durante 1hr. Después de la incubación, diferentes muestras se incubaron toda la noche a 4°C con los diferentes anticuerpos contra las subunidades de los receptores P2X₁ al P2X₇, utilizando una concentración de 2µg/ml para todos los anticuerpos (Anti-P2X_{1,2,4,7} marca Alomone Labs; Anti-P2X_{5,6} Santa Cruz Biotechnology, Inc.; y Anti-P2X₃, Chemicon internacional). Para la detección del anticuerpo primario se incubó el tejido (1hr a temperatura ambiente) con un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína. Después de esa incubación se realizaron lavados con PBS 1X. Dos muestras previamente marcadas con P2X₁, se incubaron de manera independiente 1 hr a 37°C con los anticuerpos monoclonales Anti-AB7 (2 µg/ml) (marcador de oligodendrocitos) o anti-GFAP (1µg/ml) (marcador de astrocitos), realizando el mismo procedimiento para el resto de las subunidades. El segundo anticuerpo primario fue detectado utilizando un anticuerpo secundario acoplado a rodamina. El análisis de las preparaciones se realizó en un microscopio de fluorescencia (Olympus). El control experimental consistió en un tejido que no fue tratado con ningún anticuerpo primario.

Para complementar los resultados se realizó un ensayo de inmunohistoquímica para los receptores P2X_{1,7} utilizando como método de revelado un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

I. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

A partir de los nervios ópticos provenientes de 20 ratas Sprague Dawley, de 11 a 13 días de nacidas, se extrajo ARN total utilizando el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Con el fin de conocer la cantidad de ARN, se determinó la absorbancia de la muestra (dilución 1:75) a las longitudes de onda de 260 y 280 nm: los valores obtenidos fueron de 0.095 y 0.077 respectivamente, lo que permite estimar una concentración de 0.28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Además, la relación 260/280 fue de 1.7, lo que muestra una extracción eficaz. Con el fin de determinar la calidad del ARN recuperado, se realizó una electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa-formaldehído. En la figura 5 se muestra la imagen del gel donde se pueden observar 3 bandas correspondientes al ARN ribosomal 28, 18 y 5S respectivamente. La proporción 28 y 18S es de 2:1 y no existe evidencia de degradación lo que muestra la buena calidad del ARN recuperado.

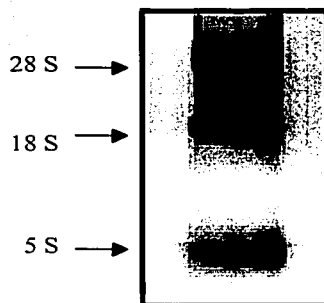


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído 1 μg de ARN total de nervio óptico de rata fue analizado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. TRANSCRIPCIÓN INVERSA

La síntesis de ADNc se realizó conforme al protocolo descrito, empleando 1 µg de ARN total. Para verificar la síntesis del ADNc, se realizó una PCR utilizando iniciadores específicos para amplificar un fragmento de ADN que codifica para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Es importante mencionar que en todas las reacciones de PCR se utilizaron dos controles, uno que contiene como cadena molde alcuotas de la mezcla de la RT que no contienen la enzima SuperScript II (control -RT), y otro en el que el ADNc es sustituido por agua (control agua). Ambos controles nos permitieron verificar que no existía contaminación de ADN en la reacción, y por lo tanto, que todos los productos de la amplificación se sintetizaron a partir de ADNc. En la figura 6 se muestra la electroforesis del producto amplificado empleando los oligonucleótidos para GAPDH. Como se puede observar en el carril 2, existe un producto de aproximadamente 450 pb que corresponde al tamaño esperado, fue amplificado. Ningún producto de amplificación es observado en el caso de los carriles 1 y 3, que corresponden a los controles. Este resultado muestra que el ADNc fue sintetizado adecuadamente y que puede servir como molde para los posteriores ensayos de PCR.

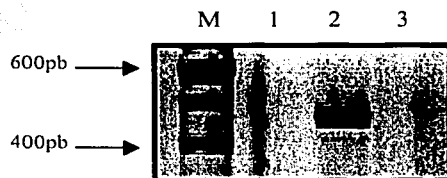


Figura 6. Amplificación de la secuencia de GAPDH a partir del ADNc de nervio óptico de rata. Carril: 1) control agua, 2) ADNc, 3) control -RT y M) Marcador de peso molecular 100 pb (GIBCO).

III. AMPLIFICACIONES DE RECEPTORES P2X CON INICIADORES DEGENERADOS

Una vez que se verificó la eficacia de la extracción de ARN y de la síntesis de ADNc, se realizaron ensayos de PCR para identificar los diferentes subtipos de receptores P2X expresados en este tejido. Para ello se emplearon dos pares de iniciadores degenerados con la finalidad de identificar secuencias que codifican para este tipo de receptores que podrían coincidir con algunas de las secuencias previamente publicadas, o bien, identificar una nueva.

Se realizó un ensayo de PCR con los iniciadores degenerados denominados P2X5'-P2X3' y 1 μ l de ADNc, como se describe en materiales y métodos. Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa y el resultado se muestra en la figura 7.

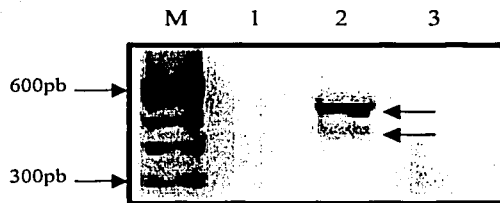


Figura 7. Amplificación de secuencias que codifican para receptores P2X utilizando los iniciadores P2X5'-P2X3'. Carril: 1) control agua; 2) ADNc; 3) control -RT y M) marcador de peso molecular 100 pb (GIBCO).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como puede observarse en el carril 2 de la figura 7, fueron obtenidos dos fragmentos de amplificación de 550 pb y 450 pb. Sólo el fragmento mayor coincide con el tamaño esperado, sin embargo, se decidió analizar ambos. Para ello, los fragmentos fueron extraídos del gel y clonados en el vector pGEMT (Promega) y las construcciones obtenidas fueron empleadas para transformar bacterias. Para seleccionar las bacterias portadoras de los plásmidos recombinantes, se empleó el método de la α -complementación, y ensayos de PCR empleando los oligonucleótidos M13F y M13R. Estos iniciadores se complementan con secuencias que flanquean el sitio de clonación del vector pGEMT. A partir del fragmento de 550 pb se obtuvieron 65 colonias blancas, de las cuales se verificaron como portadoras del plásmido recombinante a 24 colonias por el ensayo de PCR. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa y el resultado se muestra en la figura 8. Como se puede observar, de las 24 colonias analizadas, sólo 5 no son portadoras del plásmido recombinante (carriles 2, 4, 21, 23 y 24) mientras que las 19 restantes lo son.

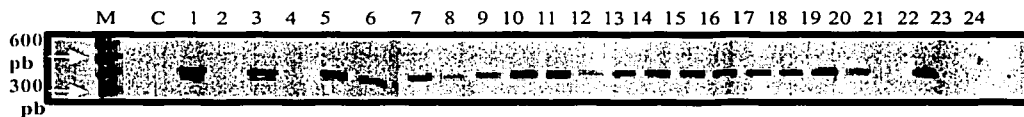


Figura 8. Amplificación de plásmidos recombinantes utilizando los iniciadores M13R-M13F (Carriles 1-24). Carril M) marcador de peso molecular 100 pb. C) control agua.

De las 19 colonias 14 fueron cultivadas para purificar el plásmido y secuenciar el fragmento clonado. Al realizar la comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank se encontró que 13 eran 100% idénticas a la secuencia de ADNc de receptor P2X₁, y 1 al del receptor P2X₄, ambas publicadas previamente (Valera *et al.*, 1994; Buell *et al.*, 1996).

El fragmento de 450 pb fue analizado siguiendo la misma estrategia que para el de 550 pb. A partir de éste, se obtuvieron 25 clonas blancas de las cuales 15 fueron verificadas por el ensayo de PCR y sólo 5 de ellas cultivadas para extraer el plásmido y secuenciar el fragmento clonado. La comparación de las secuencias obtenidas con el banco de datos mostró que todas ellas eran 100% idénticas al ADNc del receptor P2X_{1a}, una variante generada por "splicing" alternativo del

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

receptor P2X₁ (Ohkubo *et al.*, 2000).

Posteriormente se realizó un ensayo de PCR con los iniciadores degenerados denominados DEGPX5'-DEGPX3'. Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, y el resultado se muestra en la figura 9. Como se puede observar, se obtuvo un fragmento de amplificación de 450 pb que coincide con el fragmento esperado (carril 2). Al realizar la clonación de este fragmento se obtuvieron 36 clonas blancas, de las cuales 20 fueron analizadas empleando el ensayo de PCR y de esas, 10 fueron cultivadas para secuenciar el fragmento clonado. Al comparar las secuencias obtenidas con el banco de datos, se encontró que todas las secuencias tienen un 100% de identidad con el ADNc del receptor P2X₆ de rata.

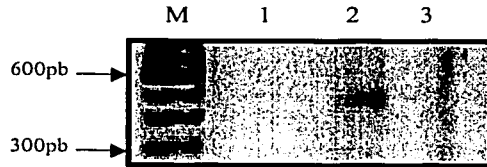


Figura 9. PCR con los iniciadores DEGPX5'-DEGPX3'.

Carril: 1) control agua, 2) ADNc, 3) control
-RT y M) marcador de peso molecular 100 pb (GIBCO).

IV. AMPLIFICACIÓN DE RECEPTORES P2X CON INICIADORES ESPECÍFICOS

Dado que las secuencias obtenidas con los dos pares de iniciadores degenerados correspondían únicamente a los subtipos P2X₁, P2X₄ y P2X₆, nos interesó confirmar si en el nervio óptico no se expresaban los subtipos P2X₂, P2X₃, P2X₅ y P2X₇. Para ello se realizaron ensayos de PCR con iniciadores específicos para estos subtipos de receptores. En la figura 10 se muestra la electroforesis de los productos de amplificación de cada una de las reacciones.

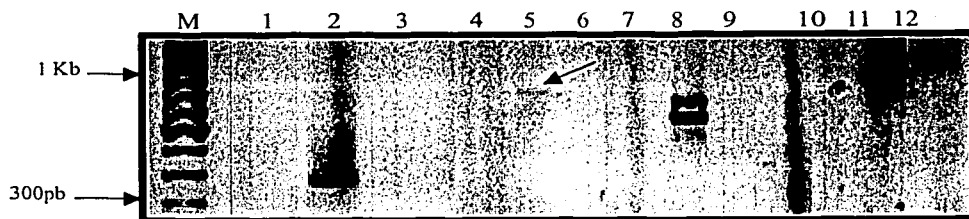


Figura 10. PCR con los iniciadores específicos para los subtipos P2X₂, P2X₃, P2X₅ y P2X₇. Carriles 1) 4) 7) y 10) control agua, 2) 5) 8) y 11) ADNc; y 3) 6) 9) y 12) control -RT. M) marcador de peso molecular 100 pb.

Como se muestra en los carriles 2, 5, 8 y 11, fueron obtenidos productos de amplificación de 380, 800, 500 y 900 pb. Todos ellos concuerdan con el tamaño esperado para cada tipo de receptor. Además, en el caso de la amplificación con iniciadores específicos para el subtipo P2X₅, pudieron ser distinguidas dos bandas suplementarias de 600 y 500 pb. Cada una de las bandas fue extraída del gel, clonada en el vector pGEMT y secuenciada. El análisis de las secuencias confirma que los productos amplificados corresponden a la de los receptores P2X₂, P2X₃, P2X₅ y P2X₇.

V. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES P2X₁ Y P2X₃

Al analizar los productos de amplificación utilizando diferentes juegos de iniciadores, encontramos que para P2X₁ y P2X₃ fueron obtenidos más de un producto (figuras 7 y 10). Estos productos sugieren la expresión de posibles variantes generadas por "splicing" de estos subtipos de receptores en el nervio óptico, como ha sido descrito en otros tejidos del sistema nervioso (Brändle *et al.*, 1997; Le *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1997; Koshimizu *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 1998; Townsend *et al.*, 1999). Para confirmar esta idea, se decidió en el caso particular de P2X₁, diseñar un par de iniciadores que permitieran amplificar secuencias que codifiquen para dicho receptor y su variante P2X_{1a}. En la figura 11 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación empleando estos iniciadores. En el carril 2 se observan tres productos de amplificación, el primero de 300 pb, el segundo de 200 pb y el tercero de 150 pb.

