

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE
KAINATO EN UN OLIGODENDROCITOMA HUMANO**

NIEVES SALVADOR CABOS

I. CAJAL (CSIC)

1997

MEMORIA PRESENTADA POR EL GRADUADO

NIEVES SALVADOR CABOS

para optar al grado de

DOCTOR EN VETERINARIA

Director de la tesis:

Dr. Juan Lerma Gómez

Ponente: Dra. Magdalena Torres Molino
Depto. Bioquímica y Biología Molecular IV

Madrid, a 29 de Septiembre de 1997



Juan Lerma Gómez, Dr. en Ciencias, Investigador del
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.)

CERTIFICA:

Que Dña. Nieves Salvador Cabos ha
realizado bajo su dirección en el
Instituto de Neurobiología "Santiago
Ramón y Cajal" del Consejo Superior de
Investigaciones Científicas (C.S.I.C.),
los trabajos correspondientes a su
tesis doctoral titulada:
"CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE
KAINATO DE UN OLIGODENDROCITOMA HUMANO"
para alcanzar el grado de doctor, y
queda conforme con su presentación para
que sea juzgada.

Y para que así conste, firma la presente en Madrid, a
29 de Septiembre de mil novecientos noventa y siete.

Fdo: Juan Lerma Gómez

A Manuel y Amelia.

El diablo es ... áquel que te confunde
y no te deja contar tu propia historia.

Tom Spanbauer.

A Juan Lerma, por animarme a comenzar esta aventura hace ya algunos años.

A Diego Ruano por ayudarme a colocar algunas piezas del rompecabezas.

A mi familia, por darme ánimos, vale Eduardo.

A Manuel y a Miguel por el soporte informático

A los aviones por llenar el cielo de puntos y rayas.

A los océanos por alimentar mi capacidad de asombro.

Y como no, a todos los que en un momento u otro me habeis ayudado, sin vosotros esto hubiera sido mucho más difícil.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

FÍSICO-QUÍMICAS

- * Ca^{2+} : ión calcio
- * H^+ : protón
- * K^+ : ión potasio
- * Kd: kilodalton
- * KHz: kilohercios
- * Na^+ : ión sodio
- * mOsm: miliosmoles

FARMACOLÓGICAS

- * ACh: acetil-colina
- * AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isosazolepropiónico
- * EB, Azul de Evans: [(3,3'-dimetil [1,1'-bifenil] 4,4'diil) bis (azo) bis [4-amino-5-hidroxi-1,3-ácido naftalen- disulfónico] sal tetrasódica.
- * CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
- * ConA: concanavalina A
- * CTZ: ciclotiazida
- * D-APV: D-2-amino-5-fosfonopentanoato
- * Do: domoato
- * EGTA: ácido etilenglicol- bis- (b-aminoetiléter)- N,N,N',N'-tetraacético
- * GABA: ácido gamma-amino-butírico
- * Gly: glicina
- * GYKI 52466: 4,5,4,- 1- (4-aminofenil)- 4-metil- 7,8-metilen- dioxi- 5h-2,3-benzodiazepina.
- * GYKI 53655: 1- (4-aminofenil)- 3-metilcarbamil- 4-metil- 7,8-metilen- dioxi- 3,4-dihidro- 5h-2,3-benzodiazepina.
- * HEPES: N-[2-hidroxi-etil] piperacina-N'-[2-ácido etanosulfónico]
- * NMDA: N-metil-D-aspartato
- * KA: kainato

- * QUIS: quiscualato
- * 5HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina

FISIOLÓGICAS

- * I_A : corriente tipo A
- * $I_{K(Ca)}$: corriente de potasio calcio dependiente
- * I_K : rectificador retardado
- * I_{KIR} : corriente de potasio rectificador de entrada
- * I-V: relación corriente-voltaje
- * LTD: depresión a largo plazo
- * LTP: potenciación a largo plazo
- * GluRs: receptores glutamatérgicos
- * iGluRs: receptores de glutamato ionotrópicos
- * mGluRs: receptores metabotrópicos
- * SNC: sistema nervioso central

MOLECULARES

- * A: nucleótido adenosina
- * AC: adenil-ciclase
- * cAMP: adenosin monofosfato cíclico
- * cGMP: guanosin monofosfato cíclico
- * DNA: ácido desoxirribonucleico
- * I: inosina
- * IP_3 : inositol trifosfato
- * M1-M4: segmentos membranales 1 - 4
- * mRNA: ácido ribonucleico mensajero
- * N: asparragina
- * PCR: reacción de polimerasa en cadena
- * PLC: fosfolipasa C
- * Q: glutamina
- * RNA: ácido ribonucleico

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
Receptores glutamatérgicos en las células gliales	10
Excitotoxicidad	13
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1.- Cultivos celulares	17
1.1.- Cultivo de la línea celular R 110	17
1.2.- Subclonaje de la línea R 110 por dilución infinita	18
1.3.- Cultivo primario de neuronas de hipocampo	19
1.4.- Cultivo primario de astrocitos	19
2.- Técnicas electrofisiológicas	20
2.1.- Soluciones de registro	23
2.1.1.- Soluciones extracelulares	23
2.1.2.- Soluciones intracelulares	24
3.- Ensayos de excitotoxicidad celular	24
3.1.- Valoración de la mortalidad celular	25
3.1.1.- Exclusión de azul tripano	25
3.1.2.- Ioduro de propidio y acetato de fluoresceína	25
3.1.3.- Hoechst 33342	26
RESULTADOS	27
Subclonaje de la línea R 110	29
Propiedades de los receptores de kainato en la línea R 110	30
Subunidades del receptor de kainato en la línea R 110	42
Propiedades farmacológicas del receptor de kainato	47
Propiedades de las corrientes dependientes de voltaje en la línea R 110	58
Implicación de los receptores de kainato en fenómenos de muerte celular	61
Muerte celular en la línea R 110	62
Mortalidad celular en cultivos primarios de astrocitos tipo II	64
Mortalidad celular en cultivos primarios de neuronas de hipocampo	66
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES	83
ANEXO	84
REFERENCIAS	90

RESUMEN

RESUMEN

La línea R 110 fue obtenida a partir de un tumor celular de corteza cerebral humana. Su origen oligodendrocítico ha sido demostrado por su inmunopositividad a proteína básica de mielina (MBP) y vimentina (Matute y cols, 1992). Tal origen esta de acuerdo con la presencia de corrientes de potasio del tipo de rectificador de entrada (I_{KIR}) y de rectificador retardado (I_K), y no expresar corrientes de sodio dependientes de voltaje (I_{Na}).

Mediante técnicas electrofisiológicas se demostró la expresión de receptores funcionales de glutámico del tipo kainato. Dada la variabilidad en la amplitud de las respuestas registradas y la heterogeneidad poblacional se realizó un subclonaje por dilución infinita con el fin de seleccionar aquellas células que expresaban este tipo de receptores.

Estas células presentaron respuestas rápidamente desensibilizantes ante la aplicación de glutamato, kainato y quisqualato y parcialmente desensibilizantes ante domoato. No se observaron respuestas a otros agonistas glutamatérgicos (AMPA y NMDA), ni a otros agentes neurotransmisores (Gly, GABA y Ach).

El receptor de glutámico expresado por la línea celular R 110 fue activado por glutamato y kainato de forma dosis dependiente con EC_{50} de 335 μ M y 15 μ M, respectivamente. En presencia de agonista, el receptor sufrió una rápida y completa desensibilización siguiendo un curso temporal monoexponencial ($\tau_d \cong 20$ ms). La recuperación desde el estado desensibilizado de la respuesta de este receptor siguió igualmente un curso monoexponencial cuya velocidad varió según el agonista utilizado ($\tau_{rec} = 3.6$ s y $\tau_{rec} = 13.7$ s para glutamato y kainato, respectivamente).

Las respuestas a kainato presentaron una relación corriente-voltaje (I/V) con una marcada rectificación de entrada. En algunos casos se observó una curva I/V con doble rectificación.

Aunque AMPA fue incapaz de generar respuestas por sí sólo, actuó como un antagonista poco potente al coaplicarlo con kainato. Los antagonistas de receptor de AMPA, CNQX y GYKI 52466 inhibieron las respuestas de kainato aunque con poca potencia (IC_{50} de 38.5 μ M y 281 μ M para CNQX y GYKI 52466, respectivamente). Ciclotiazida (CTZ), un modulador alostérico de los receptores de AMPA, no modificó las respuestas a kainato. Por el contrario, Concanavalina A (ConA) redujo la desensibilización del receptor potenciando la respuesta al pico aproximadamente un 70%. El colorante Azul de Evans (EB) presentó un efecto diferente según se perfundieran altas o bajas concentraciones de kainato. En presencia de concentraciones saturantes de kainato, este colorante siempre bloqueó las respuestas. Sin embargo, concentraciones menores de kainato causaron potenciación o inhibición de la respuesta según la concentración de EB perfundida. Independientemente del efecto causado en la célula, este compuesto siempre disminuyó el grado de desensibilización del receptor de kainato.

En muestras de la línea R 110 y mediante la técnica de RT-PCR, únicamente se pudo amplificar la subunidad GluR6. Las subunidades del receptor de kainato GluR5, GluR7, KA1 y KA2, así como las subunidades GluR1-4 del receptor de AMPA no fueron detectadas. Sin embargo, estas subunidades si pudieron amplificarse al utilizar muestras de cerebro de rata. El estudio molecular indicó que el grado de edición del RNA de la subunidad GluR6 fue múltiple, observándose que el dominio M2 únicamente existe en su forma no editada (GluR6(Q)), mientras que ambas posibilidades (formas editadas y no editadas) son posibles en el dominio M1.

Los estudios de permeabilidad a calcio indicaron escasa pero no nula permeabilidad de los receptores de kainato expresados en esta línea celular a este ión.

Aunque el papel de estos receptores es oscuro, en la línea R 110 se observó mortalidad celular tiempo dependiente asociada a la exposición al agonista. El aumento del tiempo de exposición al agonista produjo un incremento del porcentaje de mortalidad celular. Estos resultados implicarían al receptor de kainato en fenómenos excitotóxicos,

anteriormente ligados exclusivamente a la activación de otros receptores ionotrópicos de glutámico.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados, la mayoría de las sinapsis excitadoras utilizan ácido glutámico como neurotransmisor. Mediante la activación de sus receptores el ácido glutámico no sólo media la transmisión sináptica rápida, sino que también participa en la maduración de las conexiones sinápticas y en el crecimiento y la estructuración celular, actuando en este punto como un auténtico factor trófico. Además, puede conllevar la generación de fenómenos plásticos de larga duración, como ocurre con la variación por el uso de la eficacia sináptica (LTP, LTD), así como degeneración y muerte celular en procesos neurológicos agudos o crónicos, cuando su concentración se encuentra anormalmente elevada en el líquido extracelular, aunque sea durante un breve espacio de tiempo.

Los receptores de glutámico se han dividido en dos grandes superfamilias: los receptores metabotrópicos y los receptores ionotrópicos. Al activarse, los receptores metabotrópicos (mGluRs) regulan la síntesis de segundos mensajeros intracelulares, como IP₃, cAMP o cGMP (para revisión ver: Pin y Duvoisin, 1995). Esta superfamilia está formada por ocho genes diferentes (mGluR1-8), cada uno de ellos pueden generar distintos mRNA por ajustamiento alternativo (Nakanishi, 1992). En base al nivel de conservación de su secuencia aminoacídica, se han subdividido en tres grupos (Nakanishi, 1992), soportados por sus respectivos mecanismos de transducción (adenil-ciclase (AC), fosfolipasa C (PLC)) (Hayashi y cols, 1992), que coinciden con los propuestos farmacológicamente en base a su diferente afinidad por análogos del ácido glutámico.

Por el contrario, los receptores ionotrópicos (iGluRs) se caracterizan por formar un canal catiónico, con diferente selectividad iónica según el tipo de receptor, que permite la permeación de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ (Nakanishi, 1992; Hollmann y Heinemann, 1994). Estos receptores en base a sus distintas propiedades farmacológicas y biofísicas se han subdividido en tres subtipos: receptores de NMDA, receptores de AMPA y receptores de kainato.

Clásicamente se ha incluido bajo el nombre de receptores no-NMDA a los receptores AMPA y kainato, al no disponer de agonistas y/o antagonistas selectivos que permitieran su diferenciación. Con anterioridad al clonaje de las primeras subunidades del receptor de kainato, la noción de que estos receptores pudieran ser diferentes estuvo basada en experimentos de unión de radioligandos, que indicaban la presencia de sitios de unión de alta afinidad para [³H]kainato con una distribución diferente a la encontrada por [³H]AMPA en cerebro de rata, así como al diferente patrón de respuesta observado electrofisiológicamente.

Sin embargo, mediante técnicas de biología molecular se han identificado al menos 9 subunidades relacionadas, que se agrupan en dos familias: GluR1-4 (GluRA-D) denominadas según el laboratorio que las clonó (Boulter y cols, 1990 y Keinänen y cols, 1990, respectivamente) forman la familia de los receptores de AMPA y GluR5-7 junto con KA1 y KA2, la familia de los receptores de kainato. En rata y ratón existen 2 subunidades huérfanas δ -1 y δ -2, que no generan sitios de unión ni forman canal iónico (Lomeli y cols, 1993). La complejidad molecular de los receptores de glutamato se ve incrementada por la existencia de diferentes isoformas generadas por ajustamiento alternativo del RNA, así como por la edición del pre-mRNA (Hollmann y Heinemann, 1994).

Las subunidades de una misma familia mantienen entre sí un grado de identidad en su secuencia aminoacídica mayor que entre las subunidades de familias diferentes. Así, los receptores de AMPA presentan un 30-36% respecto a los receptores de kainato y las subunidades GluR5-7 un 44% respecto a las subunidades KA1 y KA2 (Mishina y cols, 1993; Sommer y Seeburg, 1992; Nakanishi, 1992; Hollmann y Heinemann, 1994).

Dentro de cada familia, las subunidades pueden formar canales homo o heteroligoméricos, que presentan diferentes propiedades funcionales dependiendo de las subunidades implicadas en la formación del canal (Hollmann y Heinemann, 1994; Bettler y Mulle, 1995). Por ejemplo, la presencia de la subunidad GluRB editada suprime la permeabilidad a calcio del receptor de AMPA formado (Hume y cols, 1991).

Experimentos de inmunoprecipitación, utilizando anticuerpos específicos, y electrofisiológicos en sistemas de expresión heteróloga con drogas que afectan a las

propiedades de desensibilización de los receptores (Patneau y Mayer, 1991; Raman y Trussell, 1992; Huettner, 1990; Wong y Mayer, 1993; Partin y cols, 1993; Patneau y cols, 1993; Yamada y Tang, 1993), han sugerido que las subunidades de AMPA y kainato no forman canales mixtos, sino receptores independientes, que pueden ser activados por los mismos agonistas y expresarse en las mismas células (Craig y cols, 1993; Lerma y cols, 1993; Patneau y cols, 1994; Puchalski y cols, 1994).

Las distintas subunidades de los receptores de glutámico están formadas por cadenas polipeptídicas glicosiladas compuestas por unos 900-1300 aminoácidos con un peso molecular aproximado de unos 100 KDa. Se supone que los receptores están formados por cinco subunidades, es decir, presentan una estructura pentamérica (Ferrer-Montiel y Montal, 1996). A diferencia de los mGluRs, el análisis de hidrofobicidad detecta en todas las subunidades la presencia de cuatro segmentos hidrofóbicos (M1-M4), que predicen otros tantos segmentos transmembrana (Keinänen y cols, 1990). Sin embargo este modelo inicialmente propuesto, basado en el ampliamente conocido del receptor nicotínico (Unwin, 1993), ha sido abandonado al ponerse en evidencia que el segmento M2 no cruza totalmente la membrana (ver más adelante). Por consiguiente, las subunidades de los receptores ionotrópicos de glutámico presentan una estructura común con tres dominios transmembrana (M1, M3 y M4), y uno cismembrana (M2) en forma de horquilla, con el extremo amino-terminal extracelular y el carboxi-terminal intracelular (Hollmann y cols, 1994; Bennett y Dingledine, 1995).

La localización extracelular del segmento que une M3 y M4 ha sido confirmada por distintos resultados experimentales como la fosforilación observada en lugares previos al segmento M3 (Raymond y cols, 1993; Wang y cols, 1993), la glicosilación de la subunidad GluR6 nativa entre los segmentos M3 y M4 (Roche y cols, 1994; Taverna y cols, 1994) o la acción a este nivel de moduladores extracelulares como espermina o H^+ (Sullivan y cols, 1994). Esta localización implica una disposición intracelular del dominio carboxi-terminal, coherente con los resultados experimentales obtenidos en estudios de fosforilación del dominio carboxi-terminal en receptores recombinantes de glutámico (Tingley y cols, 1993) y con la conservación del patrón de glicosilación tras la delección del segmento M2, que

demuestra la disposición cismembrana de este segmento (Wo y Oswald, 1994), y ratifica el modelo con tres dominios transmembrana.

Numerosos datos indican que los aminoácidos del segmento M2 están implicados en la formación del poro iónico y determinan la selectividad iónica y la relación corriente-voltaje de los distintos receptores glutamatérgicos. En los receptores de AMPA, estos parámetros están regulados por el residuo localizado en la posición 586 de la subunidad GluRB, denominado sitio Q/R. En una posición homóloga existe en el receptor NMDA una asparragina (N), que controla su permeabilidad a Ca^{2+} . Mediante experimentos de mutagénesis dirigida se ha demostrado que la sustitución de estos aminoácidos produce un cambio de las propiedades del canal (Hume y cols, 1991; Burnashev y cols, 1992a). En los receptores no-NMDA la presencia de uno u otro aminoácido se debe a un proceso de edición del RNA. El fenómeno de edición provoca el cambio de un nucleótido en la secuencia del RNA, lo que origina variantes moleculares de la misma subunidad. En este caso, por desaminación de la adenosina (A) se genera una inosina (I) (Egebjerg y Heinemann, 1993; Egebjerg y cols, 1994). Este hecho determina la presencia en el mRNA del codón CIG que codifica para arginina (R) en la versión editada en el sitio Q/R (posición 586 para GluRB y 621 para GluR6) del dominio cismembrana M2, en lugar del codón CAG que codifica para glutamina (Q) en la versión no editada. Parte del segmento previo a M1 y posterior a M3 se postulan como sitios de unión para el ácido glutámico (O' Hara y cols, 1993; Stern-Bach y cols, 1994). Mutaciones próximas a los dominios propuestos confirman esta idea (Uchino y cols, 1992).

Los receptores de AMPA median la mayoría de la transmisión sináptica rápida excitadora en el sistema nervioso central de vertebrados. Cuando son activados por glutamato o AMPA muestran corrientes rápidamente desensibilizantes, mientras que la aplicación de otros agonistas, como kainato o domoato, produce respuestas no desensibilizantes. Clásicamente se les ha adscrito una baja permeabilidad a iones divalentes.

La identidad entre la secuencia de las subunidades del receptor de AMPA es de aproximadamente un 70%. Cada subunidad puede presentar dos variantes moleculares denominadas FLIP y FLOP, en una región de 38 aminoácidos localizada previamente al

segmento M4 (Sommer y cols, 1990). Estas isoformas otorgan al receptor propiedades farmacológicas y cinéticas diferentes (Sommer y cols, 1990). La versión FLIP de todas las subunidades se expresa predominantemente antes del nacimiento y permanece invariable a lo largo del desarrollo, mientras que las formas FLOP aumentan a partir del día 8 postnatal. Ello sugiere que esta isoforma pueda corresponder al receptor adulto (Monyer y cols, 1991). Las versiones FLIP exhiben menor grado de desensibilización (Sommer y cols, 1990; Partin y cols, 1993) y son más sensibles a moduladores como la ciclotiazida (Partin y cols, 1994).

El incremento de subunidades GluRB(R) respecto GluRA y GluRC durante el desarrollo postnatal plantea la posibilidad de que el número de receptores de AMPA permeables a calcio disminuya en función de la edad (Durand y Zukin, 1993). La existencia de un alto porcentaje de heterooligómeros que contienen la subunidad GluRB(R) es una posible explicación de la baja permeabilidad a calcio encontrada en los receptores de AMPA en cerebro adulto. Sin embargo, se han descrito ciertos tipos neuronales que expresan receptores de AMPA permeables a iones de calcio (Iino y cols, 1990; Burnashev y cols, 1992b; Lerma y cols, 1994). Estas células podrían regular la producción de la subunidad GluRB(R) y, por tanto, controlar la cantidad de calcio que puede entrar al interior celular a través de estos receptores (Jonas y cols, 1994).

Las subunidades del receptor de kainato GluR5-7 presentan un 70% de identidad en su secuencia, mientras que las subunidades KA1 y KA2 alcanzan un grado de identidad mayor (80-90%). Existen variantes estructurales de estas subunidades generadas por edición del mRNA en el sitio Q/R del segmento M2, presente en las subunidades GluR5 y GluR6 (Sommer y cols, 1991; Köhler y cols, 1993). En la subunidad GluR6 además se encuentran otros dos sitios más, susceptibles de ser alterados por edición. El sitio isoleucina-valina (I/V) y tirosina-cisteína (Y/C), localizados en el segmento M1 (Köhler y cols, 1993) relacionados con la permeabilidad a calcio (Burnashev, 1996; Egebjerg y Heinemann, 1993; Köhler y cols, 1993). El porcentaje de mRNAs editados aumenta durante el desarrollo, encontrándose aproximadamente un 35% y un 75% de subunidades GluR5 y GluR6 editadas en el adulto (Bernard y Khrestchatisky, 1994; Sommer y cols, 1992).

Los receptores homooligoméricos compuestos por las subunidades GluR5 y GluR6 forman canales funcionales. Las subunidades KA1 y KA2 pueden coensamblarse con las

subunidades anteriores formando canales heterooligoméricos funcionalmente diferentes. Recientemente, se ha demostrado que la subunidad GluR7 no forma canales funcionales en sistemas de expresión, así como puede asociarse con otras subunidades produciendo cambios funcionales (Schiffer y cols, 1997). Los receptores homoméricos GluR6 dan lugar a respuestas totalmente desensibilizantes cuando son activados por glutamato, kainato o quisqualato, y parcialmente desensibilizantes frente a domoato. Por el contrario, son totalmente insensibles a AMPA (Sommer y cols, 1992; Egebjerg y cols, 1991). Los receptores homoméricos formados por subunidades GluR5 muestran una respuesta a kainato parcialmente desensibilizante y presentan cierta sensibilidad a AMPA ($EC_{50} = 3 \text{ mM}$) (Bettler y cols, 1990; Huettner, 1990). Los heteroméricos GluR5-KA2 se desensibilizan más rápidamente que los receptores GluR5 homoméricos aún cuando siguen mostrando un componente estacionario. La combinación GluR6-KA2 origina receptores con sensibilidad a AMPA, que genera respuestas poco desensibilizantes (Herb y cols, 1992).

Se han encontrado receptores funcionales de kainato en neuronas de hipocampo en cultivo (Lerma y cols, 1993; Wilding y Huettner, 1997), en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Huettner, 1990), en neuronas ganglionares del trigémino (Sahara y cols, 1997) y en precursores gliales (Patneau y cols, 1994). Fuera del sistema nervioso también se ha descrito presencia de transcritos para subunidades de receptores de kainato en los islotes pancreáticos (Weaver y cols, 1996). Aunque por el momento se desconoce su función, estos sistemas podrían participar del desarrollo cerebral y tomar parte en algunas funciones neuroendocrinas (Wisden y Seeburg, 1993; Weaver y cols, 1996). Recientemente, sin embargo, se ha demostrado su participación en la modulación de la liberación de ácido gamma-aminobutírico (GABA) principal agente neurotransmisor inhibitor del SNC (Rodríguez-Moreno y cols, 1997).

Los receptores de NMDA se caracterizan por requerir glicina como coagonista para activar el canal (Johnston y Ascher, 1987; Lerma y cols, 1990), ser altamente permeables a calcio (Ascher y Nowak, 1986) y presentar dependencia de voltaje debida a un bloqueo del canal por el magnesio extracelular (Mayer y cols, 1984; Nowak y cols, 1984). Estos receptores son susceptibles de modulación tanto por agentes endógenos como exógenos (Lovinger y cols, 1989; Manzoni y cols, 1992; Lerma, 1992), y su papel en fenómenos

plásticos (Bliss y Collingridge, 1993; Malenka y Nicoll, 1993) y degenerativos (Choi, 1988; Olney, 1990) está bien establecido en la actualidad.

Las cinco subunidades del receptor de NMDA se pueden dividir en dos subfamilias: NMDAR1 y NMDAR2. Según su secuencia aminoacídica, las subunidades de la subfamilia NMDAR2 presentan un 40-50% de identidad entre sí. Al compararlas con las subunidades de la subfamilia NMDAR1 esta relación disminuye hasta el 18% y respecto a otros iGluRs todavía es menor (12-18%) (Mishina y cols, 1993).

La subfamilia NMDAR1 está formada sólo por un gen del que se generan siete isoformas diferentes por procesamiento alternativo de su mRNA. La subfamilia NMDAR2 está formada por cuatro subunidades (NR2A-D), que no presentan isoformas salvo en la subunidad NR2D (Ishii y cols, 1993). Aunque la subfamilia NMDAR1 puede formar canales homoméricos cuando se expresa en oocitos de *Xenopus*, este resultado no se reproduce en líneas celulares ni se ha descrito en el SNC. Existen evidencias de que sólo se pueden formar receptores funcionales cuando éstos incluyen la subunidad NR1 más uno o varios tipos de subunidades NR2. Las propiedades funcionales del receptor varían según qué subunidad NR2 se ensamble (Monyer y cols, 1992).

RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS EN LAS CÉLULAS GLIALES

Mediante criterios morfológicos e inmunocitoquímicos se pueden distinguir distintos tipos de células gliales: macroglía (astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias), microglía, progenitores (células O-2A), y células específicas como la glía de Bergmann (BG), células de Müller o las células de Schwann.

A las células gliales clásicamente se les ha atribuido un papel pasivo, como células de soporte, facilitadoras de nutrientes y factores tróficos, encargadas de mantener el pH extracelular y la homeostasis iónica, no interfiriendo en el circuito neuronal. Actualmente se les atribuye un mayor dinamismo. Así, las células gliales dependiendo del tipo celular, área cerebral y estado de desarrollo pueden expresar virtualmente todos los canales voltaje- y ligando-dependientes encontrados en neuronas (para revisión ver: Barres y cols, 1990; Gallo

y Russell, 1995). La constancia de diferentes canales iónicos encontrados en los distintos tipos celulares gliales sugiere aún una mayor diversidad funcional. Por ejemplo, en oligodendrocitos se puede correlacionar la aparición de la corriente rectificadora de entrada (I_{KTR}) con la maduración de estas células (Barres y cols, 1990).

La diversidad de canales unido a la proximidad anatómica y a las relaciones neurona-glia y glia-glia generan expectativas de que estas células puedan recibir, emitir y/o modular respuestas. En la actualidad, la función mejor demostrada en las células gliales es la regulación de los niveles de potasio extracelular durante la actividad neuronal, mediante dos mecanismos de regulación: el tamponamiento espacial y la acumulación de potasio. Algunos canales de potasio (I_{KTR}) están implicados en este proceso (Barres y cols, 1988; Sontheimer, 1994), y la activación de receptores sensibles a GABA o a glutamato podrían modular el sistema. Las células gliales debido al acoplamiento eléctrico y a la formación de sincitios electrotónicos, mantienen la homeostasis extrayendo el exceso de iones desde la zona activada a las células adyacentes (Nedergaard, 1994). Aunque esto se logra mayoritariamente a través de la red astrocitaria, los oligodendrocitos también participan en esta función, aunque su papel es menos relevante por ser menor su grado de acoplamiento (Ransom y Kettermann, 1990).

La función de los receptores activados por glutamato en las células gliales *in situ* es puramente especulativa. Se han estudiado las propiedades de estos receptores en cultivos primarios de astrocitos (indiferenciados, tipo I y tipo II), oligodendrocitos y precursores (O-2A) (para revisión ver Gallo y Russell, 1995). También se han utilizado líneas celulares primarias, como la línea CG-4 de origen oligodendrocítico (Louis y cols, 1992), que presenta receptores AMPA no editados y receptores kainato editados, y que ha servido como modelo para el estudio de las propiedades funcionales de los oligodendrocitos durante el desarrollo (Patneau y cols, 1994). Igualmente se han estudiado algunas líneas celulares obtenidas de tumores (R 111) que también parecen expresar algunos tipos de receptores glutamatérgicos (Matute y cols, 1992).

La primera evidencia de que los aminoácidos excitadores depolarizan directamente la membrana de las células gliales por activación de los iGluRs y no por activación de sistemas

de transporte electrogénicos fue obtenida en cultivos de astrocitos de cerebro de rata (Bowman y Kimelberg, 1984). Estudios electrofisiológicos posteriores en cultivos de astrocitos tipo II demuestran inequívocamente distintas respuestas ante la aplicación de glutamato u otros agonistas glutamatérgicos, ratificando la existencia de receptores funcionales. La amplitud de las distintas corrientes fue similar a la observada en neuronas (Usovicz y cols, 1989). La sensibilidad a glutamato de las células gliales parece variar según la región cerebral implicada. Así, sólo un 6% de los astrocitos corticales presentan respuesta a AMPA, frente al 24% de los localizados en hipocampo (Glaum y cols, 1990).

La corriente generada en células gliales en cultivo por aplicación de glutamato es debida a la activación de los receptores AMPA y/o kainato, ya que estas células no presentan receptores NMDA funcionales (Usovicz y cols, 1989; Gallo y Russell, 1995). Sin embargo, en la glía de Bergmann se han encontrado niveles significativos de expresión de mRNA de las subunidades NR1 y NR2B del receptor NMDA, aunque este hecho no está asociado a la presencia de canales NMDA funcionales, desconociéndose el significado de dicha expresión (Luque y Richards, 1995).

Mediante técnicas de medición de calcio en cultivos de astrocitos identificados antigénicamente (Cornell-Bell y cols, 1990a; van den Pol y cols, 1992), se demuestra que las depolarizaciones de la membrana producidas por aplicación de distintos agonistas de los receptores de AMPA y kainato se correlacionan con aumentos transitorios de la concentración de calcio intracelular. Este fenómeno así como su transmisión desde la célula excitada a las células adyacentes, puede ser bloqueado por antagonistas selectivos de los receptores no-NMDA (Cornell-Bell y cols, 1990a; Holzwarth y cols, 1994). Se ha demostrado que esta señal se transmite por la red astrocítica a través de uniones comunicantes ("gap junctions") formadas por la conexina 43 (Giaume y cols, 1991).

