

**ESTUDIO DEL TRANSPORTE Y METABOLISMO DE
HIPOXANTINA EN UN SISTEMA DE COCULTIVOS
DE ENDOTELIO VASCULAR Y ASTROCITOS
EN APOSICIÓN CERCANA**

Guillermo Ceballos+
Rafael Rubio**
Ricardo Yáñez*+
Germán Chamorro***+*

RESUMEN

En el cerebro los astrocitos y las células endoteliales se encuentran en aposición cercana, constituyen la pared de los capilares cerebrales y sirven como sitio de síntesis y degradación de hipoxantina. Ambas células poseen vías metabólicas para el ahorro y degradación de la nucleobase, lo que sugiere que las relaciones anatómicas entre ambas células pueden jugar un papel importante en la regulación de la homeostasis de purinas en el cerebro. Para probar esta hipótesis, cocultivos de monocapas de endotelio vascular y astrocitos se sembraron en aposición cercana sobre membranas porosas y se llevaron a cabo estudios del transporte de hipoxantina y su metabolismo a ácido úrico, para ello se utilizaron concentraciones altas de hipoxantina (0.3 mM).

Los resultados muestran que el flujo de hipoxantina a través de las capas celulares fue mayor que el de un marcador de difusión pasiva (sacarosa) lo que sugiere un proceso de transporte, ya que dicho flujo fue inhibido por adenina y al disminuir la temperatura a la que se llevaron a cabo los experimentos, además muestran que el transporte de hipoxantina se incrementó por el cocultivo celular, probablemente como resultado del proceso inducido por el contacto establecido entre los dos tipos celulares que además generan decremento en la actividad de la oxidasa de xantina.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Lesch-Nyhan es una enfermedad rara, recesiva y ligada al sexo, que se manifiesta de manera preferente en la niñez y se caracteriza por presentar hiperuricemia, coreoatetosis, re-

* Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México.

** Facultad de Medicina, UASLP, México.

*** Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México.

+ Becario DEDIT, COFAA.

tardo mental y automutilación, incluyendo primordialmente al labio inferior, pero también dedos, nariz y lengua. La enfermedad resulta de la deficiencia en la actividad enzimática de hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT, EC 2.4.2.8), esta enzima cataliza la conversión de hipoxantina y guanina a inosina monofosfato (IMP) y guanosina monofosfato (GMP), respectivamente, en la vía de ahorro (salvamento) de purinas para la producción de nucleótidos,¹ lo que se manifiesta como incremento en la concentración de hipoxantina y consecuente sobreproducción de ácido úrico e incremento en su eliminación urinaria.² El uso de alopurinol para inhibir la actividad de la enzima oxidasa de xantina (XO, EC 1.2.3.2) disminuye las concentraciones de ácido úrico y mejora la sintomatología renal, pero no afecta los aspectos neurológicos y conductuales que acompañan a la enfermedad, estos hechos señalan al incremento de la concentración de hipoxantina hasta niveles tóxicos y no al de ácido úrico como causa probable³ de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

A la fecha, a pesar de conocerse la causa de la enfermedad de Lesch-Nyhan, no se conocen a fondo los efectos tóxicos de la acumulación de hipoxantina en el cerebro, asimismo, no es claro cómo se regula la síntesis de hipoxantina y ácido úrico en ese órgano, ni cuál es el papel que efectúan en dicha síntesis las diferentes células que lo conforman.

En el cerebro la concentración total de purinas se mantiene relativamente constante^{4,5} a pesar de que existe una continua utilización y de que no existe la capacidad metabólica para la biosíntesis *de novo* de purinas.⁶ En él la biosíntesis de nucleótidos es muy activa por lo que la demanda de substratos es también alta y para mantener el aporte adecuado de substratos, la vía de recuperación o ahorro de hipoxantina debe jugar un papel importante, ya que esta base purínica es eficazmente incorporada a nucleótidos.

En este órgano la hipoxantina se obtiene como producto de la degradación de purinas y posiblemente por su incorporación desde la sangre;^{7,8,9} sin embargo, no ha sido aclarada completamente la forma en que se mantiene la homeostasis de purinas, ni cuál es la participación de las interacciones entre los diferentes tipos celulares que

constituyen el cerebro (incluyendo sus vasos sanguíneos). Se sabe que el metabolismo de purinas de las neuronas en cultivo es diferente al encontrado en glías, ya que se ha demostrado que las neuronas poseen una capacidad cinco veces mayor que las glías para recapturar adenosina e incorporarla a nucleótidos,¹⁰ mientras que las vías enzimáticas del metabolismo de adenosina están casi ausentes en neuronas y son altamente activas en glías^{10,11} y en células del endotelio vascular cerebral.^{11,12,13}

Por otro lado, es ampliamente aceptado que las células endoteliales de microvasos cerebrales forman las bases estructurales y funcionales de la barrera hematoencefálica (BHE), sin embargo, *in vivo* las células endoteliales a ese nivel no se encuentran aisladas y presentan estrecha relación con astrocitos, células gliales que rodean con sus prolongaciones podocíticas a los capilares cerebrales y se ha postulado que estas células gliales inducen las propiedades de la BHE.

Respecto del concepto de barrera-hematoencefálica, es necesario recordar que ésta presenta tres funciones principales: 1) protección del cerebro del medio ambiente sanguíneo, 2) transporte selectivo y 3) metabolismo o modificación de sustancias transportadas por sangre o presentes en el cerebro.¹⁴

Las propiedades de difusión limitada de la pared de los capilares cerebrales puede ser el resultado de inducción estructural, ejercida por los astrocitos,¹⁵ como ejemplo, ha sido reportado que aun cuando el endotelio microvascular cerebral en cultivos primarios puede formar uniones intercelulares estrechas, éstas se incrementan en longitud, amplitud y complejidad cuando el endotelio se cocultiva con astrocitos.¹⁶

Más interesante aún, las uniones estrechas entre las células, que se pierden después de periodos prolongados de cultivo o con múltiples resiembras, son reexpresados cuando el endotelio es cocultivado con astrocitos o en medio condicionado por la presencia de las astroglias, datos que sugieren la participación de las células gliales en la formación, extensión y configuración de las uniones estrechas entre las células endoteliales y por tanto la presencia de esas células puede inducir procesos de modulación de la permeabilidad de solutos.¹⁷

Por otro lado, las células del endotelio vascular

expresan un perfil enzimático similar al encontrado en las astroglias (tabla 1) y además, ambos tipos de células degradan hipoxantina a ácido úrico a través de la actividad de la enzima oxidasa de xantina, que ha sido localizada en los capilares cerebrales⁷ y que se encuentra altamente concentrada en el endotelio vascular cerebral.¹⁸

Lo expuesto anteriormente sugiere que el complejo anatómico astrocito-endotelio puede jugar un papel importante en la homeostasis de purinas en el cerebro en condiciones normales y tal vez en las condiciones descritas en el síndrome de Lesch-Nyhan, en donde existe incremento en la concentración de hipoxantina hasta alcanzar niveles tóxicos.

La existencia de una compleja y mutua influencia entre esas células, así como la similitud en las vías metabólicas de hipoxantina expresadas

por ambos tipos de células, ha permitido plantear dudas referentes al manejo por el cerebro de las concentraciones de hipoxantina y el mecanismo mediante el cual se mantienen bajas concentraciones de ácido úrico en cerebros normales. Con estas dudas en mente el presente trabajo pretende estudiar las diferencias en el manejo de concentraciones altas de hipoxantina en cocultivos de monocapas confluentes de endotelio vascular y astrocitos, cultivados en aposición cercana, comparado con cultivos individuales de cada tipo celular, para determinar el mecanismo probable por medio del cual el organismo regula las concentraciones de hipoxantina encontradas en condiciones normales y si la alteración en este sistema pudiera ser responsable de las concentraciones tóxicas de hipoxantina encontradas en el síndrome de Lesch-Nyhan.