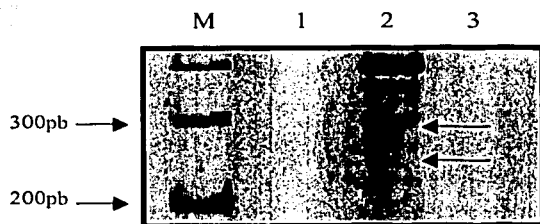


Figura 11. Amplificación del receptor P2X₁ utilizando iniciadores específicos.
Carril: 1) control agua, 2) ADNc, 3) control -RT y
M) marcador de peso molecular 100 pb (GIBCO).

1998 CC
FALLA DE ORIGEN

Para verificar que los tres fragmentos correspondían a secuencias que codifican para el receptor P2X₁, se realizó un southern blot, utilizando una sonda específica para P2X₁. En la figura 12 se muestra la imagen de la autoradiografía y se puede apreciar en el carril 2 que hibridaron con la sonda las tres bandas identificadas previamente por coloración con bromuro de etidio.



Figura 12. Southern blot P2X₁.
Carril: 1) control agua, 2) ANDc y 3) control -RT.

Las tres bandas se clonaron en el vector pGEMT y se secuenciaron. Al analizar las secuencias se encontró que la banda de 300 pb es 100% idéntica a un fragmento de ADNc P2X₁. La banda de 200 pb es en realidad una mezcla de dos secuencias diferentes. Una corresponde a la variante generada por splicing P2X_{1a} (Ohkubo *et al.*, 2000), y la otra secuencia es una nueva variante que denominamos P2X_{1b}. Esta nueva variante es similar a la variante P2X_{1a}, pero difiere en el sitio de splicing por 16 bases. La banda de 150 pb solo presenta identidad con los iniciadores que se utilizaron para la amplificación, pero el resto de la secuencia no presenta identidad con ningún subtipo P2X, por lo que se consideró que éste es un producto inespecífico de la amplificación y se decidió no continuar con su caracterización.

En la figura 13 mostramos la comparación de las 3 secuencias obtenidas de P2X₁, donde se observan las variaciones entre cada una de ellas.

TESIS CON
FALLA DE CUBENSO

```

*           20           *           40           *           60
P2X1 : TGTAGAGGTGGATGACAAGATCCCAAGCCCTGCTCTTCTTCGTGAGGCTGAGAACTTCACCCT : 63
P2X1a : TGTAGAGGTGGATGACAAGATCCCAAG----- : 27
P2X1b : TGTAGAGGTGGATGACAAGATCCCAAGCCCTGCTCTTCTTCGT----- : 43
      TGTAGAGGTGGATGACAAGATCCCAAGccctgctcttcttcgt

*           80           *           100          *           120
P2X1 : CTTTCATCAAAAACAGCATCAGCTTTCACGCTTCAAGGTCAACAGCCGCAACCTGGTAGAGGA : 126
P2X1a : -----CCGCAACCTGGTAGAGGA : 45
P2X1b : ----- : 45
      gcgcaacctggttagagGA

*           140          *           160          *           180
P2X1 : GGTGAACGGCACCTACATGAAGAAGTGCCTCTATCACAAGATTCAACACCCCTGTGCCAGT : 189
P2X1a : GGTGAACGGCACCTACATGAAGAAGTGCCTCTATCACAAGATTCAACACCCCTGTGCCAGT : 108
P2X1b : GGTGAACGGCACCTACATGAAGAAGTGCCTCTATCACAAGATTCAACACCCCTGTGCCAGT : 108
      GGTGAACGGCACCTACATGAAGAAGTGCCTCTATCACAAGATTCAACACCCCTGTGCCAGT

*           200          *           220          *           240          *
P2X1 : CTTCAACCTTGGCTATGTGGTGGGAGAGTCAGGCCAGGACTTCCGCAGCCTTGCTGAGAAGG : 252
P2X1a : CTTCAACCTTGGCTATGTGGTGGGAGAGTCAGGCCAGGACTTCCGCAGCCTTGCTGAGAAGG : 171
P2X1b : CTTCAACCTTGGCTATGTGGTGGGAGAGTCAGGCCAGGACTTCCGCAGCCTTGCTGAGAAGG : 171
      CTTCAACCTTGGCTATGTGGTGGGAGAGTCAGGCCAGGACTTCCGCAGCCTTGCTGAGAAGG

           260           *           280           *
P2X1 : TGGGGTGGTTGGTATCACCATTGACTGGAAGTGTGATCTGGA : 294
P2X1a : TGGGGTGGTTGGTATCACCATTGACTGGAAGTGTGATCTGGA : 213
P2X1b : TGGGGTGGTTGGTATCACCATTGACTGGAAGTGTGATCTGGA : 213
      TGGGGTGGTTGGTATCACCATTGACTGGAAGTGTGATCTGGA

```

Figura 13. Comparación de secuencias P2X₁ (De la base 706 a la 999 del ARNm), P2X₁, P2X_{1a} variante reportada, y P2X_{1b} variante nueva.

Por otra parte, al realizar la PCR con los iniciadores específicos para P2X₅ se obtuvieron tres bandas de amplificación (Fig. 14). Se realizó la subclonación de cada una de las bandas obtenidas de P2X₅ (500, 600 y 700 pb), de las cuales se obtuvieron 8, 4 y 2 clonas positivas respectivamente.

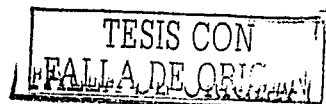




Figura 14. Amplificación del receptor P2X₅ utilizando iniciadores específicos. Carril: 1) control agua, 2) ADNc, 3) control -RT y M) marcador de peso molecular 250 pb.

Al secuenciar cada uno de los fragmentos se encontró que la banda de 600 pb corresponde a un fragmento de P2X₅. Las bandas de 500 y 700 pb, corresponden a dos variantes alternativas para este mismo subtipo de receptor a las cuales llamamos P2X_{5a} y P2X_{5b} respectivamente. A continuación se presenta la comparación de las secuencias de P2X₅ y P2X_{5a}.

P2X ₅ :	GACATTGACACTTCCCTGCAGAGTGCTGTGGTCACCAAAGTCAAGGGGGTGGCCTAT
P2X _{5a} :	GACATTGACACTTCCCTGCAGAGTGCTGTGGTCACCAAAGTCAAGGGGGTGGCCTAT
P2X ₅ :	ACTAACACCACGATGCTTGGGGAACGGCTCTGGGATGTAGCAGACTTTGTCAATCCA
P2X _{5a} :	ACTAACACCACGATGCTTGGGGAACGGCTCTGGGATGTAGCAGACTTTGTCAATCCA
P2X ₅ :	TCTCAGGGGGAGAACGTTTTCTTCGTGGTCACCAACCTGATCGTGACTCCTAACCCAG
P2X _{5a} :	TCTCAG-----
P2X ₅ :	CGGCAGGGCATCTGCCGCTGAGCGTGAAGGCATCCCTGATGGCGAGTGTCTGAGGA
P2X _{5a} :	-----CGTGAAGGCATCCCTGATGGCGAGTGTCTGAGGA
P2X ₅ :	TGATGACTGTCACGCTGGGGAGTCTGTTGTAGCTGGGCACGGACTGAAAACTGGCC
P2X _{5a} :	TGATGACTGTCACGCTGGGGAGTCTGTTGTAGCTGGGCACGGACTGAAAACTGGCC
P2X ₅ :	GCTGTCTCCGGGTGGGGAACCTCTACCCGGGGAACCTGTGAGATCTTTGCTTGGTGCCC
P2X _{5a} :	GCTGTCTCCGGGTGGGGAACCTCTACCCGGGGAACCTGTGAGATCTTTGCTTGGTGCCC
P2X ₅ :	AGTGGAGACAAAGTCCATGCCAACGGATCCCCCTTCTAAAGGATGCCGAAAAGCTTCAC
P2X _{5a} :	AGTGGAGACAAAGTCCATGCCAACGGATCCCCCTTCTAAAGGATGCCGAAAAGCTTCAC
P2X ₅ :	CATTTTCATAAAGAAGTTCATTTCGCTTCCCAAAGTTCAACTTCTCCAAAAGCCAATGTA
P2X _{5a} :	CATTTTCATAAAGAAGTTCATTTCGCTTCCCAAAGTTCAACTTCTCCAAAAGCCAATGTA
P2X ₅ :	CTAGAAACAGACAACAAACATTTCTGAAAACCTGTACACTCAGCTCCACAAATCTC
P2X _{5a} :	CTAGAAACAGACAACAAACATTTCTGAAAACCTGTACACTCAGCTCCACAAATCTC
P2X ₅ :	TACTG TCC
P2X _{5a} :	TACTG TCC

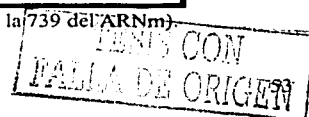
Figura 15. Comparación de secuencias P2X₅ (1) (De la base 218 a la 739 del ARNm). P2X₅; P2X_{5a} nueva variante.

En la figura 15 se observa la región de ARNm que es eliminada en la nueva variante P2X5a (exón 3). En esta secuencia se puede observar que en ésta son eliminadas 72 bases de la secuencia completa, lo que probablemente confiera características funcionales y/o farmacológicas diferentes a la subunidad.

En relación a la variante P2X_{5b}, obtenida durante la amplificación de la subunidad P2X₅, se puede mencionar lo siguiente: la mayor parte de la secuencia corresponde al ARNm que codifica para el receptor P2X₅ de rata; sin embargo, presenta además dos secuencias, una de 21 pb y otra de 86 pb (figura 16). Estas secuencias corresponden a parte del intrón 2 y a la secuencia completa del intrón 3 del gen que codifican para esta misma subunidad lo que sugiere que este fragmento posiblemente provenga de un procesamiento alternativo del mismo mensajero o de un ARNm inmaduro.

P2X ₅ :	GACATTGACACTTCCCTGCAGAGTGTGTGGTCACCAAAGTCAAGGGGGTGGCCTAT
P2X _{5b} :	GACATTGACACTTCCCTGCAGAGTGTGTGGTCACCAAAGTCAAGGGGGTGGCCTAT
P2X ₅ :	ACTAACACCACGATGCTTGGGGAACGGCTCTGGGATGTAGCAGACTTTGTCAATCCA
P2X _{5b} :	ACTAACACCACGATGCTTGGGGAACGGCTCTGGGATGTAGCAGACTTTGTCAATCCA
P2X ₅ :	TCTCAGGGGGAGAACGTTTTCTTCGTGGTCACCAACCTGATCGTGACTCCTAACCCAG
P2X _{5b} :	TCTCAGGGGGAGAACGTTTTCTTCGTGGTCACCAACCTGATCGTGACTCCTAACCCAG
P2X ₅ :	CGGCAGGGCATCTGCGCTGAG -----CGTGAAGGCATCCC
P2X _{5b} :	CGGCAGGGCATCTGCGCTGAGGTCCTTATCTCTCCTGACGCGTGAAGGCATCCC
P2X ₅ :	TGATGGCGAGTGTCTGAGGATGATGACTGTCACGCTGGGAGTCTGTTGTAGCTGG
P2X _{5b} :	TGATGGCGAGTGTCTGAGGATGATGACTGTCACGCTGGGAGTCTGTTGTAGCTGG
P2X ₅ :	GCACG-----
P2X _{5b} :	GCACGGGTGAGAGCCTGGAGTTGCTAAGCTGGAGCAGGGCAAACACACATGGACA
P2X ₅ :	-----GACTGAAAAGTGGCCGCTGTC
P2X _{5b} :	GGAAAGCCACAGCATTTCCTGTTTCTCCCTGCAGGACTGAAAAGTGGCCGCTGTC
P2X ₅ :	TCCGGTGGGGAACCTCTACCCGGGAACTGTGAGATCTTTGCTTGGTGCCAGTGG
P2X _{5b} :	TCCGGTGGGGAACCTCTACCCGGGAACTGTGAGATCTTTGCTTGGTGCCAGTGG
P2X ₅ :	AGACAAAGTCCATGCCAACGGATCCCCTTCTAAAGGATGCCGAAAAGCTTCACCATTT
P2X _{5b} :	AGACAAAGTCCATGCCAACGGATCCCCTTCTAAAGGATGCCGAAAAGCTTCACCATTT
P2X ₅ :	TCATAAAGAACTTCATTCGCTTCCCCAAGTTCAACTTCTCCAAAGCCAATGTACTAGA
P2X _{5b} :	TCATAAAGAACTTCATTCGCTTCCCCAAGTTCAACTTCTCCAAAGCCAATGTACTAGA
P2X ₅ :	AACAGACAACAAACATTTCTGAAAACCTGTCACTTCAGCTCCACAAAATCTCTACTG
P2X _{5b} :	AACAGACAACAAACATTTCTGAAAACCTGTCACTTCAGCTCCACAAAATCTCTACTG
P2X ₅ :	TCC
P2X _{5b} :	TCC

Figura 16. Comparación de secuencias P2X₅ (2) (De la base 218 a la 739 del ARNm) P2X₅; P2X_{5b}, nueva variante.