Igualmente, se ha observado en astrocitos tipo I, pero no en astrocitos tipo II, un aumento en el recambio de fosfatil-inositol (PI) y movilización del calcio intracelular en respuesta a glutamato, hecho que sugiere la existencia de receptores metabotrópicos en este tipo de células (Pearce y cols, 1986; Holzwarth y cols, 1994). La activación de los receptores metabotrópicos gliales se ha propuesto como señal para la diferenciación de astrocitos. A

través de estos mecanismos, el glutamato induce un efecto antiproliferativo en células que se encuentran entre la fase G_0 y G_1 del ciclo mitótico, pero no durante la fase S (Nicoletti y cols, 1990), produciéndose una reorganización de los filamentos de actina y la formación del filopodio (Cornell-Bell y cols, 1990b). Este efecto no se ha detectado por activación de los receptores ionotrópicos (Nicoletti y cols, 1990).

EXCITOTOXICIDAD

La sobreexcitación de los receptores glutamatérgicos produce degeneración y muerte celular (Choi, 1988; Olney, 1989). Este mecanismo se ha postulado como una de las causas subyacentes a los desórdenes neurológicos y enfermedades nerviosas. Excitotoxicidad es el término originariamente utilizado por Olney (1986) para definir la habilidad del ácido glutámico y otros aminoácidos excitadores estructuralmente relacionados con él, para destruir neuronas. Aunque todos los receptores glutamatérgicos (GluRs) pueden estar implicados en el proceso, no participan de igual manera en este fenómeno. Un pulso de 5 minutos de NMDA produce muerte celular dependiente de calcio. Una breve exposición a kainato produce hinchazón celular generalizada pero escasa muerte celular, y la misma aplicación de AMPA no provoca ningún efecto. Sin embargo, cuando la exposición a estos últimos agonistas es de mayor duración, ambos son potentes neurotóxicos. De hecho, un pulso de 24 h de kainato $10 \mu\text{M}$ produce una extensa muerte celular en cultivos de neuronas corticales (Choi y cols, 1988).

La excitotoxicidad en un cultivo de neuronas puede ser separada en dos componentes en base al tiempo y a la dependencia iónica (Choi, 1987). El primer componente se corresponde con un hinchamiento celular minutos después de la exposición debido a la entrada de iones Na^+ y Cl^- que arrastran agua (Olney y cols, 1986; Choi, 1987). Este hinchazón no es necesariamente letal, y puede ser minimizado por otros agentes depolarizantes, como soluciones de alto K^+ o veratridina. La mayoría de las células pueden recobrar su equilibrio y sobrevivir. El segundo componente produce desintegración celular tardía, horas después de la aplicación del agonista. El calcio extracelular es el responsable del proceso y determina la severidad del daño inducido por el agonista (Garthwaite y Garthwaite, 1986; Choi, 1985).

Los cultivos gliales son menos vulnerables a la excitotoxicidad que los cultivos neuronales. La menor sensibilidad se puede explicar por la ausencia de receptores NMDA, la menor densidad de receptores no-NMDA y/o la mejor regulación de los niveles de calcio intracelular. La aplicación de calcio o quisqualato produce gliotoxicidad, mientras que la inyección sistémica de kainato o glutamato sólo produce hinchazón celular. En astrocitos corticales se ha observado turgencia celular tras la aplicación de glutamato, aspartato y quisqualato, pero no tras kainato (Chan y cols, 1990). La importancia del cambio del volumen astrocitario radica en la modificación del volumen del espacio extracelular alrededor de las neuronas, que puede modular la actividad neuronal.

La neurotoxicidad mediada por glutamato ha sido asociada a una elevación anormal en la concentración del calcio intracelular. Esta hipótesis podría explicarse en un modelo de tres estados (Choi, 1990). En el primero (**inducción**), la sobreestimulación de los receptores glutamatérgicos provocaría en neuronas un desarreglo intracelular potencialmente letal por entrada de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- y aumento de IP_3 y diacilglicerol, y en particular, por sobrecarga en la concentración de calcio intracelular. En una segunda fase estos trastornos celulares podrían aumentar su intensidad implicando a otras células adyacentes (**amplificación**), por modificaciones en la relación del calcio intracelular libre y ligado, y/o por la activación de algunas familias enzimáticas como la proteína quinasa C, enzimas reguladoras de calmodulina y fosfolipasas. La activación de mGluRs también pueden participar en el proceso iniciando cascadas de segundos mensajeros. Estos cambios varían la eficacia y la excitabilidad del circuito de una forma duradera. Finalmente, la “**expresión**” de la toxicidad, incluiría aquellos procesos directamente responsables de la desintegración neuronal, es decir, las consecuencias finales de la activación en la fase anterior de las cascadas citotóxicas por enzimas catabólicas. La producción de radicales libres puede ser otra vía importante de expresión por interferir en la homeostasis del calcio, activar alguna de las cadenas anteriormente mencionadas e iniciar algunos procesos destructivos como la peroxidación de lípidos. El aumento de glutamato está retroalimentado por la formación de radicales libres, pudiéndose producir un daño excitotóxico adicional (Pellegrini-Giampietro y cols, 1988; Dawson y cols, 1991).

Así pues, la excitotoxicidad *per se* puede verse como la convergencia de diferentes vías en un proceso común que determina la muerte celular. La muerte celular provocada por excitotoxicidad puede presentar las dos formas de muerte morfológicamente descritas: necrosis y apoptosis. La muerte celular por necrosis ocurre cuando las células sufren un estímulo intenso que modifica sus condiciones fisiológicas normales, y daña su membrana plasmática. Se caracteriza por pérdida de la homeostasis, hinchazón celular y de las organelas intracelulares, desintegración de las organelas, floculación de la cromatina y lisis celular completa sin formación de vesículas. Bioquímicamente, el proceso se realiza sin gasto energético y la fragmentación de la cromatina se produce después de la lisis celular. Este tipo de muerte se ha identificado en la patogenia de enfermedades asociadas con muerte neuronal por hipoxia-isquemia, hipoglicemia, ect.

La apoptosis, por el contrario, está asociada a la renovación fisiológica de células y tejidos. Se produce en células aisladas y puede ser inducida o inhibida mediante la activación de diversos genes (Shi y cols, 1992; Sentman y cols, 1991). Las células presentan una serie de cambios degenerativos que incluyen agregación de la cromatina, condensación celular y nuclear con vacuolización citoplasmática (cuerpos apoptóticos), aunque se mantiene la integridad de sus organelas y de su membrana. *In vivo*, los cuerpos apoptóticos son rápidamente reconocidos y fagocitados por macrófagos o células epiteliales adyacentes, no existiendo una respuesta inflamatoria evidente. *In vitro*, éstos constituyen los últimos fragmentos celulares visibles. Bioquímicamente, el hecho más destacado es la degradación del DNA genómico y los cambios irreversibles que se producen antes de perder la integridad de la membrana celular (fragmentación prelítica del DNA). En algunos sistemas esta fragmentación ha sido observada como resultado de la activación de endonucleasas nucleares dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Estas enzimas se unen selectivamente al DNA entre unidades nucleosomales, generando fragmentos mono y oligonucleosomales de DNA. Estos fragmentos aparecen en un gel de agarosa formando una característica escalera con los peldaños separados por unos 200 pb (Wyllie y cols, 1980), o 50 kb (Walker y cols, 1993). El tipo y la extensión de la fragmentación de DNA puede variar. De hecho, se han observado evidencias morfológicas de apoptosis en diversas situaciones donde no era detectable la degradación internucleosomal del DNA (Walker y cols, 1993).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1.- Establecimiento y mantenimiento de una línea celular que exprese receptores de kainato.
- 2.- Caracterización molecular y funcional de los receptores de kainato en esa línea.
- 3.- Determinación del grado de implicación de los receptores de kainato en procesos de muerte celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- CULTIVOS CELULARES

Tanto el cultivo de las diversas líneas celulares como los cultivos primarios se realizaron en condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo vertical. Los medios y materiales utilizados fueron estériles. Todas las células se crecieron en un incubador humidificado a 37°C y con una atmósfera de 5% de CO₂.

1.1.- CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR R 110

La línea celular R 110 generada por Matute y colaboradores (1992), llegó al laboratorio en un ratón desnudo portador del glioma. Para la obtención de estas células se siguió el método descrito por Hockfield y cols (1993), ligeramente modificado.

Tras el sacrificio de un ratón desnudo portador del glioma se extrajo el tumor en condiciones de esterilidad. El tumor se disgregó mecánicamente y se incubó con tripsina tipo I (100 mg/ml) durante 10 minutos. Una vez lavada la tripsina, el macerado se pasó sucesivamente a través de agujas de calibre decreciente para obtener una suspensión de células aisladas. El resultado se centrifugó (5') a 1.000 rpm. El "pellet" se resuspendió en medio de cultivo, permitiéndose su decantación. El material decantado se sembró en un frasco de cultivo (frasco 1). Este proceso se repitió 3 veces, disminuyéndose la velocidad de centrifugación (800 y 500 rpm, respectivamente). Los dos primeros frascos se mantuvieron hasta que se comprobó que el frasco 3 progresó adecuadamente.

En los diez primeros pases las células de la línea R 110 se mantuvieron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino inactivado (10%), suero de caballo inactivado (6%), glutamina (2mM), penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml). En pases sucesivos se redujo el suero de caballo hasta eliminarlo del medio. En estas condiciones las células se desarrollaron adecuadamente. Tras

30 pases las células siguieron conservando sus características morfológicas.

Las células se levantaron de los frascos de cultivo cuando presentaron un 80% de confluencia. En los primeros pases la adherencia celular fue mayor y se utilizó tripsina para despegarlas. En pases sucesivos se consiguió el mismo resultado utilizando una solución compuesta por PBS y EDTA 5mM. La viabilidad celular se valoró con azul de tripano y fue mayor del 87%. Las células se sembraron en frascos de cultivo, placas Petri 35 mm o placas multipocillos sin tratar según el experimento.

Para su almacenamiento las células de la línea R 110 se congelaron en una solución compuesta por dimetilsulfóxido (DMSO) y suero fetal bovino (1:10), y se mantuvieron a -70°C. Las células se descongelaron en suero fetal bovino, se centrifugaron durante 5 minutos a 900 rpm, y se resuspendieron en el medio de cultivo anteriormente descrito.

1.2.- SUBCLONAJE DE LA LÍNEA R 110 POR DILUCIÓN INFINITA

Para el subclonaje de la línea R 110 se siguió el método descrito por Hockfield y cols (1993), con ligeras modificaciones.

Las células se levantaron del frasco de cultivo, como se indicó en el punto anterior, y se obtuvo la suspensión de células a subclonar. Con la ayuda de un hemocitómetro, se determinó el número de células de la suspensión, diluyéndose una alícuota de estas células en medio de cultivo a una concentración de 100 células/ml y otra de 5 células/ml. Se sembró la mitad de una placa de 96 pocillos (200 µl/pocillo), con cada una de las concentraciones, encontrando en promedio según la dilución, una o cinco células por pocillo. Tres días después, se revisaron los pocillos y se descartaron aquellos que presentaron numerosas colonias, seleccionándose aquellos donde se observaron colonias únicas.

Dos semanas después del subclonaje, las células formaron una monocapa. Los pocillos seleccionados se expandieron tras permitir la confluencia y se congelaron para su almacenaje.

La morfología de los clones aislados fue semejante a la de sus parentales, predominando las células fusiformes sobre las poligonales. Ninguno de los clones obtenidos presentó una única morfología, aunque procedieran de pocillos donde sólo se observara una colonia.

1.3.- CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS DE HIPOCAMPO

Los cultivos de neuronas de hipocampo se prepararon siguiendo el protocolo de Banker y Goslin (1991), con ligeras modificaciones.

Los hipocampos procedentes de cerebros de embriones de ratas Wistar de 17 días se disecaron y lavaron en una solución salina (PBS) con glucosa, incubándose a continuación en PBS con glucosa y tripsina (1.25%) durante 15' a 37°C. Posteriormente fueron disociados mecánicamente pasándolos a través de varias pipetas Pasteur de diámetro decreciente hasta obtener una solución de células aisladas. El volumen se ajustó para una densidad de 300.000 células/pocillo, realizándose la siembra en placas multipocillo previamente tratadas con poly-D-lisina (10 µg/ml) y laminina (4 µg/ml) (ambos de Sigma) (Collins, 1982). En los experimentos en los que se usaron sustancias fluorescentes, las células se sembraron sobre cubreobjetos estériles limpios y tratados con poly-D-lisina y laminina.

Las neuronas se mantuvieron en medio de cultivo Neurobasal suplementado con B-27 (al 4%) (ambos de Gibco) (Brewer y cols, 1993) y con glutamina (2 mM) y antibióticos. La mitad del volumen del medio de cada pocillo se renovó a las 72h.

1.4.- CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS

Se siguió el método descrito por McCarthy y de Vellis (1980), con ligeras modificaciones.

Se extrajeron los cerebros de 2 ó 3 ratas Wistar postnatales de entre 0-2 días. Los cerebros se mantuvieron en una solución de Hank sin calcio ni magnesio pero con glucosa (0.45%) y antibióticos, hasta que se disecaron las cortezas cerebrales. Los bloques de tejido

se disociaron mecánicamente y se pasaron secuencialmente por pipetas Pasteur de diámetros decrecientes. La suspensión celular se centrifugó (5') a 900 rpm. El "pellet" se resuspendió en DMEM suplementado con suero fetal bovino y antibióticos, y la viabilidad celular se estimó con azul de tripano. Las células se sembraron en frascos de cultivo de plástico de 50 ml a 10×10^6 células/frasco. Después de 20 minutos, las células que no se adherieron fueron desechadas por aspiración del medio. Los frascos de cultivo fueron incubados a 37°C en una atmósfera humificada de 5% de CO₂ en aire, por períodos de 10-14 días hasta confluencia. El medio de cultivo se renovó cada semana. Una vez obtenida una monocapa celular, las células se sometieron a agitación en un incubador durante 18 horas, para eliminar todas las células que no fueran astrocitos. Una vez eliminadas las células no adheridas, los astrocitos se resembraron en placas de plástico de 24 pocillos.

2.- TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS

Las corrientes de membrana se midieron con la técnica de fijación de voltaje ("patch clamp") en la configuración de célula completa ("whole cell") (Hamill y cols, 1981), usando un amplificador List L/M EPC-7.

Las pipetas de registro usadas se fabricaron a partir de microcapilares de borosilicato (1.2 mm X 0.68 mm AM SYSTEMS. INC) estiradas en un estirador horizontal siguiendo un programa con múltiples pasos. Una vez estiradas, la punta de éstas se pulió mediante un pulso de calor. La resistencia de las pipetas varió entre 1 y 5 megaohmios, cuando se llenaron con la solución de registro (ver más adelante).

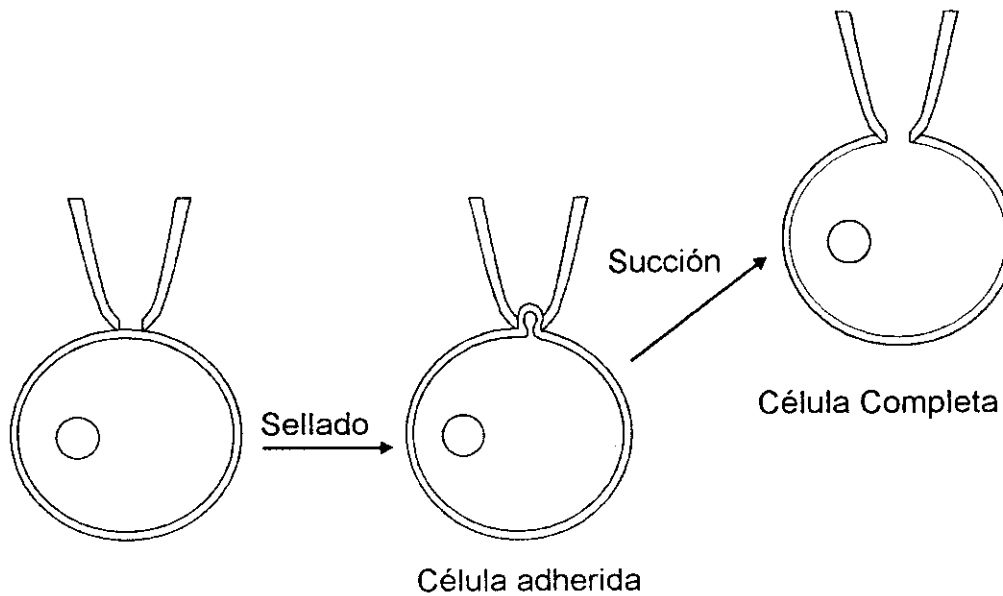


Figura 1. Desarrollo de la técnica de "patch clamp" para conseguir la configuración de célula completa.
 1) Aproximación de la punta de la pipeta a la superficie celular. 2) Formación del gigaseto. 3) Rotura controlada de la membrana celular y acceso al interior celular.

Para activar los receptores y cambiar las soluciones extracelulares, se utilizó un sistema de perfusión rápida construido expresamente en el laboratorio. El sistema de perfusión se compuso con ocho tubos de vidrio alineados (capilares de 10 μl , 41 μm X 278 μm \varnothing externo, modelo P-1924. SIGMA USA) pegados entre sí con una resina epoxi. Cada uno de ellos, mediante un tubo de polietileno (P-60 Clay Adams USA) se conectó a un depósito situado a una determinada altura sobre la preparación. El desplazamiento lateral de los tubos del sistema de perfusión se realizó mediante un motor que estuvo controlado manualmente o por un ordenador personal. La velocidad de intercambio de la solución se midió como la variación del potencial de punta de una micropipeta cuando se pasó de una solución extracelular de NaCl 160 mM a otra diluida 10 veces (ver figura 2).

El sistema de perfusión se situó aproximadamente a 200-300 μm del soma celular, garantizándose una perfusión rápida y homogénea de toda la superficie celular.

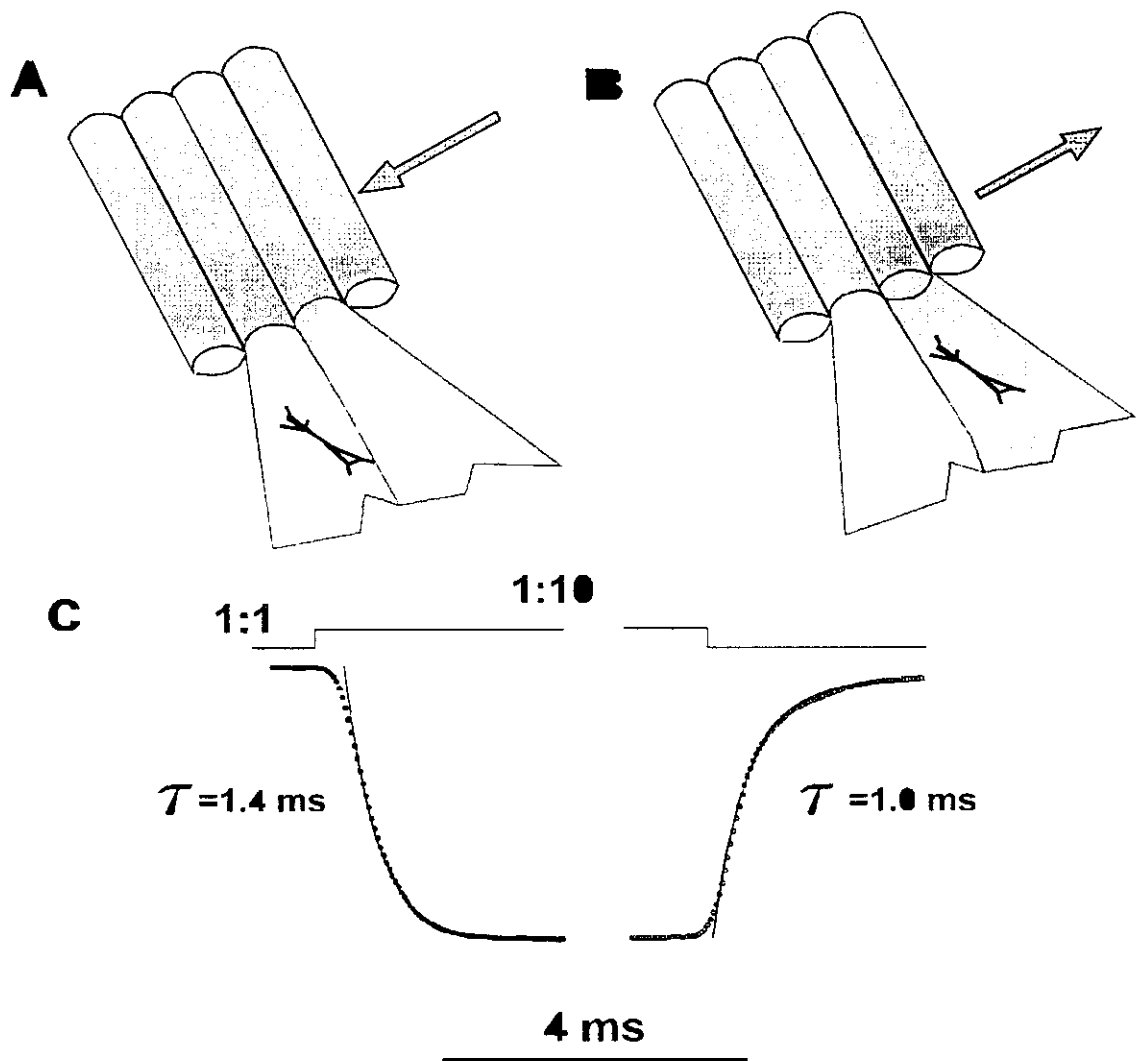


Figura 2. Esquema del sistema de perfusión. A y B) El movimiento de los tubos determina el tipo de la solución extracelular que rodea la célula. El movimiento se efectúa manualmente o mediante un ordenador. C) La velocidad de intercambio medida como el cambio del potencial de punta al sustituir una solución control (160 nM de sodio) por otra diluida diez veces. La variación de la corriente siguió sendas exponenciales con constantes de tiempo (τ) de aproximadamente 1 ms.

Para evitar la acumulación de las soluciones perfundidas, el baño se lavó continuamente manteniéndose constante el volumen en la placa de registro.

Las respuestas obtenidas se filtraron a 1 KHz y se adquirieron en un ordenador personal con una frecuencia de muestreo de 1.2-2.5 KHz usando el programa Clampex (pClamp 5.0.2 Axon Instruments). Los registros se analizaron con el programa Clampfit (pClamp 5.0.2 y 6.0 Axon Instruments). La representación de los datos y los estudios estadísticos se realizaron mediante el programa SigmaPlot versiones 5.0 y 6.0 (Jandel). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-25°C). Los resultados se expresaron como la media de los valores \pm el error standard, indicándose el número de células utilizado en cada caso.

2.1.- SOLUCIONES DE REGISTRO

2.1.1.- SOLUCIONES EXTRACELULARES

Para caracterizar la selectividad iónica del canal activado por ácido glutámico, así como su sensibilidad ante el bloqueo por parte de diversos iones y moléculas orgánicas, se analizaron las corrientes macroscópicas producidas por la activación de los receptores en varias soluciones extracelulares de distinta composición. La solución externa usada como control fue (en mM): 165 NaCl, 2.5 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 glucosa, 10 HEPES, ajustándose el pH con NaOH. En los experimentos donde se valoró la permeabilidad a otros iones, el Na⁺ fue sustituido totalmente por Cs⁺ o por Ca²⁺. En esta última solución para mantener la osmolaridad constante el Na⁺ restante fue sustituido por N-metil-D-glucamina (NMDG).

El pH y la osmolaridad en todas las soluciones se ajustaron a 7.4 y 330 mOsm, respectivamente. La medida de la presión osmótica se realizó con un osmómetro de presión de vapor (Wescor 5500). Antes de su uso todas las soluciones externas se filtraron a través de un filtro de 0.22 μ m (Millipore). En los experimentos donde se utilizaron sustancias disueltas en solventes orgánicos (por ej. DMSO), la concentración final del producto siempre fue menor del 0.1%.

2.1.2.- SOLUCIONES INTRACELULARES

La composición iónica de la solución que se usó para rellenar las pipetas de registro consistió (en mM): 140 Cs(CH₃SO₃), 0.5 CaCl₂, 5 CsCl, 5 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, el pH se ajustó con CsOH. El Cs(CH₃SO₃) fue sustituido por Na(MeSO₃) cuando se valoró la permeabilidad a otros iones y por KCl en los experimentos donde se registraron las corrientes de K⁺ voltaje dependientes.

El pH y la osmolaridad en todas las soluciones intracelulares se ajustaron a 7.3 y 315 mOsm, respectivamente. Las soluciones se filtraron con un filtro de 0.22 µm (Millipore) antes de llenar la pipeta de registro.

3.- ENSAYOS DE EXCITOTOXICIDAD CELULAR

Los ensayos se realizaron en condiciones de esterilidad. Las células se mantuvieron en un incubador de cultivo a 37°C y 5% de CO₂.

Se añadieron concentraciones fijas de las posibles sustancias excitotóxicas con distintos tiempos de exposición. La exposición terminó con la eliminación de la sustancia problema y la adición de medio de cultivo. Los pocillos control sufrieron las mismas manipulaciones que los tratados. Cada tratamiento se realizó simultáneamente en tres o cuatro pocillos dentro de la misma placa. La valoración se hizo analizando 4 campos/por pocillo, normalmente a las 24 h de retirar la sustancia problema.

Todos los ensayos de excitotoxicidad en neuronas se realizaron en cultivos de neuronas hipocámpicas de tres o cuatro días. En cultivos primarios de neuronas y astrocitos, el tiempo de exposición fue de 3 h y la valoración se realizó 24 h después de retirar la sustancia problema.

3.1.- VALORACIÓN DE LA MORTALIDAD CELULAR

Los métodos de valoración que a continuación se describen se realizaron utilizando los protocolos descritos por McGahon y cols (1995), con ligeras modificaciones.

3. 1. 1.- EXCLUSIÓN DE AZUL TRIPANO

El azul tripano es un agente impermeable a la membrana celular intacta, de tal manera que las células que están vivas no incorporan este colorante.

Para valorar la mortalidad celular se retiró el medio de cultivo y se añadió un volumen igual de solución azul tripano (0.1% p/v) en PBS, durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se contaron de tres a cinco campos y un mínimo de 100 células por campo en cada pocillo. Las células azules se contabilizaron como células muertas. La mortalidad celular se calculó en porcentaje para cada campo por separado y se obtuvo el promedio.

3. 1. 2.- IODURO DE PROPIDIO Y ACETATO DE FLUORESCINA

La viabilidad se valoró también con ioduro de propidio y acetato de fluoresceína tras la incubación con ambos fluorescentes. Las células vivas metabolizan el acetato de fluoresceína (Fda) y emiten fluorescencia verde, mientras que el ioduro de propidio (PI) se intercala en los ácidos nucleicos y emite fluorescencia roja, proceso únicamente posible cuando las células pierden la integridad de la membrana. Únicamente las células que emitieron fluorescencia roja se consideraron como células muertas.

Una vez aspirado la mitad del medio de cada uno de los pocillos de la placa, las células se incubaron durante tres minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con 500 μ l de una solución compuesta por Fda (0.192 mg) y PI (0.6 mg) en 10 ml de PBS. Las muestras se contabilizaron inmediatamente después de realizar la tinción, dado que la unión del PI al DNA es reversible. El porcentaje de mortalidad celular se calculó como en el punto anterior.

3. 1. 3.- HOECHST 33342

Igualmente se ensayó la viabilidad celular con el Hoechst 33342, un derivado del benzimidazol, que emite una fluorescencia azul cuando es excitado por luz ultravioleta. Este compuesto no es un intercalante de DNA, pero se une al DNA específicamente preferentemente a regiones ricas en bases adenina-timidina (A-T), marcando fuertemente los núcleos celulares de las células alteradas.

Una vez retirado el medio de cultivo, la placa se incubó durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con una solución Hoechst 33342 en PBS con una concentración final de 1 mg/ml. Tras retirar la solución y añadir PBS se valoró la muerte celular en función de la morfología celular y nuclear, y la intensidad de la fluorescencia. Las células viables mostraron una morfología normal y una fluorescencia azul baja y homogénea, mientras que las células muertas exhibían una morfología alterada y una fluorescencia azul intensa. De esta manera, los núcleos picnóticos y apoptóticos fueron fácilmente identificables.

RESULTADOS

RESULTADOS

De las líneas estudiadas, la línea R 110 fue la única que presentó respuestas electrofisiológicas tras la aplicación de glutamato y kainato. La línea celular de origen neural NCB-20, y las líneas celulares de origen glial U-138 y U-373, fueron insensibles a la perfusión de glutamato (1 mM) (datos no ilustrados), AMPA (500 μ M) y kainato (300 μ M), agonistas de los diversos receptores glutamatérgicos (figura 3). Sin embargo, la línea NCB-20 fue sensible a la aplicación de serotonina (5-HT 3 μ M) (ver figura 3).

La línea R 110 es un glioblastoma multiforme primitivo de origen oligodendrocítico, como indica su inmunopositividad para proteína básica de mielina (MBP) y vimentina (Matute y cols, 1992). En un primer estadio la línea R 110 se creció en MEM suplementado y se mantuvo mediante pases por ratón desnudo. Posteriormente, esta línea se creció *in vitro* en medio de cultivo más enriquecido y fue almacenada en alícuotas congeladas a -70°C (ver materiales y métodos 1.2).

Tras 30 pases, la línea presentó las mismas características. La morfología celular se conservó a pesar de las manipulaciones, encontrando el mismo porcentaje de células poligonales y fusiformes (un 20-30% y un 70-80%, respectivamente) que el descrito previamente por Matute y colaboradores (1992). La viabilidad celular fue superior al 87% tanto en células recién descongeladas como en pases sucesivos. Un 59% de estas células no presentaron respuestas ante la aplicación de kainato y glutamato, mientras que el 41% restante mostró respuestas de diferente amplitud comprendidas entre 10 y 100 pA (ver tabla 1).