TABLA 1. Actividades enzimáticas

Enzimas	Neuronas	Astrocitos	Endotelio
ADOasa	+	+++	+++
PNPasa	±	+++	+++
XOasa	—	+++	+++
HGPRTasa	+++	+++	+++

ADOasa=desaminasa de adenosina; PNPasa=fosforilasa de nucleosidos purínicos; XOasa=oxidasa de xantina; HGPRTasa=hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa.

MATERIAL Y MÉTODO

Cultivos celulares

La obtención de astrocitos de cobayo se llevó a cabo siguiendo el método descrito por McCarthy y De Vellis¹⁹ que en breve se describe. Después de obtener un cerebro de cobayo, éste es liberado de tejidos no cerebrales y cortado en cubos de aproximadamente 1 mm³, los que son incubados con tripsina (0.25%) y 20 µg de DNAasa en solución reguladora de fosfatos (0.1 M) (SRF) pH=7.4, durante una hora a 37°C. La suspensión de tejido se pasa a través de una red de nylon con poro de 70 µm, el filtrado se centrifuga 10 minutos a 3,000 rpm y tanto el sobrenadante como la capa de mielina se descartan, el sedimento se resuspende en dextran (70,000 Da) 15% en SRF y se centrifuga a 5,000 rpm durante

30 minutos. La capa celular cercana a la superficie se colecta, lava y resuspende en medio de cultivo Eagle's mínimo esencial (EMEM), suplementado con suero fetal bovino 10%, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. La suspensión resultante se siembra en frascos de cultivo y se coloca en un incubador a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂, después de tres horas se remueve el medio de cultivo, que contiene células que no se han fijado a la superficie del plato de cultivo, y se reemplaza con medio de cultivo fresco, las células adheridas (principalmente astrocitos y microglia) se dejan 72 horas en el incubador, posteriormente, las células se incuban con 5 mM de metilester de L-leucina durante dos horas para destruir selectivamente a las microglías, posteriormente el medio es cambiado cada 72 horas. Después de que alcanzan confluencia, las células son separadas del frasco

de cultivo empleando 0.05% tripsina-EDTA y sembradas nuevamente con una dilución de 1:20 y después de tres horas se repite el procedimiento para la destrucción de microglías. Con este procedimiento más del 90% de las células en el cultivo resultante reaccionan positivamente a inmunoquímica para la proteína glial ácida (GFAP).

Células endoteliales

Las células endoteliales se obtuvieron según el protocolo de Loeb,²⁰ que brevemente consiste en: se raspa con una hoja de bisturí la superficie íntima de una arteria, las células son recuperadas de la hoja de bisturí con EMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino que contiene penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) y son sembradas en platillos de cultivo. Se permitió el crecimiento de las células en el incubador bajo atmósfera de 5% de CO₂ hasta que aparecen pequeñas islas de células endoteliales, posteriormente se utilizan anillos para clonación y se separan algunas islas de endotelio con tratamiento con tripsina. Las células así aisladas se siembran nuevamente en frascos de cultivo, se mantienen en el incubador hasta que alcanzan confluencia con cambios de medio cada 72 horas.

Con este procedimiento más del 98% de las células expresan inmunorreactividad para anticuerpos contra el factor de von Willebrand.

Sistema experimental

Para obtener los cultivos individuales o los cocultivos, se empleó una membrana porosa de policarbonato (millicell-CM, 1 cm de diámetro y 0.4 µm de tamaño de poro), montada sobre un soporte rígido de plástico, la que se cubrió con colágeno tipo IV, sistema que se denominará inserto de aquí en adelante.

Para obtener los cocultivos se siguió el protocolo siguiente:

Cultivos confluentes de astroglias, fueron sometidos a tratamiento con tripsina (0.02%) para separar las células del plato de cultivo, y posteriormente fueron sembradas en los insertos a densidad de aproximadamente 3×10^5 células/inserto y mantenidas con EMEM hasta que

alcanzan confluencia (6-8 días). Posteriormente se coloca una red de nylon de 70 µm de tamaño de poro, previamente cubierta con colágeno, sobre las células y un día después, células endoteliales recién despegadas de los platos de cultivo fueron sembradas encima de las astroglias a densidad de 3×10^5 células/inserto. Debe mencionarse que la red de nylon tiene como objetivo servir como soporte además de permitir el contacto entre las células. A la densidad propuesta, las células endoteliales alcanzan confluencia en aproximadamente cuatro a cinco días.

Para preparar los cultivos individuales de células se siguió el mismo procedimiento evitando el uso del segundo tipo celular. Los insertos que contienen ya sea astrocitos, endotelio o los cocultivos (Fig. 1), fueron colocados en platos de cultivo de 24 pozos y se agregó 0.75 ml de solución de Krebs-Henseleit (K-H) al lado "abluminal" de las cámaras experimentales (área entre el inserto y la pared del platillo) y 0.5 ml de solución K-H conteniendo 0.3 M de hipoxantina en mezcla isotópica con [¹⁴C]-hipoxantina al lado "luminal" de las cámaras experimentales (interior de los insertos). Para evitar cambios en la presión hidrostática, el nivel de fluido en ambos compartimientos se mantuvo aproximadamente igual durante todo el experimento.

Todos los experimentos se realizaron en un baño con agitación continua, bajo atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂ y para disminuir las capas de líquido estáticas, se usó una agitación constante de 100 rpm.

Para cuantificar la aparición de hipoxantina en el lado abluminal de las cámaras experimentales, se tomaron alícuotas a intervalos de tiempo regulares, las cuales fueron utilizadas para la cuantificación, por HPLC de las concentraciones de hipoxantina y de ácido úrico presentes en ellas.

Método de HPLC

Se usaron concentraciones conocidas de ácido úrico y de hipoxantina como acarreadoras para la disección de la radioactividad relacionada con cada uno de ellos; se empleó una columna de ODS, C-18 (*ultrasphere* ODS) y un sistema isocrático de elusión. El sistema regulador fue fosfato de amonio 100 mM y 15% de metanol, con

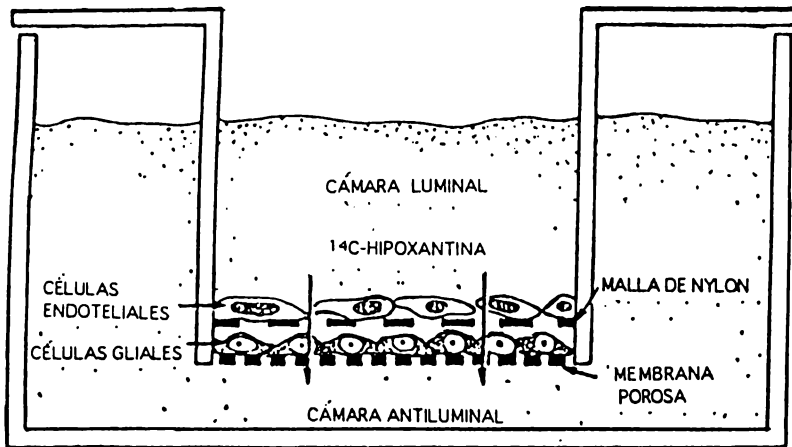


Fig. 1. Cámara experimental. Células endoteliales, astrogliales o una combinación de ambas fueron sembradas sobre una membrana porosa de policarbonato de 1 cm de diámetro y 0.4 μm de tamaño de poro.

un flujo de 1 ml/min y los efluentes de la columna fueron monitoreados a 254 nm. Los tiempos estimados de retención se determinaron con estándares de hipoxantina y ácido úrico; los efluentes fueron colectados y utilizados para la cuantificación de la radioactividad en cada pico por medio de centelleografía líquida.

