

136
205.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

NEUROTOXICIDAD DEL ROJO DE RUTENIO EN CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

JAIME IVAN VELASCO VELAZQUEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ABREVIATURAS.

AM	Acetoximetil éster.
BAPTA	Ácido bis-(o-aminofenoxi)-etano-N,N,N',N'-tetracético.
Ca ²⁺	Calcio.
Cols.	Colaboradores.
EGTA	Acido etilenglicol-bis(β-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetracético.
GABA	Ácido γ-aminobutírico.
GAD	Glutamato descarboxilasa.
H	Hora(s).
LDH	Deshidrogenasa láctica.
MC	Medio Eagle con 10% de suero fetal bovino.
ML	Medio Locke.
MOPS	Acido 3-(N-morfolin) propansulfónico.
MTT	Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio.
N	Número de experimentos iguales.
NC	Neuronas corticales.
NG	Neuronas granulares de cerebello.
P	Probabilidad.
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos.
PKC	Proteína cinasa C.
PLP	Fosfato de piridoxal.
RR	Rojo de Rutenio.
SNC	Sistema nervioso central.
SR	Retículo sarcoplásmico.
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.

INDICE.

I. INTRODUCCION.

A. NEURODEGENERACION.	1
B. ROJO DE RUTENIO.	3
C. COMPUESTOS CAPACES DE PREVENIR LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR AUMENTO EN LA CONCENTRACION DE CALCIO CITOPLASMATICO.	
1. DANTROLENO.	8
2. BAPTA.	9
3. GANGLIOSIDOS.	10

II. OBJETIVOS. 16

III. METODOS.

A. OBTENCION DE LAS REBANADAS DE HIPOCAMPO.	17
B. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS.	18
C. PREPARACION DE SOLUCIONES CONCENTRADAS.	
1. ROJO DE RUTENIO.	20
2. DANTROLENO.	20
3. BAPTA.	21
4. GANGLIOSIDOS.	21
D. METODOS UTILIZADOS PARA EVALUAR EL DAÑO CELULAR.	
1. ACTIVIDAD DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA EN HOMOGENEIZADOS DE LAS REBANADAS DE HIPOCAMPO.	21
2. LIBERACION DE DESHIDROGENASA LACTICA.	23
3. REDUCCION DEL MTT.	24
E. NIVELES DE CALCIO INTRACELULAR EN NEURONAS CORTICALES.	25
F. HISTOLOGIA.	26
G. ANALISIS ESTADISTICO.	28

IV. RESULTADOS.

A. GAD Y LDH EN REBANADAS.	29
B. LIBERACION DE LDH EN CULTIVOS PRIMARIOS.	29
C. REDUCCION DE MTT EN CULTIVOS PRIMARIOS.	30
D. NIVELES DE CALCIO CITOPLASMATICO EN NEURONAS CORTICALES.	32
E. HISTOLOGIA DE CULTIVOS PRIMARIOS.	32

V. DISCUSION.

A. REBANADAS DE HIPOCAMPO.	59
B. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS.	59
C. ANTAGONISMO DE LA NEUROTOXICIDAD POR ROJO DE RUTENIO.	61
D. POSIBLE MECANISMO DE LA NEUROTOXICIDAD DEL ROJO DE RUTENIO.	63
E. CONCLUSIONES.	65

BIBLIOGRAFIA.	66
---------------	----

I. INTRODUCCION.

A. NEURODEGENERACION.

La neurodegeneración, es decir, la muerte de neuronas es un fenómeno que ocurre normalmente en el desarrollo y en situaciones patológicas. En el caso del crecimiento, se observa una pérdida de neuronas durante el correcto establecimiento de conexiones; en la mayoría de los casos, la supervivencia neural se asocia con la recepción de factores tróficos provenientes de las células blanco, por lo que muchas células mueren al no recibir dicha señal. Los objetivos de la muerte neuronal durante el desarrollo podrían incluir: la remoción de células con funciones transitorias, la eliminación de neuronas con el mismo funcionamiento, el establecimiento de patrones morfogenéticos, la regulación del número de células en una región en particular, la eliminación de neuronas potencialmente dañinas, etc.

Por otra parte, con el objeto de diferenciar a la muerte celular observada en situaciones naturales de la que es resultado de un proceso patológico, se han propuesto los términos apoptosis y necrosis. La principal diferencia radica en los cambios citológicos que acompañan a una u otra situación: mientras que la apoptosis se asocia con muerte normal, programada o natural, y al parecer requiere de la expresión de algunos genes, la necrosis, en apariencia, no necesita

de síntesis proteica para ocurrir. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que ambos mecanismos tienen en común la activación por calcio (Oppenheim y cols., 1992).

Como se mencionó anteriormente, existen muchos ejemplos de la muerte neuronal que lleva a una situación patológica, entre otros, la Corea de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson, la poliomielitis, la pérdida de funciones específicas de una región del sistema nervioso central (SNC) luego de golpes o infartos, etc.

Una de las teorías más aceptada para explicar la muerte neuronal, sobre todo en modelos de hipoxia, isquemia y traumatismos, es la excitotóxica. Ésta se llamó así, porque se han involucrado a los ácidos glutámico y aspártico (que en condiciones fisiológicas poseen propiedades excitatorias sobre las neuronas) en la degeneración. Dicha teoría ha sido comprobada con mayor éxito en sistemas *in vitro*, donde al agregar glutamato por períodos cortos de tiempo a neuronas en cultivo, estas células degeneraron, presentando principalmente dos fases: la primera se caracteriza por un hinchamiento neuronal, que es ocasionado por una entrada de sodio, cloruro y agua; la segunda incluye la entrada de calcio, lo que posteriormente lleva a la liberación del mismo catión desde fuentes intracelulares, teniendo como resultado una elevación en los niveles de calcio en el citoplasma. Entre los cambios que pueden darse al aumentar la concentración de calcio dentro de la célula, y que podrían cooperar para el deterioro y/o muerte neuronal, deben

mencionarse los siguientes:

Activación de la proteasa calpaina I, que es capaz de degradar proteínas estructurales de las neuronas, tales como tubulina, espectrina y proteínas asociadas a microtúbulos.

La activación de fosfolipasas que al actuar sobre la membrana celular liberan ácido araquidónico. La oxidación del araquidónico produce radicales libres de oxígeno, los cuáles son capaces de producir degradación peroxidativa de la membrana.

La producción de radicales superóxido por la xantina oxidasa, generada por acción de una proteasa activada por calcio.

Aumento en la entrada de calcio a través de canales en la membrana, debida a la activación de la proteína cinasa C (Choi, 1988).

B. ROJO DE RUTENIO.

El rojo de rutenio (RR) es un colorante inorgánico sintético que se ha utilizado en microscopía óptica y electrónica para teñir las membranas citoplásmica y mitocondrial (Luft, 1971).

Este compuesto inhibe la captura y transporte de calcio (Ca^{2+}) mitocondrial (Moore, 1971; Vasington y cols., 1972; Luthra y Olson, 1977), bloquea la unión de Ca^{2+} al sarcolema aislado de músculo esquelético en un 80-90 % a una concentración de 10 μM (Madeira y Antunes-Madeira, 1974) y, puesto que esta

inhibición no depende de la concentración de RR en el medio, se propuso que su sitio de acción era distinto al de la unión con calcio.

En otro sistema aislado, el retículo sarcoplásmico (SR) proveniente del músculo esquelético del conejo, el RR pudo bloquear la entrada de calcio ocasionada por cafeína a una concentración de 100 nM (Palade, 1987).

El RR ocasiona un decremento en la actividad enzimática de la proteína responsable del transporte activo de calcio, la ATPasa de calcio, tanto en mitocondrias hepáticas (Vasington y cols., 1972) como en el sarcolema (Madeira y Antunes-Madeira, 1974).

Charuk y cols. (1990) encontraron que el colorante no sólo era capaz de inhibir la unión del calcio a la calsecuestrina, sino que se unía a la calmodulina y a la troponina C, pero no a las proteínas membranales del riñón o a proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular. La afinidad del RR por la calsecuestrina fue alta ($K_d = 0.7 \mu\text{M}$, $B_{max} = 218 \text{ nmol/mg proteína}$), por lo que el RR se ha usado para una identificación rápida de las proteínas que unen calcio.

El oxiclورو de rutenio amoniacal o RR inhibe de modo no competitivo la unión del calcio a los sinaptosomas aislados de la corteza cerebral de la rata (Kamino y cols., 1976); aunque estos autores no encontraron un sitio de unión específico para el RR, sugirieron que el colorante se une a las glicoproteínas de la membrana sinaptosomal, que conforman el sitio de unión del calcio. En terminales nerviosas del ratón, el RR impide la entrada del calcio estimulada por

despolarización, sin afectar el influjo basal de ese catión; además de que el colorante se une a los sinaptosomas con una constante de disociación de $3.7 \mu\text{M}$ y una unión máxima de 10 nmol/mg de proteína (Tapia y cols., 1985).

Acorde con estos datos, el RR impide la liberación estimulada de neurotransmisores, en la unión neuromuscular por inhibición del flujo de calcio (Rahaminoff y Alnaes, 1973), y ejerce un efecto inhibitorio sobre la liberación de acetilcolina en la placa neuromuscular (Person y Kuhn, 1979).

Por otro lado, utilizando un sistema de rebanadas provenientes del hipocampo de la rata, Wieraszko, en 1985, demostró que el RR, a una concentración de 0.71 mM , impedía la transmisión sináptica; este efecto podía ser revertido mediante lavados, siempre y cuando el tiempo de exposición no fuera muy prolongado, puesto que si se dejaba al tejido en contacto con el colorante durante 3 horas, la eliminación del RR del medio no podía restablecer potenciales evocados, a menos que el transporte de calcio se facilitara con $72 \mu\text{M}$ de 3,4-diaminopiridina. El tratamiento de estas rebanadas con neuraminidasa, para eliminar los residuos de ácido siálico, ocasionó que el efecto del RR tardara casi el doble de tiempo en aparecer, mientras que la adición de gangliósidos o ácido siálico a las rebanadas normales, antagonizó la inhibición producida por el RR, al igual que lo hizo la presencia de calcio 13.2 mM . De este trabajo puede concluirse que el RR se une a los residuos de ácido siálico e impide la neurotransmisión, bloqueando el transporte de calcio hacia dentro de las células.

Por otra parte, experimentos realizados en cultivos de neuronas provenientes de los ganglios simpáticos del sapo han demostrado que el RR es capaz de aumentar la elevación de los niveles citoplasmáticos de calcio al agregar cafeína, así como impedir la normalización de dichos niveles, siempre y cuando el colorante se aplique intracelularmente a una concentración de 30 μM (Marrison y Adams, 1992). Acorde con estos resultados, Thayer y Miller, en 1990, demostraron que el RR (10 μM) aplicado intracelularmente era capaz de remover el componente amortiguador más importante de calcio, cuando una gran cantidad de este catión era agregado a neuronas del ganglio de la raíz dorsal de rata en cultivo.

Además de las evidencias obtenidas en sistemas aislados acerca del efecto inhibitor del RR sobre la salida de los neurotransmisores, otros experimentos *in vivo* apuntan hacia un mecanismo de acción similar en sistemas más complejos. Administrado intracranealmente en ratones y gatos, el RR produce convulsiones generalizadas, e intraperitonealmente, parálisis flácida (Tapia y cols., 1976); al parecer, ambos efectos fueron generados por una alteración en alguno de los mecanismos dependientes de calcio, puesto que la inyección de CaCl_2 evitó las convulsiones y la parálisis. En experimentos posteriores, que consistieron en inyectar a ratones paralizados por RR sustancias que facilitan la liberación de transmisores en la placa neuromuscular, como la 4-aminopiridina o la guanidina, se observó que los animales podían moverse, por lo tanto el efecto del colorante,

a nivel sistémico, podía ser debido a una inhibición en la liberación de acetilcolina de la placa neuromuscular (Tapia, 1982). Con respecto al efecto convulsivo del RR cuando se inyecta intracerebralmente, se comprobó que los sinaptosomas aislados de ratones en dicho estado, liberaron menos ácido γ -aminobutírico (GABA), que es un neurotransmisor inhibitorio, lo que sugiere que la actividad epiléptica podría deberse a una menor liberación de este transmisor en el cerebro (Meza-Ruiz y Tapia, 1978).

Inyectado en la rata, el RR tiene distintos efectos dependiendo de la vía de administración: sistémicamente produce parálisis flácida y, posteriormente, convulsiones tónico-clónicas; administrado en la sustancia nigra, ocasiona una conducta de giro contralateral al lado lesionado, en donde las neuronas se observaron incluidas por RR, principalmente en los somas (Tapia y Flores-Hernández, 1990). En el área CA₁ del hipocampo produce un tipo de epilepsia, llamada sacudidas de perro mojado, además de vacuolización y muerte neuronal, las cuales pudieron observarse por microscopía óptica y electrónica (García-Ugalde y Tapia, 1991).

Por otro lado, la inyección de RR en concentraciones entre 5 y 40 μ M en el ojo de conejo produce una respuesta inflamatoria, miosis (constricción de la pupila) y ruptura de la barrera sanguínea, lo que lleva a un aumento en la presión intraocular por presencia de proteínas. Estos efectos dosis-dependientes son antagonizados por la administración de ω -conotoxina (2 μ M), pero no por

nifedipina 17 μM , lo que indica una dependencia del influjo de calcio a través de los canales tipo N (Andersson y Le Greves, 1991).

