



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUIMICOFARMACOBIOLOGIA  
LABORATORIO DE NEUROBIOLOGIA

ISOFORMAS MOLECULARES DE LA SODIO POTASIO ATPASA EN  
CELULAS GLIALES DE BERGMANN.

TESIS  
para obtener el título en  
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Presenta:  
  
MARIANA CASTRO ONTIVEROS

Asesor de tesis:  
D.C. Rosalío Mercado Camargo

TESIS PARCIALMENTE APOYADA POR CIC 26.2  
POR ANUIES-ECOS NORD-CONACYT MO2-AO3

Morelia, Michoacán

Junio 2006

---

## INDICE

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABREVIATURAS.....</b>                                                                                   | <b>3</b>  |
| <b>I. RESUMEN .....</b>                                                                                    | <b>6</b>  |
| <b>II.ABSTRACT .....</b>                                                                                   | <b>7</b>  |
| <b>III. INTRODUCCIÓN.....</b>                                                                              | <b>8</b>  |
| <b>III.1 SISTEMA NERVIOSO.....</b>                                                                         | <b>8</b>  |
| III.1.1 ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO:.....                                                            | 10        |
| <b>III.2 SISTEMA GLUTAMATERGICO .....</b>                                                                  | <b>11</b> |
| III.2.1 GLUTAMATO .....                                                                                    | 11        |
| III.2.2. GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR.....                                                               | 13        |
| III.2.3. RECEPTORES GLUTAMATERGICOS .....                                                                  | 20        |
| III.2.4 TRANSPORTADORES GLUTAMATERGICOS.....                                                               | 25        |
| <b>III.3. INHIBICIÓN ENZIMÁTICA.....</b>                                                                   | <b>30</b> |
| <b>III.4. SISTEMA ENZIMATICO DE LA <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPASA.....</b>                     | <b>32</b> |
| III.4.1 Estructura y Función .....                                                                         | 34        |
| III.4.2. ISOFORMAS MOLECULARES DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO DE LA<br>$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPASA. ....     | 38        |
| <b>IV. HIPOTESIS.....</b>                                                                                  | <b>40</b> |
| <b>V. OBJETIVO GENERAL .....</b>                                                                           | <b>40</b> |
| <b>VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS: .....</b>                                                                    | <b>41</b> |
| <b>VII. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>                                                                       | <b>41</b> |
| <b>VII.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS GLIALES DE BERGMANN.....</b>                                                 | <b>41</b> |
| <b>VII.2 PREPARACIÓN DE LOS HOMOGENEIZADOS DE CORTEZA<br/>        CEREBRAL Y CEREBELO .....</b>            | <b>42</b> |
| <b>VII.3 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES ENRIQUECIDAS CON<br/>        MEMBRANAS GLÍALES O NEURONALES. ....</b> | <b>43</b> |

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>VII.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BASAL DE LA <math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math>-ATPasa.</b> ..... | <b>44</b> |
| <b>VII.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</b> .....                                                                 | <b>45</b> |
| <b>VIII. RESULTADOS</b> .....                                                                            | <b>46</b> |
| <b>IX. DISCUSIÓN</b> .....                                                                               | <b>53</b> |
| <b>X. CONCLUSIONES</b> .....                                                                             | <b>56</b> |
| <b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....                                                                            | <b>57</b> |

## ABREVIATURAS

|                    |                                                               |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|
| ❖ a.a.             | Aminoácidos                                                   |
| ❖ AAAT             | Transportador de aminoácidos en adipositos                    |
| ❖ ADP              | Adenosin difosfato                                            |
| ❖ AMPA             | Acido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-isoxazolpropiónico          |
| ❖ AMPc             | 3,5- monofosfato cíclico de adenosina                         |
| ❖ ARNm             | Acido ribonucleico mensajero                                  |
| ❖ ASCT/SATT        | Alanina/serina/cisterna/ o treonina                           |
| ❖ ASP              | D-aspartato                                                   |
| ❖ ATP              | Adenosin trifosfato                                           |
| ❖ $\text{Ca}^{2+}$ | Calcio                                                        |
| ❖ CGB              | Células Gliales de Bergmann                                   |
| ❖ DAG              | Diacil glicerol                                               |
| ❖ EAAC1            | Acarreador de aminoácidos excitadores 1                       |
| ❖ EAAT             | Transportador de aminoácidos excitadores                      |
| ❖ ELA              | Esclerosis Lateral Anmiotrofica                               |
| ❖ g                | gramos                                                        |
| ❖ GABA             | Acido $\gamma$ -amino butírico                                |
| ❖ GFAP             | Proteína acídica glial fibrilar                               |
| ❖ GLAST            | Transportador de glutamato/aspartsto                          |
| ❖ GLT-1            | T ransportador de glutamato tipo 1                            |
| ❖ Glu              | Glutamato                                                     |
| ❖ GluRs            | Receptores de Glutamato                                       |
| ❖ H7               | Diclorhidrato de 1-(5-isoquinoleinsulfonil)-2-metilpiperazina |

|                      |                                        |
|----------------------|----------------------------------------|
| ❖ iGluRs             | Ionotrópicos                           |
| ❖ IP <sub>3</sub>    | Fosfatidil inositol trifosfato         |
| ❖ K <sup>+</sup>     | Potasio                                |
| ❖ KA                 | Acido Kaínico                          |
| ❖ KCl                | Cloruro de potasio                     |
| ❖ Kd                 | Kilodaltones                           |
| ❖ Km                 | Constante de Michaelis-Menten          |
| ❖ mGluR              | Receptor metabotrópico                 |
| ❖ Mg <sup>2+</sup>   | Magnesio                               |
| ❖ Mg Cl <sub>2</sub> | Cloruro de magnesio                    |
| ❖ ml                 | Mililitros                             |
| ❖ mM                 | Milimoles                              |
| ❖ mm                 | Milímetros                             |
| ❖ MP                 | Membrana Plasmática                    |
| ❖ μgr                | Microgramos                            |
| ❖ μl                 | Microlitros                            |
| ❖ Na <sup>+</sup>    | Sodio                                  |
| ❖ NaCl               | Cloruro de sodio                       |
| ❖ NMDA               | N-Metil-D-aspartato.                   |
| ❖ PC                 | Célula de purkinje                     |
| ❖ Pi                 | Fosfato inorgánico                     |
| ❖ pH                 | Potencial hidrógeno                    |
| ❖ PKA                | Cinasa de proteína dependiente de AMPc |
| ❖ PKC                | Protein-cinasa C                       |
| ❖ PLC                | Fosfolipasa C                          |

|                 |                                 |
|-----------------|---------------------------------|
| ❖ PTX           | Toxina de Bordetella Pertusis   |
| ❖ QA            | Quiscualato                     |
| ❖ SNC           | Sistema nervioso central        |
| ❖ rpm           | Revoluciones por minuto         |
| ❖ TPA           | Acetato de tetradecanoil forbol |
| ❖ Vmax          | Velocidad máxima                |
| ❖ VGLUT1-VGLUT3 | Transportadores vesiculares     |

## I. RESUMEN

El glutamato (glu) es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (SNC), participa en los fenómenos de aprendizaje y memoria y se le ha relacionado también con las enfermedades neurodegenerativas cuando los mecanismos de su regulación extracelular se alteran por lo cual se ha propuesto que los transportadores de glu participan en forma importante en esa regulación. Por otro lado se ha demostrado que la bomba de sodio y potasio en el SNC es importante. Resultados previos han mostrado disminución de la actividad de la bomba de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  en presencia del éster de forbol TPA y de glu en células gliales de Bergmann (CGB) que tienen el transportador de glu/aspartato dependiente de sodio (GLAST). El complejo enzimático de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, tiene un peso molecular de 250 kDa a 300kDa, es una proteína tetramérica formada por dos subunidades  $\alpha$  de 110 Kd y por dos subunidades  $\beta$  de 40 Kd aproximadamente. La subunidad  $\alpha$ , denominada la subunidad catalítica tiene los sitios de unión para el  $\text{Na}^+$  y el ATP hacia la región citoplásmica en la superficie interior y para el  $\text{K}^+$  y la ouabaina hacia la superficie externa. Esta porción de la molécula se fosforila por hidrólisis del ATP. La subunidad  $\beta$  de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa es una glucoproteína que participa en el ensamblaje del complejo proteínico en la membrana plasmática. La subunidad catalítica alfa tiene tres isoformas moleculares, las cuales se pueden caracterizar en base a su patrón de inhibición por ouabaina, en el caso de las CGB no se ha caracterizado que isoformas están presentes por lo que en el presente trabajo se realizaron curvas de inhibición de la bomba de sodio y potasio por ouabaina en CGB, en homogeneizados de cerebelo y en membranas gliales y neuronales aisladas de cerebelo de rata macho adulto por centrifugación diferencial. La isoforma presente en las CGB es la de baja afinidad para la ouabaina y es por lo tanto la

que esta participando en la interacción observada entre el transportador GLAST y la bomba de sodio y potasio.

## II.ABSTRACT

Glutamate (glu) is the main exciting neurotransmitter of the central nervous system (SNC), it participates in the learning and memory phenomena, also has been related to the neurodegenerative diseases when the mechanisms of their extracellular regulation are altered showing an important role in the regulation of the extracellular glutamate. On the other hand, the sodium pump has been demonstrated that plays an important role in the SNC, previous results have shown that TPA a Phorbol ester and the amino acid glutamate have an effect in the sodium pump activity in Bergmann Glial cells (CGB) that have the glutamate transporter GLAST which depends of sodium for its function. The enzymatic complex of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase, has a molecular weight of 250kDa to 300kDa, is a tetrameric protein formed by the subunit catalytic alpha and for the beta subunit. Actually has been reported the existence of three isoforms of the alpha subunit, so in the present work we decide to study which isoform of the sodium pump is present in Bergmann glial cells. Results show that alpha 1 isoform was present in BGC and glutamate increased the affinity of the enzyme by ouabain. The present results are relevant and help us to understand the molecular mechanism about the neurotransmitters' carriers.

### III. INTRODUCCIÓN

#### **III.1 SISTEMA NERVIOSO**

El sistema nervioso está constituido por el tejido nervioso del organismo y los elementos de soporte asociados. Desde un punto de vista estructural o anatómico, las dos primeras divisiones principales del sistema nervioso son el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está formado por el encéfalo y la medula espinal. Se integra y relaciona la información sensitiva aferente, se generan los pensamientos, emociones, se forma y almacena la memoria. La mayoría de los impulsos nerviosos que estimulan la contracción muscular y las secreciones glandulares se originan en el SNC. El SNC está conectado con los receptores sensitivos, los músculos y las glándulas de las zonas periféricas del organismo a través del SNP. Este último está formado por los nervios craneales, que nacen en el encéfalo y los nervios raquídeos, que nacen en la medula espinal. Una parte de estos nervios lleva impulsos nerviosos hasta el SNC mientras que otras partes transportan los impulsos que salen del SNC.

El componente aferente del SNP consisten en células nerviosas llamadas neuronas sensitivas o aferentes (*ad* = hacia; *ferre* = llevar). Conducen los

impulsos nerviosos desde los receptores sensitivos de varias partes del organismo hasta el SNC y acaban en el interior de este.

El componente eferente consiste en células nerviosas llamadas neuronas motoras o eferentes (*ex* = fuera de; *ferre* = llevar).

Estas se originan en el interior del SNC y conducen los impulsos nerviosos desde este a los músculos y las glándulas.

Según la parte del organismo que ejecute la respuesta, el SNP puede subdividirse en sistema nervioso somático (SNS) (*soma* = cuerpo) y sistema nervioso autónomo (SNA) (*auto* = propio; *nomos* = ley). El SNS esta formado por neuronas sensitivas que llevan información desde los receptores cutáneos y los sentidos especiales, fundamentalmente de la cabeza, la superficie corporal y las extremidades, hasta el SNC que conducen impulsos solo al sistema muscular esquelético. Como los impulsos motores pueden ser controlados conscientemente, esta porción del SNS es voluntario.