VI. INMUNODETECCIÓN EN EL NERVIÓ ÓPTICO DE LOS RECEPTORES P2X IDENTIFICADOS POR PCR.

Con el fin de estudiar la distribución de los receptores P2X, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica sobre cortes longitudinales de nervio óptico de rata empleando anticuerpos policlonales para cada uno de los receptores P2X, y anticuerpos secundarios acoplados a las moléculas fluorescentes rodamina y FITC. Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia y las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Adobe Photoshop versión 5.0.

Para establecer la calidad de los cortes de nervio óptico y la distribución celular, se realizó la tinción de Nissl en dichos cortes y se capturaron imágenes en campo claro. En la figura 17A se puede observar una imagen en campo claro de cortes longitudinales de nervio óptico, en la que se distingue las hileras de oligodendrocito dispuestas en paralelo con los axones. En la imagen 17B se observa un corte de nervio óptico teñido en el reactivo de Nissl, en el cual se puede observar el marcaje de los núcleos y citoplasma de astrocitos y oligodendrocitos, los primeros distribuidos aleatoriamente, mientras que el segundo grupo celular se encuentran alineados longitudinalmente a lo largo del nervio. Los resultados anteriores fueron de gran importancia, ya que permitieron determinar la morfología general del tejido.

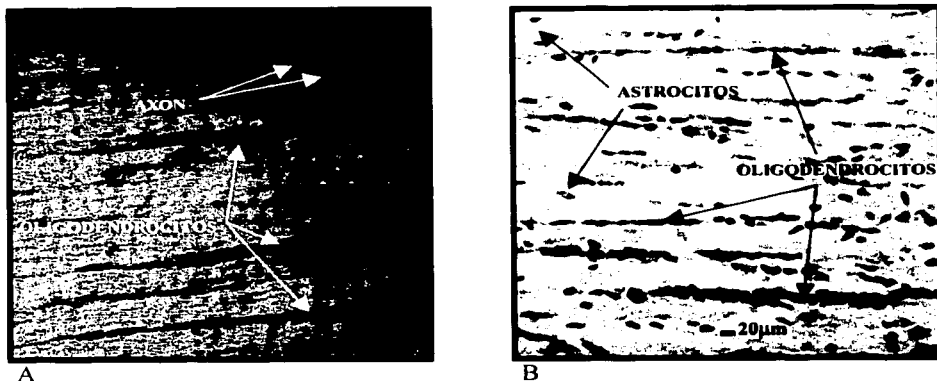


Figura 17. Morfología de cortes longitudinales de nervio óptico (40X). A. Cortes de nervio óptico en campo claro B. Tinción de Nissl en cortes de nervio óptico.

Para verificar la especificidad de los marcadores celulares AB7 y GFAP (marcadores que detectan oligodendrocitos y astrocitos específicamente), se realizaron ensayos de inmunohistoquímica empleando los marcadores celulares antes mencionados y utilizando un anticuerpo secundario acoplado a rodamina como método de detección. En la figura 18 se observan los patrones de marcaje de los anticuerpos AB7 y GFAP. Como se puede observar en la figura 18 A, el anticuerpo AB7, permite visualizar la típica imagen correspondiente a hileras de oligodendrocitos alineados a lo largo del tracto, mientras que el anticuerpo GFAP marca exclusivamente las prolongaciones de los astrocitos (figura 18 B).

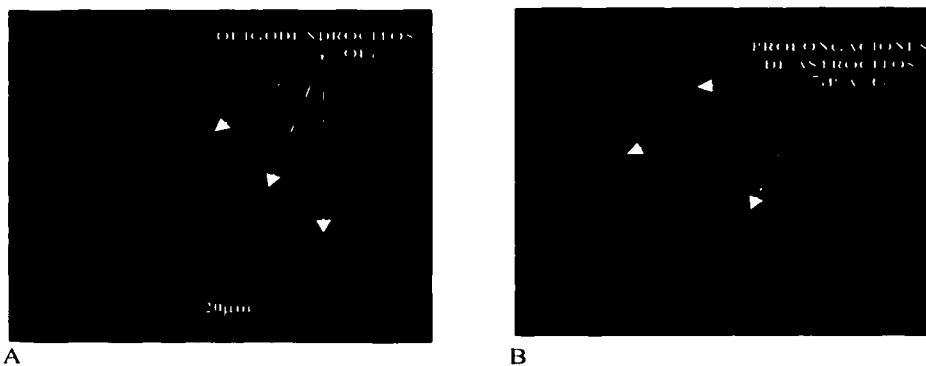


Figura 18. Inmunohistoquímica de cortes longitudinales de nervio óptico (40X). A. Marcaje con anti-AB7 (oligodendrocitos). B. Marcaje con anti-GFAP (astrocitos).

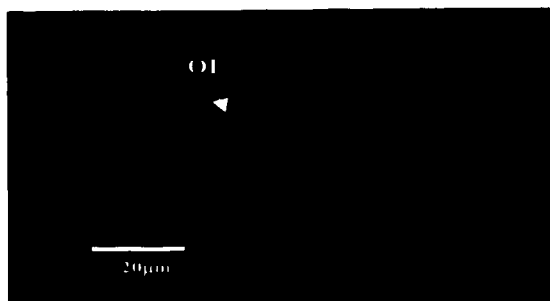
Una vez que se verificó la calidad de los cortes y la especificidad de los marcadores, se realizaron los ensayos de inmunohistoquímica con doble marcaje para determinar el tipo celular inmunoreactivo para los anticuerpos contra los receptores P2X. En los ensayos de doble marcaje se emplearon los anticuerpos AB7 o GFAP (marcados con rodamina), y uno de los anticuerpos contra los receptores P2X₁ al P2X₇ (marcados con FITC). En las figuras 19-20 se muestran los patrones de doble marcaje que se observaron en los ensayos de inmunohistoquímica para el receptor P2X₄ y AB7 o GFAP. En la figura 19 A, se observan oligodendrocitos marcados con el anticuerpo AB7 y una imagen similar se observa cuando se emplea el anticuerpo contra P2X₄

FALTA

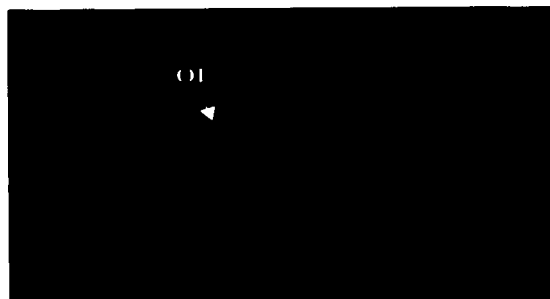
PAGINA

55|

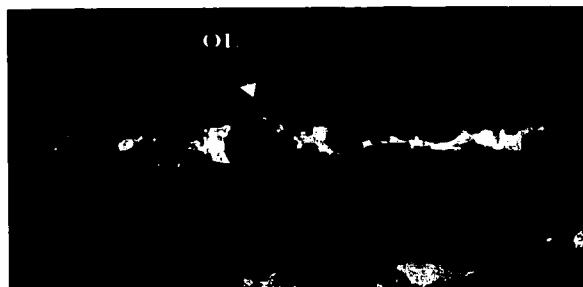
(figura 19 B). Cuando las imágenes son empalmadas, se obtiene una imagen de color amarillo lo que indica una colocación entre el anticuerpo contra el receptor P2X₄ y el marcador AB7, por lo que se establece que esta subunidad se expresa preferentemente en oligodendrocitos (figura 19 C). Al realizar el doble marcaje utilizando el marcador celular de astrocitos no se observa una colocación consistente, por lo que podemos decir que este subtipo de receptor no se expresa en este tipo celular (figura 20 A, B y C). Este tipo análisis fue realizado para cada uno de los receptores, encontrando que en los subtipos P2X₂, P2X₃, P2X₅, P2X₆ y P2X₇, se observa el mismo patrón de marcaje que para el P2X₄, por lo que podemos concluir que únicamente en oligodendrocitos se expresan estas subunidades.



A



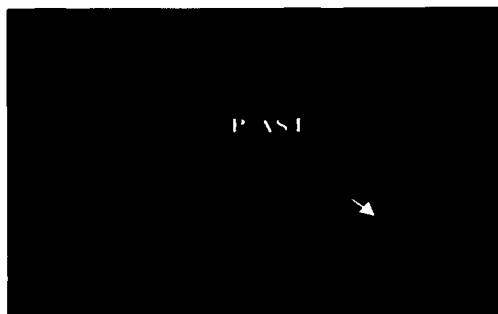
B



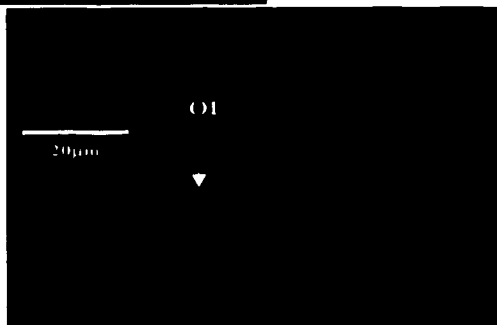
C

Figura 19. Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes longitudinales de nervio óptico (100X). A. Marcaje con el anticuerpo AB7 (oligodendrocitos); B. Marcaje con anticuerpo P2X₄. C. Imágenes A y B empalmadas.

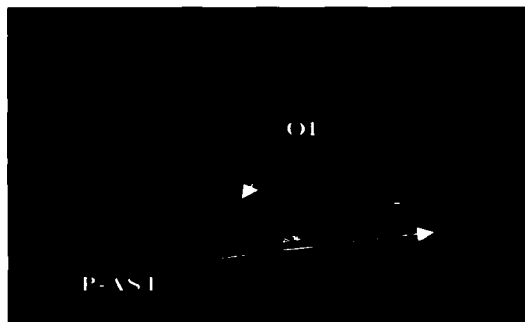
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



A



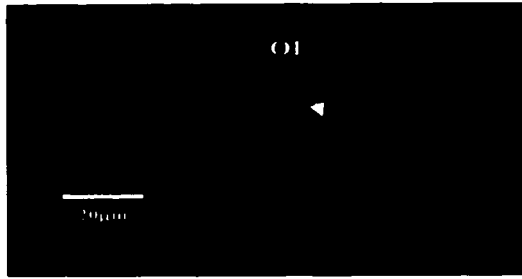
B



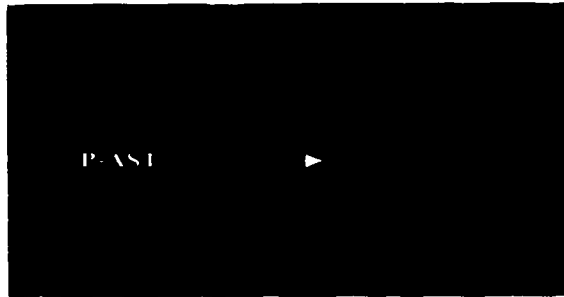
C

Figura 20. Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes longitudinales de nervio óptico (100X). A. Marcaje con el anticuerpo GFAP (astrocitos); B. Marcaje con anticuerpo P2X₄. C. Imágenes A y B empalmadas.