En otros sistemas vivos, como el caso de las amibas, el RR ocasiona la muerte de éstas en tiempos muy cortos (2-30 minutos) a concentraciones de 0.6 a 1.2 mM. Los cambios que acompañaron a la exposición al colorante son: retracción de pseudópodos, mayor fragilidad al contacto y después de 15-20 minutos, pudo observarse movimiento browniano en el citoplasma; finalmente las células se desintegraron en menos de 1 hora. El colorante no pudo ser despegado de la superficie mediante lavados; es importante mencionar que aunque la membrana de las amibas no sufrió cambios notables, el colorante fue capaz de penetrarla, puesto que se halló RR en la parte interna de la membrana e incluso dentro de las células, aunque la presencia de estos gránulos fue atribuido a pinocitosis (Szubinska y Luft, 1971).

C. COMPUESTOS CAPACES DE PREVENIR LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR AUMENTO EN LA CONCENTRACION DE CALCIO CITOPASMATICO.

1. DANTROLENO.

El dantroleno es un compuesto lipofílico, cuyo nombre sistemático es: 1-[[5 (p-nitrofenil) furfurlideno] amino] hidantoina (figura 1); cruza fácilmente la membrana plasmática y la barrera hemato-encefálica. En la clínica, esta hidantoina ha sido utilizada para tratar la hipertemia maligna, padecimiento hereditario que

se segrega de manera autosómica dominante y se caracteriza porque los pacientes muestran taquicardia, alteración de la presión sanguínea, arritmias, hiperventilación, acidosis metabólica y rigidez muscular; las alteraciones en esta enfermedad parecen ser debidas a aumentos repentinos de calcio en el citoplasma del músculo (Ward y cols., 1986).

En general se acepta que el dantroleno impide la liberación de calcio en el músculo esquelético pero no en el cardiaco, aunque no afecta la cantidad total de calcio acumulado por el músculo estriado; al parecer, su sitio de acción es en el retículo sarcoplásmico y no puede bloquear totalmente la liberación de calcio desde el SR (Van Winkle, 1976). En estudios *in vitro*, realizados con neuronas provenientes de varias regiones, se ha probado que el dantroleno es efectivo contra la elevación de calcio intracelular proveniente de fuentes internas y por lo tanto, capaz de prevenir la muerte ocasionada por el aumento de este catión (Frandsen y Schousboe, 1992, 1993; Lei y cols., 1992) por lo menos parcialmente.

2. BAPTA.

Este ácido, el bis-(*o*-aminofenoxi)-etano-*N,N,N',N'*-tetracético (figura 1), con actividad quelante de Ca^{2+} , ha probado tener efectos protectores contra deterioros celulares producidos por una elevación en el calcio citoplasmático. Una estimulación prolongada de rebanadas de hipocampo lleva a una salida del calcio de fuentes intracelulares o bien, a una entrada del mismo catión a través de

canales sensibles al voltaje. El BAPTA previno los signos de deterioro en este sistema (Scharfman y Schwartzkroin, 1989).

Usando células de hepatoma murino 1c1c7 expuestas a KCN y iodoacetato, Nicotera y cols. (1989) observaron que la anoxia ocasionaba un aumento en los niveles de calcio intracelular. Dicha elevación, al igual que la muerte, pudo prevenirse al adicionar 50 μM de BAPTA-AM (el acetoximetil éster del ácido, que es la forma permeable para las células vivas). En esta misma línea celular, Dypbukt y cols. (1990) observaron la protección contra la elevación en el calcio interno, y por lo tanto de la muerte celular producida por quinona con 30 μM de BAPTA-AM.

3. GANGLIOSIDOS.

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que se encuentran principalmente en las células de los vertebrados. En el SNC, constituyen aproximadamente el 10% de los lípidos totales de la membrana y el 66% del ácido siálico conjugado (Ledeen, 1983). Estos constituyentes se hallan concentrados en la parte externa de la membrana, de la cuál constituyen del 10 al 20% de los lípidos totales. Cuatro de los cinco gangliósidos más abundantes en el cerebro de los mamíferos pertenecen a la familia ganglio, que se caracteriza por la presencia de N-acetilgalactosamina (figura 2). La ceramida es el punto por el que los gangliósidos se unen a la membrana. (Ledeen, 1985). Las abreviaturas se refieren al número de

ácidos siálicos que contienen; así, los gangliósidos con un ácido siálico se abrevian GM, con dos, GD, con tres, GT y con cuatro GQ; el número que sigue a la abreviatura se obtiene al restar del 5 los residuos de carbohidratos contenidos en la molécula, y la letra al final se refiere a los distintos arreglos que puede presentar cada uno de ellos (Svennerholm, 1963).

En sistemas *in vitro*, los gangliósidos han demostrado tener diferentes efectos, por ejemplo:

Los gangliósidos inhiben el influjo de calcio y aumentan la liberación del mismo ion en neuronas de pollo, en concentraciones de 10 nM a 10 μ M (Guérolod y cols., 1992). En este caso no se observaron diferencias entre las concentraciones o los tipos de gangliósidos utilizados (GM1 o GD1a).

La preincubación por 2 horas de neuronas granulares del cerebelo de la rata (NG) con 100 μ M de GM1 pudo contrarrestar el aumento en el calcio intracelular inducido por el ácido glutámico, medido después de 2 y 13 minutos (Milani y cols., 1991). Por otro lado, De Erausquin y cols. (1990) reportaron en el mismo modelo que el GM1 era capaz de revertir el aumento en los niveles de calcio citoplasmático a tiempos grandes, pero no en períodos cortos luego de la exposición a una dosis tóxica de glutamato. En este caso, los gangliósidos aumentaron el tiempo en el que las neuronas permitieron la entrada de un colorante polar, el yoduro de propidio, sugiriendo un mejor estado de la membrana citoplasmática.

Una mezcla de gangliósidos compuesta por GM1, GD1a, GD1b y GT1b, o bien, cada uno en forma independiente, fueron capaces de proteger a las células neuro-2a de la muerte inducida por un ionóforo de calcio, el A23187 (Nakamura y cols., 1992). La protección fue dependiente de la presencia de gangliósidos en el período posterior a la exposición al ionóforo, y la preincubación no proporcionó ninguna protección.

Usando como modelo las NG, Vaccarino y cols. (1987) pudieron demostrar que los gangliósidos GM1 y GT1b eran capaces de prevenir la traslocación desde el citoplasma a la membrana de la proteína cinasa C (PKC), así como la activación de esta proteína inducidas por el glutamato, sin afectar el flujo de calcio y sugiriendo que la traslocación de la PKC podría impedirse porque los gangliósidos no permiten la unión de esta cinasa a la fosfatidilserina de la membrana. Acorde con los datos anteriores, Kreutter y cols. (1987) encontraron que los gangliósidos eran capaces de inhibir la actividad de la PKC *in vitro*, de manera dependiente de la dosis. La potencia de las distintas especies probadas fue: GT1b > GD1a = GD1b > GM3 = GM1.

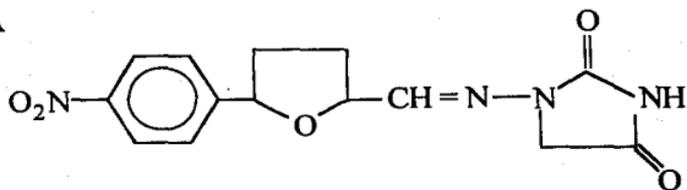
En un reporte de Faravon y cols. (1988) se encontró que una preincubación de 2 horas con gangliósidos era capaz de proteger contra la muerte celular inducida por glutamato o kainato en neuronas corticales (NC) o en NG. El orden de potencia al usar diferentes concentraciones que iban de 10 a 200 μM fue el siguiente: GT1b > GD1b > GM1, mientras que el asialo-gangliósido no tuvo

efecto. La determinación de GT1b incorporado a la membrana mostró una perfecta correlación entre esta cantidad y la supervivencia. En las NG, 60 μM GT1b no causó cambios en la amplitud o la frecuencia de apertura de los canales iónicos activados por el ácido glutámico. La traslocación de PKC resultante del tratamiento con los ácidos glutámico y kaínico fue abolida por los gangliósidos usados con el mismo orden de potencia mencionado.

Cuando las NG fueron sometidas a un período de tiempo (4h) sin glucosa, mostraron degeneración luego de 24 horas. Los efectos tóxicos fueron antagonizado por el GM1 al ser adicionado en la incubación sin glucosa, en igual proporción, a concentraciones de 30 y 100 μM (Facci y cols., 1990).

Manev y cols. (1990) reportaron que tanto el gangliósido natural GM1, como los derivados semisintéticos de éste, GM1 con N-acetil esfingosina (LIGA 4) y GM1 con N-dicloroacetil esfingosina (LIGA 20) fueron capaces de prevenir la toxicidad del glutámico en las NG. Los compuestos semisintéticos demostraron mayor potencia que el GM1, sus efectos fueron más rápidos, y más duraderos. Como ninguno de los gangliósidos interfirió con los canales iónicos abiertos por el glutamato, la protección fue atribuida a la inserción de estos lípidos en la membrana, lo que ocasionaría una inhibición de los segundos mensajeros activados por el ácido glutámico, como por ejemplo, el impedimento en la translocación de la PKC desde el citosol a la membrana.

A



B

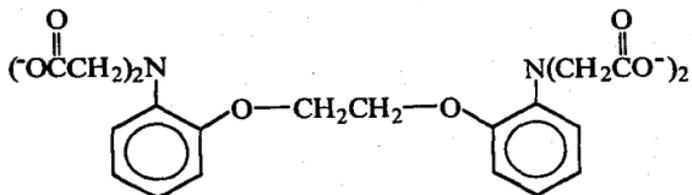


Figura 1. Estructura química de los compuestos dantroleno(A) y BAPTA (B).

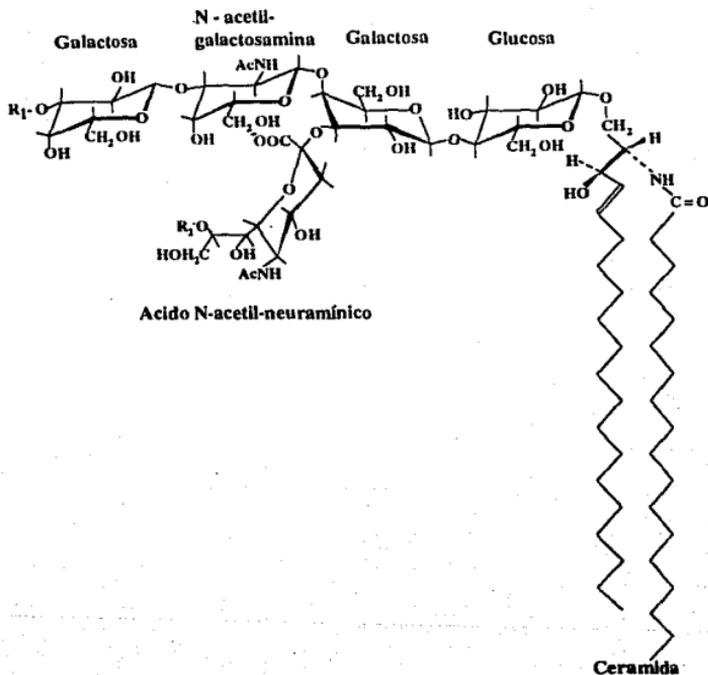


Figura 2. Gangliósidos más abundantes en el cerebro de mamíferos. Tomado de Ledeen, 1985. GM1: R₁=R₂=H; GD1a: R₁=ácido neuramínico, R₂=H; GD1b: R₁=H, R₂=ácido neuramínico; GT1b: R₁=R₂=ácido neuramínico; GQ1b: R₁=neuramíl(2-8) ácido neuramínico, R₂=ácido neuramínico.

II. OBJETIVOS.

En esta tesis se pretende caracterizar algunos de los efectos del Rojo de Rutenio observados *in vivo*, en sistemas *in vitro* (rebanadas de tejido nervioso y cultivos celulares primarios). Dichos modelos tienen la ventaja de permitir un mayor control de la concentración de RR, y, en el caso de los cultivos, pueden tenerse de manera aislada neuronas o células gliales para evaluar de manera específica los efectos del colorante.

Buscando tener un sistema eficiente para cuantificar el daño celular producido por el RR, se probarán la liberación de deshidrogenasa láctica (LDH) y la actividad de la descarboxilasa glutámica (GAD) en rebanadas de hipocampo, así como salida de LDH y reducción del colorante MTT en cultivos celulares.

Tomando en cuenta que el RR penetra a los somas neuronales *in vivo* (Flores-Hernández y Tapia, 1990; García-Ugalde y Tapia, 1991), y se ha demostrado que dentro de las neuronas impide la normalización de los niveles de calcio, se probarán drogas que disminuyan la concentración intracelular de este catión, o bien, que disminuyan las alteraciones inducidas por calcio citoplasmático elevado, con el objeto de buscar protección contra la muerte neuronal. También se tratará de corroborar la idea de que el RR eleva los niveles de calcio citoplasmático, y que este último evento se relaciona con la muerte celular, como se ha reportado en muchos modelos mencionados en la introducción.

III. METODOS.

A. OBTENCION DE LAS REBANADAS DE HIPOCAMPO.

Se utilizaron ratas machos Wistar de 200 a 250 gramos, de las cuáles se obtuvieron rebanadas del hipocampo de la siguiente manera: las ratas fueron decapitadas, el cerebro extraído de la manera más rápida posible y posteriormente fue mantenido en una caja petri sobre hielo y bañado con medio Krebs-Ringer, que había sido previamente gaseado durante 10 minutos con una mezcla de oxígeno (95%) y bióxido de carbono (5%). Las rebanadas fueron obtenidas de dos formas diferentes: 1) El hipocampo fue disecado y cortado en un rebanador Mc Ilwain marca Brinkmann, calibrado para dar rebanadas de 400 μm de grosor.

