

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias
Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE LOS POSIBLES
MECANISMOS IMPLICADOS EN LA
NEURODEGENERACION PRODUCIDA
POR LA INHIBICION DE TRANSPORTE
DE GLUTAMATO IN VITRO.
INFLUENCIA DEL METABOLISMO
ENERGETICO.

T E S I S

Que para obtener el Grado
Maestro en Ciencias Biológicas
(Biología Experimental)

P r e s e n t a

Biól. Octavio César García González



COORDINACION
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Directora de Tesis:
Dra. Lourdes Massieu Trigo

México, D. F.

Noviembre de 2000



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

Ciudad Universitaria, D.F. a 17 de Octubre de 2000.

Biól. Octavio César García González
de cuenta: 88170462
de expediente: 3991044
PRESENTE

Por la presente me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria del **16 de octubre** del año en curso, aprobó el Jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Biológicas (Biología Experimental)**, integrado de la siguiente manera:

Presidente: Dra. Ma. Luisa Fanjul Peña de Moles
Secretario: Dra. Lourdes Massieu Trigo
Vocal: Dr. Julio Morán Andrade
Suplente: Dra. Clorinda Arias Alvarez
Suplente: Dr. Federico Martínez Montes

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

C. c. p. Miembros del Jurado.
C. c. p. Expediente del Alumno.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM; bajo la tutoría de la Dra. Lourdes Massieu y con un donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto 2797ON).

**A mi madre
ejemplo de la tenacidad y
fuerza de voluntad**

**A Silvana
por su amor y cariño**

**A mi padre y mis hermanos
por su apoyo incondicional**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lourdes Massieu, por la confianza y apoyo brindado durante el desarrollo de esta tesis; sobre todo en los momentos difíciles y con quien he aprendido la experiencia de empezar desde abajo.

Al Dr. Federico Martínez, ejemplo de la crítica dura y constante, además que su primera plática que me ayudo a ubicarme y a emprender el sano ejercicio de la autocrítica.

Al Dr. Julio Morán, por su disposición y sugerencias durante el desarrollo de la tesis.

Al la Dra. Clorinda Arias y la Dra. María Luisa Fanjul por la revisión y recomendaciones para la versión final de este manuscrito.

A Fernando Peña, Paty Enríquez, Ale y Pepe Blancas por su amistad a lo largo de los últimos años.

A Benito, Hugo y Noemí con quienes compartí una nueva etapa de la vida.

A Bertha, Rodolfo, Santiago, Enrique, Consuelo, Gaby, Yazmín, Ma. Elena, Sandra, Marcela, Alvaro, Tony, "Che", Erendira, Amaranta, Lloret, Gaby Rodríguez, Rocío, Lucy, Virginia, Velia, Martín, Lemus, Tatiana, Ricardo, Adriana, Lina, Calixto, Yuriria y los que me falten; por que seguimos creyendo en la universidad pública y sobre todo porque hemos forjado una amistad.

A Tere Montiel y Rosendo por que siempre es agradable platicar y tomarse unas cervezas con ellos.

Al Dr. Alfredo Saldívar por que sus clases me dieron otra perspectiva de la vida.

Al Dr. Ricardo Tapia y su grupo (Paty, Ivan, Xóchitl, Marina), por apoyarnos inicialmente con la infraestructura necesaria para desarrollar todo en trabajo experimental.

A mis compañeros de laboratorio Ceci, Perla, Georgina, María Luisa, Cristina, Alberto y Adverquydi con quienes convivo y comparto el trabajo diario.

**Es detestable esa avaricia espiritual
que tienen los que, sabiendo algo,
no procuran la transmisión de esos
conocimientos.**

Miguel de Unamuno

**Las ideas vienen caminando, decía Nietzsche.
El andar disipa el pensamiento, enseña Sankara.
Las dos tesis están igualmente fundamentadas
y son verdaderas, y cualquiera puede comprobarlo
en el lapso de una hora, y a veces de un minuto.**

E.M. Cioran

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1. Sinapsis glutamatérgica.....	9
1.1. Metabolismo del ácido glutámico.....	10
1.2. Receptores a glutamato.....	10
1.3. Transportadores de glutamato.....	14
2. Excitotoxicidad.....	17
2.1. Muerte celular por isquemia.....	21
2.2. Isquemia cerebral y transporte de glutamato.....	24
2.3. Metabolismo energético y muerte celular.....	27
II. HIPÓTESIS.....	30
III. OBJETIVOS.....	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1. Cultivos celulares.....	32
4.2. Estudios farmacológicos.....	33
4.3. Determinación de la concentración de glutamato.....	33
4.4. Determinación de la viabilidad celular.....	34
4.5. Análisis estadístico.....	36
V. RESULTADOS.....	37
VI. DISCUSIÓN.....	57
VII. CONCLUSIONES.....	68
VIII. REFERENCIAS.....	70

RESUMEN

La alteración en el metabolismo energético mitocondrial y la acumulación de glutamato extracelular son algunas de las condiciones que prevalecen durante la isquemia cerebral. El origen de la acumulación extracelular del glutamato durante la isquemia se desconoce; sin embargo, se propone que una alteración o un cambio en la dirección del transporte de glutamato puede producir el incremento en su concentración. El glutamato a altas concentraciones induce la degeneración y muerte de las células nerviosas por un mecanismo excitotóxico; sin embargo, en los últimos años algunas evidencias experimentales han demostrado que el incremento en la concentración de glutamato extracelular no es suficiente para producir daño celular en modelos *in vivo*. Esto sugiere que la falla energética, como la que prevalece durante la isquemia, es un factor determinante para inducir la neurodegeneración. En la presente tesis se desarrolló un modelo *in vitro* con condiciones que mimetizan dos eventos que se generan durante la isquemia: la falla energética de origen mitocondrial y la acumulación de glutamato extracelular. Usando cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC), se demostró que la administración de L-trans-pirrolidín-2,4-dicarboxilato (PDC), un inhibidor del transportador de glutamato, no produjo daño celular a pesar de que la concentración extracelular de este aminoácido incrementó notablemente confirmando las observaciones *in vivo*; sin embargo, las células se volvieron susceptibles al PDC cuando sus niveles energéticos disminuyeron por la exposición a toxinas mitocondriales tales como el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) o la azida de sodio (AS). El daño celular fue analizado por observaciones al microscopio, por medio de la técnica de la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) y por los indicadores fluorescentes calceína-AM y el homodímero de etidio, marcadores de células vivas y muertas, respectivamente. En este trabajo se demostró que el daño es específico para las neuronas, ya que los cultivos puros de células gliales no se alteran en presencia de 3-NP+PDC. En todos los casos las observaciones morfológicas correlacionaron con los

ensayos de viabilidad celular. También se estudió el efecto de algunos agentes que pudieran prevenir la neurodegeneración inducida por el 3-NP+PDC en las neuronas granulares, para conocer de manera indirecta cuáles son los mecanismos celulares implicados en la muerte neuronal en el modelo *in vitro*. Se observó que la administración de sustratos energéticos como el acetoacetato y el piruvato, así como inhibidores de las especies reactivas de oxígeno, tales como la vitamina E y el fenil-*tert*-butil-nitrona (PBN), protegieron parcialmente a las células, mientras que los bloqueadores de canales de calcio dependientes de voltaje no mostraron ningún efecto neuroprotector. Solamente el antagonista del receptor NMDA, el MK801 o la exposición durante 24hrs a piruvato, previene completamente el daño neuronal, esto último sugiere que el mantenimiento del metabolismo energético mitocondrial es primordial para evitar el posible daño neuronal producido por el glutamato. Los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que la disminución de ATP, la producción de radicales libres y un incremento en la acumulación del Ca^{2+} intracelular a través del receptor NMDA, contribuyen a la muerte neuronal. La contribución precisa de cada uno de estos eventos así como su secuencia temporal aún no se conoce.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC	sistema nervioso central
Glu	ácido glutámico o glutamato
GABA	ácido γ -amino butírico
NMDA	N-metil-D-aspartato
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropionato
KA	ácido kaínico o kainato
PDC	L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxilato
DHK	dihidrokaínato
THA	<i>threo</i> -hidroxiaspartato
3-NP	ácido 3-nitropropiónico
AS	azida de sodio
ATP	trifosfato de adenosina
PBN	fenil- <i>tert</i> -butilnitrona
NBQX	2,3-dihidroxy-6-nitro-7-sulfamolibenzo(F)quinoxalina
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
MK801	(+)-5metil-10,11-dihidro5H-difenzo[a,d]ciclohepten-5,10-Imina
GLAST	transportador de glutamato/aspartato
GLT-1	transportador de glutamato-1
EAAC1	acarreador de aminoácidos excitadores-1
EAAT 1- 5	transportador de aminoácidos excitadores-1 a 5
DIV	días <i>In Vitro</i>
NGC	neuronas granulares de cerebelo
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
C-AM	calceína AM
HE	homodímero de etidio
CCDV	canales de calcio dependientes de voltaje

I. INTRODUCCIÓN

Desde finales de los años setentas se demostró que el ácido glutámico o glutamato (Glu), es un aminoácido muy abundante en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, además de ser un neurotransmisor excitador. La función del Glu no se reduce a la excitación de las células nerviosas, también se encuentra involucrado en el metabolismo energético, la biosíntesis del GABA, un neurotransmisor inhibitor, en la detoxificación del amonio, así como en procesos tan complejos asociados al desarrollo y maduración del cerebro y a mecanismos de aprendizaje y memoria (Fonnum, 1984; Kvamme, 1998). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, el Glu puede tener propiedades neurotóxicas y participar en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas o alteraciones neurológicas como la epilepsia y la isquemia cerebral (Obrenovitch y Urenjak, 1997).

Las primeras evidencias que demostraron el potencial neurotóxico del Glu fueron reportadas por Lucas y Newhouse (1957), quienes observaron que una administración subcutánea de Glu en ratones inmaduros produce una rápida degeneración de las neuronas de la capa interna de la retina. Esta evidencia fue confirmada posteriormente en ratas, conejos, cerdos de guinea, hamsters, pollos y monos *rhesus* tanto por la administración subcutánea como por la administración oral de Glu (Olney, 1979). Posteriormente, en una serie de estudios independientes, se demostró que la administración de análogos del Glu como el ácido kaínico (KA), el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido cistein-S-sulfónico y el ácido homocisteíco también podían producir degeneración de las células nerviosas y otras manifestaciones como: incremento en la frecuencia de

potenciales de acción en la médula de gato, incremento de convulsiones en ratas, gatos y monos; vómitos en perros y el síndrome del restaurante chino en humanos adultos (Olney, 1979). La correlación entre los efectos neurotóxicos del Glu y sus análogos y su capacidad de despolarizar a las neuronas fue demostrada por Olney (1969; 1971), quien acuñó el término excitotoxicidad para referirse al daño celular producido por la actividad prolongada de los receptores glutamatérgicos. La excitotoxicidad producida por Glu ha sido vinculada a la pérdida neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas como la corea de Huntington, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson y a algunos desórdenes neurológicos como la epilepsia, la hipoglucemia y la isquemia cerebral. Los mecanismos celulares involucrados en la excitotoxicidad fueron sugeridos durante los años ochentas, en trabajos donde se propone que una entrada masiva de calcio (Ca^{2+}), a través de los receptores glutamatérgicos, puede estar involucrada en la muerte neuronal probablemente debido a la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} tales como: proteasas, fosfolipasas y endonucleasas, así como en la generación de radicales libres (Choi, 1988). Recientemente se ha propuesto que una alteración en el metabolismo energético o una falla mitocondrial como la involucrada en la isquemia cerebral pueden jugar un papel determinante en la muerte celular inducida por Glu (Murphy et al, 1999; Lipton, 1999; Nicholls y Budd, 2000).

1. Sinapsis glutamatergica

La comunicación de las células nerviosas se realiza por medio de estructuras anatómicas especializadas llamadas sinapsis. La estimulación de las neuronas es originada a través de sinapsis glutamatergicas, entre otras. De manera general, la función de una sinapsis glutamatergica consiste básicamente en la despolarización de las terminales sinápticas y la liberación vesicular de glutamato de la terminal presináptica al espacio sináptico (Nicholls, 1998). Cuando es liberado el Glu tiene que recorrer una distancia de 0.5-1 μm , evento que se realiza por difusión. Subsecuentemente, dos moléculas de Glu son reconocidas por receptores específicos en la membrana postsináptica (Clements et al, 1992), los cuales, al activarse, producen un cambio en la permeabilidad iónica de la membrana y por lo tanto la excitación de la neurona (Trussell, 1998). Cada vesícula liberada tiene aproximadamente 2-5 mil moléculas de Glu, por lo que se ha estimado que la concentración de Glu liberado va de los 60-210 mM (Clements, 1996). Ya que el Glu a concentraciones mayores de 10 μM resulta tóxico a las células nerviosas (ver Transportadores de glutamato; pág. 13), este neurotransmisor es eliminado rápidamente del espacio sináptico a través de sistemas de captura de alta afinidad dependientes de sodio (Na^{2+}) que pueden estar localizados tanto en neuronas como en células gliales; en un tiempo aproximado de 50-200 μs , finalizando así la actividad de la sinapsis excitadora (Clements et al, 1992; Diamond y Jahr, 1997).