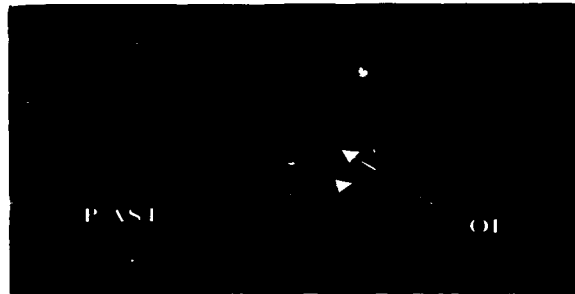
El receptor P2X₄ fue el único subtipo que mostró un patrón de marcaje diferente. Las imágenes obtenidas en el doble marcaje con dicho receptor se muestran en las figuras 21 y 22.



A

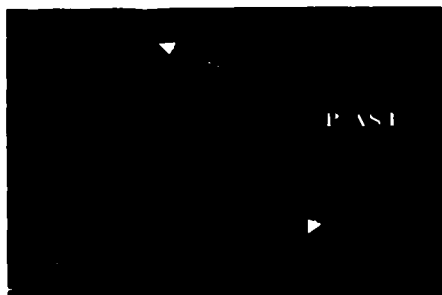


B

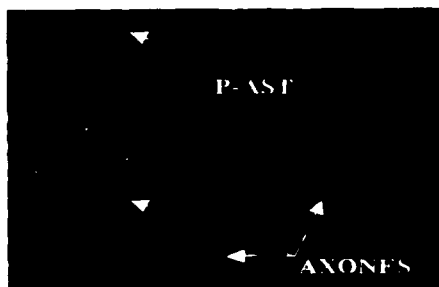


C

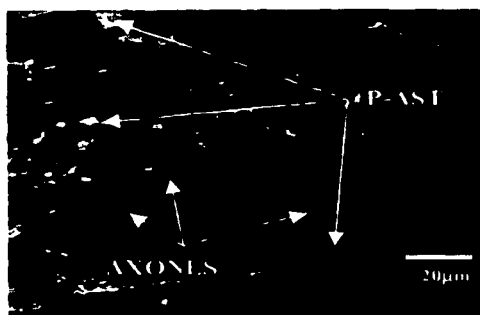
Figura 21. Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes longitudinales de nervio óptico (100X). A. Marcaje con el anticuerpo AB7 (oligodendrocitos); B. Marcaje con anticuerpo P2X₁. C. Imágenes A y B empalmadas.



A



B



C

Figura 22. Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes longitudinales de nervio óptico (100X). A. Marcaje con el anticuerpo GFAP (astrocitos); B. Marcaje con anticuerpo P2X₁. C. Imágenes A y B empalmadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FALTA

PAGINA

60|

Como se puede observar en la figura 21-22 el receptor P2X₁, no colocaliza con el marcador específico de oligodendrocitos (AB7) y lo hace parcialmente con el marcador de astrocitos (GFAP). Estos datos sugieren que este subtipo de receptores P2X pudiera ser expresado también en los axones y/o en los vasos sanguíneos presentes en el nervio óptico.

Todos estos datos fueron confirmados realizando otros ensayos de inmunohistoquímica con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (resultados no presentados).

Los resultados obtenidos en los ensayos de inmunodetección se resumen en la tabla IV. De manera cualitativa, se sugieren que las subunidades más abundantes son las de P2X₂, P2X₄ y P2X₇, seguidas por las de P2X₅ y P2X₆ mientras que la de P2X₃ muestra la menor expresión en oligodendrocitos. Por su parte, la subunidad P2X₁ mostró reactividad en astrocitos y probablemente en axones y vasos sanguíneos.

SUBUNIDAD	DISTRIBUCIÓN EN EL NERVIÓ ÓPTICO
P2X ₂ , P2X ₄ , P2X ₇ +++	<i>OLIGODENDROCITOS</i>
P2X ₅ , P2X ₆ ++	
P2X ₃ +	
P2X ₁ ++	<i>ASTROCITOS</i>
P2X ₁ +++	<i>AXONES Y/O VASOS SANGUINEOS</i>

Tabla IV. Inmunoreactividad de receptores P2X en el nervio óptico.
+ = Intensidad de marcaje.

TESIS CON
CALIA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman y amplían los datos reportados por Kirischuk y colaboradores (1995) y por James & Butt (1999; 2001; 2002), los cuales presentan evidencias de que los oligodendrocitos tanto *in vitro* como *in vivo* responden a ATP movilizándolo calcio intracelular. De acuerdo con el patrón de respuesta farmacológica observado en este tipo celular, ambos grupos de investigación sugieren que los oligodendrocitos expresan receptores tipo P2X, e incluso James & Butt (2002), proponen al subtipo P2X₇ como uno de los principales subtipos de receptores expresados en dichas células. En este contexto, el presente estudio aporta la primera evidencia molecular que confirma la expresión de receptores P2X en oligodendrocitos, lo que representa un primer acercamiento al estudio del papel que juega el ATP en la fisiología o patología de este tipo celular. En conjunto con estudios previos, los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten plantear algunas hipótesis sobre la importancia de los receptores P2X en la fisiología y patología de los oligodendrocitos.

I. ATP EN LA FISIOLOGÍA DE LOS OLIGODENDROCITOS

En primer lugar, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos establecer que los oligodendrocitos expresan receptores tipo P2X₇, y que al igual que el resto de las células que conforman el sistema nervioso pueden ser consideradas células blanco de señales fisiológicas y patológicas que involucren la liberación de ATP.

Los oligodendrocitos son un elemento celular clave en el funcionamiento del sistema nervioso ya que participan, por ejemplo, en el homeostasis extracelular y en la producción de mielina. En este sentido, los fenómenos de proliferación y diferenciación celular son fundamentales para mantener el número adecuado de oligodendrocitos maduros en cada área del SN. Se ha observado en estudios *in vitro*, que moléculas como interleucinas o factores de crecimiento, están involucradas en la generación de oligodendrocitos maduros (Valerio *et al.*, 2002; Fressinaud *et al.*, 1993; Althus *et al.*, 1992). Ya que se ha demostrado que el ATP es un

factor que induce los fenómenos de proliferación y diferenciación en diferentes tipos celulares, es posible sugerir que este nucleótido pudiera estar participando también en la generación de oligodendrocitos maduros a través de la activación de receptores P2X₂, o P2X₃, (Ryten *et al.*, 2002; Swanson *et al.*, 1998). Asimismo, es posible también, que el ATP promueva en otros tipos celulares como la microglia (Hide *et al.*, 2000), la liberación de moléculas que actúen sobre los oligodendrocitos y estimulen la proliferación y diferenciación celular.

El ATP juega un papel de factor liberador en los diferentes tipos celulares que conforman el SN. Se tiene evidencia de que la estimulación con ATP promueve la liberación de hormonas en las neuronas hipofisarias a través de los receptores P2X₂, (North 2002). Por otra parte, se ha observado en astrocitos, que este nucleótido induce la liberación de glutamato a través de los receptores P2X₂, y P2X₃, (Jeremic *et al.*, 2001). Este mismo efecto se ha observado en las células de Schwann (Jifinija & Jefinija, 1998), sin embargo, hasta el momento no se ha determinado el subtipo de receptor P2 que media la liberación de glutamato en este tipo celular. Dada la importante participación de los oligodendrocitos en la homeostasis extracelular, y que en el presente trabajo se demostró la expresión de los subtipos de receptores antes mencionados, sugerimos que este tipo celular pudiera también liberar glutamato o algún otro mensajero químico como respuesta a la estimulación con ATP. Dichas moléculas liberadas, podrían actuar sobre los mismos oligodendrocitos o sobre otros tipos de células neurogliales, manteniendo así la comunicación celular necesaria para el buen funcionamiento del nervio óptico.

Por otra parte, el ATP también se ha considerado una molécula de gran importancia en la generación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria, y por ende se le atribuye un papel de neuroprotector en el sistema nervioso. Como ya se ha mencionado, después de una lesión tisular en el SN, se incrementan los niveles de ATP extracelular, lo que promueve la activación de la microglía, y con ello, la liberación de mediadores proinflamatorios, como los son la IL-6, el TNF- α y el óxido nítrico (Moriwa *et al.*, 2000; Inoue 2002; Le Feure *et al.*, 2002). Estos mediadores actúan sobre las neuronas y los astrocitos incrementando su viabilidad y promoviendo la proliferación celular respectivamente (Eskes *et al.*, 2002; Abracchino *et al.*, 1994; Ciccarelli *et al.*, 1994). Se ha demostrado también que mediadores como la IL-6 y el TNF- α , actúan sobre los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

oligodendrocitos, induciendo proliferación celular en oligodendrocitos precursores, e incrementan la viabilidad de los oligodendrocitos maduros (Valerio *et al.*, 2002; Cammer 2000). Además, es posible que al igual que lo que se ha observado en astrocitos, el ATP pueda inducir de manera directa la proliferación celular en los oligodendrocitos, lo que complementaría la reparación del tejido dañado.

II. EXCITOTOXICIDAD EN OLIGODENDROCITOS Y ATP

La muerte de los oligodendrocitos y el proceso de desmielinización son elementos clave en la progresión de enfermedades neurodegenerativas. Este tipo celular es el más vulnerable y por lo tanto, el primer elemento del SN que degenera después de una lesión (Matute *et al.*, 2001). Se ha demostrado también que, durante una respuesta inflamatoria crónica (como se observa en enfermedades neurodegenerativas), los niveles extracelulares de ATP se mantienen elevados (Rothwell 1999; Cotran *et al.*, 1995). Es conocido que en concentraciones elevadas, este nucleótido puede inducir apoptosis en diferentes tipos celulares como macrófagos y células dendríticas (Sluyter & Wiley, 2002). En el sistema nervioso, se ha demostrado también, que el ATP puede ejercer un papel citotóxico en neuronas y microglia. El papel citotóxico del ATP en general, está mediado por el receptor P2X, (Morigiwa *et al.*, 2000; Inoue, 2002; Le Feuvre *et al.*, 2002). La activación de este receptor provoca la apertura de un poro permeable a Ca^{++} que no se desensibiliza, lo que provoca un desequilibrio de los niveles de calcio intracelular, activando de esa manera la vía clásica de la apoptosis (Wen *et al.*, 2003). Dada la estrecha relación del receptor P2X, con el fenómeno de apoptosis, y que en el presente trabajo se demostró que los oligodendrocitos expresan este receptor, es posible sugerir que la estimulación crónica con ATP, pueda desencadenar el fenómeno de apoptosis en este tipo celular. Esto último podría favorecer la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

III. RECEPTORES P2X EN ASTROCITOS

Como se ha mencionado a lo largo del trabajo, los astrocitos responden de manera importante a la estimulación con ATP. Se sabe hasta el momento que este nucleótido puede

promover el incremento de calcio intracelular (King *et al.*, 1996; Troadec *et al.*, 1999), la liberación de glutamato (Jeremic *et al.*, 2001) y la proliferación celular en astrocitos (Abbraccio *et al.*, 1994; Ciccarelli *et al.*, 1994). Cada una de las respuestas esta mediada por uno o varios tipos de receptores. Un fenómeno importante que se ha observado, es que el patrón de expresión de receptores P2X es diferentes de acuerdo al tejido de estudio. Así, sabemos por ejemplo, que los astrocitos que conforman la corteza de rata expresan los receptores P2X_{1,5} y P2X₇ (Fumagalli *et al.*, 2003). En astrocitos presentes en el núcleo acumbens, se expresan unicamente los receptores P2X_{2,4}. (Franke *et al.*, 2001), mientras que en astrocitos de hipocampo se expresan los subtipos P2X_{3,7} (Kukley *et al.*, 2001). Así mismo, los resultados del presente trabajo indican que los astrocitos que conforman el nervio óptico de rata expresan unicamente el subtipo P2X₁. Aún se desconoce el papel fisiológico que este último resultado pueda tener. Sin embargo, es importante recordar que dentro de la familia de los receptores P2X, el subtipo P2X₁, es uno de los mas sensibles a ATP (EC50 = 3µM). Lo anterior que sugiere que los astrocitos pueden sentir y responder a pequeños cambios en la concentración de ATP en el nervio óptico, lo que posiblemente modula la función de este tejido. Finalmente, todos estos datos sugieren que, el patrón de expresión de los receptores P2X en este tipo celular esta determinado por diferentes estímulos presentes de manera específica en cada tejido. Por lo anterior resultará de gran interés conocer los mecanismos que regulan la expresión de estos receptores para comprender un poco mas sobre todos los elementos que estan involucrados en la señalización purinérgica, así como su importancia en el funcionamiento del SN.