2) Las rebanadas se obtuvieron luego de fijar el cerebro con pegamento a una base y cortarlo con un vibroslice (modelo 752M, Campden Instruments Ltd) para tener rebanadas de 200 μm . Los dos tipos de incubaciones que se hicieron difieren en el tiempo, concentración y estado de las rebanadas: 1) 4 rebanadas fueron puestas en recipientes con 1 ml de medio de Krebs gaseado, que contenía o no RR en una concentración 20 μM ; luego de media hora de incubación a 37°C con agitación y sin gaseo continuo, las rebanadas se homogeneizaron en 200 μl de Krebs, con ayuda de mazos de teflón y un motor de taladro. Con los homogeneizados se realizaron las determinaciones de la deshidrogenasa láctica (LDH) y

descarboxilasa glutámica (GAD); en los medios en que fueron incubadas las rebanadas se determinó sólo la actividad de LDH liberada. En el segundo grupo de experimentos, tres rebanadas de hipocampo de 200 μm fueron incubadas en medio Krebs durante media hora con gaseo continuo. Después, se incubaron, con gaseo, durante 1 hora en 1 ml de medio en ausencia o presencia de 100 μM de RR. Al término de la incubación a 37°C, las rebanadas se homogeneizaron durante 15 segundos en un volumen de 200 μl con ayuda de un sonicador Sonífer 250 (Branson). La actividad de LDH fue determinada en el medio después de la incubación y en los homogeneizados para obtener el porcentaje de liberación al medio referido a la actividad total.

B. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS.

En el presente estudio se utilizaron 3 tipos de células: neuronas granulares del cerebelo (NG), neuronas corticales (NC) y astrocitos del cerebelo. El procedimiento de extracción, descrito con mayor detalle por Morán y Patel (1989) es básicamente el mismo, pero el origen es distinto: mientras que las NC se obtienen a partir de ratas fetales de 17 días de gestación (Dichter, 1978), las NG y los astrocitos (Patel y Hunt, 1985) provienen de ratas de 8 días de edad (Morán y Patel, 1989).

Las cajas petri desechables (Nunc) usadas para los cultivos fueron tratadas con poli-L-lisina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 24 horas antes, excepto en los astrocitos, con el objeto

de permitir la adherencia de las neuronas.

Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 1.2 a 1.5 millones/ml, y fueron adicionadas de citosina arabinosa 10 μ M aproximadamente 20 horas después de sembradas para evitar la proliferación de células gliales. En el caso de los astrocitos, estos se sembraron a una densidad de 0.6 a 0.8 millones/ml, no se les agregó citosina arabinosa, y se utilizaron después que habían transcurrido 14 días o más, siempre que se les haya cambiado el medio cada semana. Las células fueron sembradas en un medio basal Eagle (Sigma Chemical Company) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Microlab) con 25 mM de KCl, 2 mM de glutamina, y una solución de penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 μ g/ml).

Luego de sembradas, las células fueron mantenidas a 37°C, en una atmósfera de CO₂ (4.5%) y aire saturado con vapor de agua (95%) durante 4-6 días en el caso de las neuronas y por lo menos 2 semanas para las células gliales; después de transcurrido estos tiempos, y de observar en el microscopio que se encontraran en buen estado, se cambió el medio condicionado por el medio de Locke (ML) o el propio medio Eagle (MC) precalentados. Las cajas contenían: 0 (controles), 20, 50 o 100 μ M de RR, y fueron incubadas durante 8, 16 o 24 horas. El ML tiene la siguiente composición (en mM): NaCl 154, KCl 5.6, NaHCO₃ 3.6, CaCl₂ 2.3, MgCl₂ 1.2, glucosa 5.6, HEPES 5, pH=7.4 (Manev y cols., 1990).

En otros experimentos con dantroleno, se realizó una preincubación de 2

horas en ML con o sin dantroleno 30 μM . La adición de RR (acompañado o no de dantroleno 30 μM) en ML fresco fue tomada como tiempo 0 para contabilizar la incubación; a las 6 y 20 horas de incubación se adicionó dantroleno 10 μM , para tener, después de la segunda adición 50 μM final. Los valores del control corresponden a cajas preincubadas el mismo tiempo a las que no se agregó RR ni dantroleno.

C. PREPARACION DE SOLUCIONES CONCENTRADAS.

1. ROJO DE RUTENIO.

Se pesaron 3.14 mg de RR (Sigma Chemical Company) y se disolvieron en 1 ml de agua, lo que da una concentración de 4 mM. De aquí se tomaron alícuotas que se llevaron a un volumen mayor para dar concentraciones de 20, 50 o 100 μM final.

2. DANTROLENO.

El dantroleno (Norwich Eaton Pharmaceuticals) fue preparado en una solución concentrada (3 mM) en agua bidestilada y desionizada; luego de agregar el agua, se sonicó durante 5 seg y justo antes de adicionarse a las células se calentó a 37°C para disolverlo mejor. De esta solución se agregaron 10 μl a cada ml del medio de incubación.

3. BAPTA.

El BAPTA-AM (Calbiochem) fue preparado en una solución 32.7 mM en dimetilsulfóxido (DMSO). De aquí se preparó a una solución 5 mM en agua (15.3% de DMSO), de la que se tomaron 10 μ l para agregar a cada ml en los cultivos. De este modo, la concentración final de BAPTA-AM fue 50 μ M y la de DMSO 0.15%.

4. GANGLIOSIDOS.

Los gangliosidos GM1 y GT1b (Sigma Chemical Company) fueron disueltos en una mezcla de cloroformo-metanol 2:1, llevados a sequedad con nitrógeno con el objeto de evitar su oxidación (Toffano y cols., 1980) y posteriormente disueltos en agua previamente gaseada con nitrógeno, para tener soluciones 10 mM, y agregar 10 μ l por cada ml de medio Locke para tener 100 μ M final.

D. METODOS UTILIZADOS PARA EVALUAR EL DAÑO CELULAR.

1. ACTIVIDAD DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA EN LOS HOMOGENEIZADOS DE LAS REBANADAS DE HIPOCAMPO.

La descarboxilasa glutámica es la responsable de la síntesis de el neurotransmisor GABA, mediante la descarboxilación del ácido glutámico. Como se han reportado 2 isoenzimas, una dependiente y otra independiente de la coenzima fosfato de piridoxal (PLP), el ensayo puede realizarse en presencia o

ausencia de dicha coenzima; en nuestro caso todos los ensayos se realizaron con fosfato de piridoxal. El ensayo se basa en el hecho que la GAD separa el carbono 1 del ácido glutámico, liberando CO_2 ; si se pone glutamato con el primer carbono con masa atómica 14, el bióxido de carbono desprendido es radiactivo y puede cuantificarse con un contador de radioactividad.

Para la determinación de la actividad se utilizaron tubos de microensayo unidos mediante una manguera. En el primero de ellos se adicionó el homogeneizado, solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, pH=6.4, [^{14}C] ácido glutámico (Amersham) y fosfato de piridoxal (Sigma Chemical Company). El sustrato de la enzima es ácido glutámico, que tiene el carbono 1 con masa atómica 14, por lo que el bióxido de carbono desprendido (que es radiactivo) viaja a través de la manguera y es captado por una base fuerte (hiamina) debido a su naturaleza ácida. La incubación (a 37°C) se detiene luego de 20 minutos al adicionar al tubo con el tejido, ácido sulfúrico 2.5 N. Se deja difundir el bióxido de carbono durante 1 hora hasta el tubo que contiene hiamina y se separa éste para introducirse a un vial que contiene tolueno y pueda cuantificarse la radioactividad presente en un contador de centelleo. La actividad enzimática se expresa como moles sintetizados/unidad de tiempo y se calcula en relación a la cantidad de proteína presente, determinada por el método de Lowry (1951). Para calcular los moles sintetizados se utiliza la actividad específica del compuesto radiactivo ($0.07 \mu\text{Curie}/\text{mmol}$), ya que si conocemos la radioactividad presente,

corregida por la eficiencia del contador de centelleo, podemos calcular los moles sintetizados (Tapia y Salazar, 1991). En nuestro caso, se utilizó la actividad de la GAD como parámetro de supervivencia neuronal.

2. LIBERACION DE LA DESHIDROGENASA LACTICA.

Se cuantificó la actividad de esta enzima citoplasmática mediante un método espectrofotométrico (Bergmeyer y cols., 1968) que utiliza a la coenzima dinucleótido de nicotina y adenina en su forma reducida (NADH). La determinación se basa en que al oxidarse el NADH, deja de absorber luz a 340 nm, y esta oxidación es posible porque en el medio existe piruvato en exceso, que es reducido por la LDH a lactato. Así, mientras más enzima exista, mayor será la disminución en la absorbancia por unidad de tiempo.

La reacción se realizó en celdas que contenían amortiguador de fosfatos 0.05 M, con pH=7.4, junto con en el cuál se ponen β -NADH (Sigma Chemical Company, sal disódica, grado III) en concentración 170 μ M, una alícuota de la muestra a determinar, y finalmente, para arrancar la reacción, piruvato (Sigma Chemical Company) 0.3 M. El cambio en la absorbancia fue seguido durante un minuto por lo menos, a temperatura ambiente y luego se calculó la actividad presente en el homogeneizado y el sobrenadante, se sumaron ambas, y se obtuvo el porcentaje liberado al medio, en relación al total de actividad. Esto nos permite evaluar el estado de la membrana celular, que en condiciones normales no

permite la salida de protefmas. Es importante mencionar que la actividad de ésta enzima no se ve afectada si las muestras se congelan, y aclarar que la presencia de RR en los sobrenadantes no afecta la actividad de la LDH (no mostrado).

3. REDUCCION DEL MTT.

Otra técnica utilizada para caracterizar la toxicidad del RR fue la reducción del colorante bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Este ensayo está fundamentado en el hecho que las células con una cadena respiratoria funcional se encuentran en mejor estado metabólico que aquellas que no estén transfiriendo electrones en las mitocondrias. Como el MTT es reducido a formazán (producto insoluble de color azul) al recibir electrones desde el citocromo c₁ (Slater y cols., 1963), una producción de la sal reducida indica que esas células se encuentran en un buen estado.

A las células cultivadas, ya sean neuronas o astrocitos, se les cambió el MC por ML, se incubaron durante los tiempos indicados y finalmente se les adicionó MTT (Sigma Chemical Company) con concentración 144 μ M. Una hora despues, el medio fue separado por succión con vacío y el formazán se solubilizó al agregar isopropanol anhidro con HCl 0.04 N. El producto es cuantificado espectrofotométricamente a 570 nm (Mosmann, 1983). Los resultados obtenidos por diferentes grupos en este ensayo han permitido establecer una relación directa entre el buen estado metabólico de cultivos y la reducción de la sal de tetrazolio

(Manthorpe y cols., 1986; Balázs y cols., 1988). Los resultados se expresan como porcentaje del control en cada experimento. Cabe mencionar que el RR no interfiere en la cuantificación espectrofotométrica del formazán, puesto que el RR es insoluble en isopropanol ácido; el RR tampoco interfiere con la reducción de MIT, puesto que la presencia de RR 100 μM en la incubación con la sal de tetrazolio de NC control no afectó los valores de absorbancia.

E. MEDICION DE LOS NIVELES DE CALCIO INTRACELULAR EN NEURONAS.

La cuantificación del calcio en el citoplasma neuronal se realiza con indicadores que aumentan su fluorescencia de manera proporcional a la cantidad de calcio. Dentro de estos indicadores, uno de los más usados es el Fura 2, cuya síntesis se realizó en 1985 por Grynkiewicz y cols.

En el procedimiento experimental usado, NC fueron sembradas en cubreobjetos de 1.2 por 3 cm en cajas petri de 35 mm de diámetro. Luego de 4-6 días, el medio de cultivo se cambió por ML y se incubaron 24 h en ausencia (controles) o presencia de RR 100 μM . Al siguiente día el medio se cambió por 0.5 ml de ML fresco con Fura 2-AM 5 μM . Las células fueron incubadas a 37°C durante 45 minutos protegidas de la luz y luego se lavaron 2 veces con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). Posteriormente, las cajas se mantuvieron en una parrilla calibrada a 37°C hasta que las neuronas, adheridas a los

cubeobjetos fueran transferidos a una celda de cuarzo con 3 ml de ML. Las determinaciones fueron hechas a temperatura ambiente en un espectrofluorómetro SLM-AMINCO con software 8000. Las longitudes de onda de excitación usadas fueron 340 y 380 nm, y la de emisión fue 510 nm (Grynkiewicz y cols., 1985). La fluorescencia máxima se obtuvo con ionomicina (un ionóforo de calcio) 2 μ M o con tritón X-100 al 0.3 % de concentración final. La fluorescencia mínima fue leída luego de agregar EGTA 13 mM final. La conversión de fluorescencia a niveles de calcio intracelular se hizo con la siguiente fórmula (Grynkiewicz y cols., 1985):

$$[\text{calcio}] = K_d (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$$

La constante de disociación (K_d) para el complejo fura 2-calcio utilizada en los cálculos fue 225 nM (Connor, 1986; Malgaroli y cols., 1987).

Con el objeto de probar si el RR no interfería con la medición de la fluorescencia, se adicionaron distintas concentraciones de colorante (0, 10, 15, 20, 50 y 100 μ M) en una solución que contenía KCl 135 mM, MOPS 5 mM, EGTA 2 mM, Fura 2 0.5 μ M a pH 7.4, de modo tal que las concentraciones finales de calcio fueron 100, 200 y 400 nM (Grynkiewicz y cols., 1985). Se observó el cambio que producía el colorante en la fluorescencia.

F. HISTOLOGIA.

Las rebanadas del hipocampo fueron fijadas en formaldehído al 2%. Posteriormente fueron cortadas en rebanadas más pequeñas (10 μ m).