1.1. Metabolismo del ácido glutámico

El Glu es un aminoácido no esencial y difícilmente puede atravesar la barrera hematoencefálica, su síntesis se realiza a partir de la glucosa y de otros precursores mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos por reacciones de transaminación o bien a partir de la glutamina. Las enzimas involucradas en la síntesis y el metabolismo del Glu están localizadas tanto en las células neuronales como en las células gliales. El Glu liberado puede ser eliminado del espacio sináptico por sistemas de captura en las células gliales y convertido en glutamina por la enzima glutamina sintetasa, una enzima localizada preferentemente en células gliales, para posteriormente ser transportada a las neuronas donde se sintetiza Glu, aspartato y GABA, por procesos de transaminación. En las células neuronales la conversión de glutamina a Glu involucra la acción enzimática de la glutaminasa que es parte de la maquinaria enzimática mitocondrial (Kvamme, 1998; Hertz et al, 1999).

1.2 Receptores a glutamato

Los receptores a Glu median la mayor parte de la transmisión excitadora en el SNC de mamíferos. Los receptores a Glu se pueden dividir en dos tipos: los receptores ionotrópicos y los receptores metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos contienen un canal iónico específico para cationes y con base en la especificidad del agonista han sido subdivididos en: los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y los denominados receptores no-NMDA que incluyen el receptor al α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxasolpropionato (AMPA) y el receptor

a kainato (KA). Por otro lado los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G y modulan la producción de mensajeros intracelulares por la activación de la fosfolipasa C o la adenilato ciclasa (Pin y Bockaert, 1995).

Los receptores AMPA median la transmisión sináptica excitadora rápida en el sistema nervioso y están formados por cuatro subunidades (GluR1-GluR4) alrededor de un poro acuoso. Los receptores AMPA están distribuidos ubicuamente en el sistema nervioso. Las regiones del cerebro que tienen alta afinidad por el AMPA incluyen el hipocampo y la corteza cerebral y en menor cantidad el diencefalo, el cerebro medio y el posterior. En particular, la afinidad del cerebelo por el AMPA es muy baja. Los receptores a AMPA han sido considerados permeables únicamente a Na^{2+} e impermeables a Ca^{2+} . Sin embargo, algunos estudios sugieren que los receptores a AMPA pueden tener una sustancial permeabilidad al Ca^{2+} , cuando están conformados por las subunidades GluR1 y GluR3. La permeabilidad al Ca^{2+} de los receptores AMPA pudiera estar involucrada en la muerte celular observada en la isquemia cerebral (Sheardown et al, 1990; Pellegrini-Giampietro et al, 1997). Los receptores a AMPA tienen al menos tres sitios de unión separados en que los agonistas y antagonistas pueden actuar: el sitio de unión al Glu que es el sitio de los antagonistas competitivos tales como: el 2,3-dihidroxy-6-nitro-7-sulfamoiil-bezo(F)quinoxalina (NBQX); el 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) y el 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX) entre otros; el sitio de desensibilización donde actúan sustancias como la ciclotiazida o aniracetam y el sitio de unión intra-canal iónico donde actúan toxinas de arañas y avispas tales como la JSTX

(toxina de la araña Joro *Nephila clavata*), la argiotoxina y la filantoxina que son conocidos bloqueadores de la transmisión sináptica glutamatérgica. Algunas pirrolidinonas como el aniracetam y el piracetam o compuestos relacionados con las benzotiadizinas potencian la desensibilización de los receptores AMPA.

Los receptores a KA están formados por cinco subunidades (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2), son poco conocidos debido a que este agonista también estimula los receptores AMPA. Sin embargo, el diseño de herramientas farmacológicas con alta sensibilidad a los receptores a KA como la concanavalina A (Ozawa et al, 1998), han permitido conocer mejor las respuestas mediadas por este receptor. Las subunidades GluR5 y GluR6 forman un canal iónico funcional y los receptores a KA con esta combinación tienen preferencia por los agonistas domoato>KA>>Glu, mientras que las subunidades GluR7, KA1 y KA2 no forman canales funcionales y los receptores formados por homómeros de estas subunidades o combinaciones de estas estas subunidades tiene preferencia por el KA>domoato>Glu (Ozawa et al, 1998). Los receptores a KA se encuentran ampliamente distribuidos en todo el cerebro pero al parecer tienen una mayor proporción en la región CA3 del hipocampo y en la capa granular del cerebelo. En contraste con los receptores AMPA, los receptores a KA tienen una baja permeabilidad al Ca^{2+} y una respuesta de desensibilización menor (Ozawa et al, 1998). El KA tiene una potente acción convulsiva *in vivo* (Ben-Ari, 1985) y puede causar lesiones en poblaciones neuronales del hipocampo y de las neuronas retículo-talámicas (Nadler, 1978).

Los receptores NMDA están formados por las subunidades NR1 y NR2 (A-D). La combinación de la subunidad NR1 con uno o más miembros de la familia de la subunidad NR2 forman receptores-canales funcionales con diferentes propiedades farmacológicas y biofísicas (Yamamura y Shimoji, 1999). Los receptores NMDA son bloqueados fisiológicamente por magnesio (Mg^{2+}) de una manera dependiente de voltaje, tienen una alta permeabilidad al Ca^{2+} y utilizan a la glicina como un coagonista para que el receptor entre en su estado abierto. El receptor NMDA se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro y su expresión es dependiente de la edad, la región cerebral y el tipo celular. Las drogas que actúan con el receptor NMDA se dividen de acuerdo a su sitio de acción en cuatro tipos: 1) el sitio de reconocimiento a Glu/NMDA; 2) el sitio de unión a glicina insensible a estricnina 3) el sitio de unión al canal ionotrópico y 4) sitios moduladores tales como: el sitio modulador redox, el sitio de zinc (Zn^{2+}) y el sitio de poliaminas (Ozawa et al, 1998). La diversidad farmacológica del receptor NMDA es determinada por la composición de sus subunidades, el receptor NMDA puede ser antagonizado por el antagonista competitivo D-2-amino-5-fosfonovalerato (5-APV) o inhibidores de canales iónicos como la fenciclidina (PCP), el (+)-5metil-10,11-dihidro5H-difenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina (MK-801) y la ketamina entre otros. La función anormal de los receptores NMDA puede estar involucrada en la patogénesis de la esquizofrenia y el dolor y conducir a la muerte celular observada en las enfermedades neurodegenerativas o desórdenes neurológicos como la isquemia cerebral (Yamakura y Shimoji, 1999).

1.3 Transportadores de glutamato

La concentración intracelular de Glu en el cerebro es de aproximadamente 10 mM mientras que su concentración extracelular es extremadamente baja, cerca de 2-3 μM y es mantenida por sistemas de captura de alta afinidad localizados tanto en la neuronas como en las células gliales. Aunque las neuronas y la glía exhiben una alta capacidad para capturar este aminoácido al parecer la astroglia es un sitio primario para la eliminación de Glu (captura y biotransformación) en áreas del cerebro con gran actividad glutamatérgica debido a que en estas regiones la captura de Glu en astrocitos es superior a la de las propias neuronas glutamatérgicas y otros tipos celulares (Hertz et al, 1999). Se han clonado cinco transportadores para Glu el GLAST o EAAT1, el GLT-1 o EAAT2, el EAAC1 o EAAT3, el EAAT4 y el EAAT5 (Storck et al, 1992; Pines et al, 1992; Kanai et al, 1992; Fairman et al, 1995; Arriza et al, 1997). Estos transportadores requieren de Na^{2+} extracelular y dependen de K^+ interno, tienen igual capacidad para transportar Glu y D,L-aspartato en intervalos micromolares. Algunos modelos de transporte de Glu sugieren una translocación simultánea de 3 moléculas de Na^{2+} , 1 protón y 1 molécula de Glu cargado negativamente seguido por un contra-transporte de una molécula de K^+ y un OH^- al exterior. Un modelo alternativo propone el cotransporte de 2 moléculas de Na^{2+} , 1 de Glu y la salida de una molécula de K^+ y un OH^- (o HCO_3^-). De acuerdo a cada modelo existe un movimiento entrante de una carga neta positiva (Takahashi et al, 1997). El colapso del gradiente electroquímico que normalmente es sostenido por la ATPasa Na^+/K^+ puede conducir a la inhibición o

al cambio de dirección en el funcionamiento del transportador de Glu promoviendo la salida de Glu al espacio extracelular en vez de su entrada (ver *isquemia y transportador de Glu*). El transporte de Glu muestra diferentes cinéticas dependiendo de la región del cerebro y la preparación celular donde se ha estudiado (Gegelashvili and Schousboe, 1998). Una serie de compuestos con estructuras análogas al Glu como el L-*trans*-pirrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC), el L-2-[carboxyciclopropil]glicina y el ácido 1-aminociclobutanediocarboxílico, han mostrado que inhiben la captura de Glu de una manera competitiva y son utilizados como herramientas farmacológicas para discriminar entre diversos tipos de transportadores de Glu con base en sus cinéticas. Por ejemplo, el PDC es un inhibidor más efectivo para el transportador GLT1 (k_i 8 μ M) que para el transportador GLAST (k_i 79 μ M) o para el transportador EAAC1 (k_i 61 μ M), mientras que el dihidrokainato (DHK) y el kainato inhiben el transportador GLT1 con k_i 23 μ M y 53 μ M, respectivamente. Por otro lado el EAAC1 y el GLAST son 8 y 11 veces más sensibles a L-serina-O-sulfato (L-SOS) (Gegelashvili and Schousboe, 1998).

La distribución y localización regional y celular de los transportadores de Glu en el cerebro ha sido estudiada a través de ensayos inmunohistoquímicos, inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ*. El transportador de Glu GLT1 ha sido detectado a lo largo de todo el sistema nervioso central. Tiene una amplia distribución en el hipocampo y en la corteza cerebral, a nivel celular es expresado notablemente en astrocitos excepto en las células de Müller y otras células gliales de la retina. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el

GLT1 puede expresarse en cultivos de neuronas de hipocampo (Mennerick et al, 1998; Books-kayal et al, 1998), y también puede estar presente en las neuronas durante el desarrollo (Robinson, 1999). Al igual que el GLT1 el transportador GLAST tiene una alta expresión en los astrocitos de todo el cerebro. Sin embargo, durante ciertas etapas del desarrollo el GLAST puede expresarse en células neuronales (Plachez et al, 2000). El GLAST y el GLT1 pueden colocarse en los mismos astrocitos pero en diferente proporción en diversas regiones del cerebro. De manera particular el GLAST se expresa altamente en la glia de Bergmann del cerebelo (Danbolt et al, 1998). El transportador EAAC1 tienen altos niveles de expresión en el hipocampo y la corteza y bajos niveles de expresión en el cerebro medio, el estriado y el cerebelo; la localización celular de este transportador se ha restringido a las neuronas (Rothstein et al, 1994). Sin embargo, algunos estudios sugieren que EAAC1 puede expresarse en células gliales (Kugler y Schmitt, 1999). Se considera al EAAC1 como un transportador postsináptico observado en las dendritas y en los somas celulares por lo que se piensa tiene un papel importante en la eliminación de aminoácidos excitadores después de haber sido liberados en la sinápsis. El cerebelo tiene una amplia distribución del EAAT4, aunque también pueden expresarse esporádicamente en otras regiones del cerebro durante el desarrollo (Furuta et al, 1997a, 1997b). Su expresión está enriquecida en las espinas dendríticas de cerebelo e hipocampo y en las dendritas distales de las células de Purkinje del cerebelo (Danbolt et al, 1998). El transportador EAAT5 está localizado selectivamente en la retina y tienen una alta expresión en las células de Müller. Los transportadores EAAT4 y

EAAT5 parecen estar acoplados a conductancias de cloro (Cl⁻). La fisiología y función de estos transportadores aún no se conoce mucho.

2. Excitotoxicidad

Como se mencionó anteriormente, el término excitotoxicidad se refiere a la capacidad del Glu y sus análogos para producir daño celular por la actividad prolongada de sus receptores. El daño por excitotoxicidad tiene características citopatológicas bien definidas. Por ejemplo, después de 30 min de la inyección sistémica de Glu en roedores jóvenes las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo muestran un evidente hinchamiento de las dendritas y los somas celulares, el cual es seguido de la degeneración de los organelos intracelulares y picnosis nuclear. Después de varias horas las células se necrosan y son fagocitadas. El daño es predominantemente postsináptico, ya que las terminales nerviosas y los axones no se afectan (revisado en Massieu, 1999). Los posibles mecanismos celulares involucrados en la excitotoxicidad han sido estudiados en neuronas cultivadas y en rebanadas de tejido nervioso. En cultivos neuronales se han descrito dos fases principales de daño celular producido por la exposición a Glu. Durante la primera, denominada fase aguda, hay un hinchamiento marcado del soma y las dendritas, el cual depende del Na²⁺ y Cl⁻ externos. Esto ocurre después de algunos minutos de exposición al Glu, es reversible y puede ser producido por agentes despolarizantes tales como la concentración elevada de potasio y la veratridina. Este fenómeno se debe posiblemente a la entrada del Na²⁺ seguida del flujo pasivo del Cl⁻ y agua. La mayoría de las células recuperan

su volumen original después de algunas horas (Choi, 1987; Hasbani et al, 1998; Sakaguchi et al, 1999). La segunda fase se caracteriza por la desintegración retardada de las neuronas; ocurre algunas horas después de la exposición inicial del Glu y depende del Ca^{2+} externo.