IV. VARIANTES DE RECEPTORES P2X EN NERVIÓ ÓPTICO

El procesamiento alternativo del ARNm o "splicing", es un fenómeno que incrementa la diversidad funcional de las proteínas, ya que a partir de un mismo ARN heterogeneo nuclear, se pueden generar diferentes ARNm, que posteriormente darán origen a proteínas con características estructurales o funcionales diferentes. La expresión de un ARNm puede ser tejido específico, célula específica, e incluso depender de una condición fisiológica o patológica en particular. Lo anterior sugiere que existe un mecanismo fino de regulación del proceso de "splicing", el cual hasta el momento no se conoce totalmente. El sistema nervioso es uno de los sistemas en donde el

fenómeno de “splicing” juega un papel fundamental en la diversidad funcional de las proteínas, y de manera particular, de los receptores a neurotransmisores y canales iónicos. Por ejemplo, en la cóclea, se han identificado más de 500 variantes diferentes de canales de K⁺ dependientes de voltaje, las cuales son generadas por el fenómeno de “splicing”. La expresión de todas estas variantes es fundamental para la percepción de la gama total de frecuencias que somos capaces de escuchar (Rosenblatt *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1999; Grabowski & Black, 2001).

Los receptores P2X son otro ejemplo de las proteínas en donde se ha podido identificar la expresión de variantes generadas por “splicing”. Como ya se ha mencionado, hasta el momento se ha identificado la expresión de variantes alternativas para los receptores P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X₅ y P2X₆. El estudio del papel fisiológico de la expresión de estas variantes aún no se ha concluido. Hasta el momento, únicamente se ha realizado la caracterización electrofisiológica de algunas de estas variantes. En estos estudios se ha demostrado que los nuevos receptores presentan características farmacológicas y electrofisiológicas diferentes a los subtipos previamente reportados lo anterior sugiere que la expresión de variantes de receptores generadas por “splicing” podrían jugar un papel importante en la modulación del efecto del ATP en la fisiología celular (Hardy *et al.*, 2000; Ohkubo *et al.*, 2000; Carpenter *et al.*, 1999; Townsend *et al.*, 1999; Dhulipala *et al.*, 1998; Koshimizu *et al.*, 1998a; Parker *et al.*, 1998; Brändle *et al.*, 1997; Le *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1997; Urano *et al.*, 1997).

Durante la caracterización de receptores P2X en el nervio óptico en el presente trabajo, fueron identificadas algunas variantes alternativas para los receptores P2X₁ y P2X₅. En el primer caso, encontramos dos variantes alternativas, una de ellas denominada P2X_{1a}. El ADNc predice la formación de una subunidad que carece de 21 amino ácidos del dominio extracelular del receptor, eliminando un sitio de N-glicosilación. Esta variante ya había sido reportada en arteria mesentérica de rata (Ohkubo *et al.*, 2000). Por datos experimentales, se sabe que esta variante únicamente puede formar canales funcionales si es coexpresada con la subunidad completa de P2X₁. Lo anterior sugiere que P2X_{1a} tiene un defecto en el tráfico de la proteína y/o directamente en la formación de un canal funcional. Las evidencias que apoyan esta idea están basadas en estudios donde se realizó una transfección con ADNc quimérico formado por P2X_{1a} y la proteína

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

verde fluorescente (PVF). Los resultados muestran la expresión y localización de la PVF en el citoplasma, lo que sugiere que la subunidad P2X_{1a} se está expresando pero no se puede ensamblar en la membrana (Ohkubo et al., 2000).

En el presente estudio reportamos también la expresión de una nueva variante del receptor P2X₁ denominada P2X_{1b}. Esta variante, al igual que la subunidad P2X_{1a}, carece de 21 aminoácidos en la región extracelular del canal y elimina el mismo sitio de N-glicosilación, sólo que entre ambas variantes existe una diferencia en el sitio de corte de 16 nucleótidos. La N-glicosilación de los péptidos constituye una de las principales señales que permiten a las proteínas llegar a su destino final. Para el caso de las proteínas de membrana, la N-glicosilación es fundamental para que éstas puedan viajar del aparato de Golgi a la membrana y de esa manera cumplir su función (Lodish *et al.*, 2002). Por ejemplo, el transportador de glicina GLYT2, es una de las proteínas de membrana que requiere de la N-glicosilación como señal para llegar a la membrana. En esta proteína se ha demostrado, a través de ensayos de mutagénesis dirigida, que la eliminación del sitio de glicosilación disminuye el transporte hacia la membrana de manera importante (Aragon *et al.*, 2001). De acuerdo a lo anterior, y dado que la variante P2X_{1b} es muy similar a P2X_{1a}, es posible que esta subunidad también presente alteraciones en su tráfico hacia la membrana. Sin embargo, esta posibilidad debe ser corroborada realizando estudios funcionales.

En el caso de P2X₁, también hemos identificado la expresión de dos nuevas variantes alternativas. En el primer caso se trata de una variante que carece de 24 aminoácidos de la región extracelular cercana al primer dominio transmembranal. Dentro de los aminoácidos eliminados en esta subunidad se encuentra una cisteína en la posición 118. Como sabemos, la formación de los puentes disulfuro entre las diferentes cisteínas son de gran importancia para la formación tridimensional de las regiones asociadas con la unión al ligando, así como a diferentes moduladores como metales o protones. Lo anterior se ha comprobado para los receptores P2X₁ y P2X₂, ya que, por medio de estudios de mutagénesis dirigida en los subtipos P2X₁ y P2X₂, se ha demostrado que la eliminación de la cisteína 117 ó 113 (respectivamente), pudiera estar involucrada en la modificación de la región extracelular del receptor, lo que aparentemente modifica el sitio de unión a metales. La mutante P2X₁ C117A forma canales funcionales y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presenta una amplitud de la corriente normal, pero muestra un decremento en la potencia de activación por ATP y en su modulación por zinc. Es importante recordar que el zinc modula la actividad de un gran número de receptores a neurotransmisores. Este metal puede reducir o potenciar la actividad del canal cuando éste es activado por su ligando. Por ejemplo, se tienen evidencias de que el Zn^{++} reduce la afinidad por GABA en el receptor GABA-A (Casagrande *et al.*, 2003). En contraste, se ha demostrado que este mismo catión, en los receptores β -adrenérgicos y nicotínicos, incrementa la afinidad por su agonista (Swaminath *et al.*, 2002; Hslao *et al.*, 2001). De acuerdo a todo lo anterior, sugerimos que ésta nueva variante P2X_{5a} pudiera presentar modificaciones en la respuesta al ATP o en la modulación por metales; sin embargo, hace falta realizar la caracterización funcional de esta variante para conocer las implicaciones que pueda tener la eliminación de estos 24 aminoácidos en la actividad del canal.

En relación a la variante P2X_{5b}, se trata de un ARNm que presenta 22 pb del intrón 2 y todo el intrón 3 (86pb). Variantes con características similares ya han sido reportadas para los subtipos P2X₂ (Koshimizu *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1997) y P2X₄ (Carpenter *et al.*, 1999). Algunas de estas variantes ya se han caracterizado electrofisiológicamente, y lo que se ha observado es que la mayoría de estas variantes no son funcionales como canales homómeros, ya que no se observa ningún tipo de corriente cuando son activadas por ATP (Koshimizu *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1997). De manera particular para el caso de la variante P2X_{4b}, la cual conserva el intrón 1, se ha observado que si puede formar canales funcionales, pero muestra una respuesta mínima e inconsistente, mientras que cuando se coexpresa con el subtipo P2X₄, presenta una pequeña disminución en la amplitud de la corriente en comparación con el receptor P2X₄ (Carpenter *et al.*, 1999). En relación a la nueva variante P2X_{5b}, lo que sabemos hasta el momento es lo siguiente: al analizar la posible secuencia de aminoácidos que se traduciría a partir del ARNm de P2X_{5b}, encontramos que la proteína que se estaría generando tiene un sitio de terminación diferente al que se presenta en el subtipo P2X₅. Al parecer la variante P2X_{5b} se trata de una proteína truncada, que presenta la región amino terminal, el primer pase transmembranal y aproximadamente un 34% de la región extracelular. Una subunidad P2X con estas características no podría formar canales funcionales; sin embargo se desconoce si se pudiera unir con alguna subunidad completa, retenerla en el citoplasma y modular de esa forma la

función, o inclusive podría ocurrir que esta nueva proteína tenga alguna otra función diferente en la membrana. Al igual que en los casos anteriores, es necesario realizar la caracterización funcional de esta variante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES:

- 1.- En el nervio óptico de rata se expresan el ARNm de todas las subunidades de los receptores P2X, además de nuevas variantes alternativas para los subtipos P2X₁ y P2X₇.
- 2.- Las subunidades P2X_{2,7} se expresan en oligodendrocitos, mientras que P2X₁ lo hace en astrocitos, axones y/o en vasos sanguíneos.

PARTICIPACION EN EL CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA 2002.

* Rangel E.Y., Matute C., Pérez F.C., Sánchez M.V.G., Garay E. y Arellano R.O. 2002. "Diversidad molecular de purinoreceptores y su posible participación en muerte celular en nervio óptico". Memorias del XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Neurociencias. O-20

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PERSPECTIVAS

En este trabajo se presentan evidencias de que los oligodendrocitos que conforman el nervio óptico expresan los receptores P2X₂₋₇, por lo que pueden ser considerados como células blanco de señales químicas mediadas por ATP. Así mismo, se demostró la expresión de nuevas variantes para los receptores P2X₁ y P2X₅. De este proyecto se derivan nuevas preguntas sobre el papel que juega el ATP en el funcionamiento del SN. A continuación se plantean algunas propuestas que complementarán los resultados obtenidos en la presente tesis.

- 1.- Caracterizar la expresión de los receptores P2Y en el nervio óptico de rata.
- 2.- Determinar experimentalmente el papel de los receptores purinérgicos en la fisiología y patología de los oligodendrocitos *in vitro* e *in vivo*.
- 3.- Estudiar la regulación de la expresión de los receptores purinérgicos a lo largo del desarrollo.
- 4.- Analizar la expresión de estos receptores en estados patológicos.
- 5.- Caracterizar la estructura y función de las nuevas variantes de P2X identificadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