En el caso de los cultivos, la fijación para estudiar la morfología se realizó luego de lavar 2 veces con PBS 0.05 M precalentado y la adición posterior de paraformaldehído 4%/glutaraldehído 1% durante 10 minutos en frío. Las células fijadas se lavaron 2 veces con PBS frío y se montaron en resina, protegidas con un cubreobjetos. Algunas fotografías fueron tomadas justo después de los tiempos de incubación, sin fijación previa.

Con el objeto de observar si el RR alteraba el citoesqueleto de las neuronas, se sembraron NC en cubreobjetos circulares de 13 mm de diámetro a una densidad de 0.4 millones/ml. Se incubaron 24 h en ML en ausencia o presencia de RR 100 μ M; luego de transcurrido el tiempo, se lavaron dos veces con PBS frío y se fijaron con metanol absoluto durante 20 minutos en hielo. Las células fijadas se trataron con tritón X-100 al 0.25% por 10 minutos para posteriormente lavarlas 2 veces con PBS. Se dejaron en contacto una noche con una dilución 1:1000 del anticuerpo murino contra α -tubulina (Sigma Chemical Co.) en presencia de albúmina al 5%. Al siguiente día se incubaron durante una hora con un anticuerpo anti-IgG de ratón, acoplado a peroxidasa (Vector Laboratories). El revelado se hizo con diaminobencidina (Sigma Chemical Co., 0.5 mg/ml) y peróxido de hidrógeno al 0.01% disueltos en TRIS 100 mM con pH=7.4. Por último se lavó 2 veces con PBS y se hidrataron con etanol, para después montarse en un portaobjetos con resina Permout.

G. ANALISIS ESTADISTICO.

En todos los casos, n significa el número de experimentos con tejido obtenido de distintos animales. Las determinaciones se realizaron por lo menos por duplicado. Para la estadística se usó el análisis de varianza ANOVA, seguido de la prueba de Fisher; la probabilidad (P) debió ser menor o igual a 0.05 para que la diferencia fuera considerada como significativa. En todos los casos se grafica el valor medio \pm error estándar.

IV. RESULTADOS.

A. GAD Y LDH EN REBANADAS.

Como puede observarse en la figura 3, la incubación por 30 minutos de las rebanadas de hipocampo con RR 20 μM no ocasionó cambios importantes en la liberación de LDH o la actividad de la GAD. La histología corroboró estos resultados bioquímicos, puesto que el colorante se introdujo en un pequeño número de neuronas, sobre todo las que se encontraban cercanas a la superficie. También pudo observarse que a semejanza de lo que ocurre *in vivo*, el colorante penetró solamente en las neuronas y no en las células gliales. En los experimentos donde las rebanadas se preincubaron media hora y fueron expuestas a RR 100 μM , tampoco se observaron diferencias en la liberación de LDH (no mostrado).

B. LIBERACION DE LDH EN CULTIVOS PRIMARIOS.

En lo que respecta al cultivo de las neuronas corticales, al ser incubadas con diferentes concentraciones de Rojo de Rutenio en medio Eagle, la liberación de LDH no mostró una relación con la concentración del colorante adicionado; es más, se observó una relación inversa con la concentración, a tiempos de incubación de 8 y 24 horas. Es de llamar la atención que el sólo cambio de medio ocasionó una liberación importante de LDH (figuras 4 y 5). Contrario a lo

observado en el medio Eagle, en el Locke pudo observarse una dependencia de la concentración de RR en la salida de LDH, en neuronas corticales (8 horas, figura 6) y astrocitos (24 horas, figura 8). En estas neuronas, con 24 horas de incubación, la dependencia de la concentración en la liberación de LDH al medio no fue observada (figura 7), debido a que el valor del control aumenta considerablemente con respecto a las 8 horas.

C. REDUCCION DE MTT EN CULTIVOS PRIMARIOS.

La técnica del MTT, aplicada a cultivos celulares primarios, permitió ver que la toxicidad por RR es tiempo y dosis-dependiente en el caso de neuronas corticales y granulares de cerebelo (figuras 9 y 10), mientras que con los astrocitos, estas características no pueden verse claramente en los tiempos de incubación usados (figura 11). Lo anterior correlaciona perfectamente con los datos *in vivo* y con las observaciones microscópicas realizadas en este trabajo. Debe mencionarse que los resultados obtenidos con ambos tipos de neuronas fueron similares en todos los casos, por lo que si se presentan gráficas sólo de un tipo de neuronas, en el otro se obtuvieron resultados semejantes, a menos que se mencione lo contrario. La máxima disminución en la supervivencia neuronal se logró a las 24 h con RR 100 μ M, obteniendo valores de 25 a 30 % con respecto a los controles (figuras 9 y 10), mientras que en las mismas condiciones, en los astrocitos se tienen valores de 75% (figura 11).

En las figuras 12, 13 y 14 puede observarse que el dantroleno 30 μM fue incapaz de proteger a las neuronas del daño por Rojo de Rutenio a tiempos de incubación de 16 y 24 horas; por el contrario, parece haber una potenciación de la toxicidad por este compuesto, aunque estadísticamente esta diferencia no resultó significativa. A concentración de 15 μM , el dantroleno no afectó la toxicidad por RR, en incubaciones de 24 horas (no mostrado). En experimentos con una preincubación, descritos con detalle en la sección de métodos, el aumento en la toxicidad debido al dantroleno parece ser más claro (figura 15).

En el caso del BAPTA-AM, una concentración de 50 μM parece proteger un poco a las neuronas, lo que fue más claro en neuronas corticales (figura 16) que en granulares (figura 17), aunque en ninguno de los dos casos, las diferencias resultaron significativas en las pruebas estadísticas. En neuronas corticales, el BAPTA-AM 25 μM , coincubado 24 h con RR 100 μM también fue capaz de proporcionar cierta protección, pero al mismo nivel de BAPTA 50 μM (42.0 ± 5.9 , $n=2$).

Por último, los gangliósidos usados en este estudio no tuvieron el mismo efecto al probarse contra la toxicidad por RR. Mientras que GM1, a concentración de 100 μM no previno contra la muerte neuronal luego de 24 horas de incubación (figura 18), a 16 horas incluso parece haber una potenciación (figura 19). Por su parte, el GT1b 100 μM protegió de manera significativa a las neuronas de la muerte al ser coincubado con RR 24 horas (figura 18). A 16 horas se observa una

diferencia menor con las células tratadas solamente con colorante, aunque aún así, la diferencia resultó significativa (figura 19). En la figura 20 puede observarse que el GT1b es igual de efectivo al probar concentraciones más bajas (10 y 50 μM) en una incubación de 24 horas. En lo referente a los astrocitos, ninguno de los gangliósidos pudo antagonizar la pequeña disminución en la reducción de MTT producida por la incubación con RR por 24 h (figura 21).

D. NIVELES DE CALCIO CITOPASMÁTICO EN NEURONAS CORTICALES.

Después de exponer a las neuronas corticales a Rojo de Rutenio 100 μM durante 24 h, puede observarse un claro aumento en la concentración de calcio citoplasmático con respecto a las células control (figura 22).

En las mediciones hechas con RR en solución, pudo observarse que a concentraciones menores a 20 μM , el colorante no afectó de manera importante la medición, pero a partir de 20 y hasta 100 μM , el color producido por el RR no permitió la correcta detección de la fluorescencia (es decir, no importando la cantidad de calcio adicionada, la fluorescencia se mantenía en 1), con concentraciones de calcio que fueron de 100 a 400 nM.

E. HISTOLOGIA DE CULTIVOS PRIMARIOS.

La observación microscópica de los cultivos de neuronas mostró somas

neuronales teñidos de manera específica luego de 2 h de incubación, mientras que a 8 h muchas neuronas se encontraron teñidas (RR 100 μ M), aunque a estos tiempos la estructura de las células no se alteró notablemente: sólo se observó disminución en el diámetro del soma de algunas células y algunas otras con vacuolizaciones (figura 23). En células incubadas 16 h, el RR había penetrado la mayoría de los somas neuronales y producido vacuolización; la morfología no se conservó tanto como a 8 h, puesto que las prolongaciones habían disminuido en grosor. A las 24 h, las cajas sin RR tenían neuronas con somas grandes y definidos, así como prolongaciones gruesas y rectas; con RR 20 μ M, se encontró una disminución en la población, las neuritas se hallaban onduladas y había células vacuolizadas. A concentraciones mayores (50 y 100 μ M), el daño fue más evidente aún, sobre todo por la disminución en la población, además que los procesos neurales se encontraron, además de disminuidos y adelgazados, muchas veces seccionados, como se pone de manifiesto en la inmunocitoquímica con α -tubulina (figura 24). En cuanto a los somas, en la preparación anterior, algunos se ven bien definidos, pero carecen de prolongaciones, otros se ven picnóticos, aunque todos fueron penetrados por el RR. En la figura 25 se presentan fotografías de NC incubadas 24 h en ML, en las que se observa que el GT1b pudo prevenir las alteraciones morfológicas ocasionadas por el RR.

En lo que se refiere a los astrocitos, en tiempos hasta 20 horas, el aspecto de los cultivos tratados con RR (a cualquier concentración) no difería mucho de

los controles, pero a 20 h, por ejemplo, con 20 y 50 μM se empezaron a ver vacuolizaciones, pero pocas células se hallaban incluidas por el colorante; con 100 μM de RR, la vacuolización fue más evidente y la población empezó a disminuir ligeramente, además que algunos somas se encontraron teñidos (figura 26).

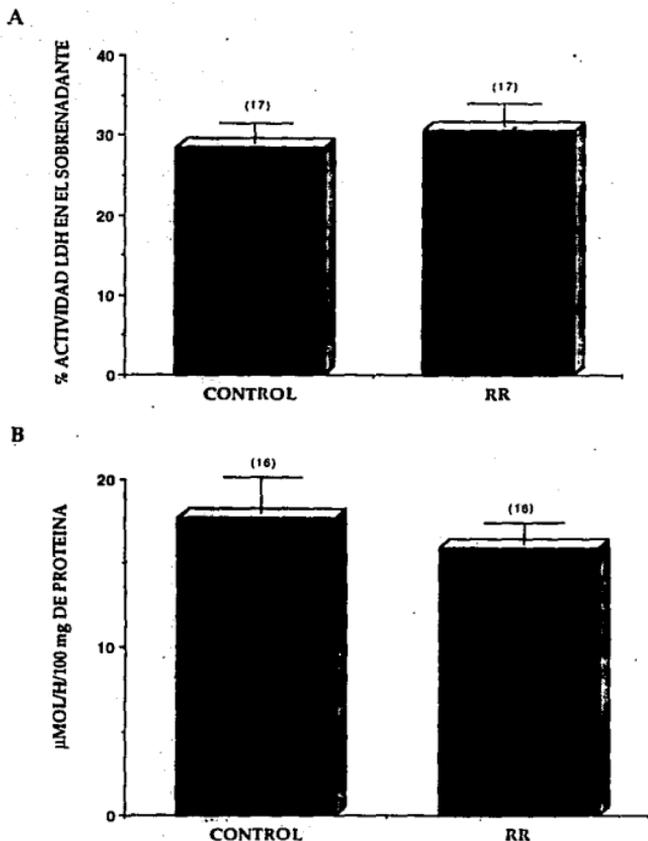


Figura 3: Las rebanadas de hipocampo fueron incubadas media hora sin y con RR 20 μ M en medio Krebs gaseado. A) Actividad porcentual de la LDH en los sobrenadantes. B) Actividad de la GAD en presencia de fosfato de piridoxal en homogenizados. En ningún caso se obtuvo una diferencia significativa.

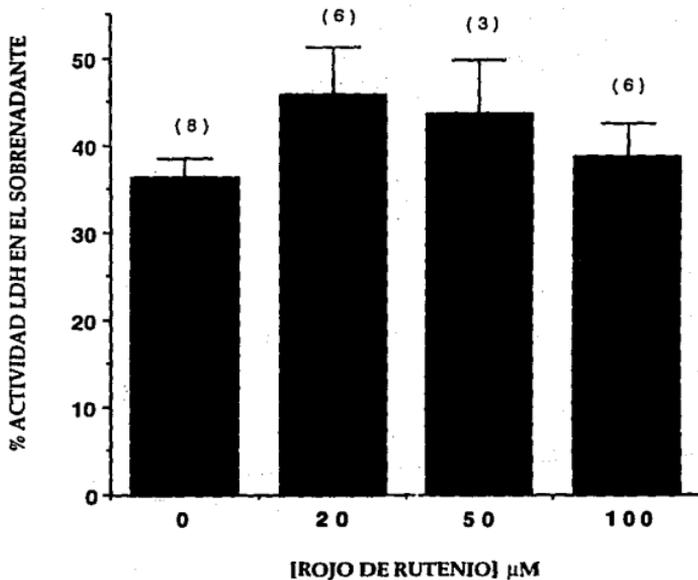


Figura 4. Las neuronas corticales, al ser expuestas a un medio de cultivo fresco y a distintas concentraciones de RR, liberaron una cantidad importante de LDH aún en la condición del control. En esta incubación, durante 8 h, no se pudo establecer una correlación entre la concentración de RR y la liberación de LDH.