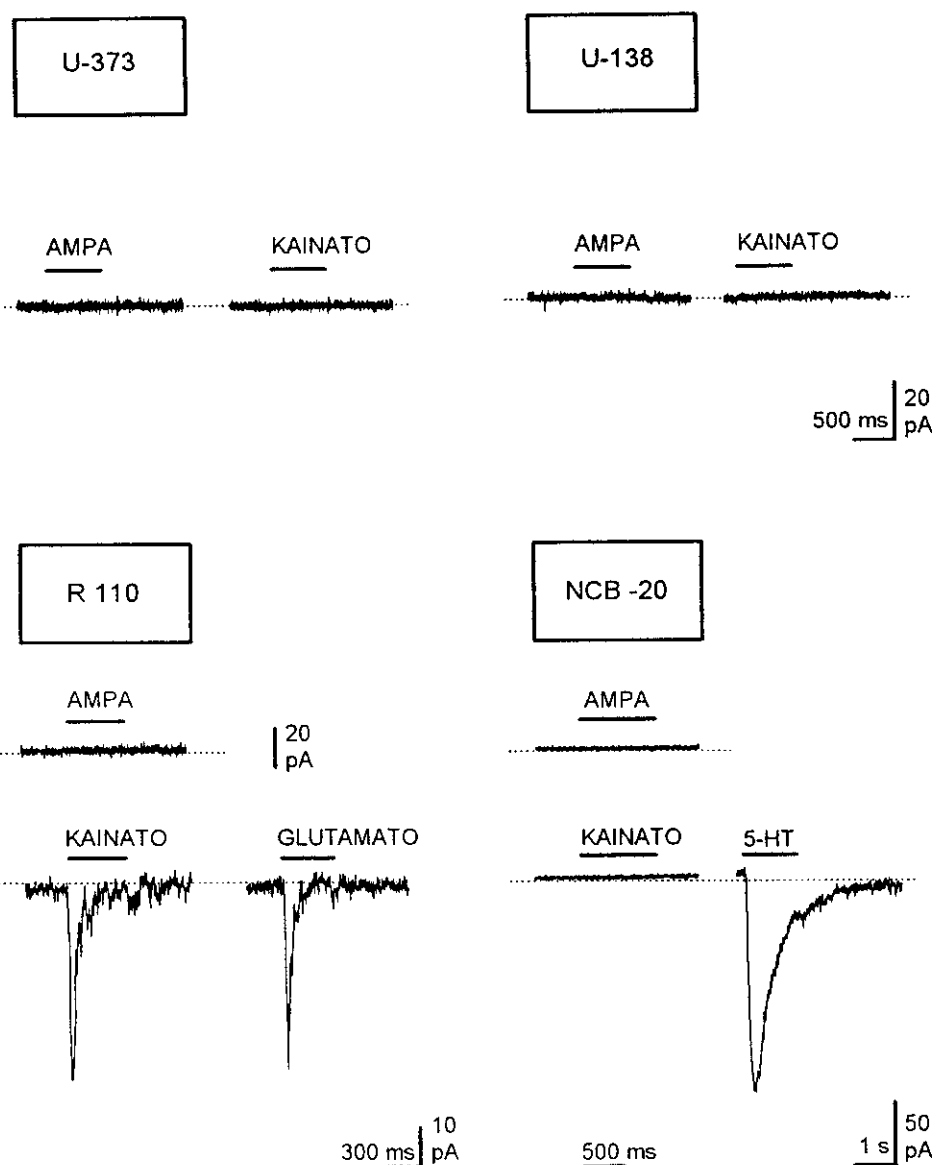


Figura 3. Efecto de diversos agonistas de receptores glutamatérgicos en líneas celulares de origen nervioso. La línea R 110 fue la única en la que se observó activación de corrientes de membrana tras la aplicación de agonistas glutamatérgicos (AMPA 500 μ M, KA 300 μ M y Glu 1 mM). La línea NCB-20 presentó respuestas ante la aplicación de serotonina (5-HT 3 μ M). Todos los registros se realizaron a un potencial de membrana de -70 mV.

SUBCLONAJE DE LA LÍNEA R 110

Con el fin de incrementar el porcentaje de células con respuesta, se realizó un subclonaje por dilución infinita. Para ello y siguiendo los pasos descritos en materiales y métodos 1.3, se aislaron 18 clones, de los que se estudiaron 9 tras su crecimiento. La morfología celular de éstos fue semejante a los parentales, predominando las células de tipo fusiforme sobre las planas poligonales. Curiosamente, ninguno de los clones obtenidos presentó una única morfología celular, aunque procedieran de pocillos donde sólo se detectó una colonia.

En los clones obtenidos se determinó electrofisiológicamente la presencia de respuestas a kainato, cuantificándose en 486 células el porcentaje de células con respuesta y la amplitud de las mismas, tanto en los parentales como en los clones obtenidos (tabla 1).

n	SUBCLÓN	0 pA	<10-20 pA	21-40 pA	41-60 pA	61-80 pA	81-100 pA
185	Parental	59.5	23.2	8.6	4.4	2.7	1.6
10	E10	100					
7	B4	71.4	28.6				
10	D5	70	30				
9	G5	66.7	33.3				
10	D8	20	70	10			
34	F5	14.7	58.9	20.6		5.9	
42	D4	40.5	26.1	14.3	14.3	4.8	
64	E7	31.2	17.2	18.8	20.3	7.8	4.6
115	F8	16.5	14.8	14.8	36.5	13	4.4

Tabla 1. Subclonaje de la línea R 110. Porcentaje de células comprendidas en cada rango de amplitud de respuesta a un pulso de kainato 300 mM tras el subclonaje de la línea R 110; n indica el número de células registradas en cada caso.

En varios clones (D4, E7, F5 y F8) se encontró mayor porcentaje de células con respuesta que en los parentales (40.5% de células con respuesta y 8.7% con respuestas mayores de 50 pA). Uno de ellos (F8) presentó un 83.5% de células con respuesta y un

53.9% con amplitudes mayores de 50 pA. Sin embargo, en otro (E10) no se identificaron células con respuesta (ver tabla 1).

Tras esta primera valoración se decidió realizar el resto de los ensayos funcionales utilizando preferentemente los clones E7 y F8.

PROPIEDADES DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA LÍNEA R 110

Los receptores de kainato se desensibilizan rápidamente. El proceso de desensibilización de las respuestas sigue un proceso monoexponencial que puede verse limitado por las condiciones de registro. Las células de la línea R 110 presentaron una morfología celular plana que dificultaba una vez establecida la configuración de célula completa, la difusión de las sustancias problema cuando la célula estaba pegada y/o acoplada a otra en la placa de registro. En la figura 4 se muestra cómo las condiciones de perfusión y de fijación de voltaje mejoraron cuando la célula se despegó de la placa de registro (ver figura 4). En estas condiciones, se observó en todos los casos una constante de desensibilización más rápida al ajustar una exponencial al proceso de desensibilización de las respuestas (ver figura 4). Así mismo, se observó un aumento en la amplitud de las respuestas cuando la célula se encontraba aislada, que podría justificarse por la activación rápida de un mayor número de receptores. Cuando la célula se encontraba junto a otras células, se observó una disminución en la amplitud al despegarla, que podría reflejar la respuesta individual de esta célula frente a una "respuesta grupal". Ello sugiere que estas células podrían estar acopladas eléctricamente, como se ha descrito en astrocitos y oligodendrocitos adultos (Nedergaard, 1994; Ransom y Kettermann, 1990) (ver figura 4).

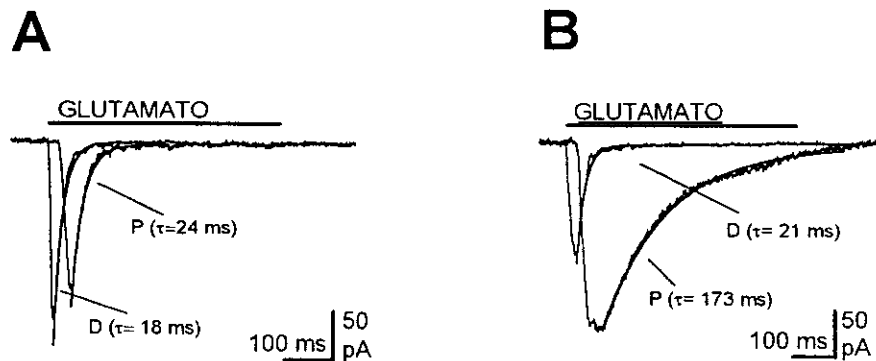


Figura 4. La cinética y la amplitud de las corrientes activadas por glutamato (5 mM) en células de la línea R 110 varían tras ser despegadas de la placa de cultivo. A) Célula aislada. B) Célula situada en un agregado de 4 células. La amplitud de la respuesta siempre aumentó cuando se despegó una célula aislada de la placa de cultivo, mientras que disminuyó cuando ésta procedía de un agregado de células. Obsérvese cómo el proceso de desensibilización, que sigue un curso exponencial (línea gruesa) aumenta su velocidad tras despegar la célula de la placa (D). Las respuestas se obtuvieron a un potencial de membrana de -70 mV.

En las células R 110 la aplicación de glutamato activó de forma dosis dependiente una corriente entrante inactivante. Kainato (KA) y quisqualato (QUIS) produjeron respuestas semejantes.

Otros agonistas glutamatérgicos como el ácido N-metil-D-aspartato (NMDA, 200 μ M en presencia de Gly 20 μ M; n = 11) y el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (S-AMPA, 1 mM; n = 8), no produjeron ningún tipo de respuesta. Tampoco se encontraron respuestas en presencia de otros neurotransmisores como el ácido gamma-amino-butírico (GABA, 1mM; n = 11), la acetil-colina (ACh, 100 μ M; n = 7) y la glicina (Gly, 1 mM; n = 11) (ver figura 5).

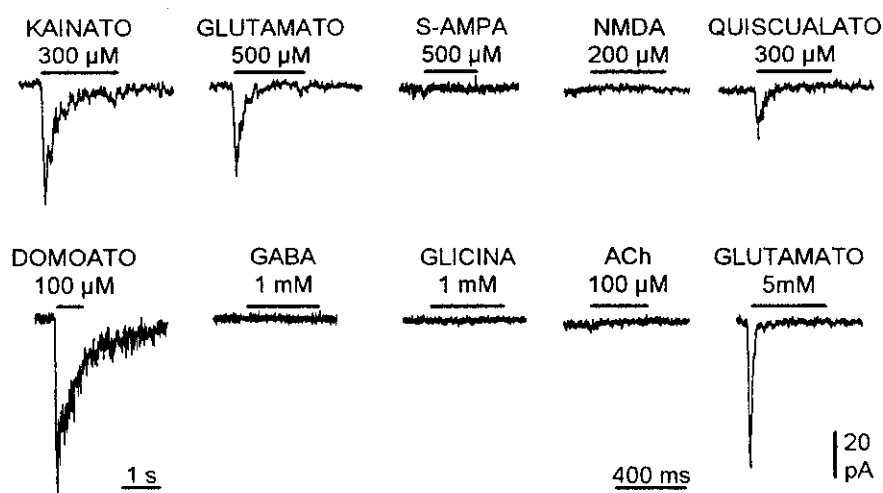


Figura 5. Efecto de diversos agonistas de receptores para neurotransmisores sobre la corriente de membrana en la línea R 110. Los agonistas del receptor de kainato (KA, GLU, QUIS y Do), fueron capaces de activar consistentemente corrientes de membrana. AMPA y NMDA (con gly 20 μM y sin Mg^{2+}) no generaron ningún tipo de respuesta. Tampoco se observaron respuestas a agonistas de otros receptores. Los experimentos, a excepción de GABA (0 mV), se realizaron a un potencial de membrana de -70 mV.

Estas respuestas han sido adscritas a la presencia de receptores de kainato. La aplicación de glutamato, kainato y quisqualato, produjo una corriente rápida completamente inactivante. La desensibilización siguió un curso temporal monoexponencial presentando una constante de tiempo (τ) de 16 ± 1.2 ms, 15.2 ± 2.5 ms y 93 ± 10 ms, para GLU 5 mM, KA 1 mM y QUIS 300 μM , respectivamente ($n = 5$) (ver figura 6). Domoato (Do 100 mM), análogo estructural de kainato, activó los receptores de kainato de estas células generando una respuesta más lenta e incompletamente inactivada. Dicha inactivación siguió un curso temporal monoexponencial (τ) de 263.4 ± 27 ms ($n = 5$). La existencia de corriente medible en condiciones de estado estacionario permitió determinar la velocidad de deactivación de estos receptores. Tras la retirada del agonista, la corriente decayó siguiendo un curso temporal monoexponencial con una constante de tiempo (τ) de 716.1 ± 42.6 ms ($n = 5$) (figura 6).

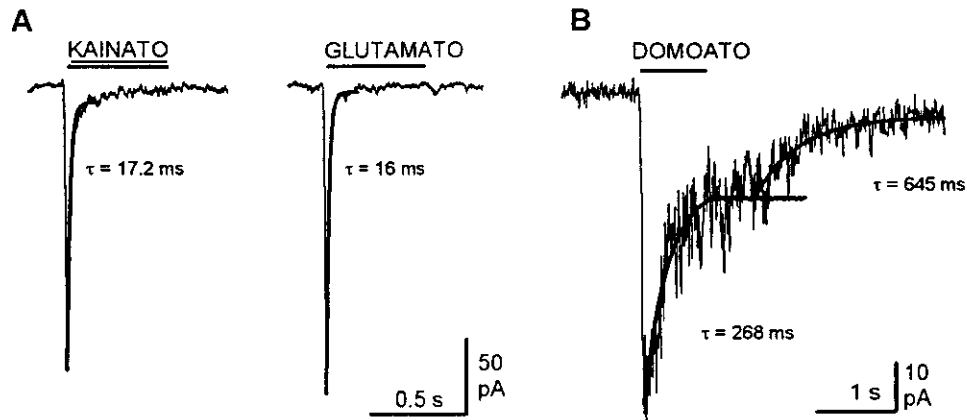


Figura 6. Los receptores de kainato de la línea R 110 mostraron respuestas con diferente cinética de inactivación en función del agonista utilizado. La aplicación de glutamato y kainato activó respuestas rápidas que se inactivaron rápidamente. Este proceso de desensibilización pudo ajustarse a una exponencial de aproximadamente 16 ms (línea gruesa). Domoato generó respuestas con inactivación incompleta, que siguió un curso temporal monoexponencial (τ) de 264 ms. Tras la retirada del agonista, la desactivación de la corriente fue lenta y siguió un único proceso exponencial.

Respuestas similares a éstas, se han descrito en sistema nervioso periférico en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Huettnner, 1990) y más recientemente en neuronas de hipocampo (Lerma y cols, 1993), neuronas ganglionares del trigémino (Sahara y cols, 1997), astrocitos y precursores gliales (Patneau y cols, 1994).

Para comprobar que los distintos agonistas actuaron sobre el mismo receptor, se realizaron experimentos de desensibilización cruzada. Para ello, se aplicó un pulso de kainato (300 μ M), permitiéndose la desensibilización de la población de receptores. A continuación se aplicó un segundo pulso de glutamato (500 μ M) o domoato (100 μ M) (ver figura 7). Durante el período entre pulsos (750 ms) la célula se encontró perfundida por la solución control. Si ambos agonistas actúan sobre el mismo receptor, la respuesta del segundo se debería ver disminuida en amplitud respecto a su respuesta control. La respuesta control para el segundo agonista se realizó con el mismo protocolo, pero sin aplicar el pulso previo de kainato. Como se muestra en la figura 7, la desensibilización de la respuesta por kainato previno casi totalmente la generación de corrientes en respuesta a la perfusión de glutamato o

domoato, confirmándose que los tres agonistas son capaces de activar la misma población de receptores.

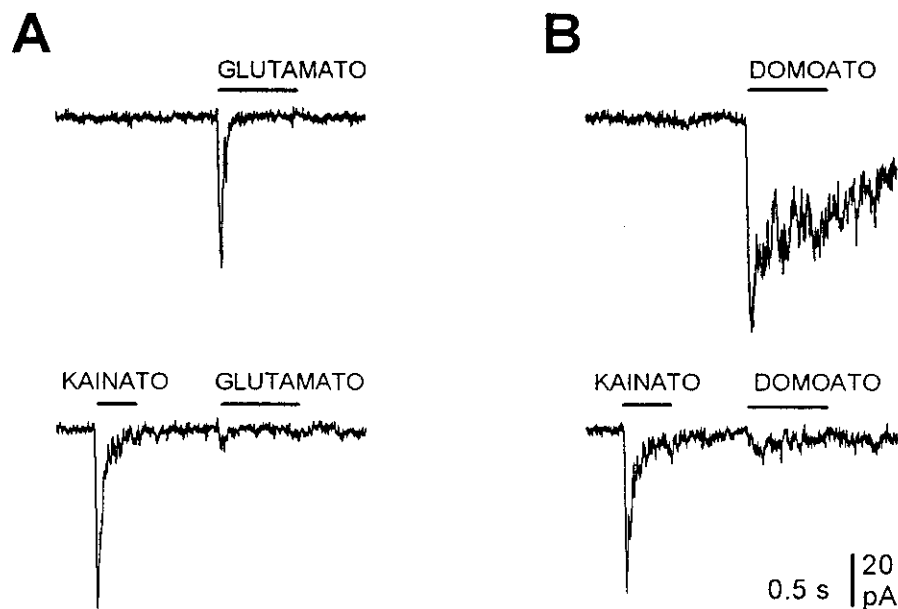


Figura 7. Los tres agonistas activan la misma población de receptores de kainato. En la parte superior se encuentran las respuestas a glutamato y domoato. En la parte inferior se observa la pérdida de amplitud de tales respuestas por la aplicación previa de kainato. En A) desensibilización cruzada kainato 300 μ M - glutamato 500 μ M. En B) desensibilización cruzada kainato 300 μ M - domoato 100 μ M.

Con el fin de determinar la afinidad aparente de cada agonista se calcularon las curvas dosis-respuesta para glutamato y kainato. Para ello, a un mismo potencial de membrana (-70 mV) se aplicaron ambos agonistas en varias concentraciones. Tanto glutamato como kainato activaron al receptor de forma dosis dependiente, alcanzando un nivel máximo de respuesta a una concentración próxima a 3 mM y 1 mM para glutamato y kainato, respectivamente. Los datos experimentales se normalizaron y se ajustaron a la ecuación de Hill, calculándose las concentraciones a las cuales la activación de los receptores fue del 50% (EC_{50}). Glutamato presentó un EC_{50} de $335 \pm 21.8 \mu$ M, mientras que kainato presentó una afinidad aparentemente mayor, con un EC_{50} de $15 \pm 2.7 \mu$ M (ver figura 8). Estos valores son semejantes a los obtenidos en neuronas de hipocampo en cultivo (Lerma y cols, 1993) y

neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Huettnner, 1990), que presentan receptores selectivos para kainato.

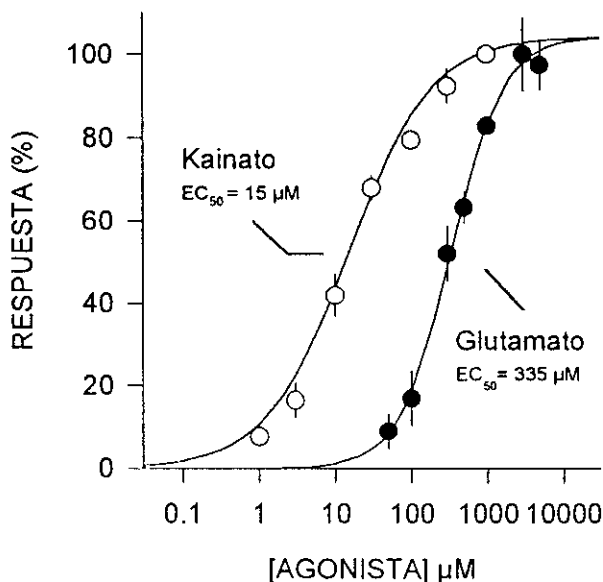


Figura 8. Los receptores glutamatérgicos de la línea R 110 presentan alta afinidad por kainato pero no por glutamato. Curva dosis respuesta para ambos agonistas. Los puntos representan la media \pm error estandar de los valores obtenidos de 8 - 12 células. La línea sólida corresponde al ajuste a la ecuación $R = R_{\text{máx}} / (1 + (EC_{50} / Ago)^n)$ de los datos experimentales. " $R_{\text{máx}}$ " es la respuesta máxima. " EC_{50} " la concentración que activó el 50% de los receptores. "Ago" la concentración de agonista y n el coeficiente de Hill. Este fue de 1 y 0.8 para glutamato y kainato respectivamente.

Con el fin de determinar si kainato y glutamato presentaron igual eficiencia para activar los receptores de kainato, en 15 células se aplicaron concentraciones saturantes de glutamato (Glu 3 mM) y kainato (KA 1 mM) (ver figura 8), comparándose la amplitud de las respectivas respuestas. La corriente máxima activada fue igual para glutamato (100%) que para kainato ($99.46 \pm 1.7\%$) (ver figura 9).

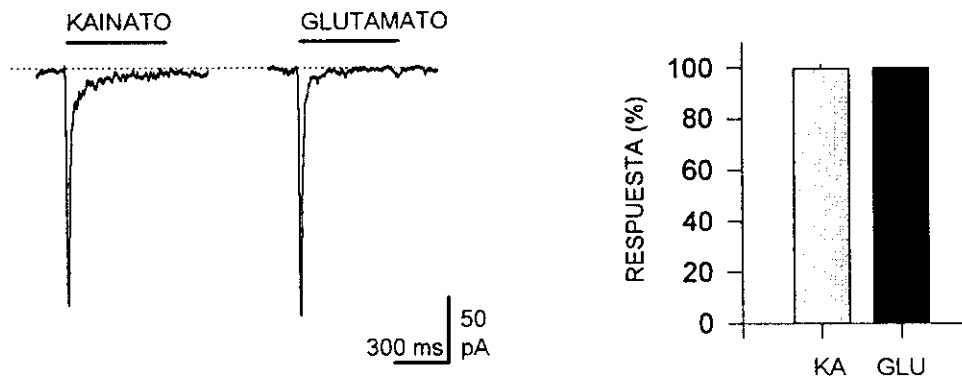


Figura 9. Glutamato y kainato activaron los receptores de kainato con similar eficacia. La amplitud total de las respuestas, fue similar a concentraciones saturantes de glutamato y kainato (5 mM y 1 mM, respectivamente). Los experimentos se realizaron a un potencial de membrana de -70 mV.

Como se describió anteriormente, la velocidad de entrada en el estado desensibilizado de los receptores de kainato es rápida. Para determinar la velocidad de recuperación del receptor desde el estado desensibilizado, se aplicaron pares de pulsos con distintos intervalos de tiempo. Estos experimentos pusieron de manifiesto que la velocidad de recuperación del receptor desde el estado desensibilizado depende del agonista utilizado. Así, cuando se empleó glutamato como agonista, fue necesario separar las aplicaciones aproximadamente unos 10 segundos para obtener la recuperación completa de la respuesta. Este tiempo fue mayor (unos 40 s) al perfundir kainato (ver figura 10). Ambos procesos de recuperación siguieron una cinética monoexponencial, que presentó constantes de tiempo (τ_{rec}) de 3.6 s y 13.7 s para glutamato y kainato, respectivamente.

Estos datos ponen de manifiesto que el tiempo de recuperación de los receptores de kainato es considerablemente mayor que el descrito para los receptores de AMPA o NMDA. Por ello, en todos los experimentos, los pulsos de agonista se espaciaron al menos 30 s cuando se utilizó glutamato como agonista y 60 s al aplicar kainato para garantizar la recuperación de todos los receptores.

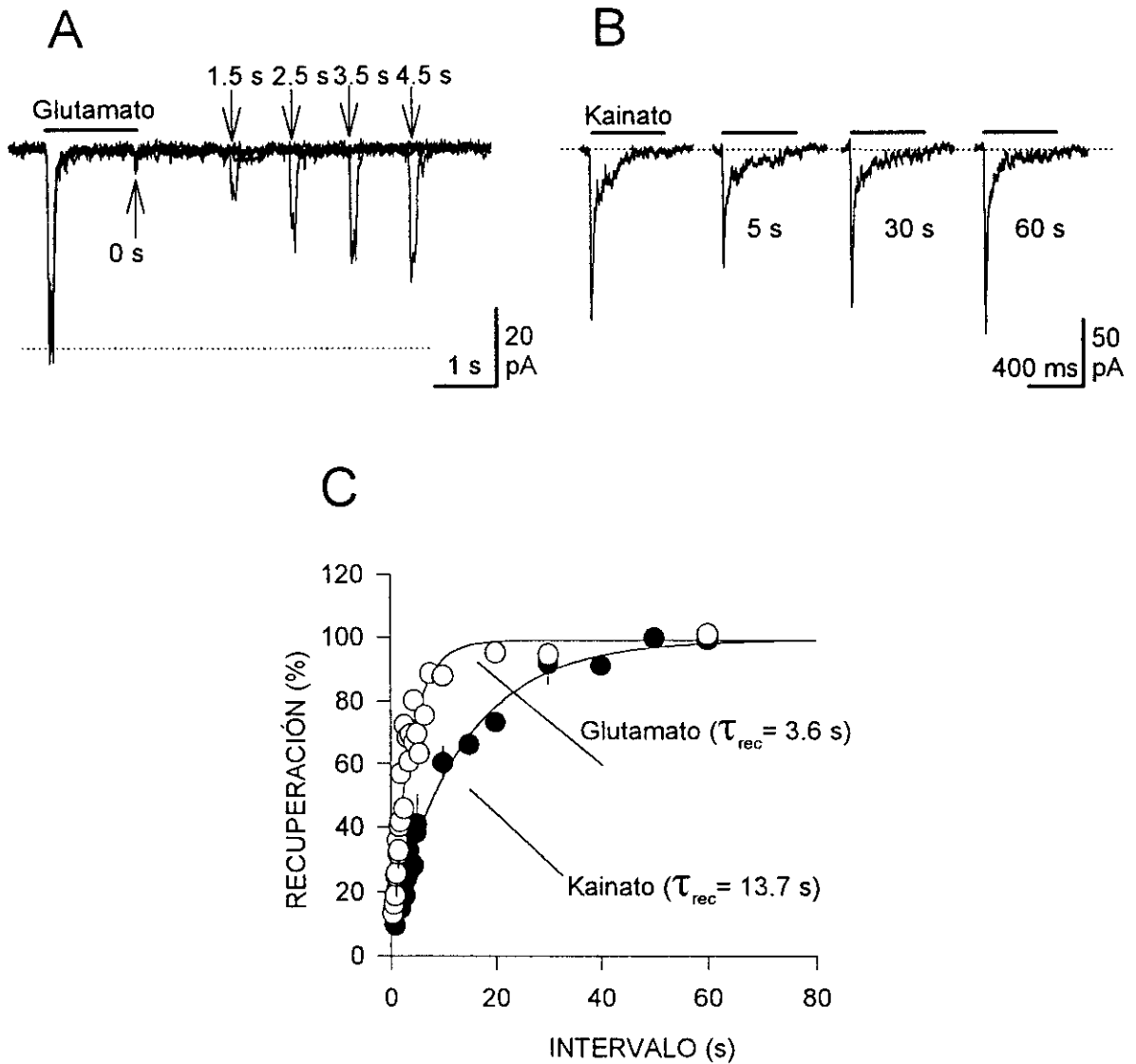


Figura 10. La velocidad de recuperación del estado desensibilizado de los receptores de kainato es muy baja y depende del agonista. Pares de pulsos de agonista pusieron de manifiesto que la recuperación de la desensibilización siguió un proceso monoexponencial (C), que cursó más rápidamente cuando el receptor se activó con el agonista endógeno glutamato (A) que cuando se hizo con kainato (B). Los experimentos se realizaron a un potencial de membrana de -70 mV. La concentración de glutamato y kainato utilizada fue 1 mM y 300 μ M, respectivamente.

La velocidad de activación de los receptores de kainato fue dosis dependiente. En la figura 11B se puede observar que el tiempo al pico de la respuesta obtenida con glutamato 3 mM es menor que el observado cuando la concentración de glutamato utilizada fue menor. Sin embargo, dicha activación fue voltaje independiente, al no variarse la latencia de las

respuestas con el cambio de potencial de membrana (ver figura 11A). La velocidad de inactivación también resultó ser dosis dependiente y voltaje independiente, observándose un aumento en la constante de tiempo del proceso desensibilizante (τ), al disminuir la concentración de agonista (ver figura 11B), y no verse modificadas dichas constantes (τ) por el potencial de membrana (ver figura 11A).

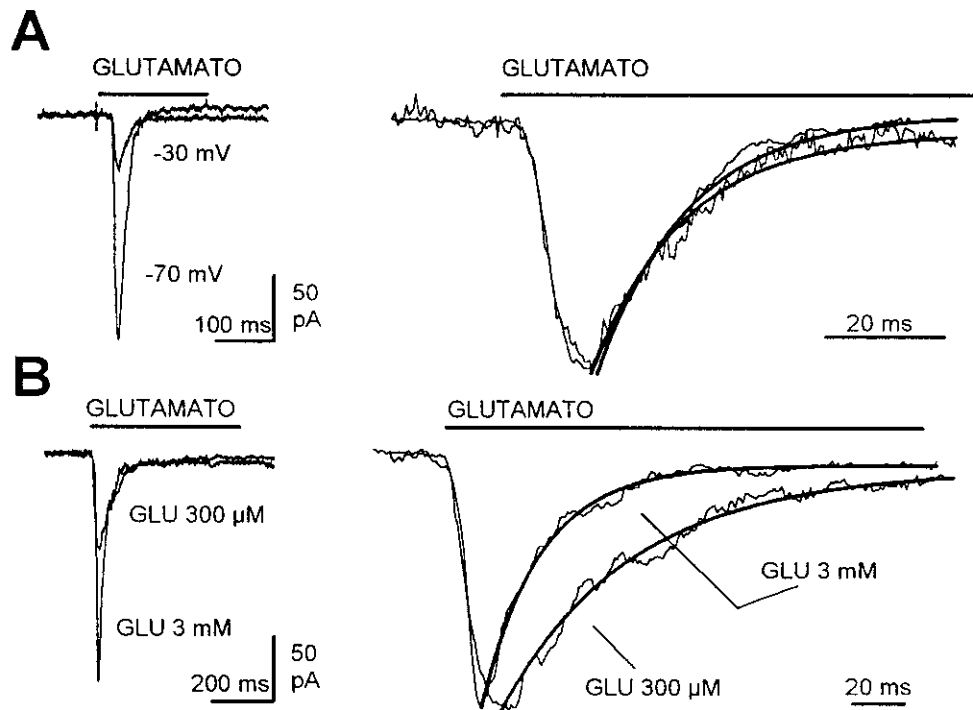


Figura 11. La activación y la inactivación del receptor de kainato fue dosis dependiente y voltaje independiente. Activación del receptor de kainato a dos potenciales de membrana (A) y con dos concentraciones diferentes de agonista (B). A la dcha. normalización de las respuestas con respecto al pico de la respuesta. En A) voltaje independencia (en el ejemplo $\tau_d = 15$ ms). En B) dosis dependencia (en el ejemplo $\tau_d = 23$ ms y $\tau_i = 52.7$ ms para GLU 300 μ M y GLU 3 mM respectivamente).

Para calcular la relación corriente-voltaje (I/V) de los receptores de kainato, el potencial de membrana se varió entre -100 y 100 mV en intervalos de 10 mV, desde un potencial de reposo de -70 mV. Una vez establecido cada potencial de membrana, se activaron los receptores mediante pulsos de agonista. En estas condiciones, se observó una relación corriente-voltaje (I/V) con una marcada rectificación entrante. De 40 células

estudiadas, 35 (87.5%) mostraron curvas I/V donde no se observó corriente saliente a potenciales de membrana depolarizados (>50 mV), cuando Na⁺ fue el catión mayoritario en la solución externa y Cs⁺ o Na⁺ lo fueron en la interna (ver figura 12). En 5 células (12.5%), se observó doble rectificación en esas mismas condiciones, siendo la magnitud de la corriente saliente menor. El potencial de reversión (V_{rev}) de las corrientes evocadas por kainato o glutamato no pudo calcularse por no existir respuestas netas medibles entre 0 y 50 mV (ver figura 12) debido a la fuerte rectificación descrita.