- Abbraccio M.P., Saffrey M.J., Hopker V. and Burnstock G. 1994. "Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum" *Neuroscience*. 59: (1) 67-76.
- Alcantara G.F.C., Maia C.G., Lacerda M.J.R. and Moura N.V. 1999. "Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation". *Glia*. 25:247-255.
- Althus H.H., Kloppner S., Schmidt-Schultz T. and Scharz P. 1992. "Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber in oligodendrocytes isolated from adult pig brain". *Neurosci Lett*. 135(2): 219-223.
- Altschul S. F., Madden T.L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res*. 25:3389-3402.
- Amadio S., Ambrosi N.S., Cavaliere F., Murra B., Sancesario G., Bernardi G., Burnstock G. and Volante C. 2002. "P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons". *Neuropharmacology*. 42: 489-501.
- Aragon C., Martinez-Maza R., Poyatos I., Lopez-Corcuera B., Nunez E., Jimenez C. and Zafra F. 2001. "The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2." *J Biol Chem*. 19;276(3):2168-73.
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P. and Haydon Ph.G. 1999. "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner". *TINS*. 22(5): 208-215.
- Avola R., Spina P.V., Gallo F., Morales M.C., Marletta N., Costa A. Tirolo C., Testa N., Reale S. and Marchetti B. 2000. "Immortalizes hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons induce a functional switch in the growth factor responsiveness of astroglia: involvement of basic fibroblast growth factor". *International Journal of Developmental Neuroscience*. 18:743-763.
- Ballerini P., Di Iorio P., Ciccarelli R., Nargi E., D'Alimonte I., Traversa U., Rathbone M. P. and Caciagli F. 2002. "Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release" *Neuroreport*. 13: (14) 1789-1792.
- Ballotti R., Nielsen F. C., Pringle N., Kowalski A., Richardson W. D., Van O.E. and Gammeloft S., 1987. "Insulin-like growth factor I in cultures rat astrocytes: expression of the gene, and receptor tyrosine kinase". *EMBO J*. 6: 3633-3639.
- Barres B.A., Koroshetz W.J., Chun L.L.Y., Schwartz K.J., Corey D.P. 1990. "Ion channel expression of white matter glia II. The O2A progenitor cell". *Neuron*. 4: 507-524.
- Barres B.A. 1991. "New roles for glia". *The Journal of Neuroscience*, 11(12): 3685-3694.
- Barres B.A. and Raff, M. C. 1999. "Axonal control of oligodendrocyte development". *Journal of cell biology* 147 (6):1123-1128.
- Baumann N. and Pham-Dinh D. 2001. "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system". *Physiol Rev*. 81(2):871-927.
- Beattie E.C., Stellwagen D., Morishita W., Brenahan J.C., Keun Ha B., Von Z.M., Beattie M.S. and Malenka R.C. 2002. "Control of synaptic strength by glial TNF α ". *Science*. 295:2282-2285.
- Berl S. Clacke D.D. 1983. "The metabolic compartmentation concept". In: Hertz L., Kvamme E., McGeer E. G., Schousboe A. (eds). "Gutamina, glutamato and GABA in the central nervous system". Alan R. Liss. New York. 205-217.
- Blannkedfeld G., Enkvist K., Kettenmann H. 1995. "Gamma-aminobutyric acid and glutamate receptors". In: Kettenmann H., Ransom B.R. (eds) *Neuroglia*. Oxford University Press, In. New York. 335-345.
- Blannkenfeld G. and Kettenmann H. 1991. "Glutamate and GABA receptors in vertebrate glial cell". *Mol. Neurobiol*. 5: 31-43.
- Bock E. 1978. "Nerous system specific proteins". *J. Neurochem*. 30:7-14.
- Bodin Ph. and Burnstrook G. 2001. "Purinergic signalling: ATP release". *Neurochemical Research*. 26(8/9): 959-969.
- Bongarzone E.R., Howard S.G., Schönmann V. and Campagnoni A.T. 1998. "Identification of the

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- dopamine D3 receptor in oligodendrocyte precursors: potential role in regulating differentiation and myelin formation". *J Neurosci.* 18(14):5344-53.
- Brändle U., Osteroth R., Sin J., Surprenant A., Buell G., Ruppertsberg J.P., Plinker P.K., Zenner H.P. and Glowatzki E. 1997. "Desensitization of the P2X₂ receptor controlled by alternative splicing". *FEBS Letters.* 404: 294-298.
 - Buell G., Lewis C., Collo G., North R.A. and Surprenant A. 1996. "An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain". *EMBO J.* 15 (1): 55-62.
 - Burgess S. K. and McCarthy K. D. 1985. "Autoradiographic quantitation of beta-adrenergic receptors on neural cell in primary cultures. II. Comparison of receptors on various types of immunocytochemically identified cells". *Brain. Res.* 335: 11-19.
 - Burnstock G. 2000. "P2X receptors on sensory neurons". *Br. Journal Anaesth.* 84:476-488.
 - Burvinic S., Briones R. and Huidobro T.J.P. 2002. "P2Y(1) and P2Y(2) receptors are couple to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed". *Br. Journal Pharmacology.* 136(6): 847-856.
 - Butt A.M. and Berry M. 2000. "Oligodendrocytes and the control of myelination *in vivo*: New insights from the rat anterior medullary velum". *Journal of neuroscience research.* 59: 477-488.
 - Cammer W. 2000. "Effects of TNF α on immature and mature oligodendrocytes and their progenitors *in vitro*". *Brain Res.* 12;864(2):213-9.
 - Carpenter R.H.S. 1998. "Neurofisiología". Manual moderno. México, D.F.
 - Carpenter D., Meadows H.L., Brough S., Chapman G., Clarke C., Coldwell M., Davis R., Harrison D., Meakin J., McHale M., Rice S.Q.J., Tomlinson W.J. Wood M. and Sanger G.J. 1999. "Site-specific splice variation of the human P2X₄ receptor". *Neuroscience Letters.* 273: 183-186.
 - Casagrande S., Valle L., Cupello A. and Robello M. 2003. "Modulation by Zn(2+) and Cd(2+) of GABA(A) receptors of rat cerebellum granule cells in culture". *Eur Biophys J.* 32(1):40-6. Epub 2002 Nov 14.
 - Cataldo A.M. and Broadwell R.D., 1986. "Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions: neurons and glia". *Microsc. Tech.* 3:413-437.
 - Cavaliere F., Sancesario G., Bernardi G. and Volante C. 2002. "Extracellular ATP and nerve growth factor intensify hypoglycemia-induced cell death in primary neurons: role of P2 and NGFR α 75 receptors". *Journal of neurochemistry.* 83(5):1129-1138.
 - Chen Z.P., Kratzmeier M., Levy A., McArdie C.A., Poch A., Day A., Mukhopadhyay A.K. and Lightman S.L. 1995. "Evidence for a role of pituitary ATP receptors in the regulations of pituitary function". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: (11) 5219-5223.
 - Chizh B.A. and Illes P. 2001. "P2X receptors and nociception". *Pharmacol. Rev.* 53(4): 553-568.
 - Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. "Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal. Biochem.* 162 : 156-159.
 - Ciccarelli R., Di Iorio P., Ballerini P., Ambrosini G., Giuliani P., Tiboni G. M. and Caciagli F. 1994. "Effects of exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes" *J. neurosci Res.* 39:(5) 556-66.
 - Clyne J.D., LaPointe L.D. and Hume R.I. 2002a. "The role of histidine residues in modulation of the rat P2X₂ purinoceptor by zinc and pH". *Journal of Physiology.* 539(2): 347-359.
 - Clyne J.D., Wang L.F. and Hume R.I. 2002. "Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X₂ purinoceptor". *The journal of neuroscience.* 22(10): 3873-3880.
 - Cotran R.S., Kumar V. and Robbins S.L., 1995. "Patología estructural y funcional". McGraw-Hill. Madrid España.
 - De la Torre J.C. and Mussivand T. 1993. "Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease?". *Neurol Res.* 15(3): 146-153.
 - Del Río Hortega P. 1919. "El tercer elemento de los centros nerviosos". *Bloc Soc. Espan. Biol.* 9: 69-120.
 - Deuchars S.A., Atkinson L., Brooke R.E., Musa H., Milligan C.J., Batten T.F., Buckley N.J., Parson S.H. and Ducechars J. 2001. "Neuronal P2X₇ receptor are targeted to presynaptic terminals the centro and peripheral nervous systems". *The Journal of Neuroscience.* 21(18): 7143-7152.

- Dhulipala P.D.K., Wang Y.X. and Kotlikoff M.I. 1998. "The human P2X₄ receptor gene in alternatively spliced". *Gene*. 207: 259-266.
- Dunn Ph.M., Zhong Y. and Burnstock G. 2001. "P2X receptors in peripheral neurons". *Progress in Neurobiology*. 65: 107-134.
- Dupree J.L., Girault J.A. and Popko B. 1999. "Axo-glial interactions regulate the localization of axonal paranodal proteins". *Journal of cell biology*. 174 (6): 1145-1151.
- Eng L.F., Vanderhaeghe J.J., Bignami A. and Gersth B. 1971. "An acidic protein isolated from fibrous astrocyte". *Brain. Res.* 28:351-354.
- Ennion S., Hagan S. and Evans R.J. 2000. "The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X₁ receptor". *The Journal Biological Chemistry*. 275 (38):29361-29367.
- Ennion S.J. and Evans R.J. 2002. "Conserved cystine residues in the extracellular loop of the human P2X₁ receptor from disulfide bonds are involved in receptor trafficking to the cell surface". *Molecular Pharmacology*. 61(2): 303311..
- Eskes Ch., Honegger P., Juillierat J.L. and Monnet T.F. 2002. "Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release". *Glia*. 37:43-52.
- Faissner, A. 1997. "The tenascin gene family in axon growth and guidance". *Cell tissue res.* 290:331-341.
- Fields R.D. and Stevens B. 2000. "ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia". *TINS* 23: (12) 625-633.
- Franke H., Grosche J., Schadlich H., Krugel U., Allgaler C. and Illes P. 2001. "P2X receptor expression on astrocytes in the nucleoc accumbens of rat". *Neuroscience*. 108 (3): 421-429.
- Franke H., Krugel U., Schmidt R., Grosche J., Reichenbach A. and Illes P. 2001. "P2 receptors-types involved in astrogliosis *in vivo*". *Br. J. Pharmacol.* 134(6): 1180-1189.
- Frautschy S.A., Wilicke P.A. and Baird A. 1991. "Localization of basic fibroblast growth factor and its mRNA after CNS injury". *Brain. Res.* 553: 291-299.
- Fressinaud C., Laeng P., Labourdette G., Durand J. and Vallat J.M. 1993. "The proliferation of mature oligodendrocytes *in vitro* is stimulated by basic fibroblast growth factor and inhibited by oligodendrocyte-type 2 astrocyte precursors". *Dev Biol.* 158(2):317-29.
- Friedman B., Hockofield S., Blac J.A., Woodruff K.A. and Waxman S.G. 1989. " *In situ* demonstrations of mature oligodendrocytes and their process: an immunocytochemical study with a new monoclonal antibody Rip". *Glia*. 2:585-598.
- Fruttiger M., Karlsson L., Hall A.C., Abramsson A., Calver A.R., Boström H., Willetts K., Bertold C.H., Heath J.K., Betsholz C. and Richardson W.D. 1999. "Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice". *Development*. 126: 457-467.
- Fujii S., Kato H., Furuse H., Ito K., Osada H., Hamaguchi T. and Kuroda Y. 1995. "The mechanism of ATP-induced long-term potentiation involves extracellular phosphorylation of membrane proteins in guinea-pig hippocampal CA1 neurons". *Neurosci Lett.* 187(2): 130-132.
- Fumagalli M., Brambilla R., D'Ambrosi N., Volonte C., Matteoli M., Verderio C. and Abbraccio M.P. 2003. "Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors". *Glia* 43(3): 218-223.
- Furukawa S., Furukawa Y. and Saotoyoshi K. 1986. "Synthesis and secretion of nerve growth factor by mouse astroglial cell in culture". *Biochem. Biophysics. Res. Commun.* 136: 57-63.
- Goldberg J.L. and Barres B.A. 2000. "Nogo in nerve regeneration". *Nature*. 403: 369-370.
- Gonzalez D., Dess W. L., Hiney J.K. Ojeda S.R. and Saneto R.P. 1990. " Expression of β -nerve growth factor in cultured cell derived from the hypothalamus and cerebral cortex". *Brain Res.* 511: 249-258.
- Grabowski P.J. and Black D.L. 2001. "Alternative RNA splicing in the nervous system". *Progress in Neurobiology*. 65: 289-308.
- Hardy L.A., Harvey I.J., Chambers P. and Gillespie J.I. 2000. "A putative alternatively spliced variant of the P2X₁ purinoreceptor in the human bladder". *Experimental Physiology*. 85(4): 461-463.
- Hatton G.I., Bicknell R.J., Hoyland R. and Mason W.T. 1992. "Arginine vasopressin mobilises intracellular calcium via V1-receptor activation in astrocytes (pituicytes) cultured from adult rat neural lobes". *Brain Res.* 588:75-83.