Para demostrar la existencia de un sistema de transporte para hipoxantina, así como del posible incremento en éste, como resultado del cocultivo de astroglias y endotelio, fue necesario establecer que el transporte de [^{14}C]-hipoxantina ocurre a un ritmo mayor que el de una molécula como la sacarosa, la que es del mismo tamaño molecular aproximadamente pero difunde pasivamente. Considerando este objetivo, los experimentos se repitieron y se agregó, en el lado luminal de las cámaras experimentales, solución de K-H con mezclas isotópicas de hipoxantina [0.3 mM] con [^{14}C]-hipoxantina y sacarosa [0.3 mM] con [^3H]-sacarosa, teniendo cuidado de ajustar las concentraciones del material marcado de tal manera que las desintegraciones por minuto (dpm)/ μl provenientes del [^3H] fueran equivalentes a las obtenidas del [^{14}C].

Otro de los mecanismos empleados para demostrar la existencia de un acarreador o transportador, fue utilizar una sustancia que compitiera con la hipoxantina por el mismo transportador, tal como la adenina, y además disminuir la tem-

peratura a la que se llevarían a cabo los experimentos para determinar la dependencia en la temperatura. Con el objetivo anterior, se llevaron a cabo experimentos en ausencia y en presencia de 3 mM de adenina y disminuyendo a 20°C la temperatura del baño de incubación.

Para determinar la presencia e incremento en el transportador de hipoxantina, como consecuencia del cocultivo entre esos dos tipos celulares, fue importante la determinación de las concentraciones tanto de hipoxantina como de ácido úrico en el lado abluminal de las cámaras experimentales, ya que ambas células poseen la capacidad metabólica para la degradación de hipoxantina a ácido úrico y un incremento en la radioactividad pudiera ser el resultado de mayor degradación de la hipoxantina y no necesariamente de incremento en su transporte.

Caracterización de células

Las células endoteliales fueron identificadas al examinar su morfología celular (adoquín) con microscopía de contraste de fases y caracterizadas por la expresión de antígeno de factor VIII de la cascada de coagulación (von Willebrand) utilizando anticuerpos desarrollados en conejo y por la captura de lipoproteínas de baja densidad acetiladas fluorescentes.

Los astrocitos fueron identificados como cé-

lulas que expresan la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) utilizando anticuerpos policlonales desarrollados en conejo.

El procedimiento llevado a cabo consistió en:

Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos, lavadas y tratadas con H₂O₂ 15% en metanol por 15 minutos, lavadas e incubadas 30 minutos con solución bloqueante (5% de suero de cabra), posteriormente se incubaron durante 48 horas a 4°C con anticuerpos contra GFAP(1:100) en el caso de los astrocitos y anticuerpos contra el factor de von Willebrand (1:1,000) las células endoteliales. Después de lavadas, las células fueron incubadas con inmunoglobulina de cabra anticonejo (1:100) durante cuatro horas a temperatura ambiente y después se trataron con complejo peroxidasa-antiperoxidasa (1:50). Los cultivos fueron teñidos con tetraclorhidrato de 3',3' diaminobenzidina y H₂O₂ para determinar actividad de peroxidasa. Los cultivos fueron observados con microscopía de luz.

Microscopía electrónica del crecimiento celular en el interior de la cámara experimental

Para la caracterización de las cámaras experimentales se utilizó microscopía electrónica de barrido, para ello los insertos fueron lavados dos veces durante cinco minutos cada vez con solución reguladora de fosfatos (0.1 M, pH=7.4) a temperatura ambiente. Después de lavarlos se colocan durante dos horas en solución fijadora que contiene 2% paraformaldehído + 2.5% glutaraldehído + 3% sacarosa disueltos en solución reguladora de fosfatos 0.1 M, pH=7.4. Posterior al periodo de fijación, los insertos con células fueron lavados en solución reguladora de cacodilatos en dos ocasiones y durante cinco minutos cada vez. Las células posteriormente fueron fijadas con tetraóxido de osmio al 1% en solución reguladora de fosfatos (0.1 M) durante una hora y lavadas con solución reguladora de fosfatos, para después deshidratarlas en forma gradual en alcohol etílico (30%-15 minutos; 50%-15 minutos; 70%-15 minutos; 95%-15 minutos y 100%-3 × 15 minutos).

Después del proceso de deshidratación, se sometieron al proceso de secado al punto crítico y fueron orientadas y colocadas en soportes es-

peciales para microscopía de barrido. Se fijaron y cubrieron con una capa de grafito coloidal y a continuación se colocó una capa de tinte de plata en los alrededores de la muestra asegurándose de que existiera buen contacto entre la superficie del espécimen y del soporte.

Estimación del número de células

Se obtuvo un estimado del número de células cuantificando la concentración de DNA por el método de Labarca y Paigen³⁵ usando un valor de 2.3 pg de DNA/célula (Rees y Jones³⁶).

Brevemente, el método consiste en que las células fueron homogeneizadas en solución reguladora de fosfatos (PBS) 0.05 M PO₄, 2 M NaCl, pH=7.4, sonicadas e incubadas con el reactivo *Hoechst* 33258 (2-[2-(4-hidroxifenil)-6-benzilimidazolil]-6-(1 Imetil-4-piperazil)-benzimidazol, 30 minutos en la obscuridad y analizadas en un espectrofluorómetro *Aminco* a 356 nm de excitación y 475 nm de emisión.

Análisis estadístico

Para el estudio de las relaciones entre los datos obtenidos, se utilizó el análisis de covarianza y prueba *F* para encontrar diferencias en pendiente y elevación de las líneas de regresión, así como pruebas *t* para determinar diferencias entre medias. Las diferencias fueron consideradas como significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Microscopía electrónica

La figura 2 es la fotografía de una muestra de células endoteliales analizadas por microscopía electrónica de barrido, puede apreciarse la morfología de las células que crecen como plastas o adobes representando la morfología en adoquín clásicamente reportada. Se observa que las uniones celulares están ligeramente separadas, como consecuencia de las diferencias en el punto crítico de secado entre las células y la membrana sobre las que son sembradas.

En la figura 3 se muestra el crecimiento y morfología de las células astrocitarias al ser sembradas en los insertos experimentales. Se aprecian

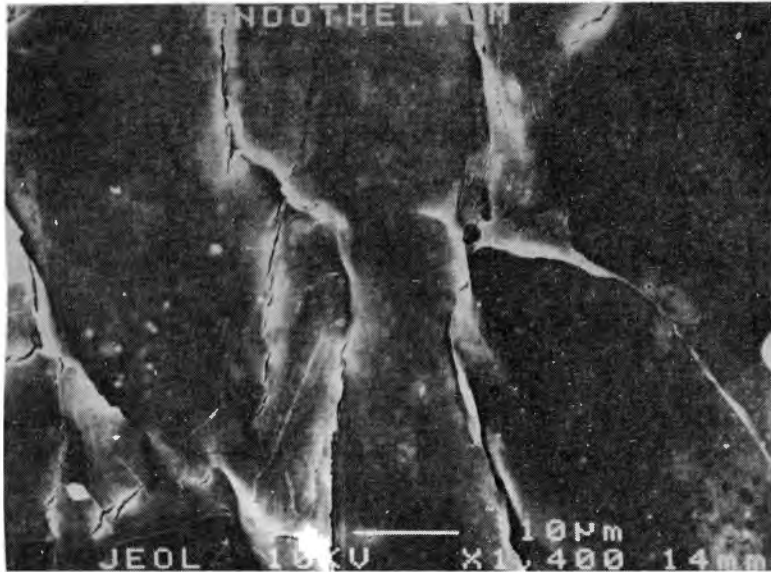


Fig. 2. Fotomicrografía de monocapas de endotelio creciendo sobre una membrana porosa, obtenida con un microscopio electrónico de barrido ($\times 1,400$), puede observarse la clásica morfología en adobe o adoquín, así como las uniones intercelulares. Las células en estos cultivos expresan el factor de von Willebrand.