Normalmente la concentración de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) es de aproximadamente 1-2 mM, mientras que la concentración Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) es de aproximadamente 0.1 μM . Estos gradientes de concentración son mantenidos por transportadores de Ca^{2+} fuera de las células y por ATPasas celulares. Además, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es regulada por organelos celulares como la mitocondria y el retículo endoplasmático y por proteínas intracelulares como la parvalbúmina, la calretinina y la calbindina; entre otras (Pozzan et al. 1994). Las funciones fisiológicas intracelulares dependientes del Ca^{2+} son activadas cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ incrementa aproximadamente a 1 μM . Si la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sigue aumentando hasta llegar a concentraciones mayores de 10 μM la homeostasis de Ca^{2+} intracelular es alterada pudiendo causar un daño o incluso la muerte a las células (Alberts et al. 1994). Se ha reportado que una anoxia química o la exposición a alto K^+ , Glu, NMDA y kainato en cultivos celulares incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta valores superiores a los 300 nM durante los primeros minutos de exposición (Milani et al, 1991; Kiedrowski y Costa, 1995; Savidge y Bristow, 1997; Hyrc et al, 1997; Koschmieder et al, 1999). En las NGC se ha reportado que pueden acumular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de hasta 20 mM sin que esta concentración sea aparentemente tóxica a la célula (Eimarl y Schramm, 1994). Sin embargo, trabajos realizados en cultivos de células corticales y de estriado sugieren que el

daño celular no se debe a la cantidad de Ca^{+2} que se acumula en la célula, sino a las vías de entradas de Ca^{2+} , en particular la vía que involucra al receptor tipo NMDA (Hyrc et al, 1997; Peng et al, 1998; Sattler et al, 1998).

La correlación cuantitativa entre la degeneración producida por Glu y la cantidad de Ca^{2+} acumulada intracelularmente ha permitido postular que la participación de la entrada de Ca^{2+} a la célula en el proceso excitotóxico se puede producir a través de diversas vías como son: los receptores glutamatérgicos (en particular los receptores tipo NMDA), los canales de calcio dependientes de voltaje y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ es un factor importante para la muerte celular por excitotoxicidad; sin embargo, los pasos subsiguientes al incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ no están bien dilucidados. Se piensa que la entrada de estos iones podría: 1) activar proteasas, las cuales contribuirían al daño celular al degradar proteínas estructurales; 2) activar fosfolipasas contribuyendo al rompimiento de la membrana celular; 3) incrementar la producción de radicales libres y por lo tanto producir daño por estrés oxidativo y 4) activar endonucleasas generando alteraciones en el ADN (Fig. 1). Como mencionamos, una sobreactivación de este receptor durante la isquemia, el trauma cerebral o las crisis epilépticas puede activar una cascada de eventos celulares que culminen en la muerte celular (Choi, 1988).

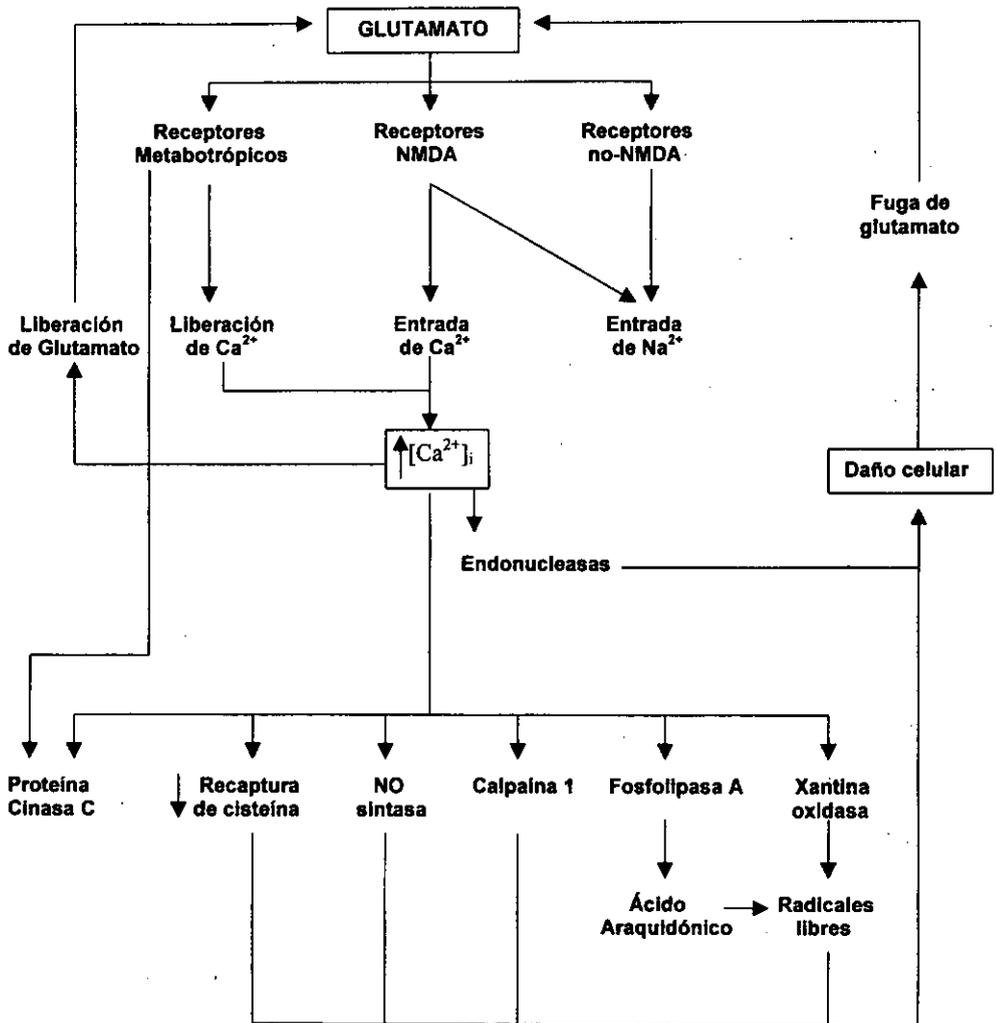


Figura 1. Posibles vías involucradas en la muerte neuronal producida por excitotoxicidad. La activación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos produce una entrada excesiva de calcio. El aumento de la concentración de calcio intracelular activa una serie de enzimas que contribuyen al deterioro de las neuronas. La pérdida de la integridad de las membranas neuronales da lugar a la fuga de glutamato, lo cual contribuye a la activación prolongada de los receptores glutamatérgicos de las células vecinas. A su vez, la entrada de calcio también estimula la liberación de glutamato por exocitosis, estableciéndose así un sistema de retroalimentación que prolonga la sobreexcitación neuronal. (Tomado de Massieu, 1999).

2.1 Muerte celular por isquemia

La isquemia cerebral se ubica como una de las principales causas de muerte en el mundo y de incapacitación en adultos jóvenes (Dietrich, 1998), por lo que es importante conocer los eventos celulares generados durante la isquemia, así como las estrategias que permitan proteger contra el daño isquémico y sus secuelas.

La isquemia cerebral ocurre cuando existe una disminución de la circulación sanguínea cerebral producida por un trauma, hemorragia, paro cardíaco u oclusión arterial, provocando degeneración en la zona que ha dejado de ser irrigada. En la región donde se reduce completamente el flujo sanguíneo se agotan las reservas energéticas (glucosa y oxígeno) por lo que las células están destinadas a morir. Esta zona recibe el nombre de centro isquémico. En la región que circunda el centro isquémico, denominada zona de penumbra, hay irrigación colateral y es por tanto rescatable. Se ha propuesto que el daño isquémico en la zona de penumbra es de tipo excitotóxico con base en las siguientes evidencias: 1) las características citopatológicas subsecuentes a la isquemia son similares a las producidas por la exposición directa de las neuronas a altas concentraciones de Glu (Simon et al, 1984); 2) estudios de microdiálisis *in vivo* indican que la concentración Glu y aspartato aumenta significativamente en aquellas regiones que exhibirán daño celular como consecuencia de la isquemia (Benveniste et al, 1984; Graham et al, 1990; Baker et al, 1991); 3) los antagonistas de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y no-MNDA protegen contra la neurodegeneración inducida por la isquemia

(Simon et al, 1984; Sheardown et al, 1990) y 4) la interrupción de las vías glutamatérgicas evita el daño isquémico (Wieloch et al, 1985; Benveniste et al, 1989).

Algunos estudios han propuesto que la muerte celular observada durante la isquemia se podría generar a través de un mecanismo denominado excitotoxicidad secundaria (Fig. 2). Se propone que la deficiencia energética asociada a la isquemia disminuiría la concentración de ATP en las neuronas, lo que provocaría una reducción en la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ encargada de mantener el potencial de membrana produciendo su despolarización y por lo tanto la liberación del ión Mg^+ que normalmente se encuentra bloqueando el poro iónico del receptor al NMDA. La presencia de Glu, aún a bajas concentraciones, activaría el receptor NMDA y tendría lugar el daño excitotóxico por los mecanismos mencionados anteriormente (Novelli et al, 1988; Zeevalk & Nicklas, 1992; Beal, 1993a).

Falla energética

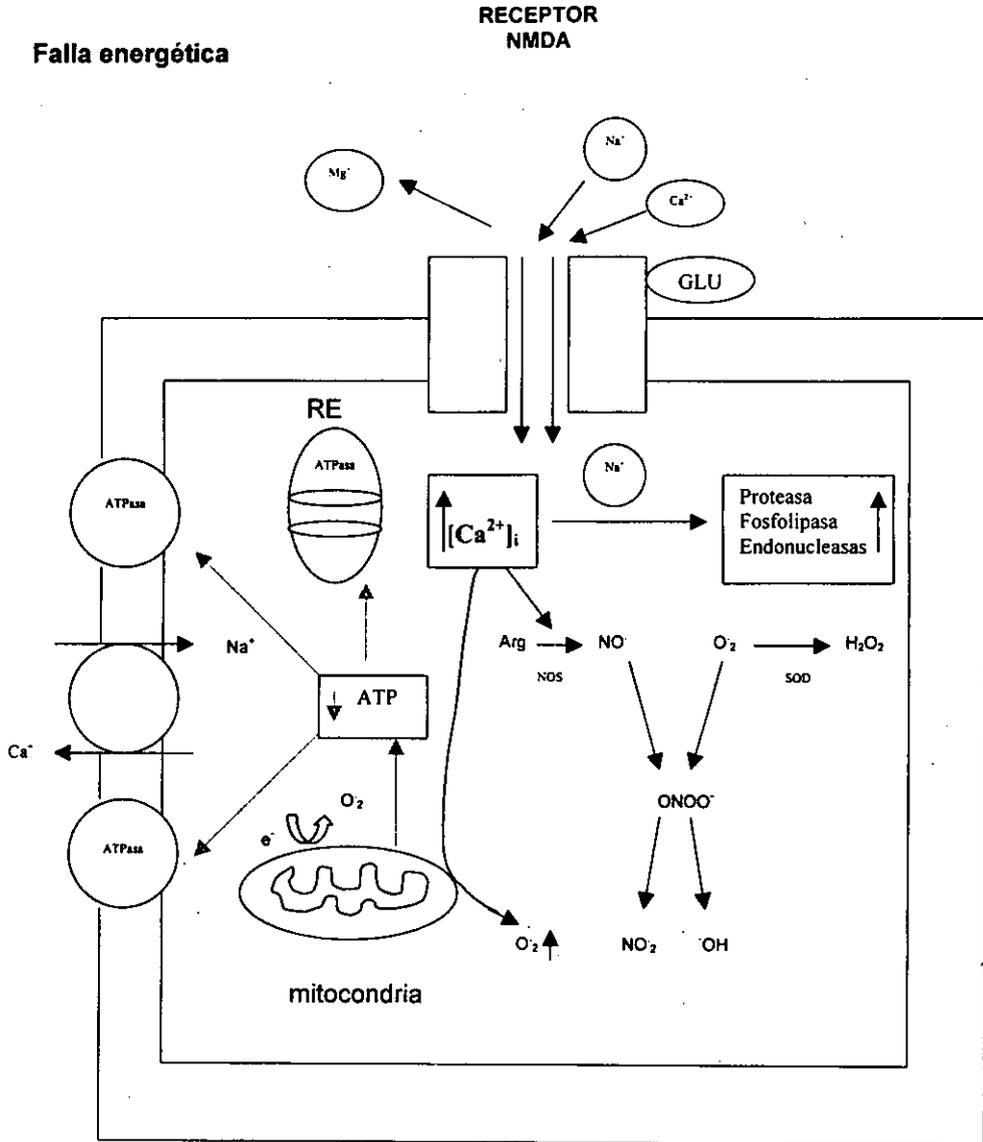


Figura 2. Mecanismos celulares involucrados en la excitotoxicidad secundaria. Una falla energética como la observada durante la isquemia cerebral produciría una reducción en la concentración de ATP y por lo tanto una disminución en la actividad de las ATPasa Na^+/K^+ induciendo la despolarización de la membrana plasmática y la liberación del ion Mg^{2+} que normalmente se encuentra bloqueando el receptor NMDA. La presencia de glutamato aún a bajas concentraciones produciría un incremento en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y la activación de enzimas como proteasas, fosfolipasas, endonucleasas. La falla mitocondrial derivada de estas condiciones a su vez incrementaría la producción de especies reactivas de oxígeno potenciando el daño celular. NOS; Óxido Nítrico Sintasa, SOD; Superóxido dismutasa, RE; retículo endoplásmico; NO, óxido nítrico, O_2 , superóxido; ONOO^- , peroxinitrito (Tomado de Beal, 1995).

2.2 Isquemia cerebral y transporte de glutamato

Aunque no se conoce el mecanismo responsable del aumento de los niveles extracelulares de Glu durante la isquemia cerebral, se ha propuesto que la disminución de ATP durante la isquemia y la subsecuente alteración de los gradientes iónicos por la inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ induce el cambio de dirección del funcionamiento del transportador ya que éste es dependiente de los gradientes de Na^+ y K^+ a través de la membrana (Fig. 3). Se ha sugerido también que exista una reducción de la expresión de los transportadores de Glu debido a la falla energética y que esto contribuya a la acumulación de este aminoácido en el espacio extracelular. El incremento en la concentración de Glu estaría vinculado al daño celular excitotóxico (Attwell et al, 1990; Takahashi et al, 1997; Martin et al, 1997; Longuemare et al, 1999; Fujita et al, 2000). Esta propuesta se basa en las siguientes evidencias experimentales: 1) inhibidores de la captura de Glu pueden causar daño excitotóxico o potenciarlo (Rothstein et al, 1993; Blitzblau et al, 1996; Velasco et al, 1996; Volterra et al, 1996); 2) la inhibición del transporte de Glu aumenta su concentración extracelular a niveles potencialmente tóxicos (Rothstein et al, 1993; Velasco et al, 1996); 3) la neurodegeneración inducida por la inhibición del transporte es inhibida por antagonistas de los receptores glutamatérgicos (Blitzblau et al, 1996; Velasco et al, 1996; Volterra et al, 1996); 4) la inhibición de la expresión de los diferentes transportadores de Glu *in vivo* por oligonucleótidos antisentido produce lesiones y crisis epilépticas. Las lesiones se asocian con un incremento en la concentración de Glu (Rothstein et al, 1996; Tanaka et al, 1997). En rebanadas

de hipocampo, la inhibición de la expresión del transportador de Glu potencia el daño excitotóxico (Simantov et al, 1999) y 5) después de un daño isquémico se observa una reducción en la expresión de ciertos transportadores de Glu (Torp et al, 1995; Martin et al, 1997; Fujita et al, 1999). Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado que la inhibición prolongada de los transportadores de Glu *in vivo* no produce daño neuronal *per se* a pesar de incrementar notablemente la concentración de este aminoácido respecto a su nivel basal en el espacio extracelular (Massieu et al, 1995; Massieu y Tapia, 1997). El hecho de que el incremento en los niveles extracelulares de glutamato por inhibición de su transporte no sea suficiente para producir neurodegeneración *in vivo*, sugiere que factores adicionales como la deficiencia energética asociada a la isquemia cerebral, sean necesarios para inducir el daño neuronal.

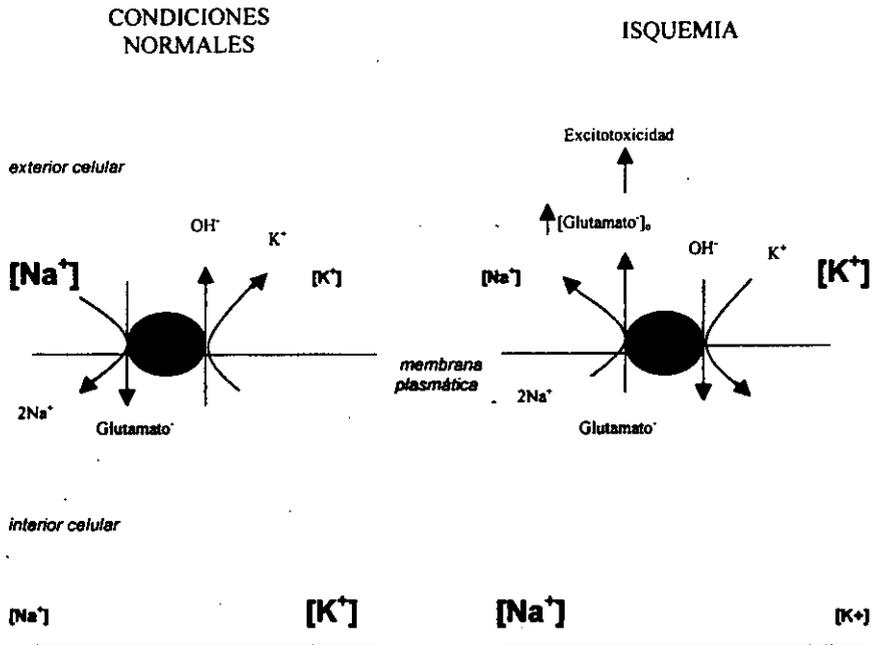


Figura 3. Funcionamiento inverso del transporte de glutamato. Durante la isquemia, la alteración de los gradientes iónicos de Na⁺ y K⁺ produce la salida de glutamato de las neuronas o las células gliales activando los receptores glutamatérgicos de las células vecinas y produciendo un daño excitotóxico (modificado de Attwell, 1993).

2.3 Metabolismo energético y muerte celular

La función y supervivencia de las neuronas depende del aporte continuo de glucosa y oxígeno para generar ATP a través de la glucólisis y la fosforilación oxidativa (Erecinska y Silver, 1994). La restricción de la generación de ATP, como sucede en la isquemia cerebral, causa un daño neuronal irreversible produciendo la muerte celular posiblemente a través de un mecanismo de excitotoxicidad secundaria (Hara, 1993; Massieu y Garcia, 1998; Dirnagl et al, 1999). En los últimos años, diversos estudios han demostrado que una alteración en el metabolismo energético mitocondrial da lugar a la degeneración de las células nerviosas. Por ejemplo: la administración sistémica del ácido 3-nitropropiónico (3-NP), un inhibidor irreversible de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, enzima encargada de catalizar la producción de fumarato a partir de succinato en el ciclo de Krebs y que forma parte del complejo II de la cadena respiratoria (Alston et al, 1977; Coles et al, 1979), produce degeneración en las células del estriado y corteza e *in vitro* de hipocampo, tálamo y cerebelo (Beal et al, 1993b; Weller & Paul, 1993; Wullner et al, 1994; Fink et al, 1996), probablemente por un decremento en la síntesis de ATP (Pang y Geddes, 1997; Greene et al, 1998). El efecto neurotóxico del 3-NP se observó cuando niños chinos consumieron accidentalmente cañas de azúcar que contenían 3-NP, provocándoles una encefalopatía aguda seguida por una distonia retardada (He et al, 1995). Las lesiones producidas por el 3-NP presentan características citológicas y neuroquímicas parecidas a las que se producen con la administración de agonistas glutamatérgicos y a las que se

presentan en la enfermedad de Huntington y en la isquemia cerebral (Beal et al, 1993b; Borlonga et al, 1997; Brouillet et al, 1999). La muerte neuronal puede disminuir por la administración de antagonistas del receptor NMDA (Weller y Paul, 1993; Fink et al, 1996; Pang y Geddes, 1997). Por otro lado, la muerte celular producida por agonistas glutamatérgicos se exagera por el 3-NP (Pang y Geddes, 1997; Greene et al, 1998; Sánchez-Carbente y Massieu, 1999).

Recientemente, diversos laboratorios han reportado un gran número de evidencias que sugieren que la disfunción mitocondrial juega un papel fundamental en la activación de diversos eventos celulares que podrían estar involucrados en la muerte neuronal, tales como: la alteración del potencial de membrana mitocondrial (Ankarcrona et al, 1995; White y Reynolds, 1996; Schinder et al, 1996; Chalmers-Redman et al, 1999), cambios en los flujos iónicos (Kristián y Siesjo, 1997), hinchamiento celular (Patel et al, 1998); activación de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) (Patel et al, 1992; Riepe et al, 1992), desacoplamiento de sistemas de transporte dependientes de energía (Madl y Burgesser, 1993), generación de especies reactivas de oxígeno (Almeida et al, 1999; Brorson et al, 1999), activación de receptores glutamatérgicos (Beal, 1995; Gilland et al, 1998), alteración en el amortiguamiento del calcio intracelular (Nicholls y Budd, 1998), apertura del poro de permeabilidad de transición (Crompton, 1999) y liberación del citocromo c (Green y Reed, 1998), además de la ya mencionada reducción en la concentración interna de ATP (Pang y Geddes, 1997; Greene et al, 1998). Estos eventos pueden conducir a una muerte neuronal apoptótica o necrótica que se

puede observar durante la isquemia; sin embargo, la secuencia o la contribución precisa de cada uno de estos eventos es incierta (Martín et al, 1998; Lipton, 1999). A su vez, se ha observado que el Glu y sus análogos así como el 3-NP, induce la despolarización de la membrana mitocondrial y la reducción de los niveles de ATP en cultivos celulares (Marcaida et al, 1995; Pang y Geddes, 1997), confirmando la interacción compleja entre el estado energético celular y la muerte excitotóxica.

II. HIPÓTESIS

Un estado óptimo del metabolismo energético permite tolerar incrementos en los niveles de Glu extracelular inducido por la inhibición de sus transportadores. Sin embargo, si existe una alteración en el metabolismo energético la células son vulnerables al Glu.

III. OBJETIVOS

Con los antecedentes señalados anteriormente se propopuso el siguiente objetivo general:

Estudiar la relación entre los efectos tóxicos del Glu y el estado energético mitocondrial.

Con este propósito se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Desarrollar un modelo que reproduzca dos condiciones que se presentan durante un periodo isquémico: el incremento en la concentración de Glu extracelular y la falla mitocondrial en cultivos primarios de NGC.
2. Conocer si las NGC son más vulnerables al daño producido por el incremento de Glu extracelular en presencia de inhibidores de la función mitocondrial.
3. Determinar los cambios en la concentración extracelular de Glu en presencia de PDC, 3-NP y 3-NP+PDC

II. HIPÓTESIS

Un estado óptimo del metabolismo energético permite tolerar incrementos en los niveles de Glu extracelular inducido por la inhibición de sus transportadores. Sin embargo, si existe una alteración en el metabolismo energético la células son vulnerables al Glu.

III. OBJETIVOS

Con los antecedentes señalados anteriormente se propuso el siguiente objetivo general:

Estudiar la relación entre los efectos tóxicos del Glu y el estado energético mitocondrial.

Con este propósito se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Desarrollar un modelo que reproduzca dos condiciones que se presentan durante un periodo isquémico: el incremento en la concentración de Glu extracelular y la falla mitocondrial en cultivos primarios de NGC.
2. Conocer si las NGC son más vulnerables al daño producido por el incremento de Glu extracelular en presencia de inhibidores de la función mitocondrial.
3. Determinar los cambios en la concentración extracelular de Glu en presencia de PDC, 3-NP y 3-NP+PDC

4. Estudiar si la presencia de sustratos del metabolismo mitocondrial pueden contrarrestar la muerte neuronal en este modelo experimental.
5. Comparar el posible efecto protector de compuestos que actúan a diferentes niveles celulares como son: metabólico, estrés oxidativo, canales de calcio dependientes de voltaje y receptores glutamatérgicos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivos de Celulares

Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC), se obtuvieron de ratas Wistar de 7-8 días de edad (Bioterio IFC/UNAM), los cuales fueron disectados y cortados en cubos de 300 μm por medio de un rebanador e incubados con una solución de tripsina al 0.25% y dispersados por trituración con una solución que contiene DNAsa e inhibidor de tripsina (0.08% y 0.52% respectivamente), pH 8.2. Las células fueron suspendidas en medio basal mínimo Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina (2 mM), penicilina (50 U/ml), estreptomycin (50 $\mu\text{g/ml}$), gentamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) y KCl (25 mM) y cultivados a una densidad de 1.5×10^6 células por 1ml/pozo en cajas de plástico de 24 multipozos previamente tratadas con poli-L-lisina (5 $\mu\text{g/ml}$). Las células fueron cultivadas por 9 días a 37°C con una humedad del 95% y una atmosfera de CO₂ del 5%. A los 4 días de cultivo (DIV) se agregó a cada uno de los pozos glucosa (5 mM) y citosina arabinosa (10 μM) para inhibir la proliferación de las células gliales. La proporción de neuronas en estos cultivos fue de 93% y la de células gliales de 7% determinada por inmunocitoquímica usando anticuerpos contra MAP₂ y GFAP. Como control se hicieron cultivos puros de astrocitos de cerebelo para descartar que esta proporción de células gliales tuviera un efecto adicional en los resultados obtenidos en nuestro modelo y asegurar que estos fueran específicos de células neuronales. Los cultivos de astrocitos de cerebelo fueron obtenidos de células disociadas de la suspensión sembradas en el mismo medio sin KCl y a la misma densidad que las neuronas

en cajas de plástico de 24 multipozos sin recubrir con poli-L-lisina. El medio no fue cambiado hasta que los cultivos fueron usados para los experimentos.

4.2 Estudios Farmacológicos

En todos los experimentos las NGC y los astrocitos fueron usados a los 9 DIV. Para todos los casos 0.5 ml del medio condicionado fue removido y se agregó el inhibidor de la captura de glutamato (PDC), el inhibidor del metabolismo energético (ya sea 3-NP o azida de sodio) y los fármacos con posible efecto protector, al medio remanente durante 4 horas (a las concentraciones indicadas en las figuras). En algunos experimentos el piruvato se incubó durante 24 horas. Al final del periodo de incubación el medio que contenía los fármacos fue sustituido con el medio condicionado previamente recolectado antes del experimento y mantenido a 37°C. Todos los experimentos fueron realizados por tetraplicado. Cultivos control se incluyeron en cada experimento y se trataron con vehículo en forma paralela. Este protocolo farmacológico fue utilizado para el ensayo de MTT, los ensayos de muerte/vida y las observaciones al microscopio de luz invertido. La morfología de las células y el aspecto general del cultivo fue monitoreado antes y después del tratamiento farmacológico.

4.3 Determinación de la concentración de glutamato

Los niveles de Glu presentes en el medio fueron medidos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés). Al final del periodo de incubación con los fármacos se tomaron alícuotas del medio y se

desproteinizaron con ácido perclórico al 7%; posteriormente fueron neutralizadas con KOH, se tomaron 25 µl de la alícuota y se mezclaron con el mismo volumen de o-phthaldialdehído, después de 3 minutos se tomaron 20 µl para ser inyectados en el sistema de HPLC (Beckman). Se usó una columna de ODS (25 cm x 4 mm de diámetro interno). La fase móvil fue de metanol/acetato de potasio (0.1 M, pH 5.5) y fue corrida a una velocidad de 1.5ml/min en un gradiente lineal (de 15 minutos) de 25 a 75% metanol. Los resultados obtenidos fueron comparados con una mezcla estandar que contiene una concentración conocida de aminoácidos (Sigma), procesados de la misma manera.

4.4 Determinación de viabilidad celular

En todos los casos la evaluación de daño y de la viabilidad neuronal fue realizada 24 horas después del tratamiento farmacológico por 3 métodos: 1) examinación directa de los cultivos a través de microscopio de luz invertido, 2) la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), y 3) por el ensayo de muerte/vida. El ensayo de MTT es usado para valorar la funcionalidad de las enzimas mitocondriales en neuronas viables (Mosmann, 1993; Liu et al, 1997). Este ensayo se basa en el principio de que las enzimas mitocondriales tienen la capacidad de transformar la sal de MTT en una sal de formazán (Berridge y Tan, 1993). El anillo de tetrazolium del MTT es cortado por varias enzimas deshidrogenasas en la mitocondria activa y precipita como formazán, un producto de color azul. Una disminución en la producción de formazan es un índice de la pérdida de la actividad mitocondrial y por lo tanto de daño celular. Brevemente, después de 24 horas del tratamiento farmacológico se les adicionó

MTT (150 μM) a los cultivos. Después de una hora de incubación (37°C, en una atmósfera que contiene 5% CO_2 y 95% O_2), el medio fue aspirado y el formazán precipitado fue solubilizado con 0.8 ml de isopropanol y cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm.

El ensayo de muerte/vida se realizó a través de dos marcadores fluorescentes: la calceína-AM (C-AM) y el homodímero de etidio (HE), que fueron detectados por microscopía de fluorescencia. Para estos experimentos las células se sembraron sobre cubreobjetos en cajas de 12 pozos. La C-AM es un compuesto no fluorescente que es permeable a través de la membrana y es retenido por las células vivas; en presencia de esterasas intracelulares produce fluorescencia verde que es un indicador de viabilidad celular. El HE es excluido de las células normales y sólo puede entrar a las células cuando la membrana está dañada, se intercala entre los pares de bases de los ácidos nucleicos produciendo fluorescencia roja que es un indicador de células no viables (Haugland, 1996). Brevemente, 24 horas después del ensayo farmacológico las células se lavaron dos veces con D-PBS y se expusieron a la C-AM (2 μM) y HE (4 μM) disueltos en D-PBS por 5 minutos, posteriormente se lavaron y se fijaron con paraformaldehído 30 minutos; inmediatamente fueron analizados por microscopía de fluorescencia y cuantificados con un sistema de análisis de imágenes (NIH Image 1.6 para Macintosh). Se contaron 10 campos de tres experimentos por duplicado. El total de células en cada campo se tomó como el 100%, los resultados se expresan como el por ciento de células

marcadas con HE (muertas), con respecto al número total de células (rojas y verdes) presentes en cada campo.

4.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA seguido por una prueba de Fisher de comparación múltiple utilizando el programa Stat View

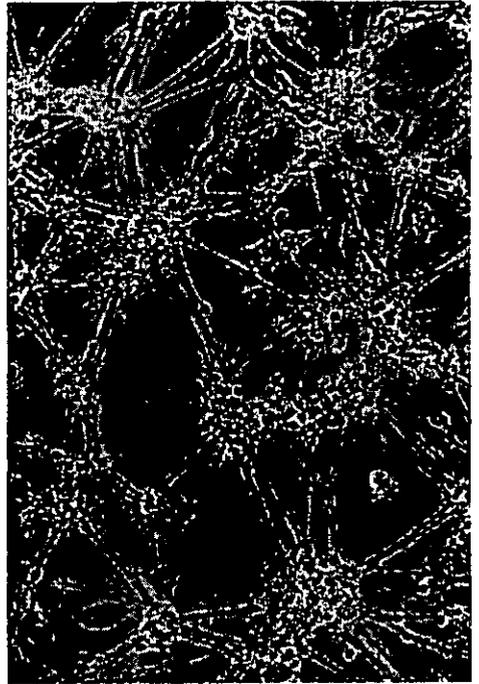
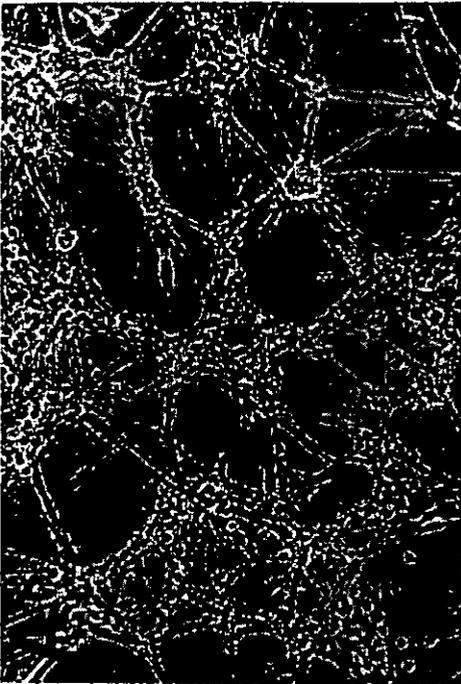
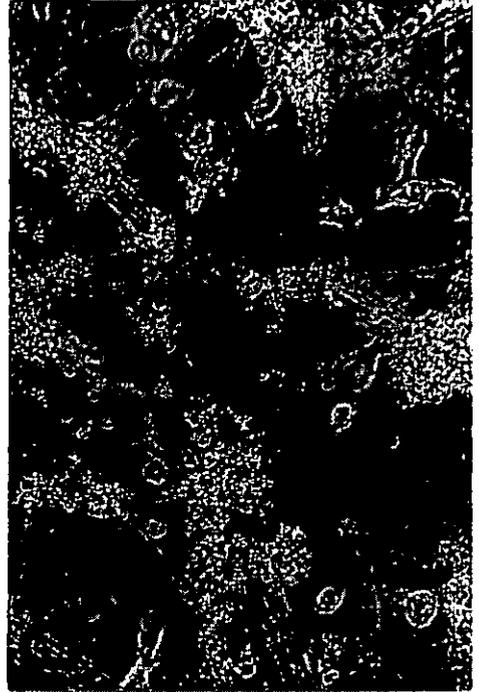
4.5 para Macintosh.

V. RESULTADOS

5.1 Observaciones morfológicas

Las células granulares del cerebelo en cultivo generalmente crecen y maduran en grupos, aunque también se pueden observar células aisladas. Desarrollan prolongaciones o procesos a lo largo de todo el plato de cultivo formando una red intrincada. Las observaciones realizadas bajo el microscopio de luz invertido muestran que los somas aparecen oscuros y redondos con un halo brillante a su alrededor mientras que los procesos generalmente se observan oscuros y gruesos y tienen una forma cilíndrica (Fig. 4A). Veinticuatro horas después de la exposición a 3-NP 500 μ M durante 4 hrs los cultivos no presentan un cambio morfológico aparente (Fig. 4B). Un resultado similar se observa después de la exposición a PDC 500 μ M bajo las mismas condiciones (Fig. 4C), a diferencia de otros trabajos donde se ha demostrado que esta concentración de PDC es tóxica en otros tipos celulares como son los cultivos de células corticales (Robinson et al, 1993; Blitzblau et al, 1996; Velasco et al, 1996; Volterra et al, 1996). Los cultivos incubados durante 4 horas en presencia de 3-NP+PDC y observados 24 horas después de la exposición, muestran alteraciones morfológicas celulares tales como: somas brillantes y encogidos y presencia de varicosidades o pérdida de las neuritas (Fig. 4D). Resultados similares se observan después de la exposición a Glu (500 μ M) durante 45 minutos (ver más adelante). Las observaciones morfológicas correlacionan con los resultados del ensayo de muerte/vida y con las de reducción de MTT utilizados como indicadores de la viabilidad celular.

Figura 4. Efecto del 3-NP, el PDC y el PDC+3-NP (500 μ M) después de 4 hrs. de incubación en NGC. Las observaciones fueron realizadas 24 hrs después del ensayo farmacológico. Las fotos fueron tomadas directamente en un microscopio de luz invertido. En los cultivos controles (A) se observan perfectamente bien los somas y procesos neuronales. La administración de 3-NP (B) o PDC (C) no produce una alteración evidente de la morfología de los cultivos; sin embargo, la coincubación de 3-NP+PDC destruye casi por completo a las neuronas y neuritas (D). Las fotografías muestran un cultivo representativo.



5.2 El daño producido por 3-NP+PDC fue similar al observado por agonistas glutamatérgicos

A través del ensayo de MTT se demostró que las NGC expuestas a Glu (500 μM) durante 45 min tuvieron un daño similar a la coincubación del 3-NP+PDC (500 μM) durante 4 hrs. La exposición a NMDA (500 μM) en las mismas condiciones que el Glu produce una discreta pero significativa disminución de la reducción del MTT (Fig. 5). La diferencia entre el daño producido por el Glu y el NMDA se deben a las condiciones de incubación. Para los experimentos con el Glu se utilizó un medio Ringer Krebs sin Mg^{2+} , mientras que los experimentos con el NMDA se realizaron directamente en el medio de cultivo de las células. Estos experimentos confirman, como ha sido antes demostrado, que las NGC son sensibles a los efectos tóxicos del Glu. El MK801 (10 μM) revirtió la disminución en la capacidad de reducir MTT inducida por el glutamato, el NMDA y el 3-NP+PDC (Fig. 5). Los valores de la reducción de MTT fueron: control, 100%; 3-NP+PDC, $44.16 \pm 2.9\%$; 3-NP+PDC+MK801, 88.79 ± 4.9 ; Glu, 51.51 ± 3.8 ; Glu+MK801, 86.82 ± 5.1 ; NMDA, 77.83 ± 5.1 ; NMDA+MK801, 103.45 ± 7.5 como se observa en la figura 5, solamente la condición de NMDA+MK801 mostró una protección del 100%. Cultivos paralelos fueron utilizados para valorar la viabilidad celular por microscopía de fluorescencia, en estos experimentos se observó que los cultivos control presentaron fluorescencia verde en la mayoría de los somas y en las neuritas, lo cual indica que estas células están vivas, mientras que, en los cultivos expuestos a 3-NP+PDC se observó un 45.6% de células muertas, positivas a la fluorescencia roja, lo que indica que la mitad de las células bajo estas condiciones mueren. Este efecto fue

revertivo en presencia de MK801 (10 μm) y piruvato (2 mM) disminuyendo el porcentaje de células muertas al 20.14% y 19.03% respectivamente. Estos resultados correlacionan con los de la reducción de MTT y por lo tanto ambos métodos pueden ser utilizados en forma rutinaria para determinar la viabilidad celular (Tabla 1; Fig. 6).

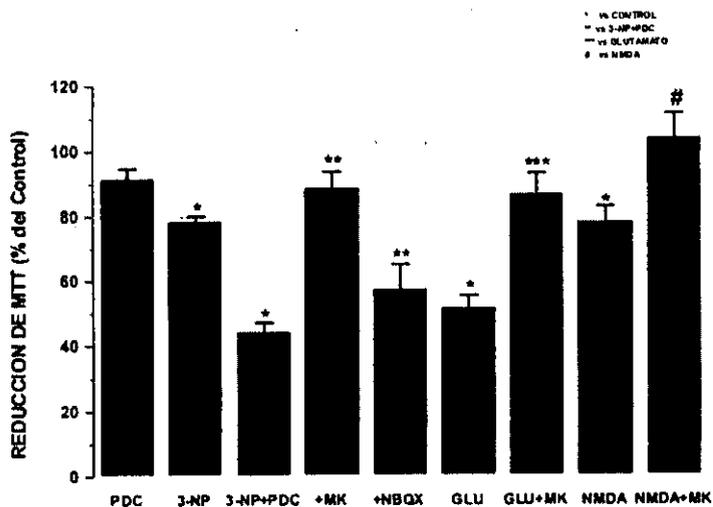


Figura 5. Efecto del 3-NP + PDC y agonistas glutamatérgicos sobre la reducción de MTT en las NGC. El MTT (150 μ M), fue agregado a los cultivos 24 horas después de iniciado el tratamiento farmacológico y medido su producto, el formazán, con un espectrofotómetro a 570 nm. Las barras representan el promedio de 6 datos \pm ES. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre distintas condiciones. El 3-NP+PDC produce un daño similar al inducido por glutamato que es revertido por MK801 en ambas condiciones. El daño producido por NMDA también es revertido completamente en presencia de MK801. *, **, *** $P < 0.05$ (n=6).

Figura 6. Observaciones morfológicas observadas después de realizar el ensayo de fluorescencia muerte/vida. Las fotografías fueron tomadas 24 horas después de iniciado el tratamiento farmacológico como se describe en *Materiales y Métodos*. En los cultivos control (A) la mayoría de las células muestran una fluorescencia verde (positivas a C-AM) en los somas y procesos así como algunas células muertas rojas fluorescentes (positivas al HE) que representan aproximadamente el 12% del total de células observadas en el campo (Tabla 1). La exposición de 3-NP+PDC (B) incrementa el porcentaje de las células muertas; ya que la proporción de células rojas es mucho mayor que en el cultivo control. En C y D se muestra el efecto protector del piruvato (2 mM) incubado durante 24 hrs y del MK801(10 μ M) incubado durante 4 hrs. En ambos casos la proporción de células muertas rojas fluorescentes disminuyó considerablemente. Las microfotografías fueron tomadas a 40X.

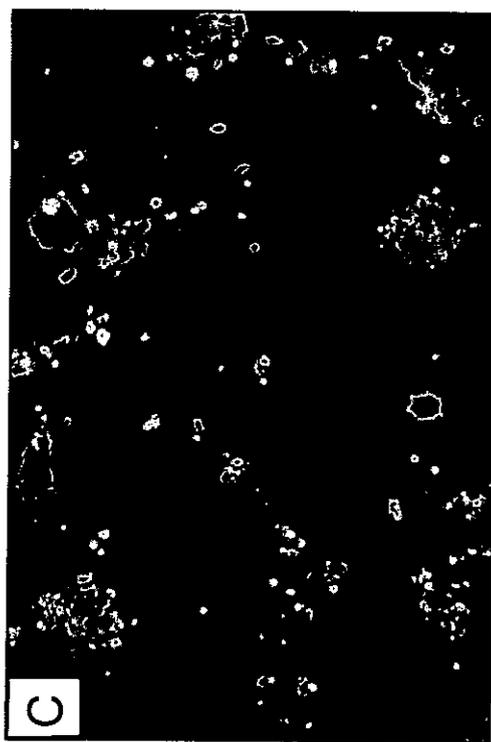


Tabla 1. Viabilidad celular determinada a través del ensayo de muerte/vida y de la reducción de MTT

	CONTROL	3-NP+PDC	+MK801	+PIRUVATO
% DE CÉLULAS MUERTAS	12.12±1.5	47.16±2.0	20.14±1.6	16.7±2.6
% DE REDUCCIÓN DE MTT relativo al control	100	44.16±2.9	88.79±4.9	79.0±4.1

Tabla 1. Después de 24 horas de exposición con los fármacos la sobrevivencia celular fue determinada por el ensayo de muerte/vida (% del total) y la reducción de MTT (% del control) como se describe en Materiales y Métodos. Con ambos ensayos se obtienen resultados muy similares por lo que pueden ser utilizados en forma rutinaria para medir la viabilidad celular. (n= 4-6)

Tabla 2. Concentración extracelular de amino ácidos en NGC (µM).

	Glutamato	Aspartato	Glutamina	Glicina	Taurina	Alanina
Control	18.10 ± 4.2	2.54 ± 0.71	648.03 ± 79.17	147.95 ± 6.3	30.62 ± 4.2	218.03 ± 18.37
3-NP	23.76 ± 4.9	2.40 ± 0.62	605.15 ± 75.29	145.79 ± 9.3	30.80 ± 3.3	211.75 ± 11.75
PDC	35.09 ± 9.9*	4.80 ± 1.0*	521.19 ± 72.67	160.85 ± 12.09	32.02 ± 3.9	212.67 ± 14.55
3-NP+PDC	29.57 ± 6.4	3.70 ± 0.88	526.61 ± 50.01	140.95 ± 6.7	39.92 ± 2.9	184.10 ± 10.14

Tabla 2. Concentración extracelular de aminoácidos en NGC medidos por HPLC en alícuotas tomadas del medio después de 4 horas de incubación con los diferentes tratamientos. Como se observa, solamente la concentración extracelular de glutamato y aspartato se incrementó significativamente en presencia de PDC. La administración de 3-NP o la coincubación de PDC+ 3-NP no produjo un incremento adicional en la concentración de estos aminoácidos con respecto al producido por el PDC. Los niveles extracelulares de glutamina, glicina, taurina y alanina no se alteran en ninguna de las condiciones experimentales. * P < 0.05 relativo al control. (n= 4-6)

5.3 El daño producido por el 3-NP+PDC no se debe a un incremento adicional en la concentración de Glu extracelular al inducido por PDC

Con el fin de conocer si el daño neuronal inducido por 3-NP+PDC se debe a una acumulación adicional de aminoácidos excitadores en el medio de cultivo, se determinó la concentración de aminoácidos en el medio después del periodo de incubación con PDC solo y en presencia de 3-NP. Como se muestra en la Tabla 2, el PDC induce una elevación de casi 2 veces la concentración extracelular de Glu y aspartato; sin embargo, el daño neuronal inducido en presencia de 3-NP+PDC no se asocia con una acumulación adicional de estos aminoácidos excitadores ya que el 3-NP no tiene ningún efecto sobre la concentración extracelular de los aminoácidos ni en presencia ni en ausencia del PDC. No se observan cambios en la concentración extracelular de glutamina, glicina, alanina y taurina después de los tratamientos individuales de 3-NP y PDC o de la coincubación de ambos compuestos.

5.4 El daño producido por 3-NP + PDC es específico de células neuronales

Los cultivos de NGC presentan un 7% de células gliales, este porcentaje de células no neuronales puede contribuir a la reducción de MTT y por lo tanto afectar los datos de protección y muerte en nuestro modelo. Con el fin de descartar esta posibilidad, se realizaron cultivos puros de células gliales de cerebelo. La reducción de MTT en estos cultivos no se modificó en presencia de 3-NP aún a altas concentraciones. Los valores de reducción de MTT para 3-NP 0.5, 1.0 y 2.0 mM fueron: $101.8 \pm 4.7\%$; $101.9 \pm 3\%$ y $96.27 \pm 5.2\%$ respectivamente

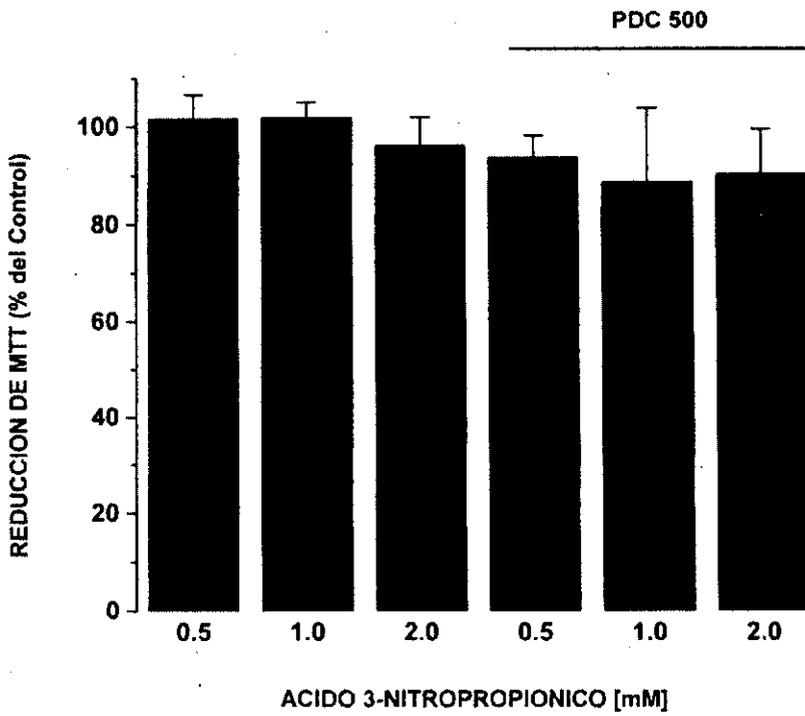
(Fig. 7B). La reducción de MTT no se alteró cuando el 3-NP (0.5, 1.0 y 2.0 mM) se incubó en presencia de PDC (500 μ M), los valores de reducción de MTT fueron: $93.73 \pm 4.3\%$; $88.65 \pm 15\%$; $90.21 \pm 9\%$ respectivamente; esta reducción no fue significativa con respecto al control (Fig. 7B). En ningún caso se observa una alteración morfológica en los cultivos (Fig. 7A). Estos datos sugieren que el daño observado en el modelo es exclusivo de células neuronales.

Figura 7. Efecto del 3-NP y del PDC sobre la morfología y la reducción de MTT de cultivos de células gliales de cerebelo de 9 DIV. En A se muestra que no existe ninguna alteración morfológica en los astrocitos cuando fueron expuestos al 3-NP (0.5 mM) y al 3-NP+PDC (0.5 mM) durante 4 horas y observados 24 horas después del tratamiento. En B se muestra una gráfica donde se observa que el 3-NP más PDC y el 3-NP solo, aún a concentraciones elevadas, no afectó la reducción de MTT con respecto al control. Las barras representan el promedio de 6 datos \pm ES.

A



B



5.5 La inhibición del metabolismo energético es un evento clave en la susceptibilidad de las neuronas a los efectos tóxicos del Glu

Como se mostró en las figuras 4 y 5, la administración de PDC no produce daño en los cultivos a pesar de incrementar notablemente la concentración de Glu extracelular (Tabla 2); sin embargo, en presencia del 3-NP, el Glu se vuelve tóxico para las NGC. Con el fin de comprobar si el daño que observamos en nuestro modelo se debe al desacoplamiento del metabolismo energético y no a algún efecto adicional del 3-NP se utilizó azida de sodio (AS), un inhibidor del complejo IV (citocromo oxidasa) de la cadena de transporte de electrones. La AS ha sido utilizada en modelos de neurotoxicidad y anoxia *in vivo* e *in vitro* (Brouillet et al, 1994; Varming et al, 1996; Cebers et al, 1998). La AS 0.1, 0.3 y 0.5 mM fue incubada durante 4 horas en los cultivos. Con las concentraciones de 0.1 y 0.3 mM de AS no se observó una disminución significativa en la reducción de MTT veinticuatro horas después del tratamiento farmacológico (Fig. 8B); sin embargo, la concentración de 0.5 mM fue tóxica para los cultivos (los valores de reducción de MTT fueron: AS 0.1 mM, $99.34 \pm 3.8\%$; AS 0.3 mM, $89.66 \pm 6.5\%$; AS 0.5 mM, $52.5 \pm 15.38\%$), la presencia de PDC (500 μM) exacerbó el daño celular en las concentraciones no tóxicas de AS. El efecto tóxico de la AS (0.5 mM) fue revertido por la administración de MK801 (AS 0.5 mM+MK801 $104.65 \pm 0.76\%$, datos no mostrados) al igual que la disminución de la reducción de MTT inducida por AS+PDC (los valores de reducción de MTT fueron: AS 0.1mM+PDC 45.97 ± 15.67 ; AS 0.3mM+PDC, 39.91 ± 13.63 ; AS 0.1mM+PDC+MK801, 104.55 ± 7.0 ; AS 0.3mM+PDC+MK801, 93.25 ± 2.7), estos valores correlacionan con las observaciones morfológicas (Fig.

8A), lo cual sugiere que metabolismo energético tiene que ser preservado para contrarrestar el efecto tóxico del Glu.

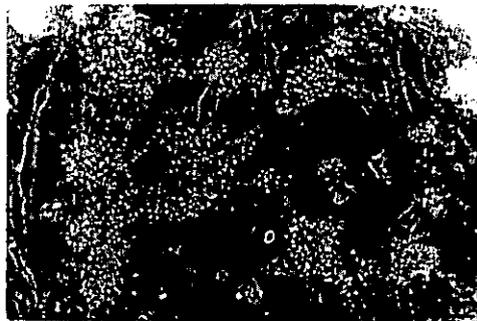
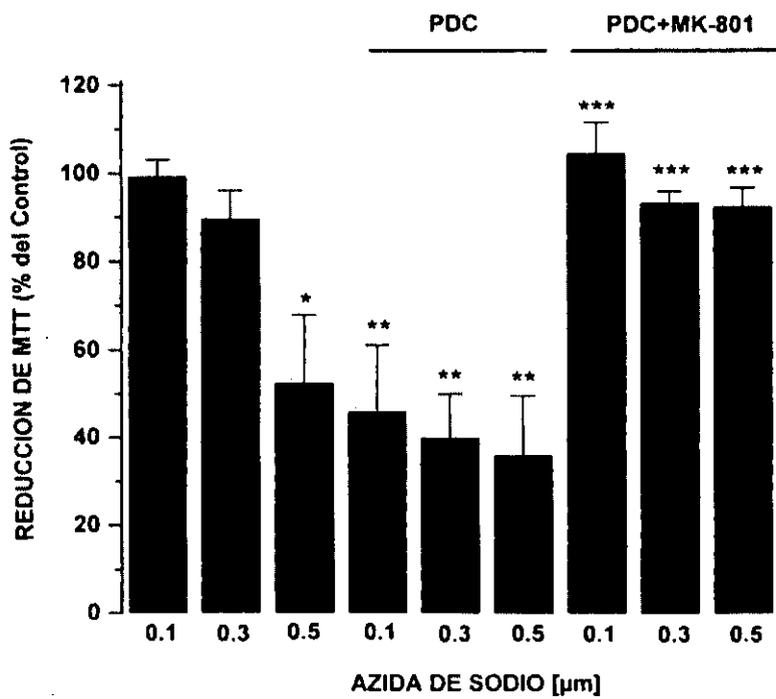
Figura 8. Efecto de la azida de sodio (AS) y del PDC sobre la morfología de NGC (A) y la reducción de MTT (B). La AS se incubó durante 4 horas a las concentraciones que se indican en la gráfica. En experimentos paralelos se incubó la AS en presencia de PDC (500 μ M) y de PDC \pm MK801 (10 μ M). 24 horas después del tratamiento farmacológico, se realizaron las observaciones morfológicas y el ensayo de MTT. Concentraciones menores de 0.5 mM de AS no son tóxicas para los cultivos pero la presencia de PDC en estas condiciones produjo un daño celular significativo el cual fue revertido por la administración de MK801. Las barras representan el promedio de 6-7 datos \pm ES (*signifivativo vs control; ** signifivativo vs AS, *** significativo vs AS+PDC; $P < 0.05$).

A

AZIDA DE SODIO



AZIDA DE SODIO + PDC

**B**

5.6 Protección contra el daño inducido por 3-NP + PDC

Con el fin de conocer la contribución de los diferentes eventos celulares posiblemente involucrados en el daño neuronal inducido en nuestro modelo experimental se usaron diversas drogas que actúan a diferentes niveles como posibles neuroprotectores. Como se observa en la figura 9, los sustratos energéticos piruvato (2 mM) y acetoacetato (5 mM) producen un efecto neuroprotector contra el daño inducido por 3NP+PDC cuando estuvieron presentes durante las cuatro horas de incubación. Sin embargo, el efecto protector de estos compuestos fue parcial pues sólo se restauró la capacidad de reducción de MTT a 59.9 ± 4.0 y $64.4 \pm 7.5\%$ respecto al control, respectivamente. Una notable protección fue observada cuando el piruvato fue incubado durante y después de la exposición de 3-NP+PDC, restaurando la capacidad de reducción de MTT a $79.0 \pm 4.1\%$ del control. La incubación con acetoacetato por 24 hrs no tuvo un mayor efecto protector. El antioxidante vitamina E (250 μM) y el atrapador de radicales libres PBN (500 μM) muestran una protección parcial idéntica contra el daño inducido por el 3-NP+PDC (61.55 ± 7.7 y $61.04 \pm 8.6\%$ de reducción de MTT respecto al control). El antagonista del receptor NMDA, el MK801 (10 μM) presentó la mayor protección ($88.79 \pm 4.9\%$ de reducción de MTT respecto al control) mientras que el antagonista no-NMDA el NBQX (100 μM) tuvo una protección parcial ($57.39 \pm 7.7\%$ reducción de MTT). En contraste a estos compuestos, los antagonistas de canales de calcio dependientes de voltaje no mostraron ningún efecto protector. Ninguna de estas drogas altera la reducción de MTT en cultivos control. Sin embargo, el piruvato y el acetoacetato

si son capaces de contrarrestar el daño inducido por el 3-NP (datos no mostrados).

Las observaciones morfológicas corroboran el efecto neuroprotector de las diferentes drogas probadas. Como se observa en la figura 10, los cultivos se preservan en presencia de acetoacetato (B) y vitamina E (D), mientras que los cultivos incubados con piruvato durante 24 hrs (C) y MK801 (E) presentan una morfología celular prácticamente idéntica a la de los cultivos control. La presencia de nitrendipina en estas condiciones experimentales no tuvo ningún efecto protector (F). Resultados similares se observaron con el ensayo de muerte/vida (Tabla 2; Fig. 6).

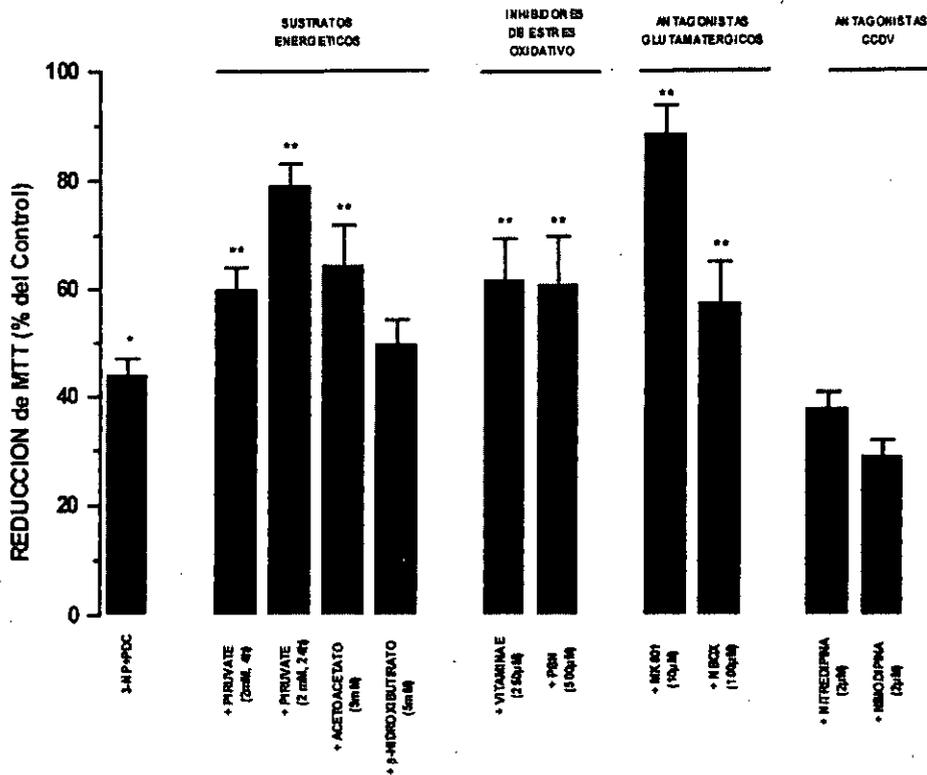
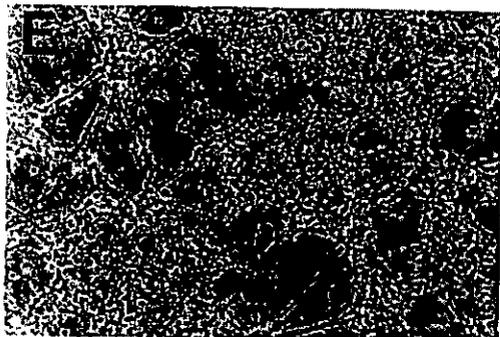
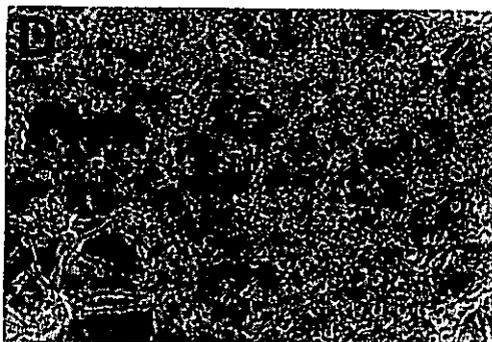
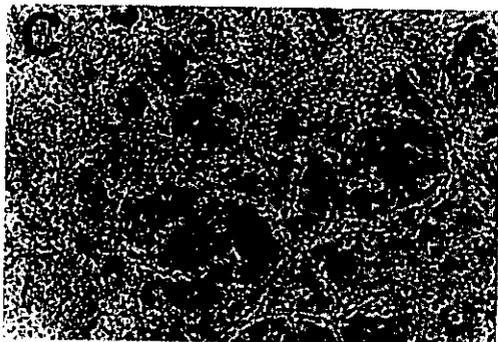
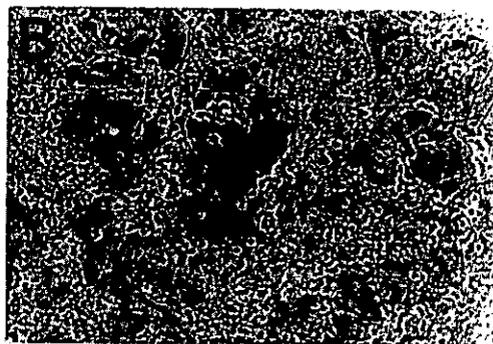
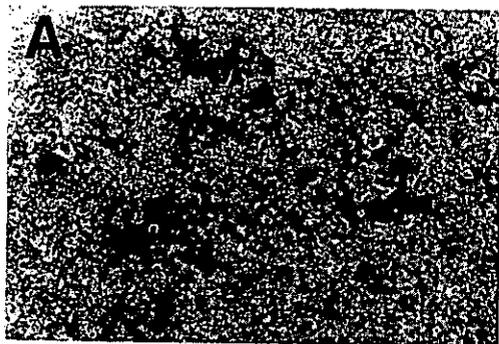


Figura 9. Mecanismos de protección contra el daño producido por 3-NP y PDC. Los fármacos fueron coincubados con el 3-NP y el PDC durante cuatro horas a las concentraciones que se indican en la gráfica. En otra serie de experimentos el piruvato se incubó durante y después de la exposición de 3-NP y PDC (Piruvato 24 h); veinticuatro horas después del tratamiento se realizó el ensayo de MTT como se describe en MATERIALES Y MÉTODOS. Los valores representan el promedio de 6-8 datos \pm ES (* significativo vs control ; ** significativo vs 3-NP+PDC, $P < 0.05$).

Figura 10. *Microfotografías que muestran la preservación de la morfología general de los cultivos de NGC en presencia de diferentes fármacos coincubados en presencia de 3-NP+PDC. 24 hrs después de incubar en presencia de 3-NP+PDC durante 4 hrs, los cultivos celulares se observan muy dañados. Hay células muertas y las neuritas no están bien preservadas ya que se ven fragmentadas o adelgazadas (A). En presencia de acetoacetato (B), piruvato (24 hrs) (C), vitamina E (D) y MK801 (E) la morfología general de los cultivos se preserva, mientras que en presencia de nitrendipina (F) los cultivos se ven dañados.*



VI. DISCUSION

La falla del metabolismo energético asociada a la isquemia cerebral induce la muerte neuronal a través del desencadenamiento de varios eventos como son: la disfunción en la respiración mitocondrial, la disrupción de los gradientes iónicos, el decremento de ATP, la liberación de Glu y la producción de radicales libres (Lipton et al, 1999). Sin embargo, la secuencia o la contribución precisa de cada uno de estos eventos no es clara. En el presente trabajo se examinó la relación entre dos eventos que ocurren durante la isquemia: la alteración en el metabolismo energético debida a la disfunción mitocondrial y la acumulación de Glu extracelular inducida por la inhibición de sus transportadores en cultivos de NGC.

El mecanismo que produce la acumulación de Glu extracelular durante la isquemia no es claro, pero se sugiere que puede resultar del cambio de dirección en el funcionamiento del transportador de Glu, producido por cambios en los gradientes iónicos y la depleción de ATP (Rossi et al, 2000; Jabaudon et al, 2000). Experimentos *in vitro* en células corticales han reportado que la inhibición del transporte de Glu induce un incremento del Glu extracelular y neurodegeneración (Velasco et al, 1996; Volterra et al, 1996; Blitzblau et al, 1996). Sin embargo, en el presente trabajo se demostró que las neuronas granulares de cerebelo son resistentes a la elevación de los niveles de Glu extracelular inducida por la administración de PDC, un inhibidor de su transporte. Las diferencias entre la vulnerabilidad de las células granulares y las células corticales a los efectos tóxicos del PDC puede estar relacionada con la

expresión diferencial de subtipos del receptor NMDA que confieren diferente permeabilidad a los iones Ca^{2+} . Se tiene reportado que en las células corticales la toxicidad del Glu está correlacionada con la expresión de las subunidades NR1 y NR2B del receptor NMDA (Cheng et al, 1999) y la combinación de estas subunidades se cree puede ser crítica para la toxicidad por Glu (Mizuta et al, 1998). En contraste, en el cerebelo la subunidad NR2B se expresa transitoriamente durante el desarrollo, mientras que la expresión de la subunidad NR2C se incrementa después del nacimiento y tiene su máxima expresión en la edad adulta (Monyer et al, 1994; Watanabe et al, 1994; Rafiki et al, 2000). Los receptores a NMDA que contienen la subunidad NR2C son menos sensibles al Glu y sus agonistas (Krupp et al, 1996; Gray et al, 1997). En este sentido recientemente se ha reportado que: 1) la subunidad NR2Cb una variante de la subunidad NR2C expresada durante el desarrollo de las NGC, en combinación con la subunidad NR1 tienen una baja permeabilidad al Ca^{2+} cuando las células son estimuladas por Glu (Rafiki et al, 2000) y 2) la tolerancia de las NGC al tratamiento crónico de PDC (100 μM , 48 h), se deba a un posible rearrreglo de las subunidades de los receptores NMDA inducida por la exposición continua de Glu (Cebers et al, 1999).

El 3-NP inhibe a la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), que es activa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la fosforilación oxidativa. La administración de 3-NP *in vivo* produce lesiones parecidas a las producidas por agonistas glutamatérgicos por lo que se piensa que induce muerte neuronal a través de un mecanismo excitotóxico. Además, reproduce las características

conductuales y neuropatológicas de la enfermedad de Huntington en roedores y primates no humanos (Borlonga et al, 1997; Brouillet et al, 1999). Por otra parte en modelos *in vitro* el 3-NP inhibe la actividad de la SDH rápidamente, disminuye los niveles de ATP y produce una muerte celular posiblemente excitotóxica (Olsen et al, 1999). Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio han demostrado que en las NGC, el 3-NP (500 μ M) inhibe un 90% la actividad de la SDH desde a los 30 minutos y ésta permanece por 24 horas, sin causar un daño morfológico a las neuronas. Estos datos sugieren que las NGC pueden tolerar una pequeña falla mitocondrial y sobrevivir con la transferencia de electrones generada a través de los complejos mitocondriales activos restableciendo las demandas energéticas de la célula (Murphy et al, 1999). En este sentido se tiene reportado que las concentraciones no tóxicas de 3-NP y AS utilizadas en nuestro estudio existe una reducción parcial de ATP que no está asociada a un daño celular (Cebers et al, 1998; Greene et al, 1998). Recientemente algunas evidencias experimentales sugieren que, aún bajo condiciones de inhibición metabólica extrema, las células podrían sobrevivir con el ATP generado por la glucólisis (Budd y Nicholls, 1996; Chalmers-Redman et al, 1999; Seo et al, 1999; Tian y Backer, 2000).