- He M., Koshimitzu T., Tomic M. and Stojilkovic S.S. 2002. "Purinergic P2X₂ receptor desensitisation depends on coupling between ectodomain and C-terminal domain". *Molecular Pharmacology*. 62(5): 1187-1197.
- Hertz L., Baldwin F. and Schousboe A. 1979. "Serotonin receptors on astrocytes in primary cultures". *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 223-226.
- Hide I., Tanaka M., Inoue A., Nakajima K., Kohsaka S., Inoue K. and Nakata Y. 2000. "Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia" *J. Neurochem.* 75: (3) 965-72.
- Hohmann J., Kowalewski H., Vogel M. and Zimmermann H. 1993. "Isolation of a Ca²⁺ or Mg (2+)-activated ATP-ase (ecto-ATPase) from bovine brain synaptic membranes". *Biochim Biophys. Acta.* 1152 (1): 146-154.
- Hosli E and Hosli L. 1988. "Autoradiographic localization of binding sites for muscarinic and nicotinic agonists and antagonists on cultured astrocytes". *Exp Brain Res.* 71(2):450-4.
- Housley G.D., Kanjhan R., Raybould N.P., Greenwood D., Salih S.G., Jarlebark L., Burton L., Setz V.C., Cannel M.B., Soeller C., Christie D.L., Usami S., Matsubara A., Yoshie H., Ryan A.F. and Thorne P.R. 1999. "Expression of the P2X₂ receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the cochlea: implications for sound transduction and auditory neurotransmission". *The Journal Neuroscience.* 19(19): 8377-8388.
- Hsiao B., Dweck D. and Luetje CW. 2001. "Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc". *J Neurosci.* 15;21(6):1848-56.
- Hu B., Mei Q.B., Yao X.J., Smith E., Barry W.H. and Liang B.T. 2001. "A novel contractile phenotype with cardiac transgenic expression of the human P2X₄". *FASEB J.* 15(14): 2739-2741.
- Huxtable D. 1989. "Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine". *Progr. Neurobiol.* 32: 471-533.
- Inoue K. 2002. "Microglial activation by purines and pyrimines". *Glia.* 40: 156-163.
- Jagroop A.I., Burnstock G. and Mikhailidis D.P. 2003. "Both the ADP receptors P2Y(1) and P2Y(12), play a role in controlling shape change in human platelets". *Platelets.* 14(1):15-20.
- James S. and Richardson P.J. 1993. "Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse". *Journal Neurochemistry.* 60 (1): 219-227.
- James G. and Butt A.M. 1999. "Adenosine 5' triphosphate evokes mobilization of intracellular calcium in central nervous system white matter of adult mouse optic nerve". *Neurosci. lett.* 268: 53-56.
- James G. and Butt A.M. 2001. "P2X and P2Y purinoreceptors mediate ATP-evoked calcium signalling in optic nerve glia *in situ*". *Cell calcium.* 30(4): 251-259.
- James G. and Butt A.M. 2002. "P2Y and P2X purinoreceptor mediated Ca²⁺ signalling in glial cell pathology in the central nervous system". *European Journal of Pharmacology.* 447: 247-260.
- Jensen A.M. and Chiu S.Y., 1991. "Differential intracellular calcium responses to glutamate in type-1 and type-2 culture brain astrocytes". *J. Neurosci.* 11 : 1674-1684.
- Jefčinija S.D. and Jefčinija K.V. 1998. "ATP stimulates release of excitatory amino acids from cultured Schwann cell". *Neuroscience.* 82(3): 927-934.
- Jeremic A., Jefčinija K.V., Stevanovic J., Glavaski A. and Jefčinija S.D. 2001. "ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes". *Journal of Neurochemistry.* 77: 664-675.
- Jo Y.H. and Role L.W. 2002. "Coordinate release of ATP and GABA at *in vitro* synapses of lateral hypothalamic neurons". *Journal of Neuroscience.* 22(12): 4794-4804.
- Jones E.M., Gray-Keller M. and Fetiplace R. 1999. "The role of Ca²⁺ activated K⁺ channel spliced variants in the tonotopic organization of the turtle cochlea". *J. Physiol.* 518(Pt 3):653-665.
- Kandel E.R., Jessell T.M. y Sejwartz J.H. 1997. "Neurociencia y conducta". Prentice may. España.
- Kenedy C. 1996. "ATP as a cotransmitter in perivascular sympathetic nerves". *J.Auton. Pharmacol.* 16(6) : 337-340.
- Kettenmann H. 1999. "Physiology of glial cells". *Advances in Neurology*, 79:565-571.
- Khakh B.S., Burnstock G., Kennedy Ch., King B.F., North R.A., Séguéla Ph., Voigt M. and Humphrey P.P.A. 2001. "International Union of Pharmacology. XXIV. Current Status of the Nomenclature and Properties of P2X receptors and Their Subunits". *Pharmacological Reviws.* 53: (1): 107-118.
- King B.F., Neary J.T., Zhu Q., Wang S., Norenberg M.D. and Burnstock G. 1996. "P2 purinoreceptors in rat

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

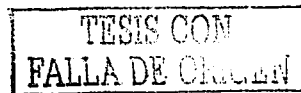
- cortical astrocytes: expression, calcium-imaging and signaling studies". *Neuroscience*. 74(4): 1187-1196.
- Kirischuk S., Scherer H., Kettenman H., and Verkhratsky A. 1995. "Activation of P2-purinoreceptors triggered Ca²⁺ release from InsP3-sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes". *Journal physiology*. 483(1): 41-57.
 - Kittner H., Franke H., Fisher W., Schultheis N., Krugel U. and Illes P. 2003. "Stimulation of P2Y₁ receptors causes antioxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y₁ receptors-mediated nitric oxide production". *Neuropsychopharmacology*. 28(3): 435-444.
 - Knapp P.E., Maderspach K. and Hauser K.F. 1998. "Endogenous opioid system in developing normal in jimpy ligodendrocytes: mu and kappa opioid receptors mediate differential mitogenic and growth responses". *Glia*. 22(2): 189-201.
 - Koelle G.B. 1950. "The histochemical differentiation of types of cholinesterases and their localization in tissues of the cat". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 100: 158-179.
 - Koshimizu T., Tomić M., Koshimizu M. and Stojilkovic S.S. 1998. "Identification of amino acid residues contributing to desensitization of the P2X₂ receptor channel". *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (21):12853-12857.
 - Koshimizu T., Tomić M. Van Goor F. and Stojilkovic S.S. 1998a. "Functional role of alternative splicing in pituitary P2X₂ receptor-channel activation and desensitization". *Molecular Endocrinology*. 901-913.
 - Koshimizu T., Koshimizu M. and Stojilkovic S.S. 1999. "Contributions of the C-terminal domain to the control of P2X receptor desensitization". *The Journal of Biological Chemistry*. 274(53): 37651-37657.
 - Krugel U., Kittner H. and Illes P. 1999 "Adenosine 5'-triphosphate-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens *in vivo*". *Neurosci Lett*. 265: (1) 49-52.
 - Kugelgen J., Spath L. and Starke K. 1994. "Evidence for P2-receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in rat brain cortex". *Br. J. Pharmacol* 113 (3): 815-822.
 - Kugelgen J. Koch H. and Starke K. 1997. "P"-receptor-mediated inhibition serotonin release in the rat brain cortex". *Neuropharmacology*. 36 (9): 1221-1227.
 - Kukley M., Barden J.A., Steinhauser C. and Jabs R. 2001. "Distribution of P2X receptors on astrocyte in juvenile rat hippocampus". *Glia*. 36:11-21.
 - Laschet J., Grisar T., Bureau M. and Guillaume D. 1992. "Characteristics of putresine uptake and subsequent GABA formation in primary cultured astrocytes from normal C57BL/6J and epileptic DBA/2J mouse brain cortices". *Neurosci*. 48: 151-157.
 - Larrabee M.G. 1992. "Extracellular intermediates of glucosa metabolism: fluxes of endogenous lactate and alanina through extracellular pool in embrionic sympathetic ganglio". *J.Neurochem*. 59; 1041-1052.
 - Le K., Paquet M., Nouel D., Babinski K. and Séguéla Ph. 1997. "Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system". *FEBS Letters* 418: 195-199.
 - Le Feuvre R., Brough D. and Rothwell N. 2002. "Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration". *European Journal of Pharmacology*. 447:261-269.
 - Levi G. and Patricio M. 1992. "Astrocyte heterogeneity: endogenous amino acid levels and release evoked by non N-methyl-D-aspartate receptor agonists and by potassium-induced swelling in type-1 and type-2 astrocytes". *J.Neurochem*. 58: 1943-1952.
 - Liu J.S.H., John G.R., Sikora A., Lee S.C. and Brosnan C.F. 2000. "Modulation of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α signaling by P2 purinergic receptors in human fetal astrocytes". *Journal of neuroscience*. 20(14): 5292-5299.
 - Lodish H., Berk A., Lawrence Z.S., Matsudaira P., Baltimore S. and Darnell J. 2002. "Biología Celular y Molecular". Panamericana, Argentina. Buenos Aires.
 - Lutz P.L. and Kabler S. 1997. "Release of adenosine and ATP in the brain of the freshwater turtle (*Trachemys scripta*) during long-term anoxia". *Brain Research* 769: 281-286.
 - Madelian V., Martin D.L., Delay M.J. and Weiss, S. 1991. "Beta-receptor stimulated and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated taurine release from LRM55 glial cells". *J. Neurosci*. 5:3154-3160.
 - Magistretti P.J., Sorg O. and Martin J.L. 1993. "Regulation of glycogen metabolism in astrocytes: physiological, pharmacological and pathological aspects". In: Murphy S. (eds). *Astrocytes: pharmacology and function*. Academic. Press. San Diego. 243-265.



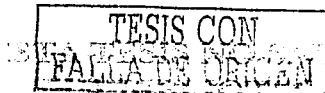
- Manthorpe M., Rudge, J. S. and Varon S. 1986. "Astroglial cell contributions to neural survival and neuritic growth". In Fedoroff S., Vernadakis, A. (eds) *Astrocytes*. Academic Press. Orlando. Vol 3: 315-360.
- Martín J.L., Madelán V., Seligman B. and Shain W. 1990 "The role of osmotic pressure and membrane potential in K⁺ stimulated taurine release from cultured astrocytes and LRM55 cell". *J. Neurosci.* 10: 571-577.
- Matute C., Arellano R.O., Conde-Guerri B. and Miledi R. 1992. "mRNA coding for neurotransmitter receptors in a human astrocytoma". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(8):3399-3403.
- Matute C., Alberdi E., Domercq M., Perez-Cerda F., Perez-Samartin A., Sanchez-Gomez M.V. 2001. "The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases" *Trends Neurosci.* 24(4):224-30.
- Migita K., Haines W.R., Voigt M.M. and Egan T.M. 2001. "Polar residues of the second transmembrane domain influence cation permeability of the ATP-gated P2X₂ receptor". *The Journal of Biological Chemistry.* 276 (33): 30934-30941.
- Mori de Moro G., Arvanitis D. and Sczuchet S. 1990. "Characterization of an oligodendrocyte glycoprotein recognized by monoclonal antibody II". *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 605: 434-438.
- Morigiwa K., Fukuda Y. and Yamashita M. 2000. "Neurotransmitter ATP and cytokine release". *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 115 (4): 185-192.
- Mugnaini E. and Walberg F. 1964. "III. Ultrastructure of neuroglia". *Rev. Anat. Embriol. Cell. Biol.* 37: 194-236.
- Mutafova Y.V.N., Carolan B.M., Harden T.K. and Keef K.D. 2000. "Multiple P2Y receptors mediated contraction in guinea pig mesenteric vein". *Gen Pharmacology.* 32 (2): 127-136.
- Nakazawa K., Sawa H., Ojima H., Nozawa R.I., Takeuchi K. and Ohno Y. 2002. "Size of side-chain at channel pore mouth affects Ca²⁺ block of P2X₂ receptor". *European Journal of Pharmacology.* 449: 207-211.
- Neuman E.A. and Zahs K.R. 1998. "Modulation of neural activity by glial cell in the retina". *Journal of neuroscience.* 18 (11): 4022-4028.
- Nicholls J.G., Martin A.R., Wallace B.G. and Fuchs P.A., 2001. "From Neuron to Brain". Sinauer Associates, Inc. Publishers. U.S.A.
- Nike A., Bäumert H.G., Rettinger J., Eichele A., Lambrecht G., Mutschler E. and Schmalzing G. 1998. "P2X₁ and P2X₃ receptors from stable timers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels". *The EMBO Journal.* 17: 3016-3028.
- North R.A. and Surprenant A. 2000. "Pharmacology of cloned P2X receptors". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 563-580.
- North R.A. 2002. "Molecular physiology of P2X receptors". *Physiol Rev.* 82: 1013-1067.
- Nunez L., Villalobos C. and Frawley L. S. 1997 "Extracellular ATP as an autocrine/paracrine regulator of prolactin release" *Am J. Physiol* 272: (6 pt.1) E1117-1123.
- Ohkubo T., Yamazaki J., Nakashima Y. and Kitamura K. 2000. "Presence and possible role of spliced isoform of the P2X₁ receptor in rat vascular smooth muscle cells". *European Journal Physiology.* 441: 57-64.
- Orkand R.K. 1995. "Effects of nerve impulses on glial membranes". In Kettenmann H., Ramson B.R. (eds) *Neuroglia*. Oxford University Press Inc. New York. 460-470.
- Orkand R. K., Nicholl J.G. and Kuffler S.W. 1996. "Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial in the central nervous system of amphibia". *J. Neurophysiol.* 29:788-806.
- Parker M.S., Larroque M.L., Campbell J.M., Bobinn R.P. and Deininger P.L. 1998. "Novel variant of the P2X₂ ATP receptor from the guinea pig organ of corti". *Hearing Research.* 121: 62-70.
- Poelchen W., Sieler D., Wirkner K. and Illes P. 2001 "Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat". *Neuroscience* 102: (3) 593-602.
- Queiroz G., Meyer D. K., Meyer A., Starke K. and Von Kügelgen I. 1999. "A study of the mechanism of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors" *Neuroscience.* 91: (3) 1171-1181.
- Ralevic V. and Burnstock G. 1998. "Receptors for purines and pyrimidines". *Pharmacol. Rev.* 50(3) :413-492