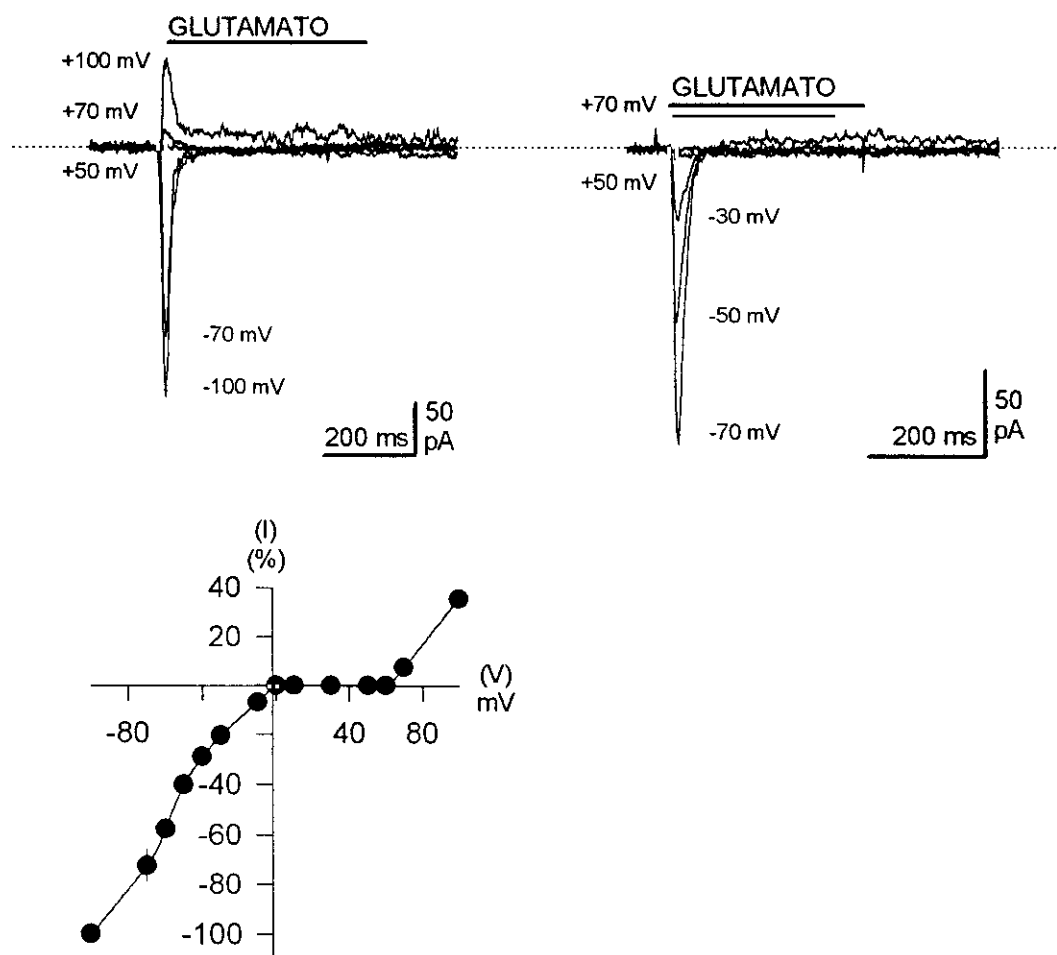


Figura 12. Los receptores de kainato mostraron una relación I/V rectificadora de entrada. Un 87.5% de las células no presentaron respuesta mensurable a potenciales positivos. Sin embargo, el 12.5% restante mostraron doble rectificación. En la zona superior ejemplos de estos dos tipos de respuestas, en la zona inferior normalización de la corriente evocada a diferentes potenciales de membrana.

Estudios en receptores recombinantes han puesto de manifiesto que la rectificación de entrada de los receptores de AMPA y de kainato está asociada a una alta permeabilidad a iones de calcio. Dado que la mayoría de las células registradas presentaron este tipo de rectificación, se estudió la permeabilidad a calcio con el fin de determinar si estos receptores podrían constituir una vía significativa de ingreso de calcio al interior celular. La respuesta disminuyó considerablemente cuando calcio fue el único ión portador de carga en la solución extracelular (figura 13). Así, el aumento de la concentración de calcio (≥ 10 mM) o la eliminación del ión sodio y del ión calcio de la solución extracelular provocó la abolición de la respuesta (ver figura 14). Sin embargo, cuando la concentración de calcio en la solución extracelular fue de 5 mM en ausencia de sodio, la respuesta a un potencial de membrana de -70 mV, fue el $9.5 \pm 0.7\%$ ($n = 7$) de la respuesta en la solución control (ver figura 13). Dada la existencia de rectificación de entrada y la pequeña amplitud de las respuestas en nuestras condiciones de registro, tampoco se pudo calcular el potencial de reversión de la corriente, y por tanto estimarse la razón de permeabilidades $\text{Ca}^{2+}/\text{Cs}^+$.

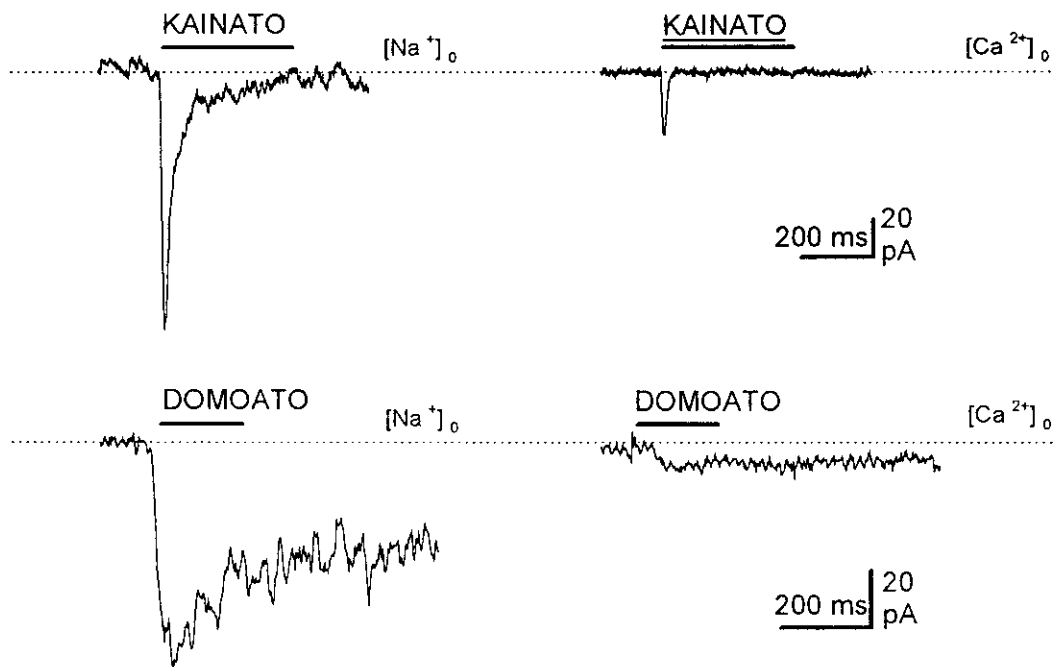


Figura 13. El receptor de kainato presenta cierta permeabilidad a calcio. La amplitud de las respuestas mediadas por el receptor de kainato al perfundir kainato $300 \mu\text{M}$ o domoato $100 \mu\text{M}$ a un potencial de membrana de -70 mV fue diferente según la solución extracelular utilizada. La relación entre las respuestas obtenidas en una solución de calcio (calcio 5 mM sin sodio) y una solución de sodio fue del $9.5 \pm 0.7\%$.

En presencia de otros cationes, como el ión cesio, no se observó respuesta a kainato cuando éste fue el único ión permeable. La presencia de cesio en la solución extracelular produjo un bloqueo total de la respuesta, independientemente de la solución intracelular utilizada (cesio metanosulfonato o sodio metanosulfonato) (ver figura 14). Sin embargo, la presencia de Na^+ en la solución extracelular, permitió que Cs^+ permeara a través del canal, incluso en sentido saliente cuando desaparece la rectificación (ver figura 12). Estos datos pueden explicarse por la existencia de un posible lugar alostérico específico para los receptores de kainato, con el que el ión Na^+ interaccionaría permitiendo la apertura del canal. En este sentido, experimentos realizados en nuestro laboratorio en células de hipocampo en cultivo ponen de manifiesto que la ausencia de Na^+ extracelular produce una pérdida de función en los receptores de kainato.

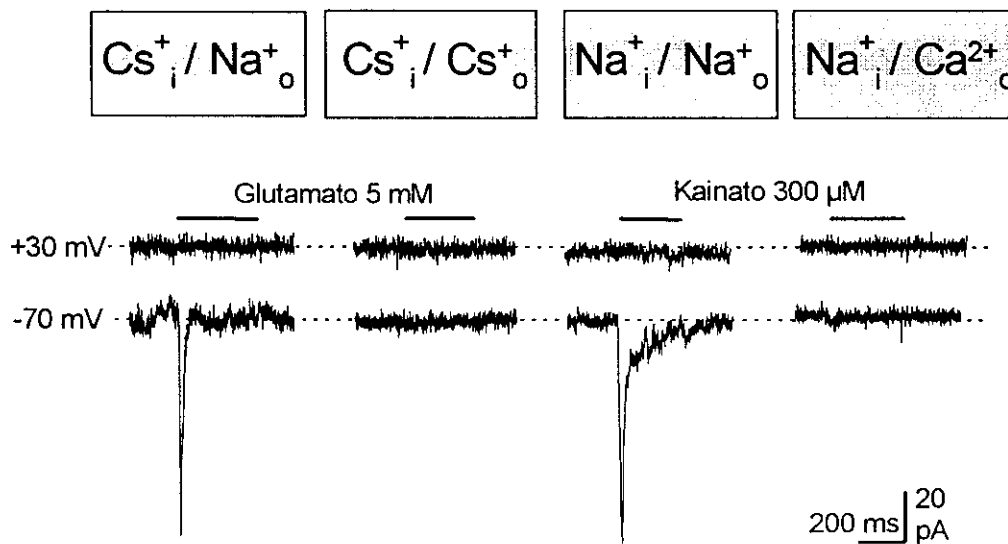


Figura 14. Permeabilidad iónica de los receptores de kainato en la línea R 110. Glutamato o kainato activaron canales en presencia de Na^+ , pero no fueron capaces de generar respuestas ni en presencia de Cs^+ , cuando este fue el único ión permeable, por bloquear totalmente la respuesta. Altas concentraciones de Ca^{2+} en ausencia de sodio en la solución extracelular, tampoco generaron ningún tipo de respuesta.

SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE KAINATO EN LA LÍNEA R 110

En colaboración con el Dr. Diego Ruano se determinaron las subunidades del receptor de kainato expresadas por la línea R 110.

El mRNA de una población de células de la línea R 110, se retrotranscribió al correspondiente cDNA. Usando cebadores específicos para cada subunidad y mediante la técnica de PCR múltiple (mPCR) se amplificaron fragmentos del cDNA con el fin de determinar las subunidades presentes según se describe en Ruano y cols. (1995). El mismo procedimiento se aplicó en muestras de RNA aislado de cerebro de rata.

Como pone de manifiesto la figura 15A, la línea R 110 no expresó las subunidades correspondientes al receptor de AMPA, GluR1-4. La línea R 110 mostró una única banda (de unos 259 pb), que se correspondió con la migración del cDNA para la subunidad GLUR6 (ver figura 15B).

La ausencia de expresión de las subunidades GluR1-4 (receptores tipo AMPA), que sí aparecen (banda 750 pb) en la columna control de cDNA de cerebro de rata (ver figura 15A), concuerda con los resultados electrofisiológicos, donde no se apreciaron respuestas a AMPA (ver figura 5). Estos resultados indican que la línea R 110 expresa receptores de kainato, compuestos exclusivamente por subunidades GLUR6.

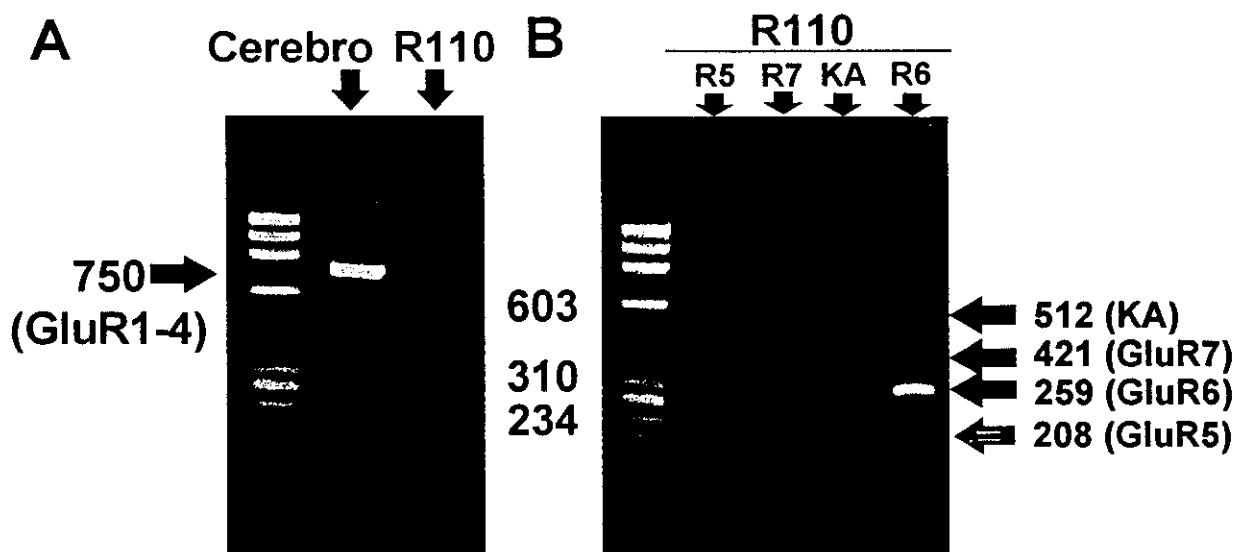


Figura 15. Determinación de las subunidades del receptor de glutamato expresadas por la línea celular R 110. Las distintas subunidades de los receptores glutamatérgicos se amplificaron por la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR) usando pares de cebadores específicos (ver Ruano y cols, 1995). Como control se utilizó cerebro total de rata. En la línea R 110, no se detectó expresión de las subunidades correspondientes al receptor de AMPA, GluR1-4. Sin embargo, presentó una única banda de unos 259 pb, que se correspondía con el tamaño previsto del cDNA para la subunidad GluR6. El marcador de pesos moleculares utilizado fue el ϕ X 174, Hae III.

En ensayos subsiguientes se ratificó el resultado anterior, obteniendo una única banda de expresión a la altura de 259 pb, tanto en los parentales como en los clones ensayados obtenidos por dilución límite de los parentales. El clon E10, donde no se había detectado respuestas a kainato electrofisiológicamente, también expresaba la subunidad GLUR6 (ver figura 16).

Aunque la amplificación con PCR no es un método cuantitativo, cuando las condiciones (cantidad de DNA de partida, n° de ciclos, carga en el gel, etc...) se mantienen constantes, se puede estimar el grado de expresión por la intensidad de la banda generada. La mayor expresión de la subunidad GluR6 se observó en el clon F8 (ver figura 16), uno de los presentó mayor amplitud en las respuestas electrofisiológicas (ver tabla 1).

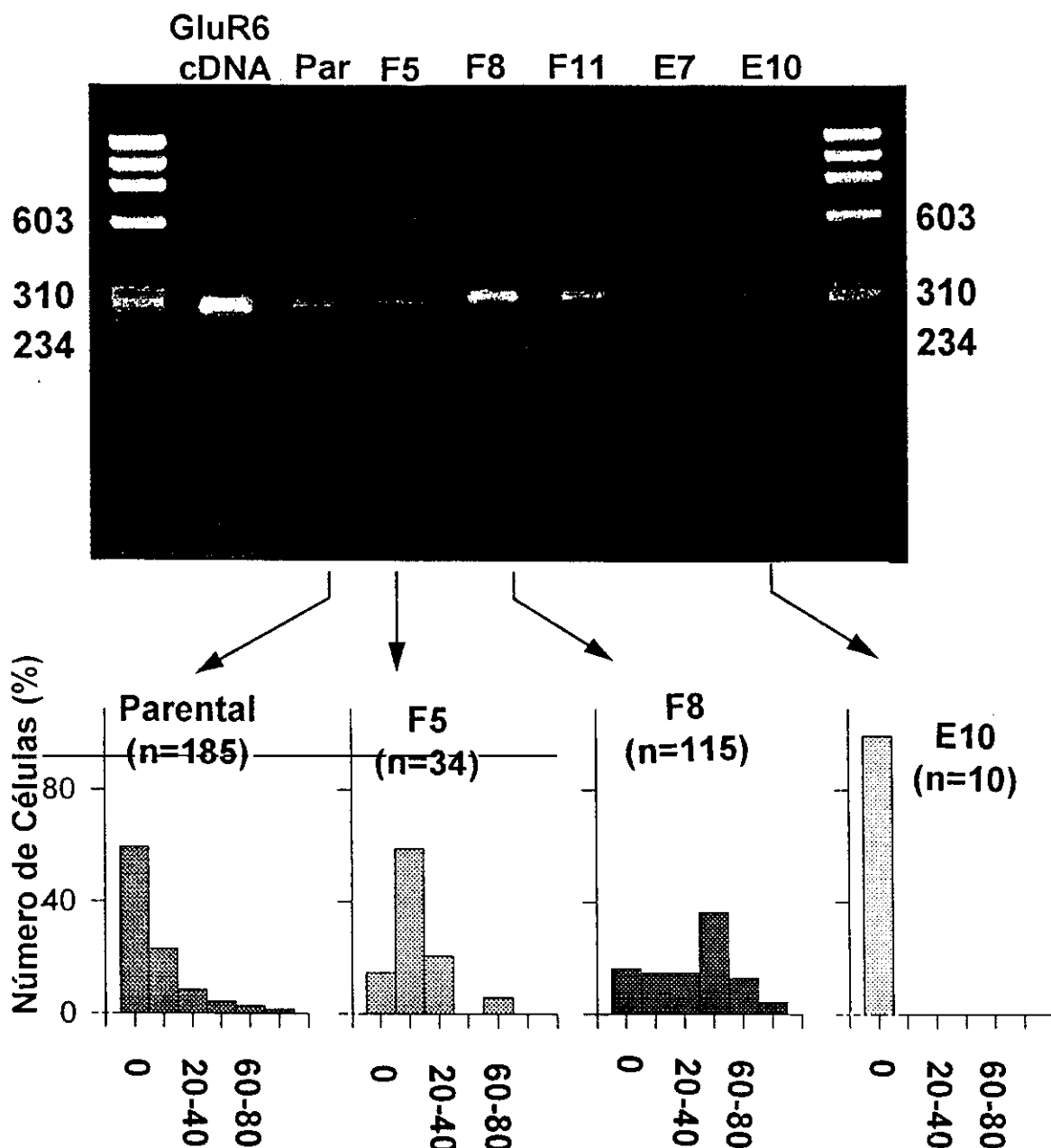


Figura 16. Expresión de subunidades de kainato en los subclones de la línea R 110. En la figura se representa el resultado de la amplificación por RT-PCR para la subunidad GluR6 en cinco de los clones aislados (gel superior) así como los histogramas de frecuencia de las amplitudes de las respuestas a kainato en tres de ellos. El marcador de pesos moleculares utilizado fue el ϕ X 174, Hae III.

Como se describió en la introducción, para la subunidad GLUR6 existen tres lugares controlados por mecanismos de edición del RNA. Uno en el sitio Q/R del dominio cismembrana II (M2) y otros dos sitios adicionales I/V e Y/C en el dominio transmembrana I

(M1) de la subunidad GLUR6 (para revisión ver: Bettler y Mulle, 1995). Como los receptores formados por subunidades editadas GluR6(R) presentan relaciones I/V lineales (Köhler y cols, 1993) y los datos electrofisiológicos revelaron una marcada rectificación entrante, se pudo postular la presencia de receptores formados por subunidades GluR6 no editadas GluR6(Q) en las células de la línea R 110. Para comprobarlo, se determinó el grado de edición del sitio Q/R del dominio M2. Para ello, la banda de cDNA obtenida por RT-PCR se digirió con el enzima de restricción Aci I. El cambio de G a I en el RNA genera un sitio de restricción para esta endonucleasa, produciéndose en la forma editada (GluR6(R)) dos bandas de 197 y 62 pb tras la incubación con este enzima. En la forma no editada (GluR6(Q)), la banda original de 259 pb se mantiene, puesto que el sitio de restricción no existe. Los ensayos demostraron que las subunidades GluR6 presentes tanto en los parentales como en los clones de la línea R 110, se encontraron exclusivamente en su forma no editada (ver figura 17).

La presencia de formas editadas y no editadas en los sitios I/V e Y/C localizadas en el dominio M1 de la subunidad GluR6 fueron obtenidas por Southern blot según el protocolo descrito por Ruano y cols (1995). La proporción de formas editadas (V/C) y no editadas (I/Y) encontradas fue similar (datos no ilustrados). Estos resultados sugieren que al igual que en neuronas, las formas editadas y no editadas pueden coexistir en la misma célula (Ruano y cols, 1995).

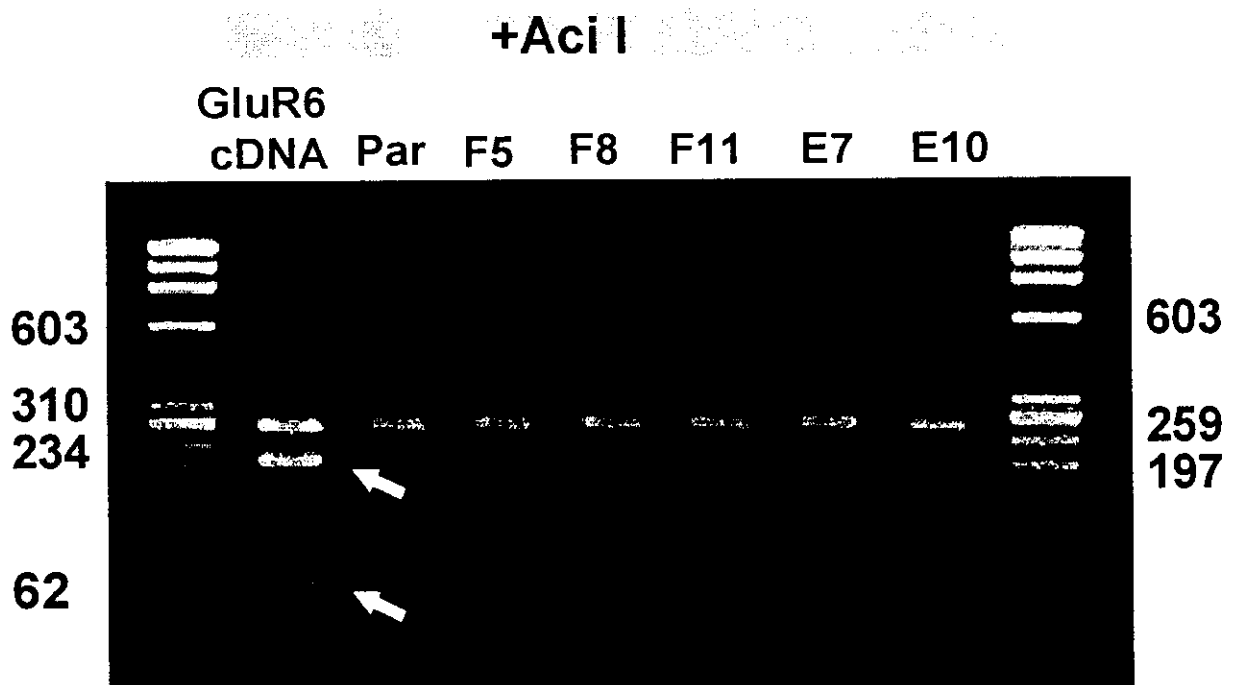


Figura 17. La subunidad GluR6 en la línea R 110 se encuentra exclusivamente en su forma no editada. El fragmento de DNA de la subunidad GluR6 de la línea R 110 es resistente al enzima de restricción Aci I, apreciándose una única banda de unos 259 pb. Cuando el mismo ensayo se realiza con una mezcla de cDNAs para GluR6 con un 50% de edición, la incubación con el enzima provoca dos bandas de 196 y 62 pb (flechas). El marcador de pesos moleculares utilizado fue el \varnothing X 174 Hae III.

Por tanto, se puede concluir que la línea R 110 expresa receptores de kainato específicos formados exclusivamente por la subunidad GluR6(Q). El segmento M1 presenta todas las variables posibles de edición. Los datos moleculares se correlacionan perfectamente con las características funcionales observadas para los receptores de kainato en esta línea celular.

PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL RECEPTOR DE KAINATO

El receptor de AMPA posee un lugar de regulación alostérica, que es reconocido por **ciclotiazida (CTZ)**, benzotiadiacina estructuralmente relacionada con los diazóxidos. Este compuesto produce potenciación de la respuesta estacionaria de los receptores tipo AMPA inducida tanto por AMPA como por kainato (Patneau y cols, 1993).

Con el fin de comprobar si en el receptor de kainato expresado por las células R 110 existía un lugar de regulación alostérica semejante, se estudió la capacidad de modulación de estas respuestas por CTZ. Para ello, se aplicó kainato (300 μM) en presencia de dos concentraciones de ciclotiazida (10 μM y 100 μM). En seis células estudiadas la aplicación de CTZ ni potenció la respuesta ni redujo el grado de desensibilización del receptor. La amplitud de las respuestas tras la aplicación de kainato fue semejante a la obtenida al perfundir kainato y CTZ, independientemente de la concentración de CTZ utilizada (98.7% \pm 4.2 y 98.75% \pm 5.1 de la amplitud de la respuesta control para KA + CTZ 10 μM y KA + CTZ 100 μM , respectivamente) (ver figura 18).

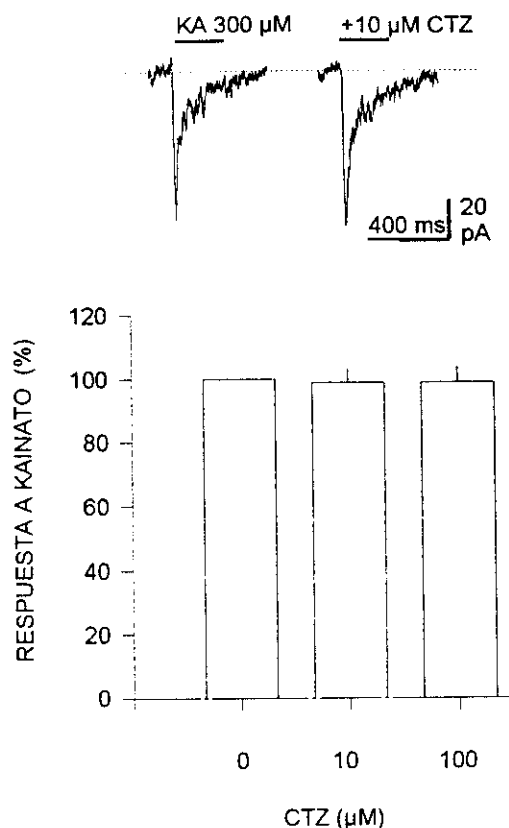


Figura 18. Ciclotiazida, modulador alostérico de los receptores de AMPA, no actúa sobre los receptores de kainato presentes en la línea R 110. La aplicación conjunta de CTZ y kainato no produjo ningún efecto en los receptores de kainato. Concentraciones saturantes de CTZ para el receptor de AMPA, ni potenciaron la respuesta ni redujeron el grado de desensibilización de los receptores de kainato.

Es conocido que las subunidades KA1 y KA2 cuando forman parte del receptor de kainato al expresarse con GluR6, otorgan al receptor sensibilidad a AMPA con muy baja afinidad. Aunque en los estudios de PCR, no se observó la expresión de estas subunidades, se estudió el efecto de AMPA sobre las respuestas de kainato.

En la línea R 110, AMPA no fue capaz de generar ningún tipo de respuesta (ver figura 5). Mediante experimentos de desensibilización cruzada con S-AMPA 1 mM y KA 300 μM, tampoco se evidenció que AMPA indujera desensibilización del receptor de kainato (datos no ilustrados). Sin embargo, la coaplicación de AMPA y KA produjo una pequeña reducción en la amplitud del pico de la respuesta respecto a la perfusión de kainato en ausencia de AMPA ($14.4\% \pm 3.6$; $n = 4$). La adición de ciclotiazida (10 μM) no modificó el

porcentaje de reducción obtenido ($13.3\% \pm 4.5$; $n = 3$) (ver figura 19), pudiéndose concluir que AMPA puede actuar como antagonista poco potente del receptor de kainato.

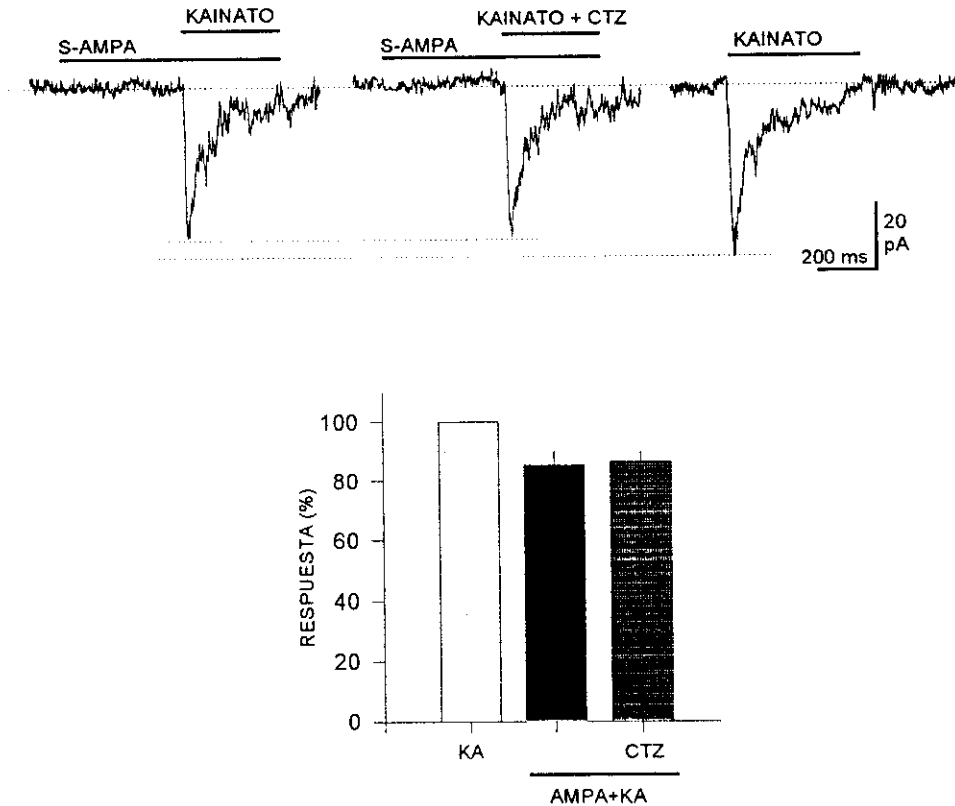


Figura 19. S-AMPA actúa como antagonista poco potente de los receptores de kainato en la línea R 110. La coaplicación de AMPA (200 μ M) y kainato (300 μ M) produjo una pequeña reducción del pico de kainato. La adición de CTZ (10 μ M) no modificó los resultados.