El SNA esta formado por neuronas sensitivas que llevan información desde receptores situados fundamentalmente en las vísceras hasta el SNC, conducen los impulsos hasta el músculo liso, el músculo cardiaco y las glándulas. Con estas respuestas motoras no se encuentran normalmente bajo control consiente, el SNA es involuntario.

La porción motora del SNA tiene dos ramas. La división simpática y la parasimpática. Con pocas excepciones las vísceras reciben instrucciones de ambas. En general, estas dos divisiones tienen acciones opuestas.

Los procesos favorecidos por las neuronas simpáticas suelen implicar un gasto de energía, mientras que los estímulos parasimpáticos restablecen y conservan la energía del organismo. <sup>(1)</sup>

### III.1.1 ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO:

**Sistema nervioso central:** encéfalo (cerebro, cerebelo y bulbo raquídeo) y médula espinal.

Se han descrito las funciones para las estructuras que componen el SNC:

- Médula espinal: a lo largo de la columna vertebral, recibe información sensorial y contiene neuronas motoras. De ella parten 31 pares de nervios espinales.
- Bulbo raquídeo: regula funciones autónomas (latidos corazón, respiración, digestión, circulación...).
- Cerebelo: coordina los movimientos, postura y equilibrio.
- Tálamo: procesa y distribuye la información sensorial y motora
- Hipotálamo: regula el sistema nervioso autónomo y la secreción hormonal (glándula pituitaria), hábitos, ritmos circadianos, temperatura.
- Hipocampo: participa en la memoria a largo plazo.

**Sistema nervioso periférico:** nervios craneales, nervios raquídeos, ganglios, receptores sensoriales.

El sistema nervioso periférico se subdivide en:

**Sistema nervioso somático:** neuronas sensoriales de los sentidos especiales y somáticos y neuronas motoras que conducen impulsos a los músculos esqueléticos (voluntarios).

**Sistema nervioso autónomo:** neuronas sensoriales autónomas (vísceras) y neuronas motoras que conducen impulsos a músculo liso, miocardio, glándulas y tejido adiposo (involuntarios). Dos partes: simpática y parasimpático.

**Sistema nervioso entérico:** controla el tubo digestivo, involuntario.

### **III.2 SISTEMA GLUTAMATERGICO**

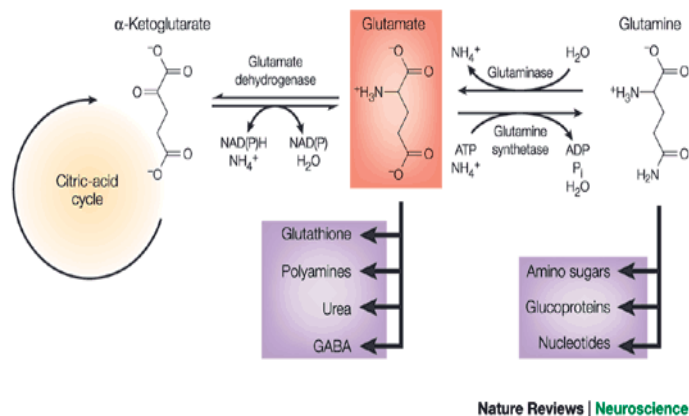
#### **III.2.1 GLUTAMATO**

El ácido glutámico (Glu) es el neurotransmisor excitatorio por excelencia del sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados, junto con el ácido aspártico (Asp), son los responsables de la mayor parte de la transmisión sináptica excitadora del SNC.

El Glu es un aminoácido dicarboxílico, no esencial de naturaleza ácida y de carga negativa, además es un aminoácido implicado en múltiples funciones biológicas. Este aminoácido tiene un papel importante como intermediario metabólico<sup>(2)</sup> donde puede servir como fuente de energía o bien como reservorio de amoníaco; es precursor de glutamina, arginina, fosfato de creatina, prolina,

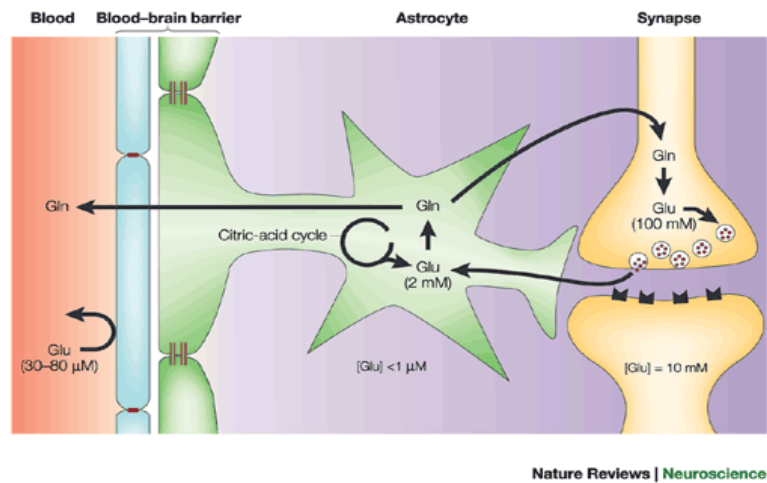
hidroxirolina, poliaminas, glutatión.<sup>(3)</sup> Es también un componente importante en la síntesis de péptidos y proteínas.<sup>(4)</sup>

En el SNC el glutamato tiene dos funciones adicionales: como neurotransmisor y como precursor en la síntesis del ácido γ-amino butírico (GABA)<sup>(5)</sup> como se muestra en la Fig. 1.



**Fig.1 Rutas metabólicas del glutamato**

El glutamato por ser un aminoácido no esencial, no puede cruzar la barrera hematoencefálica; por lo tanto, no es accesible al cerebro mediante la circulación. Las concentraciones de glutamato en el SNC se encuentran distribuidas de manera ubicua en el tejido cerebral en el que alcanza concentraciones superiores a las de cualquier otro aminoácido, el cerebro contiene grandes cantidades de glutamato (cerca de 10 mmol/kg de peso seco). Estas concentraciones se derivan únicamente de su síntesis de novo por los astrocitos<sup>(6)</sup> (Fig. 2).



**Fig. 2 Barrera hematoencefálica y síntesis de glutamato en el cerebro.**

Esencialmente se sintetiza a partir de la glucosa y la transaminación del alfa-cetoglutarato en el ciclo de Krebs y de glutamina.

Casi la totalidad del glutamato está localizado intracelularmente y la mayor concentración se encuentra en las terminales nerviosas. <sup>(7)</sup>

### III.2.2. GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR

El glutamato cumple la mayoría de los criterios para ser considerado como neurotransmisor:

- Se localiza en vesículas presinápticas

## UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

- Se ha demostrado su liberación cuando se estimulan las terminales axónicas.
- Se han caracterizado receptores específicos que responden al ácido glutámico tanto en la membrana pre como en la postsináptica.
- Existen mecanismos para removerlo de la hendidura sináptica.

A pesar de lo anterior, en un principio fue algo difícil admitir el papel del glutamato como neurotransmisor, dado que esta molécula se encuentra ampliamente distribuida en las neuronas y en la glía y, además, se involucra en actividades consideradas no sinápticas. La principal de éstas es su participación en la función metabólica de las células. Por tal razón, es importante distinguir entre el pool de glutamato dedicado a la neurotransmisión y aquel que forma parte de las rutas metabólicas comunes a todas las células.

Es necesario tener en cuenta que en las células gliales se convierte en glutamina, mientras que en las células gabaérgicas (en el caso de la corteza cerebral están en estrecha relación con las células glutamatérgicas piramidales), por acción de la enzima que descarboxila al ácido glutámico GAD, se convierte en el neurotransmisor Gaba<sup>(8-9)</sup>

La glucosa sérica es el precursor más importante para la síntesis de ácido glutámico en el sistema nervioso; pues ingresa a éste luego de atravesar el

endotelio vascular y la interfase (constituida por los pies de los astrocitos que rodean los capilares sanguíneos). Por lo tanto, la captura de glucosa se realiza por la acción de los transportadores de la familia GLUT, los cuales se expresan tanto en las células endoteliales como en los astrositos. Además, se ha comprobado que debido a la acción de estos astrocitos la glucosa se convierte en lactato, el cual se libera en el líquido extracelular, luego las neuronas lo captan y se constituye así en una de sus alternativas de sustrato energético.

Los astrocitos también poseen la capacidad de capturar ácido láctico de origen sérico, lo que probablemente los convierte en un importante reservorio de este metabolito. En concentraciones elevadas, el ácido láctico tiene un efecto angiogénico,<sup>(10)</sup> lo que indica que en la mayoría de las circunstancias este efecto es normalmente amortiguado (sin embargo, además, tiene un efecto vasodilatador que puede ser un factor importante para correlacionar la actividad glutamatérgica y el incremento del flujo sanguíneo cerebral).

Al contrario de las neuronas, los astrocitos tienen una capacidad limitada para sintetizar ácido láctico. Las neuronas, por otra parte, convierten el lactato en piruvato y a éste en acetilCoA, el cual ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico, donde se une con el oxaloacetato para formar citrato. Éste pasa luego, sucesivamente, a isocitrato y a alfaetoglutarato, el cual puede ser transaminado a glutamato por transaminasas como la aspartato aminotransferasa y la alanina

aminotransferasa, que utiliza donadores de grupos amino como aspartato y alanita.<sup>(11)</sup>

En los astrocitos que rodean los cuerpos de las neuronas, es decir, los de localización en la sustancia gris y en los oligodendrocitos, el glutamato se convierte en glutamina por acción de la enzima glutamina sintetasa. Con la intervención de transportadores localizados en los astrocitos o en las neuronas, la glutamina que de ser transferida de las glías a las neuronas; pues, por parte de los primeros, se han identificado los transportadores que median su liberación y tres transportadores, localizados en las neuronas, que ayudan a atrapar esta sustancia.

Se ha descrito que una subpoblación de neuronas glutamatérgicas expresan la enzima glutaminasa, la cual convierte la glutamina en glutamato.

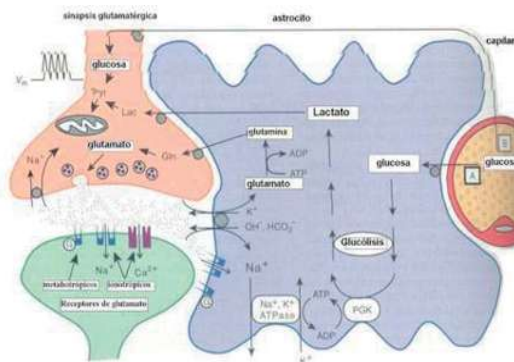
En condiciones normales la enzima glutaminasa se localiza en la membrana mitocondrial interna pero, en caso de lesión de las neuronas, esta puede trasladarse al medio extracelular y, de manera equivocada, convertir la glutamina en glutamato en este sitio, lo cual puede ser letal para la célula por los conocidos efectos excitotóxicos el glutamato en concentraciones ligeramente superiores a las normales. Esta puede ser una ruta importante para exacerbar y propagar un proceso de lesión excitotóxico.<sup>(10)</sup>

Bajo ciertas condiciones, el transporte continuo de glutamina por el astrocito hacia la neurona conlleva una disminución de las concentraciones de alfaetoglutarato del ciclo del ácido tricarboxílico glial, lo cual se puede compensar utilizando la vía de la anaplerosis, es decir, la carboxilación del piruvato, para convertirlo en oxaloacetato o malato, e ingresar de ese modo nuevos sustratos al ciclo.