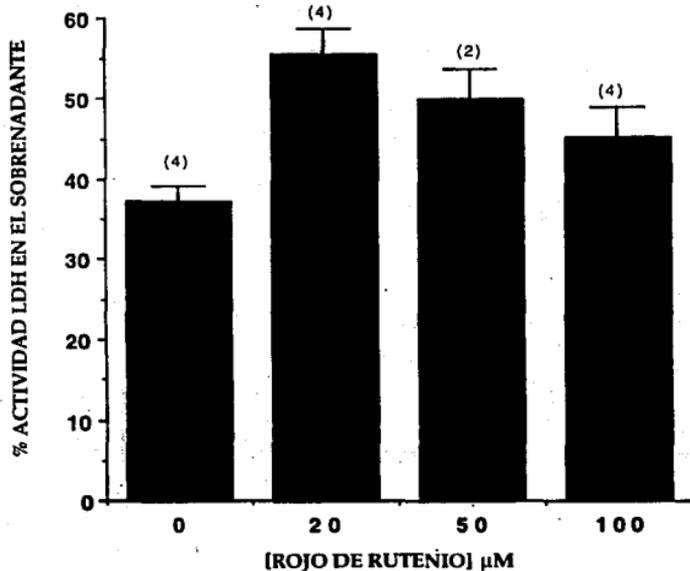


Figura 5. Al incubar neuronas corticales 24 h con diferentes concentraciones de RR en medio Eagle, la mayor liberación de LDH se observó con RR 20 μM y la menor en las cajas control. * $P < 0.05$ en relación al control (Anova-Fisher).

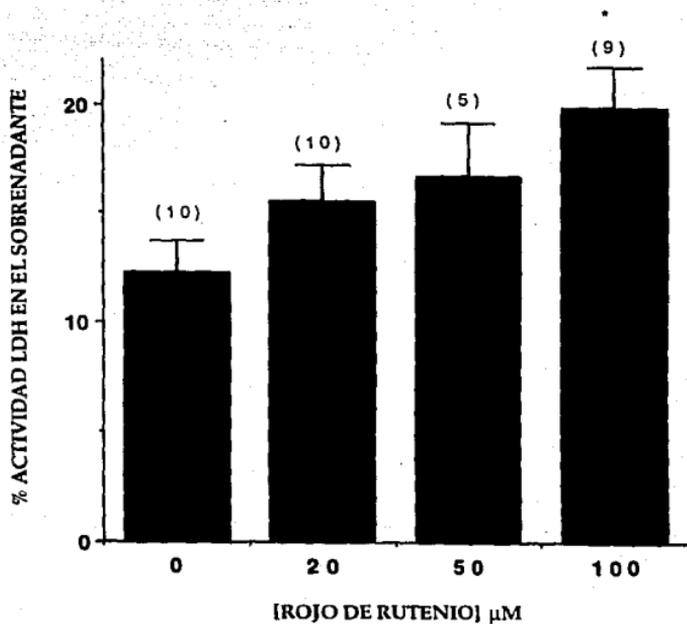


Figura 6. Efecto dependiente de la dosis producido por el RR sobre la liberación de LDH al medio Locke, luego de 8 h de incubación en neuronas corticales. * $P < 0.05$ respecto a los valores del control.

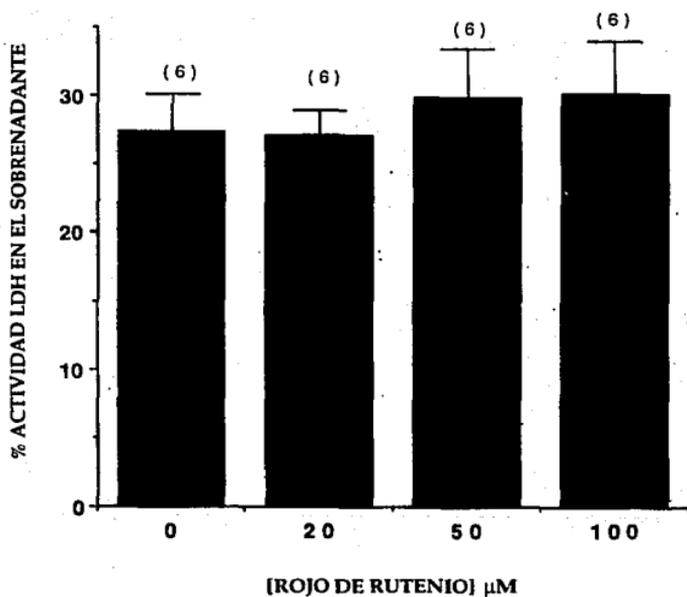


Figura 7. La incubación de neuronas corticales en medio Locke por 24 h con distintas concentraciones de RR no permitió establecer una relación del estado de las células con la liberación de LDH.

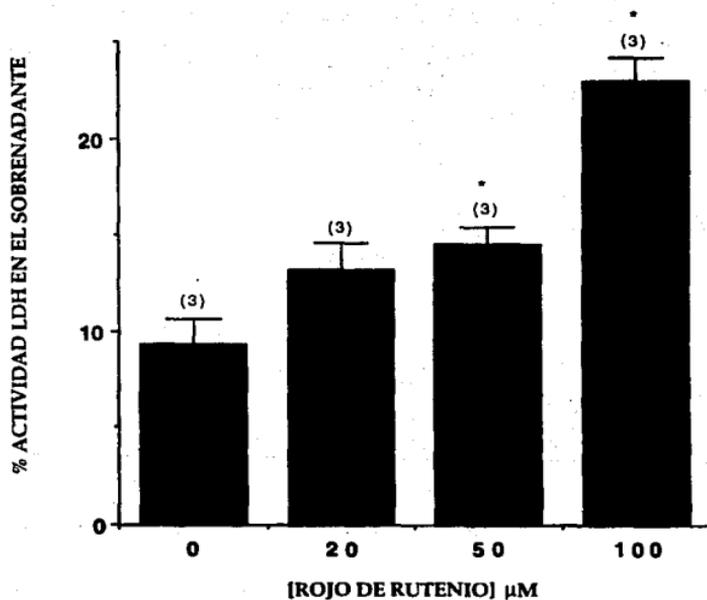


Figura 8. Los astrocitos de cerebelo incubados en solución Locke por 24 h mostraron una liberación de LDH dependiente de la dosis. * $P < 0.05$ respecto al control.

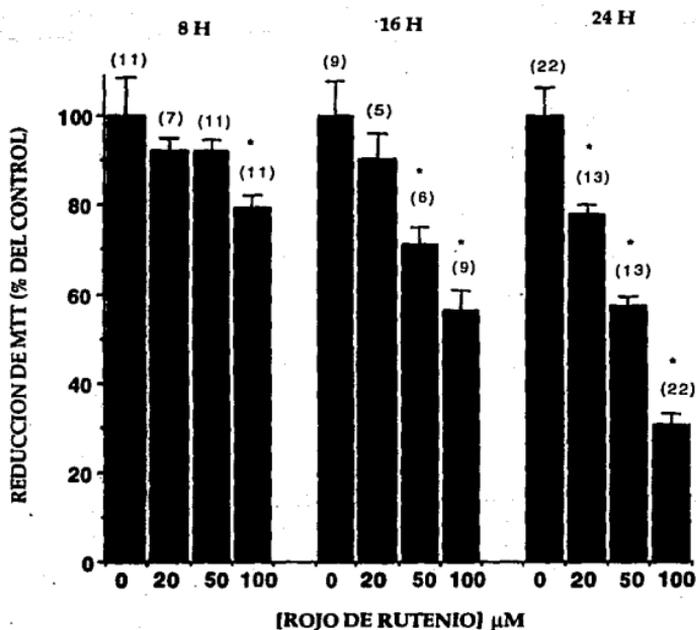


Figura 9. En neuronas corticales incubadas 8, 16 y 24 h con distintas concentraciones de RR pudo observarse un decremento en la reducci3n de MTT que depende tanto de la concentraci3n como del tiempo de exposici3n al colorante. * $P < 0.05$ relacionado con los valores del control para cada tiempo.

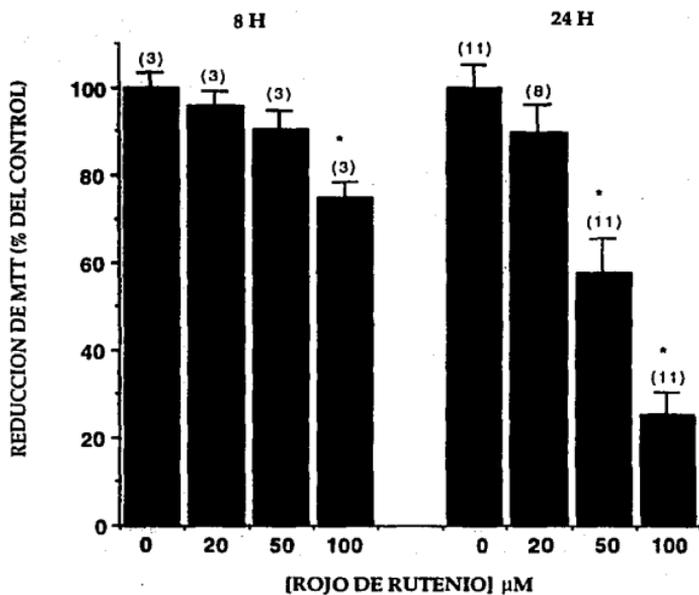


Figura 10. Las neuronas granulares de cerebelo también mostraron ser susceptibles a la toxicidad por RR a las 8 y 24 h de exposición en medio Locke.
 * $P < 0.05$ respecto al control en cada tiempo.

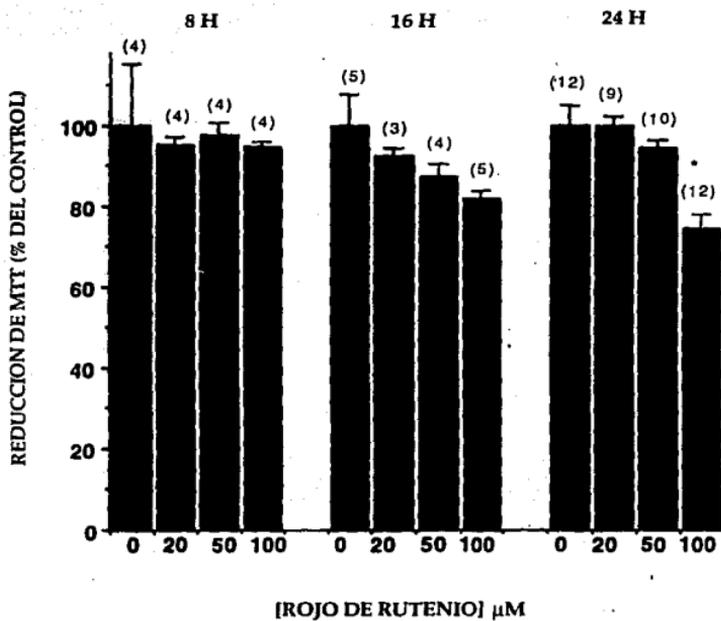


Figura 11. Los astrocitos de cerebelo son mucho más resistentes al efecto en la disminución en la reducción de MTT que las neuronas. La única diferencia estadísticamente importante es con RR 100 μM 24 h. * $P < 0.05$ (Anova-Fisher) respecto al control.

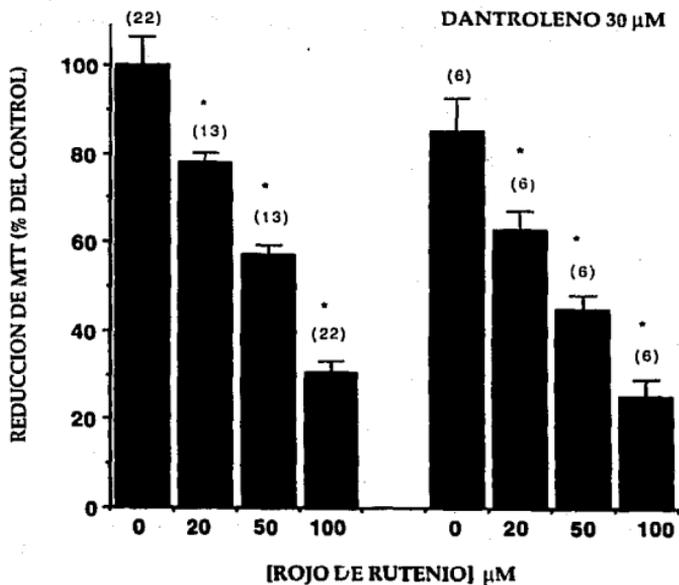


Figura 12. El dantroleno 30 μM fue incapaz de proteger a las neuronas corticales de la toxicidad por Rojo de Rutenio, luego de 24 h de incubación.
 * P<0.05 del control.

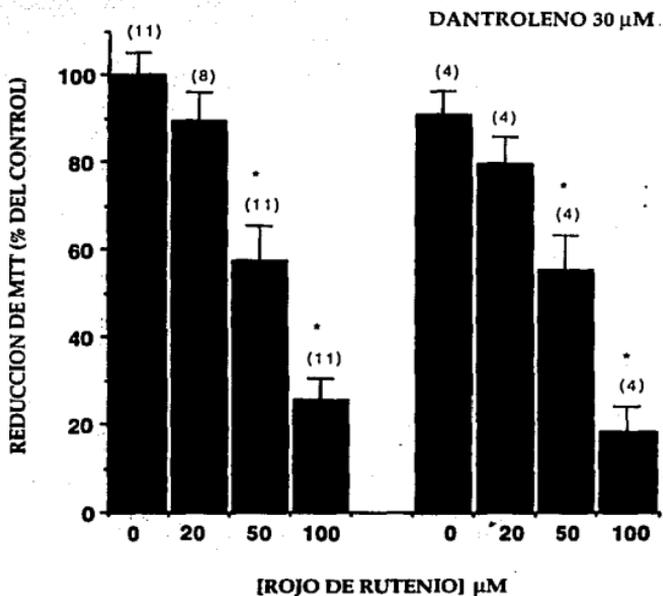


Figura 13. Neuronas granulares de cerebelo incubadas con RR y dantroleno 30 μ M por 24 h en ML. No se observa ningún aumento en la reducción de MTT debido a dantroleno. * $P < 0.05$ respecto al control.