Las respuestas evocadas por kainato 300 μ M fueron bloqueadas de manera reversible por CNQX, antagonista competitivo de los receptores de AMPA, presentando una IC_{50} de $38.5 \pm 6.3 \mu$ M (ver figura 20). Este valor es considerablemente mayor que el calculado para este tipo de receptores en neuronas de hipocampo ($IC_{50} = 6.1 \mu$ M) (Paternain y cols, 1996), y revela una baja afinidad de este antagonista por el receptor de kainato expresado en las células R 110.

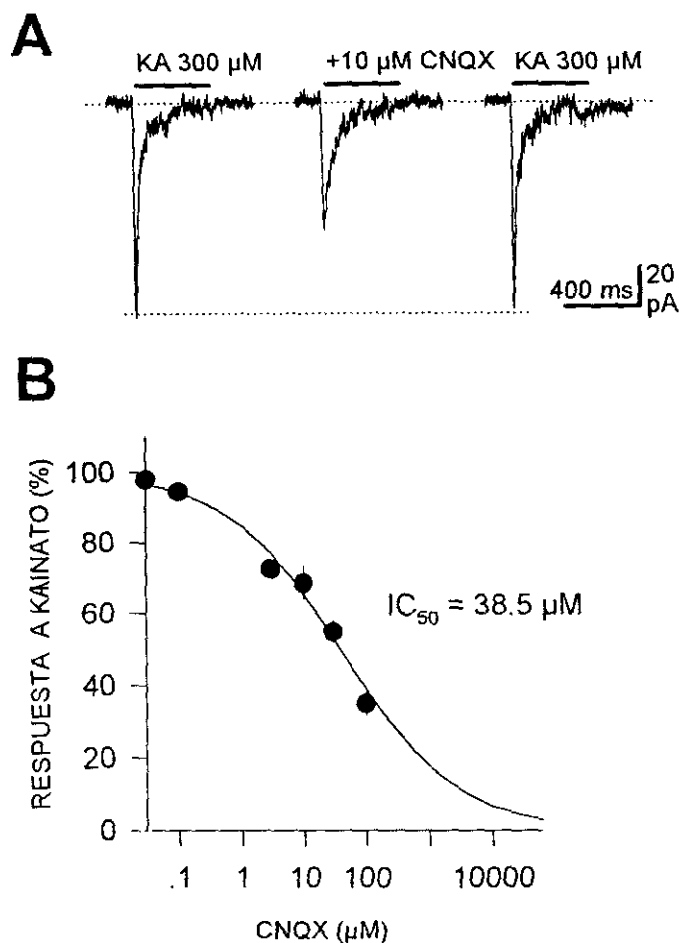


Figura 20. Efecto del CNQX sobre los receptores de kainato presentes en la línea R 110. A) CNQX inhibe reversiblemente las respuestas de kainato. B) Curva dosis-inhibición de CNQX de las respuestas a kainato (300 μ M). La curva corresponde al ajuste de la ecuación $R = 100 / (1 + Ant^n / IC_{50}^n)$ a los datos experimentales, siendo Ant la concentración de antagonista, IC₅₀ la concentración de antagonista que produce el 50% de la inhibición máxima y n el coeficiente de Hill. Los puntos se corresponden a la media de los valores obtenidos \pm el error standard en 10-21 células.

Las 2,3-benzodiazepinas recientemente desarrolladas por Tarnawa y cols (1989) se comportan como antagonistas no competitivos de los receptores de AMPA. En neuronas de hipocampo en cultivo el efecto de GYKI 52466 es aproximadamente unas 45 veces menos potente sobre los receptores de kainato que sobre los receptores de AMPA, calculándose un IC₅₀ de 9.8 μ M y 450 μ M para los receptores AMPA y kainato respectivamente (Paternain y cols, 1995). En neuronas del ganglio de la raíz dorsal se necesitan concentraciones >200 μ M para conseguir el mismo efecto. La inhibición de este compuesto es independiente del potencial de membrana y de la concentración de agonista utilizado (Wilding y Huettner,

1995). En la línea R 110 las respuestas de KA 100 μM fueron inhibidas pobre y reversiblemente por concentraciones crecientes de GYKI 52466. La IC_{50} calculada fue de $281 \pm 98.5 \mu\text{M}$ (ver figura 21), semejante al encontrado en células del ganglio de la raíz dorsal.

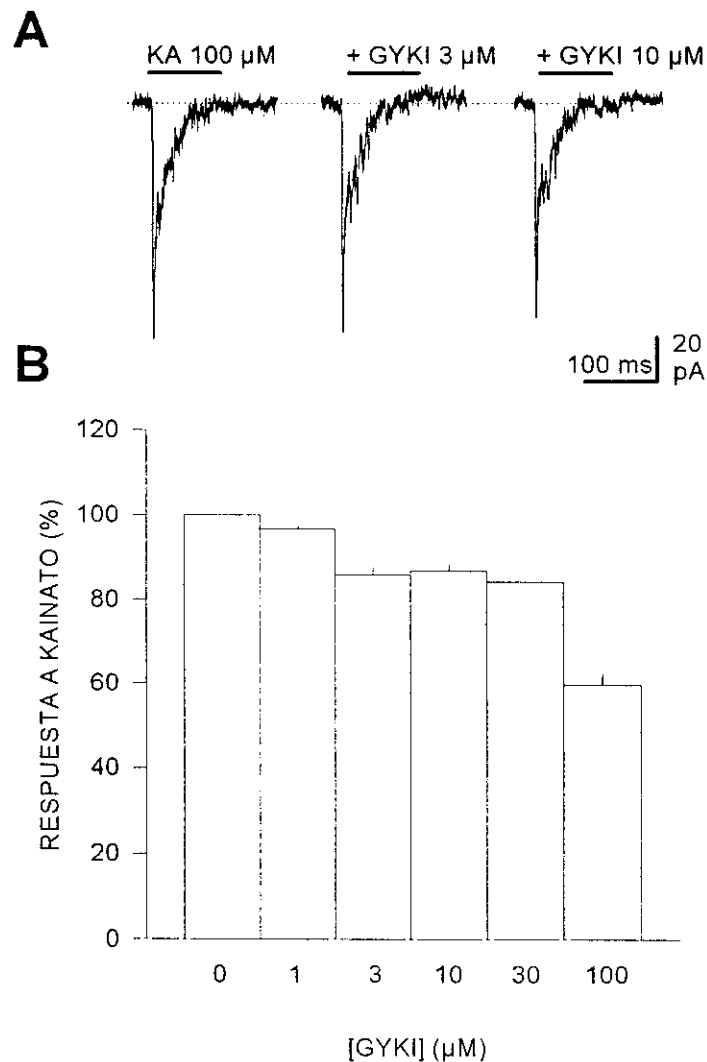


Figura 21. Efecto del antagonista no competitivo de los receptores AMPA, GYKI 52466, sobre los receptores de kainato. A) Respuestas de kainato 100 mM antes y en presencia de concentraciones de GYKI 52466 crecientes. B) Inhibición de la respuesta de kainato por concentraciones crecientes de GYKI 52466. Las barras representan la media de los valores obtenidos \pm el error standard de 4-12 células.

Las lectinas son proteínas con sitios de unión de alta afinidad para polisacáridos. Algunas potencian la respuesta de los receptores de AMPA y de kainato, al reducir su desensibilización (Mayer y Vyklicky, 1989; Wong y Mayer, 1993; Partin y cols, 1993;

Patneau y cols, 1994). Cuanto mayor es el número de sitios potenciales de glicosilación más sensibles son los receptores no-NMDA. Por ello, la acción de las lectinas es mayor sobre los receptores de kainato (6 sitios en GluR5-7 y de 8-10 sitios posibles en KA1-KA2) que sobre los receptores de AMPA (4-6 sitios posibles). El efecto de las lectinas tras un breve período de incubación (\cong 3-5 minutos) es ampliamente irreversible.

En la línea R 110, la incubación con **concanavalina A (ConA 0.3 mg/ml)** durante 5 minutos produjo respuestas de mayor amplitud con incremento del ruido de membrana respecto a las células sin tratar. ConA redujo la desensibilización del receptor, potenciando también la respuesta al pico. La amplitud de la corriente estacionaria fue incrementada alcanzándose amplitudes semejantes a la respuesta pico inicial (figura 22A). El efecto de ConA no fue reversible. Una vez tratada la placa con ConA no se observaron respuestas sin componente estacionario en ninguna otra célula. El porcentaje de células que no respondieron a glutamato (15%) antes de incubar la placa con ConA se mantuvo constante tras el proceso.

El tratamiento con ConA previno un $60.2 \pm 1.8\%$ ($n = 11$) la desensibilización de la corriente transitoria inicial (ver figura 22B). Esta reducción de la desensibilización durante la fase inicial de la respuesta a glutamato origina, probablemente, la potenciación observada del pico de la respuesta.

Tras la incubación con ConA, la amplitud de la corriente al pico generada por glutamato fue el $170.2 \pm 7.3\%$ ($n = 5$) de la amplitud a pico inicial. Así mismo, la respuesta estacionaria inexistente antes de la incubación con ConA fue incrementada alcanzando amplitudes semejantes a las observadas en las respuestas al pico control ($98.1 \pm 8.5\%$) (ver figura 22A y 22C).

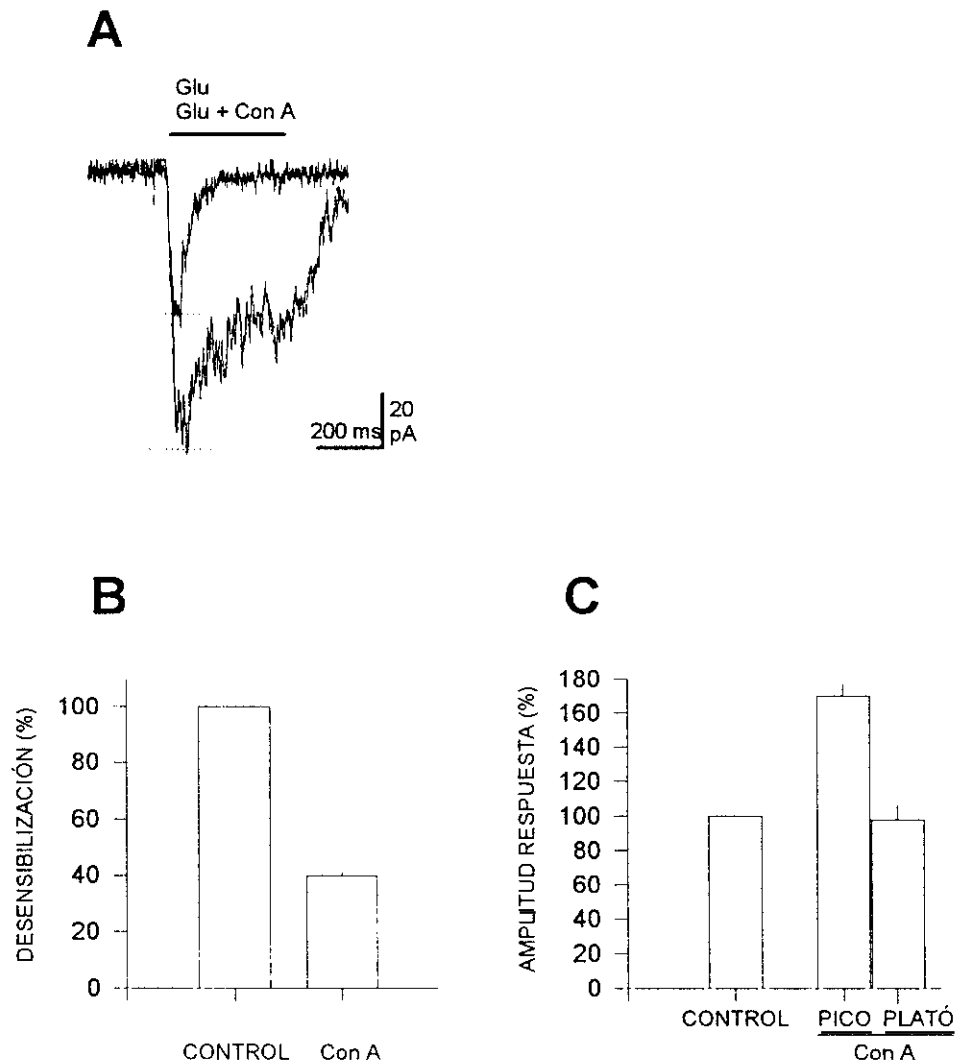


Figura 22. ConA reduce la desensibilización en los receptores de kainato de la línea R 110. A) Respuesta a glutamato 1 mM, a -70 mV, antes y después de ser incubada la placa durante 5 minutos con ConA. B) En 11 células se calculó la desensibilización, según la fórmula: $(\text{pico-ss})/\text{pico} \times 100$, evocada por glutamato 1 mM antes y después de incubar la placa con ConA. ConA previno un $60.2 \pm 1.8\%$ de la desensibilización de la respuesta. C) En 5 células se calculó la amplitud de la respuesta tras la incubación de la placa con ConA. Obsérvese la potenciación de la respuesta pico ($170.2 \pm 7.3\%$) y la aparición de un componente estacionario (plató) en la respuesta, similar en amplitud a la respuesta al pico control ($98.1 \pm 8.5\%$).

ConA no modificó la relación I/V (ver figura 23B) y en ninguna de las células estudiadas se observó corriente a potenciales de membrana positivos. Tras la incubación con ConA, la relación I/V de las respuestas medidas al pico y en su estado estacionario igualmente presentaron rectificación entrante (ver figura 23A y B).

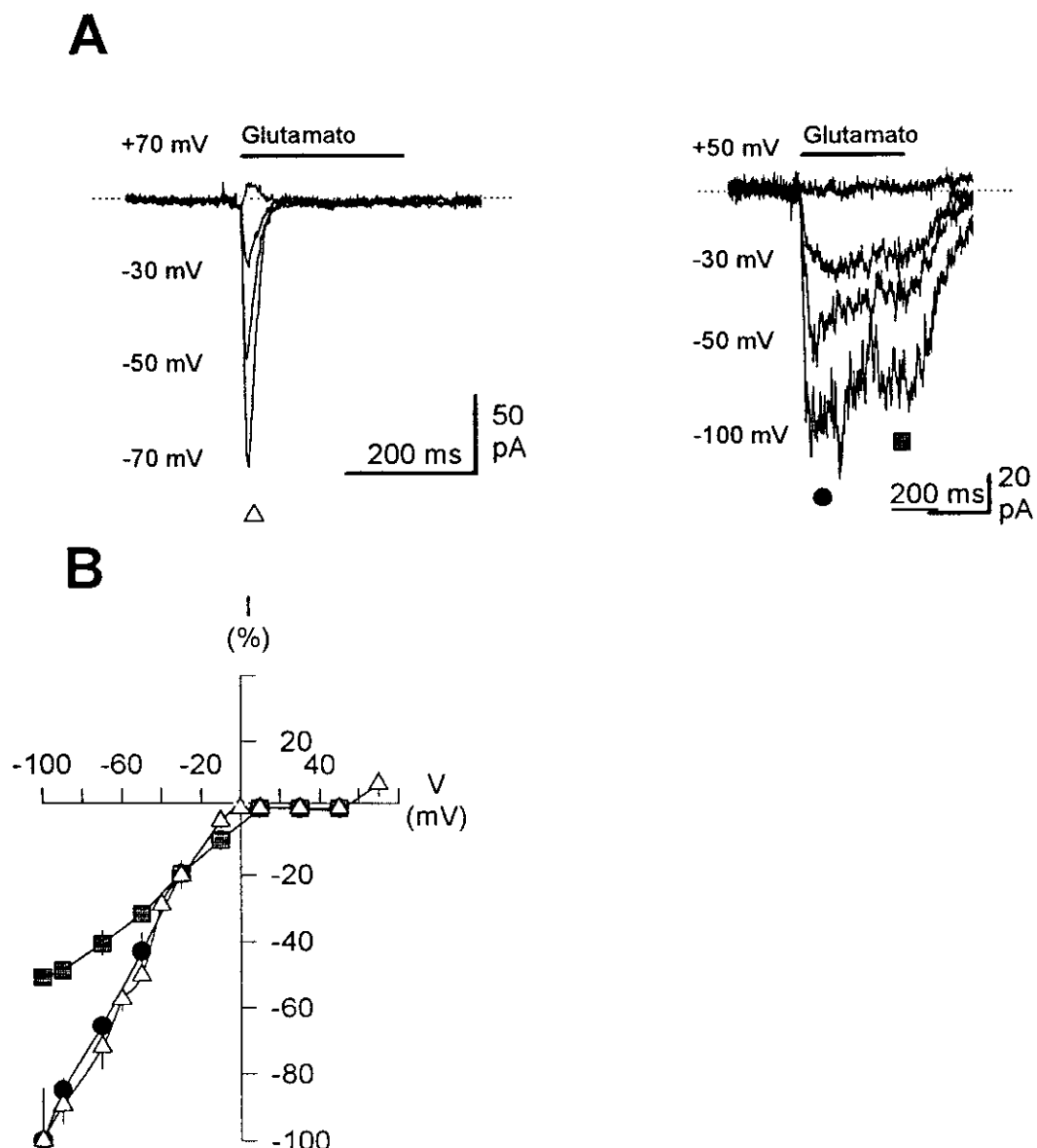


Figura 23. Con A no modifica la relación I/V de los receptores de kainato de la línea R 110. A) Variación de la amplitud de la respuesta en función del potencial de membrana. Antes (izda) y después (dcha) de incubar con ConA. B) Representación de la relación I/V en células tratadas y sin tratar con ConA. Obsérvese que la rectificación de entrada persiste tras incubación con ConA.

El colorante **Azul de Evans (EB)** ha sido descrito como un modulador de los receptores de AMPA. Su adición modifica las propiedades cinéticas de los receptores de AMPA, al reducir y enlentecer su desensibilización (Lebmann y cols, 1992). Sin embargo, también parece actuar como un potente inhibidor de las respuestas de kainato en células HEK

293 transfectadas con GluR6(R) (Price y Raymond, 1996), y como modulador de las respuestas de kainato en los receptores de kainato nativos en neuronas hipocampo (Ruano y cols, 1995).

Con el fin de determinar su acción sobre los receptores de kainato expresados en la línea R 110, se realizaron curvas dosis-respuesta a dos concentraciones diferentes de kainato (300 μ M y 5 mM) (ver figura 25C). Los experimentos realizados indicaron un comportamiento celular diferente en presencia de EB según la concentración de kainato utilizada. Así, EB en presencia de concentraciones saturantes de kainato (5 mM) bloqueó la respuesta (ver figura 24A), mientras que a concentraciones menores de kainato (300 μ M) potenció o inhibió la respuesta según la concentración de EB perfundida (ver figura 24B y 24C). La perfusión de kainato 300 μ M en presencia de EB 1 μ M generó respuestas cuya amplitud fue el $123.4 \pm 8.7\%$ ($n = 11$) de la amplitud control, mientras que la perfusión de concentraciones mayores de EB produjeron inhibición de las respuestas. Estas respuestas presentaron un componente estacionario no observado en su ausencia o cuando se perfundió una concentración de agonista mayor (ver figura 24). En la línea R 110 el efecto de EB sólo fue parcialmente reversible tras el lavado, al igual que se había descrito en neuronas talámicas (Lebmann y cols, 1992).

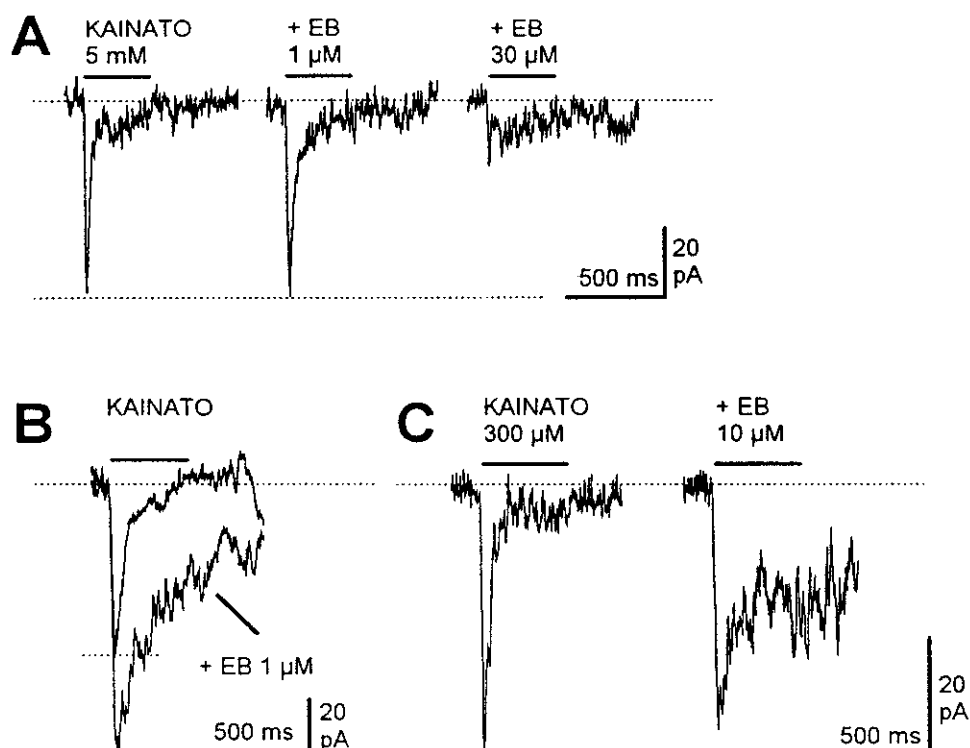


Figura 24. Efecto del colorante EB sobre los receptores de kainato presentes en la línea R 110. A) Efecto dosis dependiente de EB sobre las respuestas por 5 mM de kainato. En respuestas inducidas por 300 μM de kainato la perfusión de EB 1 μM generó un aumento de la amplitud de la respuesta tanto al pico como al estado estacionario (B). La perfusión de una concentración mayor produjo inhibición de la corriente inicial, pero potenció la corriente estacionaria (C).

El decremento de la velocidad de desensibilización y/o la aparición de un componente estacionario indicó que EB fue capaz de modular las propiedades de desensibilización del receptor de kainato. La constante de tiempo del proceso exponencial que definió la desensibilización (τ_d) se duplicó (1.96 ± 0.3 veces) tras aplicar EB 1 μM (ver figura 25). Esta acción fue dosis dependiente y más evidente cuando la concentración de agonista ensayada fue menor. Al utilizar 300 μM de KA, EB produjo enlentecimientos ligeramente mayores (2.23 ± 0.9 veces, 3.2 ± 1.2 veces, para EB 1 y 30 μM , respectivamente) (ver figura 25B3). La aparición de un componente estacionario al perfundir 300 μM de kainato en presencia de EB (ver figura 24 y 25) permite estudiar la relación entre la amplitud de la corriente estacionaria y la amplitud de la corriente pico en presencia de diferentes concentraciones de EB, observándose un incremento significativo y constante a todas las concentraciones de EB ensayadas (ver figura 25D). Así mismo, parece existir una cierta similitud entre el incremento

de la τ_d y la reducción de la amplitud de la respuesta al pico, al ser mayor la relación entre la amplitud de la respuesta en el estado estacionario y la amplitud al pico según se aumenta la concentración de EB (ver figura 25B3 y 25D).

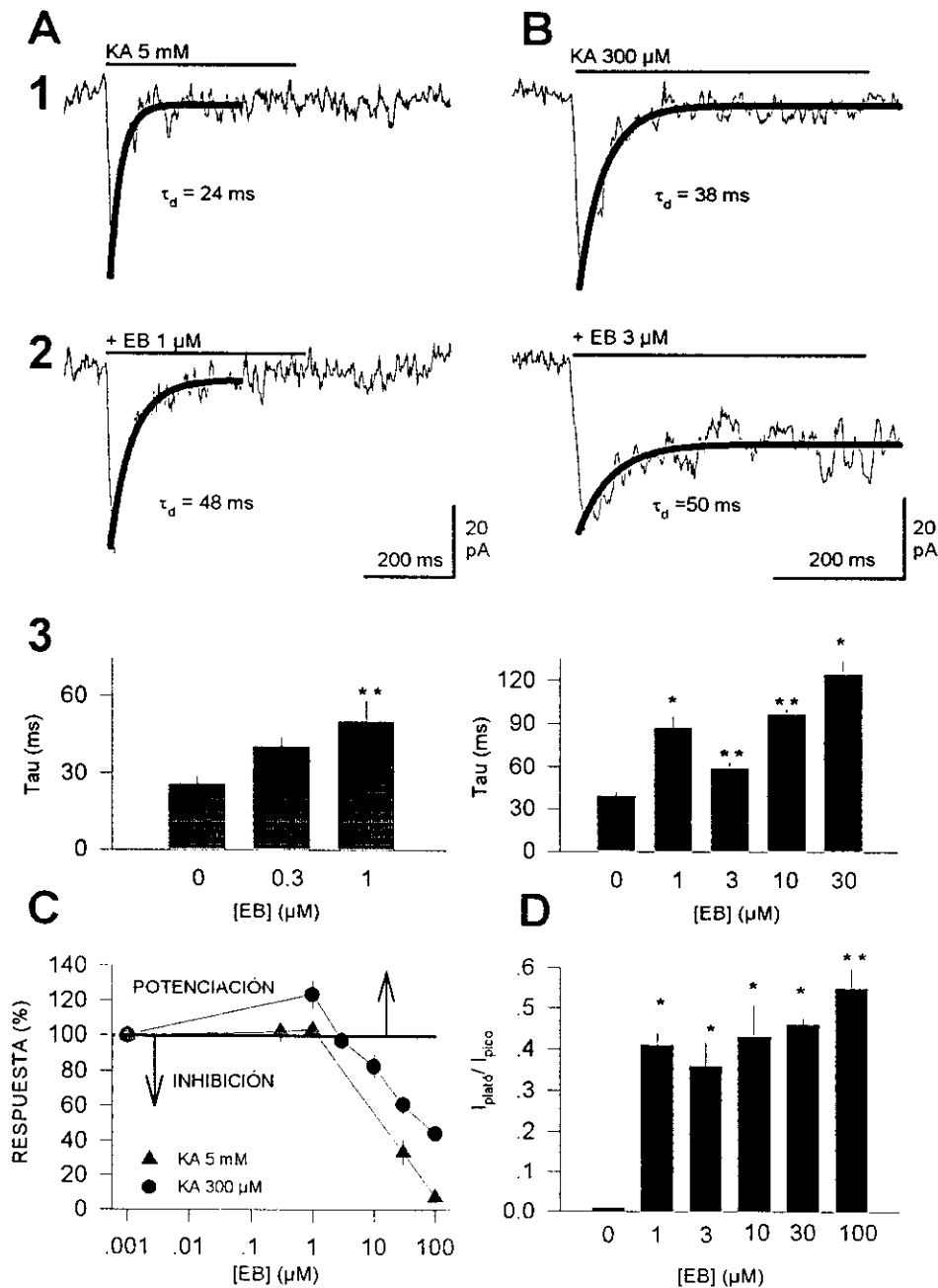


Figura 25. La corriente evocada por kainato durante la exposición de EB difiere del control en la τ_d y en la relación de la corriente estacionaria y la corriente al pico. Corrientes evocadas por la rápida aplicación de 5 mM de kainato (A) ó 300 μ M (B), antes (A1, B1) y durante la exposición de EB (A2, B2). Las respuestas de los ejemplos se ajustaron a una exponencial que aparece superpuesta al registro con la τ_d indicada en cada caso. Las τ_d durante la exposición de EB incrementaron de forma dosis-dependiente (A3 y B3) (6-11 y 9-18 células para A3 y B3, respectivamente). C) Curva dosis-respuesta para EB sobre respuestas evocadas por kainato 300 μ M ó 5 mM. D) Decremento de la desensibilización durante la exposición de EB al perfundir 300 μ M de kainato (n = 6). Los valores de las gráficas representan la media \pm error estándar. Test de la t de Student- pareado significativamente diferente del control * p > 0.0005 y ** p < 0.07.

PROPIEDADES DE LAS CORRIENTES DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN LA LÍNEA R 110

Con el fin de determinar la presencia de otras conductancias en la línea R 110, en 32 células se estudiaron las corrientes dependientes de voltaje. Las células tuvieron un potencial de membrana en reposo de -58.3 ± 5.4 mV ($n = 25$). En nuestras condiciones de cultivo, la línea R 110 expresó diferentes tipos de corrientes de potasio dependientes de voltaje, no observándose la presencia de corrientes de sodio dependientes de voltaje en ninguna de las células registradas ($n = 10$).

En los experimentos que se describen a continuación, la concentración intracelular de potasio fue de 136 mM y la extracelular de 5 mM, pudiéndose calcular un potencial de equilibrio para dicho ión de aproximadamente -85 mV.

La aplicación de pulsos depolarizantes desde un potencial de reposo de -60 mV, a diferentes potenciales de membrana que variaron desde -50 mV a 90 mV, en incrementos de 20 mV, desenmascaró en todas las células registradas ($n = 18$) una corriente saliente que se activó a potenciales más positivos de -40 mV (-30 ± 10 mV), y que presentó escasa inactivación. Cuando el protocolo anterior se realizó desde un potencial de membrana de -110 mV, apareció superpuesta a la corriente anterior una corriente inactivante, que se desenmascaró al sustraer ambos componentes. Estas corrientes mostraron una relación I/V donde la conductancia aumentó según se depolarizó la célula (ver figura 26). Aunque no se estudiaron farmacológicamente estos canales, estas corrientes son compatibles debido a las soluciones utilizadas con corrientes de K^+ , y parecen corresponderse con un rectificador retardado (I_K), y una corriente tipo-A (I_A).