Por años se consideró que los astrocitos eran las únicas células capaces de llevar a cabo este tipo de metabolismo. Sin embargo, se ha demostrado la actividad carboxiladora del piruvato de la enzima málica mitocondrial neuronal. La posibilidad de que ciertas subpoblaciones neuronales puedan carboxilar el piruvato explica por qué algunos circuitos glutamatérgicos pueden expresar bajas concentraciones inmunoquímicas de glutaminasa. En este caso la producción de glutamato para la función sináptica se deriva de sustratos propios de estas neuronas.<sup>(11)</sup>

Una vez que el glutamato ha sido liberado en la sinapsis hay que removerlo de la hendidura para limitar su acción en el tiempo. Existen dos alternativas para manipular este glutamato: primero, que sea capturado por los astrocitos. Segundo, que sea capturado por las terminales nerviosas y en las mitocondrias, organelos que abundan en estas estructuras, transaminado por aminotransferasas o desaminado por la glutamato deshidrogenasa y convertido entonces a alfaetoglutarato, que es oxidado sucesivamente a succinato, fumarato y malato. Este último puede ser descarboxilado a lactato, de manera

que el glutamato de la neurotransmisión puede ser fuente de lactato. Esto es muy importante, porque este metabolito puede actuar en los vasos sanguíneos adyacentes como vasodilatador, y facilitar por esta vía un acople entre actividad neuronal y flujo sanguíneo local (Fig.3).



**Fig. 3 Síntesis y Degradación de Glutamato**

El ciclo de síntesis y degradación del glutamato requiere energía en varias de sus etapas: en el proceso de almacenamiento en vesículas y durante la fusión de la vesícula con la membrana presináptica, proceso previo para la exocitosis. Por otro parte, para la recaptura del glutamato y de la glutamina también se requiere energía, ya que este proceso debe vencer un gradiente de sodio que necesita la función de la Na/ATPasa, que retorna el sodio al espacio extracelular.

En esta actividad se necesitan dos ATP por cada molécula de glutamato o glutamina. Se calcula que el ciclo del glutamato consume alrededor del 3% del de la energía obtenida del metabolismo de la glucosa.<sup>(10)</sup>

El glutamato además de poseer un papel fundamental en la transferencia rápida de información, ha sido involucrado en el aprendizaje y la memoria. Aunque el glutamato desempeña importantes funciones fisiológicas en el SNC, participa en el 70% de las sinapsis excitatorias, la activación excesiva de sus receptores, bajo ciertas condiciones, es neurotóxica, habiéndose relacionado con procesos neurodegenerativos tanto agudos como crónicos.

En la neurotoxicidad aguda (por ejemplo, isquemia cerebral) el déficit energético celular conlleva a una disminución en la recaptación de glutamato del espacio sináptico, al consecuente aumento en su concentración y a un incremento de la sensibilidad de las neuronas al glutamato.

La sobre activación de los receptores en esta situación tiene como resultado una alteración en los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  que genera la entrada masiva de agua, induciendo la lisis osmótica de la neurona.

Por otro lado, la neurotoxicidad crónica esta mediada por mecanismos dependientes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y esta implicada en enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica, la demencia asociada al sida, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer.<sup>(12)</sup>

Actualmente se ha demostrado que la diversidad espacial y temporal de los efectos del Glu radica en su interacción con clases diferentes de receptores, los que juegan un papel importante en la plasticidad neuronal, el desarrollo del SNC y la neurodegeneración.<sup>(13)</sup> Igualmente relevantes son la concentración y el curso

temporal del Glu en la sinápsis, y la participación de sus sistemas de captura, en la modulación de la respuesta postsináptica.<sup>(14)</sup>

### III.2.3. RECEPTORES GLUTAMATERGICOS

Los receptores de neurotransmisores, están localizados tanto pre- como post-sinápticamente. En los vertebrados los receptores presinápticos, son típicamente receptores metabotrópicos que inhiben la liberación del transmisor; sin embargo, en vertebrados ha sido descrita la participación de estos receptores en fenómenos que involucran la facilitación.

La activación de los receptores ionotrópicos presinápticos conduce generalmente a la inhibición de la transmisión sináptica.<sup>(15)</sup> Estudios recientes han mostrado que los neurotransmisores pueden aumentar la eficacia sináptica por la activación de canales iónicos presinápticos activados por ligando.<sup>(16)</sup> Haciendo énfasis en las características de los receptores de glutamato, el glutamato es almacenado en vesículas sinápticas y liberado en la terminal presináptica por un mecanismo calcio dependiente que implica la participación de los canales de calcio voltaje-dependientes, tipo N y P/Q.

La concentración de glutamato vesicular es aproximadamente de 100mmol/l y la liberación del contenido de una vesícula sináptica genera un potencial excitador postsináptico que corresponde principalmente a la activación de receptores de AMPA.<sup>(17)</sup> El glutamato reconoce al menos cuatro tipos de receptores,<sup>(18)</sup> que

reciben su denominación de acuerdo al tipo de agonista al que responde: los receptores ionotrópicos, AMPA, NMDA (N-metil -D-Aspartato), Kainato (ionotrópicos) que son complejos multiprotéicos formados por 4 ó 5 subunidades con un canal iónico intrínseco, por donde fluyen iones como calcio, sodio y potasio<sup>(10)</sup> y que a pocos milisegundos de unir al agonista induce cambios en la permeabilidad de la membrana y los metabotrópicos<sup>(19)</sup> formados por un solo péptido, estos son capaces de formar dímeros para adquirir propiedades físicas y funcionales distintas.<sup>(20)</sup>

Pertenecen a la superfamilia de los receptores de siete segmentos transmembranales y están acoplados a proteínas G que modulan sistemas de segundos mensajeros o a canales iónicos.<sup>(21)</sup> Su activación promueve o inhibe el desencadenamiento de cascadas metabólicas que influyen en diferentes niveles, en la membrana, en el citoplasma e incluso en el núcleo de las neuronas.<sup>(10)</sup> Ambas clases de receptores son capaces de transducir las señales empleando múltiples sistemas de segundos mensajeros, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ , nucleótidos cíclicos, entre otros.

La aplicación de técnicas electrofisiológicas ha permitido determinar que esos receptores pueden coexistir en poblaciones neuronales diferentes. Estos receptores presentan canales iónicos permeables a cationes, dependiendo la permeabilidad al ( $\text{Na}^+$ ) y al ( $\text{Ca}^{++}$ ) de la familia y composición de las subunidades del receptor<sup>(17)</sup>; existe otra clase de receptores de glutamato denominados Delta 1 y 2 que no unen glutamato y no forman canales funcionales cuando se

expresan en células heterologas; sin embargo, experimentalmente se ha descrito que los ratones que carecen del gen que codifica a los receptores Delta muestran, entre otras alteraciones, pérdida de la coordinación motora.<sup>(22)</sup>

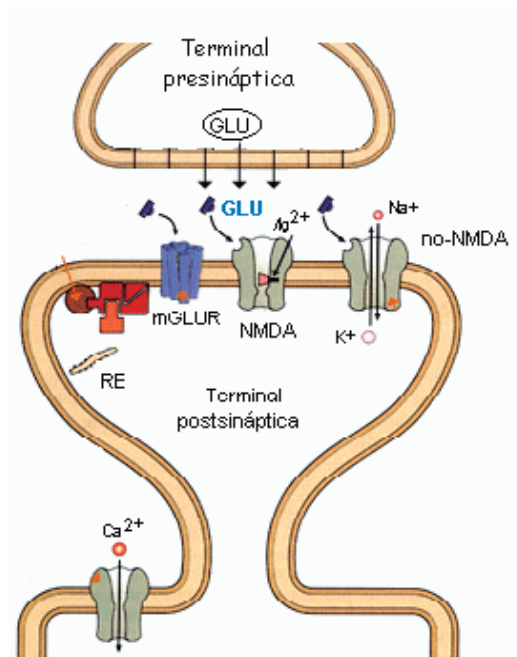
En la actualidad han sido identificados 27 genes que codifican para subunidades específicas de estos receptores y 5 más que corresponden a receptores hipotéticos o a proteínas asociadas a receptores.<sup>(23)</sup>

La acción de los aminoácidos excitadores, Glu y Asp, así como de sus análogos estructurales  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropionato (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato (KA) y quisqualato (QA), entre otros, tienen la capacidad de excitar neuronas del SNC activando en sus membranas receptores específicos.<sup>(23)</sup>

La transmisión glutamatérgica ha sido descrita en diversas regiones del sistema nervioso, que incluyen: conexiones córtico-corticales ipsilaterales y contralaterales, proyecciones corticales hacia la amígdala, tubérculo olfatorio, el putamen, núcleo caudado, tálamo, colículos superior e inferior, área tegmental, sustancia nigra núcleo rojo y medula espinal, además de la corteza entorrinal, participando en la neurobiología hipocampal y en conexiones que incluyen al septum, subiculum, cuerpo mamilar e hipotálamo así como también en la corteza visual, retina y cerebelo<sup>(23)</sup> por otro lado, además de su acción en la escala de mili segundos, la activación de los receptores de glutamato juega un importante papel en los cambios duraderos que involucran al fenotipo neuronal y el desarrollo; los

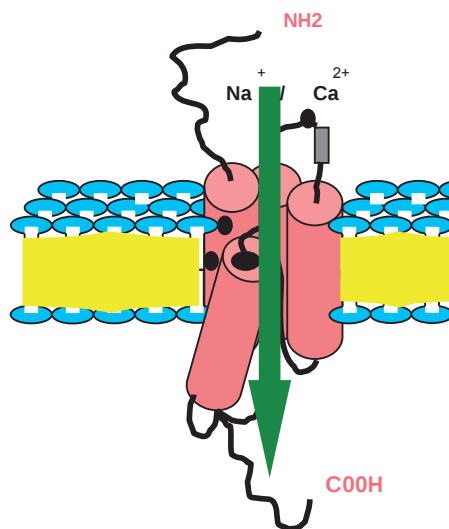
patrones de actividad sináptica excitadora son requeridos para el control fino de las conexiones sinápticas y la generación de mapas topográficos en las redes neurales.<sup>(24)</sup>

Es claro que las acciones ionotrópicas desencadenan fenómenos eléctricos de instauración y activación rápida, mientras que las acciones metabotrópicas son prolongadas y se pueden traducir en adaptaciones moleculares y cambios en la expresión génica, lo cual se considera importante en los mecanismos moleculares que subyacen a la plasticidad y a la memoria<sup>(10)</sup> (Fig.4).



**Fig. (4) Presentación esquemática para los receptores de Glutamato**

Los receptores ionotrópicos son canales de cationes que cuando se abren, permiten la entrada de sodio y de calcio y la salida de potasio. Hay tres tipos y su nombre se deriva de sus agonistas sintéticos NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propionato) y kainato (Fig. 5).



**Fig. 5 Receptores ionotrópicos**

Estos receptores son proteínas oligoméricas que funcionan como canales catiónicos inespecíficos activados por un ligando extracelular. Son complejos macromoleculares que contienen tres dominios transmembranales denominados M1, M3 y M4 y una porción reentrante en la membrana, el dominio M2, que confiere las distintas selectividades iónicas del canal.<sup>(19)</sup>

Los iGluRs están formados por cuatro subunidades con alta similitud de secuencia, que en el cerebro, difieren en su composición oligomérica y sus

propiedades funcionales. <sup>(25,26)</sup> Las subunidades están integradas, en promedio, por ~900 aminoácidos y pesan ~ 100kDa, con un 80% de identidad aminoacídica dentro de una familia y ~ 50% entre familias de receptores.

#### III.2.4 TRANSPORTADORES GLUTAMATERGICOS

El glutamato se considera el neurotransmisor excitador de mayor importancia en el SNC. Diversos estudios de acumulación de este aminoácido revelan la existencia de distintos subtipos de transportadores con características cinéticas y farmacológicas diferentes. <sup>(27)</sup>

El glutamato en concentraciones elevadas se considera una neurotoxina, ya que su incremento en el espacio sináptico lleva a una excitación continua de las neuronas, lo que puede llevar a la muerte celular. El funcionamiento normal de los transportadores de glutamato se altera en condiciones tales como la isquemia y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), padecimientos que llevan a un daño en el SNC como consecuencia de la muerte neuronal. <sup>(28)</sup>

Es por ello que los transportadores de glutamato regulan la transmisión sináptica removiendo al neurotransmisor del espacio extracelular.