Fig. 3. Fotomicrografía de células astrogliales creciendo sobre una membrana porosa de policarbonato, obtenida con un microscopio electrónico de barrido ($\times 750$), pueden observarse las múltiples capas celulares características del crecimiento de estas células. Las células de este tipo de cultivos expresan positividad para anticuerpos en contra de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

las características arbóreas de los astrocitos así como las múltiples capas celulares en las que se acomodan este tipo de células.

En la figura 4 se muestra la membrana de policarbonato en la que fueron sembradas células endoteliales por un lado de ella y astrocitos en el lado opuesto.

Análisis de la permeabilidad a hipoxantina

La permeabilidad a la [¹⁴C]-hipoxantina en el sistema experimental empleado se calculó empleando la siguiente fórmula:²¹

$$P = d [A_2] / dt \times V_2 / [A_1] \times S$$

donde [A₁] representa la concentración de [¹⁴C]-hipoxantina en el lado luminal de la cámara, S es la superficie de la membrana porosa, [A₂] es la concentración del trazador en el lado abluminal de la cámara y V₂ es el volumen en el compartimiento abluminal. La ecuación fue utilizada para calcular la permeabilidad de los insertos en ausencia de células y en presencia de éstas y desde esas determinaciones se calculó la permeabilidad de los distintos tipos de cultivo por medio de la siguiente fórmula:

$$1/P \text{ células} = 1/P \text{ filtro+células} - 1/P \text{ filtro}$$

La permeabilidad de los filtros solos en los experimentos fue $6.39 \pm 0.07 \times 10^{-4}$ cm/s. La permeabilidad en los diferentes tipos de cultivos fue significativamente mayor en los cocultivos celulares (Fig. 5) que en los cultivos individuales.

Comparación entre el influjo de ¹⁴C y ³H-Sacarosa

Con el objetivo de determinar la razón del incremento en el coeficiente de transferencia en los cocultivos celulares, se llevó a cabo una serie de experimentos en los que se comparó el influjo de ¹⁴C con el de [³H]-Sacarosa (³H), substancia con peso molecular ligeramente mayor que el de hipoxantina y que se utiliza comúnmente como marcador de difusión pasiva.

Debe mencionarse que en todos los experimentos en los que se comparó el influjo de ¹⁴C con el de ³H, la concentración de cada radioisótopo fue ajustada de tal manera que se obtuviera aproximadamente la misma cantidad de dpm/ml.

Los resultados obtenidos (Fig. 6) al graficar el cociente obtenido de dividir el influjo de ¹⁴C entre el influjo de ³H, muestran que en los in-

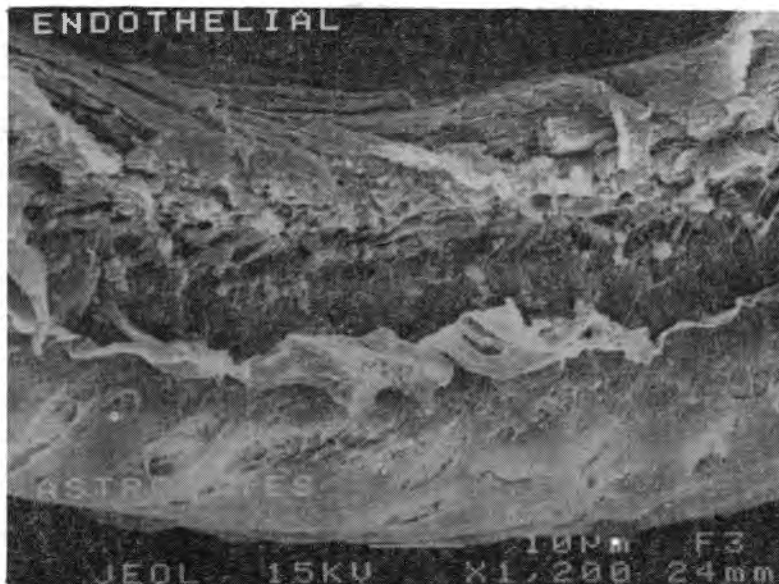


Fig. 4. Fotomicrografía de una membrana porosa de policarbonato en la que se han sembrado astrocitos a un lado de la membrana y endotelio vascular en el lado opuesto, obtenida con microscopía electrónica de barrido ($\times 1,200$).

sertos en los que se han omitido las células el cociente $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ es prácticamente igual a uno, lo cual señala que ambas moléculas difunden libremente y prácticamente con la misma razón temporal, bajo estas condiciones las desviaciones encontradas en ese cociente pueden explicarse por las diferencias en la velocidad de difusión entre la hipoxantina ($\text{PM}=136.1$) y la sacarosa ($\text{PM}=324.2$) ya que para moléculas de ese tamaño el coeficiente de difusión es aproximadamente igual al inverso de la raíz cuadrada del peso molecular.

El análisis del cociente $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ en los insertos que contienen a las astroglias y células endoteliales en cocultivo da origen a una curva en la que el influjo de ^{14}C es hasta cuatro veces mayor que el de ^3H en los primeros minutos del ensayo, mientras que en los minutos posteriores dichos influjos tienden a equilibrarse y son indistinguibles de los obtenidos en ausencia de células.

Efecto de adenina sobre el influjo de ^{14}C

La incubación de los cocultivos celulares con adenina da como resultado una disminución en las diferencias en el influjo de ^{14}C y ^3H , determinadas en su ausencia ya que bajo estas condiciones no existe diferencia en la velocidad de influjo entre ambas moléculas.

La comparación de los cocientes $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ (Fig. 6) obtenidos en ausencia y presencia de adenina muestran que el proceso inducido por el cocultivo de astroglias y endotelio, que provoca incremento en el influjo de ^{14}C sin alterar el de ^3H y que en el grupo control es aproximadamente igual a cuatro en los minutos iniciales del ensayo, pudo inhibirse significativamente con adenina, molécula estructuralmente semejante a la hipoxantina. Bajo estas condiciones la relación del influjo de $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ alcanza valores máximos cercanos a dos en los primeros segundos del análisis y posteriormente disminuyen a valores

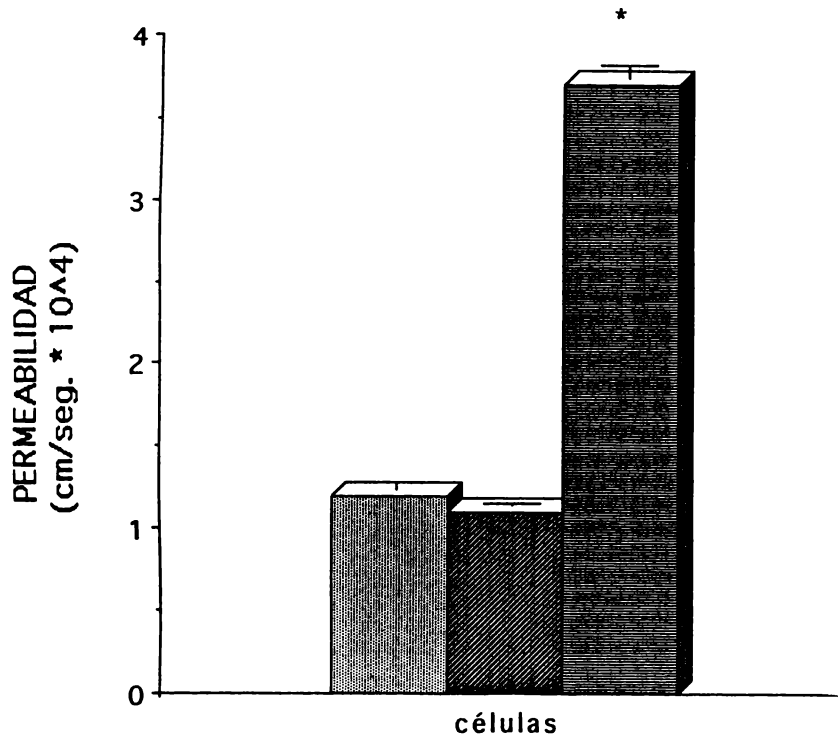


Fig. 5. Permeabilidad a sustancias marcadas con carbono-14, después de agregar [^{14}C]-hipoxantina en el lado abluminal de las cámaras experimentales conteniendo (▨) astrocitos, (▩) endotelio, (▧) cocultivos de astrocitos y endotelio. Los datos son expresados como medias \pm e.s., * $p < 0.05$, cocultivos vs. astrocitos o endotelio.

cercanos a la relación encontrada en los experimentos en que se utilizaron insertos sin células o en los tiempos mayores (480-600) de los experimentos con células en cocultivo.