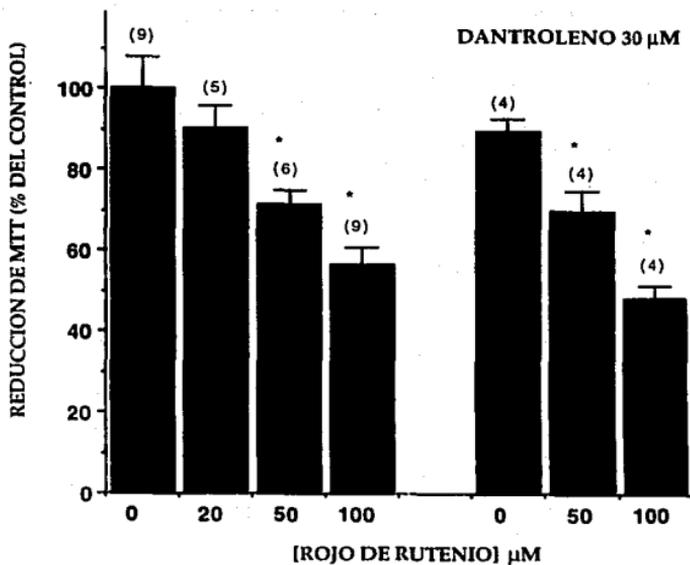


Figura 14. Neuronas corticales incubadas 16 h en medio Locke. A este tiempo, el dantroleno tampoco tiene efecto sobre la toxicidad por RR. * $P < 0.05$ relacionado con el control.

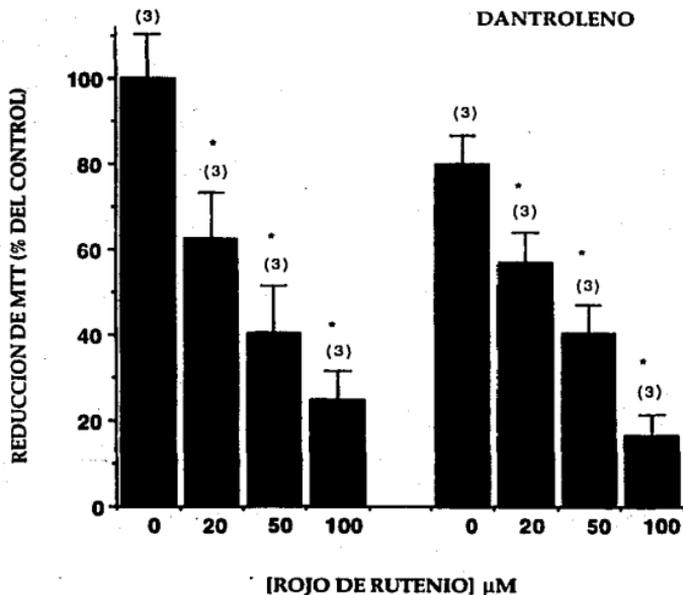


Figura 15. Neuronas corticales preincubadas con dantroleno según el protocolo descrito en métodos. Aquí puede observarse mejor la pequeña potenciación en la toxicidad del RR por dantroleno. * $P < 0.05$ del control, que fue tratado de la misma forma, excepto que no se la adicionó RR o dantroleno.

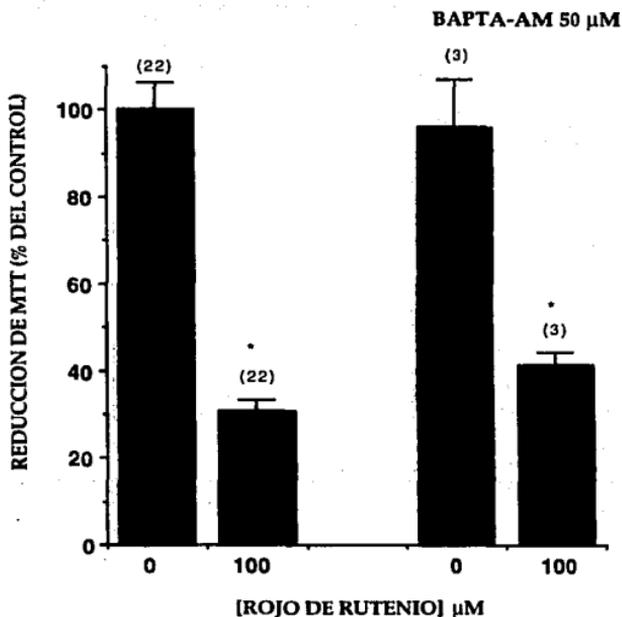


Figura 16. El BAPTA-AM 50 μ M produjo un ligero aumento en la transformación de MTT por células corticales incubadas con RR 100 μ M 24 h, comparado con células que fueron expuestas sólo a RR. Este quelante de calcio no parece afectar de manera importante a las células sin RR. * $P < 0.05$ respecto al control.

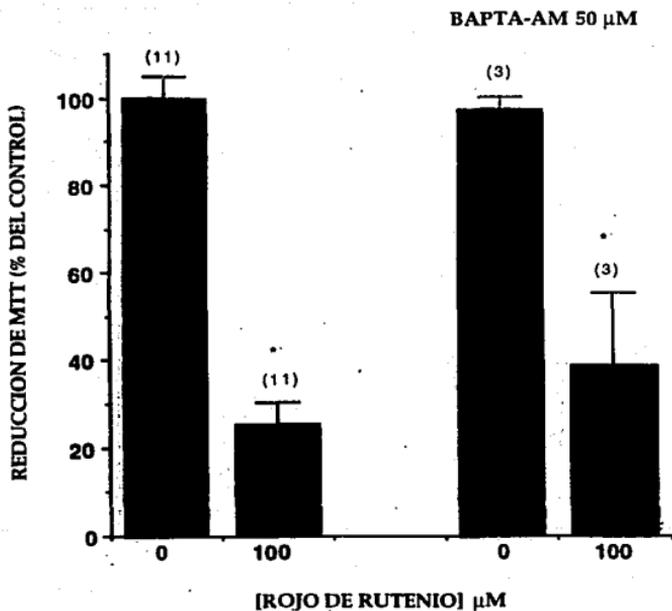


Figura 17. Neuronas granulares de cerebelo expuestas a RR 100 μ M por 24 h. El efecto mostrado por el BAPTA-AM en neuronas corticales parece reproducir, aunque con mayor variabilidad. * $P < 0.05$ comparado con el control.

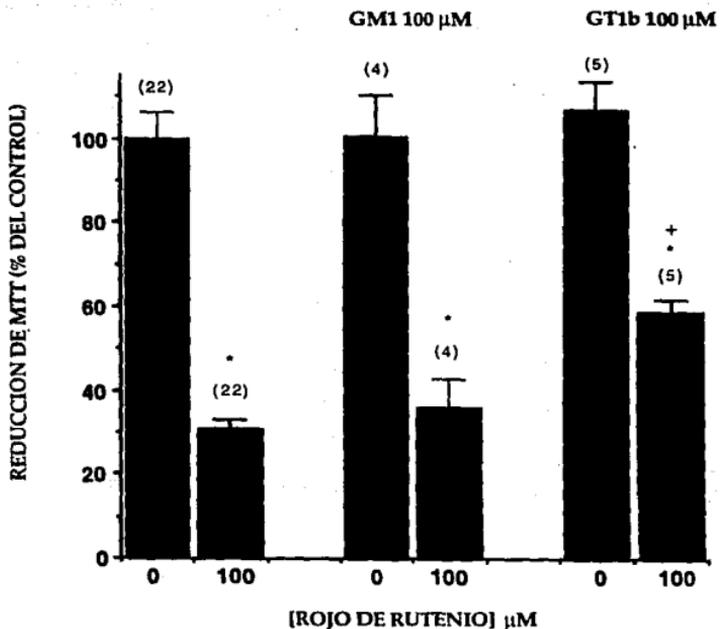


Figura 18. En neuronas corticales, luego de 24 h de incubación, los gangliósidos GM1 y GT1b probados en la misma concentración contra la muerte ocasionada por RR tuvieron efectos distintos: el GM1 no la afectó, mientras que el trisialogangliósido la redujo de manera significativa. * $P < 0.05$ respecto al control. + $P < 0.05$ relacionada con las células tratadas sólo con RR 100 μM .

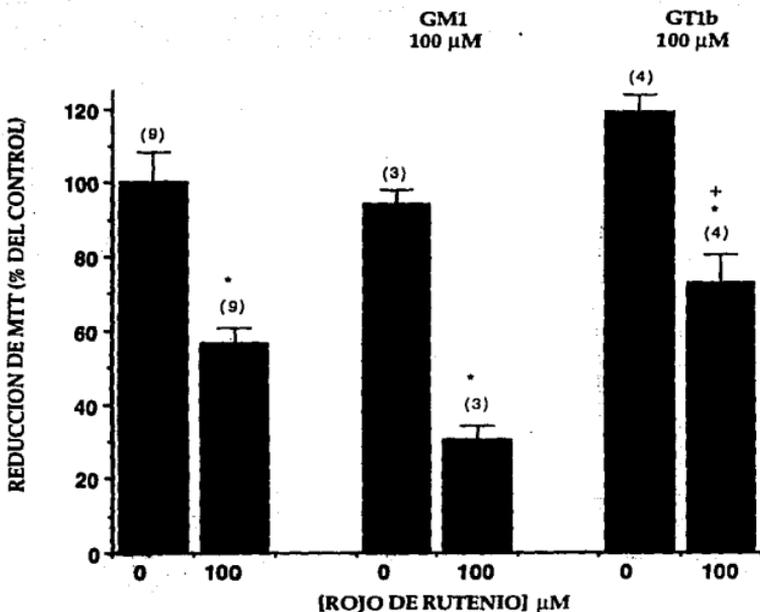


Figura 19. En células corticales incubadas 16 h, los gangliósidos mostraron efectos contrarios al probarse contra la toxicidad por RR. El monosialogangliósido la potenció y el GT1b la previno, aunque en menor proporción que la observada a 24 h. * $P < 0.05$ vs. control. + $P < 0.05$ de la condición con RR únicamente.

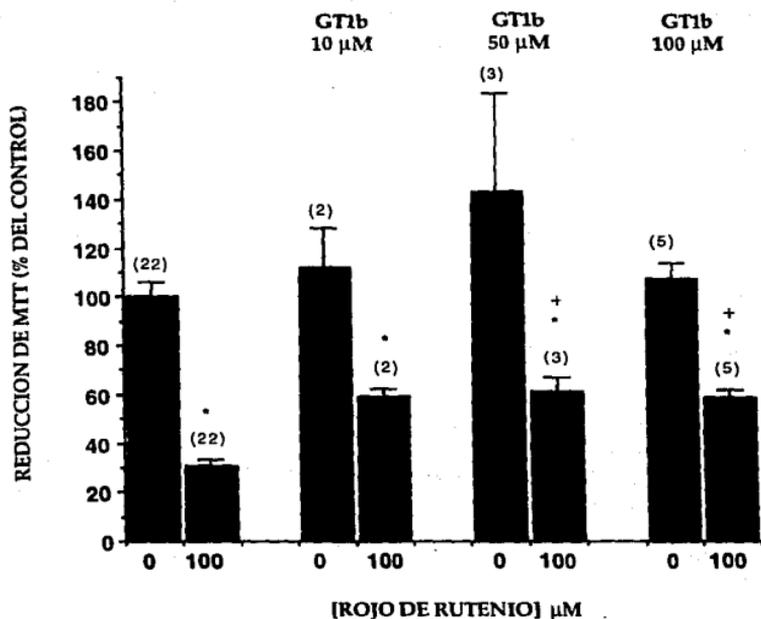


Figura 20. El efecto protector del GT1b demostró alcanzar los mismos niveles al probar concentraciones de gangliósido de 10, 50 y 100 μM en neuronas corticales incubadas 24 h. * $P < 0.05$ vs. control. + $P < 0.05$ vs. RR 100 μM .

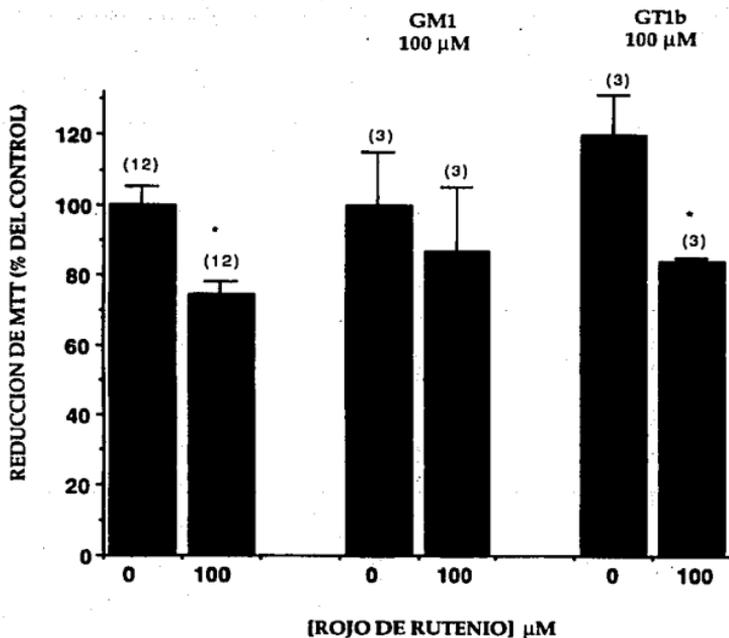


Figura 21. En astrocitos de cerebelo incubados 24 h en solución Locke, los gangliósidos, a concentración de 100 μM, no pudieron antagonizar la pequeña disminución en la reducción de MTT provocada por RR. * P<0.05 respecto a las cajas sin colorante ni gangliósido.