De esta manera las concentraciones de glutamato se mantienen por debajo de niveles neurotóxicos, evitando la activación excesiva de los receptores y el consecuente desarrollo de padecimientos neurodegenerativos. Aparentemente no existe una enzima extracelular que pueda metabolizar al glutamato, por lo que el único medio rápido de removerlo es mediante los sistemas de transporte de glutamato de alta afinidad y dependientes de sodio.<sup>(29)</sup>

Las células del SNC expresan diferentes proteínas capaces de transportar al glutamato. Algunas de estas se encuentran en la membrana celular y otras intracelularmente. En la membrana existen transportadores de alta afinidad y de baja afinidad. Intracelularmente de la célula se expresan transportadores en la membrana mitocondrial y en vesículas sinápticas.<sup>(30)</sup>

La familia de los transportadores de glutamato también a los transportadores de aminoácidos neutros (alanina, serina y cisteína) ASCT1 y ASCT2, así como a los transportadores de glutamato de *E. Coli*, *B. stearothermophilus* y *B.melitoli*.<sup>(31)</sup>

Los transportadores de alta afinidad tienen una constante de afinidad (Km) que varía entre 1 y 100  $\mu\text{M}$  dependiendo del subtipo de transportador y del sistema donde se expresan.

Estas proteínas utilizan gradientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  para cumplir su función transportadora, por ello se conocen como transportadores de glutamato acoplados a sodio y potasio o transportadores de aminoácidos excitadores (Excitatory Amino acid Transporters, EAAT's), constituyen el sistema de transporte de glutamato mejor estudiado.

Los transportadores de baja afinidad presentan una  $K_m$  de 500  $\mu M$ , no requieren de sodio para ejercer su función transportadora y se inhiben en presencia de D-glutamato.<sup>(32)</sup>

Se conocen a la fecha cinco transportadores de glutamato de alta afinidad en los vertebrados: EAAC1 clonado del intestino delgado de conejo,<sup>(33)</sup> GLT-1 clonado del cerebro de la rata,<sup>(34)</sup> GLAST clonado del cerebro de la rata,<sup>(35)</sup> EAAT4 clonado del cerebelo del humano<sup>(36)</sup> y EAAT5 clonado de la retina del humano.<sup>(37)</sup>

La clonación de estos transportadores se obtuvo a partir de la secuencia parcial de una de las proteínas y con base en ellas se hicieron oligonucleótidos que se usaron como sonda para aislar bibliotecas de ácido desoxiribonucleico complementario (cDNA) de diversos vertebrados.

El transportador clonado se expresó en ovocitos de *xenopus laevis* y por técnicas radio métrica y electrofisiológicas se caracterizaron tanto las propiedades cinéticas como la dependencia de sodio y la selectividad del transportador.

Tabla I. Distribución de los transportadores de glutamato.

| <i><b>Transportador</b></i> | <i><b>Homólogo<br/>en humano</b></i> | <i><b>Tipo<br/>Celular</b></i>     | <i><b>Distribución</b></i>                | <i><b>Km (<math>\mu</math>M)</b></i> | <i><b>Grupo de<br/>trabajo</b></i> |
|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| GLAST                       | EAAT1                                | Astrocitos,<br>glía de<br>Bergmann | Cerebelo,<br>corteza<br>cerebelar         | 77                                   | Storck T y<br>cols,1992            |
| GLT-1                       | EAAT2                                | Astrocitos                         | Cerebro,<br>médula espinal                | 2                                    | Pines G y<br>cols,1992             |
| EAAC1                       | EAAT3                                | Neuronas                           | Hipocampo,<br>cerebelo,<br>ganglio basal. | 12                                   | Kanai y<br>Hediger,<br>1992        |
| EAAT4                       | EAAT4                                | Neuronas                           | Neuronas de<br>Purkinje                   | 2.49/0.97                            | Fairman<br>W. y cols,<br>1995      |
| EAAT5                       | EAAT5                                | Neuronas                           | Retina                                    | 64                                   | Arriza JI t<br>cols, 1995          |

El transportador **GLT-1** es una glicoproteína de 573 a.a y 72 kDa presenta una mayor distribución en el cerebro anterior, el hipocampo, la corteza cerebral y el estriado <sup>(31)</sup> se expresa también abundantemente en la capa molecular del cerebelo, específicamente en las células gliales de Bergmann. <sup>(38)</sup>

Este transportador se caracterizó como uno de tipo glial ; sin embargo recientemente se reportó su presencia en cultivos de neuronas del hipocampo de la rata.<sup>(39)</sup> Berger y Heidger<sup>(40)</sup> demostraron, por medio de estudios de hibridación *in situ* que GLT-1 se expresa en la mayoría de las neuronas de la neocorteza, de la capa plexiforme externa del bulbo olfatorio de las partes dorsal y ventral del núcleo olfatorio anterior y de la mayoría de las neuronas del núcleo antero medial talámico del cerebro de la rata.

El transportador **EAAC1** de 524 a.a y 57 kDa, parece ser un transportador preferentemente neuronal con una distribución heterogénea en el SNC. Tiene una presencia importante en tejidos como el riñón, corazón hígado, pulmón, placenta y músculo liso, sin embargo, tanto la proteína como su mRNA se localizan en la corteza cerebral<sup>(41-44)</sup> donde, existe una mayor concentración también se expresa en hipocampo, bulbo olfatorio, tálamo, colliculus superior, cerebelo y medula espinal.<sup>(45)</sup>

El transportador **GLAST** es una glicoproteína de 543 a.a y 66 kDa de peso; su gen, de 85 kb, contiene 10 exones.<sup>(46)</sup> En el SNC, la expresión de GLAST parece ser exclusiva de astrocitos en particular su expresión está enriquecida en la glía de Bergmann, del cerebelo y capa molecular de la corteza cerebelar,<sup>(47-48)</sup> también en el núcleo supraóptico, y células gliales de la retina.<sup>(49)</sup>

El transportador **EAAT4** se considera característico del cerebelo de donde se clono, es de origen humano su expresión en el resto del SNC no sobrepasa el 5% comparada con el cerebelo. <sup>(50)</sup> En cantidades inferiores se localiza en el tallo cerebral, la corteza y el hipocampo. Presenta una identidad del 40-60% con sus homólogos. <sup>(51-52)</sup>

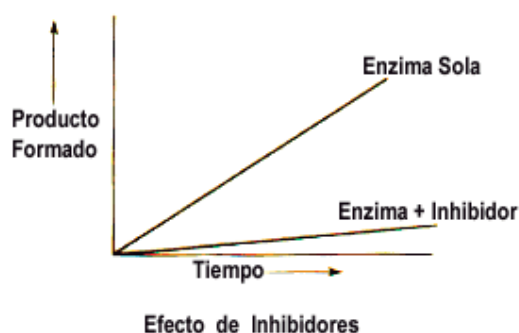
El transportador **EAAT5** Parece ser exclusivo de la retina, se localiza de forma especial en la capa plexiforme externa y en las células de Müller de la retina de la salamandra. <sup>(53)</sup>

### **III.3. INHIBICIÓN ENZIMÁTICA**

La actividad enzimática puede ser disminuida o eliminada por la acción de ciertas sustancias a las cuales se les conoce con el nombre de inhibidores enzimáticos. Mediante el uso de inhibidores enzimáticos se ha obtenido información muy valiosa sobre la conformación del centro activo de algunas enzimas.

Las distintas formas de interacción se traducen en varios tipos de inhibición perfectamente diferenciables experimentalmente. Los dos tipos más comunes son la *competitiva* y la *no competitiva* (Fig. 6). La primera es cuando el inhibidor compite con el sustrato por la unión con el centro activo de la enzima. Este tipo de inhibición puede reducirse si se aumenta la concentración de sustrato. <sup>(55)</sup>

Un ejemplo clásico lo constituye la inhibición del malonato sobre la enzima succinato deshidrogenasa que cataliza la eliminación de dos átomos de hidrógeno de los átomos de carbono metilénico del succinato. En la segunda el inhibidor forma un enlace covalente con las enzimas cerca del centro activo sin modificarla irreversiblemente. Un ejemplo son los gases nerviosos, como el fluorofosfato de di isopropilo (DFP) que forma un complejo con la enzima acetilcolinesterasa. Los animales envenenados con este gas quedan paralizados, debido a la imposibilidad de transmitir adecuadamente los impulsos nerviosos. Ciertos metales como el plomo, mercurio y arsénico inhiben enzimas que tienen en su centro activo grupos – SH libres. <sup>(54)</sup> El proceso de inhibición enzimática es útil para comprender los mecanismos de acción tóxica y farmacológica de algunos compuestos.



**Fig. 6 Representación gráfica de Lineweaver-Burk para determinar el tipo de inhibición enzimática.**

Un aspecto importante de los inhibidores es que pueden utilizarse para discriminar entre isoformas de una enzima.

#### **III.4. SISTEMA ENZIMATICO DE LA $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPASA**

La membrana plasmática define el espacio y mantiene las diferencias entre el contenido celular y su entorno. Constituye por tanto, una barrera altamente específica y selectiva para la entrada de nutrientes a la célula, y controla de forma precisa la salida de productos de desecho. Por otra parte mantiene diferencias de concentración de una serie de iones que son de vital importancia para la actividad celular. Por lo anterior las células han desarrollado mecanismos para realizar todas estas actividades de forma eficiente.

En particular, al generar diferencias de concentraciones iónicas a través de la bicapa lipídica, las membranas tienen la capacidad de almacenar energía potencial en forma de gradientes electroquímicos que se utilizan en los procesos de transporte, en la transmisión de señales eléctricas en células excitables y en la síntesis de adenosin trifosfato ó ATP.<sup>(56)</sup>

Dentro de los sistemas de transporte que la célula a desarrollado intervienen dos tipos de proteína, unas de ellas las permeasas que reconocen compuestos específicos y experimentan una serie de cambios conformacionales que le permiten transferir el soluto a través de la membrana y los canales iónicos que

forman poros hidrofílicos transmembranales. Estas proteínas realizan un transporte pasivo pues el movimiento responde tanto a un gradiente de concentración como a un gradiente eléctrico esta situación resulta útil en muchos procesos bioquímicos, pero en algunas situaciones es imprescindible que las células o los compartimentos celulares sean capaces de transportar sustancias en contra de gradientes de concentración, incluso gradientes muy desfavorables por lo que es necesario consumir energía, lo que se conoce como transporte activo. La energía para la actividad de estas proteínas suele proceder de la hidrólisis del ATP o un gradiente iónico, globalmente se calcula que algunas células gastan entre el 30 y 50 % de su ATP tan solo en el transporte activo.

Todos los procesos de transporte activo en los tejidos animales transportan glucosa y otros azúcares, aminoácidos y cationes como  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{++}$ ,<sup>(57)</sup>

Siendo estos últimos transportados por sistemas protéicos denominados bombas entre ellas la bomba de sodio y potasio (adenosin trifosfohidrolasa estimulada por  $Na^+$  y  $K^+$  dependiente de  $Mg^{++}$ ,  $Na^+/K^+$ -ATPasa) la cual es la más activa y la más universal, encontrándose en las membranas de casi todas las células animales.

En el año de 1941, Dean sugirió la presencia de una bomba de  $Na^+$  en la membrana plasmática de células animales pero no fue sino hasta 1957 cuando Jens Skou<sup>(58)</sup> descubrió en Dinamarca, la enzima que acopla la hidrólisis del ATP con la regulación de la concentración de los cationes sodio y potasio en la célula, proporcionando la base bioquímico-molecular para la expulsión del  $Na^+$  y la recuperación del  $K^+$ .

Las evidencias más convincentes de que la hidrólisis de ATP provee la energía para que ocurra el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , provinieron de experimentos realizados por Whittman y col.,<sup>(59)</sup> en preparados de eritrocitos denominados fantasmas en los cuales las concentraciones de iones, ATP y drogas se pueden variar en ambos lados de la membrana. Encontrando que:

- El transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  está acoplado a la hidrólisis de ATP y que no se puede llevar acabo uno sin el otro.
- El transporte de iones y la hidrólisis de ATP solamente se llevan acabo cuando en el exterior existe  $\text{K}^+$  y en el citoplasma  $\text{Na}^+$  y ATP.
- Por cada molécula de ATP hidrolizado se bombean tres iones  $\text{Na}^+$  hacia fuera y dos iones  $\text{K}^+$  hacia el citoplasma en células del cerebro,<sup>(60)</sup> aunque esta relación puede variar dependiendo del tejido.<sup>(61)</sup>

#### III.4.1 Estructura y Función

La bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  es un sistema enzimático que hidroliza ATP y de acuerdo a la Comisión de Enzimas que establece un sistema de nomenclatura internacional, es designada como E.C.3.6.1.3. que se refiere a que lleva acabo una reacción de hidrólisis, actúa sobre un enlace anhidro y específicamente es una fosfohidrolasa<sup>(62)</sup> es la responsable de mantener diferencias de concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana. La mayoría de las células animales mantienen la concentración de  $\text{K}^+$  intracelular constante relativamente elevada comprendida entre 120 y 160 mM siendo esta en promedio 30 veces más que la concentración

extracelular, mientras que el nivel del  $\text{Na}^+$  en el interior de la célula es, generalmente, inferior a 10 mM y su concentración extracelular alrededor de 10 veces más. En las neuronas están entrando y saliendo continuamente pequeñas cantidades de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  respectivamente durante la propagación de impulsos nerviosos, a través de canales.

Es la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa la que reestablece el equilibrio entre los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que es la condición en la que no hay flujo neto de estos iones a través de la membrana y restablece el potencial de reposo de  $-70\text{mV}$ , característico de varios tipos celulares, en el caso de las neuronas esto es crucial para su funcionamiento.

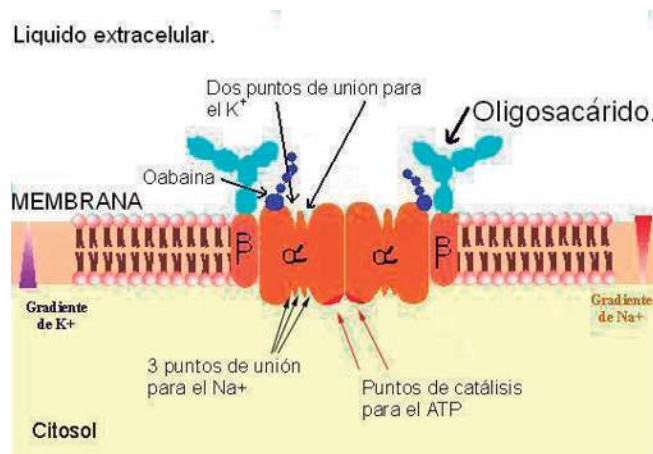
La velocidad de bombeo es regulada por concentraciones de  $\text{Na}^+$  intracelular y las concentraciones de  $\text{K}^+$  extracelular, sin embargo bajo condiciones fisiológicas normales las concentraciones de  $\text{Na}^+$  intracelular generalmente es menor que la requerida para ocupar el 50 % de los sitios de  $\text{Na}^+$  mientras que la concentración de  $\text{K}^+$  extracelular es suficiente para ocupar al máximo los sitios de  $\text{K}^+$ . Por lo tanto la velocidad de bombeo está más influenciada por las concentraciones de  $\text{Na}^+$  intracelular que por las de  $\text{K}^+$  extracelular. Otros factores que influyen en la actividad de la enzima son las concentraciones de ATP,  $\text{Mg}^{++}$ , adenosin trifosfato o ADP y fosfato inorgánico o  $\text{Pi}$ . <sup>(63)</sup> En el SNC la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  está concentrada en los nódulos de Ranvier y procesos axonales finos, dendritas y membranas de células gliales que rodean a los cuerpos neuronales en el cerebro, cerebelo y en la médula espinal.

## UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

El complejo enzimático de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, purificada, <sup>(64)</sup> posee un peso molecular de 250kDa a 300kDa, es una proteína tetramérica formada por dos subunidades  $\alpha$  de 110 Kd y por dos subunidades  $\beta$  de 40 Kd aproximadamente. El complejo atraviesa la membrana plasmática con segmentos hidrofílicos que se extienden hacia el espacio extracelular y hacia el citoplasma.

La subunidad  $\alpha$ , denominada la subunidad catalítica tiene los sitios de unión para el  $\text{Na}^+$  y el ATP hacia la región citoplásmica en la superficie interior y para el  $\text{K}^+$  y la ouabaina hacia la superficie externa.

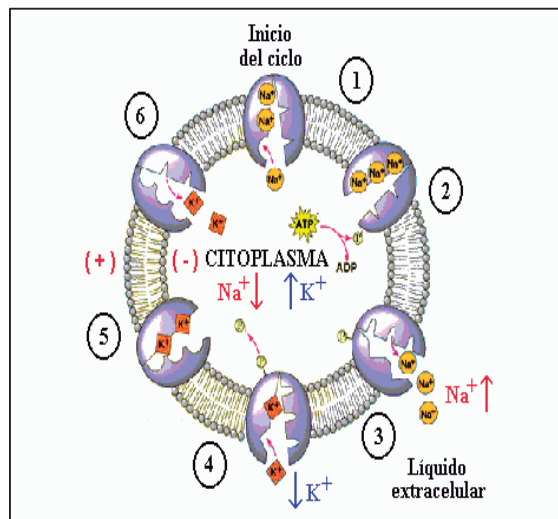
Esta porción de la molécula se fosforila mientras el ATP es hidrolizado. La subunidad  $\beta$  de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa es una glucoproteína que contiene ácido siálico, además de glucosa, galactosa y restos de otra hexosa. Aunque no se conoce a ciencia cierta la función de la subunidad  $\beta$  se piensa que participa en el ensamblaje del complejo proteínico en la membrana plasmática. (Fig. 7)



**Fig. 7** Modelo esquemático que muestra la estructura de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.

El mecanismo empleado por el sistema enzimático de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  comienza con la unión del  $\text{Na}^+$  citoplasmático a la subunidad  $\alpha$ , en el estado E1 (1), seguida por la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  por el ATP, induciendo un cambio conformacional  $\text{E1} \rightarrow \text{E2}$  durante el cual el  $\text{Na}^+$  queda expuesto hacia el lado extracelular (2), presentando una disminución de la afinidad por el complejo y por tal motivo se libera hacia el espacio extracelular (3).

En esta conformación el  $\text{K}^+$  se une al sitio extracelular de la enzima y el resto de la energía libre se disipa al desfosforilarse la misma (4) revirtiendo del estado  $\text{E2} \rightarrow \text{E1}$ . Una vez recuperada la conformación original (5), estado en el cual el  $\text{K}^+$  queda expuesto al lado citoplasmático y su afinidad por la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  disminuye, lo que provoca su liberación hacia el interior de la célula (6) reiniciándose nuevamente el ciclo. (Fig.8)



**Fig.8 Modelo propuesto para el funcionamiento de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPasa.**

### III.4.2. ISOFORMAS MOLECULARES DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO DE LA $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPASA.

Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  tienen múltiples isoformas y son codificadas por varios genes, las isoformas de la  $\alpha$  muestran diferentes afinidades por los glucósidos cardiacos y su distribución se ha estudiado de acuerdo a las características de unión y movilidad electroforética.<sup>(65)</sup> La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa con mayor afinidad a la ouabaina contiene la subunidad  $\alpha_3$ , la de afinidad intermedia contiene la subunidad  $\alpha_2$  y la de muy baja afinidad, es la que tiene la subunidad  $\alpha_1$ .<sup>(65)</sup>

En el SNC se expresan las tres isoformas  $\alpha$  a lo largo del desarrollo ontogénico pero en varias proporciones dependiendo de la región y del tipo celular.<sup>(66)</sup> En la actualidad se considera que las neuronas expresan las tres isoformas en varias combinaciones y que la glía expresa principalmente las isoformas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . También hay isoformas de la subunidad  $\beta$ , como varias formas de edición postranscripcionales<sup>(62)</sup> aunque no se sabe con exactitud el papel que desempeña esta subunidad, existen evidencias que señalan que su unión a la subunidad  $\alpha$  es indispensable para que esta sea degradada y así transportarse desde el retículo endoplásmico para insertarse en la membrana plasmática, es indispensable para la actividad de la subunidad  $\alpha$  así como también es importante en la traslocación de iones.<sup>(67-68)</sup>

Tres isoformas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) de la subunidad catalítica  $\alpha$  de la bomba de  $\text{Na}^+$  en membrana plasmática (MP) han sido identificadas en tejidos de aves y mamíferos. Las tres isoformas difieren en sus afinidades por los iones y por el inhibidor de la bomba de  $\text{Na}^+$ , la ouabaina. En la rata, la  $\alpha 1$  posee una inusual baja afinidad por la ouabaina. La MP de la mayoría de las células de ratas contiene tanto la isoforma de baja afinidad ( $\alpha 1$ ) como la isoforma de alta afinidad ( $\alpha 2$  o  $\alpha 3$ ), pero la localización precisa de éstas isoformas y su significancia funcional, son desconocidas. Se han empleado técnicas de inmunocitoquímica de alta resolución para localizar las isoformas de la subunidad  $\alpha$  en astrocitos neuronales primarios de rata cultivados y miocitos arteriales. La isoforma  $\alpha 1$  fue ubicuamente distribuida sobre la superficie de éstas células. En contraste, las isoformas con alta afinidad a la ouabaina ( $\alpha 2$  en astrositos y  $\alpha 3$  en neuronas y miocitos) fueron confinadas a una distribución reticular dentro de la MP paralelo al retículo endoplasmático subyacente o el retículo sarcoplasmático. Ésta distribución es idéntica al intercambio  $\text{Na}/\text{Ca}$  de la MP. Esto formula la posibilidad de que la  $\alpha 1$  pueda regular el volumen cistolítico del  $\text{Na}^+$ , en áreas donde  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  regulen al  $\text{Na}^+$ , e indirectamente al  $\text{Ca}^+$  en espacios cistolíticos restringidos entre la MP y el retículo. La alta afinidad de la bomba de  $\text{Na}^+$  puede ser modulada por medio del  $\text{Ca}^+$  contenido en el retículo y la señalización del  $\text{Ca}^+$ .

En la rata <sup>(69)</sup> la IC<sub>50</sub> es > 10,000nM para  $\alpha$  1, y solo de 10-500nM para  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3. Estas isoformas también exhiben diferencias en sus cinéticas para el Na<sup>+</sup>, el K<sup>+</sup> y el ATP. <sup>(70)</sup>

Trabajos previos del laboratorio <sup>(71-72)</sup> han mostrado que la inhibición y activación del transportador GLAST en las CGB disminuye la actividad de la bomba de sodio y potasio, por otro lado no existen reportes de cuantas isoformas de la enzima están presentes en las CGB. Por lo cual en el presente trabajo nos planteamos la siguiente:

#### IV. HIPOTESIS

En las células gliales de Bergmann están presentes las tres isoformas de la bomba de sodio y potasio.

#### V. OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante curvas de inhibición por ouabaina las isoformas de la bomba de sodio y potasio presentes en las CGB.

## VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Estandarizar el método para determinar la actividad de la bomba de sodio y potasio.
- 2.- Realizar Curvas de inhibición de la actividad de la bomba de sodio y potasio con ouabaina.
- 3.- Estudiar el efecto del TPA y GLU en las curvas de inhibición de la bomba de sodio por ouabaina.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### **VII.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS GLIALES DE BERGMANN.**

Se utilizó el método descrito por Ruíz, <sup>(73)</sup> brevemente: los cultivos primarios de células gliales de Bergmann se prepararon a partir de embriones de pollo de 14 días. Se disectaron los cerebelos y se colocaron en medio de cultivo (D-MEM) que contenía 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina y 2  $\mu$ M de gentamicina. El tejido se separó mecánicamente pasándolo a través de agujas de diversos calibres con el fin de disociar las células. Se contó el número de células viables utilizando azul de tripano y se ajustó la concentración celular a  $1.0 \times 10^6$  células por mililitro. Una vez ajustado el número de células se distribuyeron en placas de cultivo de plástico con 24 pozos o bien en cajas de Petri de 60 o 100 ml. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

Estudios de inmunocitoquímica y de flujo de iones inducidos por kainato, han demostrado que las células obtenidas a partir de este cultivo son células Gliales de Bergmann. A los 14 días de cultivo las CGB se trataron con 1,0 mM de Glutamato durante 30 minutos a 37°C y con TPA (100 nM).

### **VII.2 PREPARACIÓN DE LOS HOMOGENEIZADOS DE CORTEZA CEREBRAL Y CEREBELO**

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de 200-220 g de peso corporal, obtenidas del bioterio del CINVESTAV-IPN y del INSTITUTO QUIMICO BIOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO. Se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas de ciclos de iluminación-oscuridad de 12h cada uno, humedad relativa del 80% y temperatura de 20-24 °C. Se sometieron a un régimen nutricional ab libitum tanto de agua como de alimento purina Chow.

Los animales se sacrificaron entre las 9:00 y las 10:00 a.m por desnucación cervical e inmediatamente se perfundió con 15 ml de solución salina isotónica fría al 0.9 % que se inyectó en el ventrículo izquierdo drenando a través de la vena cava inferior.

Se extrajo el encéfalo y sobre una superficie fría se hizo la disección de la corteza cerebral y del cerebelo, los cuales se homogeneizaron en 10 volúmenes de una solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM a pH 7.4, con 10 pasos a 700 rpm en un homogeneizador de vidrio con un vástago de teflón de 0.25 mm de luz.

**VII.3 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES ENRIQUECIDAS CON MEMBRANAS GLIALES O NEURONALES.**

Se utilizó el método descrito por Rose.<sup>(74)</sup> Se disecaron tanto la corteza cerebral como el cerebelo de 5 ratas macho adultos de 200 – 250g y se colocaron en ficoll al 10% en solución de fosfatos. Se cortaron los tejidos cerebelos con navaja y se pasaron a través de una malla de 110µM mediante presión mecánica, se recibió el filtrado en 12.5ml de ficoll al 10% y se hizo pasar el filtrado por una malla de 48µM el filtrado obtenido se homogenizó manualmente (1 vez) y la suspensión resultante se colocó en un gradiente de sacarosa (1.45M) y ficoll al 30% (en este orden de densidad) de 2 a 2.5 ml de filtrado por gradiente. Se centrifugó a 39,000 rpm por 45 min. a 4°C en un rotor SW56; una vez centrifugado se obtuvieron 2 bandas, que correspondieron en orden descendente a glía enriquecida y a neurona. La glía se separa entre el ficoll al 30% y la suspensión. Las neuronas se separan en la interfase de la sacarosa y el ficoll al 30%. Se colectaron las bandas por separado y se diluyeron en proporción 1:10 con la solución de TRIS-HCL 50mM pH = 7.4. Se centrifugaron nuevamente a 9,000 rpm por 10 min. a 4°C para concentrar las células.

Resuspendimos por separado las pastillas resultantes en TRIS-HCL 50mM pH= 7.4 y se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry.<sup>(75)</sup> En una concentración final de 2mg de proteína / ml para los ensayos de actividad enzimática.

**VII.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BASAL DE LA  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.**

Las fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales de corteza y de cerebelo se preincubaron durante 30 minutos a 37 °C en agitación constante con Glu a concentración de 1mM y otro grupo con TPA a concentración final de 100nM y posteriormente se realizó la determinación de la actividad de la bomba de sodio. La actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa se midió con el método utilizado por Mercado y Hernández<sup>(76)</sup> por triplicado en alícuotas de 25  $\mu\text{l}$  equivalentes a 50  $\mu\text{g}$  de proteína del homogeneizado o de las fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales, brevemente:

Se preincubó el tejido durante 5 minutos a 37 °C en agitación constante en un incubador metabólico con el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con  $\text{MgCl}_2$  6mM, KCl 20 mM, NaCl 100mM sin ouabaina para medir la actividad total y con diferentes concentraciones de ouabaina desde 100  $\mu\text{M}$  hasta 1nM para medir la actividad específica. Se adiciono ATP (12mM) y a los 10 minutos, la reacción se detuvo añadiendo 20  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético frío al 50%. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante en donde se llevó a cabo la determinación de  $\text{P}_i$ , producto de la hidrólisis, con el reactivo a base de ácido sulfúrico, molibdato de amonio y sulfato ferroso. El  $\text{P}_i$  se determinó espectrofotométricamente a 800 nm a los 10 minutos de iniciada la reacción, de acuerdo al método de Fiske y Subbarrow.<sup>(77)</sup>

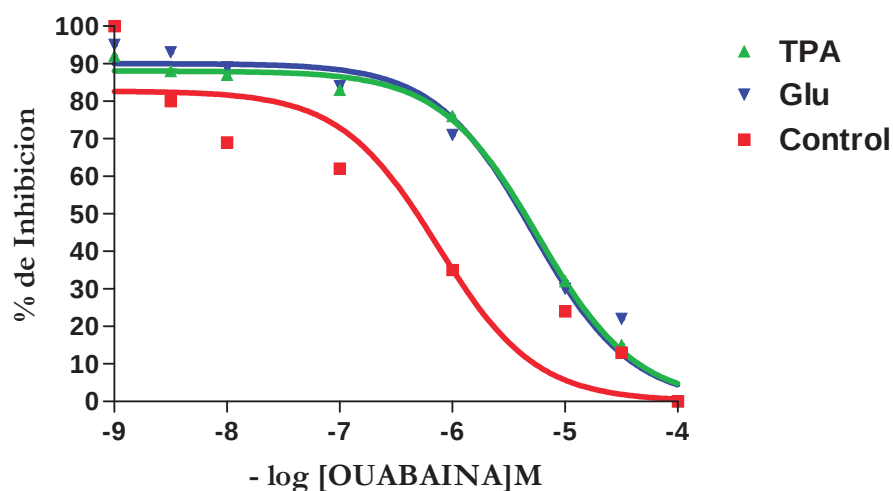
La actividad específica de la enzima se obtuvo a partir de la diferencia entre la actividad total y la actividad medida en presencia de ouabaina.

#### **VII.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se calculo el promedio y la desviación estándar de los grupos experimentales y las constantes de inhibición se calcularon con el programa Graph Pad Prism 4.0.

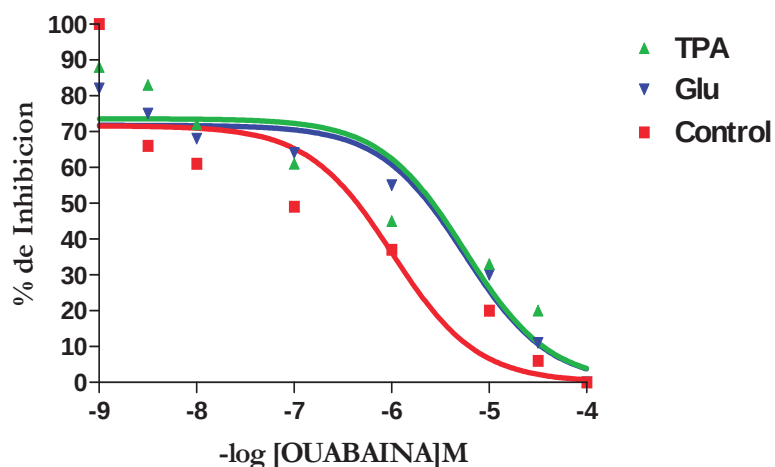
## VIII. RESULTADOS

La figura 9 muestra la curva de inhibición por ouabaina de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en fracciones enriquecidas de membranas gliales de corteza cerebral. La actividad basal en el grupo control fue de  $11.18 \mu\text{moles de Pi/mgPr/hr}$ . Con respecto a las constantes de inhibición calculadas, los grupos tratados con TPA y glutamato mostraron la misma constante de inhibición  $5.76 \times 10^{-6} \text{ M}$  y  $5.21 \times 10^{-6} \text{ M}$  respectivamente, para el grupo control la constante fue de  $7.40 \times 10^{-7} \text{ M}$  (Tabla II).



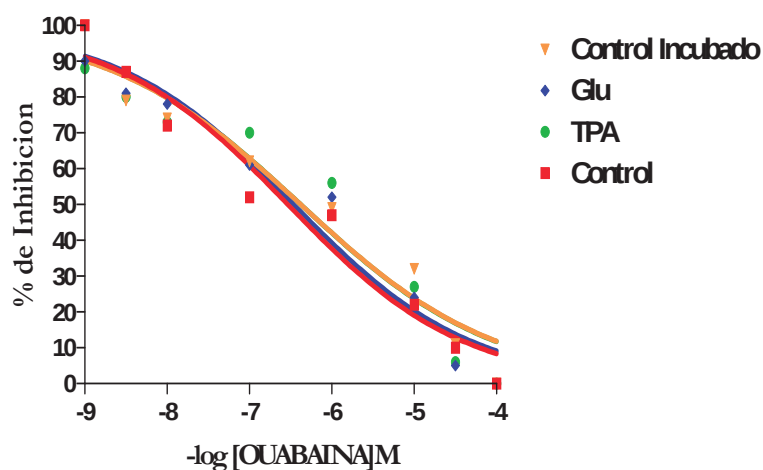
**Fig. 9.** Curva de inhibición de la bomba de sodio y potasio por ouabaina en membranas gliales de corteza cerebral.  $\bar{X} \pm \text{D. E.}$  de 4 experimentos realizados por triplicado.

La figura 10 muestra la curva de inhibición por ouabaina de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en fracciones enriquecidas de membranas neuronales de corteza cerebral. La actividad basal de la enzima fue de  $6.64 \mu\text{moles de Pi/mgPr/hr}$ . La constante de inhibición calculada para los tres grupos fue del mismo orden de magnitud:  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $5.63 \times 10^{-6}$  y  $5.53 \times 10^{-6} \text{ M}$  (tabla II).



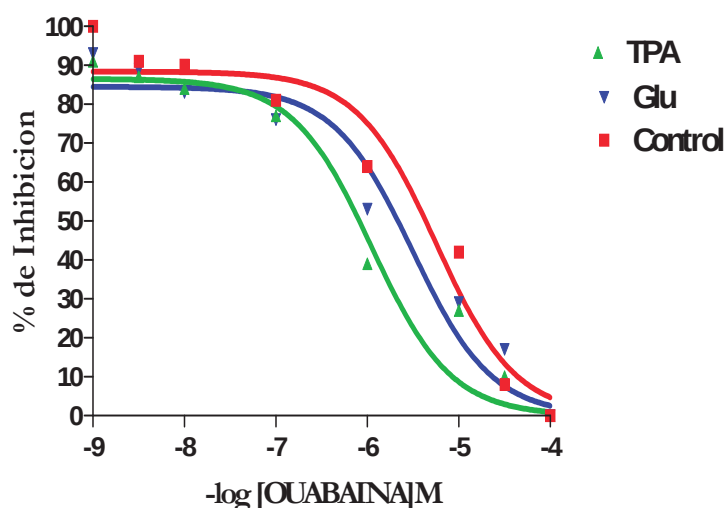
**Fig. 10.** Curva de inhibición de la bomba de sodio y potasio por ouabaina en membranas neuronales de corteza cerebral.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 4 experimentos realizados por triplicado.

La figura 11 muestra la curva de inhibición por ouabaina de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en homogeneizado de cerebelo. La actividad basal de la enzima fue de  $6.10 \mu\text{moles de Pi/mgPr/hr}$ . La constante de inhibición calculada para los tres grupos, control, TPA y Glu fueron de  $2.92 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $4.18 \times 10^{-7}$  y  $3.43 \times 10^{-7}$  respectivamente y en las cuales no se observa diferencia entre ellas (tabla II).



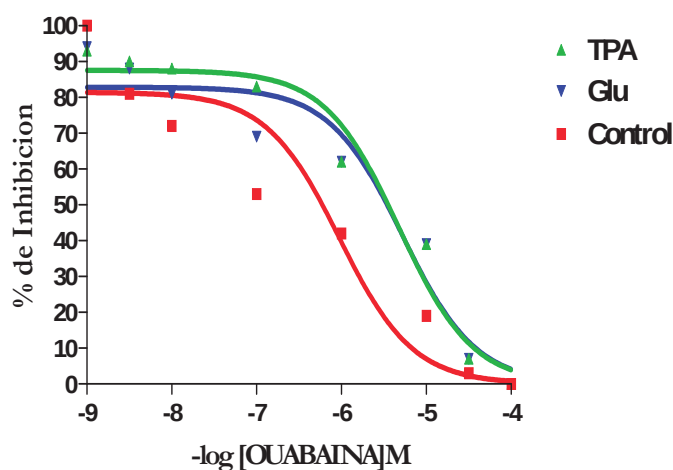
**Fig.11.** Curva de inhibición de la bomba de sodio y potasio por ouabaina en homogeneizado de cerebelo.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 4 experimentos realizados por triplicado.

La figura 12 muestra la curva de inhibición por ouabaina de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en membranas gliales aisladas de cerebelo de rata. La actividad basal de la enzima fue de  $15.31 \mu\text{moles de Pi/mgPr/hr}$ . La constante de inhibición calculada para los tres grupos fueron de  $5.67 \times 10^{-6} \text{ M}$  para los grupos control y control incubado,  $1.12 \times 10^{-6} \text{ M}$  para el grupo tratado con TPA y de  $3.14 \times 10^{-6}$  no se observo por lo tanto diferencias en un orden de magnitud entre los grupos experimentales (tabla II).



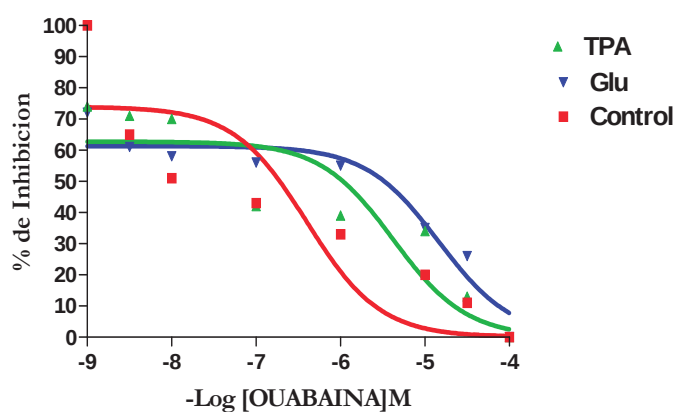
**Fig. 12.** Curva de inhibición de la bomba de sodio y potasio por ouabaina en membranas gliales aisladas de cerebelo.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 4 experimentos realizados por triplicado.

La figura 13 muestra la curva de inhibición por ouabaina de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en membranas neuronales aisladas de cerebelo de rata. La actividad basal de la enzima fue de  $17.13 \mu\text{moles de Pi/mgPr/hr}$ . La constante de inhibición calculada para los tres grupos fueron de  $9.48 \times 10^{-7} \text{ M}$  para el grupo control,  $4.73 \times 10^{-6}$  para el grupo tratado con TPA y de  $5.24 \times 10^{-6}$  no se observo por lo tanto diferencias en un orden de magnitud entre los grupos experimentales (tabla II).



**Fig. 13.** Curva de inhibición de la bomba de sodio y potasio por ouabaina en membranas neuronales aisladas de cerebelo.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 4 experimentos realizados por triplicado.

La figura 14 muestra la curva de inhibición por ouabaina de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en células gliales de Bergmann. La actividad basal de la enzima fue de 2.78  $\mu\text{moles de Pi/mgPr/hr}$ . La constante de inhibición calculada para los tres grupos fueron de  $3.99 \times 10^{-7} \text{ M}$  para el grupo control,  $4.20 \times 10^{-6} \text{ M}$  para el grupo tratado con TPA y de  $1.45 \times 10^{-5} \text{ M}$  para el grupo tratado con Glutamato, observándose un cambio en la afinidad de la enzima para la ouabaina en el grupo tratado con glutamato (tabla II).



**Fig. 14. Curva de inhibición de la bomba de sodio y potasio por ouabaina en Células Gliales de Bergmann.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 4 experimentos realizados por triplicado.**

TABLA II. CONSTANTES DE INHIBICION DE LA  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa POR OUABAINA

| TEJIDO                   | CONTROL                         | TPA                             | GLU                             |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Neurona de corteza       | $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$  | $5.63 \times 10^{-6} \text{ M}$ | $5.53 \times 10^{-6} \text{ M}$ |
| Neurona de cerebelo      | $9.48 \times 10^{-7} \text{ M}$ | $4.73 \times 10^{-6} \text{ M}$ | $5.24 \times 10^{-6} \text{ M}$ |
| Homogenizado de cerebelo | $2.92 \times 10^{-7} \text{ M}$ | $4.18 \times 10^{-7} \text{ M}$ | $3.43 \times 10^{-7} \text{ M}$ |
| Glía de corteza          | $7.40 \times 10^{-7} \text{ M}$ | $5.76 \times 10^{-6} \text{ M}$ | $5.21 \times 10^{-6} \text{ M}$ |
| Glía de cerebelo         | $5.67 \times 10^{-6} \text{ M}$ | $1.12 \times 10^{-6} \text{ M}$ | $3.14 \times 10^{-6} \text{ M}$ |
| CGB                      | $3.99 \times 10^{-7} \text{ M}$ | $4.20 \times 10^{-6} \text{ M}$ | $1.45 \times 10^{-5} \text{ M}$ |

## IX. DISCUSIÓN

Cuando hablamos de una familia génica nos referimos a un determinado número de genes que codifican proteínas con la característica común de poseer homología entre elementos funcionales comunes, como por ejemplo sitios de fijación de ligandos como glucosa, ATP, fosfato inorgánico, iones o substratos en general. Si se trata de isoformas, la homología estructural puede ser desde el 80% hasta más del 99%. Estos discretos cambios estructurales durante la evolución han dado lugar a modificaciones funcionales muy sutiles. Esto son los isoenzimas o más comúnmente conocidos como isoformas.

Las isoformas, aun desarrollando la misma función, tienen una distribución particular según los tejidos o grupos celulares en los que se encuentren otorgándoles propiedades especializadas a estos.

Como ya se menciona anteriormente la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa es un enzima de la membrana plasmática de las células de mamífero. Y allí donde se ha descrito se ha presentado siempre el cliché común de un oligómero funcionante formado por la asociación de una subunidad alfa y una subunidad beta.<sup>(78)</sup> La subunidad alfa esta implicada en los procesos de transporte de iones sodio, potasio, magnesio y calcio y protones así como de la fijación de ATP y fosfato inorgánico. Además de las funciones implicadas en la bomba de sodio, la subunidad alfa es el receptor de los glucósidos cardiotónicos.

La subunidad beta es un polipéptido glicosilado que, aun siendo indispensable para el funcionamiento de la subunidad alfa, no parece estar implicada directamente en la actividad de la bomba de sodio como tal, pero si con el ensamblaje del sistema en la membrana.

La variación en la sensibilidad a los glicósidos cardiacos que se presenta entre los tejidos de la misma especie ya hizo sospechar la existencia de formas distintas de la misma proteína.

Se describe que para confirmarlo se purifico la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPasa de distintos tejidos y se generaron anticuerpos contra ellas, observándose que los anticuerpos generados contra la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPasa de uno inhiben la de los otros con una menor eficacia que la del tejido que se uso como antígeno. <sup>(78)</sup>

La tecnología del DNA recombinante puso en evidencia la existencia de tres cDNAs con secuencias diferentes que codifican tres subunidades alfa diferentes en la misma especie animal. Estas tres subunidades alfa que difieren en estructura primaria son denominadas isoformas alfa 1, alfa 2, alfa 3. Los genes que las codifican presentan unos patrones de expresión diferencial que varían según los tejidos, los grupos celulares dentro del mismo tejido y según las distintas etapas del desarrollo. Las señales precisas y especificadas por las que cada célula o tejido expresa una isoforma y no otra son apenas conocidas en algunos casos. <sup>(66)</sup>

De acuerdo con los valores  $IC_{50}$  reportados en la literatura <sup>(69)</sup> tenemos que para la isoforma  $\alpha 1$  los valores en el orden Molar son mayores que ( $1 \times 10^{-5}$  M) mientras que para  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  son solamente de  $1 \times 10^{-8}$  M y de  $5 \times 10^{-7}$  M, tomando esto como referencia y de acuerdo a los valores obtenidos en cada tejido tratado podemos ver que la isoforma presente en neurona de cerebelo y de corteza esta entre la alfa1 y la alfa 2 por su afinidad intermedia, probablemente las dos isoformas estén presentes. En neurona de cerebelo el cambio observado en la afinidad de la enzima por ouabaina en presencia de TPA y Glu es similar al efecto observado en la actividad de la enzima por estos dos compuestos, lo que indica que si existe relación entre el transportado de glutamato en neurona de cerebelo y la bomba de sodio y potasio al igual que en la glía de corteza cerebral. Las CGB muestran la presencia de las isoformas alfa 1 y alfa 2 y un cambio en la afinidad en presencia de glutamato, lo que indica que el transportador GLAST y la bomba de sodio y potasio están muy relacionados. Con respecto al homogeneizado de cerebelo, las constantes obtenidas indican que la isoforma presente es la alfa2 y que el TPA y el Glutamato no modifican esta interacción, probablemente al tener tanto neurona como glía el efecto de TPA y Glutamato en ambos tipos celulares se neutralice.

## X. CONCLUSIONES

- La técnica para determinar la actividad de la bomba de sodio y potasio fue estandarizada adecuadamente.
- Se caracterizó la curva de inhibición de la bomba de sodio y potasio contra ouabaina en diferentes preparaciones de tejido cerebral.
- La isoforma presente en las Células Gliales de Bergmann fue alfa 1 y alfa 2, además corroboramos la relación entre el transportador GLAST y la bomba de sodio y potasio al existir un cambio en la afinidad de la enzima por ouabaina con el tratamiento de Glutamato.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Finn, Geneser. (2000), Histología. Editorial Panamericana. 3<sup>ra</sup>. Ed. 327-375.
2. Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., and Robinson, S.R. (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. J. Neurosci. Res. 57, 417-428.
3. Mathews, C.K, Van Holde, K.E., and Ahern, K.G. (2000) En, Biochemistry. Addison Wesley Longman E.D., pp.126-160.
4. Erecinska, M., and Silver, I.A. (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. Prog. Neurobiol. 35: 245-296.
5. Fonnum, F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. J. Neurochem.
6. Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., and Robinson, S. R. (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. J. Neurosci. Res. 57:417-428.
7. Danbolt, N.C. (1994) the high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. Prog. Neurobiol. 44: 377-396.
8. Gallo, V, Ghiani, C.A (2000) Glutamate Receptors in glía. New cell, new inputs and new functions. Trend in Pharmacol Sci. 21:252-&.

9. Bergles, D. E, Diamond, J. S, Jahr, C. E (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.*9:293-&
10. Medina, M. A and Escobar, B. M (2000) Sistema Glutamatérgico, primera parte: Sinaptología, homeostasis y muerte celular. *Rev. Colombiana de Psiquiatría.*3: 187-212
11. Ottersen, O. P, Storm, M .J (2000) Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate. In: *Glutamate Handbook of Chemical Neuroanatomy*. S. I. Elseiver.18:1-44.
12. Jordan, J (2003) Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. *OFFARM.*3: 102-112.
13. Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., Yamaguchi, S., Kawabata, S., and Okada, M. (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Rev.*26:230-235.
14. Sims, K.D. and Robinson, M.B. (1999) Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit. Rev. in Neurobiology*, 13 (2):169-197.
15. Schmitz, D, Mellor, J, Nicoll, R (2001) Presynaptic Kainate Receptor Mediation of Frequency Facilitation at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Science.*291:1972-1975.

16. Vitten, H, Isaacson, J (2001) Synaptic Transmission: Exiting Times for Presynaptic Receptors. *Curr. Biol.* 11:695-697.
17. Meldrum, B (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130:1007s-10152
18. Lerma, J (1997) Receptores postsinápticos de neurotransmisores. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.* 91: 271-277.
19. Bigger, C (1999) Ionotrópic Glutamate Receptors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 441-447
20. Gomes, I., Jordan, B.A., Gupta, A., Rios, C., Trapaidze, N., and Devi, L.A. (2001) G protein coupled receptor function. *J. Mol. Med.* 79:226-242.
21. Hudspeth, M.J., (1997) Glutamate a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. *Br. J. Anaesth.* 78: 731-747.
22. Caramelo, O, Santos, P, Carvalho, A, Duarte, C (1999) Metabotropic Glutamate Receptors Modulate (3H) Acetylcholine Release from Cultured Amacrine -Like Neurons. *J. Neurosci. Res.* 58: 505-514.

23. Michaelis, E.K., (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. In Neurobiol.* 54:369-415.
24. Kalb, R, Fox, A (1997) Synchronized overproduction of AMPA, Kainate, and NMDA Glutamate Receptors During Human Spinal Cord Development. *J. Comp. Neurol.* 384: 200-210.
25. Guyton, C. A. y Hall, E. J. (1997) Tratado de Fisiología médica. Mc Graw-Hill Interamericana. pp. 617-618.
26. Mason, D.J., and Hugget, J.F. (2002) Glutamate transporters in bone. *J. Musculoskel. Neuron Interact.* 2(5):406-414.
27. Reyes, H. D., Salceda, S. R (2000) Transportadores de Glutamate de alta afinidad en el sistema nervioso: estructura función y relevancia fisiológica. *Arch. Neurocién.* 2:96-102.
28. Trotti, D, Danbolt, N. C, Volterra, A (1998) Glutamate transporters are oxidant vulnerable a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration. *Trends. Pharmacol. Sci.* 8: 328-334.
29. Bergles, D. E, Diamond, J. S, Jahr, C. E (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and Beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3:293-298.
30. Gamboa, E. C (2002) Regulación del transportador de glutamato/aspartato GLAST por el factor de crecimiento parecido a

insulina tipo 1(IGF-1).Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Genética y Biología Molecular)CINVESTAV.1-80.

- 31.Kanai, Y, Trott, D, Nussberger, S, Hediger, M.A (1997) The high-affinity glutamate transporter family. En Reith MEA, editor. Neurotransmitter Transporters: structure, function and regulation. New Jersey: Humana Press.
32. Plachez, C, Danbolt, N. C, Recansens, M. (2000) Transient expression of the glial glutamate transporters GLAST and GLT1in Hippocampal neurons in primary culture. Jou of Neurosc. Res. 59:587-593
- 33.Borowski, B, Hoffman, B (1995) Neurotransmitter transporters: Molecular biology, function, and regulation. Int. Rev. Neurobiol. 38:139-199.
- 34.Down, L. A, Robinson, M. B (1996) Rapid stimulation of EAAC1-mediated Na<sup>+</sup>- dependent L-glutamate transport activity in C6 glioma cells by phorbol ester. J.Neurochem.67:508-516.
- 35.Lopez, T, Ortega, A (1994) AMPA/KA Receptors in Bergmann glía.Neuro.Report.5:504-506.
- 36.Seal, R. P., Amara, S. G. (1999) Excitatory aminoacid transporters. A family in flux. Ann. Rev. Of. Pharma. tox. 39:431-456.
- 37.Arriza, J.F, Eliasof, S, Kavanaugh, M.P, Amara, S.G (1997) Excitatory amino transporter, a retinal glutamate transporter

coupled to a chloride conductance. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 4155-4160.

38. Takashi, M, Billows, B, Ross, D, Savants, M, Hermann, M, Atwell, D (2000) The role of glutamate transporters in glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J.Exp.Biol.*2:401-409.
39. Mennerick, S, Zorumski, C.F (1998) Glial contributions to excitatory neurotransmission in cultured hippocampal cells. *Nature.* 368:59-62.
40. Berger, U.V, Hediger, M.A, (1995) Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anat. Embriol.*195: 13-30.
41. Kanai, Y and Hediger, M.A (1992) Primary structure and functional characterization of high- affinity glutamate transporter. *Nature.*360:467- 471.
42. Rothstein, J. D, Dykes, Hoberg, M, Pardo, C. A, Bristol, L. A, Jin, L, Wu, D, Nash, N and Kunc, R.W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 13: 713- 725.
43. Arraiza, J.L, Fairman, W.A, Wadiche, J.I, Murdoch, G.H, Kavanaugh, M.P and Amara, S.G (1994) Functional comparisons of the glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J.Neurosci.*14: 5559-5569.

44. Nakayama, T, Kawakani, H, Tanaka, K, and Nakamura, S (1996) Expression of three glutamate transporter subtype mRNAs in human brain regions and peripheral tissues. *Mol. Brain. Res.* 36:189-192.
45. Hansson, E, et al (2000) Astroglia and glutamate transport, glutamate induced cell-swelling and gap junction communication. *Neuroch. Inter.* 37:317-329.
46. Stoffel, W, Sasse, J, Ducker, M, Muller, R, Hofmann, K, Fink, T and Lichter, P (1996) Human high-affinity, Na<sup>+</sup>-dependent L – Glutamate L-aspartate transporter GLAST-1(EAAT1) : gene structure and localization to chromosome 5p11-p12. *FEBS Lett.* 386: 189-193.
47. Ruiz, M, Ortega, A (1995) Characterization of Na<sup>+</sup>- dependent glutamate/aspartate transporter from cultured Bergmann glia. *Neuro. Report.* 6:2041-2044.
48. Kondo, K, Hashimoto, H, Kitana, J, Sawada, M, Suzumura, A, Marunouchi, T and Baba, A (1995) Expression of glutamate transporters in cultured glial cells. *Neurosci. Lett.* 188:140-142.
49. Lehre, K, Levy, L, Ottersen, O, Storm – Mathisen, J, Danbolt, N (1995) Differential expression of the two glial glutamate transporters in the rat brain; quantitative and immunocytochemical observation. *J. Neurosci.* 15: 1835-1853

50. Danbolt, N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog.in.Neurob.*65:1-105.
51. Fairman, W.A, Vanderberg, R.J, Arraiza, J.L, Kavanaugh, M. P and Amara, S.G (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.*375:599.603.
52. Palmada, M and Centelles, J (1998) Excitatory aminoacid neurotransmission. Pathways form metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. *Front. in Biosci.*3:701-718.
53. Eliasof, S, Arriza, J. L, Leighton, B. H, Kavanaugh, M.P, Amara, S. G (1998) Excitatory aminoacid transporters of the salamander retina: identification, localization and function. *J. Neurosci.* 2: 698-712.
54. Lehninger, A. L (1993) Principios de Bioquímica. Cinética Enzimática. Edit. Omega. 2ª. Ed. P211.
55. Scriban, R (1985) Biotecnología. Cinética Enzimática Edit. Manual. Moderno. 2ª Edit. 589,596-599.
56. Stein, W. (1990) Channels, Carriers and Pumps: An Introduction to Membrane Transport. San Diego, CA. Academic Press.

57. Darnell, J., Lodish, H., and Baltimore, D. (1990) Molecular Cell Biology, 2nd ed. New York: Scientific American Books.
58. Skou, J. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *B. A. B.* 23: 394-401.
59. Lehninger, A. L (1993) Principios de Bioquímica. Sistema ATPasa transportador de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Edit. Omega. 2ª. Ed. P211.
60. Horisberger, J., Lemas, V., Kraehenbuhl, J. and Rossier, B. (1991) Structure-function relationship of Na, K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* 53: 565-584.
61. Mercer, R. (1993) Structure of the Na, K-ATPase. *Int. Rev. Cytol.* 137 C: 139-168.
62. Stahl, W. (1986) The Na, K-ATPase of nervous tissue. *Neurochem. Int.* 8: 449-476.
63. Watts, A., Sanchez-Watts, G., Emanuel, J. and Levenson, R. (1991) Cell-specific expression of mRNAs encoding  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase  $\beta$  and  $\alpha$ -subunit isoforms within the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7425-7429.
64. Kyte, J (1971) Purification of de sodium and potassium –dependent Adenosine triphosphatase from canine renal medulla. *J Biol Chem.* 246: 4147-4165.
65. Sweadner, K (1989) Isozymes of the  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  -ATPase. *Biochem. Biophys. Acta.* 185-220.

66. Vasallo, P. M, González, M. M, Rodríguez, D. Y, Gallego, E and García, P. J (1994) La bomba de sodio: una familia multigénica. *Nefro.4*:427-435.
67. Geering, K, Theula, Z. Y, Verrey, F, Hauptle, M. T and Rossier, B. C (1989) A role for the  $\beta$ -subunit in the expression of functional  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  ATPase in *Xenopus* oocytes. *Am.J.Physiol.*257:851-858.
68. Ackermann, U and Gerring, K (1990) Mutual dependence of  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  ATPase  $\alpha$  and  $\beta$ -subunits for correct post- transcriptional processing and intracellular transport *FEBS Lett.* 269:105-108.
69. Juaszova, M and Blaustein M. P. (1997)  $\text{Na}^+$  pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:1800-1805.
70. Mobasheri, A, Avila, J, Cozar, C. I, Brownleader, D. M, Tevan, M, Martin, J. O (2000)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase Isozyme Diversity; Comparative Biochemistry and Physiological Implications of Novel Functional Interactions. *Biosc.Report.*2:51-97.
71. Guzmán, D. C. B (2003) Cinética de la Bomba de sodio y potasio en células gliales de Bergmann: Efecto del TPA y Glutamato. Tesis para obtener el título profesional de Q.F.B. p 1-54.UMSNH.
72. Vuelas, B.Y (2003) Transportadores de Glutamato y actividad de la Bomba de sodio y potasio en tejido cerebral de ratas macho

adultas. Tesis para obtener el título profesional de Q.F.B. p 1-52.UMSNH.

73. Ruiz, M., Ortega, A., (1995) Characterization of a  $\text{Na}^+$ -dependent glutamate/aspartate transporter from cultured Bergmann glía. Neuro. Report, 6: 2041-2044.
74. Rose, S. (1967), Preparation of enriched fraction from cerebral cortex containing isolated, metabolically active neuronal and glial cells. Biochem. J. 102: 33-43.
75. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. And Randall, R. (1951), Protein measured with the follín phenol of reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
76. Mercado, C. R., and Hernández, R. J. (1992), Regulatory role of a neurotransmitter ( 5-HT) on Glial  $\text{Na}^+$  /  $\text{K}^+$  -ATPase in rat brain. Neurochem. Int. 21: 119-127.
77. Fiske, C., and Subbarow, Y. (1925), The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem. 66:375-400.
78. Sweadner, K. J (1989) Isozymes of the  $\text{Na}^+$  /  $\text{K}^+$  -ATPase. Biochimica. Biophysica. Act.988: 185-220.