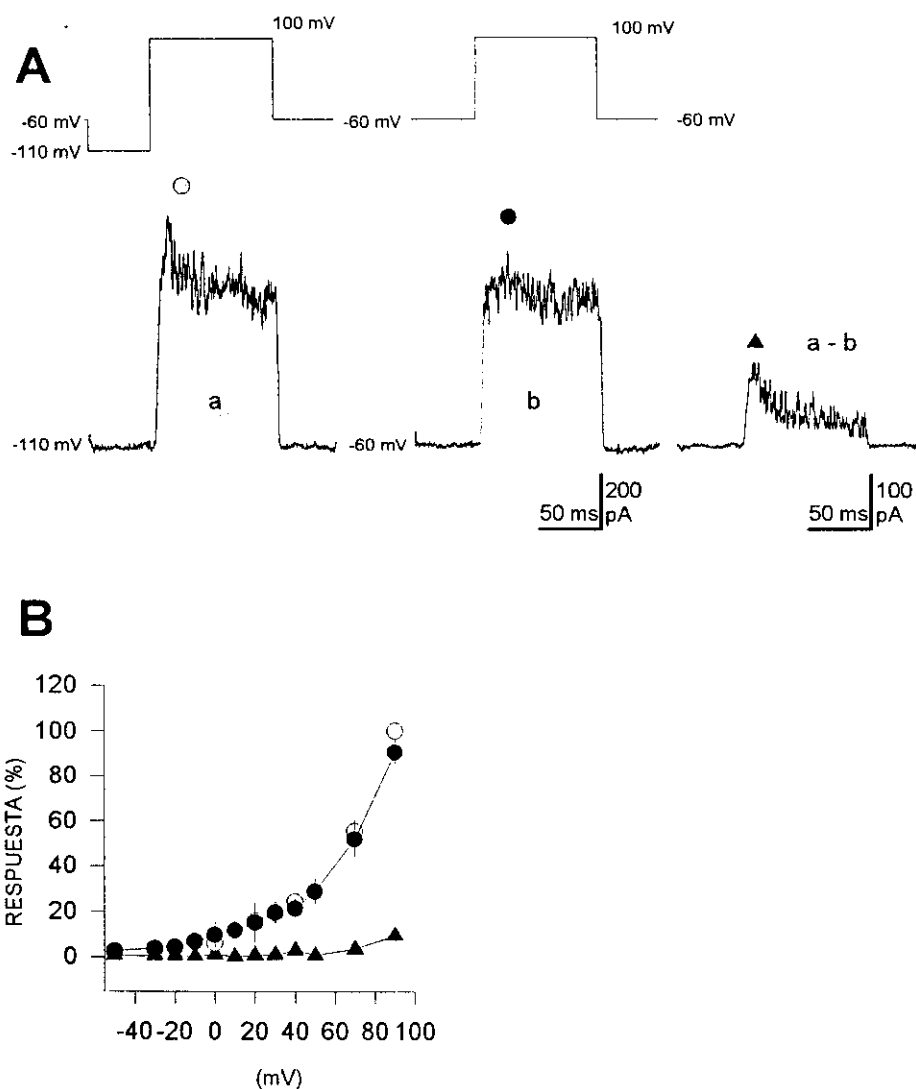


Figura 26. Corrientes voltaje dependientes de K^+ observadas en la línea R 110. A) La sustracción de ambos protocolos permitió desenmascarar ambos componentes. Estas corrientes podrían corresponderse con un rectificador retardado (I_K) y una corriente tipo-A (I_A). B) Normalización de las respuestas y presentación de ambos componentes ($n = 18$).

Con el fin de no bloquear los procesos dependientes de calcio, la concentración de EGTA se disminuyó en la pipeta de registro (0.1 mM). En estas condiciones se observó una corriente saliente que aumentó en amplitud en función del voltaje y la concentración extracelular de calcio, siendo más evidente a potenciales ≥ 50 mV (ver figura 28). En algunos parches, se pusieron de manifiesto eventos unitarios de gran conductancia, que podrían relacionarse con corrientes de potasio calcio dependientes I_{KCa} .

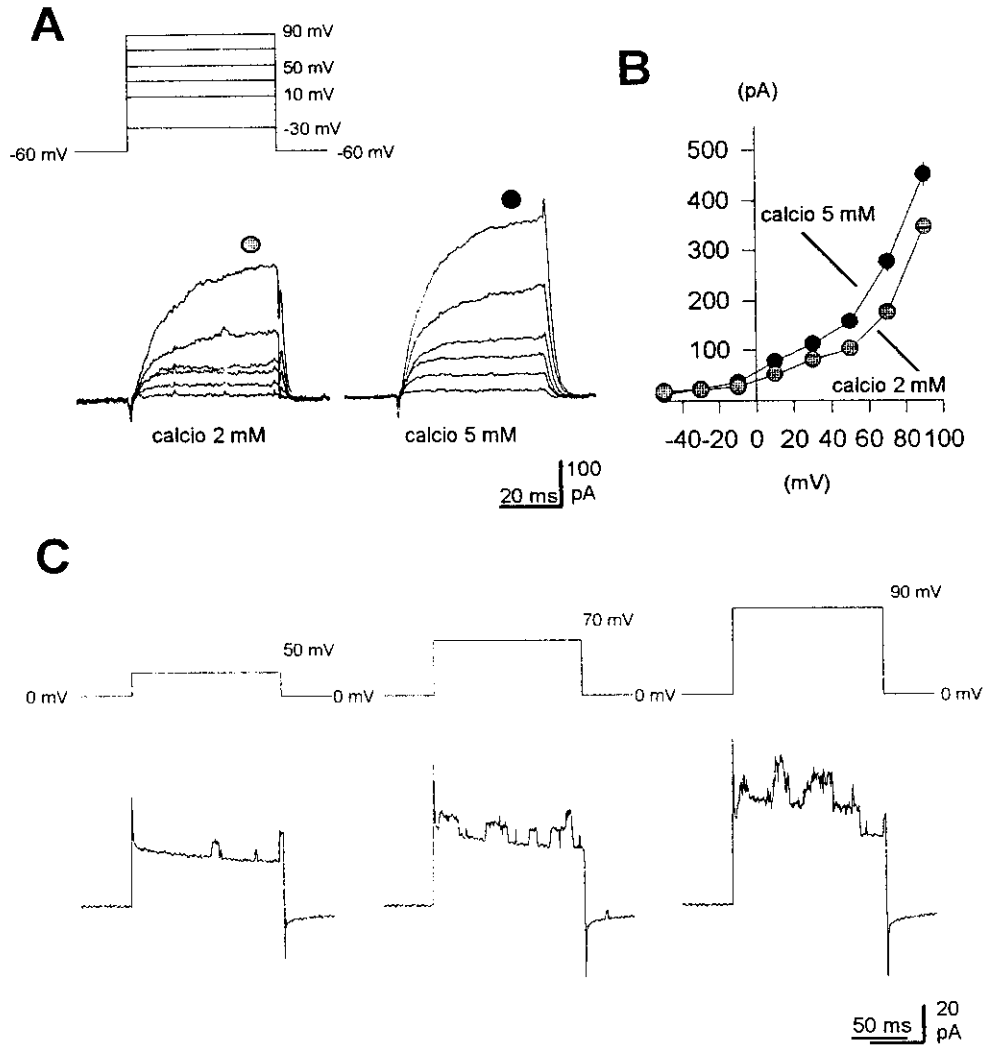


Figura 28. Corriente de potasio dependiente de calcio en la línea R 110. A) Obsérvese como al aumentar la concentración de calcio extracelular, aumenta la amplitud de la corriente. El aumento de la corriente fue dependiente de voltaje. B) La curva I/V fue construida con los valores de la corriente descrita. C) La frecuencia y la amplitud de los eventos únicos aumentaron al depolarizar la membrana.

La aplicación de pulsos hiperpolarizantes desde un potencial de reposo de -60 mV, a diferentes potenciales de membrana que variaron desde -60 a -150 mV, en incrementos de -10 mV, desenmascararon una corriente entrante en todas las células registradas (n = 12). Esta corriente se hizo obvia a potenciales de membrana próximos al potencial de equilibrio para el ión potasio, aumentando su amplitud a potenciales más hiperpolarizados, alcanzando su valor máximo alrededor de -150 ± 10 mV. A potenciales muy hiperpolarizados (≤ -120 mV), la

corriente mostró cierto grado de inactivación (ver figura 29). Aunque no se estudió farmacológicamente, esta corriente se correspondería con un rectificador de entrada I_{KIR} .

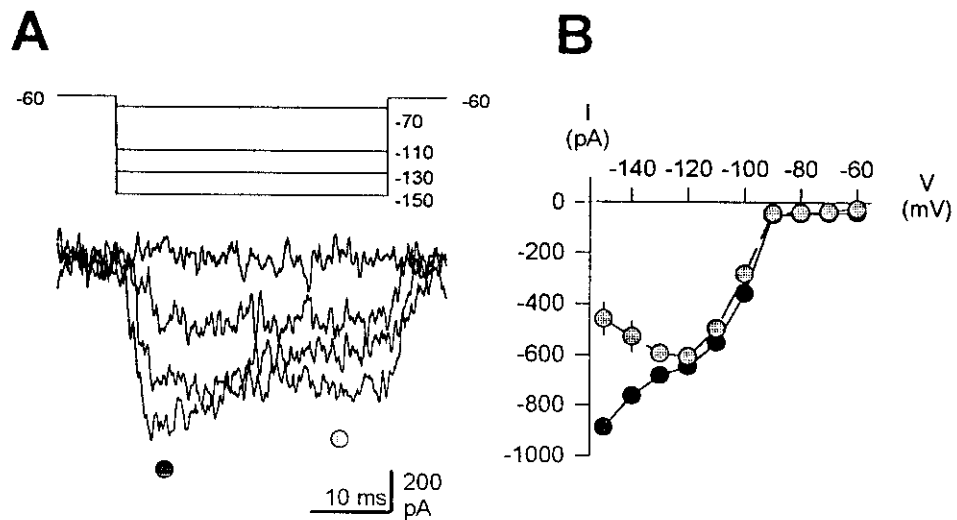


Figura 29. Corriente I_{KIR} en células R 110. A) Activación e inactivación de la corriente I_{KIR} desde -60 mV. B) I/V con la representación de todos los valores.

Estos resultados indican que las células de la línea R 110 expresan canales de potasio del tipo I_K , I_A , I_{KCa} e I_{KIR} , los cuales han sido igualmente encontrados en oligodendrocitos (para revisión ver: Sontheimer, 1994).

IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN FENÓMENOS DE MUERTE CELULAR

MUERTE CELULAR EN LA LÍNEA R 110

Existen numerosas evidencias indicando que los receptores ionotrópicos glutamatérgicos de AMPA y de NMDA están involucrados en la muerte neuronal excitotóxica asociada a diversas patologías del SNC (para revisión ver: Meldrum y Garthwaite, 1990). Sin embargo, no existen datos concluyentes acerca de que los receptores de kainato puedan o no desempeñar un papel en este tipo de procesos. Ello es debido principalmente a la carencia de agonistas específicos de estos receptores y al hecho de que los receptores de kainato y AMPA son coexpresados en las mismas células. Como se ha demostrado anteriormente, la línea R 110 únicamente expresa receptores de kainato, por lo que representa un buen modelo para determinar si la activación continuada de los receptores de kainato conlleva o no fenómenos de excitotoxicidad.

En un primer ensayo se evaluó la mortalidad celular inducida por kainato 20 μ M y domoato 2 μ M aplicando pulsos de distinta duración (1 y 12 h), estimándose la muerte celular a las 24 h del inicio del pulso. Los resultados pusieron de manifiesto una reducción del número de células vivas en los pocillos tratados respecto a los controles, y un mayor porcentaje de mortalidad con domoato ($16.1 \pm 1.2\%$; $34.7 \pm 0.4\%$, para 1 h y 12 h de exposición, respectivamente) que con kainato ($11.2 \pm 0.3\%$; $26.1 \pm 5.9\%$, para 1 h y 12 h de exposición, respectivamente) en los dos tiempos ensayados (ver anexo, tabla 2). Tras este primer ensayo el resto de los experimentos se realizaron con domoato.

La mortalidad celular se valoró con ioduro de propidio/acetato de fluoresceína (Fda/PI) y con azul tripano. El marcaje con azul tripano no fue homogéneo por toda la superficie celular, existiendo células parcialmente teñidas. Para comprobar si éstas últimas se correspondían con células muertas o no, se realizaron experimentos donde se valoró la muerte celular por los dos métodos anteriormente descritos. La mortalidad celular obtenida por ambas técnicas fue semejante, descartándose la posibilidad de artefacto en la tinción y considerándose a las células parcialmente teñidas como muertas.

Para verificar si el medio de cultivo ejercía alguna influencia sobre las características y los porcentajes de mortalidad celular encontrados, se realizaron experimentos con células crecidas en medio de cultivo con y sin suero. Las células se sembraron con suero en ambos casos para facilitar su adhesión a la placa. Una vez adheridas, se sustituyó el medio con suero por otro sin suero, y se mantuvieron en estas condiciones 48h antes de realizar el ensayo. La proporción de células con diferente morfología (células de tipo fusiforme y células globosas) se conservó en los pocillos mantenidos sin suero. Las células globosas aparentemente no modificaron su morfología, mientras que las de tipo fusiforme se alargaron y estrecharon respecto a las mantenidas con suero. Este fenómeno fue reversible, la adición de suero en el medio de cultivo revirtió el efecto observado.

El efecto excitotóxico de domoato en los ensayos sin suero fue semejante (ver anexo, tabla 4). Por tanto, la presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo no modificó significativamente los porcentajes de mortalidad observados.

La exposición transitoria de domoato (10 μ M) produjo porcentajes mayores de mortalidad según se fue aumentando el tiempo de exposición al agonista (ver anexo, tabla 3). Este aumento alcanzó hasta un 80% ($82.9 \pm 1.3\%$, a las 48h) (ver anexo, tabla 4) al mantenerse de una forma continuada la exposición de domoato. Tal incremento siguió un curso temporal que pudo ajustarse a una exponencial cuya constante de tiempo fue de 8.3 h (ver figura 30A). En concordancia con estos datos, los pulsos de domoato de 3 h, 6 h o 48 h evidenciaron igualmente un incremento del número de células muertas, cuando ello se evaluó a las 48 h desde el inicio del pulso (ver figura 30B).

Con la exposición de domoato (10 μ M), se observaron diferencias de morfología celular entre los pocillos tratados y los controles. En los primeros, las células crecieron agrupadas, presentaron un aspecto redondeado no turgente, con pérdida de prolongaciones y condensación nuclear, mientras que en los controles el crecimiento celular fue homogéneo, sin cambios morfológicos evidentes. Estos cambios fueron más evidentes al aumentar el tiempo de exposición del agonista.

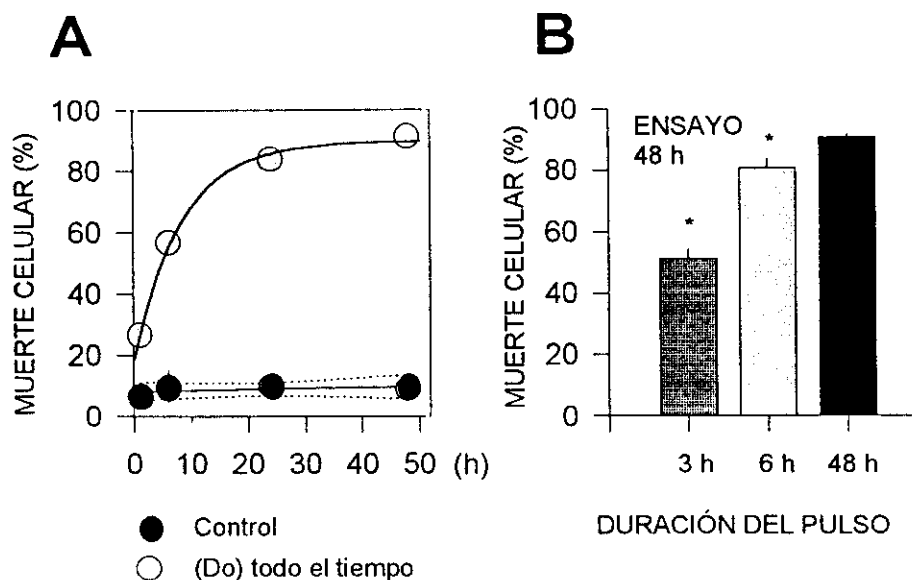


Figura 30. La mortalidad celular en la línea R 110 fue tiempo de exposición dependiente. A) Evolución de la mortalidad con el tiempo de exposición al agonista (domoato 10 μ M). La mortalidad creció exponencialmente con el tiempo de exposición. La curva superpuesta corresponde a un proceso exponencial, que presentó una constante de tiempo (83% de mortalidad) de 8.3 horas. B) La exposición transitoria de domoato evaluada a las 48 h de la exposición evidenció menor mortalidad que la obtenida en la exposición continuada de domoato. (*) Test de la t de Student-pareado ($p < 0.1$).

MORTALIDAD CELULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS TIPO II

En cultivos primarios de astrocitos de rata, se han descrito la presencia de receptores funcionales tanto de AMPA como de kainato. Por ello, se estudió el posible papel excitotóxico de los receptores de kainato en este tipo celular glial no oligodendrocítico.

Para diferenciar la toxicidad mediada por cada tipo de receptor, ésta se valoró mediante la aplicación de domoato en presencia de GYKI 52466 y GYKI 53655, antagonistas de los receptores de AMPA.

Los resultados indicaron una cierta toxicidad intrínseca para las 2,3 benzodiazepinas, ligeramente mayor para GYKI 53655 que para GYKI 52466 (ver figura 31). Los pocillos

incubados con GYKI 53655 mostraron un 5% más de mortalidad que los tratados con GYKI 52466 ($10.2 \pm 1.1\%$) (ver anexo, tabla 5). La mortalidad mediada por activación del receptor de AMPA se pudo calcular en el 34.8% (utilizando el GYKI 52466), mientras que cuando se utilizó GYKI 53655 fue del 34%.

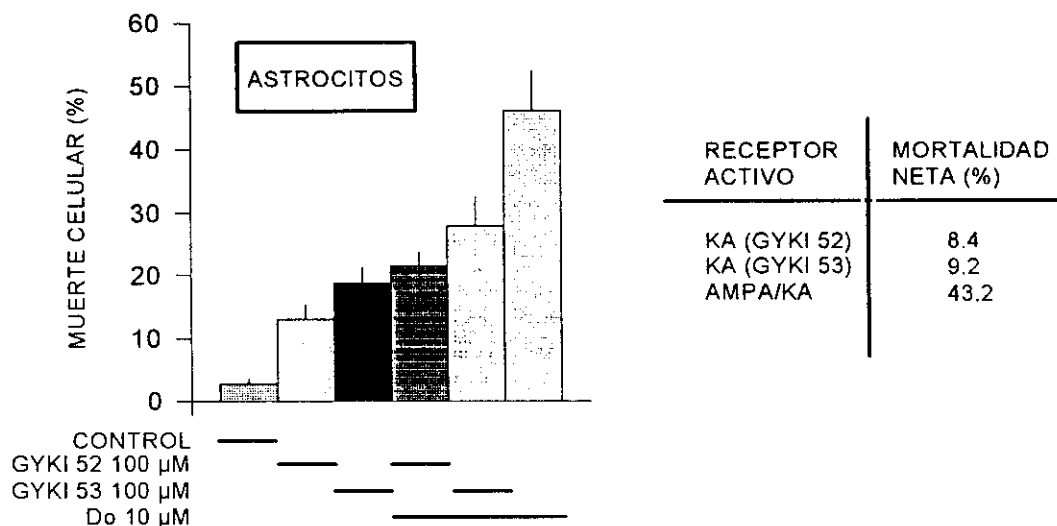


Figura 31. Efecto de un pulso de domoato en un cultivo primario de astrocitos. Los valores corresponden a la media \pm el error estandar. Todos los pulsos tuvieron una duración de 3h y la valoración se realizó a las 24h del inicio del pulso. A la derecha se indica la mortalidad neta calculada inducida por la activación de cada tipo de receptor.

La mortalidad global del cultivo fue mayor que la observada en la línea R 110 en estas mismas condiciones (43.2% y 25.3%, para astrocitos y células R 110 respectivamente) (ver anexo, tabla 3), pero menor si únicamente se compara la mortalidad estimada mediada por el receptor de kainato (9.2%).

Tras la incubación con domoato, las células se presentaron edematosas con aspecto granuloso. La tinción nuclear desenmascaró algún núcleo picnótico y una fluorescencia puntiforme más acusada.

MORTALIDAD CELULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO

Para comprobar si la activación selectiva de los receptores de kainato ejerce un efecto semejante en neuronas, se realizaron experimentos similares en cultivos primarios de neuronas de hipocampo, que expresan receptores funcionales de NMDA, AMPA y kainato (Lerma y cols, 1993).

Con el fin de valorar el porcentaje de mortalidad celular generado por cada tipo de receptor, los agonistas utilizados (glutamato y domoato) fueron añadidos sólo o coaplicados con antagonistas específicos de estos receptores a concentración saturante, D-2-amino-5-fosfonovalerato (APV) 100 μ M, para antagonizar el receptor de NMDA, y GYKI 52466 ó 53655 100 μ M, para el receptor de AMPA. Todos los ensayos se realizaron aplicando un pulso de agonista de 3 h de duración cuyo efecto se valoró a las 24 h del inicio del pulso, como se había realizado anteriormente en los cultivos de astrocitos. La mortalidad provocada por la activación de los receptores NMDA, AMPA y kainato se evaluó utilizando la tinción de azul tripano o la tinción FdA/PI, valorándose también en algunos ensayos la apariencia nuclear mediante la tinción de Hoesch 33342 (ver materiales y métodos 4).

Los cultivos neuronales fueron más sensibles al pulso de domoato que la línea R 110 o los astrocitos (ver anexo, tabla 7). La mortalidad celular fue próxima al 70% cuando no se añadió ningún tipo de antagonista. La adición de antagonistas redujo la mortalidad celular. En este sentido, tanto la adición de GYKI 52466 como la de APV fueron capaces de prevenir en gran medida la muerte neuronal, siendo la combinación (APV + GYKI 52466) la más efectiva (ver figura 32 y anexo, tablas 6 y 7).

En estos experimentos se calculó también la mortalidad neta para cada uno de los receptores activados en neuronas. Esto se hizo sustrayendo los valores promedio de las células muertas encontradas en presencia de los antagonistas GYKI 52466 y APV (sólos o coaplicados). Así, la mortalidad inducida por la activación del receptor de kainato fue calculada a partir de la sustracción de los valores (APV + GYKI 52466 + agonista) - (APV + GYKI 52466) (ver anexo, tablas 6 y 7). De la misma forma, se realizaron cálculos parecidos

para obtener la mortalidad inducida por la activación de los receptores de NMDA, y de los receptores de AMPA junto con la fracción no bloqueada de los receptores de kainato. Al restar de éstos, los porcentajes de mortalidad observados en (APV + agonista) - (APV), se obtuvo la mortalidad inducida por la activación de los receptores de AMPA y de kainato, y finalmente al sustraer (GYKI 52466 + agonista) - (GYKI 52466) se pudo obtener la mortalidad inducida por los receptores de NMDA y de la fracción no bloqueada de los receptores de kainato (\ll KA).

Cuando se utilizó glutamato (GLU 10 μ M) como agonista, se obtuvo aproximadamente un 41% de mortalidad mediada por el receptor de NMDA, un 30% por el receptor de AMPA y un 4.7% por el receptor de kainato (ver anexo, tabla 6). Al usar domoato (Do 10 μ M), la mortalidad mediada por la activación del receptor de AMPA o del receptor de kainato fue semejante a la observada con glutamato (32% y 3.6%, respectivamente). Sin embargo, se encontró un componente resistente (\cong 16%) al antagonismo total del receptor de AMPA y parcial del receptor de kainato por GYKI 52466 que era sensible a APV (ver figura 32 y anexo, tabla 7). Esto podría deberse a que domoato podría inducir la liberación de glutamato que actuaría como agonista del receptor de NMDA. Es necesario señalar que al utilizar GYKI 52466 en los cálculos se estima que un 20% del receptor de kainato es bloqueado inespecíficamente (Paternain y cols, 1995), lo que ocasiona una subvaloración del efecto tóxico de los receptores de kainato.

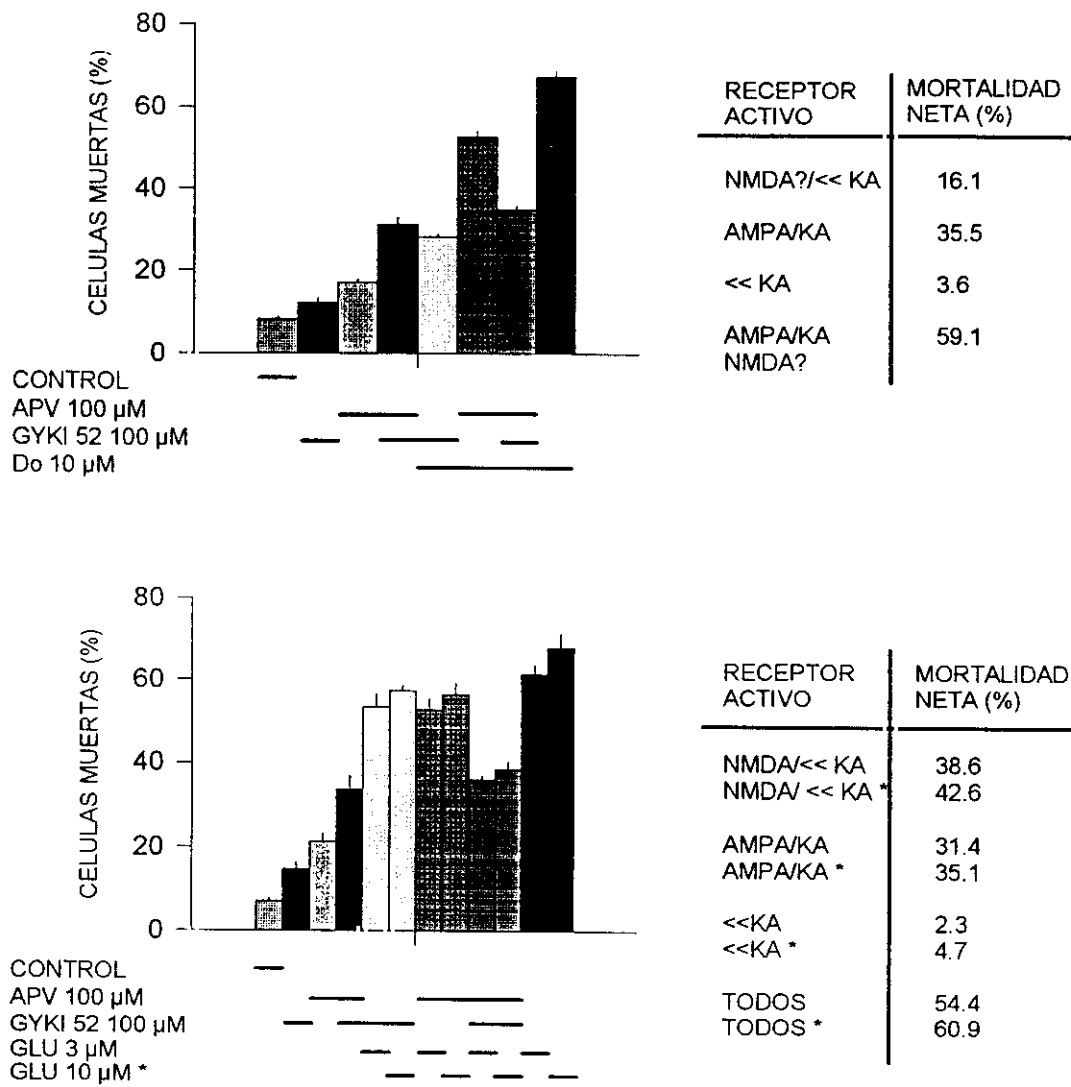


Figura 32. Mortalidad mediada por receptores glutamatérgicos en un cultivo de neuronas de hipocampo. Efecto de un pulso de Do (10 μM) y de glutamato (3 y 10 μM) en presencia y ausencia de antagonistas. A la derecha relación de la mortalidad mediada por cada tipo de receptor. Obsérvese como disminuye la mortalidad mediada por el receptor NMDA cuando se utiliza domoato como agonista (16.1%). Los valores fueron la media ± el error estándar. Todos los pulsos tuvieron una duración de 3h y la valoración se realizó a las 24h del pulso. (*) indica los porcentajes mediados por GLU 10 μM. (<<KA) receptor de kainato resistente a la acción de GYKI 52466.

Este tipo de ensayos también se realizaron en presencia de GYKI 53655, antagonista específico no competitivo del receptor de AMPA ($IC_{50} = 0.9 \mu M$) que no afecta al receptor de kainato (Paternain y cols, 1995). Los resultados revelaron que GYKI 53655 fue altamente tóxico en cultivos neuronales (ver figura 33B y anexo, tabla 8) y no produjo el nivel de protección esperado. Sin embargo, dada su utilidad para diferenciar los receptores tipo AMPA y tipo kainato, se realizaron experimentos para averiguar si este compuesto poseía una toxicidad intrínseca o no. Para descartar una toxicidad impuesta por el solvente (CIH), se realizaron ensayos a concentraciones diez veces menores (GYKI 53655 $10 \mu M$). Los porcentajes de mortalidad en los pocillos donde se valoró la toxicidad de GYKI 53655 fueron similares en ambas concentraciones (ver figura 33B y anexo, tabla 8), descartándose esta hipótesis.

La toxicidad asociada a este compuesto se evaluó en cultivos primarios de astrocitos (ver toxicidad en astrocitos) y en células 293 HEK. La incubación de GYKI 53655 ($100 \mu M$) en células 293 HEK, línea celular de origen no neural donde no existen receptores sensibles a glutamato, en cultivos a alta y a baja densidad, no indujo toxicidad alguna, siendo la mortalidad menor del 6% ($3.6 \pm 0.4\%$ en los controles y $5 \pm 0.4\%$ y $4.5 \pm 0.3\%$ en los tratados con GYKI 53655 $100 \mu M$ y Do $10 \mu M$, respectivamente; $n = 6$) (ver figura 33A). La baja mortalidad observada en estos sistemas sugiere otro tipo de mecanismo de toxicidad.

En estos ensayos, la adición de medio con una concentración alta de K^+ extracelular ($K^+ 45 mM$) 30 minutos después del pulso, descrita como protector neuronal, redujo un 5% la mortalidad en los pocillos previamente tratados con GYKI 53655 y casi un 10% los previamente tratados con (APV + GYKI 53655 + Do).