Efecto de disminución de la temperatura sobre el influjo de ^{14}C

El análisis del influjo de ^{14}C en condiciones experimentales en las que la temperatura se redujo a 20°C , mostró disminución en el influjo de la radioactividad relacionada con ^{14}C a través de las cámaras experimentales conteniendo cocultivos celulares, de tal manera que el análisis de dicho influjo a 20°C muestra comportamiento similar al influjo de ^3H , siendo significativamente diferente del influjo de ^{14}C a 37°C .

El cociente $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ a 20°C (Fig. 6) se aproxima a la unidad, es decir, el proceso que provoca que el influjo de ^{14}C se incremente en los cocultivos en condiciones estándar (37°C) se inhibe significativamente al disminuir la temperatura (20°C) en que se llevan a cabo las evaluaciones del influjo.

Determinación de la actividad de ^{14}C relacionada con hipoxantina y ácido úrico

Ya que tanto astroglias como endotelio poseen la maquinaria enzimática necesaria para degradar la hipoxantina a ácido úrico, se considera probable que el incremento en el transporte de moléculas marcadas con ^{14}C , consecuencia del cocultivo de esas células, puede ser originado por

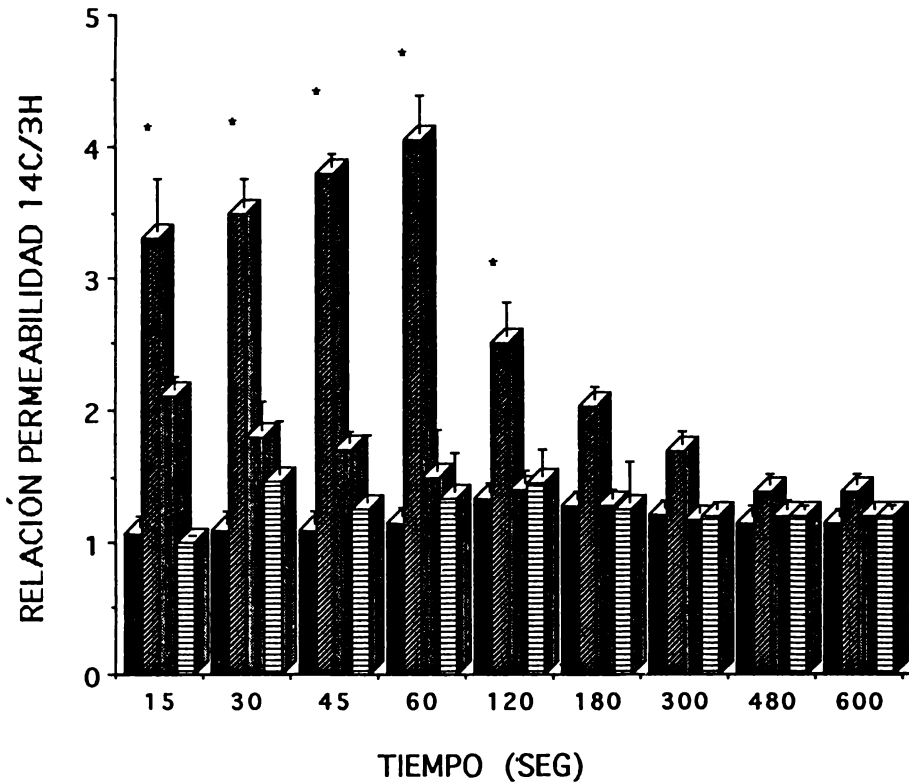


Fig. 6. Relación temporal de la permeabilidad a sustancias marcadas con carbono-14 / permeabilidad a un marcador de difusión pasiva (^3H -sacarosa). (■) membranas en ausencia de células, (▨) cocultivos astrocitos-endotelio vascular, (▩) cocultivos en presencia de adenina (3mM) y (≡) cocultivos a 20°C . Los datos son expresados como medias \pm e.s., * $p < 0.05$, cocultivos vs. membranas o + adenina o a 20°C .

incremento en el transporte de hipoxantina y/o por incremento en su degradación a ácido úrico con la posterior extrusión de esta molécula al lado abluminal de las cámaras experimentales.

Para resolver esas preguntas, se realizaron una serie de experimentos en los que se empleó un método de HPLC, separando la radioactividad asociada con [^{14}C]-hipoxantina de la relacionada con [^{14}C]-ácido úrico.

Los resultados muestran, como puede apreciarse en la Fig. 7, que la radioactividad (dpm) asociada con [^{14}C]-hipoxantina, transportada por los cultivos individuales de astroglias, es prácticamente la misma que la transportada por las células endoteliales, mientras que en las cámaras experimentales que contenían las células en cocultivo la concentración de [^{14}C]-hipoxantina fue significativamente mayor ($p < 0.01$), es decir, el cocultivo de astroglias y endotelio vas-

cular induce incremento en el transporte de hipoxantina.

Por otro lado, el análisis de la radioactividad asociada con [^{14}C]-ácido úrico muestra (Fig. 8) que la cantidad de ácido úrico liberado al lado abluminal de las cámaras experimentales, después de agregar [^{14}C]-hipoxantina en el lado luminal en los cultivos de endotelio, fue mayor que la liberada por los cultivos de astroglias y, al contrario de lo esperado, la cantidad de ácido úrico liberado por las células en cocultivos, que según lo considerado en este trabajo debería ser aproximadamente igual a la suma de las concentraciones de ácido úrico sintetizado en los cultivos individuales de astroglias y células endoteliales, fue menor aún que en los cultivos individuales de endotelio. Estos resultados señalan disminución en la liberación y probablemente en la síntesis de ácido úrico como consecuencia del cocultivo celular.