TESIS COM
FALLA DE

- Ransom B.R. and Orkand R.K. 1996. "Glial-neuronal interaction in non-synaptic areas of the brain : studies in the optic nerve". *Trends Neurosc.* 19 (8):352-358.
- Rassendren F., Buell G., Newbott A., North A.R. and Suprenant A. 1997. "Identification of amino acid residues contributing to pore of a P2X₂ receptor". *The EMBO Journal* 16 (12): 3446-3454.
- Rathbone M.P., Middlemiss P.J., Gysbers J.W., Andrew C., Herman M.A.R., Reed J.K., Ciccarelli R., Di Iorio P. and Caciagli F. 1999. "Trophic effects of purines in neurons and glial cells" *Progress in neurobiology.* 59: 663-690.
- Rettinger J., Aschrafi A. and Schmalzing G. 2000. "Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X₁ receptor". *The Journal of Biological Chemistry.* 275 (43): 33542-33547.
- Rochon D., Rousse I. and Robitaille R. 2001. "Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction". *Journal of neuroscience.* 21(11): 3819-3829.
- Rosenblatt K.P., Sun Z.P., Heller S. and Hudspeth A.J. 1997. "Distribution of Ca²⁺ activated K⁺ channel isoforms along the tonotopic gradient of the chicken's cochlea". *Neuron.* 19(5): 1061-1075.
- Rothwell N.J. 1999. "Cytokines-killers in the brain?". *Neurnal of physiology.* 514(1): 3-17.
- Rougon G., Noble M. and Mudge A.W. 1983. "Neuropeptides modulate the β -adrenergic response of purified astrocytes in vitro". *Nature.* 305: 715-717.
- Rudge J.S., Morse J.K., Wiegand S.J. and Ip N.Y. 1991. " Injury-induced regulation of neurotrophic factor mRNA in adult rat brain". *Abstr. Soc. Neurosci.* 17: 1121.
- Ruppelt A., Ma W., Borchardt K., Solberberg S.D. and Soto F. 2001. "Genomic structure, developmental distribution and functional properties of the chicken P2X₅ receptor". *J. Neurochem.* 77(5):1256-1265.
- Ryten M., Dunn P.M., Neary J.T. and Burnstock G. 2002. "ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X₅ receptor on satellite cells". *J Cell Biol.* 22;158(2):345-55.
- Sak K., Boeynaems J.M. and Everaus H. 2003. "Involvement of P2Y receptors in the differentiations of haematopoietic cell". *J. Leukoc Biol.* 73(4): 442-447.
- Salter M.W. and Hicks J. 1994. "ATP-evoked increases in intracellular calcium in neurons and glia from the dorsal spinal cord". *J. Neurosc.* 14 (3): 1563-1575.
- Sambrook T., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. "Molecular Cloning". Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A. : 1977. "DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors ". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 54-63.
- Sawada M., Kondo N., Suzumura A., and Marunouchi T. 1989. "Producción of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture". *Brain. Res.* 491:394-397.
- Simon J., Kidd E.J., Smith F.M., Chessell I.P., Murrell L.R., Humphrey P.P.A. and Barnard E.A. 1997. "Localization of functional expression of splice variants of the P2X₂ receptor". *Molecular Pharmacology.* 52: 237-248.
- Skoff R.P. and Knapp P.E. 1995. "The origins and lineages of macroglial cell". In Kettenmann H., Ransom B.R., (eds). *Neuroglia.* Oxford University Press, Inc New York.
- Sluyter R. and Wiley J.S. 2002. "Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of CD23 from human dendritic cells via activation of P2X₇ receptors". *Int Immunol.* 14(12):1415-21.
- Sneddon P. 2000. "Electrophysiology of autonomic neuromuscular transmission involving ATP". *J. Auton. Nerv. Syst.* 81(1-3):218-224.
- Sperlagh B., Mergl Z., Juranyi Z., Vizi E. S. and Makara G.B. 1999 "Local regulation of vasopressin and oxytocin secretion by extracellular ATP in the isolated posterior lobe of the rat hypophysis" *J Endocrinol* 160:(3) 343-350.
- Sperlagh B., Kofalvi A., Deuchars J., Atkinson L., Milligan C.J., Buckley N.J. and Vizi E.S. 2002. "Involvement of P2X₇ receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus". *Journal of neurochemistry.* 81(6): 1196-1211.
- Stella N., Estelles A., Siciliano J., Tence M., Desagher S., Piomelli D. and Glowinski J. 1997. "Interleukin-1 enhances the ATP-evoked release of arachidonic acid from mouse astrocytes". *Journal of neuroscience.* 17(9): 2939-2946.
- Steward O. 2000. "Functional Neuroscience". Springer. California U.S.A.



- Stockli K. A., Lotpeich F., Sendtner M., Mariakowski P., Caroll P., Gotz R., Lindholm D. and Thoenen H. 1989. "Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor". *Nature*. 342: 920-923.
- Swanson K., Reigh C. and Landreth G.E. 1998. "ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotrophic P2X₂ purinoreceptors in PC12 cells". *Journal of Biological Chemistry*. 273 (32)19965-19971.
- Swaminath G., Steenhuis J., Kobilka B. and Lee T.W. 2002. "Allosteric modulation of beta2-adrenergic receptor by Zn(2+)". *Mol Pharmacol*. 61(1):65-72.
- Syroid D.E., Maycox P.R., Burrola P.G., Liu N., Wen D., Lee K.F., Lemke G. and Kilpatrick T. 1996. "Cell death in the Schwann cell lineage and its regulation by neuroregulin". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 9229-9234.
- Thomas S.A. and Home R.I. 1990. "Permeation of both cations and anions through a single class of ATP-activated ion channels in developing chick skeletal muscle". *J.Gen. Physiol* 95(4): 569-590.
- Townsend N.A., King B.F., Wildman S.S. and Burnstock G. 1999. "Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X₄ and P2X₆ receptors". *Molecular Brain Research*. 64: 246-254.
- Troadec J. D., Thirion S., Petturiti D., Bohn M. T. and Poujeol P. 1999 "ATP acting on P2Y receptors triggers calcium mobilization in primary cultures of rat neurohypophysial astrocytes (pituitocytes)". *Pflugers Arch*. 437: (5) 745-753.
- Ullian E.M., Sapperstein S.K., Chistopherson K.S. and Barres B.A. 2001. "Control of synapse number by glia". *Science*. 291: 657-660.
- Urano T., Nishimori H., Han H., Furuhashi T., Kimura Y., Nakamura Y. and Tokino T. 1997. "Cloning P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53". *Cancer Res*. 57 (15): 3281-3287.
- Vadnick I. and Shrager P. 1998. "Ion channel redistribution and function during development of the myelinated axon". *Journal of neurobiology*. 37: 80-96.
- Valera S., Hussy N., Evans R.J., Adami N., North R.A., Surprenant A. and Buell G. 1994. "A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP". *Nature* 371: 516-519.
- Valerio A., Ferrario M., Dreano M., Garotta G., Spano P. ad Pizzi M. 2002. "Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor/IL-6 fusion protein enhances *in vitro* differentiation of purified rat oligodendroglial lineage cells". *Mol Cell Neurosci*. 21(4):602-15.
- Vesce S., Bezzi P. and Volterra A. 2001. "Synaptic transmission with the glia". *News Physiol. Sci*. 16:178-184.
- Verkhratsky A. and Steinhauser C. 2000. "Ion channels in glial cells". *Brain Research Reviews* 32:380-412.
- Vernadakis A. 1996. "Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity". *Prog. Neurobiol*. 49(3) : 185-214.
- Vial C. and Evans R.J. 2001. "Smooth muscles does not have a common P2X receptor phenotype: expression, ontology and function of P2X₁ receptor in mouse ileum, bladder and reproductive system". *Auton Neuroscience*. 92 (1-2): 56-64.
- Wahl S.M., Allen J.B., Mccartney F.N., Morganti K.M.C., Kossmann T., Ellingswoth L., Mai U.E., Mergenlagen S.E. and Orenstein J.M. 1991. "Macrophage and astrocyte-derived transforming growth factor β as mediators of central nervous system dysfunction in acquired immunodeficiency syndrome". *J. Exp. Med*. 173; 981-991.
- Wen L.T., Caldwell C.C. and Knowles A.F. 2003. "Poly(ADP-ribose) polymerase activation and changes in Bax protein expression associated with extracellular ATP-mediated apoptosis in human embryonic kidney 293-P2X7 cells". *Mol Pharmacol*. 63(3):706-13.
- Westlud K.N., Denny R.M., Kochersperger L.M., Rose R.M. and Abell C.W. 1985. "Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain". *Science*. 230: 181-183.
- Wieraszko A. and Ehrlich Y.H. 1994. "On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus". *Journal of neurochemistry*. 63(5): 17320-1738.
- Wieraszko A. 1996. "Extracellular ATP as a neurotransmitter: its role in synaptic plasticity in the hippocampus". *Acta Neurobiol Exp*. 56(2): 637-648.
- Winningham-Major F., Staecker J.L., Barger S.W., Coart S. and Van Eldik L.J. 1989 "Neurite extension



and neural survival activities of recombinant S100b proteins that differ in the content and position of cysteine residues". *J. Cell Biol.* 109: 3063-3971.

- Wu P.H. and Phillis J.W. 1978. "Distribution and release of adenosine triphosphate in rat brain" *Neurochemical research.* 3: 563-571.
- Zafra F., Hengerer B., Leibrock J., Thoenen H. and Lindholm D. 1990. "Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated nonNMDA glutamate receptors". *EMBO J.* 9: 3545-3550.
- Zanassi P., Paolillo M., Montecucco A., Avvedimento E.V. and Schinelli S. 1999. "Pharmacological and molecular evidence for dopamine D(1) receptor expression by striatal astrocytes in culture". *J Neurosci Res.* 58(4):544-52.
- Zhang Y. X., Yamashita H., Ohshita T., Sawamoto N. and Nakamura S. 1995. "ATP increases extracellular dopamine level through stimulation of P2Y purinoceptors in the rat striatum" *Brain Res.* 691: (1-2) 205-212.
- Ziganshin A. U., Ziganshina L.E. and Burnstock G. 2002. "P2 receptors: Theoretical background for use in clinical practice". *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 134 (4):313-317.
- Zigmond M.J., Bloom F.E., Ladis S.C., Roberts J.L. and Squire, L. R. "Fundamental neuroscience". Academic Press, U.S.A.
- Zimmermann H. 1994. "Signalling via ATP in the nervous system" *TINS* 17: (10) 420-426.
- Zimmermann H. 1996. "Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system". *Prog. Neurobiol.* 49 (6): 589- 618.
- Zinchuk V.S., Okada T. and Kobayashi T. 1999. "Detection of ecto-ATPase activity in synaptic plasma membranes for studying extracellular ATP-induced signal transduction". *Brain Res Protoc.* 4(3) : 258-265.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN