

129  
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

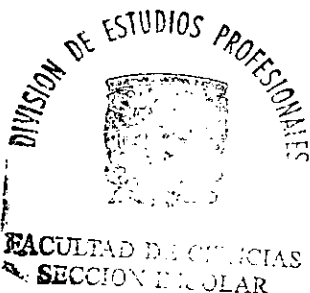
METABOLISMO DE AMINOACIDOS  
NEUROTRANSMISORES *in vivo* EN EL CUERPO  
ESTRIADO Y EL HIPOCAMPO DE LA RATA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :  
ELIA SOLEDAD PEREZ NERI



DIRECTOR: DR. RICARDO TAPIA IBARGUENGOYTIA.

1998



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

268032



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
Metabolismo de aminoácidos neurotransmisores **in vivo** en el cuerpo estriado y  
el hipocampo de la rata.

realizado por Elia Soledad Pérez Neri

con número de cuenta 9150618-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoytia	<i>R. Tapia</i>
Propietario		
Propietario	Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Alvarez	<i>Clorinda</i>
Propietario	Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez	<i>Martha</i>
Suplente	Dr. Luis Felipe Jiménez García	<i>Luis</i>
Suplente	Biól. David Garcíaadiego Cázares	<i>David</i>

Consejo Departamental de Biología

*Edna María Suárez Díaz*

Dra. Edna María Suárez Díaz

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	III
<b>DEDICATORIA</b> .....	IV
<b>RESUMEN</b> .....	VI
<b>EL CEREBRO</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. Generalidades.....	5
2. Sinapsis.....	7
3. Neurotransmisores.....	10
4. Biosíntesis, degradación y liberación de glutamato y GABA en el SNC de mamíferos.....	12
<b>ANTECEDENTES</b>	
Compartimentalización del metabolismo de glutamato, glutamina y GABA.....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	30
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	31
<b>RESULTADOS</b>	
I. Recuperación de radiactividad.....	37
II. Microdiálisis.....	39
III. Radiactividad en los productos formados en el tejido a partir de la administración de <sup>U-14</sup> C-glutamina	
III.I. Radiactividad total.....	40
III.II. Radiactividad en los aminoácidos	
III.II.I. Glutamina.....	42

III.II.II. Glutamato.....	43
III.II.III. GABA.....	47
IV. Radiactividad en los productos formados en el tejido a partir de la administración de <sup>U-14</sup> C glutamato	
IV.I. Radiactividad total.....	47
IV.II. Radiactividad en los aminoácidos	
IV.II.I. Glutamina.....	50
IV.II.II. Glutamato.....	53
IV.II.III. GABA.....	54
V. Radiactividad en los productos formados en el tejido a partir de la administración de <sup>U-14</sup> C-glucosa	
V.I. Radiactividad total.....	55
V.II. Radiactividad en los aminoácidos	
V.II.I. Glutamina.....	58
V.II.II. Glutamato.....	59
V.II.III. GABA.....	59
DISCUSION.....	61
CONCLUSIONES.....	67
REFERENCIAS.....	69


## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Ricardo Tapia por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio y bajo su dirección.
  
- A mis compañeros de laboratorio; Lourdes, Clorinda, Pati, Iván, Eva, Isabel, Rayo, Nati, Francisco, Miguel, Octavio, Fernando y Marina.
  
- A los compañeros del bioterio; Dra. Claudia Rivera, Sara, Alejandra, Salvador y Pedro.
  
- Al Instituto de Fisiología Celular.
  
- A la Facultad de Ciencias.
  
- A la Universidad Nacional Autónoma de México.
  
- A Fundación UNAM.
  
- Al Sistema Nacional de Investigadores.

## DEDICATORIA

A la energía que hace latir deprisa mi corazón.

A mis amados padres, Gloria y Pedro en quienes me veo reflejada.

A mis amigas Ursula y Aline; tenerlas como hermanas es lo mejor que me ha pasado en la vida...las amo.  "sisters forever".

A mis queridos hermanos Omar, Jonathan e Iván,  
siempre y en todo lugar, los amo.

A Alvaro; recién encontrado y siempre esperado...amor.

A mis amigas de toda la vida; Dolores: por los viajes y las aventuras, Jaina: por tu risa y tu comprensión, Gaby: por tu apoyo y tus consejos, Mari: por las fiestas en tu casa, por tu apoyo, Clara: por tus prisas y tus regaños, Lilia: por toda tu ayuda y compañerismo, Angélica: por tu tenacidad, Alejandra: por los buenos momentos. A todas por tantos y tan buenos años de amistad.

A Bere, por adoptarnos desde el principio y para siempre, por tu amistad.

A David, por tu amistad desinteresada.

A Clau, mi amiga...mi otra hermana.

A Juan Carlos...siempre mucho.

A Ale Mata donde quiera que estés.

A María Elena, los buenos amigos no se olvidan.

A Eugenio Delgadillo y Gilberto Sodi.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias; Rosa Zugazagoitia, Rosario Arellano, Zenón Cano, Ricardo León, Mari Villagrán, Genobeba González, Leonor Peralta.

A mis alumnos y ex alumnos de la Facultad de Ciencias.

A mis compañeros de generación; Ale Serrato, Tony, Emilio, Rogelio, Rafa, Robertito, Camilo, René.

A Rebe, Miguel, José y Ricardo.

A Guadalupe, ya sé que es tu trabajo pero...gracias.

A Clorinda por cada consejo regalado y cada libro compartido.

A Sonia por tu amistad incondicional.

A Tona, Inti, Susana y Norma, por acogerme afectuosamente. En especial a Norma; te fuiste antes de que pudiera mostrarte lo bella que es Ciudad Universitaria, estabas a punto de titularte, no necesitarás de credenciales ni títulos a donde te has ido. Ningún título, ningún diploma, ningún reconocimiento hemos de llevarnos cuando sigamos tu camino, sólo nos queda buscar a nuestra manera la forma de ser felices.

A Silvio, Joan, Fernando, Pablo, Oscar, Violeta, José, Marcela, Isabel, Ángeles, Mario, Pablo, Elena, Maruja, Miguel E., Jaime, Edgar, Federico N., Guillermo, Claudio, Vicente, Frida, Remedios, Enrique, Hans, Juana, Miguel Angel, Alberto, Oscar W., Carlos D., Alejandro, Jorge Luis, Juan Carlos, Julio C., Juan Pablo, Ramón, Aline, Juan W., Alejo, Rosa, Simona, Emilia, Pablo P., Antonio S., Lud., Amado M., Julio V., Gabriel, Eduardo, Pascal, Gaby, Daniel, Nicolás, Carlos F., Jorge, Guadalupe, Conrad, Carlos B., Miguel C., Antonio B., León, Rubén, Camilo, Roberto, Rabindranath, Federico C., Elías, Dante, Pedro, Manuel, José María, Salvador, Amado, María Enriqueta, Diego, Oliverio...por hacer latir deprisa mi corazón.



## RESUMEN

La compartimentalización metabólica se refiere a la presencia en un tejido de pozas química y funcionalmente diferentes de un sustrato dado (Clarke, 1983). La principal indicación de este evento es la presencia de una radiactividad específica mayor en un producto metabólico que en su precursor marcado radiactivamente administrado de forma exógena (Tapia, 1980; Peng, 1993).

Se ha sugerido que existen al menos dos pozas de glutamato en el tejido nervioso; una chica localizada en las células gliales en donde el glutamato es rápidamente metabolizado a glutamina antes de mezclarse con la poza total o grande de glutamato localizada en las terminales sinápticas (Tapia, 1980). El GABA se sintetiza en las terminales nerviosas las cuales contienen GAD, la enzima que forma GABA a partir de glutamato, en forma abundante.

Se sabe que la enzima que forma glutamina a partir de glutamato la glutamina sintetasa (GD), se localiza predominantemente en las células gliales, mientras que la glutaminasa que convierte a la glutamina en glutamato, se encuentra en grandes cantidades en las terminales neuronales. Esto sugiere que existe un ciclo metabólico glutamato-glutamina mediante el cual se asegura que siempre exista el glutamato necesario para ser liberado ante un estímulo (en la poza grande o transmisora), pero sin alcanzar concentraciones que provoquen sobreexcitabilidad neuronal, de manera que la poza chica o metabólica actúa equilibrando la concentración de glutamato al transformarlo en

glutamina que a su vez se encuentra disponible para formar nuevo glutamato en cualquier momento.

El glutamato se forma también a partir de la glucosa por la acción de transaminasas.

Este trabajo pretende aportar más información sobre el papel del glutamato, la glutamina y la glucosa en la función nerviosa, específicamente relacionados con su papel como precursores metabólicos de glutamato.

Se realizaron inyecciones agudas de cada precursor marcados radiactivamente, en el ventrículo lateral cerebral de ratas Wistar macho adultas. Se empleó la técnica de microdiálisis, el dialisado obtenido y homogenados de hipocampo y cuerpo estriado fueron analizados por HPLC y se cuantificó la radiactividad en los aminoácidos contenidos.

Los resultados muestran que la glucosa es el principal precursor del GABA neuronal y no así el glutamato y la glutamina cuando se administran intracerebralmente. Sin embargo, cuando se administra glutamato, éste se metaboliza a glutamina en preferencia a formar GABA. Estos hechos podrían ser de gran importancia durante eventos patológicos como la isquemia en donde la liberación basal de GABA podría verse comprometida.

Yo tengo ira, miedo, piedad, alegría,  
tristeza, codicia, largueza, furia, mansedumbre  
y todos los buenos y malos afectos  
y loables y reprehensibles ejercicios  
que se pueden encontrar en todos los hombres  
juntos o separados.

Yo he probado todos los vicios  
y todas las virtudes  
y en un mismo día me siento  
con inclinación a llorar y a reír,  
a dar y a retener,  
a holgar y a padecer,  
y siempre ignoro la causa  
y el impulso destas contrariedades.

A ésta alternativa de movimientos contrarios,  
he oído llamar locura;  
y si lo es, todos somos locos,  
grado más o menos,  
porque en todos he advertido  
ésta impensada y repetida alteración.

Jorres Villaruel  
Vida e Historia.

*"... dime dónde nace la fantasía:  
en el corazón o en la cabeza..."  
Shakespeare.*

## EL CEREBRO

El cerebro humano es la estructura más compleja en el universo. Sus extraordinarias propiedades han hecho posible que el *Homo sapiens* realice profundas transformaciones en su entorno, domine la Tierra, altere el curso de la evolución con la ingeniería genética, camine sobre la luna y sea capaz de crear y ejecutar artes como la música, la pintura, la danza, la literatura, etc. y, como en palabras del Dr. Tapia, "de saber cómo el cerebro puede saber; de investigar cómo el hombre puede investigar; de descubrir cómo la mente puede descubrir..." (Tapia, 1987), funciones que le han sido vitales durante siglos.

Sin cerebro no tendríamos conciencia y, por lo tanto, no sabríamos nada de nosotros mismos, ni tendríamos contacto con nuestro entorno. Es por esta razón que a lo largo de la historia de la humanidad ha existido la necesidad de comprender el funcionamiento del cerebro. Debido a la dedicación de muchos científicos, podemos afortunadamente entender ahora parte de su realidad, aunque estamos aún muy lejos de conocer los límites de la mente y lo que esta puede lograr.

En la búsqueda del "albergue del alma", en la Antigua Grecia, Aristóteles (Hicks, 1907) y Platón (Cornford, 1952) propusieron al corazón y a la cabeza como los dos sitios principales de competencia, respectivamente; Aristóteles reconoce en su

tratado *Las partes de los animales*, que el hombre es el animal que posee el cerebro de mayor tamaño en proporción al cuerpo, y que su función es la preservación del cuerpo entero sin embargo, pensaba que esta importante función era llevada a cabo por el cerebro "sólo porque éste órgano es capaz de compensar un exceso de calor del corazón, verdadero asiento del alma y de los sentidos", de tal manera que el cerebro funcionaría como contrapeso del corazón moderando su actividad. Platón, en cambio, propuso un alma racional localizada en la cabeza como fuente de todas nuestras funciones mentales.

Descartes por su parte, insistía en que las funciones del cerebro deben ser consideradas "como en toda máquina, siguiendo la disposición de sus partes individuales, como lo hacen ni más ni menos, los movimientos de un reloj". Según Descartes, las respuestas estereotipadas podían ser explicadas en términos mecánicos y recibieron el nombre de reflejos por la descripción que él hizo de la reflexión de los espíritus (Fearing, 1929).

Hipócrates, uno de los grandes hombres que contribuyó a escribir la historia de la medicina, con su sabiduría llena de emoción, expresaba hace 24 siglos que es en el cerebro "...donde se originan las alegrías, los placeres y las risas, así como las tristezas, las penas, el dolor y las lágrimas. Es con el cerebro que adquirimos sabiduría y conocimiento, vemos y oímos, y sabemos qué es correcto o incorrecto, dulce o insípido... Y por ese mismo órgano podemos sufrir locura o delirio, y nos asaltan miedos y terrores de día y de noche..." (Tapia, 1987). Esto es cierto ya que el mundo

del hombre es de día y de noche, porque construimos lo claro y lo oscuro, creamos y destruimos, amamos y odiamos, y todo esto al mismo tiempo.

Sólo a través del cerebro mantenemos contacto con nuestro entorno y con nosotros mismos; es sin duda alguna, un órgano privilegiado de extraordinaria eficacia.

La función cerebral es un factor determinante en la diferenciación y evolución de la especie humana. Hoy en día, sabemos que toda conducta es reflejo de la función cerebral. De acuerdo con lo anterior, la mente representa un número ilimitado de funciones llevadas a cabo por el cerebro. Entender las bases metabólicas de la mente, cómo percibimos, cómo actuamos, aprendemos, recordamos, amamos, decidimos, es hoy por hoy motivo de ardua investigación en el mundo entero.

Sabemos que las neuronas son células que juegan un papel primordial dentro de la función cerebral y que se distinguen de otras células del cuerpo por ciertas propiedades moleculares. Muchas de esas propiedades características son responsables de la actividad de señalización de las neuronas. Sabemos también que el cerebro humano está formado por 10 trillones de neuronas además de las células gliales. Existen por lo menos  $10^{14}$  sinapsis (punto de contacto entre dos neuronas), y el posible número de combinaciones de conexiones sinápticas en un solo cerebro humano es más grande que el número total de partículas atómicas que existen en el universo conocido.

Pero, ¿cuál es la base bioquímica de la transmisión sináptica?, ¿en qué grado

puede explicarse la función neuronal en términos de moléculas específicas?, ¿cómo combina el cerebro estas unidades para controlar la conducta y cómo el funcionamiento de las células constituyentes en el cerebro individual es influenciado por la conducta de otra persona, así como por factores diversos?.

La función del cerebro incluye no sólo conductas relativamente simples como caminar y sonreír, sino también como ya se ha mencionado, de elaborar funciones complejas como sentir, pensar, aprender, escribir poemas o hacer guerras. Los desórdenes de emoción y pensamiento que caracterizan enfermedades neurológicas o psicóticas deben, por tanto, ser resultado de disturbios del cerebro.

*Hasta aquí fue guiada la mente  
por culpa tuya, mi Lesbia,  
y tanto por su empleo  
se aniquiló ella misma,  
que ya ni estimarte podría,  
aunque te hicieras la óptima,  
ni desistir de amar  
aunque lo hicieras todo.  
Catulo.*

## INTRODUCCIÓN

### 1. Generalidades

Todas las células presentan dos propiedades que les son fundamentales para llevar a cabo sus funciones de manera eficiente: la irritabilidad, que les permite reaccionar ante los cambios de los medios interno y externo, y la conductividad, que es la capacidad que tienen las células para transmitir esas señales en forma de mensajes químicos o eléctricos. Estas dos propiedades se encuentran especialmente representadas en las células que constituyen el sistema nervioso ya que mediante sus prolongaciones hacia todos los demás órganos, se comunica con ellos y regula su actividad de manera directa. Así mismo, recibe información del medio externo mediante el sistema nervioso somático (nervios sensitivos, órganos de los sentidos, músculos esqueléticos).

El tejido nervioso está constituido por un conjunto de células de gran heterogeneidad tanto morfológica como funcional cuyo tipo celular principal son las neuronas, las cuales se encargan principalmente de la comunicación, es decir, de recibir, procesar y transmitir todo tipo de información generada por los estímulos tanto internos como externos, de organizar y coordinar el funcionamiento de todo el organismo; funciones motoras, viscerales, endócrinas y mentales. Estas células poseen distintas porciones bien definidas, cada una de las cuales cumple funciones específicas dentro de la función neuronal global, y a diferencia de los demás tejidos, no se encuentran adosadas unas con otras sino que forman una red mediante sus



proyecciones en la cual mantienen intensa comunicación intercelular.

Además de las neuronas, se encuentra presente en el sistema nervioso un grupo importante de células de varios tipos, conocido de manera general como células de la glía o neuroglía conformada por astrocitos, oligodendrocitos, microglía. Éstas llevan a cabo funciones de nutrición, metabolismo, sostén y defensa del tejido nervioso.

Otros tipos celulares que forman parte del tejido nervioso son las células endodiales que recubren las cavidades del sistema nervioso central (ventrículos cerebrales y canal del epéndimo), forman los plexos coroides cuya función principal es la formación de líquido cefalorraquídeo; las células de Schwann que forman la mielina de los axones de las neuronas del sistema nervioso periférico; las células satélites o anficitos que rodean a las neuronas pseudomonopolares de los ganglios espinales, simpáticos y parasimpáticos formando una corona, y que cumplen funciones tróficas; los nervios propiamente dichos del sistema nervioso periférico y los vasos sanguíneos cuyo endotelio pierde las fenestraciones típicas ya que sus células están estrechamente unidas, además de encontrarse totalmente envueltos por las expansiones de las prolongaciones de los astrocitos formando el llamado pie perivascular, lo que impide el contacto directo entre las neuronas y los capilares. Todo esto dificulta el paso de ciertas sustancias de la sangre al tejido nervioso, debido a una menor permeabilidad de los capilares. Esta estructura constituye parte fundamental de la barrera hematoencefálica.

## 2.Sinapsis

Las neuronas están constituidas por un cuerpo o soma celular que varía mucho en forma y tamaño y del cual se extienden dos tipos de prolongaciones que cumplen distintas funciones: las dendritas que se ramifican formando el llamado árbol dendrítico, reciben el impulso nervioso proveniente de otras neuronas, y el axón que es una sola prolongación y que tiene ramificaciones a distancia considerable de él envía el impulso hacia otras neuronas o hacia un efector final. La porción terminal del axón es un ensanchamiento a manera de botón que posee en su interior un gran número de vesículas sinápticas, las cuales a su vez contienen neurotransmisores. La membrana del botón sináptico tiene un engrosamiento característico en un sitio específico el cual, en proximidad con un sitio análogo de la membrana de una dendrita o soma o axón de otra neurona, constituye la sinapsis. Éste término fue introducido por Charles Sherrington quien lo definió como la unidad anatómico-fisiológica de la comunicación interneuronal. Este punto donde se transmite información de una neurona a otra fue descrito por primera vez por Santiago Ramón y Cajal, quien sugirió que en la transmisión de los mensajes se debería considerar un espacio interneuronal, posteriormente llamado hendidura sináptica (Pasantes et al., 1991).

La primer evidencia sólida de la neurotransmisión química, es decir, por medio de neurotransmisores, se obtuvo mediante los experimentos de Otto Loewi en 1921 que permitieron establecer definitivamente la participación de una sustancia química específica en el mecanismo de la comunicación nerviosa. Loewi demostró que la estimulación del nervio vago de un corazón de rana perfundido desencadenaba una

respuesta igual en otro corazón, separado del primero pero inmerso en el mismo líquido, lo cual sugería que el nervio vago había liberado una sustancia al perfusado. Se determinó la naturaleza química de este compuesto liberado como consecuencia de la estimulación nerviosa y se identificó como acetilcolina (Nicholls et al., 1992).

Bajo las mismas bases, Loewi identificó a la adrenalina como el mediador químico en los nervios simpáticos, y Dale a la acetilcolina como el neurotransmisor de la unión neuromuscular (Dale, 1953).

Los trabajos de Katz, Kuffler y otros proporcionaron los fundamentos para el conocimiento de los mecanismos básicos de la transmisión sináptica mediada por compuestos químicos (Pasantes et al., 1991).

La transmisión química se lleva a cabo a partir de un estímulo que provoca la despolarización de la terminal presináptica, lo que determina la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje permitiendo la entrada de este ion a la terminal presináptica, aumentando así su concentración intracelular y desencadenando la salida del neurotransmisor. Este último difunde a través del espacio sináptico y alcanza un receptor específico en la célula postsináptica. La interacción transmisor-receptor induce un cambio en la permeabilidad iónica, ya sea por efecto directo (en el caso de receptores ionotrópicos), o por medio de una serie de reacciones metabólicas (en el caso de receptores metabotrópicos). El cambio en la conductancia membranal genera un potencial postsináptico. Una vez llevada a cabo la transmisión de la señal, el neurotransmisor es eliminado de la hendidura sináptica mediante proteínas acarreadoras o por destrucción enzimática, y las concentraciones de calcio en la

presinapsis son restituidas a sus niveles de reposo, mediante la acción de organelos y moléculas secuestradoras (Pasantes et al., 1991).

Otro mecanismo de comunicación interneuronal es la transmisión eléctrica, observada por primera vez en 1959 por Furshpan y Potter mediante el registro de fibras nerviosas con microelectrodos intracelulares. La transmisión eléctrica no es un proceso exclusivo de las células nerviosas sino que también se presenta en otras células del cuerpo como las células del corazón. Sin embargo, en el cerebro es menos común que la transmisión química. La transmisión de la señal eléctrica se lleva a cabo mediante un flujo de corrientes iónicas de una neurona a la otra.

La propiedad funcional más importante de estas sinapsis es que el impulso nervioso es transmitido a la neurona postsináptica prácticamente como si continuara el potencial de acción. Esto implica que no hay retardo en este tipo de transmisión sináptica.

La transición entre la transmisión eléctrica y la transmisión química está probablemente ligada a los principios generales de desarrollo, diferenciación y especialización del sistema nervioso.

En estudios comparativos se ha observado un decremento en la frecuencia de las sinapsis eléctricas a medida que se avanza en la evolución. Así mismo, en los vertebrados, el número de sinapsis eléctricas disminuye a medida que avanza el desarrollo embrionario.

Recientemente se ha propuesto un papel muy importante de las sinapsis eléctricas en la actividad neuronal, debido a que las uniones gap, las cuales constituyen el punto de comunicación en este tipo de sinapsis, pueden contribuir sustancialmente a la sincronización de descargas epileptiformes inducidas en medios libres de calcio *in vitro* (Pérez-Velázquez et al., 1994). Además se han realizado estudios que demuestran que la actividad epileptiforme podría inducir la síntesis de nuevas proteínas para la formación de uniones gap en el CA1 del hipocampo (Jefferys and Haas, 1982; Haas and Jefferys, 1984; Taylor and Dudek, 1982). Se ha observado también que la conexina 43, la principal proteína de las uniones gap de astrocitos se eleva en muestras de neocorteza en focos epilépticos (Naus et al., 1991).

La transmisión química puede amplificar la señal neuronal para alterar el potencial de la célula postsináptica, lo cual resulta de gran importancia en procesos superiores del cerebro como la memoria (Pasantés et al., 1991).

La existencia de sinapsis químicas representa muchas ventajas sobre las sinapsis eléctricas en términos de funcionalidad, como es el hecho de que la terminal presináptica se encuentre claramente definida por la presencia de un neurotransmisor, que debe ser liberado para ejercer un efecto sobre la neurona postsináptica, lo cual determina la unidireccionalidad de la transmisión sináptica. Además, las sinapsis químicas pueden ser inhibitorias simplemente por el hecho de que el transmisor produzca la apertura de canales apropiados (a aniones) al ser reconocido por su receptor postsináptico. La posibilidad de modular la síntesis del transmisor, su

liberación, el número de los receptores postsinápticos, o su afinidad por el transmisor, constituye otra ventaja fundamental en la regulación de la transmisión química en comparación con la rigidez funcional de la transmisión eléctrica (Pasantes et al., 1991).

### 3. Neurotransmisores

Un neurotransmisor puede definirse como una sustancia que es liberada en una sinapsis por una neurona y que afecta otra célula de manera específica, además de reunir los siguientes criterios:

1. Que sea sintetizado en la neurona.
2. Que esté presente en la terminal presináptica y sea liberado en cantidades suficientes para ejercer su supuesta acción en una neurona postsináptica o en un órgano efector.
3. Que cuando se aplique exógenamente (como una droga), en concentraciones razonables, mimetice exactamente la acción del transmisor endógenamente liberado.
4. Que exista un mecanismo específico para removerlo de la hendidura sináptica (Kandel et al., 1991).

De acuerdo con su estructura química, los compuestos identificados hasta la fecha con acción de neurotransmisores pueden considerarse dentro de tres grupos principales: los aminoácidos, las aminas biogénicas y los péptidos, además de la acetilcolina, el primero en ser identificado y el mejor conocido de todos los neurotransmisores.

Los aminoácidos neuroactivos, es decir, aquellos que modifican la actividad de las neuronas, tienen dos tipos de acciones: excitadoras o inhibitoras. Los primeros son por su estructura, aminoácidos ácidos como el ácido glutámico, el ácido aspártico, el ácido cisteico, el ácido cisteínsulfínico; mientras que los segundos corresponden por su estructura a aminoácidos neutros como la glicina, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la taurina. De hecho, la descarboxilación de los aminoácidos excitadores da origen a los aminoácidos con actividad inhibitora; así, la descarboxilación del ácido glutámico origina el GABA mientras que la del ácido aspártico origina la  $\beta$ -alanina (Pasantes et al. 1991).

El transporte de aminoácidos circulantes en el cerebro es de gran importancia en la función cerebral, ya que muchas vías metabólicas de aminoácidos cerebrales están influenciadas por su disponibilidad de precursor (Shank y Aprison, 1977).

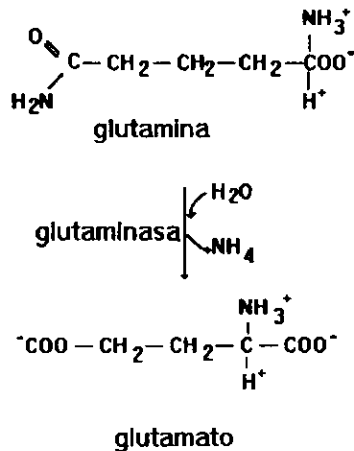
#### 4. Biosíntesis, degradación y liberación de glutamato y GABA en el SNC de mamíferos

##### a) Glutamato

El metabolismo del glutamato en el SNC ha sido motivo de ardua investigación. Muchos estudios se han centrado en el papel del glutamato en el metabolismo del nitrógeno, como los de van den Berg en 1970 y los de Weil-Malherbe en 1950; en el metabolismo energético como los de Berl y Clarke en 1969; en su papel como precursor de GABA y de otros intermediarios del ciclo de Krebs estudiada entre otros por Baxter en 1970; y su compartimentalización metabólica, estudiada también por Berl

y Clarke en 1969 y Tapia en 1980. Además, el glutamato es incorporado a proteínas y péptidos, contribuye al balance osmótico y es constituyente importante del glutatión y del ácido fólico (McGeer et al., 1979).

El glutamato se forma por transaminaciones del  $\alpha$ -cetoglutarato, y también por desamidación a partir de la glutamina presente en la terminal presináptica bajo la acción de la glutaminasa (fig. 1).



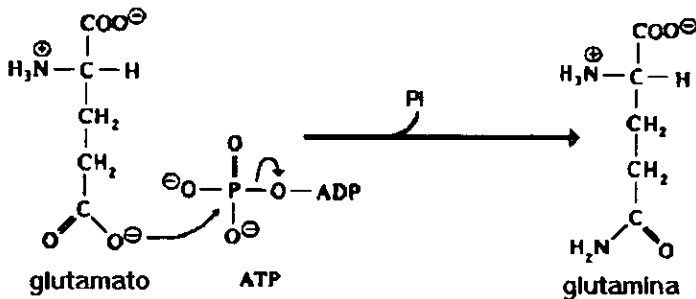
**Figura 1. Conversión de glutamina a glutamato.**

En las sinapsis glutamatérgicas, el glutamato se encuentra disponible para ser liberado, mientras que en sinapsis GABAérgicas puede ser descarboxilado a GABA que a su vez se encuentra disponible para ser liberado bajo un estímulo.

Una vez liberado al espacio sináptico, el neurotransmisor es reconocido por



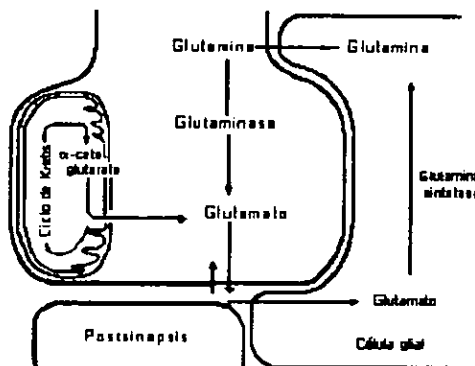
proteínas receptoras en la membrana postsináptica, ejerce su acción neurotransmisora y el resto de glutamato es recapturado por la propia terminal sináptica o por las células gliales, donde es convertido a glutamina por medio de la enzima glutamina sintetasa (fig.2), que cataliza la incorporación del grupo amino al glutamato (Shank y Baxter, 1975).



**Figura 2. Conversión de glutamato a glutamina.**

Esta glutamina se libera al espacio extracelular y es entonces tomada por las terminales nerviosas en donde nuevamente es convertida a glutamato mediante la acción de la glutaminasa; existe evidencia de que pueden existir en las mitocondrias dos tipos de glutaminasa con diferentes propiedades reguladoras, una de ellas localizada en la matriz interna generando el glutamato útil para la producción de energía, y un segundo tipo en la matriz mitocondrial externa que podría proporcionar el glutamato que cumple funciones como neurotransmisor (Bradford, et al., 1983) recuperando así el glutamato de la poza transmisora. Este modelo sugiere que existe un ciclo metabólico entre las neuronas glutamatérgicas y las células gliales constituido

por un flujo de glutamato de las neuronas a la glía, mismo que es compensado por un flujo de glutamina en sentido opuesto (fig.3).



**Figura 3. Compartimentos metabólicos del glutamato en sinapsis y células gliales.**

Este mecanismo de síntesis y degradación también sirve para asegurar que las concentraciones de glutamato en el espacio extracelular se mantengan por debajo de  $\approx 3 \mu\text{M}$  (Yudkoff et al., 1993), es decir, que no alcancen niveles que provoquen la sobreexcitación neuronal, esto se logra mediante sistemas de recaptura de alta afinidad dependientes de sodio en las terminales nerviosas y en la glía, lo cual maximiza la señal provocada por la liberación de glutamato sobre la concentración basal extracelular.

El ácido glutámico se sintetiza también a partir de la glucosa, con una velocidad de recambio similar a la de los intermediarios del ciclo de Krebs, que son sus

precursores directos. El grupo  $\alpha$ -amino de muchos aminoácidos es transferido a  $\alpha$ -cetoglutarato para formar glutamato. Esta transferencia de grupos amino es catalizada por enzimas que llevan el nombre de aminotransferasas o transaminasas. La aspartatoaminotransferasa cataliza la transferencia de un grupo amino de aspartato a  $\alpha$ -cetoglutarato:



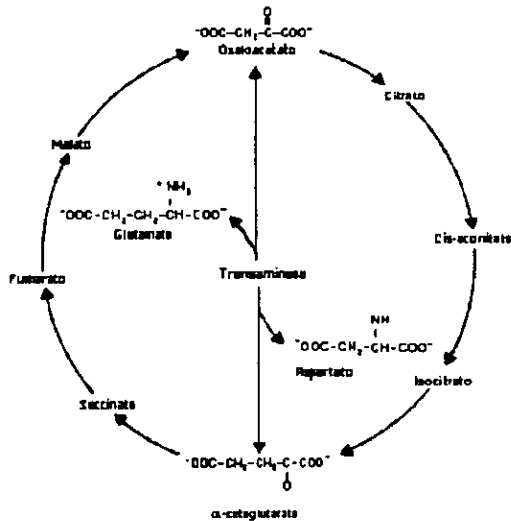
mientras que la alanina-aminotransferasa cataliza la transferencia del grupo amino de alanina a  $\alpha$ -cetoglutarato:



Se ha establecido experimentalmente que la glucosa es el principal sustrato del metabolismo energético en el SNC y que gran parte del carbono de la glucosa pasa a través del glutamato antes de ser oxidado a  $\text{CO}_2$ . Ya que el metabolismo energético es muy activo en el SNC, la síntesis de glutamato, a partir de precursores derivados de la glucosa, es muy rápido. Existen al menos dos vías metabólicas del glutamato que tiene un papel importante en el metabolismo energético. Ambas vías involucran al ciclo del ácido cítrico. Según estudios hechos por Brand y Chappel en 1974, una vía involucra la síntesis del GABA y está probablemente restringida a neuronas que utilizan al GABA como neurotransmisor. La segunda vía involucra al glutamato en la lanzadera malato-aspartato (fig.4), (Shank y Aprison, 1979).

La tasa de síntesis del glutamato a partir de la glutamina es probablemente

mucho menor que aquella a partir de la glucosa. Sin embargo, en términos de la síntesis neta de glutamato necesaria para reponer las moléculas perdidas por la liberación del transmisor, la conversión de la glutamina al glutamato puede ser igual o mayor que a partir de la glucosa.



**Figura 4. Metabolismo del glutamato.**

Por estudios realizados por Nadler y colaboradores en 1977 y otros grupos de investigación, sabemos que la liberación de glutamato depende, por lo menos parcialmente, del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Sin embargo, el glutamato puede también ser liberado en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio, indicando que el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado de sitios de almacenamiento intracelulares, puede mediar la exocitosis o que el glutamato puede ser liberado por un mecanismo de acarreo.

Un incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provoca la liberación del neurotransmisor. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  también afectan la excitación; la disminución en las concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuyen el umbral para la iniciación de impulsos, mientras que el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular eleva el umbral (Nicholls et al., 1992).

#### b) GABA

La síntesis del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), se lleva a cabo a través de la descarboxilación del ácido glutámico (fig.5). La enzima responsable de esta reacción es la glutamato descarboxilasa (GAD), la cual es casi exclusiva del sistema nervioso central, aunque se sabe desde 1980 que el GABA y las enzimas de su metabolismo, la GAD y la GABA-T se encuentran en grandes concentraciones en el páncreas, específicamente en las células  $\beta$  de los islotes, lo cual sugiere que puede presentar un papel importante en la función endócrina de éste órgano. También se han encontrado grandes concentraciones de GABA en el timo y en la glándula adrenal, y en menor concentración en el pulmón, corazón, testículos, hígado, bazo y estómago en ratas (Gerber and Hare, 1980).

La GAD en el cerebro utiliza como cofactor al fosfato de piridoxal y se localiza principalmente en las terminales GABAérgicas presinápticas (Wennstein et al., 1963; Balázs et al., 1966; Fonnum, 1968), lo que sugiere que la síntesis del GABA ocurre predominantemente en las terminales nerviosas (Baxter, 1976), por lo que la GAD constituye un regulador del equilibrio cerebral de glutamato y GABA.

La producción de GABA requiere del ciclo de ácidos tricarboxílicos y las enzimas asociadas al metabolismo de GABA: la GABA-T (4-aminobutirato-2-oxoglutarato aminotransferasa) y la gad (L-glutamato descarboxilasa). El primer paso en la formación de GABA es la transaminación de  $\alpha$ -cetoglutarato por la GABA-T para formar ácido glutámico. El glutamato es entonces descarboxilado por la GAD para formar GABA. Se requiere nuevamente de la GABA-T para transaminar el GABA y formar semialdehído succínico, el cual es convertido a ácido succínico por la deshidrogenasa succínica (SSADH), permitiendo la entrada de metabolitos del GABA al ciclo de Krebs (fig.5).

En las células que contienen GABA pero no contienen GAD (terminales glutamatérgicas), el grupo amino es removido del GABA para formar glutamato por la GABA-T. Después de la conversión de glutamato a glutamina, la glutamina puede ser liberada por la célula o reconvertida a glutamato por la glutaminasa. El glutamato puede ser usado para formar GABA en las células donde están presentes las enzimas GAD y GABA-T o entrar directamente al ciclo de Krebs por la conversión de  $\alpha$ -cetoglutarato por reacciones de deaminación oxidativa y transaminación (Sorenson et al., 1991).

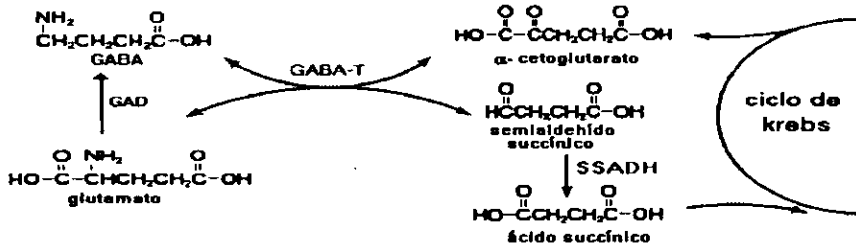


Figura 5. Síntesis de GABA.

### GAD y GABA-T

La GAD ha sido purificada de cerebro de rata, ratón y humano, requiere fosfato de piridoxal como cofactor (Wu, 1976; Blindermann et al., 1978; Oertel et al., 1981).

Basados en estudios de diferencias de migración electroforética (Chang and Gottlieb, 1988), en su capacidad de unión al fosfato de piridoxal (Denner y Wu), en su peso molecular y en su secuencia genética (Tobin et al., 1991), se ha confirmado que existen dos tipos de GAD.

La GABA-T se ha purificado de muchas especies (Vasilev y Eremin, 1968; Saito et al., 1974; Cash et al., 1974), tiene un peso molecular de ~109 000, y está constituido por 2 subunidades, también es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal.

La evaluación cuantitativa de la participación del GABA en el metabolismo energético ha mostrado que no contribuye sustancialmente a este, lo cual sugiere que su función más importante en el SNC es la neurotransmisión.

## ANTECEDENTES

### Compartimentalización del metabolismo de glutamato, glutamina y GABA

La compartimentalización metabólica se refiere a la presencia en un tejido de pozas química y funcionalmente diferentes de un sustrato dado (Berl y Clarke, 1983). El término se aplica a compuestos que parecen ser metabolizados en un tejido a diferentes ritmos simultáneamente.

Por definición, cada compartimento o poza de un compuesto, tiene su propio ritmo metabólico que lo distingue del mismo compuesto en otro compartimento, esto es, los compartimentos no se encuentran en equilibrio unos con otros; si así fuera, estos no podrían ser cinéticamente detectables (Berl y Clarke, 1982).

La principal indicación de compartimentalización metabólica (Tapia, 1980; Peng et al., 1993) es la presencia de una radiactividad específica mayor en un producto metabólico en relación a su precursor, es decir, después de la administración de precursores marcados radiactivamente, se encuentra una mayor radiactividad específica en los productos del metabolismo que en sus precursores.

En el caso de aminoácidos neurotransmisores se ha sugerido la existencia de compartimentos metabólicos definidos de capacidad variable y relacionados con funciones específicas. En especial, se han realizado estudios con el glutamato que muestran que la inyección de glutamato marcado radiactivamente en el cerebro



incrementa muy rápidamente la marca radiactiva en la glutamina, la cual aparece con una radiactividad específica mucho mayor que la del propio glutamato. Estas observaciones sugieren la existencia de un compartimento de poca capacidad que alimenta la síntesis de glutamina en forma rápida esto es, la glutamina exógena no tiene acceso a la poza celular total de glutamina y es restringida a un compartimento que tiene mayor radiactividad específica que la glutamina de la poza total y de la cual se forma el glutamato (Peng et al., 1993).

Trabajos realizados por Waelsch y colaboradores en 1960 demostraron que puede obtenerse el mismo resultado a partir de otros precursores como el bicarbonato, butirato, citrato, y muchos aminoácidos pero no con glucosa, piruvato, lactato o glicerol.

Ya que solo se conoce una vía de síntesis para la glutamina, la cual se lleva a cabo a partir del glutamato (fig.2), se ha sugerido que existen al menos dos pozas de glutamato en el tejido nervioso: una poza chica en donde el glutamato es rápidamente convertido a glutamina antes de mezclarse con la poza total o grande de glutamato, los precursores que tienen una relación de actividad específica glutamina/glutamato mayor a 1.0 alimentan la poza chica (tabla I) en contraste, la glucosa y otros precursores parecen marcar ambos compartimentos, los cuerpos cetónicos, lactato, glicerol y otros, parecen marcar la poza grande, en este caso, la relación de radiactividad específica glutamina/glutamato es menor que 1.0 (Tapia, 1980).

## COMPARTIMENTALIZACION DEL GLUTAMATO Y LA GLUTAMINA EN EL CEREBRO

COMPARTIMENTO PEQUEÑO DE GLUTAMATO  
(PRECURSORES CON UNA RELACIÓN DE  
ACTIVIDAD ESPECÍFICA Gln/Glu > 1.0)

-Glutamato  
-aspartato  
-GABA  
-leucina  
-serina  
-prolina  
-acetato  
-butirato  
-bicarbonato  
-citrato

COMPARTIMENTO GRANDE DE GLUTAMATO  
(PRECURSORES CON UNA RELACIÓN DE  
ACTIVIDAD ESPECÍFICA Gln/Glu < 1.0)

-Glucosa  
-β-hidroxiacetato  
-acetoacetato  
-piruvato  
-lactato  
-glicerol

Tabla I. Modificada de Tapia, 1980.

La compartimentalización metabólica del glutamato y la glutamina, es probablemente el reflejo de múltiples funciones de estos aminoácidos en el metabolismo cerebral.

La glutamina es entonces un importante precursor de las pozas de glutamato y GABA específicamente relacionados con su papel como neurotransmisores en el SNC (Berl et al., 1961) y no solo un mecanismo metabólico para la eliminación de nitrógeno del tejido nervioso.

Como ya se ha mencionado, estos dos compartimentos se localizan en distintos elementos celulares. Se sabe que la glutamina sintetasa (GS), la enzima que forma a la glutamina a partir del glutamato, se localiza predominantemente en las células gliales (Pasantes et al., 1991), los astrocitos tienen una alta concentración de GS

activa *in vivo* e *in vitro*, esto sugiere que al menos parte de la poza chica de glutamato está localizada en astrocitos. Se sabe además que las neuronas no tienen gran cantidad de GS pero sí de glutaminasa específicamente en las terminales, por esta razón, se asume que constituye el compartimento grande de glutamato (Lai et al., 1993).

Se ha observado también en autorradiografías del ganglio de la raíz dorsal, que los precursores que alimentan la poza chica marcan principalmente a las células gliales, mientras que los que alimentan a la poza grande marcan predominantemente a las neuronas (Minchin y Beart, 1975). Asimismo, se ha observado que la despolarización de rebanadas de cerebro estimula notablemente la liberación de glutamato y GABA marcados derivados de la glutamina marcada radiactivamente, en forma dependiente de calcio (Tapia y González, 1978). Estos datos apoyan la hipótesis de que la glutamina es sintetizada principalmente en las células gliales para su posterior transporte a las terminales nerviosas en donde su función es servir como precursor de las pozas de glutamato y de GABA cuyo papel principal es la neurotransmisión (Tapia, 1980).

El aumento en la radiactividad de la glutamina aún por encima de la del glutamato, después de la administración de glutamato marcado radiactivamente, se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo* en el tejido nervioso pero no en otros tejidos (Tapia, 1980).

La importancia de esta compartimentalización metabólica en la transmisión sináptica se hace evidente al examinar el comportamiento de los aminoácidos neurotransmisores y su relación con sus precursores metabólicos. En experimentos *in vitro* utilizando rebanadas de hipocampo se ha encontrado que el glutamato que se libera en respuesta a estímulos despolarizantes, procede básicamente de la glutamina. Así mismo, al lesionar la vía glutamatérgica de las células granulares del hipocampo, se reduce considerablemente la liberación de glutamato sintetizado a partir de la glutamina (Pasantés et al., 1991).

La compartimentalización metabólica del glutamato es: 1) una propiedad particular del sistema nervioso que no se observa en otros órganos; 2) está presente en todas las regiones del cerebro; 3) está presente en todas las capas corticales después de la aplicación de precursores; 4) está presente en muchas especies de mamíferos y 5) es demostrable también *in vitro* (Tapia, 1980).

En otros estudios, se ha observado que el glutamato derivado directamente de la glutamina por acción de la glutaminasa, se libera por despolarización en preferencia al glutamato generado a través del ciclo de Krebs a partir del esqueleto de carbono de la glucosa (Bradford et al., 1983).

La degradación del glutamato durante la neurotransmisión, puede incrementar la actividad de la glutaminasa (Nicklas, 1983), lo que indica que el glutamato liberado para servir como neurotransmisor se deriva principalmente de la glutamina por la acción de la glutaminasa (Bradford et al., 1983; Thanki et al., 1983). En estudios

realizados en sinaptosomas, se ha observado que la administración de 5 mM de glutamato provoca un 50% de inhibición de la glutaminasa. Resultados similares se han obtenido en homogenados de tejido nervioso, en donde la administración de 2.5 mM de glutamato reduce en un 50% la actividad de ésta enzima (Bradford et al., 1978).

El GABA se sintetiza en las terminales nerviosas, en donde se localiza la poza grande de glutamato, las cuales contienen GAD. Cuando el GABA es liberado, difunde a su sitio de acción y es entonces recapturado activamente en la poza chica. En las células gliales, el GABA es transaminado con el  $\alpha$ -cetoglutarato por la acción de la GABA-T a succinato y glutamato, el cual es convertido a glutamina que regresa entonces a la poza grande, donde es reconvertida a glutamato. El glutamato es entonces descarboxilado para formar un nuevo GABA. Es importante insistir en el hecho de que tanto la glutamina como el GABA se sintetizan en sitios diferentes; la glutamina se sintetiza en la poza chica localizada en las células gliales, es transportada a la grande localizada en las neuronas y convertida en glutamato; el GABA se sintetiza exclusivamente en la poza grande, es transportado a la poza chica y transaminado por la GABA-T (Baxter, 1976).

La evidencia de que al menos ciertos tipos celulares convierten a la glutamina en GABA se ha proporcionado con estudios en sinaptosomas que muestran que la  $^{14}\text{C}$ -glutamina puede ser rápidamente metabolizada a glutamato el cual es descarboxilado a GABA. Se sabe que existe un flujo neto de glutamato y GABA de las neuronas hacia las células gliales causada por la liberación mediada por impulso, de estos

aminoácidos en la terminal nerviosa.

La glutamina formada en las células gliales es recapturada por las neuronas para recuperar las pozas transmisoras de glutamato y GABA. Algunos experimentos *in vitro* han demostrado el papel de la glutamina en la recuperación de las pozas de glutamato y GABA, (Shank y Aprison 1977) mostrando un incremento en la captura y conversión de glutamina radiactiva a glutamato y GABA radiactivos, seguida de despolarización inducida por altas concentraciones de potasio.

Estudios realizados *ex vivo* sugieren que la glutamina es el principal precursor *in vivo* de glutamato y GABA en su papel como neurotransmisores (Ward et al., 1983). La principal limitación para comparar a la glucosa y la glutamina como sustratos *in vivo* o en rebanadas de tejido es la formación total de glutamina a partir de glucosa marcada, ya que esta glutamina es entonces capaz de mezclarse con la glutamina que se aplica directamente, enmascarando la contribución de glutamina generada a partir de glutamato. En este tipo de estudios (Bradford, et al., 1983) se ha observado que la radiactividad específica de la  $^{14}\text{C}$ -glutamina marcada generada a partir de la glucosa es de dos a tres veces más alta que la de la  $^3\text{H}$ -glutamina. La conexión entre los dos compartimentos de glutamato se da a partir de la conversión de glutamato derivado de la glucosa a glutamina:

**$^{14}\text{C}$ -glucosa  $\rightarrow$  ciclo de Krebs  $\rightarrow$   $^{14}\text{C}$ -glutamato**



**Figura 6. Conexión entre las dos pozas de glutamato.**

Se han realizado pocos estudios *in vivo* que relacionen la compartimentalización con el funcionamiento sináptico aunque existe mayor información en estudios realizados en rebanadas de tejido cerebral, en sinaptosomas y en cultivos. Asimismo, no se cuenta con información suficiente sobre el papel de los aminoácidos en la función nerviosa. Aunque la glutamina ha sido usada como precursor para estudiar la liberación de glutamato en el cerebro, se ha empleado también para estudiar la liberación de GABA, lo que sugiere que la poza transmisora de GABA puede ser radiactivamente marcada a partir de glutamina como precursor, sin embargo, se desconoce la contribución real de la glutamina al mantenimiento de las pozas transmisoras.

El glutamato ha sido relacionado en muchos estudios con el daño neuronal, seguido de la muerte celular, que se presenta en muchos modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas así como en pacientes que padecen algunas de estas enfermedades.

El mayor conocimiento de las rutas metabólicas de glutamato sería de gran

utilidad en la búsqueda de procedimientos experimentales que permitan el bloqueo de algún paso determinante, lo cual podría evitar la liberación excesiva de glutamato en condiciones patológicas y así disminuir el daño neuronal y la muerte celular asociados. Debido a lo anterior se proponen los siguientes objetivos:



## OBJETIVOS:

1. Aportar más información sobre el papel de los aminoácidos glutamato, glutamina y GABA y de la glucosa en la función nerviosa, específicamente en su papel como precursores metabólicos de glutamato.
2. Estudiar la velocidad de síntesis de glutamato y GABA a partir de cada precursor administrado, para aportar información sobre la efectividad de estos precursores y su posible participación en la síntesis del glutamato que se libera en condiciones normales y en condiciones experimentales de enfermedades neurodegenerativas.
3. Estudiar la distribución de los productos marcados a partir de un precursor administrado intracerebroventricularmente en diferentes áreas cerebrales, particularmente en el cuerpo estriado y el hipocampo, ya que en estas regiones se localiza una gran cantidad de terminales glutamatérgicas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales:

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (200-250 g) bajo anestesia con halotano 3-4% en una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Se colocaron en un aparato estereotáxico con la barra de nariz a -3.3 mm, se expuso el cráneo y se tomaron coordenadas para el ventrículo cerebral izquierdo (AP -0.8 a partir de Bregma; L +1.7 a partir de la línea media y V -3.9 a partir de la duramadre) y para el cuerpo estriado izquierdo (AP +0.7; L +2.8 y V -6.0) de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1982) y se perforó el cráneo en ambas zonas. Las ratas permanecieron bajo anestesia durante todo el experimento a través de una tubería conectada a una máscara de hule colocada sobre su nariz, a flujo constante de halotano en una concentración de 0.8% a 1.5%. La temperatura corporal se mantuvo a 35°C mediante cojines térmicos (Deltaphase isothermal PAD, USA).

### Inyección aguda de precursores:

Las ratas fueron colocadas en un aparato estereotáxico y mantenidas bajo anestesia como se describe anteriormente.

Tres grupos de 12 ratas fueron inyectados en el ventrículo lateral izquierdo con: 2.0 µCi de L-(<sup>U-14</sup>C)-glutamina (act. esp. 210 mCi/mmol, NEN Products, USA), en 20 µl; 2.0 µCi de L-(<sup>U-14</sup>C)-glutamato (act. esp. 262 mCi/mmol, 2.0 mCi, ICN Radiochemicals, USA), en 20 µl; y 10.0 µCi de D-(<sup>U-14</sup>C)-glucosa (act. esp. 313 mCi/mmol, ICN,

Radiochemicals, USA), en 10  $\mu$ l.

Todas las inyecciones se llevaron a cabo 5 minutos después de la penetración de la jeringa en el tejido cerebral como período de estabilización metabólica debido al daño mecánico. Seis ratas de cada grupo fueron decapitadas a los 12.5 minutos después de la inyección y las seis restantes se decapitaron a los 37.5 minutos después de la inyección. Estos tiempos equivalen a la primera y tercera fracción de perfusado en el caso de los experimentos con microdiálisis. Se extrajo inmediatamente el cerebro y se disecó sobre hielo el cuerpo estriado y el hipocampo ipsilaterales a la inyección, así como los tejidos contralaterales como controles.

Microdiálisis con inyección aguda de  $^{14}\text{C}$ -glucosa:

Se empleó una jeringa Hamilton de 20  $\mu$ l, la cual se introdujo en el ventrículo izquierdo previamente cargada con 2.0  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{D-}[^{14}\text{C}]\text{-glucosa}$  (act. esp. 313  $\text{mCi/mmol}$ ) en un volumen de 10  $\mu$ l.

Simultáneamente, se colocó una cánula de microdiálisis de 2mm de longitud y 0.5 mm de diámetro (CMA12, Bioanalytical Systems, USA). Antes de ser implantada, cada cánula fue perfundida con agua destilada durante 30 minutos a un flujo de 5  $\mu\text{l}/\text{minuto}$ . Las ratas fueron implantadas unilateralmente en el cuerpo estriado izquierdo para recuperar el fluido extracelular. Se perfundió continuamente con una solución Ringer-Krebs (118 mM NaCl, 4.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4.0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  y 10 mM de glucosa, pH 7.4) a un flujo de 2  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  usando una bomba de

microinyección (Carnegie CMA/100) por 45 minutos como tiempo de estabilización de la membrana. Después de este tiempo, se colectaron tres fracciones basales de perfusado de 25  $\mu$ l cada una (12.5 minutos). Durante la colección de la tercera fracción, se inyectaron 2.0  $\mu$ Ci de  $^{14}\text{C}$ -glucosa en el ventrículo cerebral izquierdo. Se estimuló con una solución Ringer-Krebs alta en potasio durante la colección de las tres fracciones siguientes. Se reestableció el flujo de medio Ringer-Krebs normal y se colectaron dos fracciones basales más. Se decapitó a los animales y se extrajo el cerebro en hielo para la determinación de aminoácidos en el cuerpo estriado mediante un sistema de HPLC y cuantificación de radiactividad.

#### Análisis de aminoácidos en el perfusado del cuerpo estriado:

Fracciones de dialisado (25  $\mu$ l) colectado en el cuerpo estriado, se derivatizaron con un volumen igual de una solución de o-ftaldialdehído (5 mg de OPA, o-ftaldialdehído, SIGMA, Chemical C.O., USA + 250  $\mu$ l de etanol + 250  $\mu$ l de mercaptoetanol + 4.5 ml de buffer de boratos 0.4 M, pH 10.4), y tres minutos después se inyectaron 20  $\mu$ l de esta mezcla en un sistema de HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Beckman).

Se empleó una columna ODS C18 de fase reversa (25 cm + 4 mm) en un gradiente lineal metanol/buffer de acetato de potasio (0.1M, pH 5.5) y se realizó la cromatografía a un flujo de 1.5  $\mu$ l/min durante 15 minutos en un gradiente lineal de

25% a 75% de metanol. Los aminoácidos fueron detectados fluorométricamente y la identificación y cuantificación de los picos se compararon con mezclas de aminoácidos estandar en base a los tiempos de retención de cada aminoácido (Salazar et al., 1994).

#### Análisis de aminoácidos en el tejido:

Los tejidos se pesaron y homogenizaron en 200  $\mu$ l de agua desionizada y se agregó a cada uno de ellos 20  $\mu$ l de una solución al 7% de ácido perclórico. Las proteínas precipitadas fueron sedimentadas por centrifugación (Beckman Microfuge 12, USA) a 6000 rpm durante tres minutos y el sobrenadante obtenido se neutralizó con KOH. Se realizó una segunda centrifugación para sedimentar el perclorato de potasio precipitado y se analizó el último sobrenadante en un sistema de HPLC como se describió anteriormente.

#### Cuantificación de radiactividad:

##### a) En el dialisado:

Cada muestra de dialisado analizada por HPLC, se recuperó en la salida del cromatógrafo cada 40 segundos en muestras de 1.5 ml cada una, ya que a este tiempo es posible colectar por separado los aminoácidos contenidos en cada una. A cada fracción se le agregó 5 ml de líquido de centelleo, tritosol (preparado con 3 g de 2,5-difenil-oxazol [PPO], 270 ml de tritón, 37 ml de etilenglicol, 106 ml de etanol y 600 ml

de xilol por cada litro de solución), para evaluar la radiactividad de cada muestra y cuantificar así la cantidad de aminoácidos marcados radiactivamente, producto del metabolismo del precursor administrado intracerebralmente, y se colocaron en un contador de centelleo líquido (Beckman). La radiactividad encontrada en cada fracción se relacionó con la cantidad de cada aminoácido colectado, mediante el tiempo de retención de cada uno de ellos en base a una mezcla estandar.

b) En los homogenados:

A partir del análisis de aminoácidos en el tejido se tomaron 25  $\mu$ l del último sobrenadante, los aminoácidos contenidos en este se derivatizaron con 25  $\mu$ l de o-phthalaldehído para su detección fluorométrica mediante un sistema de HPLC como se describe previamente. Las muestras de tejido fueron recuperadas a la salida del cromatógrafo cada 40 segundos en 19 fracciones de 1.5 ml cada una. Se les agregó 5 ml de tritosol para la cuantificación de los aminoácidos radiactivos producto del metabolismo del precursor administrado y se realizó la cuantificación de radiactividad en un contador de centelleo líquido (Beckman, 6000 SC, USA), se calculó la eficiencia con el método de estandar externo y los resultados se expresan en desintegraciones por minuto (dpm).

Diez microlitros más del último sobrenadante se diluyeron 10 veces y se realizaron los mismos estudios descritos para el sobrenadante sin diluir, con la finalidad de evaluar las concentraciones de aminoácidos en el cromatograma (estos datos no se muestran).

Por otro lado se tomaron duplicados de 20  $\mu$ l del último sobrenadante a los cuales se les agregó 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad de cada muestra, sin pasar por el cromatógrafo, con la finalidad de evaluar la radiactividad total en esa fracción y realizar el cálculo para el tejido completo.

Se realizó el análisis estadístico para evaluar la significancia de las diferencias, se usó la prueba de ANOVA seguida por una prueba de comparación múltiple de Fisher, todos los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS:

### I. Recuperación de radiactividad:

Si el total de radiactividad inyectada en el ventrículo cerebral para cada precursor se considera como el 100%, la radiactividad total que se recupera en las zonas estudiadas, tanto ipsilaterales como contralaterales y en ambos tiempos de análisis, varía de precursor a precursor, sin embargo puede considerarse un rango de 0.1% a 1.5% (ver tabla II). Este bajo porcentaje se debe a la dilución de la marca al difundir por todo el SNC y otros tejidos. No se cuantificó la radiactividad en todo el SNC, aunque por peso puede calcularse el valor aproximado de radiactividad recuperada en el encéfalo, el cual es del 9-10%, pero debe considerarse que la tasa metabólica es diferente en las distintas zonas cerebrales. De cualquier manera, este pequeño porcentaje no es en ningún caso despreciable en estos estudios. El metabolismo de cada precursor marcado, se estudió cuantificando la radiactividad en los aminoácidos sintetizados, a partir de su separación en un sistema de HPLC (ver material y métodos). La recuperación de la marca a través del cromatógrafo es del 80-100% en todos los tejidos estudiados y en ambos tiempos de análisis (12.5 y 37.5 minutos). Sin embargo, es importante mencionar que el 70% de la radiactividad total recuperada con respecto a homogenados que no han pasado por el cromatógrafo, no corresponde a ningún aminoácido en el cromatograma, ya que se observa a los 2 minutos de corrida la cromatografía, tiempo que no corresponde con el tiempo de retención de ningún aminoácido detectado fluorométricamente. El 30% restante de radiactividad se reparte en los aminoácidos descritos.



tejido total	12.5 minutos	37.5 minutos
<i>A partir de la administración de <sup>14</sup>C-glutamina</i>		
estriado contralat.	0.04 ± 0.009	0.06 ± 0.01
estriado ipsilat.	0.56 ± 0.09	0.05 ± 0.04
hipoc. contralat.	0.03 ± 0.005	0.06 ± 0.01
hipoc. ipsilat.	0.9 ± 0.15	0.54 ± 0.09
TOTAL	1.5	1.2
<i>A partir de la administración de <sup>14</sup>C-glutamato</i>		
estriado contralat.	0.13 ± 0.04	0.05 ± 0.01
estriado ipsilat.	0.27 ± 0.06	0.24 ± 0.02
hipoc. contralat.	0.08 ± 0.04	0.03 ± 0.01
hipoc. ipsilat.	0.43 ± 0.06	0.45 ± 0.06
TOTAL	0.91	0.77
<i>A partir de la administración de <sup>14</sup>C-glucosa</i>		
estriado contralat.	0.007 ± 0.001	0.01 ± 0.003
estriado ipsilat.	0.15 ± 0.04	0.07 ± 0.01
hipoc. contralat.	0.009 ± 0.0004	0.008 ± 0.001
hipoc. ipsilat.	0.26 ± 0.05	0.06 ± 0.02
TOTAL	0.42	0.15

Tabla II. % de recuperación de radiactividad en los homogenados.

Porcentaje ± error estandar.

En virtud de este resultado, se realizaron una serie de pruebas para tratar de encontrar el origen de ese 70%. Se inyectaron al cromatógrafo los precursores radiactivos en varias concentraciones (estos datos no se muestran), y se colectó cada muestra en varias fracciones a la salida del cromatógrafo de la misma forma que se realizó con homogenados de tejido, se procedió con el conteo de radiactividad por fracciones y se encontró que la mayor marca se encuentra en una fracción que corresponde en el cromatograma a un tiempo de aproximadamente 2 minutos. Parece ser entonces que este pico de radiactividad es un artefacto cuya naturaleza no fue posible identificar ya que fue detectado con los estándares de los tres precursores empleados marcados con  $^{14}\text{C}$  y con  $^3\text{H}$ , con o sin previa derivatización con OPA y que además no coincide con ningún pico de fluorescencia. Debido a lo anterior, el valor de esta radiactividad, no fue considerado en ninguna gráfica.

## II. Microdiálisis:

Con el fin de aportar mas información sobre las vías metabólicas que se encuentran mas involucradas en la generación de un aumento en la liberación de aminoácidos neurotransmisores en condiciones de sobreestimulación celular, se monitorearon los niveles de glutamato y GABA en el espacio extracelular en el cuerpo estriado de la rata *in vivo*, mediante la técnica de microdiálisis. Se introdujo la cánula en el estriado y se inyectó 2.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -glucosa (ver material y métodos) en el ventrículo contralateral a la cánula. El conteo de radiactividad mostró valores extremadamente bajos en las fracciones de dialisado, por lo que fue imposible realizar

pruebas estadísticas en estos experimentos.

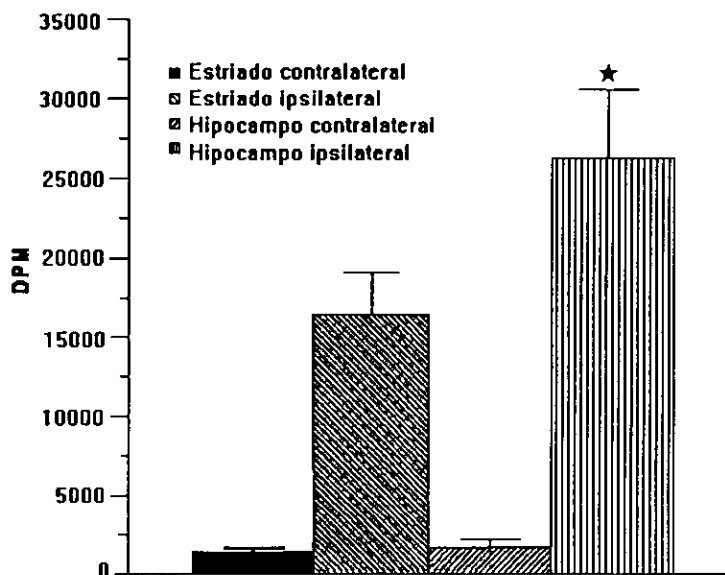
Se modificó la metodología para tratar de seguir la marca radiactiva con mayor definición, para lo cual se colectó el medio extracelular en el cuerpo estriado ipsilateral a la inyección, sin embargo, el conteo de radiactividad no fue distinto al anterior, por lo que de nuevo, fue imposible realizar pruebas estadísticas en estos experimentos. En otros experimentos se aumentó la cantidad del precursor marcado y se utilizó  $^{14}\text{C}$ -glucosa en vez de  $^3\text{H}$ -glucosa, y tampoco en estas condiciones se observó un aumento considerable en la radiactividad en los dialisados. Por último, se perfundió constantemente el precursor marcado (100 000 cpm/ $\mu\text{l}$ ) y se realizaron las mismas pruebas de conteo de radiactividad en las fracciones de dialisado, los resultados fueron semejantes. Por estas razones, no se realizaron experimentos con la administración de otros precursores y tampoco se muestran gráficas de ninguno de estos resultados.

### III. Radiactividad en los productos formados en el tejido a partir de la administración de $^{14}\text{C}$ -glutamina:

#### III.1. Radiactividad total:

La radiactividad total observada en el hipocampo ipsilateral a la inyección a los 12.5 minutos después de la administración intracerebroventricular de  $^{14}\text{C}$ -glutamina (fig.7), es mayor que en el estriado ipsilateral ( $p < 0.05$ ), mientras que los tejidos contralaterales acumulan una mínima cantidad de marca, la cual no tiene diferencias

significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).



**Figura 7: Radiactividad total en el homogenado, 12.5 minutos después de la inyección de 2.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  glutamina, promedio  $\pm$  EE de 6 experimentos, \*  $p < 0.05$ .**

A los 37.5 minutos después de la inyección (fig.8), la marca en el hipocampo ipsilateral disminuye considerablemente por lo que, a este tiempo, no existen diferencias significativas entre el estriado y el hipocampo ipsilaterales a la inyección ( $p > 0.05$ ), lo que podría sugerir una tasa metabólica mayor en el hipocampo con respecto a el cuerpo estriado, debido a esto es que a 37.5 minutos se observa una disminución en la marca radiactiva del hipocampo. Al igual que a tiempos cortos, también se observa una mínima cantidad de marca en los tejidos contralaterales, la cual no tiene diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).

A ambos tiempos es evidente que los productos del metabolismo de la  $^{14}\text{C}$ -glutamina y la propia glutamina se localizan casi en su totalidad en los tejidos ipsilaterales a la zona de inyección del precursor, y sólo una mínima cantidad de productos marcados se encuentran en los tejidos contralaterales ( $p < 0.05$ ).

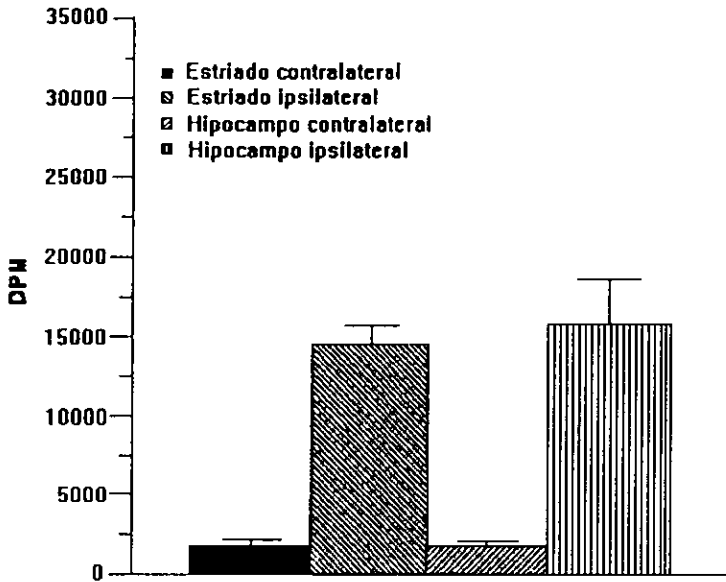


Figura 8: Radiactividad total en el homogenado, 37.5 minutos después de la inyección de 2.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  glutamina, promedio  $\pm$  EE de 5 experimentos, \*  $p < 0.05$ .

### III.II. Radiactividad en los aminoácidos:

#### III.II.I. Glutamina:

Quando se separan los aminoácidos en el cromatógrafo, se observa que a los 12.5 minutos después de la inyección de  $^{14}\text{C}$ -glutamina (fig.9), se presenta mayor

marca en la glutamina que en el glutamato tanto en el cuerpo estriado como en el hipocampo ipsilaterales, sin embargo, hay más glutamato marcado en el hipocampo que en el cuerpo estriado, mientras que esta relación no se mantiene en el caso de la glutamina y el GABA.

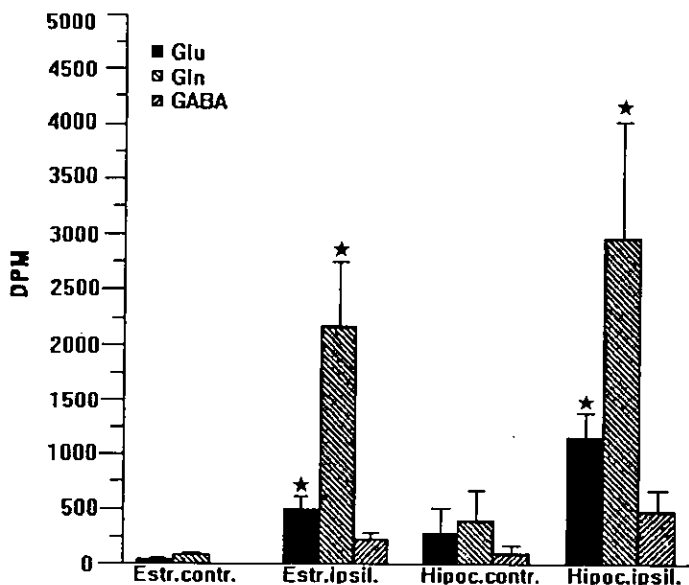
La marca en el glutamato marcado en ambos tejidos es mayor que la del GABA. En el hipocampo del lado inyectado se observa mayor cantidad de glutamato marcado con respecto al estriado del mismo lado ( $p < 0.05$ ). En cambio, no hay diferencias significativas entre el GABA marcado encontrado en el hipocampo ipsilateral con respecto al estriado ipsilateral a la inyección ( $p > 0.05$ ), ni en la glutamina marcada en ambos tejidos ( $p > 0.05$ ).

### III.II.II. Glutamato

El glutamato marcado encontrado en el hipocampo ipsilateral presenta diferencias significativas con respecto al que se encuentra en el hipocampo contralateral ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en el caso del cuerpo estriado, no existen diferencias significativas en el glutamato marcado de ambos hemisferios cerebrales ( $p > 0.05$ ).

Tampoco existen diferencias significativas entre el glutamato marcado encontrado en los tejidos contralaterales ( $p > 0.05$ ).

La glutamina marcada radiactivamente en los hipocampos y estriados ipsilaterales es significativamente mayor que la radiactividad en la glutamina presente en los tejidos contralaterales ( $p < 0.05$ ).



**Figura 9: Radiactividad en los aminoácidos, 12.5 minutos después de la inyección de 2.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  glutamina, promedio  $\pm$  EE de 6 experimentos, \*  $p < 0.05$ .**

No se encontraron diferencias significativas entre la marca encontrada en la glutamina en el estriado contralateral con respecto a la glutamina marcada en el hipocampo contralateral ( $p > 0.05$ ).

La radiactividad en el GABA encontrado en el hipocampo ipsilateral es significativamente mayor de la marca encontrada en el hipocampo contralateral ( $p <$

0.05). Sin embargo no ocurre lo mismo en el caso del GABA encontrado en el cuerpo estriado de ambos hemisferios ( $p > 0.05$ ).

Los tejidos contralaterales no presentan diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ).

A los 37.5 minutos después de la inyección de  $^{14}\text{C}$ -glutamina (fig.10), se observa en los tejidos ipsilaterales una mayor radiactividad en la glutamina que en el glutamato y GABA marcados, además de que no parece haber diferencias significativas entre el glutamato y el GABA marcados en ninguno de los tejidos. Sin embargo, a los 37.5 minutos parece haber mayor radiactividad en el GABA sintetizado a partir del precursor marcado que a los 12.5 minutos principalmente en el cuerpo estriado ipsilateral, mientras que a los 37.5 minutos la cantidad de glutamato marcado es menor en el hipocampo ipsilateral que a los 12.5 minutos, pero mucho mayor en el cuerpo estriado del mismo lado con respecto al encontrado a los 12.5 minutos. Mientras que no se observa un cambio significativo en la glutamina marcada.

A los 37.5 minutos después de la inyección, se observa una mayor marca en el glutamato observado en el cuerpo estriado ipsilateral con respecto al glutamato marcado encontrado en el cuerpo estriado contralateral a la inyección ( $p < 0.05$ ). Sin embargo no ocurre lo mismo en el caso del glutamato marcado que se observa en el hipocampo ipsilateral con respecto al encontrado en el hipocampo contralateral ( $p > 0.05$ ).



La radiactividad encontrada en el glutamato en los tejidos contralaterales no presenta diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ). Tampoco se observan diferencias significativas entre el glutamato del cuerpo estriado ipsilateral con respecto al glutamato marcado encontrado en el hipocampo ipsilateral ( $p > 0.05$ ).

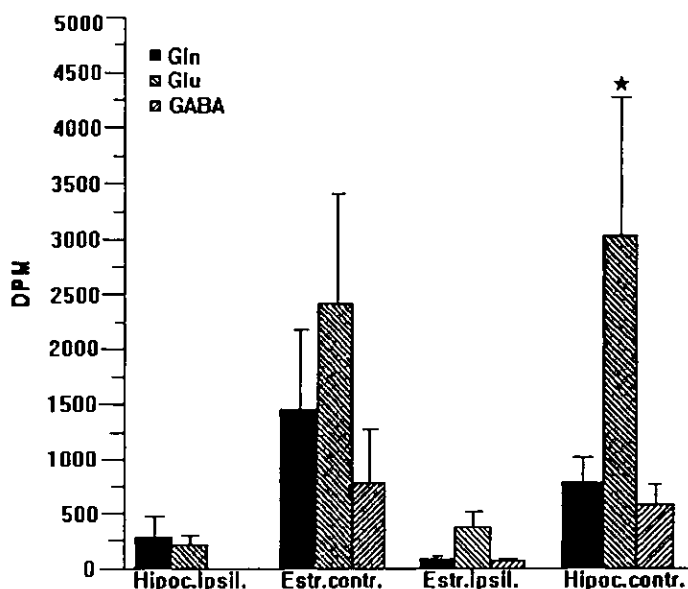


Figura 10: Radiactividad en los aminoácidos, 37.5 minutos después de la inyección de  $2.0 \mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  glutamina, promedio  $\pm$  EE de 6 experimentos, \*  $p < 0.05$ .

La radiactividad en la glutamina es significativamente mayor en el hipocampo ipsilateral que en el contralateral ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, no sucede lo mismo al comparar la marca encontrada en la glutamina del cuerpo estriado en ambos hemisferios ( $p > 0.05$ ) lo cual es contrario a lo encontrado en el caso del glutamato.

La glutamina marcada observada a 37.5 minutos en el cuerpo estriado ipsilateral no presenta diferencias significativas con respecto al hipocampo ipsilateral a

la inyección ( $p > 0.05$ ). Lo mismo ocurre con la glutamina encontrada en los tejidos contralaterales ( $p > 0.05$ ).

### III.II.III. GABA:

La marca en el GABA encontrado en el cuerpo estriado ipsilateral a la inyección es significativamente mayor que la que se encuentra en el cuerpo estriado contralateral ( $p < 0.05$ ), lo que no se observa en el caso del GABA marcado encontrado en ambos hipocampos ( $p > 0.05$ ).

La radiactividad en el GABA observado en el cuerpo estriado ipsilateral, no presenta diferencias significativas con respecto al encontrado en el hipocampo del mismo hemisferio ( $p > 0.05$ ). Asimismo, no se observan diferencias significativas entre la cantidad de GABA marcado encontrado en el cuerpo estriado y en el hipocampo contralaterales ( $p > 0.05$ ).

## IV. Radiactividad en los productos formados en el tejido a partir de la administración de $^{14}\text{C}$ -glutamato:

### IV.I. Radiactividad total:

La radiactividad total observada en las zonas cerebrales estudiadas a los 12.5 minutos a partir de la administración de  $^{14}\text{C}$ -glutamato, presenta básicamente el mismo patrón que la marca encontrada en los tejidos a partir de la administración de  $^{14}\text{C}$ -glutamina aunque cabe mencionar que a partir de  $^{14}\text{C}$ -glutamato se obtiene mayor

radiactividad en los tejidos que a partir de  $^{14}\text{C}$ -glutamato (fig.11). Sin embargo, llama la atención la gran marca que se presenta en los tejidos contralaterales principalmente en el cuerpo estriado, lo cual no se observa con la inyección de  $^{14}\text{C}$ -glutamato.

Al igual que en el caso de la glutamina no se observan diferencias significativas en la radiactividad total encontrada en el cuerpo estriado ipsilateral con respecto al mismo tejido del lado contrario ( $p > 0.05$ ), pero la radiactividad encontrada en el hipocampo ipsilateral es significativamente mayor que la que se acumula en el hipocampo contralateral ( $p < 0.05$ ).

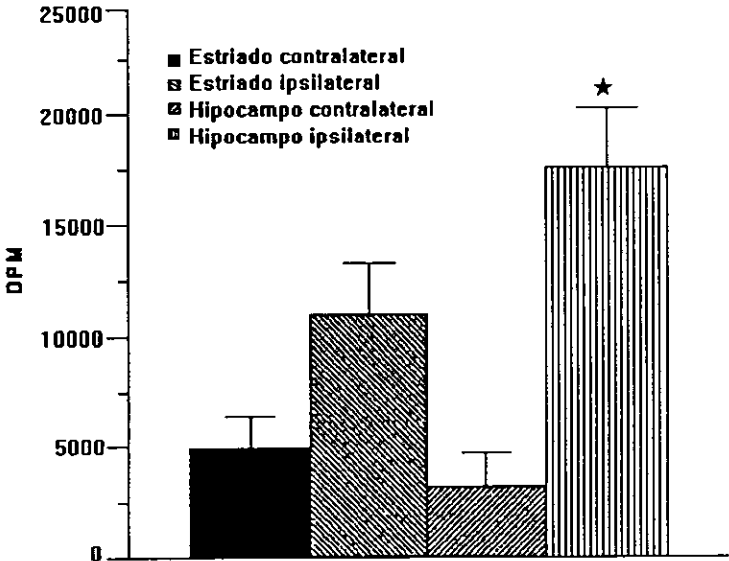


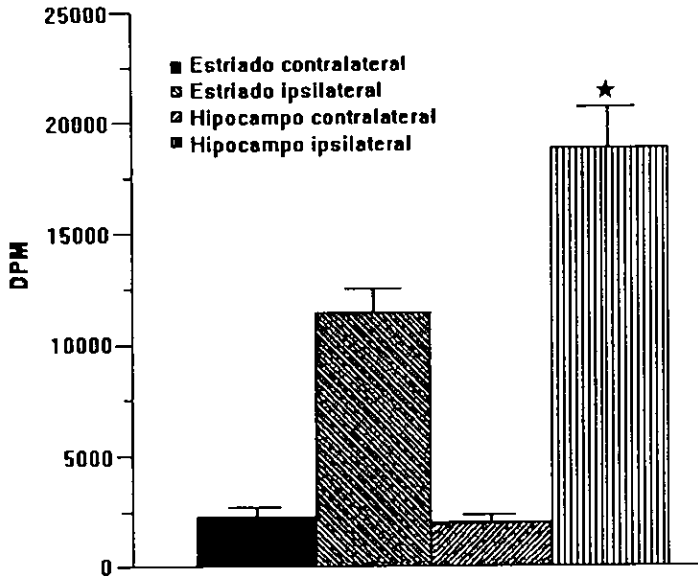
Figura 11: Radiactividad total en el homogenado, 12.5 minutos después de la inyección de 2.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  glutamato, promedio  $\pm$  EE de 5 experimentos, \*  $p < 0.05$ .

En el estriado ipsilateral, la radiactividad total encontrada es significativamente menor que la que se observa en el hipocampo ipsilateral ( $p < 0.05$ ). En los tejidos contralaterales no existen diferencias significativas en la cantidad total de radiactividad acumulada a este tiempo ( $p > 0.05$ ).

A los 37.5 minutos después de la administración del precursor marcado (fig.12), la marca encontrada en los tejidos ipsilaterales permanece prácticamente sin cambio con respecto a lo observado a los 12.5 minutos, la marca en el hipocampo ipsilateral no disminuye a este tiempo a diferencia de lo observado con la inyección de  $^{14}\text{C}$ -glutamina en donde hay una disminución en la marca a los 37.5 minutos después de la inyección por lo cual, en este tiempo no se equilibra la marca en ambos tejidos. Se observa una disminución en la marca radiactiva presente en los tejidos contralaterales.

Tanto el cuerpo estriado como el hipocampo ipsilaterales presentan mayor acumulación de productos marcados que los tejidos contralaterales a la inyección ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a los tejidos ipsilaterales, se observa que la acumulación de la marca radiactiva en el hipocampo es significativamente mayor que la que se observa en el cuerpo estriado ( $p < 0.05$ ). En los tejidos contralaterales la cantidad de radiactividad total es mínima y es similar en ambos tejidos ( $p > 0.05$ ).

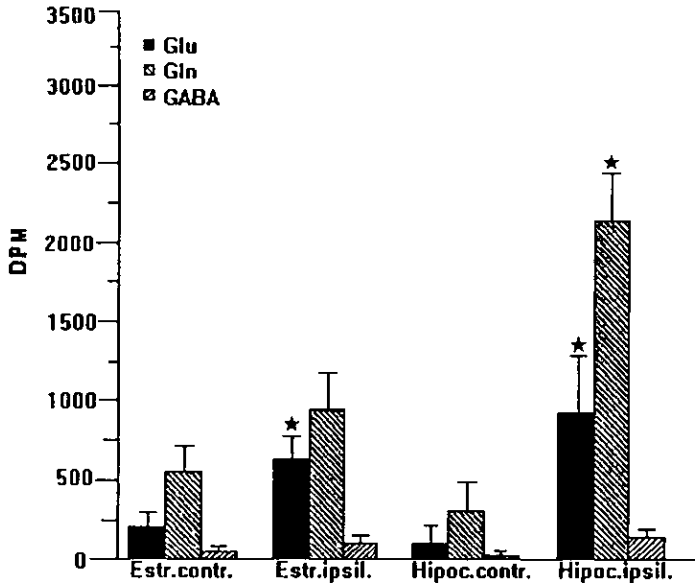


**Figura 12: Radiactividad total en el homogenado, 37.5 minutos después de la inyección de 2.0 µCi de <sup>14</sup>C glutamato, promedio ± EE de 5 experimentos, \* p < 0.05.**

#### IV.II. Radiactividad en los aminoácidos:

##### IV.II.I. Glutamina:

A los 12.5 minutos después de la inyección (fig.13) se observa en el hipocampo ipsilateral, mayor cantidad de glutamina marcada que de glutamato y de GABA al igual que a partir de la administración de <sup>14</sup>C-glutamina. Sin embargo en el cuerpo estriado ipsilateral, la diferencia en la marca entre la glutamina y el glutamato no es significativa ( $p > 0.05$ ). El GABA marcado radiactivamente en ambos tejidos es significativamente menor que los demás aminoácidos.



**Figura 13: Radiactividad en los aminoácidos, 12.5 minutos después de la inyección de 2.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  glutamato, promedio  $\pm$  EE de 5 experimentos, \*  $p < 0.05$ .**

La glutamina marcada presente en el hipocampo ipsilateral es mucho mayor que la que se encuentra en el cuerpo estriado del mismo hemisferio ( $p < 0.05$ ). En cambio, no se observan diferencias significativas en el glutamato y en el GABA marcados que se acumularon en los tejidos ipsilaterales ( $p > 0.05$ ).

La glutamina marcada acumulada en el cuerpo estriado ipsilateral no presenta diferencias significativas con respecto a la marca observada en la glutamina en el cuerpo estriado contralateral ( $p > 0.05$ ), lo cual es completamente diferente cuando el precursor administrado es  $^{14}\text{C}$ -glutamato.

En el hipocampo ipsilateral la cantidad de glutamina marcada es mucho mayor a la que se acumula en el hipocampo contralateral ( $p < 0.05$ ).

En los tejidos contralaterales la cantidad de glutamina que se acumula, producto del metabolismo del glutamato administrado, es mínima y no presenta diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).

Al igual que con la administración de  $^{14}\text{C}$ -glutamina, la cantidad de glutamina marcada en ambos tejidos a los 37.5 minutos después de la inyección (fig.14) es mayor que la del glutamato y del GABA.

Tanto en el cuerpo estriado ipsilateral como en el hipocampo del mismo hemisferio se observa un aumento significativo en la glutamina marcada con respecto al glutamato y al GABA, lo cual no se observa a los 12.5 minutos donde no existe diferencia entre el glutamato y la glutamina encontrados en el estriado ipsilateral. A diferencia de lo observado a 12.5 minutos, la marca radiactiva entre el glutamato y el GABA tanto en el cuerpo estriado como en el hipocampo ipsilaterales no presenta diferencias significativas entre sí, esto es similar a lo observado a 37.5 minutos cuando se administra  $^{14}\text{C}$ -glutamina.

La cantidad de glutamina acumulada tanto en el cuerpo estriado como en el hipocampo ipsilaterales es significativamente mayor que la que se observa en sus respectivos tejidos contralaterales ( $p < 0.05$ ), lo cual no es tan evidente en el caso de la glutamina que se acumula en el cuerpo estriado a los 12.5 minutos, pero si es similar a lo observado a los 37.5 minutos después de la administración de  $^{14}\text{C}$ -glutamina.

#### IV.II.II. Glutamato:

Al igual que cuando se administra  $^{14}\text{C}$ -glutamina, no existen diferencias significativas en la radiactividad de glutamato observada en el cuerpo estriado ipsilateral con respecto al glutamato marcado que se observa en el cuerpo estriado contralateral ( $p > 0.05$ ) sin embargo, en el hipocampo ipsilateral a la inyección la cantidad de glutamato marcado es significativamente mayor que la que se acumula en el hipocampo contralateral ( $p < 0.05$ ).

La cantidad de glutamato marcado que se encuentra en los tejidos contralaterales es similar ( $p > 0.05$ ).

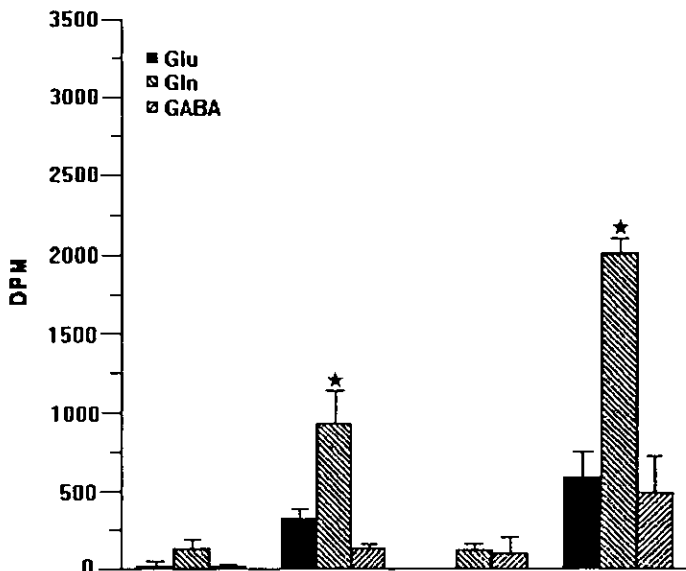
No hay diferencias significativas en el glutamato marcado que se observa en el cuerpo estriado ipsilateral con respecto al que se acumula en el hipocampo ipsilateral ( $p > 0.05$ ) sin embargo, la cantidad de glutamina marcada es mayor en el hipocampo que en el cuerpo estriado ipsilaterales, todo lo contrario a lo observado cuando se administra  $^{14}\text{C}$ -glutamina ( $p < 0.05$ ).

La radiactividad en el glutamato que se acumula en el cuerpo estriado ipsilateral es mayor del que se acumula en el estriado contralateral ( $p < 0.05$ ). Sucede lo mismo en el caso del hipocampo ipsilateral, en donde se observa una mayor acumulación de glutamato que el que se acumula en el hipocampo contralateral ( $p < 0.05$ ).

A los 37.5 minutos se observa una disminución significativa en el glutamato en los tejidos ipsilaterales con respecto a los 12.5 minutos sin embargo, no se aprecian diferencias significativas entre la marca de la glutamina. El GABA marcado



radiactivamente que se observa a tiempos largos en el hipocampo ipsilateral aumentó considerablemente con respecto a la marca radiactiva encontrada a tiempos cortos.



**Figura 14: Radiactividad en los aminoácidos, 37.5 minutos después de la inyección de 2.0  $\mu$ Ci de  $^{14}$ C glutamato, promedio  $\pm$  EE de 3 experimentos, \*  $p < 0.05$ .**

#### IV.II.III. GABA:

El GABA marcado radiactivamente (fig 13) que se encuentra tanto en los tejidos ipsilaterales como contralaterales es similar ( $p > 0.05$ ), lo cual no ocurre cuando el precursor es  $^{14}$ C-glutamina al menos en el caso del hipocampo en donde sí se observa un aumento significativo en el GABA marcado encontrado en el lado ipsilateral a la inyección.

La marca radiactiva en el GABA que se observa en el cuerpo estriado ipsilateral a los 37.5 minutos (fig.14) no es diferente de la que se encuentra en el hipocampo del mismo lado ( $p > 0.05$ ), al igual que cuando se administra  $^{14}\text{C}$ -glutamina, aunque sí se observa un aumento en el GABA marcado del hipocampo ipsilateral a la inyección con respecto al que se observa en el mismo tejido a los 12.5 minutos.

La cantidad de GABA marcado que se observa en todos los tejidos es mínima y no presenta diferencias significativas en ningún caso ( $p > 0.05$ ), aunque se aprecia un ligero aumento en el GABA marcado a este tiempo.

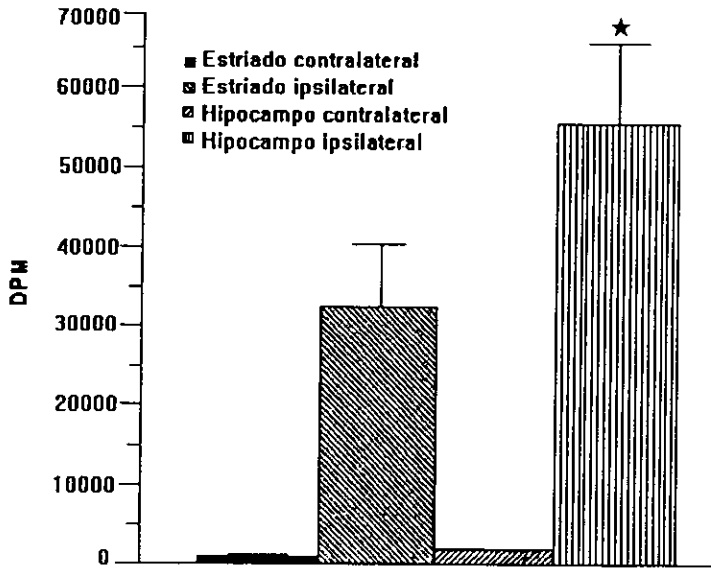
V. Radiactividad en los productos formados en el tejido a partir de la administración de  $^{14}\text{C}$ -glucosa:

V.I. Radiactividad total:

Después de 12.5 minutos de la inyección de  $^{14}\text{C}$ -glucosa (fig.15) la marca radiactiva en los tejidos ipsilaterales es considerablemente mayor que la observada a partir de la inyección de los otros precursores empleados (3 veces mayor) sin embargo, debe considerarse que la cantidad de radiactividad inyectada en este caso fue cinco veces mayor que en el caso de la inyección de glutamato y de glutamina marcados.

A los 12.5 minutos la radiactividad total que se observa en el cuerpo estriado ipsilateral es considerablemente mayor que la que se acumula en el cuerpo estriado

contralateral ( $p < 0.05$ ). De la misma manera se acumula mayor marca radiactiva en el hipocampo ipsilateral que la que se observa en el hipocampo contralateral a este tiempo ( $p < 0.05$ ). Esto es similar a lo observado con la administración de los otros precursores.



**Figura 15: Radiactividad total en el homogenado, 12.5 minutos despues de la inyección de 10.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  glucosa, promedio  $\pm$  EE de 3 experimentos, \*  $p < 0.05$ .**

Al igual que con la administración de los otros precursores utilizados en este trabajo, en los tejidos ipsilaterales se observa una mayor marca radiactiva total en el hipocampo que en el cuerpo estriado ( $p < 0.05$ ), mientras que en los tejidos contralaterales la marca observada es mínima y no presenta diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).

A los 37.5 minutos después de la inyección de  $^{14}\text{C}$ -glucosa (fig.16) se presenta una gran disminución en la marca acumulada en los tejidos ipsilaterales con respecto a los 12.5 minutos principalmente en el hipocampo, lo cual no se observa cuando los precursores administrados son glutamina o glutamato marcados, por lo que se equilibra la cantidad de marca entre los tejidos ipsilaterales ( $p > 0.05$ ).

En los tejidos contralaterales la marca acumulada es mínima y tampoco tiene diferencias entre sí ( $p > 0.05$ ).

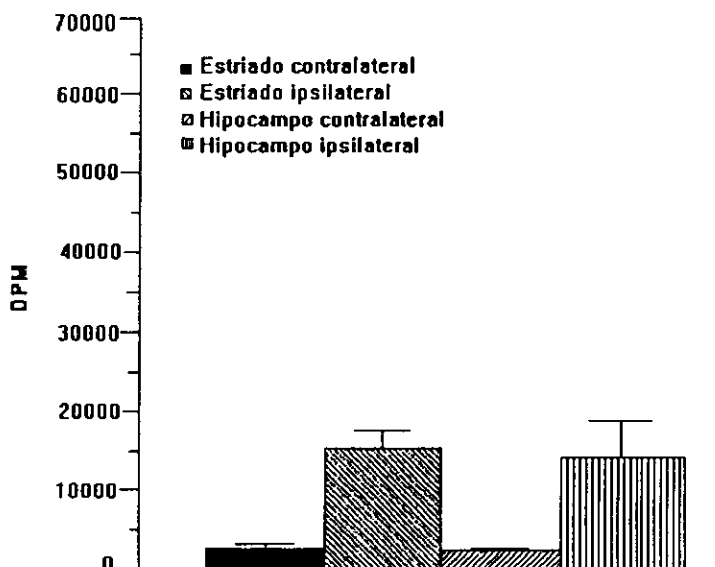


Figura 16: Radiactividad total en el homogenado, 37.5 minutos después de la inyección de 10.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  glucosa, promedio  $\pm$  EE de 4 experimentos, \*  $p < 0.05$ .

## V.II. Radiactividad en los aminoácidos:

### V.II.I glutamina

A los 12.5 minutos de la inyección de  $^{14}\text{C}$ -glucosa (fig.17) se observa que la glutamina marcada es mucho menor que el glutamato e incluso que el GABA marcados, lo cual coincide con la marca total encontrada en el tejido y difiere completamente a lo observado con la inyección de los otros precursores. La marca encontrada en el glutamato y el GABA es similar tanto en el cuerpo estriado como en el hipocampo ipsilaterales, la marca entre estos aminoácidos también es similar.

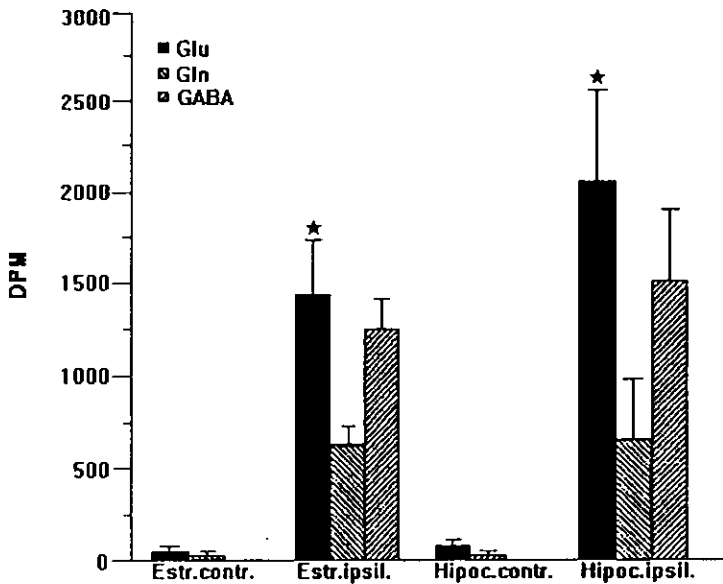


Figura 17: Radiactividad en los aminoácidos, 12.5 minutos después de la inyección de  $10.0 \mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  glucosa, promedio  $\pm$  EE de 3 experimentos, \*  $p < 0.05$ .

## V.II.II Glutamato

No se observan diferencias en el glutamato marcado en el cuerpo estriado ipsilateral respecto al hipocampo del mismo lado ( $p > 0.05$ ). De igual manera, la cantidad de glutamina y de GABA marcados es similar entre ambos tejidos ipsilaterales ( $p > 0.05$ ) lo cual difiere de lo observado con la administración de glutamato o glutamina marcados a los 12.5 minutos.

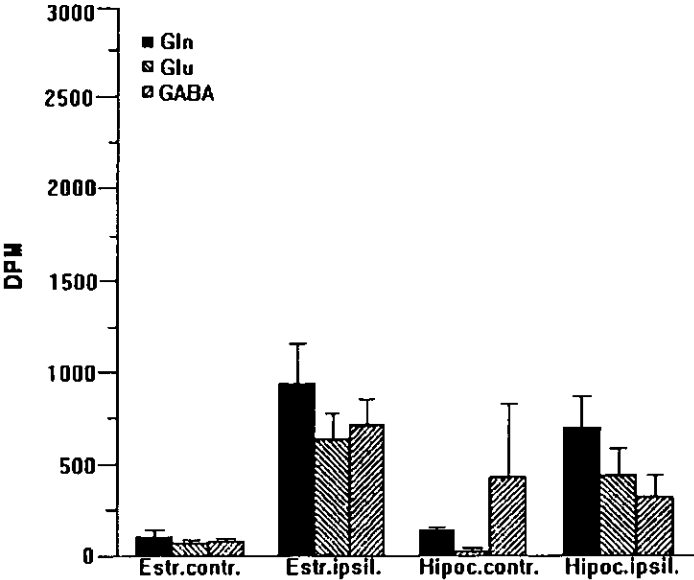
La marca radiactiva es mayor en todos los aminoácidos que se observan en los tejidos ipsilaterales que en los contralaterales a la inyección ( $p < 0.05$ ).

## V.II.III. GABA

El GABA marcado que se acumula a los 12.5 minutos tanto en el cuerpo estriado como en el hipocampo ipsilaterales es significativamente mayor que el que se observa en sus respectivos tejidos contralaterales ( $p < 0.05$ ). Llama la atención el gran aumento que se encuentra en el GABA marcado en los tejidos ipsilaterales a la inyección, lo cual no se observa con la administración de glutamato o glutamina marcados, sobre todo si es considerado en relación a la marca en el glutamato y la glutamina.

Se observa una ligera disminución de la marca radiactiva del cuerpo estriado ipsilateral en la formación de aminoácidos a 37.5 minutos (fig.18), mientras que en el hipocampo esta disminución en la marca es más evidente.

A los 37.5 minutos después de la inyección de glucosa marcada (fig.18) las cantidades de glutamato y glutamina marcados que se acumulan tanto en el cuerpo estriado como en el hipocampo ipsilaterales son significativamente mayores que las que se observan en sus respectivos tejidos contralaterales ( $p < 0.05$ ).



**Figura 18: Radiactividad en los aminoácidos, 37.5 minutos después de la inyección de 10.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  glucosa, promedio  $\pm$  EE de 4 experimentos, \*  $p < 0.05$ .**

El glutamato y la glutamina marcados que se observan en el hipocampo ipsilateral no tienen diferencias significativas con las que se encuentran en el cuerpo estriado ipsilateral ( $p > 0.05$ ). Asimismo, no existen diferencias significativas entre la marca radiactiva de glutamato y glutamina acumulada en los tejidos contralaterales a la inyección ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSION:

Como parte de la actividad metabólica normal en el tejido nervioso de vertebrados hay una síntesis constante de glutamina, la cual refleja el papel de este aminoácido como un producto final del metabolismo del nitrógeno (van den Berg, 1970; van den Berg et al., 1976).

Se ha sugerido que la glutamina puede funcionar recuperando las pozas neurotransmisoras de glutamato y de GABA ya que la glutamina es una fuente potencial y altamente disponible de carbono y nitrógeno para la síntesis de glutamato y de GABA; además, sus niveles intra y extracelulares son altos (van den Berg, 1970) y puede atravesar la barrera hematoencefálica (Patel y Balázs, 1971; Oldendorf, 1971; Quastel, 1974; Shank y Aprison, 1977).

La importancia de la glutamina como principal precursor del glutamato y de GABA neurotransmisores se ha establecido en muchos modelos *in vitro* (Bradford et al., 1978; Tapia y González, 1978; Hamberger et al., 1979), sin embargo hacen falta estudios sobre el metabolismo del glutamato y glutamina *in vivo* ya que se desconoce la contribución real de la glutamina al mantenimiento de las pozas neurotransmisoras de glutamato y GABA.

Los resultados de esta tesis contribuyen a aumentar la información en este sentido.



### *Destino de la $^{14}\text{C}$ -glutamina*

A partir de la inyección intracerebroventricular de  $^{14}\text{C}$ -glutamina se lleva a cabo la síntesis de glutamato, lo cual se comprueba por el aumento en el  $^{14}\text{C}$ -glutamato en los tejidos ipsilaterales a la inyección. El hecho de que a los 12.5 minutos después de la inyección se acumule mayor radiactividad en el glutamato del hipocampo que en el del cuerpo estriado (fig.9) sugiere que el recambio metabólico glutamato-glutamina es mayor en el hipocampo que en otras zonas cerebrales, como por ejemplo el cuerpo estriado. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que a los 37.5 minutos la mayor radiactividad en el glutamato se encuentra en el cuerpo estriado (fig.10), mientras que en el hipocampo comienza a disminuir debido seguramente a que está metabolizándose en otros productos. Parece ser entonces que el hipocampo es capaz de metabolizar a tiempos más cortos, mayor cantidad de la glutamina administrada, lo que indica que el recambio metabólico en esta zona es mayor que en el cuerpo estriado.

Es de considerar el hecho de que a los 12.5 minutos en el hipocampo se ha sintetizado el doble de  $^{14}\text{C}$ -GABA que en el cuerpo estriado, lo cual apoya la idea de que las pozas metabólicas son más activas en esta zona cerebral.

La radiactividad se distribuye entre el glutamato y la glutamina a lo largo del tiempo y a los 37.5 minutos el glutamato marcado es el doble que a los 12.5 minutos en el cuerpo estriado ipsilateral sin embargo, no hay cambio en la radiactividad total de glutamina (fig.10) lo que sugiere que al mismo tiempo que esta zona está captando  $^{14}\text{C}$

glutamina, parte de esta se metaboliza rápidamente a GABA, el cual aumenta significativamente a los 37.5 minutos.

En el cuerpo estriado la marca radiactiva comienza a equilibrarse a los 37.5 minutos entre el glutamato y la glutamina sin embargo, en el hipocampo la proporción de  $^{14}\text{C}$ -aminoácidos permanece prácticamente constante a lo largo del tiempo y por lo tanto no existen evidencias de que las pozas comiencen a equilibrarse en esta zona.

#### *Destino del $^{14}\text{C}$ -glutamato*

Después de la inyección intracerebroventricular de  $^{14}\text{C}$ -glutamato se acumula una radiactividad significativamente alta en la  $^{14}\text{C}$ -glutamina y en el  $^{14}\text{C}$ -GABA, lo que sugiere que el glutamato es un buen precursor de estos aminoácidos en el cerebro, esta observación apoya múltiples estudios sobre el metabolismo de estos aminoácidos (Berl et al., 1961; Cheng S.C., 1978).

A los 12.5 minutos después de la administración de  $^{14}\text{C}$ -glutamato, la glutamina cerebral presenta una mayor radiactividad que su precursor, el glutamato, lo cual confirma la presencia de compartimentos metabólicos de estos aminoácidos en el cerebro (Tapia, 1980).

Durante este período de tiempo la radiactividad es redistribuida entre el glutamato y la glutamina. El decremento en la radiactividad del glutamato es debida a su conversión a glutamina durante los primeros minutos del experimento. Sin embargo, en el caso del GABA en el estriado del lado inyectado, la diferencia encontrada en el

GABA marcado radiactivamente con respecto al glutamato no es tan evidente como en el caso del hipocampo ipsilateral, lo cual sugiere que en el hipocampo se lleva a cabo la síntesis de glutamina a una mayor velocidad y por lo tanto las pozas se ven alimentadas de forma más eficiente en esta zona. A los 12.5 minutos la marca radiactiva en el GABA es mínima, lo cual sugiere que su síntesis se da a partir de la glutamina recientemente sintetizada y no directamente del glutamato administrado, ya que como se observa, la radiactividad en el GABA aumenta a lo largo del tiempo (37.5 minutos), principalmente en el hipocampo del lado inyectado (fig.14), además de que la radiactividad disminuye tanto en la glutamina como en el glutamato, lo cual confirma que este aminoácido está funcionando como precursor del GABA.

Llama la atención la elevada radiactividad acumulada en la glutamina del lado contralateral a la inyección, principalmente en el cuerpo estriado lo cual sugiere que existe un mecanismo de transporte de glutamato hacia todo el cerebro sin embargo, este evento no se observa a tiempos largos seguramente porque este aminoácido ya se ha metabolizado a otros productos.

A los 37.5 minutos después de la inyección no se observa una disminución en la cantidad de  $^{14}\text{C}$ -glutamina con respecto a los 12.5 minutos pero sí en el glutamato, lo que indica su rápida conversión a  $^{14}\text{C}$ -glutamina.

La mayor cantidad de  $^{14}\text{C}$ -GABA en el hipocampo ipsilateral a los 37.5 minutos con respecto al GABA marcado que se observa a los 12.5 minutos sugiere que a este tiempo se ha sintetizado ya mayor cantidad de  $^{14}\text{C}$  glutamina la cual es capaz de

funcionar como precursor de GABA y por lo tanto los niveles de GABA tienden a aumentar en el tiempo, si esto es cierto se esperaría que a tiempos más largos se acumulara mayor cantidad de  $^{14}\text{C}$ -GABA, lo que apoya estudios previos como el de Ottersen y colaboradores en 1992.

El hecho de que a partir de precursores como el glutamato y la glutamina se sintetice mayor cantidad de glutamina que de glutamato sugiere que estos precursores alimentan principalmente a la poza chica de glutamato (Tapia, 1980) en la cual se requiere gran cantidad de glutamina para funcionar específicamente como precursor del glutamato neurotransmisor.

#### *Destino de la $^{14}\text{C}$ -glucosa*

A partir de la inyección intrecerebroventricular de  $^{14}\text{C}$ -glucosa se sintetiza mayor cantidad de glutamato que de glutamina, lo cual sugiere que la glucosa alimenta principalmente la poza grande de glutamato (Tapia, 1980) y que gran parte del glutamato se metaboliza rápidamente a GABA, lo cual es posible ya que a los 12.5 minutos se acumula mayor cantidad de  $^{14}\text{C}$ -GABA que de  $^{14}\text{C}$ -glutamina, casi el doble que empleando otros precursores. Esto sugiere que la glucosa es mejor precursor de GABA que de glutamina (fig.17). Paulsen y colaboradores afirmaron en 1988, en base a estudios sobre la participación de las células gliales para proporcionar precursores para la síntesis de GABA *in vivo*, que la glutamina no puede ser el único precursor de GABA.

El hecho de que no se observen diferencias en la radiactividad de los aminoácidos entre el cuerpo estriado y el hipocampo sugiere que el hipocampo es más eficiente para captar glutamato y glutamina que glucosa.

A los 37.5 minutos disminuye la radiactividad principalmente en el hipocampo (fig.18), lo que apoya la idea de que el metabolismo de la glucosa es mayor y por lo tanto estos  $^{14}\text{C}$ -aminoácidos ya se han metabolizado a otros productos y debido a esto disminuye la radiactividad en esta zona.

Después de 37.5 minutos de la administración de  $^{14}\text{C}$ -glucosa ya no existe diferencia entre  $^{14}\text{C}$ -glutamato,  $^{14}\text{C}$ -glutamina y  $^{14}\text{C}$  GABA tanto en el hipocampo como en el cuerpo estriado, lo que sugiere que las pozas metabólicas comienzan a equilibrarse a este tiempo.

La posibilidad de pozas separadas de glutamina y glutamato se ha propuesto desde 1956 por Cowie y Walton y constituye una vía importante para el mantenimiento del glutamato neurotransmisor.