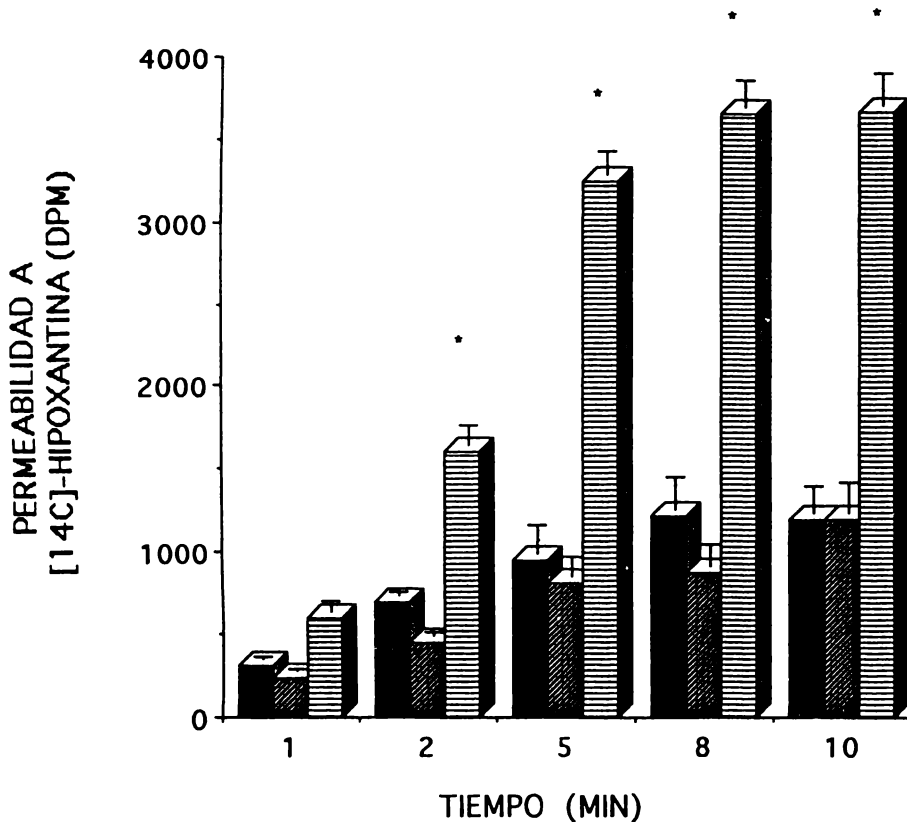


Fig. 7. Análisis de la permeabilidad a [^{14}C]-hipoxantina con respecto al tiempo en cultivos de (■) endotelio; (▨) astrocitos y (≡) cocultivos astrocitos-endotelio vascular. Los datos son expresados como medias \pm e.s., * $p < 0.01$, cocultivos vs. astrocitos o endotelio.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo permiten señalar que existe un sistema de transporte para hipoxantina tanto en células de endotelio vascular como en astrocitos, componentes ambos de la BHE, que en las condiciones de cultivo celular es inhibido tanto por adenina como por una disminución en la temperatura a la que se llevan a cabo los experimentos. De particular importancia es el hecho de que el transporte de hipoxantina se incrementa cuando los astrocitos y las células endoteliales son cocultivados y que, además, dicho sistema de asociación celular se relaciona de alguna manera con un decremento en la síntesis de ácido úrico, muy probablemente a través de la depresión de la actividad de la enzima oxidasa de xantina, hechos probablemente relacionados con los procesos que regulan la toxicidad de esas purinas.

El sistema experimental empleado en este trabajo fue adecuado para los propósitos establecidos, y la integridad de las células en él fue demostrada por microscopía de luz así como por microscopía electrónica de barrido. Las células endoteliales crecen en monocapa, mientras que los astrocitos se extienden en varias direcciones. Este proceso obligó a efectuar los experimentos en tiempos muy similares, posteriores al sembrado y resembrado de células a fin de evitar grandes variaciones en el número de células presentes en los insertos y ajustando los resultados a un número similar de millones de células.

En la figura 4 puede apreciarse una fotomicrografía en la que se muestra una membrana de policarbonato, en cuyos lados crecen células endoteliales y astrocíticas. En este sistema las células no se tocan entre sí y sirvió para efectuar experimentos preliminares en la evaluación del transporte de hipoxantina, este sistema puede ser

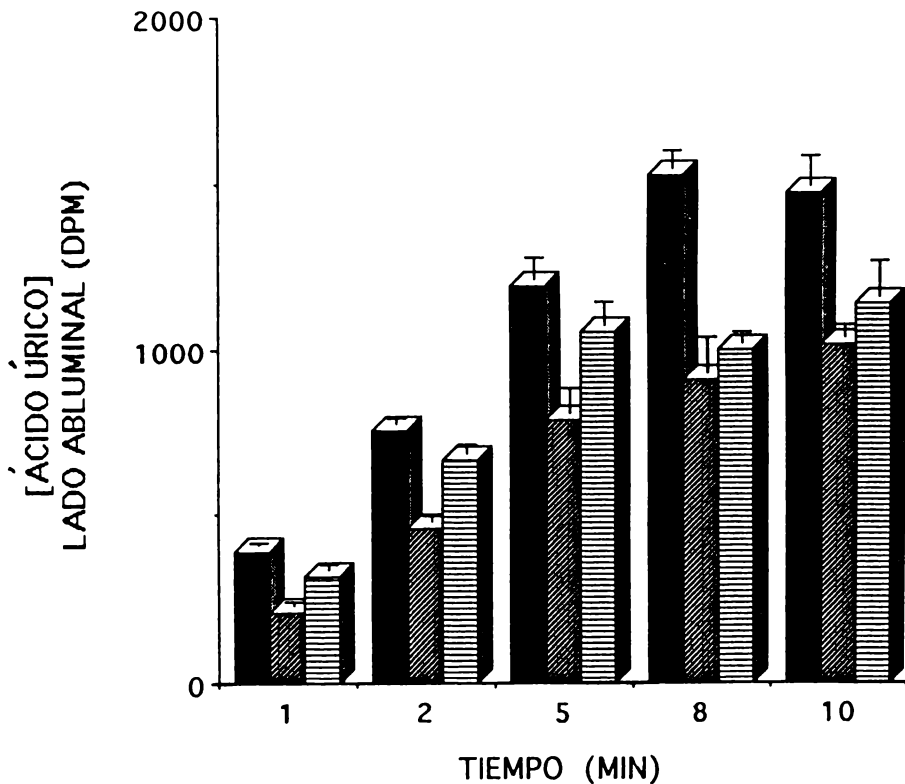


Fig. 8. Análisis del incremento en la concentración de ácido úrico en el lado abluminal de las cámaras experimentales conteniendo (■) endotelio; (▨) astrocitos y (▤) cocultivos astrocitos-endotelio vascular. Los datos son expresados como medias \pm e.s.

empleado para la determinación de los efectos de sustancias solubles presentes en el medio en que son mantenidos los cocultivos y que pueden afectar al sistema en una u otra dirección.

Los resultados van de acuerdo con la propuesta que les confiere a los astrocitos influencia directa en la homeostasis cerebral de varias sustancias, sobre los perfiles enzimáticos, en los sistemas de protección en contra de la toxicidad de sustancias y sobre los procesos de transporte característicos del endotelio cerebral en la barrera hematoencefálica. Así se sabe que los astrocitos inducen la reexpresión de la enzima δ glutamil transpeptidasa,^{22,23} incrementan la actividad de fosfatasa alcalina,²⁴ incrementan el número y complejidad de uniones estrechas entre las células^{17,16} e incrementan el transporte polarizado de aminoácidos neutros.¹⁷ Sin embargo, la influencia de los astrocitos no se limita al endotelio cerebral y puede ser ejercida sobre endotelio vascular de otro origen, y como prueba de esto se ha demostrado²⁵ que fragmentos embrionarios cerebrales avasculares de codorniz, al ser transplantados a la cavidad celómica de embriones de pollo, en donde son vascularizados por vasos abdominales, inducen en esta vasculatura extrañas características histoquímicas y funcionales semejantes a las encontradas en la barrera hematoencefálica se ha demostrado además, que al inyectar suspensiones de astrocitos²⁶ en la cámara anterior del ojo de ratas, inducen propiedades de BHE (en este caso expresada como permeabilidad a colorantes) en los vasos formados en los agregados astrocitarios. La influencia ejercida por estas células ha sido demostrada también *in vitro* en cultivos de endotelio de vena de cordón umbilical humano²⁷ y de aorta de bovino,²⁸ en donde la astrogliia induce la expresión de uniones estrechas semejantes a las encontradas en el endotelio cerebral así como actividad de fosfatasa alcalina, considerada ésta como representativa de funciones especializadas en la BHE.

Por otro lado, el incremento del transporte de hipoxantina observado en los cocultivos endotelio-astrocitos en estos experimentos, es un proceso que puede ser utilizado por el sistema celular para disminuir la toxicidad de la nucleobase, ya que se lleva a cabo tanto en dirección astrocitos-endotelio como endotelio-astrocitos (datos

no mostrados) y pudiera servir para desplazar la hipoxantina acumulada hacia el torrente circulatorio. Los resultados no pueden ser explicados por incremento en la difusión pasiva de la nucleobase, que podría darse si se hubieren creado un mayor número de porosidades entre las células, o si los existentes hubieran adquirido un mayor tamaño, como resultados de los procesos involucrados en el cocultivo celular, ya que si éste hubiera sido el caso, el paso del marcador de difusión pasiva utilizado (³H-sacarosa) presentaría las mismas características que el paso de la ¹⁴C-hipoxantina. Los resultados muestran que ése no fue el caso y la relación paso de hipoxantina marcada/paso de sacarosa marcada es alto, representando cuando menos un proceso facilitado y probablemente transporte activo para la nucleobase y no así para el carbohidrato.

Es evidente que las diferencias en permeabilidad de los cultivos a [¹⁴C]-hipoxantina tampoco puede ser explicada por diferencias en la densidad celular presente en los cocultivos, ya que el número de células en ellos fue aproximadamente igual a la suma de las células contenidas en los cultivos de endotelio más las contenidas en los cultivos de astrogliias, y de haber existido diferencia ésta hubiera sido a la alta (un mayor número de células en los cocultivos en relación con los cultivos individuales) reflejándose en una barrera más grande, dada la mayor densidad celular, para la difusión pasiva, por lo que de ser este último el mecanismo involucrado en el paso de la hipoxantina a través de esas células, lo que se hubiera encontrado sería una disminución en el flujo de hipoxantina.

Los resultados concuerdan con los reportes señalando la existencia de transporte de hipoxantina en capilares cerebrales aislados⁷ y con los que muestran *in vivo* que hipoxantina puede ser transportada desde sangre hasta el cerebro.^{9,28}

La inhibición del paso de hipoxantina a través de las capas celulares, por adenina o al disminuir la temperatura a la que se llevan a cabo los experimentos, sugiere la existencia de un sistema de transporte de hipoxantina que puede ser compartido por adenina y que es sensible a cambios de temperatura.

Es necesario recordar que el medio ambiente que rodea a las células endoteliales puede ser de gran importancia en la expresión o regulación

de la expresión de las características de la barrera hematoencefálica y, tomando en cuenta este concepto, el incremento en el transporte de hipoxantina encontrado en los cocultivos celulares, que puede ser resultado de incremento en el transporte de la nucleobase por las células endoteliales o por los astrocitos o por ambos, puede ser el resultado del efecto de factores solubles liberados por los astrocitos que afectan al endotelio,²⁷ o liberados por el endotelio y que afectan a los astrocitos³⁷ y permiten el desarrollo de un nuevo sistema, o bien ser el resultado de las interacciones implementadas entre las células ya que, en sistemas como el que se empleó, una capa celular puede ser usada como soporte o sustrato para el crecimiento y diferenciación de las células sembradas encima de ellas,^{29,30} necesitando el contacto intercelular (en este trabajo la malla de nylon colocada entre las células se utilizó sólo para mejorar el soporte, y el poro de la malla es lo suficientemente amplio (70 μm) para permitir que las células se toquen; debe hacerse notar que la malla *per se* no indujo cambios en los procesos estudiados).

En relación con el último punto, es necesario recordar que el desarrollo y funcionamiento normal de todos los tipos celulares en un organismo dependen de su interacción con moléculas en su microambiente. Dentro de las moléculas que regulan la actividad y desarrollo celular se encuentran factores de diferenciación y crecimiento, moléculas de adhesión y componentes de la matriz extracelular (MEC), siendo esta última la que menos interés despertó por muchos años ya que se proponía que sus funciones estaban limitadas a efectos sobre la adhesión y organización del citoesqueleto, sin embargo en la actualidad se han descrito otras funciones de la matriz extracelular que incluyen modulación de las acciones de los factores de crecimiento y diferenciación. En el mismo sentido se han descrito otras funciones tales como la de regular la estabilidad y difusión de factores como TG- β (factor de crecimiento tumoral- β) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y es a través de esa regulación que la MEC puede influenciar el comportamiento celular regulando la concentración y actividad de factores de crecimiento. Se ha demostrado también que la MEC puede activar directamente vías metabólicas intracelulares

que desencadenan la liberación de segundos mensajeros, por ejemplo se ha demostrado que la activación de la tirosina cinasa p¹²⁵FAK, asociado con la dispersión celular dependiente de integrinas, depende a su vez de la presencia de matriz extracelular,³¹ y es a través de este mecanismo que se ha podido explicar el porqué muchas neuronas requieren de una MEC apropiada para responder a estímulos externos tales como el factor de crecimiento neural.³²

Los constituyentes mayores de la MEC incluyen; colágenos, lamininas, fibronectina, trombospodinas, tenascina, restrictina, agrina y proteoglicanos,³² y es altamente probable que alguno o algunos estén involucrados también en el incremento del transporte de hipoxantina encontrado en los sistemas de cocultivo empleados en este trabajo, en donde la inducción de moléculas transportadoras juega un papel importante.

Los resultados muestran disminución en la síntesis ácido úrico comparada con lo esperado, y que era una sumatoria de las síntesis encontradas en los cultivos individuales, esto muestra una posible regulación a la baja de la actividad de la oxidasa de xantina, que bien puede tratarse de otro de los efectos inducidos por las interrelaciones establecidas entre las células y la matriz extracelular.

Lo anterior permite explicar el porqué las células en nuestro sistema, en especial las endoteliales, no sufren daño ante una concentración de hipoxantina tan elevada como la que se empleó, que puede compararse con las concentraciones tóxicas encontradas en el síndrome de Lesch-Nyhan. En este sentido se ha demostrado, en cultivos de endotelio vascular, que sólo la aplicación conjunta de hipoxantina y oxidasa de xantina induce alteraciones en la permeabilidad, ya que dicha asociación es fuente de alta producción de radicales libres que pueden dañar a las células reflejándose en incrementos en la permeabilidad de moléculas como la albúmina. En este aspecto, es por demás interesante que la aplicación por separado de hipoxantina o de la oxidasa de xantina no induce los mismos daños,³³ señalando que la enzima presente en estas células se encuentra bajo un sistema de regulación que impide, a final de cuentas, el daño celular en condiciones normales, y la toxicidad de la hipoxantina *in vivo* sólo se observa en condiciones en

las que no es removida por la enzima HGPR T que la reincorpora a nucleótidos. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, ya que a pesar de que la concentración de hipoxantina administrada es alta, la actividad de XO se encuentra disminuida, por lo que la toxicidad de la nucleobase se ve reducida al incrementarse su transporte y los pocos radicales libres producidos en estas condiciones pueden ser atrapados rápidamente, inclusive por el mismo ácido úrico producido.

En conclusión, empleando un sistema *in vivo* que semeja algunas de las características encontradas a nivel de la barrera hematoencefálica *in vivo*, permiten explicar la forma en que puede ser mantenida la homeostasis de purinas en el cerebro en condiciones normales, en donde existe transporte de hipoxantina que se incrementa por las relaciones establecidas entre las células endoteliales formadoras de la barrera y los astrocitos, ya sea a través de factores solubles o de los contactos establecidos a través de la matriz extracelular, por lo que la toxicidad de la nucleobase se reduce. Sin embargo, es necesario mucho más trabajo para dilucidar los mecanismos involucrados alrededor de esta vía metabólica en procesos patológicos tales como la enfermedad de Lesch-Nyhan en donde la deficiencia genética de la enzima HGPR Tasa induce incrementos en la concentración de hipoxantina que no pueden ser reducidos por terapia con alopurinol, que sólo disminuye las concentraciones de ácido úrico. Los incrementos en la concentración de hipoxantina se han asociado con disminución en las concentraciones de dopamina en pacientes con esa enfermedad, y dicho agotamiento puede ser la causa de los movimientos alterados en estos pacientes y quizá de los comportamientos automutilatorios,³⁴ sin embargo, esto es sólo una nueva hipótesis que necesita aún ser comprobada.