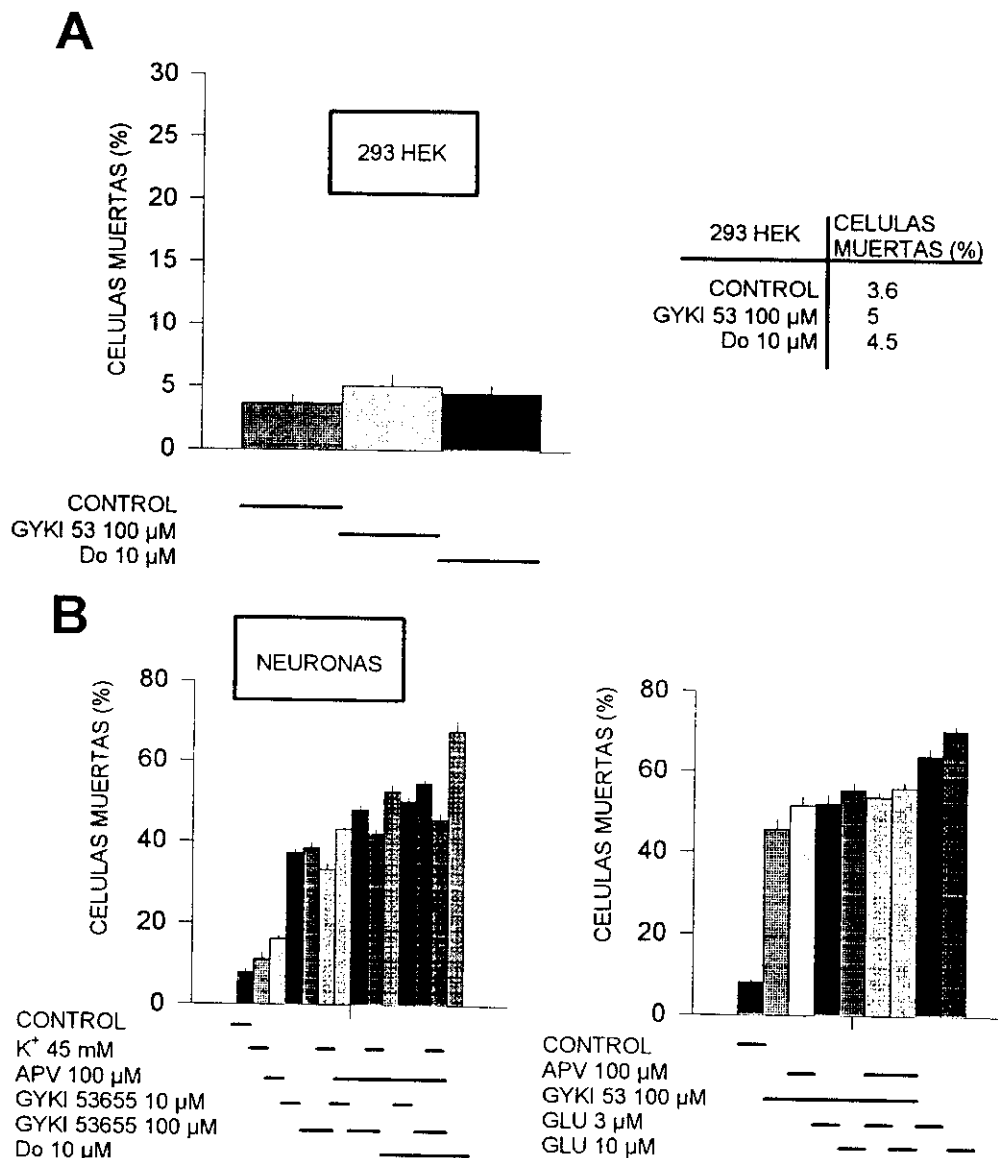


Figura 33. GYKI 53655 fue altamente tóxico en cultivos de neuronas de hipocampo e inerte en células 293 HEK. A) GYKI 53655 no tuvo ningún efecto en la línea 293 HEK. B) En neuronas fue altamente tóxico, la adición de (K⁺ 45 mM) 30 minutos después del pulso de domoato redujo los porcentajes de mortalidad observados en los cultivos neuronales. Los valores fueron la media ± el error estándar. Todos los pulsos tuvieron una duración de 3h y la valoración se realizó a las 24h del pulso.

Morfológicamente las neuronas tratadas con APV o GYKI 52466 presentaron una apariencia semejante a los controles. Se apreció una ligera turgencia, conservándose intactas las prolongaciones. Las neuronas tratadas con GYKI 53655 mostraron menos

prolongaciones y más delgadas, o carecieron de ellas, presentando somas redondeados de menor tamaño y con apariencia granulosa. Las neuronas incubadas con glutamato y domoato presentaron un aspecto semejante al descrito anteriormente. La condensación de la cromatina y la fragmentación de la membrana celular fue visible por fluorescencia utilizando el reactivo Hoechst 33342. Las células tratadas con glutamato y domoato mostraron una fluorescencia más intensa que los controles (condensación de la cromatina), picnosis y algún cuerpo apoptótico (ver anexo, tabla 9). Si se relacionan los datos de mortalidad obtenidos en la tabla 6 con la diferente actividad nuclear observada en la tabla 9, se podría suponer que algunas de las células que presentaron mayor actividad nuclear serían susceptibles de recuperación, ya que la suma de los porcentajes de los grupos, mayor actividad nuclear, picnosis y cuerpos apoptóticos, fue superior a la mortalidad total observada.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Muchas de las características conocidas de las células gliales están presentes en los gliomas (ver Barres y cols, 1990; Sontheimer, 1994; Brismar, 1995). Los canales expresados por los oligodendrocitos varían dependiendo de la especie, estado de desarrollo y medio de cultivo utilizado. En el proceso de maduración, los oligodendrocitos sufren cambios drásticos en su patrón de expresión. Los precursores expresan canales de sodio (I_{Na} , I_{NaH}), de calcio (tipo L y tipo T), canales de cloro y numerosos tipos de canales de potasio (I_K , I_A , $I_{K(Ca)}$), que pierden al diferenciarse (Sontheimer y cols, 1989). Así, en oligodendrocitos adultos no se encuentran canales de sodio voltaje dependientes, ni canales de calcio (que son remplazados por canales I_{KIR}) y disminuyen las corrientes de potasio salientes (Sontheimer y cols, 1989). La expresión de receptores funcionales también se ve afectada durante el desarrollo. Así, la densidad de los receptores GABA_A disminuye unas 100 veces durante el desarrollo (Blankenfeld y cols, 1991), y los receptores de glutamato descritos en precursores (Gallo y cols, 1994; Barres y cols, 1990) no se han observado en oligodendrocitos.

En este sentido, la línea R 110, glioblastoma multiforme primitivo, posiblemente de origen oligodendrocítico, como indica su inmunopositividad para proteína básica de mielina (MBP) y vimentina (Matute y cols, 1992), en nuestras condiciones de cultivo, expresó diferentes tipos de canales de potasio (I_K , $I_{K(Ca)}$, I_{KIR}), que coexisten con receptores funcionales de kainato. *In vivo*, los receptores glutamatérgicos parecen controlar la proliferación y la maduración de las células gliales, modulando el desarrollo celular en el SNC.

Los receptores glutamatérgicos presentes en la línea R 110 generaron respuestas evocadas por kainato que sufrieron una rápida y total desensibilización, siendo la recuperación de la desensibilización de estas respuestas considerablemente lenta. Otros agonistas como glutamato, quisqualato o domoato también fueron capaces de activar la misma población de receptores selectivos para kainato, como demostraron los experimentos

de desensibilización cruzada del receptor. El agonista de los receptores de AMPA, S-AMPA, fue incapaz de generar respuestas medibles, incluso a concentraciones de 1 mM. Características similares han sido encontradas en receptores recombinantes homoméricos GluR6 (Egebjerg y cols, 1991). La coaplicación de AMPA y kainato produjo una ligera reducción de la respuesta (\cong 14%), igualmente observado en el receptor humano EAA4 (homomérico GluR6) (Hoo y cols, 1994). El agonista NMDA, específico de los receptores de NMDA, tampoco fue capaz de producir respuestas, resultado esperable por el origen glial de esta línea celular.

Los receptores selectivos para kainato en la línea R 110 presentaron una relación I/V con una fuerte rectificación entrante. La rectificación de los receptores GluR6 depende de la presencia o ausencia de subunidades editadas en el sitio Q/R. Así, los receptores no editados (Q) muestran rectificación entrante, mientras que los editados (R) presentan cierta rectificación saliente. Recientemente se ha demostrado que la rectificación está originada por un bloqueo dependiente de voltaje, debido a poliaminas intracelulares (Kamboj y cols, 1995; Koh y cols, 1995; Bowie y Mayer, 1995). La afinidad de las poliaminas por el receptor de kainato depende del aminoácido presente en el sitio Q/R, siendo mayor para los receptores no editados (Q). A potenciales de membrana moderadamente positivos, entre 10 y 50 mV, las poliaminas entran en el poro bloqueándolo, necesitándose potenciales mucho más positivos para que las poliaminas puedan permear por el canal y se restaure el flujo iónico. Por las evidencias anteriores cabría suponer que el receptor selectivo para kainato estudiado en la línea R 110 estaría formado exclusivamente por subunidades GLuR6(Q). En concordancia con ello, la determinación de las subunidades expresadas en la línea R 110 por la técnica de RT-PCR, puso de manifiesto la existencia de subunidades GluR6 no editadas en el segmento M2, y editadas y no editadas, en el segmento M1.

Por consiguiente, estos resultados determinan que los receptores funcionales expresados por la línea R 110 son receptores compuestos por subunidades GluR6(Q), con todas las posibilidades de edición en el dominio M1.

La permeabilidad a calcio del receptor de kainato en receptores homoméricos GluR6 se ha relacionado con los sitios de edición descritos no sólo en el dominio M2 sino también en

el M1. Los estudios de Khöler y colaboradores (1993) en células HEK transfectadas con las diversas subunidades GluR6, explican la permeabilidad a calcio de estos receptores en función del grado y tipo de edición. Así, los homómeros GluR6(R) presentan los mayores valores de permeabilidad a calcio, mientras que los homómeros GluR6(Q) con diverso grado de edición en el M1 muestran baja permeabilidad. Los heterómeros (VCQ/VCR) presentan la menor permeabilidad de las observadas. Por el contrario, al estudiar la corriente fraccional de calcio en células 293 HEK transfectadas con subunidades GluR6 editadas y no editadas (Burnashev y cols, 1995), se observó que ésta también depende del grado de edición del dominio M2, pero de forma similar a la descrita para el receptor de AMPA, permeando más calcio las formas no editadas (Q) ($f = 1.55\%$) que las editadas (R) ($f < 0.2\%$). Cuando el dominio M1 no está editado la permeabilidad a calcio del no editado en M2 aumenta ligeramente (2%). Los receptores heterómeros con ambas formas presentan valores de permeación intermedios (0.58%). Estos experimentos están en clara contradicción con los resultados de Khöler y colaboradores, donde los receptores editados (R) eran los más permeables. Estas diferencias podrían explicarse por observación de la permeación de aniones, principalmente Cl⁻, en las formas R (Burnashev y cols, 1996) que contribuirían a la corriente total, sobreestimándose la permeabilidad a calcio observada. Aún así, la permeabilidad a iones Ca²⁺ descrita para los receptores de kainato es mucho menor que la observada con esta misma técnica en los receptores de AMPA formados por subunidades no editadas (3.2 - 3.9%). Los receptores de kainato de la línea R 110 mostraron cierta permeabilidad a Ca²⁺ ya que, cuando calcio fue el único ión permeante, éstos fueron capaces de generar corriente entrante. La fuerte rectificación de entrada impidió calcular el potencial de reversión y por tanto, valorar la permeabilidad del canal para este ión.

El receptor de kainato expresado en la línea R 110 mostró características similares a las descritas para el receptor presente en neuronas (Lerma y cols, 1993): (i) no fue activado por AMPA, (ii) las respuestas fueron totalmente desensibilizantes, (iii) la cinética de desensibilización fue rápida y con un curso temporal monoexponencial, (iv) la sensibilidad de este receptor fue baja para glutamato (EC_{50} de 335 μ M y 330 μ M, para R 110 y neuronas, respectivamente) pero alta para kainato (EC_{50} de 15 μ M y 22 μ M, para R 110 y neuronas, respectivamente), (v) presentaron el mismo tiempo de recuperación del receptor ($KA \cong 40$ s), (vi) presentaron una relación I/V con una marcada rectificación de entrada, y (vii) las

neuronas de hipocampo en cultivo también expresan altos niveles de la subunidad GluR6 (Ruano y cols, 1995).

En neuronas del ganglio de la raíz dorsal también se expresan receptores funcionales de kainato con respuestas desensibilizantes y una afinidad semejante para kainato ($EC_{50} = 15 \mu\text{M}$; Huettner, 1990), a la descrita en la línea R 110. Sin embargo, las respuestas de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal difieren de las registradas en la línea R 110 en: (i) ser activadas por AMPA con baja afinidad ($EC_{50} = 520 \mu\text{M}$), (ii) presentar una cinética de desensibilización lenta y con un curso temporal biexponencial en respuesta a kainato, y (iii) presentar una relación I/V aproximadamente lineal. Al estudiar la composición molecular de las subunidades del receptor de kainato expresadas por estas neuronas, se demuestra la existencia de altos niveles de expresión para las subunidades GluR5 (Bettler y cols, 1990) y KA2 (Herb y cols, 1992). Estas subunidades más que GluR6, serían las que formarían los receptores funcionales en las células de la raíz dorsal.

Ha sido descrito recientemente que tanto los astrocitos, como los precursores gliales (células O-2A) y la línea CG4 expresan receptores de kainato (Patneau y cols, 1994). Estos receptores posiblemente estén compuestos por subunidades GluR6 y KA2, ya que estas células expresan altos niveles de estas subunidades y bajos niveles de GluR7 y KA1. Las respuestas en células gliales se caracterizan por: (i) presentar respuestas desensibilizantes rápidas, (ii) exhibir una alta afinidad para kainato ($EC_{50} = 5 \mu\text{M}$) y una muy baja afinidad para AMPA, (iii) presentar una recuperación de la desensibilización lenta (unos 60 s), y (iv) mostrar una relación I/V con rectificación de entrada, consecuente con la presencia de subunidades GluR6(Q) (Patneau y cols, 1994; Pulchalski y cols, 1994). La coexpresión de subunidades KA1 y KA2 con la subunidad GluR6 confiere nuevas propiedades al receptor como una débil sensibilidad a AMPA (Herb y cols, 1992).

Al estudiar la farmacología del receptor de kainato expresado en la línea R 110, se demostró que estos receptores fueron completamente insensibles a CTZ. No observándose ni potenciación de la amplitud de la respuesta, ni reducción en el grado de desensibilización. Estos mismos resultados han sido referidos en neuronas de hipocampo en cultivo (Paternain y

cols, 1996), neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Wong y Mayer, 1993; Wilding y Huettnner, 1995), progenitores de células gliales y receptores recombinantes GluR6 (Partin y cols, 1993; Patneau y cols, 1994). La ligera inhibición de la respuesta medida por CTZ al pico encontrada en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Wong y Mayer, 1993) y en células 293 HEK transfectadas con receptores de kainato (Partin y cols, 1993) no fue evidente en la línea R 110.

En neuronas de hipocampo que no presentan receptores tipo AMPA, las respuestas de kainato fueron inhibidas reversiblemente por CNQX, antagonista competitivo de los receptores de AMPA. La potencia de este inhibidor ($IC_{50} \leq 6.1 \mu\text{M}$ para KA 300 μM ; Paternain y cols, 1996) es semejante al descrito para el receptor humano EAA4 ($IC_{50} = 4.3 \mu\text{M}$ para KA 1 mM; Hoo y cols, 1994) y para las neuronas del ganglio de la raíz dorsal ($IC_{50} = 2 \mu\text{M}$ para GLU 100 μM ; Huettnner 1990). En la línea CG4 concentraciones de CNQX de 30 μM son capaces de reducir considerablemente la respuesta de kainato (Gallo y cols, 1994). La línea R 110 también presentó inhibición reversible de la respuesta de kainato en presencia de CNQX, pero este compuesto tuvo menor potencia ($IC_{50} = 38.5 \mu\text{M}$ para KA 300 μM). Este resultado podría explicarse por la homogeneidad del receptor únicamente formado por subunidades GluR6 poco sensibles al CNQX (Bettler y Mülle, 1995).

Las respuestas de kainato fueron también inhibidas por altas concentraciones de GYKI 52466 (IC_{50} de 281 μM). Esta potencia fue semejante a la descrita en neuronas del ganglio de la raíz dorsal ($IC_{50} > 200 \mu\text{M}$; Wilding y Huettnner, 1995), pero mayor que la observada en neuronas de hipocampo ($IC_{50} = 450 \mu\text{M}$; Paternain y cols, 1995).

La incubación con ConA de las células R 110 produjo la potenciación de la respuesta al pico de glutamato (1.5 - 2 veces) al reducirse la desensibilización de las respuestas. Esta potenciación de las respuestas de glutamato por ConA en los receptores de kainato es comparable a la potenciación de las respuestas por CTZ en los receptores de AMPA (aproximadamente 100 veces) (Partin y cols, 1993). Aunque se desconoce el mecanismo molecular implicado en la inhibición de la desensibilización, parece estar relacionado con su unión directa a los residuos glucídicos situados en los dominios extracelulares del receptor, siendo este efecto mayor cuanto mayor es el número de posibles sitios de glicosilación.

En neuronas de hipocampo en cultivo, la incubación con ConA invariablemente provoca una reducción de la respuesta pico (Wilding y Huettner, 1997), sin modificar la relación I/V.

En neuronas del ganglio de la raíz dorsal la incubación con ConA elimina completamente la desensibilización de las respuestas en la mayoría de las células, no alterándose ni la relación I/V, ni la afinidad del receptor por kainato ni domoato (Huettner, 1990). En la línea CG4, ConA aumenta la respuesta al pico de kainato aproximadamente un 230% y disminuye la desensibilización aproximadamente un 50%. Como en los casos anteriores no se observó ninguna variación ni en la afinidad del receptor por kainato, ni en la relación dosis-respuesta (Patneau y cols, 1994). En la línea R 110 la incubación con ConA previno un 60.2% la desensibilización de las respuestas de glutamato y aumentó un 70% la respuesta al pico, datos semejantes a los encontrados en células transfectadas. Al igual que en otras células con receptores de kainato anteriormente descritas, en la línea R 110 tampoco vió modificada tras la incubación con ConA, ni la relación dosis-respuesta para glutamato, ni la relación I/V.

Se desconoce el mecanismo de acción del EB. En experimentos realizados en células 293 HEK transfectadas con GluR6, se ha descrito una inhibición del 90% de la corriente en presencia de EB, acompañada de una disminución de la desensibilización del 10% (Raymond, 1995). Los mismos experimentos realizados en células pretratadas con ConA, no muestran este tipo de inhibición (Raymond, 1995). Estos resultados son semejantes a los observados en oocitos recombinantes GluR6 previamente tratados con ConA (Keller y cols, 1993), que sugerían que este receptor no era sensible a EB.

En neuronas de hipocampo que expresan receptores de kainato, la perfusión de EB produce efectos diferentes. En unas neuronas, EB abolió de forma reversible la respuesta de kainato, mientras que en otras, disminuyó la desensibilización y potenció la respuesta (Ruano y cols, 1995).

En la línea R 110 se observó un comportamiento celular diferente en presencia de EB según se perfundieran altas o bajas concentraciones de kainato. Así, a concentraciones saturantes de kainato, EB bloqueó la respuesta, mientras que a concentraciones menores (KA 300 μ M), EB potenció o inhibió la respuesta según la concentración de EB perfundida. En el receptor de AMPA en neuronas de hipocampo, se ha descrito una mayor potenciación de las respuestas a kainato en presencia de CTZ, cuanto menor es la concentración de kainato perfundida (Patneau y cols, 1993). De igual manera, también se ha descrito una interacción competitiva entre EB y CTZ en los receptores de AMPA (Price y Raymond, 1996), y aunque CTZ no tiene ningún efecto en los receptores de kainato, EB podría presentar un sitio de unión semejante a descrito en CTZ, observándose este efecto al unirse a receptor de kainato.

En la línea R 110 el efecto de EB fue sólo parcialmente reversible tras el lavado, al igual que se había descrito en neuronas talámicas (Lebmann y cols, 1992). En todas las respuestas, independientemente del efecto observado, se observó un enlentecimiento de la desensibilización dosis-dependiente, siendo este efecto más acusado cuando la concentración de kainato utilizada fue menor. Se desconoce si EB interactúa directamente con las regiones del receptor involucradas en la desensibilización o estas acciones son debidas a mecanismos alostéricos. En células transfectadas la naturaleza no competitiva y la relativa irreversibilidad, unido a los efectos en la desensibilización y en la cinética de recuperación del receptor sugieren que EB puede actuar modificando la conformación del estado abierto del canal y desplazar el equilibrio entre los estados abierto y desensibilizado (Price y Raymond, 1996).

IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN FENÓMENOS DE MUERTE CELULAR

Estudios de actividad revelan una fuerte correlación entre el potencial citotóxico y la potencia excitadora de los diferentes agonistas glutamatérgicos, sugiriendo una convergencia entre estos dos fenómenos. La toxicidad es consecuencia de una excesiva activación de los receptores, y ésta contribuye a la degeneración y posterior muerte celular. La vulnerabilidad celular depende entre otros factores de: (i) la concentración del agonista, (ii) el tiempo de

exposición, (iii) el tipo de receptor, (iv) la edad y el grado de diferenciación celular y por último (v) de la capacidad celular para neutralizar el aumento de la concentración de calcio intracelular.

En la línea R 110 la presencia exclusivamente de receptores homoméricos GluR6(Q) facilita la valoración de posibles implicaciones del receptor de kainato en procesos de muerte celular. Los experimentos demostraron una mortalidad significativa, dependiente del tiempo de exposición a kainato o domoato, relacionando de este modo, la activación del receptor de kainato en fenómenos de excitotoxicidad. La mortalidad observada fue mayor al utilizar domoato probablemente por generar respuestas parcialmente desensibilizantes al activar los receptores de kainato (Lerma y cols, 1993; Huettner, 1990; Hoo y cols, 1994).

La presencia o ausencia de suero en el medio puede modificar la expresión de canales iónicos en las células gliales en cultivo. En este sentido, el mantenimiento de la línea R 110 en ausencia de suero produjo un cambio reversible en la morfología de las células de tipo fusiforme. Sin embargo, la mortalidad observada en estos cultivos fue semejante a la descrita en cultivos con suero, concluyéndose que la mortalidad celular observada fue independiente de la presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo utilizado. Este resultado podría explicarse por una menor dependencia de estas células a los factores añadidos en el suero al medio de cultivo. Esto no ocurre en cultivos de astrocitos tipo II, donde la ausencia de suero favorece la expresión de una gran diversidad y densidad de corrientes de calcio en comparación con los encontrados en cultivos con suero (Barres y cols, 1990), o la ausencia de corrientes de sodio descritas en cultivos con suero (Barres y cols, 1990).

La mortalidad mediada por los receptores de NMDA y AMPA ha sido asociada a un aumento de la concentración del calcio intracelular. La presencia de cierta corriente en respuesta a kainato o domoato en la línea R 110 cuando calcio fue el único ión permeante es consecuente con la expresión de receptores homoméricos GluR6(Q), forma más permeable al ión calcio en recombinantes GluR6 (Burnashev y cols, 1995). Esta vía de calcio, abre la posibilidad de que la toxicidad mediada por este receptor de kainato

también pueda ser debida, como en los otros receptores glutamatérgicos, a un aumento de la concentración del calcio intracelular. Recientemente la activación por kainato en oligodendrocitos del nervio óptico también ha sido relacionada con la sobreexcitación de los receptores de kainato, acompañada de un aumento en la concentración de calcio intracelular (Matute y cols, 1997).

En la línea R 110, en presencia continuada de domoato la mortalidad neta máxima fue del 83%. Los valores experimentales en el tiempo se ajustaron a una exponencial cuya constante de tiempo fue de 8.3 h. Esto significa que en ausencia de cualquier otro receptor activado por domoato, la activación continuada del receptor de kainato puede llevar a la muerte celular. Los resultados presentados en esta memoria indican que tal activación produce la pérdida de elementos celulares, principalmente por necrosis.

Para corroborar si el efecto tóxico observado en la línea R 110 era mediado por la activación continuada de los receptores de kainato, se realizaron experimentos semejantes en cultivos primarios de astrocitos y de neuronas hipocámpicas. Ambos tipos celulares expresan esta clase de receptores (Lerma y cols, 1993; Patneau y cols, 1994). Para poder diferenciar la toxicidad mediada por cada tipo de receptor (NMDA, AMPA y/o kainato) se coaplicaron concentraciones saturantes de los diversos antagonistas disponibles. Es conocido que los astrocitos tipo II no expresan receptores de NMDA y sí receptores AMPA y kainato (Wyllie y cols, 1991). El porcentaje de muerte celular glial tras la exposición a domoato fue superior al valorado en la línea R 110, pero menor que el neuronal. La mayor mortalidad glial observada respecto a la línea R 110 es debida, sin duda, a la activación de los receptores tipo AMPA, dado que la coaplicación de antagonistas para este receptor disminuyó drásticamente el porcentaje de mortalidad observado.

La menor mortalidad glial respecto a los cultivos de neuronas de hipocampo podría explicarse por la ausencia de receptores NMDA y la menor densidad de receptores no-NMDA. Adicionalmente, la regulación más eficaz de los niveles de calcio intracelular por los astrocitos, podría ser otra causa.

En cultivos neuronales en presencia de glutamato la vulnerabilidad celular fue parcialmente prevenida por la presencia de APV y GYKI 52466. El GYKI 52466 ha sido descrito como neuroprotector en retinas embrionarias de pollo sobre la población de receptores no-NMDA, pero no ejerce ningún efecto protector sobre la población de receptores de NMDA (Zorumski y cols, 1993). Por el contrario, APV disminuyó la vulnerabilidad mediada por los receptores de NMDA, pero no produjo ningún efecto protector cuando se activó la población de receptores de AMPA y/o kainato. Ambos mecanismos explicarían nuestros resultados. De hecho, la combinación APV + GYKI 52466 fue la más protectora. Al utilizar domoato como agonista se observó un porcentaje de muerte semejante al descrito en presencia de glutamato tanto en la mortalidad global del cultivo, como en la mortalidad disparada por los receptores de AMPA y por los receptores de kainato. Sin embargo, la mortalidad mediada por el receptor de NMDA se vió altamente disminuida pero no eliminada. Este resultado es esperable al no ser sensible este receptor a domoato. La mortalidad residual observada podría explicarse por la existencia en el medio de glutamato, procedente de las células muertas por domoato, que activarían al receptor de NMDA. La densidad, el tipo de receptores funcionales y el agonista utilizado determinará la sensibilidad de la célula al daño excitotóxico. Las células más vulnerables serían aquellas que presenten todos los tipos de receptores. La suma de los porcentajes de mortalidad mediada para cada tipo de receptor fue mayor que la mortalidad global del cultivo. Esto indica que en nuestros cultivos, algunas neuronas coexpresaron los diferentes tipos de receptores.

El GYKI 53655, antagonista no competitivo con mayor afinidad para el receptor de AMPA (a una concentración 100 μ M bloquea totalmente el receptor AMPA sin afectar al receptor de kainato), no pudo utilizarse para diferenciar la mortalidad mediada por el receptor de kainato, por ser tóxico en cultivos neuronales (31% con una concentración de 100 μ M). La toxicidad de GYKI 53655 no parece intrínseca al compuesto, ya que su aplicación en otros cultivos no tuvo ningún efecto o bien fue moderado. Sin embargo, independientemente de la mortalidad global observada tanto en cultivos neuronales como astrocíticos, existió un pequeño porcentaje de mortalidad (4-10%) que no pudo justificarse como mortalidad mediada por el receptor de AMPA o por

el receptor de NMDA. Este porcentaje podría ser debido a la sobreactivación de los receptores de kainato.

En conjunto, estos resultados indican que los receptores de kainato podrían participar en procesos patológicos degenerativos como se ha descrito para los receptores de AMPA y de NMDA.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- La línea R 110 expresa exclusivamente una población funcional de receptores de glutámico, que son selectivos para kainato y que están formados de manera exclusiva por la subunidad GluR6(Q). Esta subunidad, sin embargo, está presente en varias formas que incluyen todas las posibilidades de edición en el dominio M1.

2.- La activación continuada del receptor de kainato puede desencadenar la muerte celular por fenómenos excitotóxicos.

ANEXO

R 110	T PULSO/T VALORACIÓN	MEDIA ± SEM (%)	n
CONTROL	1h/24h	4.03 ± 0.2	2
KA 20 µM	1h/24h	11.2 ± 0.3 *	5
Do 2 µM	1h/24h	16.1 ± 1.2 **	5
CONTROL	12h/24h	6.9 ± 0.6	2
KA 20 µM	12h/24h	29.1 ± 3.2 *	5
Do 2 µM	12h/24h	34.7 ± 0.4 **	5

Tabla 2. Ensayo mortalidad celular con kainato y domoato en la línea R 110. Los ensayos se realizaron en medio con suero. Test de la t de Student-pareada, significativo respecto al control * $p < 0.5$ y ** $p = 0.01$.

R 110	T PULSO/T VALORACIÓN	MEDIA ± SEM (%)	n
CONTROL	Todos los tiempos	11.8 ± 0.8	25
Do 10 µM	1h/1h	27.1 ± 2 ***	4
Do 10 µM	1h/24h	31.2 ± 1.8 ***	4
Do 10 µM	1h/96h	48.2 ± 3.5 **	4
Do 10 µM	1h/120h	57.7 ± 2.5 *	4
Do 10 µM	3h/3h	29.4 ± 1.1 ***	4
Do 10 µM	3h/24h	37.1 ± 2.6 *	8
Do 10 µM	3h/48h	51.4 ± 2.8 *	8
Do 10 µM	3h/72h	54.8 ± 3.8 **	4
Do 10 µM	3h/96h	59.6 ± 4.2 **	4
Do 10 µM	6h/6h	58.3 ± 3 *	7
Do 10 µM	6h/24h	78.5 ± 1.1 *	8
Do 10 µM	6h/48h	80.7 ± 2.9 *	4

Tabla 3. La mortalidad celular ante una misma concentración de agonista fue tiempo dependiente. Todos los ensayos se realizaron en medio con suero. La valoración se realizó con azul tripano y Fda/PI. Test de la t de Student-pareada, significativamente diferente respecto al control * $p > 0.0001$, ** $p < 0.005$ y *** $p = 0.01$.

R 110	T PULSO/ T VALORACIÓN	MEDIA ± SEM (%)		n
		CON SUERO	SIN SUERO	
CONTROL	todos los tiempos	7.8 ± 0.8	9.9 ± 1.6	4
Do 10 µM	1h/1h	25.5 ± 2.8	27.7 ± 1.9	4
Do 10 µM	6h/6h	52.5 ± 1.6 *	61.1 ± 3 *	4
Do 10 µM	24h/24h	83.04 ± 1.1 *	84.8 ± 3.7 *	4
Do 10 µM	48h/48h	90.6 ± 1.1 *	92.9 ± 2.8 *	4

Tabla 4. Efecto del suero en la mortalidad celular. La presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo no modificó los valores de mortalidad celular. Test de la t de Student-pareada, significativamente diferente respecto al control * $p > 0.00001$, ** $p < 0.0005$ y *** $p = 0.01$.