La presencia de pozas metabólicas de glutamato y sus derivados tiene consecuencias considerables para la estimación de la velocidad de recambio de estos metabolitos y sobre todo, de su función neurotransmisora. La estimación clásica de la relación precursor-producto empleada para la estimación de la velocidad de recambio es válida solo a tiempos cortos, pues se presenta un equilibrio en la marca en las pozas debido a que el precursor marcado puede penetrar en todas las pozas a tiempos mas largos, lo que impide la demostración de la existencia de pozas metabólicas.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentados, puede concluirse lo siguiente:

1. El hipocampo presenta una mayor tasa metabólica con respecto a el cuerpo estriado ya que a pesar de la cercanía de este último con el ventrículo lateral (sitio de inyección de los precursores marcados radiactivamente), la mayor radiactividad se presenta en el hipocampo.

2. El glutamato y glutamina alimentan principalmente a la poza chica de glutamato, ya que a partir de la administración de estos precursores marcados radiactivamente se metaboliza mayor cantidad de glutamina que de glutamato marcados, mientras que a partir de la administración de glucosa como precursor la mayor radiactividad se observa en el glutamato, lo cual sugiere que la glucosa alimenta principalmente la poza grande de glutamato.

3. El estudio de las pozas metabólicas de glutamato debe realizarse a tiempos cortos ya que a tiempos largos la radiactividad se equilibra.

4. La glucosa es el principal precursor precursor del GABA neuronal y no así el glutamato o la glutamina cuando se administran intracerebralmente. Ya que la mayor radiactividad encontrada en el GABA se presenta a partir de la administración de glucosa marcada. Este hecho pudiera tener importancia durante eventos patológicos

como la isquemia en donde la liberación tónica o basal de GABA estaría muy comprometida.

5. La glutamina es mejor precursor de GABA que el glutamato cuando se administra glutamato marcado radiactivamente, ya que la mayor marca radiactiva en el GABA se observa a tiempos largos, cuando en glutamato administrado ya se ha metabolizado a glutamina.

6.- La glucosa se metaboliza mas rápidamente que el glutamato o la glutamina marcados radiactivamente cuando se administran en el cerebro de la rata y debido a que forma gran cantidad de CO<sub>2</sub> el cual no puede ser detectado por los métodos empleados, la marca radiactiva en los aminoácidos cuantificados es mucho menor cuando el precursor administrado es glucosa, a pesar de que la radiactividad administrada en la glucosa fue mucho mayor que cuando se administraron aminoácidos marcados ya que éstos al formar parte de proteínas permiten detectar la marca radiactiva en los homogenados.

7.- En el dializado obtenido por microdialísis es imposible detectar radiactividad cuando se administra glucosa ya que ésta se metaboliza rápidamente y a tiempos más cortos no se obtendría suficiente volumen de dializado para su cuantificación.

## REFERENCIAS:

- Albers R.W. and Koval G.J. 1961. *Biochem. Biophys. Acta.* 52:29.
- Balázs R., Dahl D. and Harwood J.R. 1966. *Subcellular distribution of enzymes of glutamate metabolism in rat brain.* *J. Neurochem.* 13:897-905.
- Balázs R., Patel A.J., and Richter D. 1993. *Metabolic compartments in brain: their properties and relation to morphological structures.* In: *Metabolic Compartmentation in the Brain* (Balázs R., and Cremer J.E. eds.). Macmillan, London.
- Balázs R., Machiyama Y., Hammond B.J., Julian T. and Richter D. 1970. *Biochem. J.* 116:445.
- Baxter C.F. 1970. In: *Handbook of Neurochemistry* (Lajtha A., ed.). 3:289-353.
- Baxter C.F. 1976. *Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartmentation.* In: *GABA in Nervous System Function.* Raven Press. New York.
- Beri S., Lajtha A., and Waelsch H. 1961. *Amino Acid and protein metabolism-VI. Cerebral Compartments of glutamic acid metabolism.* *J. of Neurochem.* 7, 186-197.
- Beri S., and Clarke D.D. 1969. *Metabolic compartmentation of glutamate in the CNS.* In: *Handbook of Neurochemistry* (Lajtha A., ed.). Plenum Press. New York.
- Beri S. and Clarke D. 1982. *Compartmentation of Amino Acid Metabolism.* In: *Handbook of Neurochemistry* (Lajtha A., ed.). Plenum Press. New York. Vol. 2. Cap.19.pp 447-469.
- Beri S. and Clarke D. 1983. *The Metabolic Compartmentation Concept.* In: *Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System.* Alan R. Liss, Inc., NY. 205-217.
- Blindermann J.M., Maitre N., Ossola L., Mandel P. 1978. *Purification and some properties of L-glutamate decarboxylase from human brain.* *Eur. J. Biochem.* 86:143-152.
- Bradford H.F., and Ward H.K. 1976. *Brain Res.* 110:115-125.
- Bradford H.F., Ward H.K., and Thomas A.J. 1978. *Glutamine-A major substrate for nerve endings.* *J. of Neurochem.* 30, 1453-1459.
- Bradford H.F., Ward H.K. and Thanki C.M. 1983. *Glutamine as a neurotransmitter precursor: Complementary studies in vivo and in vitro on the synthesis and release of*

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



*transmitter glutamate and GABA*. In: Glutamine, glutamate and GABA in the Central Nervous System. Alan R. Liss, Inc., New York. 249-260.

-Brand M.D. and Chappell J.B. 1974. *Glutamate and Aspartate transport in rat brain mitochondria*. Biochem. J. 140:205-210.

-Cash C., Maitre M., Ciesielski L. and Mandel P. 1974. *Purification and characterization of 4-aminobutyrate 2-ketoglutarate transaminase from human brain*. FEBS Lett. 47:199-203.

-Chang Y.C. and Gottlieb D.I. 1988. *Characterization of the proteins purified with monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase*. J. of Neurosci. 8:2123-2220.

-Cheng S.C., Naruse H., and Brunner E.A. 1978. *Effects of sodium thiopental on the tricarboxylic acid cycle metabolism in mouse brain: CO<sub>2</sub> fixation and metabolic compartmentation*. J. of Neurochem. 30, 1591-1593.

-Cornford F.M. 1952. *Plato's Cosmology, The Timaeus of Plato*. Traducción comentada. Humanities Press, NY.

-Cowie D.B. and Walton B.P. 1956. Biochem. Biophys. acta. 21:211.

-Dale H.H. 1953. *Adventures in Physiology*. Pergamon Press. London.

-Denner L.A. and Wu J.Y. 1985. *Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence of free pyridoxal phosphate*. J. Neurochem. 44:957-965.

-Fearing F. 1929. *René Descartes, a study in the history of the theories of reflex action*. Psychol. Rev. 36:375-388.

-Fonnum F. 1968. *The distribution of glutamate decarboxylase and aspartate transaminase un subcellular fractions of rat and guinea-pig brain*. Biochem. J. 106:401-412.

-Furshpan E.J. and Potter D.D. 1959. J. of Physiol. 145:289-325.

-Gerber J.C. III, and Hare T.A. 1980. *GABA in periferal Tissues. Presence and Actions in Endocrin Pancreatic Function*. Brain Research Bulletin. Vol. 5, suppl. 2. 341-346.

-Hamberger A.C., Chiang G.H., Nysten E.S., Scheff S.W., and Cotman C.W. 1979. *Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate*. Brain Res. 168, 513-530.

- Haas H.L. and Jefferys J.G.R. 1984. *Low-calcium field burst discharges of CA1 pyramidal neurones in rat hippocampal slices*. J. Physiol. 354:185-201.
- Hicks R.D. 1907. *Aristotle, De Anima*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jefferys J.G.R. and Haas H.L. 1982. *Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission*. Nature. 300:448-450.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. 1991. *Principles of Neural Science*. Elsevier. New York.
- Lai J.C. and Behar K.L. 1993. *Glycolysis-Citric Acid Cycle Interrelation: A new approach and some insights in cellular and subcellular compartmentation*. Dev. Neurosci. 15, 181-193.
- Loewi O. 1921. Pflügers Arch. 189:239-242.
- McGeer E.G., McGeer P.L. and Hattori T. 1979. *Glutamate in the Striatum*. In *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology*. Edited by L.J. Filer Jr., et al.. Raven Press. New York.
- Minchin M.C.W., and Beart P.M. 1975. Brain Research.83: 437-449.
- Nadler J.V., White W.F., Vaca K.W., Redburn D.A. and Cotman C.W. 1977. *Characterization of putative aminoacid transmitter release from slices of rat dentate gyrus*. J. Neurochem. 29:279-290.
- Naus C.C., Bechberger J.F. and Paul D.L. 1991. *Gap junction gen expression in human seizure disorder*. Exp. Neurol. 111:198-203.
- Nicholls J.G., Martin A.R. and Wallace B.G. 1992. *From neuron to brain: A cellular and molecular approach to the function of the nervous system*. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Nicklas W.J. 1983. *Relative contributions of neurons and glia to metabolism of glutamate and GABA*. In: *Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System*. Alan R. Liss, Inc. New York.
- Oertel W.H., Schmechel D.E., Tappaz M.L., Kopin I.J. 1981. *Production of a specific antiserum to rat brain glutamic acid decarboxylase by injection of an antigen-antibody complex*. Neuroscience. 6:2689-2700.
- Oldendorf W.H. 1971. *Brain uptake of radiolabelled amino acids, amines and hexoses after arterial injection*. Am.J. Physiol. 221:1629-1639.

- Ottersen O.P., Zhang N., and Walberg F. 1992. *Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: Morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum*. Neuroscience. 46:3, 519-534.
- Pasantes H., Sánchez J., Tapia R. 1991. *Neurobiología Celular*. Fondo de Cultura Económica. México D.F.
- Patel A.J., and Balázs R. 1971. Biochem. J. 121:469-481.
- Paulsen R.E., Odden E. and Fonnum F. 1988. *Importance of Glutamine for  $\gamma$ -aminobutyric acid Synthesis in Rat Neostriatum In Vivo*. J. of Neurochem. 51:1294-1299.
- Paxinos G., and Watson C. 1982. *The rat brain stereotaxic coordinates*. Academic Press. Sydney.
- Peng L., Hertz L., Huang R., Sonnewald U., Petersen S.B., Westergaard N., Larsson O.M., and Schousboe A. 1993. *Utilization of glutamine and TCA constituents as precursors for transmitter glutamate and GABA*. Dev. Neurosci. 15:367-377.
- Pérez-Velázquez J.L., Valiante T.A., and Carlen P.L. 1994. *Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis*. J. of Neurosci., 14:4308-4317.
- Quastel J.H. 1974. Biochem. Soc. Tans. 2:765-780.
- Rawn J.D. 1989. Biochemistry. Neil Patterson Publishers. U.S.A.
- Roberts P.J., and Keen P. 1974. *High affinity uptake for glutamine in rat dorsal roots but not in nerve endings*. Brain Res. 67:352-357.
- Saito K., Schousboe A., Wu J.Y. and Roberts E. 1974. *Some immunochemical properties and species specificity of GABA- $\alpha$ -ketoglutarate transaminase from mouse brain*. Brain Res. 65:287-296.
- Salazar P., Montiel T., Brailowsky S. and Tapia R. 1994. *Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of  $\gamma$ -aminobutyric acid*. Neurochem. Int. 24:4, 363-368.
- Schousboe A., Westergaard N., Sonnewald V., Petersen S.B., Huang R., Peng L. and Hertz L. 1993. *Glutamate and glutamine metabolism and compartmentation in astrocytes*. Dev. Neurosci. 15, 339-366.

- Shank R.P., and Baxter C.F. 1975. *J. Neurochem.* 24:641-646.
- Shank R.P., and Aprison M.H. 1977. *Glutamine uptake and metabolism by the isolated toad brain: evidence pertaining to its proposed role as a transmitter precursor.* *J. of Neurochem.* 28, 1189-1196.
- Shank R.P. and Aprison M.H. 1979. *Biochemical Aspects of the Neurotransmitter Function of Glutamate.* In: *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology.* Filer Jr. et al. eds. Raven Press.NY.
- Shank R.P., and Baxter C.F. 1975. *J. Neurochem.* 24:641-646.
- Siegel G.J., Agranoff B.W., Alberts R.W., and Molinoff P.B. 1994. *Basic Neurochemistry.* Raven Press. New York.
- Sorenson R.L., Garry D.G. and Brelje T.C. 1991. *Perspectives in Diabetes: Structural and Functional Considerations of GABA in Islets of Langerhans  $\beta$ -cells and Nerves.* *Diabetes.* 40:1365-1374.
- Tapia R., and González R.M. 1978. *Glutamine and glutamate as precursors of the releasable pool of GABA in brain cortex slices.* *Neuroscience Letters.* 10, 165-169.
- Tapia R. 1980. *Glutamine metabolism in brain.* In: *Glutamine: Metabolism, Enzimology and Regulation.* Academic Press, Inc. 285-297.
- Tapia I.R. 1987. *Las células de la mente.* La Ciencia Desde México. Fondo de Cultura Económica. No. 30.
- Thanki C.M., Sugden D., Thomas A.J., and Bradford H.F. 1983. *In vivo release from cerebral cortex of [ $^{14}$ C] glutamate synthesized from [ $^{14}$ C] glutamine.* *J. of Neurochem.* 41, 611-617.
- Taylor C.P. and Dudek F.E. 1982. *Synchronous neural after discharges in rat hippocampal slices without active chemical synapses.* *Science.* 218:810-812.
- Tobin A.J., Atkinson M.A., Bu D-F, Clare, Salzler M., Erlander M.G., Feldblum S., Houser C., Kaufman D.L., Maclaren N.K., Patel N., Pinal C. and Tillakaratne N.J.K. 1991. *Autoantibodies in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients differentially recognize two forms of glutamate decarboxylase, which derive from two genes (abstract).* *Diabetes* 40:suppl.1:2A.
- van den Berg C.J. 1970. In: *Handbook of Neurochemistry* (Lajtha A, ed.). 3:355-379. Plenum Press, New York.

-van den Berg C.J., Reijnierse G.L., Blockus G.G., Kroon M.C., Ronda G., Clarke D.D. and Garfinkel D. 1976. In: *Metabolic Compartmentation and Neurotransmission-Relation to Brain Structure and Function* (Berl S., Clarke D.D. and Schneider D., eds.). Plenum Press, New York. pp. 515-544.

-Vasilev V.Y. and Eremin V.P. 1968. Purification and properties of  $\gamma$ -aminobutyrate-glutamate transaminase. *Biokhimiya*. 33:1143-1149.

-Waelsch H. 1960. In: *Structure and Function of the Cerebral Cortex* (Tower D.B. and Schadé J.P. eds.). Elsevier. Amsterdam. 313-326.

-Waksman A. and Roberts E. 1965. *Biochemistry*. 4:2132.

-Ward H.K., Thanki C.M. and Bradford H.F. 1983. *Glutamine and Glucose as Precursors of Transmitter Amino Acids: Ex vivo studies*. *J. of Neurochem.* 40:855-860

-Weil-Malherbe H. 1950. *Significance of glutamic acid for the metabolism of nervous tissue*. *Physiol. Rev.* 30, 549-568.

-Weinstein H., Roberts E. and Kakefuda T. 1963. *Biochem. Pharmacol.* 12:503.

-Wu J.Y. 1976. *Purification, characterization and kinetic studies of GAD and GABA-T from mouse brain*. In: *GABA in Nervous System Function*. Roberts E., Chase T.N., Tower D.B. Eds. N.Y. Raven. 7-55.

-Yudkoff M., Nissim I., Daikhin Y., Lin Z.P., Nelson D., Pleasure D. and Erecinska M. 1993. *Brain Glutamate Metabolism: Neural-Astroglial relationships*. *Dev. Neurosci.* 15, 343-350.