SUMMARY

In brain, astrocytes and endothelial cells are found in close apposition, they constitute the wall of the brain's capillaries and serve as a site of hypoxanthine production and degradation. Both cell types possess the hypoxanthine salvage and degradative pathways, this suggests that the

endothelial-astrocyte anatomical complex might play an important role in the brain's purine homeostasis. To test this hypothesis, cocultures of monolayers of vascular endothelial cells and astrocytes were grown over a porous membrane, in close apposition to one another and there were performed studies on hypoxanthine transport and metabolism to uric acid using high hypoxanthine concentrations (0.3 mM).

Our results shown that the hypoxanthine's flux across the cellular layers was greater than a passive diffusion marker (sucrose), suggesting a transport process because it was inhibited by adenine and lowering the experimental temperature and also show that the hypoxanthine transport was increased by the cellular coculture, probably as a result of processes induced by the complex interactions established between the two cell types that in turn induced a depression of xanthine oxidase activity.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alford, R.; Redman, J.; O'Brien, E. y Caskey, C. 1995. "Lesch-Nyhan syndrome: carrier and prenatal diagnosis". *Prenatal Diagnosis*, **15**:329-338.
2. Lesch, M. y Nyhan, W. 1964. "A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function". *Am. J. Med.*, **36**: 561-570.
3. Evans, J. y Gregory, M. 1993. "Lesch-Nyhan syndrome and the lower lip guard". *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **76**:437-440.
4. MacDonnell, P.; Huff, K.; Grouse, L. y Guroff, G. 1980. "Brain nucleic acid". In: *Biochemistry of Brain*, Kumar, S. ed., pp. 211-240, Pergamon Press, New York.
5. Mandell, P. y Wintzerith, M. 1980. "Free nucleotides and nucleic acids during brain development". In: *Biochemistry of brain*, Kumar, S. ed., pp 241-282, Pergamon Press, New York.
6. Howard, W.J.; Kerson, L.A. y Appel, S.H. 1970. "Synthesis de novo of purines in slices of rat brain and liver". *J. Neurochem.*, **17**:121-128.
7. Betz, A.L. 1985. "Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain

- capillaries". *J. Neurochem.*, **44**:574-579.
8. Conford, E.A. y Oldendorf, W.H. 1975. "Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors". *Biochim. Biophys. Acta*, **394**:211-219.
 9. Spector, R. 1987. "Hypoxanthine transport through the blood-brain barrier". *Neurochem. Res.*, **12**(9):791-796.
 10. Meghji, P.; Tuttle, J. y Rubio, R. 1989. "Adenosine formation and release by embryonic chick neurons and glia in cell culture". *J. Neurochem.*, **53**:1852-1860.
 11. Ceballos, G.; Tuttle, J. y Rubio, R. 1994. "Differential of purine metabolizing enzymes between glia and neurons". *J. Neurochem.*, **62**:1144-1153.
 12. Rubio, R.; Wiedmeier, T. y Berne, R.M. 1972. "Nucleoside phosphorylase; Localization and role in the myocardial distribution of purines". *Am J. Physiol.*, **222**:550-555.
 13. Van Reempts, J.; Van Deuren, B.; Haseldonckx M.; Van den Ven, M.; Thoné, F. y Borgers, M. 1988. "Purine nucleoside phosphorylase: a histochemical marker for glial cells". *Brain Res.*, **462**:142-147.
 14. Risau, W. y Wolburg, H. 1990. "Development of the blood-brain barrier". *TINS*, **13**:174-178.
 15. Brightman, M.W. y Tao-cheng, J-H. 1988. "Cell membrane interactions between astrocytes and brain endothelium". In: *The biochemical pathology of astrocytes, Neurology and Neurobiology*, 39 pp. 21-39, Alan R. Liss Inc. NY.
 16. Tao-Cheng, J-H.; Nagy, Z. y Brightman, M.W. 1987. "Tight junctions of brain endothelium *in vitro* are enhanced by astroglia". *J. Neuroscience* **7**(10):3293-3299.
 17. Arthur, F.E.; Shrivvers, R.R. y Bowman, P.D. 1987. "Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient *in vitro* model". *Dev. Brain Res.*, **36**:155-159.
 18. Terada, L.S.; Willingham, I.R.; Rosandich, M.E.; Leff, J.A.; Kindt, G.W. y Repine, J.E. 1991. "Generation of superoxide anion by brain endothelial cell xanthine oxidase". *J. Cell Physiol.*, **148**:191-196.
 19. McCarthy, K.D. y DeVellis, J. 1980. "Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue". *J. Cell Biol.*, **85**:890-902.
 20. Loeb, A.L.; Owens, G.K. y Peach, M.J. 1985. "Evidence for endothelium-derived relaxing factor in cultured cells". *Hypertension*, **7**:804-807.
 21. Watanabe, H.; Kuhne, W.; Spahr, R.; Schwartz, P. y Piper, M. 1991. "Macromolecule permeability of coronary and aortic endothelial monolayers under energy depletion". *Am. J. Physiol.*, **260**:H1344-H1352.
 22. DeBault, L.F. y Cancilla, P.A. 1980. "δ glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells *in vitro*". *Science*, **207**:653-655.
 23. Maxwell, K.; Berliner, J.A. y Cancilla, P.A. 1987. "Induction of δ-glutamyl transpeptidase in cultured cerebral endothelial cells by a product released by astrocytes". *Brain Res.*, **410**:309-314.
 24. Beck, D.W.; Vinters, H.V.; Hart, M.N. y Cancilla, P.A. 1984. "Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **43**:219-224.
 25. Stewart, P.A. y Wiley, M. 1981. "Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: A study using quailchick transplantation chimeras". *Dev. Biol.*, **84**:183-192.
 26. Janzer, R.C. y Raff, M. 1987. "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells". *Nature*, **235**:253-257.
 27. Tio, S.; Deenen, M. y Marani, E. 1990. "Astrocyte-mediated induction of alkaline phosphatase activity in human umbilical cord vein endothelium: an *in vitro* model. *Eur. J. Morphol.*, **28** (2-4):289-300.
 28. Spector, R. 1988. "Hypoxanthine transport and metabolism in the central nervous system". *J. Neurochem.*, **50**:969-978.
 29. Bissel, M.J.; Hall, H.G. y Parry G. 1982. "How does extracellular matrix direct gene expression?" *J. Theor. Biol.*, **99**:31-68.
 30. Shivers, R.R.; Arthur, F.E. y Bowman, P.D. 1988. "Induction of gap junctions and brain endothelium-like tight junctions in cultured bovine endothelial cells: Local control of cell specialization". *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **20**(1), 1-14.
 31. Zachary, I. y Rozengurt, E. 1992. "Focal adhesion kinase (p125^{FAK}): A point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes". *Cell*, **71**:891-894.
 32. Venstrom, K. y Reichardt, L. 1993. "Extrace-

- llular matrix 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system". *Faseb J.*, **7**:996-1003.
33. Berman R. y Martin, W. 1993. "Arterial endothelial barrier dysfunction: actions of homocysteine and the hypoxanthine-xanthine oxidase free radical generating system". *Br. J. Pharmacol.*; **108**:920-926.
 34. Criswell H.; Mueller R. y Breese, G. 1988. "Assessment of purine-dopamine interactions in 6-hydroxydopamine-lesioned rats". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**:493-498.
 35. Labarca, P. y Paigen, D. 1987. "Determination of DNA content of cells by Hoechst 33258". In: *Culture of animal cell: a manual of basic technique*, pp. 233-234, Ian Freshney ed. Wiley Liss.
 36. Rees, H. y Jones, R.N. 1972. "The origin of the wide species variation in nuclear DNA content". *Int. Rev. Cytol.*, **32**:53-92.
 37. Estrada, C.; Bready, J.; Berliner, J.; Pardridge, W. y Cancilla, P.A. 1990. "Astrocyte growth stimulation by a soluble factor produced by cerebral endothelial cells *in vitro*". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **49** (6):539-549.