ASTROCITOS	T PULSO/ T VALORACIÓN	MEDIA ± SEM (%)	RECEPTOR	MORTALIDAD	n
			ACTIVO	NETA	
CONTROL	3h/24h	2.8 ± 0.4	-		4
G 52 100 µM	3h/24h	13 ± 1.1 **	-		4
G 53 100 µM	3h/24h	18.7 ± 1.3 **	-		4
G 52 + Do 10 µM	3h/24h	21.4 ± 1.1 **	<<KA	8.4	4
G 53 + Do 10 µM	3h/24h	27.9 ± 2.3 **	KA	9.2	4
Do 10 µM	3h/24h	46 ± 3.1 *	AMPA/KA	43.2	4

Tabla 5. Efecto de un pulso de domoato en un cultivo primario de astrocitos. Las concentraciones de antagonista fueron saturantes en la preparación. Test de la t de Student-pareada, significativamente diferente respecto al control * $p = 0.0006$ y ** $p < 0.003$. <<KA (aproximadamente un 80% de los receptores de kainato).

NEURONAS	T PULSO/ T VALORACIÓN	MEDIA ± SEM (%)	RECEPTOR ACTIVO	MORTALIDAD NETA	n
control	3h/24h	7.1 ± 0.6	-		8
Glu 3 µM	3h/24h	61.5 ± 2.3 *	TODOS	54.4	7
Glu 10 µM	3h/24h	68 ± 3.5 *	TODOS	60.9	7
GYKI 52466 100µM	3h/24h	14.8 ± 1.8 ***	-		7
APV 100µM	3h/24h	21.4 ± 2 **	-		8
APV + GYKI 52	3h/24h	33.9 ± 3.1 **	-		5
APV + Glu 3	3h/24h	52.8 ± 2.8 **	AMPA/KA	31.4	4
APV + Glu 10	3h/24h	56.5 ± 2.6 **	AMPA/KA	35.1	4
GYKI 52 + Glu 3	3h/24h	53.4 ± 3.2 *	NMDA/⟨⟨KA	38.6	3
GYKI 52 + Glu 10	3h/24h	57.4 ± 1.3 *	NMDA/⟨⟨KA	42.6	3
APV + G 52 + Glu 3	3h/24h	36.2 ± 0.8 **	⟨⟨KA	2.3	4
APV + G 52 + Glu 10	3h/24h	38.6 ± 1.8 *	⟨⟨KA	4.7	4

Tabla 6. Efecto de un pulso de glutamato en un cultivo de neuronas de hipocampo. La tabla se ha subdividido en tres, en el primero mortalidad neuronal en presencia de glutamato, en la segunda mortalidad mediada por los antagonistas, y en la tercera mortalidad neuronal mediada por cada tipo de receptor. Test de la t de Student- pareada, significativamente diferente respecto al control * $p > 0.00001$, ** $p < 0.0008$ y *** $p < 0.005$.

NEURONAS	T PULSO/ T VALORACIÓN	MEDIA ± SEM (%)	RECEPTOR ACTIVO	MORTALIDAD NETA	n
control	3h/24h	8.2 ± 0.7	-		10
Do 10 µM	3h/24h	67.3 ± 1.4 *	AMPA/KA/NMDA?	59.1	10
GYKI 52466 100 µM	3h/24h	12.2 ± 1.1 **	-		4
APV 100 µM	3h/24h	17.1 ± 0.8 *	-		7
APV + GYKI 52	3h/24h	31.4 ± 1.6 **	-		4
APV + Do	3h/24h	52.6 ± 1.5 *	AMPA/KA	35.5	7
GYKI 52 + Do	3h/24h	28.3 ± 0.6 *	NMDA?/ <<KA	16.1	4
APV + GYKI 52 + Do	3h/24h	35 ± 0.8 *	<<KA	3.6	7

Tabla 7. Efecto de un pulso de domoato en un cultivo de neuronas de hipocampo. Los porcentajes de mortalidad fueron semejantes a los observados en los ensayos con glutamato. Test de la t de Student- pareada, significativamente diferente respecto al control * $p < 0.00005$ y ** $p < 0.0008$.

NEURONAS	T PULSO/ T VALORACIÓN	MEDIA ± SEM (%)	RECEPTOR ACTIVO	MORTALIDAD NETA	n
control	3h/24h	8.2 ± 0.8	-		4
Glu 3 μM	3h/24h	64 ± 2 **	TODOS		4
Glu 10 μM	3h/24h	70.3 ± 1.5 *	TODOS		4
GYKI 53655 100μM	3h/24h	45.6 ± 2.6 ***	-		8
APV + GYKI 53	3h/24h	51 ± 2.6 **	-		4
GYKI 53 + Glu 3	3h/24h	52.1 ± 1.9 **	NMDA/KA	7.5	6
GYKI 53 + Glu 10	3h/24h	55.3 ± 2.2 ***	NMDA/KA	9.7	6
APV + G 53 + Glu 3	3h/24h	53.7 ± 1.3 **	KA	2	4
APV + G 53 + Glu 10	3h/24h	55.8 ± 2 **	KA	4.4	4

NEURONAS	T PULSO/ T VALORACIÓN	MEDIA ± SEM (%)	RECEPTOR ACTIVO	MORTALIDAD NETA	n
control	3h/24h	7.9 ± 0.9	-		4
K ⁺ 45 mM	30' tras pulso	11.2 ± 1.8	-		3
Do 10 μM	3h/24h	67.3 ± 2.7 **	AMPA/KA/NMDA?	59.1	4
GYKI 53655 10 μM	3h/24h	37.4 ± 0.9 *	-		4
GYKI 53655 100 μM	3h/24h	38.6 ± 1.2 *	-		4
GYKI 53 100 + K ⁺	3h/24h-K ⁺ 30' tras pulso	33.3 ± 1.5 **	.		3
APV + G 53 10 μM	3h/24h	43.2 ± 0.6 **	-		4
APV + G 53 100 μM	3h/24h	48.1 ± 1.2 **	-		4
APV + G 53 100 + K ⁺	3h/24h-K ⁺ 30' tras pulso	42.1 ± 1.1 ***	-		3
APV + G 53 10 + Do	3h/24h	50.2 ± 1.2 *	KA/ <<AMPA	6.9	4
APV + G 53 100 + Do	3h/24h	54.7 ± 0.9 *	KA	6.6	4
APV + G 53 100 + Do + K ⁺	3h/24h-K ⁺ 30' tras pulso	46.6 ± 1.8 *	KA	3.5	3

Tabla 8. GYKI 53655 fue altamente tóxico. Dada la alta toxicidad del compuesto, se vió reducida la toxicidad mediada por los diferentes receptores. La aplicación de una solución de alto potasio mejoró los porcentajes de mortalidad observados. Test de la t de Student- pareada, significativamente diferente respecto al control * p > 0.00001, ** p < 0.0006 y *** p < 0.003. <<AMPA (activación del receptor de AMPA menor del 10%).

NEURONAS	RECEPTOR	> ACTIVIDAD			CUERPOS	n
	ACTIVO	NORMALES	NUCLEAR	PICNOSIS	APOPTÓTICOS	
control	-	81.7 ± 2.7	8.7 ± 4	8.7 ± 1.4	0.9 ± 0.2	4
Glu 3 µM	TODOS	31.7 ± 2.9	50.7 ± 2.2	15.8 ± 0.4	1.7 ± 0.2	4
Glu 10 µM	TODOS	35.6 ± 4	46.3 ± 7.5	15 ± 3	3 ± 0.4	4
G 52 100µM	-	68.2 ± 4.9	22.3 ± 0.8	8.8 ± 4	0.7 ± 0.2	4
APV 100µM	-	61.3 ± 8.2	25.2 ± 8.8	12.2 ± 0.9	1.3 ± 0.3	4
G 53 100µM	-	48 ± 6.1	36.3 ± 1	14.2 ± 5.4	1.5 ± 0.3	4
APV + G 52	-	59.5 ± 1.2	24 ± 2.9	15.4 ± 2.9	1.1 ± 0.5	4
APV + G 53	-	46.1 ± 5	32.1 ± 6.6	21.2 ± 1.8	0.6 ± 0.2	4
APV + Glu 3	AMPA/KA	42.7 ± 0.8	30 ± 6.5	25.3 ± 8.1	2 ± 0.8	4
APV + Glu 10	AMPA/KA	40.8 ± 1.1	33.9 ± 3.8	23.2 ± 4.9	2.1 ± 0.3	4
G 52 + Glu 3	NMDA/ <<KA	42.9 ± 3.4	40.6 ± 0.7	15.7 ± 2.7	0.8 ± 0.2	4
G 52 + Glu 10	NMDA/ <<KA	40.6 ± 2.3	40.4 ± 5.8	17.9 ± 3.3	1.1 ± 0.2	4
G 53 + Glu 3	NMDA/KA	42 ± 5.3	36.5 ± 1	20 ± 4.6	1.5 ± 0.3	4
G53 + Glu 10	NMDA/KA	40.2 ± 9.1	35.9 ± 2.5	22.2 ± 6.5	1.7 ± 0.1	4
APV + G 52 + Glu 3	<<KA	58.2 ± 2.1	20.4 ± 3.1	19.6 ± 0.8	1.8 ± 0.2	4
APV + G 52 + Glu 10	<<KA	54.9 ± 1.8	20.2 ± 1.7	23 ± 0.4	1.9 ± 0.4	4
APV + G 53 + Glu 3	KA	42 ± 3.9	34.5 ± 3.2	21.2 ± 3.2	2.3 ± 0.2	4
APV + G 53 + Glu 10	KA	39.5 ± 6.4	33.2 ± 4.8	24.3 ± 8.9	3.2 ± 1.1	4

Tabla 9. Diferente actividad nuclear ante un pulso de glutamato (3h/24h) en neuronas de hipocampo. La tinción Hoechst 33342 permitió diferenciar diferente actividad nuclear. Los valores fueron la media ± SEM en porcentaje. <<KA (aproximadamente un 80% de los receptores de kainato).

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- * Ascher P and Nowak L. Calcium permeability of the channels activated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) in isolated mouse central neurones in culture. *J. Physiol.*, 1986; 377: 35P.

- * Banker G and Goslin K. In *Culturing nerve cells*. Banker G and Goslin K (Eds). 1991.

- * Barres B A, Chun L L Y and Corey D P. Ion channels expression by white matter glia. I. Type 2 astrocytes and oligodendrocytes. *Glia*, 1988; 1: 10-30.

- * Barres B A, Chun L L Y and Corey D P. Ion channels in vertebrate glia. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1990; 13: 441-74.

- * Bennett J A and Dingledine R. Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant loop. *Neuron*, 1995; 14: 373-384.

- * Bernard A and Khrestchatisky M. Assessing the extent of RNA editing in the TMII regions of GluR5 and GluR6 kainate receptors during rat brain development. *J. Neurochem.*, 1994; 62: 2057-60.

- * Bettler B and Mülle C. Review: neurotransmitter receptors II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, 1995; 34.2: 123-39.

- * Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris E S, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M and Heinemann S. Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron*, 1990; 5: 583-95.

- * Blankenfeld G V, Trotter J and Kettenmann H. Expression of a distinct GABA_A receptor subtype in the oligodendrocyte lineage and its developmental regulation. *Eur. J. Neurosci.*, 1991; 3: 310-16.

- * Bliss T V P and Collingridge G L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993; 361: 31-39.

- * Boulter J, Hollmann M, O' Shea-Greenfield A, Hartley M, Deneris E, Maron C and Heinemann S. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science*, 1990; 249: 1033-37.

- * Bowie D and Mayer M L. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron*, 1995; 15: 1-20.

- * Bowman C L and Kimelberg H K. Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature*, 1984; 311: 656-59.

- * Brewer G J, Torricelli J R, Evege E K and Price P J. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal™, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Research.*, 1993; 35: 567-76.

- * Brismar T. Physiology of transformed glial cells. *Glia*, 1995; 15: 231-43.

- * Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg J P, Günter W, Seeburg P H and Sackmann B. Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science*, 1992a; 257: 1415-19.

- * Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Seeburg P H and Sackmann B. Calcium-permeable-AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science*, 1992b; 256: 1566-70.

- * Burnashev N, Villarroel A and Sackmann B. Dimensions and ion selectivity of recombinant AMPA and kainate receptor channels and their dependence on Q/R site residues. *J. Physiol. (Lond)*, 1996; 496: 165-73.

- * Burnashev N, Zhou Z, Neher E and Sakmann B. Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J. Physiol. (Lond)*, 1995; 485: 403-18.

- * Burnashev N. Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 1996; 6: 311-17.

- * Chan P H, Chu L. and Chen S. Effects of MK-801 on glutamate-induced swelling of astrocytes in primary cell culture. *J. Neurosci. Res.*, 1990; 25: 87-93.

- * Choi D W, Koh J-Y and Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J. Neurosci.*, 1988; 8: 185-96.

- * Choi D W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1988; 1: 623-34.

- * Choi D W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.*, 1985; 58: 293-97.

- * Choi D W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *Neurosci. Lett.*, 1987; 7: 369-79.

- * Choi D W. Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 1990; 2: 105-47.

- * Collins F. Axon initiation by ciliary neurons in culture. *Dev. Biol.*, 1982; 65: 50-57.

- * Cornell-Bell A H, Finkbeiner S M, Cooper M S and Smith S J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: Long-range glial signaling. *Science*, 1990a; 247: 470-73.

- * Cornell-Bell A H, Thomas P G and Smith S J. The excitatory neurotransmitter glutamate causes filopodia formation in cultured hippocampal astrocytes. *Glia*, 1990b; 3: 322-34.

- * Craig A M, Blackstone C D, Huganir R L and Banker G. The distribution of glutamate receptors in cultured hippocampal neurons: Postsynaptic clustering of AMPA selective subunits. *Neuron*, 1993; 10: 1055-68.

- * Dawson V L, Dawson T M, London E D, Bretz D S and Snyder S H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991; 88: 6368-71.

- * Durand G M and Zukin R Z. Developmental regulation of mRNAs encoding rat brain kainate/AMPA receptors: a Northern analysis study. *J. Neurochem.*, 1993; 61: 2239-46.

- * Egebjerg J and Heinemann S F. Ca^{2+} permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993; 90: 755-59.

- * Egebjerg J, Bettler B, Hermans-Borgmeyer I and Heinemann S. Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature*, 1991; 351: 745-48.

- * Egebjerg J, Kukekov V and Heinemann S F. Intron sequences directs RNA editing of the glutamate receptor subunit GluR2 coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994; 91: 10270-74.

- * Ferrer-Montiel A V and Montal M. Pentameric subunit stoichiometry of a neuronal glutamate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996; 93: 2741-44.

- * Gallo V and Russell J T. Excitatory amino acid receptors in glia: Different subtypes for distinct functions?. *J. Neurosci. Res.*, 1995; 42: 1-8.

- * Gallo V, Patneau D K, Mayer M L and Vaccarino F M. Excitatory amino acid receptors in glial progenitor cells: molecular and functional properties. *Glia*, 1994; 11: 94-101.

- * Garthwaite G and Garthwaite J. Amino acid neurotoxicity: intracellular sites of calcium accumulation associated with the onset of irreversible damage to rat cerebellar neurones in vitro. *Neurosci. Lett.*, 1986; 71: 53-58.

- * Giaume C, Fromaget C, El Aoumari A, Cordier J, Glowinski J and Gros D. Gap junctions in cultured astrocytes: Single channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron*, 1991; 6: 133-43.

- * Glaum S R, Holzwarth J A and Miller R J. Glutamate receptors activate Ca^{2+} influx into astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990; 87: 3454-58.

- * Hamill O P, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth F J. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, 1981; 391: 85-100.

- * Hayashi Y, Tanabe Y, Aramori Y, Masu M, Shimamoto K, Ohfuné Y and Nakanishi S. Agonist analysis of 2-(carboxycyclopropyl)glycine isomers for cloned metabotropic glutamate receptor subtypes expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br. J. Pharmac.*, 1992; 107: 539-43.

- * Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W and Seeburg P H. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron*, 1992; 8: 775-85.

- * Hockfield S, Carlson S, Evans C, Levitt P, Pintar J and Silberstein L. In *Molecular probes of the nervous system, vol 1. Selected methods for antibody and nucleic acid probes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Ed.). 1993.

- * Hollmann M and Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *A. Rev. Neurosci.*, 1994; 17: 31-108.

- * Hollmann M, Maron C and Heinemann S. Topology of glutamate receptors: new insights from Nglycosylation site epitope-tagging. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1994; 20: 603.7.

- * Holzwarth J A, Gibbons S J, Brorson J R, Philipson L H and Miller R J. Glutamate receptor agonists stimulate diverse calcium responses in different types of cultured rat cortical glial cells. *J. Neurosci.*, 1994; 14: 1879-91.
- * Hoo K H, Nutt S L, Fletcher E J, Elliot C E, Korczak B, Deverill R M, Rampersad V, Fantaske R P and Kamboj R K. Functional expression and pharmacological characterization of the human EAA4 (GluR6) glutamate receptor: a kainate selective channel subunit. *Receptors and Channels*, 1994; 2: 327-37.
- * Huettner J E. Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: Activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitization by Con A. *Neuron*, 1990; 5: 255-66.
- * Hume R I, Dingledine R and Heinemann S F. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science*, 1991; 253: 1028-31.
- * Iino M, Ozakawa S and Tsuzuki K. Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.(Lond.)*, 1990; 424: 151-65.
- * Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M and Nakanishi S. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 2836-43.
- * Jhonson J W and Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 1987; 325: 529-31.
- * Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg P H and Monyer H. Differences in calcium permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron*, 1994; 12: 1281-89.
- * Kamboj S K, Swanson G T and Cull-Candy S G. Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. *J. Physiology*, 1995; 486.2: 297-303.

- * Keinänen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn T A, Sakmann B and Seeburg P H. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science*, 1990; 249: 556-60.
- * Keller B U, Blaschke M, Rivosecchi R, Hollmann M, Heinemann S F and Konnerth Arthur. Identification of a subunit-specific antagonist of α -amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate/kainate receptor channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993; 90: 605-09.
- * Koh D-S, Burnashev N and Jonas P. Block of native Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in rat brain by intracellular polyamines generates double rectification. *J. Physiol.*, 1995; 486.2: 305-12.
- * Köhler M, Burnashev N, Sakmann B and Seeburg P H. Determinants of Ca^{2+} permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: Diversity by RNA editing. *Neuron*, 1993; 10: 491-500.
- * Lebmann V, Gottmann K and Lux H D. Evans Blue reduces macroscopic desensitization of non-NMDA receptor mediated currents and prolongs excitatory postsynaptic currents in cultured rat thalamic neurons. *Neuroscience Letters*, 1992. 146: 13-16.
- * Lerma J, Morales M, Ibarz J M and Somohano F. Rectification properties and Ca^{2+} permeability of glutamate receptors channels in hippocampal cells. *European Journal of Neuroscience*, 1994; 6: 1080-88.
- * Lerma J, Paternain A V, Naranjo J R and Mellström B. Functional kainate selective glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993; 90: 11688-92.
- * Lerma J, Zukin R S, and Bennett M V L. Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990; 87: 2354-58.

- * Lerma J. Spermine regulates N-methyl-D-aspartate receptor desensitization. *Neuron*, 1992; 8: 343-52.
- * Lomeli H, Sprengel R, Laurie D J, Köhr G, Herb A, Seeburg P H and Wisden W. The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett.*, 1993; 315: 318-22.
- * Louis J C, Magal E, Muir D, Manthorpe M and Varon S. CG-4, a new bipotential cell line from rat brain, is capable of differentiating in vitro into either mature oligodendrocytes or type-2 astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 1992; 31: 193-204.
- * Lovinger D M, White G and Weight F F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 1989; 243: 1721-24.
- * Luque J M and Richards J G. Expression of NMDA2B receptor subunit mRNA in Bergmann glia. *Glia*, 1995; 13: 228-32.
- * Malenka R C and Nicoll R A. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci*, 1993; 16: 521-27.
- * Manzoni O, Prezeau L, Marin P, Deshager S, Bockaert J and Fagni L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron*, 1992; 8: 653-62.
- * Matute C, Arellano R O, Conde-Guerri B and Miledi R. mRNA coding for neurotransmitter receptors in a human astrocytoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997; 94: 8830-35.
- * Matute C, Sánchez-Gómez M V, Martínez-Millán L and Miledi R. Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992; 89: 3399-403.

- * Mayer M L, Westbrook G L and Guthrie P B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 1984; 309: 261-63.

- * Mayer M L and Wyklicky L Jr. Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989; 86: 1.411-15.

- * McCarthy K D and de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglia cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.*, 1980; 85: 890-902.

- * McGahon A J, Martin S J, Bissonnette R P, Mahboubi A, Shi Y, Mogil R J, Nishioka W K and Green D R. In *Methods in cell biology, vol 46*. Academic Press, Inc. (Eds.). 1995.

- * Meldrum B and Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative diseases. *TIPS*, 1990. 11: 379-87.

- * Mishina M, Mori H, Araki K, Kushiya E, Meguro H, Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Ikeda K, Nagasawa M, Yamazaki M, Masaki M, Yamakura T, Morita T and Sakimura K. Molecular and functional diversity of the NMDA receptor channel. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1993; 707: 136-152.

- * Monyer H, Seeburg P H and Wisden W. Glutamate-operated channels-developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron*, 1991; 6: 799-810.

- * Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B and Seeburg P H. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 1992; 256: 1217-21.

- * Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, 1992; 258: 597-603.

- * Nedergaard M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science*, 1994; 263: 1768-71.

- * Nicoletti F, Magri G, Ingrao F, Bruno V, Catania M V, Dell'Albani P, Condorelli D F and Avola R. Excitatory amino acids stimulate inositol phospholipid hydrolysis and reduce proliferation in cultured astrocytes. *J. Neurochem.*, 1990; 54: 771-77.
- * Novak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A and Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 1984; 307: 462-65.
- * O' Hara P, Sheppard P O, Thogersen H, Venezia D, Haldeman B A, McGrane V, Houamed K H, Thomsen C, Gilbert T L and Mulvihill E R. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding domains. *Neuron*, 1993; 11: 41-52.
- * Olney J W, Price M T, Samson L and Labruyere J. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.*, 1986; 65: 65-71.
- * Olney J W. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *A. Rev. Pharmac. Toxic.*, 1990; 30: 47-71.
- * Olney J W. Excitotoxicity and N-methyl-D-aspartate receptors. *Drug Dev. Res.*, 1989; 17: 299.
- * Olney J W. Inciting excitotoxic cytolysis among central neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1986; 203: 631-45.
- * Partin K M, Patneau D K and Mayer M L. Cyclothiazide differentially modulates desensitization of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor splice variants. *Molecular Pharmacology*, 1994; 46: 129-38.
- * Partin K M, Patneau D K, Winters C A, Mayer M L and Buonanno A. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron*, 1993; 11: 1069-82.

- * Paternain A V, Morales M and Lerma J. Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron*, 1995; 14: 185-89.
- * Paternain A V, Vicente A, Nielsen E Ø and Lerma J. Comparative Antagonism of kainate-activated kainate and AMPA receptors in hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 1996; 8: 2129-36.
- * Patneau D K and Mayer M L. Kinetic analysis of interactions between kainate and AMPA: evidence for activation of a single receptor in mouse hippocampal neurons. *Neuron*, 1991; 6: 785-98.
- * Patneau D K, Vylicky L and Mayer M L. Hippocampal neurons exhibit cyclothiazide-sensitive rapidly desensitizing responses to kainate. *J. Neurosci.*, 1993; 13: 3496-509.
- * Patneau D K, Wright P W, Winters C, Mayer M L and Gallo V. Glial cells of the oligodendrocyte lineage express both kainate- and AMPA-preferring subtypes of glutamate receptor. *Neuron*, 1994; 12: 357-71.
- * Pearce B, Albrecht J, Morrow C and Murphy S. Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. *Neurosci. Lett.*, 1986; 72: 335-40.
- * Pellegrini-Giampietro D E, Cherici G, Alesiani M, Carla V and Moroni F. Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem.*, 1988; 51: 1960-63.
- * Pin J P and Duvosin R. Review: Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 1995; 34: 1-26.

- * Price C J and Raymond L A. Evans blue antagonizes both alpha-amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate and kainate receptors and modulates receptor desensitization. *Molecular Pharmacology*, 1996; 50: 1665-71.

- * Pulchaski R B, Louis J -C, Brose N, Traynelis S F, Egebjerg J, Kukekov V, Whenthold R J, Rogers S W, Lin F, Moran T, Morrison JH and Heinemann S F. Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors. *Neuron*, 1994; 13: 1-20.

- * Raman I A and Trussell L O. The kinetics of the response to glutamate and kainate in neurons of the avian cochlear nucleus. *Neuron*, 1992; 9: 173-86.

- * Ransom B R and Kettenmann H. Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. *Glia*, 1990; 3: 258-66.

- * Raymond L A, Blackstone C D and Huganir R L. Phosphorylation and modulation of recombinant GluR6 glutamate receptors by c-AMP-dependent protein kinase. *Nature*, 1993; 361: 637-641.

- * Raymond L A. Evans Blue slows desensitization and inhibits GluR6-mediated currents in transfected HEK-293 cells. *Society for Neuroscience*, 1995; 21: Abstract 781.10.

- * Roche K W, Raymond L A, Blackstone C and Huganir R L. Transmembrane topology of the glutamate receptor subunit GluR6. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 11679-82.

- * Rodriguez-Moreno A, Herreras H and Lerma J. Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron*, 1997; en prensa.

- * Ruano D, Lambolez B, Rossier J, Paternain A V and Lerma J. Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing. *Neuron*, 1995; 14: 1009-17.

- * Sahara Y, Noro N, Iida Y, Soma K and Nakamura Y. Glutamate receptor subunits GluR5 and KA-2 are coexpressed in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Neurosci.*, 1997; 17 (17): 6611-20.

- * Schiffer H H, Swanson G T and Heinemann S F. Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron*, 1997. 19: 1141-46.

- * Sentman C L, Shutter J R, Hockenbery D, Kanagawa O and Korsmeyer S J. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*, 1991. 67: 879-88.

- * Shi Y, Glynn J M, Guilbert L J, Cotter T G, Bissonnette R P and Green D R. Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science*, 1992. 257: 212-14.

- * Sommer B and Seeburg H. Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *TIPS*, 1992; 13: 291-296.

- * Sommer B, Burnashev N, Verdoorn T A, Keinänen K, Sakmann B and Seeburg P H. A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J.*, 1992; 11: 1651-56.

- * Sommer B, Keinänen K, Verdoorn T A, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Köhler M, Takagi T, Sakmann B and Seeburg P H. Flip and flop: A cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*, 1990; 249: 1580-85.

- * Sommer B, Köhler M, Sprengel R and Seeburg P H. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell*, 1991; 67: 11-19.

- * Sontheimer H, Trotter J, Schachner M and Kettenmann H. Channel expression correlates with differentiation stage during development of oligodendrocytes from their precursor cells in culture. *Neuron*, 1989; 2: 1135-45.

- * Sontheimer H. Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia*, 1994; 11: 156-72.

- * Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, Sheppard P O, O'Hara P J and Heinemann S F. Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*, 1994; 13: 1345-57.

- * Sullivan J M, Traynelis S F, Chen H V, Escobar W, Heinemann S F and Lipton S A. Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptors. *Neuron*, 1994; 13: 131-47.

- * Tarnawa Y, Farkas S, Berzsenyi P, Pataki A and András F. Electrophysiological studies with a 2,3-benzodiazepine muscle relaxant: GYKI 52466. *Eur. J. Pharmacol.*, 1989; 167: 193-99.

- * Taverna F A, Wang L -Y, MacDonald J F and Hampson D R. A transmembrane model for an ionotropic glutamate receptor predicted on the basis of the location of asparagine-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 14159-64.

- * Tingley W G, Roche K W, Thompson A K and Huganir R L. Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing in the C-terminal domain. *Nature*, 1993; 364: 70-73.

- * Uchino S, Sakimura K, Nagahara K and Mishina M. Mutations in a putative agonist binding region of the AMPA-selective glutamate receptor channel. *FEBS Lett.*, 1992; 308: 253-57.

- * Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 1993; 229: 1101-24.

- * Usowicz M M, Gallo V and Cull-Candy S G. Multiple conductance channels in type-2 cerebellar astrocytes activated by excitatory amino acids. *Nature*, 1989; 339: 380-83.

- * van der Pol A N, Finkbeiner S M and Cornell-Bell A H. Calcium excitability in suprachiasmatic nucleus neurons and glia *in vitro*. *J. Neurosci.*, 1992; 12: 2648-64.

- * Walker R P, Kokileva L, LeBlanc J and Sikorska M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *BioTechniques*, 1993. 15: 1032-36.

- * Wang L Y, Taverna F A, Huang X P, MacDonald J F and Hampson D R. Phosphorylation and modulation of a kainate receptor (GluR6) by cAMP-dependent protein kinase. *Science*, 1993; 259: 1173-75.

- * Weaver C D, Yao T L, Powers A C and Verdoorn T A. Differential Expression of glutamate receptor subtypes in rat pancreatic islets. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271.2: 12977- 84.

- * Wilding T J and Huettner J E. Activation and desensitization of hippocampal kainate receptors. *J. Neurosci.*, 1997; 17(8): 2713-21.

- * Wilding T J and Huettner J E. Differential antagonism of α -amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-preferring and kainate preferring receptors by 2,3-benzodiazepines. *Molec. Pharmac.*, 1995; 47: 582-87.

- * Wisden W and Seeburg P H. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.*, 1993; 13: 3582-98.

- * Wo Z G and Oswald R E. Transmembrane topology of two kainate receptor subunits revealed by N-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994; 91: 7154-58.

- * Wong L A and Mayer M L. Differential modulation by cyclothiazide and concanavalin A of desensitization at native AMPA-and kainate-preferring glutamate receptors. *Molec. Pharmac.*, 1993; 44: 504-10.

- * Wyllie A H, Kerr J F R and Currie A R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 1980; 68: 251-306.

- * Wyllie D J A, Mathie A, Symonds C J and Cull-Candy S G. Activation of glutamate receptors and glutamate uptake in identified macroglial cells in rat cerebellar cultures. *J. Physiol.*, 1991; 432: 235-58.

- * Yamada K A and Tang C M. Benzothiadiazides inhibit rapid glutamate receptor desensitization and enhance glutamatergic synaptic currents. *J. Neurosci.*, 1993; 13: 3904-15.

- * Zorumski C F, Yamada K A, Price M T and Olney J W. A benzodiazepine recognition site associated with the non-NMDA glutamate receptor. *Neuron*, 1993; 10: 61-67.