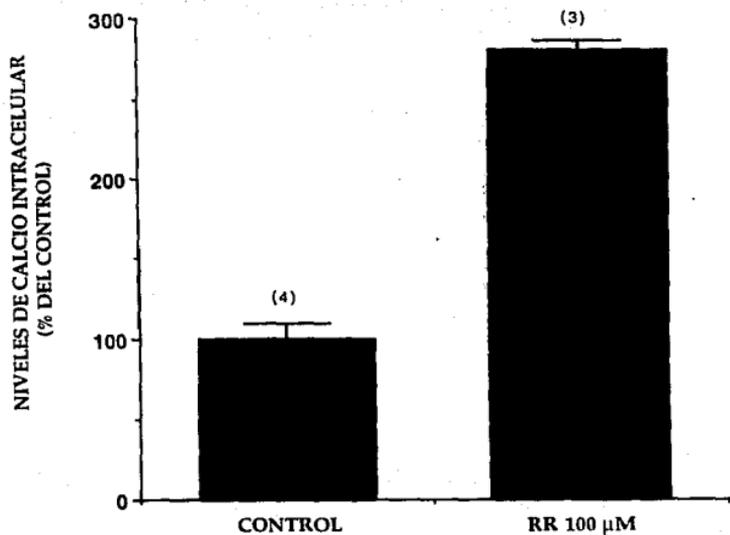
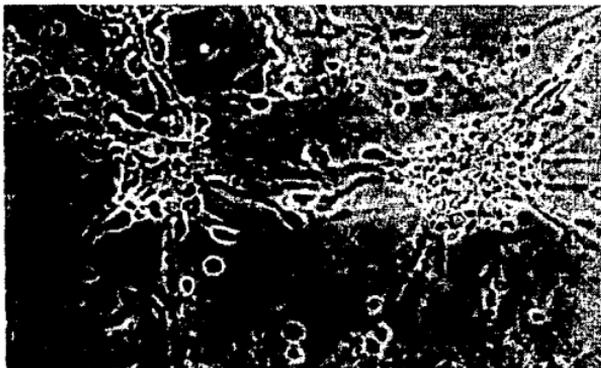


Figura 22. El RR ocasiona un aumento significativo en los niveles de calcio intracelular respecto a neuronas no tratadas con el colorante, luego de 24 h de exposición. Los resultados se expresan como aumento respecto al control. Los valores de las células control fueron 86 ± 8 nM de Ca^{2+} . * $P < 0.05$ en relación al control.

A



B

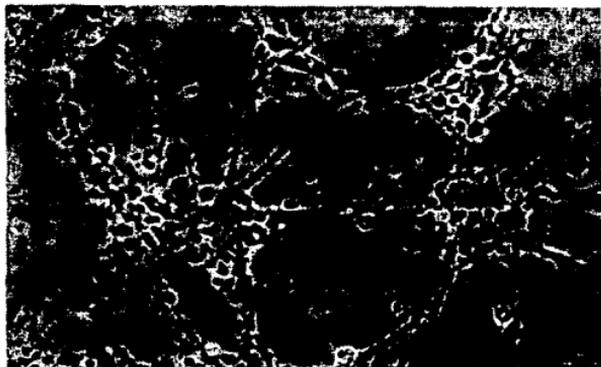


Figura 23. Aspecto al microscopio de neuronas corticales incubadas en medio Locke en ausencia (A) o presencia (100 μ M, B) de RR durante 8 horas. Nótese que varios somas tienen RR.

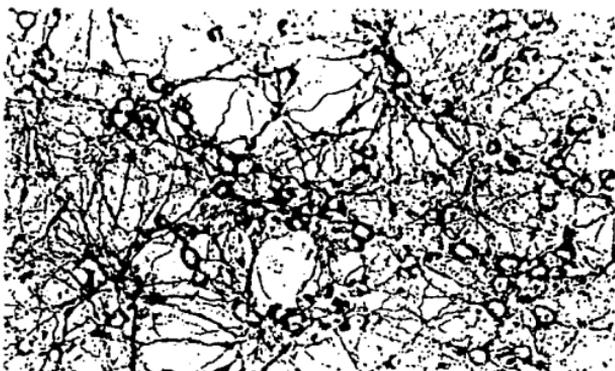
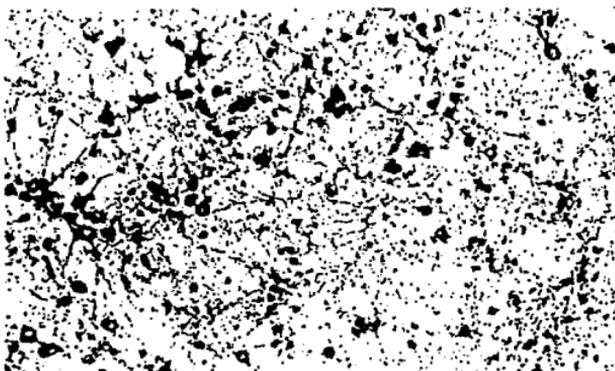
A**B**

Figura 24. En esta tinción de neuronas corticales con anti- α -tubulina se observa que luego de 24 h de exposición a RR 100 μ M (B) las proteínas que componen el citoesqueleto han sido muy deterioradas, sobre todo aquellas que se encuentran en las prolongaciones neuronales. Es de llamar la atención también el hecho que la población ha disminuido notablemente, comparando con condiciones control (A).

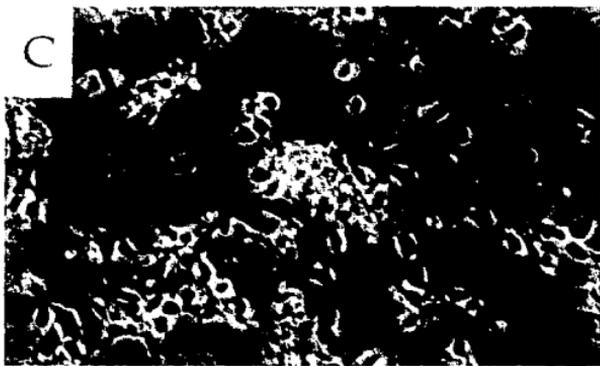
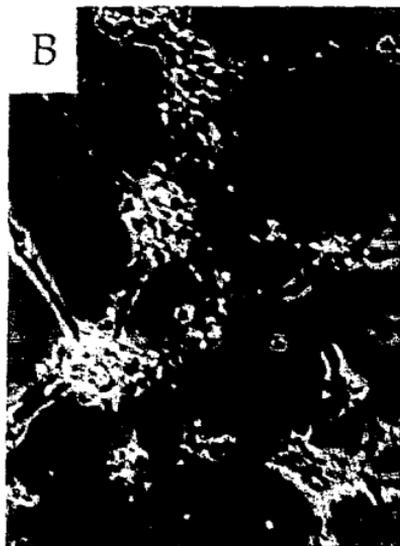


Figura 25. El Rojo de Rutenio provoca, luego de 24 h de incubación, disminución en la población, vacuolización y fragmentación en los procesos de células corticales. El GT1b es capaz de antagonizar aunque sea parcialmente dichas modificaciones. A: control. B: RR 100 μ M. C: RR 100 μ M + GT1b 100 μ M.



Figura 26. En los astrocitos de cerebelo, la vacuolización producida por RR no es tan extendida como en el caso de las neuronas, al incubar con el colorante a concentración $100 \mu\text{M}$ por 24 h (B). Compárese con condiciones control (A).

V. DISCUSION.

A. REBANADAS DE HIPOCAMPO.

Las mediciones de descarboxilasa glutámica y liberación de deshidrogenasa láctica al medio, usadas como parámetro de supervivencia neuronal en el primer caso, y celular en el segundo, no mostraron diferencias entre las condiciones con y sin RR. La disminución en la actividad de la GAD y el aumento en la liberación de lactato deshidrogenasa ocasionados por el Rojo de Rutenio no fue muy grande, lo que nos permite decir que las neuronas en las rebanadas fueron poco dañadas, o bien que sólo algunas células en específico fueron las que sufrieron alteraciones; estas células, de acuerdo con la histología, fueron pocas y se encontraban en zonas superficiales. Como se mencionó en resultados, una incubación con RR 100 μM durante 1 hora, no permitió observar una mayor liberación de LDH al medio en el que fueron incubadas las rebanadas. Cabe mencionar que estos datos no se contraponen a los encontrados por Wieraszko en 1986, puesto que las concentraciones (0.71 mM) y tiempos (3 h) usados por él para observar un deterioro en la transmisión sináptica, son mayores que los probados por nosotros.

B. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS.

En lo referente al cultivo de neuronas, llama poderosamente la atención el

hecho que en el medio Eagle, en las incubaciones por 8 y 24 horas, el RR a concentración de 20 μM produzca una mayor liberación de LDH que 100 μM ; en estos experimentos es claro que el solo cambio de medio ocasionó una liberación importante de LDH. La observación de una mayor salida de la deshidrogenasa láctica podría ser explicada especulando que el RR potencia la toxicidad del MC a 20 pero no a 100 μM . El mecanismo probable queda por ser dilucidado.

Los datos en la liberación de deshidrogenasa láctica demuestran que esta metodología permite establecer una relación entre el aspecto morfológico y el bioquímico incubando neuronas corticales 8 h o astrocitos 24 h con Rojo de Rutenio; no ocurre lo mismo al mantener células corticales 24 h en medio Locke, sobre todo porque la salida de LDH al medio en las cajas control aumenta considerablemente. La diferencia observada entre los dos medio utilizados podría deberse a que el MC contiene muchos más componentes de origen proteico, puesto que tanto la concentración de iones, como la osmolaridad es parecida en ambos medios.

Por otra parte, tanto para las neuronas como para las células gliales, la reducción del bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio permitió evaluar metabólicamente, de manera correspondiente con las observaciones al microscopio, a las células en los tiempos de exposición al Rojo de Rutenio en este estudio. Es de llamar la atención el hecho de que, empleando esta metodología, las neuronas fueron mucho más susceptibles al colorante que las células gliales,

a un punto tal, que se necesitó tres veces más de tiempo (8 contra 24 h) en los astrocitos para tener una disminución de alrededor del 25% en la reducción de MTT, con RR 100 μ M.

C. ANTAGONISMO DE LA NEUROTOXICIDAD POR RR.

Los resultados obtenidos al coincubar dantroleno con Rojo de Rutenio, permiten decir que la salida de calcio desde fuentes internas no es un evento que sea necesario para el desarrollo de la toxicidad por el colorante, puesto que la concentración empleada de dantroleno ha probado ser eficaz al prevenir, aunque sea de manera parcial, la toxicidad por N-metil-D-aspartato (un agonista del receptor al glutamato) (Frandsen y Schousboe, 1992; Lei y cols, 1992) o por glutamato (Frandsen y Schousboe, 1993). En los experimentos de preincubación con dantroleno, parece observarse una potenciación del efecto neurotóxico del RR, lo que podría ser explicado si el dantroleno no solamente bloqueara la salida del calcio desde fuentes internas (retículo sarcoplásmico), sino que impidiera el flujo en ambos sentidos, lo que implicaría que el exceso de calcio en el citoplasma no podría ser recibido por las pozas intracelulares.

El quelante de calcio BAPTA pudo proporcionar cierta protección a las neuronas en este modelo de toxicidad. Dicho antagonismo fue de pequeña magnitud en las concentraciones usadas, pero queda la posibilidad de aumentar la concentración, con el objeto de buscar un mayor antagonismo para la

neurotoxicidad del Rojo de Rutenio.

Respecto a los gangliósidos, es importante destacar el hecho que el GT1b fue capaz de proteger a las neuronas de los efectos del RR, pero el GM1 no. Este dato sugiere que el mayor número de ácidos siálicos en la molécula del GT1b podría ser un factor trascendente en este fenómeno. Otros factores a considerar son los siguientes:

Los gangliósidos han probado ser capaces de inhibir tanto la translocación, como la activación de la proteína cinasa C, siendo el GT1b más eficaz que el GM1 (Vaccarino y cols., 1987). Con la cinasa aislada, el GT1b demostró ser un inhibidor más potente de la PKC que el GM1 (Kreutter y cols., 1987).

En extractos de cerebro de cobayo, se ha reportado una proteína cinasa que es inhibida y otra que es estimulada por gangliósidos. Los polisialogangliósidos resultaron ser más potentes en ambos casos (Kai-Foon J, 1987 y 1988). Estos datos sugieren que estos glucoesfingolípidos participan en la fosforilación de algunas proteínas.

Otro factor a considerar para explicar la acción protectora de los gangliósidos es que éstos impiden la entrada y aumentan la salida del calcio en las neuronas (Guérolod y cols., 1992); además, previenen la muerte celular y la elevación de calcio citoplasmático inducidos por glutámico (Faravon y cols., 1988; De Erasquin y cols., 1990) y por un ionóforo de calcio (Nakamura y cols., 1992).

Referente a las concentraciones en las que el GT1b pudo disminuir la

toxicidad por Rojo de Rutenio en neuronas corticales, parece que desde 10 y hasta 100 μM se tiene el mismo efecto.

D. POSIBLE MECANISMO PARA LA NEUROTOXICIDAD DEL RR.

La elevación del Ca^{2+} intracelular producida por Rojo de Rutenio 100 μM luego de 24 h de incubación en apariencia no es tan grande, aunque un factor a considerar es el hecho que luego de esta exposición, muchas neuronas han muerto, por lo que el incremento podría ser en realidad mayor. Si consideramos que 30% de las neuronas sobreviven luego de 24 h, en el supuesto que tuvieramos el mismo número de neuronas que en las condiciones sin colorante, el aumento en el calcio citoplasmático alcanzaría más o menos niveles de 850 nM. En relación con esta elevación, en un reporte previo se sugiere que el RR podría aumentar la concentración de calcio interno al producir la inhibición de la ATPasa de calcio (Conter y Beck, 1983). A pesar de que el Rojo de Rutenio puede interferir con la fluorescencia a concentraciones mayores o iguales a 20 μM , en nuestro sistema no se observó tal fenómeno, que al parecer es debido más bien al color que a una interacción del RR con el complejo fura 2-calcio. Por otra parte, se ha mencionado que el RR provoca un aumento en la entrada de calcio en el ojo del conejo (Andersson y Le Greves, 1991), principalmente por los canales tipo N; en nuestro modelo los datos apuntan hacia un mecanismo de acción similar.

Otro aspecto que podría participar en la neurotoxicidad del Rojo de

Rutenio, es la interacción del colorante con las proteínas que constituyen los microtúbulos. Debe mencionarse que el colorante impide la polimerización de dímeros de tubulina cuando se halla en cantidades equimolares e incluso provoca la separación de los microtúbulos formados al agregar 3 moles de RR/mol de dímero de tubulina (Deinum y cols., 1981), efecto que no podía ser revertido por la adición de calcio 2.5 mM, sugiriendo que los sitios de unión a Ca^{2+} y al Rojo de Rutenio en los túbulos son distintos. Estos mismos autores demostraron que RR 400 μM inhibe de forma significativa el transporte axonal de leucina tritlada, proceso en el cuál el sistema de microtúbulos se halla involucrado. De acuerdo con lo anterior, el RR podría ocasionar disturbios en el sistema de microtúbulos que llevarían a un deterioro en las neuronas. Como puede observarse en la figura 24, la acción del RR sobre la tubulina es muy clara, aunque no sabemos si el deterioro es ocasionado por una acción directa del colorante sobre las proteínas, o bien sea resultado de la proteólisis activada por calcio.

Con respecto a la calmodulina, Sasaki y cols., en 1992, reportaron que el RR inhibe de manera competitiva la unión de esta proteína a calcio. En ausencia de calcio, encontraron que el Rojo de Rutenio se une a calmodulina en dos sitios, con constantes de disociación de 0.36 y 8.7 μM , y que, de estos sitios, el de alta afinidad no era afectado por la presencia de calcio. De este modo, los autores sugieren que el colorante puede ser un inhibidor de enzimas dependientes de calcio-calmodulina. En nuestro modelo, el RR también podría inhibir la activación

de la calmodulina por calcio, y el GT1b contrarrestar este efecto de algún modo.

E. CONCLUSIONES.

Con los resultados obtenidos y analizados en esta tesis, puede llegarse a las siguientes conclusiones:

El sistema de rebanadas de hipocampo utilizado no es un buen modelo para estudiar el mecanismo del efecto neurotóxico del RR.

En los cultivos celulares primarios, pudo observarse una mayor susceptibilidad de las neuronas, comparada con la de células gliales, a la toxicidad por RR, lo que correlaciona perfectamente con los resultados *in vivo*.

Parece que la elevación de los niveles de calcio es un evento involucrado en la muerte neuronal ocasionada por RR, tanto por la medición directa de los niveles como por la ligera protección proporcionada por el BAPTA. Los datos con dantroleno sugieren que el aumento en el calcio citoplasmático podría deberse a la entrada de este catión desde el medio externo.

Con respecto al antagonismo de la neurotoxicidad por el GT1b, parece que el número de ácidos siálicos en la molécula de gangliósido es un factor importante, puesto que el GM1 no proporcionó ninguna protección. Los factores que podrían influir de manera más importante para la protección por GT1b, son la regulación de la entrada de calcio extracelular, la inhibición en la traslocación de la proteína cinasa C y las posibles fosforilaciones debidas a él.

BIBLIOGRAFIA.

- Andersson S., Le Greves P. (1991) Ruthenium Red and capsaicin induce a neurogenic inflammatory response in the rabbit eye: effects of ω -conotoxin GVIA and tetrodotoxin. *Eur. J. Pharmacol.* 209: 175-183.
- Balázs R., Jørgensen O., Hack N. (1988) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27: 437-451.
- Bergmeyer H., Bernt E., Hess B. (1968) *Methods of enzymatic analysis.* (Bergmeyer H. ed.) Academic Press, N.Y.: 736-741.
- Charuk J., Pirraglia C., Reithmeier R. (1990) Interaction of Ruthenium Red with Ca^{2+} -binding proteins. *Anal. Biochem.* 188: 123-131.
- Choi D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the Nervous System. *Neuron* 1: 623-634.
- Connor J. (1986) Digital imaging of free calcium changes and of spatial gradients in growing processes in single, mammalian central nervous system cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6179-6183.
- Conter V., Beck W. (1983) Impairment by Ruthenium Red of anticancer drug cytotoxicity in CCRF-CEM cells. *Biochem. Pharmacol.* 32: 723-726.
- De Erasquin G., Manev H., Guidotti A., Costa E., Brooker G. (1990) Gangliosides normalize distorted single-cell intracellular free Ca^{2+} dynamics after toxic

- doses of glutamate in cerebellar granule cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8017-8021.
- Deinum J., Wallin M., Kanje M., Lagercrantz C. (1981) The effect of Ruthenium Red on the assembly and disassembly of microtubules and on rapid axonal transport. Biochim. Biophys. Acta 675: 209-213.
- Dichter M. (1978) Rat cortical-neurons in culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology and synapse formation. Brain Res. 149: 279-293.
- Dydbukt J., Thor H., Nicotera P. (1990) Intracellular Ca²⁺ chelators prevent DNA damage and protect hepatoma 1c1c7 cells from quinone-induced cell killing. Free Rad. Res. Comms. 8: 347-354.
- Facci L., Leon A., Skaper S. (1990) Hypoglycemic neurotoxicity in vitro: involvement of excitatory amino acid receptors and attenuation by monosialoganglioside GM1. Neuroscience 37: 709-716.
- Faravon M., Manev H., Alho H., Bertolino M., Ferret B., Guidotti A., Costa E. (1988) Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7351-7355.
- Frandsen A., Schousboe A. (1992) Mobilization of dantrolene-sensitive intracellular calcium pools is involved in the cytotoxicity induced by quisqualate and N-methyl-D-aspartate but not by 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)

- propionate and kainate in cultured cerebral cortical neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2590-2594.
- Frandsen A., Schousboe A. (1993) Excitatory amino acid-mediated cytotoxicity and calcium homeostasis in cultured neurons. J. Neurochem. 60: 1202-1211.
- García-Ugalde G., Tapia R. (1991) Convulsions and wet-dog shakes produced by systemic or intrahippocampal administration of ruthenium red in the rat. Exp. Brain Res. 86: 633-640.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260: 3440-3450.
- Guérold B., Massarelli R., Freysz L., Dreyfus H. (1992) Exogenous gangliosides modulate calcium fluxes in cultured neuronal cells. J. Neurosci. Res. 32: 110-115.
- Kai-Foon J. (1987) Ganglioside-modulated protein phosphorylation. Partial purification and characterization of a ganglioside-stimulated protein kinase in brain. J. Biol. Chem. 262: 5248-5255.
- Kai-Foon J. (1988) Ganglioside-modulated protein phosphorylation. Partial purification and characterization of a ganglioside-inhibited protein kinase in brain. J. Biol. Chem. 263: 568-574.
- Kamino K., Ogawa M., Uyesaka N., Inouye A. (1976) Calcium binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. IV Effects of Ruthenium Red on the co-operative nature of calcium-binding. J. Membr. Biol. 26: 345-356.

- Kreutter D., Kim J., Goldenring J., Rasmussen H., Ukomadu C. DeLorenzo R., Yu R. (1987) Regulation of Protein Kinase C activity by gangliosides. *J. Biol. Chem.* 262: 1633-1637.
- Ledeen R. (1983) Gangliosides. *Handbook of Neurochemistry*. Second edition. Lajtha A. Ed. Plenum Press, New York. pp 41-80.
- Ledeen, R. (1985) Gangliosides of the neuron. *Trends in Neurosciences* 8: 169-174.
- Lei S., Zhang D., Abele A., Lipton S. (1992) Blockade of NMDA receptor-mediated mobilization of intracellular Ca^{2+} prevents neurotoxicity. *Brain Res.* 598: 196-202.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luft J.H. (1971) Ruthenium red and violet I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* 171: 347-368.
- Luthra R., OLson, M. (1977) The inhibition of calcium uptake and release by rat liver mitochondria by Ruthenium Red. *FEBS Letters* 81: 142-146
- Madeira V., Antunes-Madeira M. (1974) Interaction of Ruthenium Red with isolated sarcolemma. *J. Membr. Biol.* 17: 41-50.
- Malgaroli A., Milani D., Meldolesi J., Pozzan T. (1987) Fura-2 measurement of cytosolic free Ca^{2+} in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J. Cell Biol.* 105: 2145-2155.

- Manev H., Faravon M., Vicini S., Guidotti A., Costa E. (1990) Glutamate-induced neuronal death in primary cultures of cerebellar granule cells: protection by synthetic derivatives of endogenous sphingolipids. *J. Pharm. Exp. Ther.* 252: 419-427.
- Manthorpe M., Fagnani R., Skaper S., Varon S. (1986) An automated colorimetric microassay for neuronotrophic factors. *Dev. Brain Res.* 25: 191-198.
- Marrion N., Adams P. (1992) Release of intracellular calcium and modulation of membrane currents by caffeine in bull-frog sympathetic neurones. *J. Physiol.* 445: 515-535.
- Meza-Ruiz G., Tapia R. (1978) [³H] GABA release in synaptosomal fractions after intracranial administration of ruthenium red. *Brain Res.* 154: 163-166.
- Milani D., Guidolin D., Facci L., Buso M., Leon A., Skaper S. (1991) Excitatory amino acid-induced alterations of cytoplasmic free Ca²⁺ in individual cerebellar granule neurons: role in neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 28: 434-441.
- Moore C. L. (1971) Specific inhibition of mitochondrial Ca²⁺ transport by Ruthenium Red. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 298-305.
- Morán J., Patel A. (1989) Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev. Brain Res.* 46: 97-105.
- Mossman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:

- application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Nakamura K., Wu G., Ledeen R. (1992) Protection of Neuro-2a cells against calcium ionophore cytotoxicity by gangliosides. *J. Neurosci. Res.* 31: 245-253.
- Nicotera P., Thor H., Orrenius S. (1989) Cytosolic-free Ca^{2+} and cell killing in hepatoma 1c1c7 cells exposed to chemical anoxia. *FASEB J.* 3: 59-64.
- Oppenheim R., Schwartz L., Shatz C. (1992) Neuronal death, a tradition of dying. *J. Neurobiol.* 23: 1111-1115.
- Palade P. (1987) Drug-induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 262: 6135-6141.
- Patel A., Hunt A. (1985) Observations on cell growth and regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in primary cultures of forebrain and cerebellar astrocytes. *Dev. Brain Res.* 18: 175-184.
- Person R., Kuhn J. (1979) Depression of spontaneous and ionophore-induced transmitter release by Ruthenium Red at the neuromuscular junction. *Brain Res. Bull.* 4: 669-674.
- Rahamimoff R., Alnaes E. (1973) Inhibitory action of ruthenium red on neuromuscular transmission. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 3613-3616.
- Sasaki T., Naka M., Nakamura F., Tanaka T. (1992) Ruthenium Red inhibits the binding of calcium to calmodulin required for enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 267: 21518-21523.

- Scharfman H., Schwartzkroin P. (1989) Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation. *Science* 246: 257-260.
- Slater T.F., Sawyer B., Str auli U. (1963) Studies on succinate- t e t r a z o l i u m reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta* 77: 383-393.
- Svennerholm L. (1963) Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.* 10: 613-623.
- Szubinska B., Luft J. (1971) Ruthenium Red and Violet: III. Fine structure of the plasma membrane and extraneous coats in amoebae (*A. proteus* and *Chaos chaos*) *Anat. Rec.* 171: 417-442.
- Tapia R. (1982) Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in the mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum. *Neurosci. Lett.* 30: 73-77.
- Tapia R., Arias C., Morales E. (1985) Binding of lanthanum ions and Ruthenium Red to synaptosomes and its effects on neurotransmitter release. *J. Neurochem.* 45: 1464-1460.
- Tapia R., Flores-Hern andez J. (1990) Circling behavior induced by intranigral administration of Ruthenium Red and 4-aminopyridine in the rat. *Neuroscience* 39: 657-663.
- Tapia R., Meza-Ruiz G., Drucker-Col n R. (1976) Convulsions or flaccid paralysis induced by Ruthenium Red depending on route of administration. *Brain*

Res. 116: 101-109.

Tapia R., Salazar P. (1991) Glutamate decarboxylase activity in the substantia nigra and the hippocampus of rats microinjected with inhibitors of the enzyme. *Neurochem. Res.* 16: 263-267.

Thayer S. y Miller R. (1990) Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones *in vitro*. *J. Physiol.* 425: 85-115.

Toffano G., Benvegnù D., Bonetti A., Facci L., Leon A., Orlando P., Ghidoni R., Tettamanti G. (1980) Interactions of GM1 ganglioside with crude rat brain neuronal membranes. *J. Neurochem.* 35: 861-866.

Vaccarino F., Guidotti A., Costa E. (1987) Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8707-8711.

Van Winkle W. (1976) Calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: site of action of dantrolene sodium. *Science* 196: 1130-1131.

Vasington F., Gazzotti P., Tiozzo R., Carafoli E. (1972) The effect of Ruthenium Red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 256: 43-54.

Ward A., Chaffman M., Sorkin E. (1986) Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and update

of its use in spasticity. *Drugs* 32: 130-168.

Wieraszko A. (1986) Evidence that Ruthenium Red disturbs the synaptic transmission in the rat hippocampal slices through interacting with sialic acid residues. *Brain Res.* 378: 120-126.