La inhibición metabólica en presencia del PDC induce un daño neuronal notable. Estas evidencias sugieren que las células se vuelven susceptibles al Glu cuando su metabolismo energético se encuentra disminuido, lo cual concuerda con resultados similares reportados *in vivo* (Sanchez-Carbente y Massieu, 1999). El daño es exclusivo de células neuronales ya que cultivos

puros de astrocitos no son afectados. La toxicidad del PDC en presencia de 3-NP no parece deberse a un incremento adicional de los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores en el medio, ya que el 3-NP no induce cambios en la concentración de estos aminoácidos ya sea en ausencia o en presencia de PDC. Esto sugiere que durante la isquemia, las células neuronales se vuelven vulnerables a la elevación transitoria de los niveles de Glu extracelular porque su metabolismo energético está inhibido.

En el presente estudio se probaron diferentes agentes que previenen la muerte neuronal de las células granulares de cerebelo en condiciones que mimetizan la isquemia. Los sustratos energéticos como el piruvato y el acetoacetato tuvieron una protección parcial cuando son incubados durante 4 horas contra el daño producido por el 3-NP+PDC. El efecto protector de estos compuestos puede estar relacionado con su capacidad para restaurar el déficit energético inducido por el 3-NP actuando como sustratos del ciclo de los ácidos tricarbóxicos a través de su conversión a acetyl-CoA.

Diversas evidencias apoyan el papel protector del piruvato en diferentes modelos experimentales. El piruvato puede preservar la función sináptica y la integridad morfológica de las neuronas en rebanadas de hipocampo en ausencia de glucosa y durante la inhibición de la glucólisis (Izumi et al, 1997), y proteger contra la toxicidad inducida por Glu en cultivos de células corticales (Ruiz et al, 1998), y por NMDA en ausencia de glucosa en cultivos de células de estriado, por un mecanismo que probablemente involucra la producción de ATP (Maus et al, 1999). Otros trabajos sugieren que el mecanismo de protección del piruvato

se debe al incremento en la velocidad de respiración mitocondrial, a la disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular o a la reducción de la concentración de glutamato extracelular a través de un agente con actividad parecida a la glutamato-piruvato transaminasa (Villalba et al, 1994; Eimerl y Schramm, 1995; Maus et al, 1999). El efecto protector del piruvato incubado por 24 horas puede deberse a su capacidad de reaccionar con el peróxido de hidrógeno para que por medio de una descarboxilación oxidativa se genere acetato, bióxido de carbono y agua evitando el estrés oxidativo (Desagher et al, 1997). Por el contrario, el acetoacetato no incrementa su efecto protector cuando es incubado por 24 horas.

Otra posibilidad es que el piruvato y acetoacetato incrementen significativamente la formación de ácido quinurénico, un antagonista endógeno del receptor NMDA. El ácido kinurénico es sintetizado a partir de un metabolito del triptofano la L-kinurenina, a través de la kinurenina aminotransferasa. Existen dos tipos de kinurenina aminotransferasa (tipo I y II) localizadas preferentemente en las células gliales. Ambas enzimas dependen de fosfato de piridoxal como cofactor y utilizan al piruvato y en ocasiones al α -cetoglutarato como cosustratos para la transaminación. Una vez formado el ácido kinurénico es liberado al espacio extracelular (Hodgkins y Schwarcz, 1998a, 1998b).

Los cuerpos cetónicos como el acetoacetato pueden reemplazar a la glucosa como la principal fuente de energía cuando hay una alteración del metabolismo energético como es el caso de la isquemia y la hipoglicemia (Nehlig y Pereira de Vasconcelos, 1993). El efecto protector de los cuerpos cetónicos

como el acetoacetato también puede explicarse por: 1) un aumento en la concentración local de piruvato, el cual resultaría de la inhibición de la piruvato deshidrogenasa por el exceso de acetil-CoA (Hodgkins y Schwarcz, 1998b) y 2) por un aumento en la síntesis de GABA y disminución en la síntesis de aspartato. Los cuerpos cetónicos se convierten en acetil-CoA la cual se condensa con el oxalacetato para formar citrato. Si esta reacción se favorece disminuirán las pozas de oxalacetato y por lo tanto la transaminación del Glu al aspartato y α -cetoglutarato. Si el Glu no está disponible para esta reacción, entonces habría más glutamato disponible para la síntesis de GABA por la glutamato deshidrogenasa (Daikhin y Yudkoff, 1998).

Numerosos reportes en la literatura demuestran el papel del estrés oxidativo en el daño neuronal inducido por Glu e inhibidores mitocondriales. Además, la autooxidación del transporte de electrones induce la producción de especies de oxígeno reactivas (Lafon-Cazal et al, 1993; Dugan et al, 1995; Gunaseker et al, 1995; Alexi et al, 1998; Murphy et al, 1999). En el presente trabajo se sugiere que la producción de radicales libres participa en la cadena de eventos que llevan a la muerte celular ya que la vitamina E y el PBN mostraron un efecto protector contra el daño celular producido en nuestras condiciones experimentales. Se ha demostrado ampliamente que la vitamina E (α -tocoferol) evita la lipoperoxidación (Diplock, 1997; Hall, 1997) y tiene un efecto protector contra la toxicidad del Glu y el daño neuronal y mejora los déficits de memoria y aprendizaje inducidos por péptido β -amiloide, además de evitar la apoptosis que ocurre espontáneamente durante la maduración de las NGC (Ciani et al, 1996;

Yamada et al, 1999; Mason et al, 1999). El PBN, es un atrapador de radicales libres que protege contra el daño oxidativo; el PBN interacciona con las moléculas que tienen un radical libre formando un compuesto más estable llamado spin aductor (Thomas, 1997). Nuestros resultados están de acuerdo con otros estudios que han mostrado un efecto protector del PBN contra el daño producido por el 3-NP y el malonato (Schulz et al, 1996; Olsen et al, 1999).

Las lesiones inducidas por el Glu y las asociadas a la isquemia cerebral han sido vinculadas a la activación de CCDV, en particular los tipo L, (Choi, 1988; Stuver et al, 1996; Pisani et al, 1997; Leski, 1999). En el presente trabajo se observó que la administración de la nitrendipina y la nimodipina, bloqueadores de estos canales, no previenen la muerte celular producida por el 3-NP+PDC, por lo que es posible que exista un aumento en la concentración de calcio intracelular asociada a la muerte celular en nuestro modelo ésta se deba a su entrada por los receptores glutamatérgicos tipo NMDA. En este sentido se ha propuesto que la vía de entrada del calcio y no en si el aumento de su concentración intracelular, es el factor determinante para la vulnerabilidad neuronal a la toxicidad de este catión (Sattler et al, 1998; Peng y Greenamyre, 1998).

La inhibición de la función mitocondrial por el 3-NP puede conducir a la activación de los receptores NMDA aún en presencia de concentraciones bajas de Glu produciendo un daño neuronal similar al isquémico a través de un mecanismo de excitotoxicidad secundaria anteriormente explicado (ver muerte celular por isquemia en la Introducción). De acuerdo a esto, se observó una

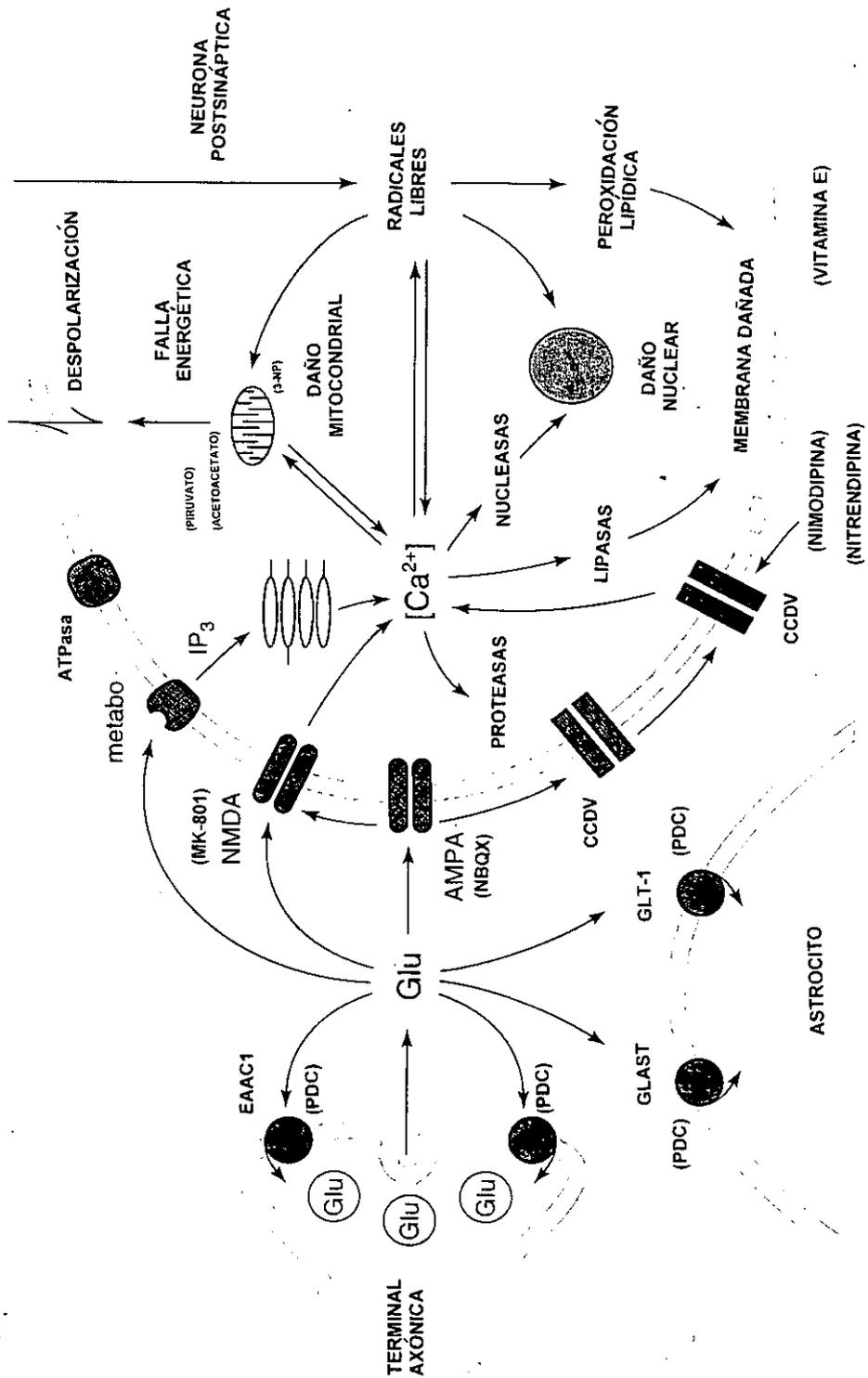
notable protección con los antagonistas glutamatérgicos, en particular con el MK801. La administración de antagonistas glutamatérgicos es muy eficiente para contrarestar la pérdida neuronal *in vivo* e *in vitro* en modelos de isquemia cerebral y de excitotoxicidad (Simon et al, 1984; Wieloch, 1985; Sheardown et al, 1990; Massieu y Tapia, 1994, Vornov et al, 1995); sin embargo, su administración con fines terapéuticos puede producir efectos secundarios como la hipertensión, la sedación y la ataxia (Holt, 1997). Por esta razón es necesario buscar otros mecanismos que permitan contrarestar la pérdida neuronal asociada a la isquemia y a las enfermedades neurodegenerativas. En este sentido la administración de sustratos energéticos puede representar una nueva estrategia terapéutica.

La interpretación de nuestros experimentos podría ser la siguiente: un desacoplamiento en el metabolismo energético mitocondrial inducido por el 3-NP predispone a las células granulares a la neurodegeneración inducida por Glu. En una primera fase la disfunción mitocondrial por el 3-NP produce una disminución en la concentración intracelular de ATP y como consecuencia la disrupción de los gradientes iónicos mantenidos por la actividad de las ATPasas de Na^+/K^+ y de Ca^{2+} . Esto causaría la activación de los receptores NMDA y la generación de especies reactivas de oxígeno y una alteración en la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Adicionalmente el Glu extracelular acumulado en el medio debido a la presencia del PDC sobreestimularía el receptor NMDA aumentando aún más la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, produciendo un daño excitotóxico.

Además, la exposición directa a Glu en cultivos primarios de cerebelo produce una reducción en los niveles de ATP (Marcaida et al, 1995). En este sentido se ha demostrado que la activación prolongada de los receptores NMDA genera una sustancial despolarización mitocondrial que correlaciona con un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la muerte celular. Se sugiere que el incremento de Ca^{2+} inducido por el Glu puede ser una consecuencia de la disfunción mitocondrial (Schinder et al 1996). Por lo tanto, la falla mitocondrial puede jugar un papel esencial en la degeneración excitotóxica y puede predisponer a las neuronas a la toxicidad del Glu, a su vez, el daño excitotóxico puede contribuir a la falla mitocondrial generando un círculo vicioso que lleve a la muerte celular (Fig. 11).

En el presente trabajo se desarrolló un nuevo modelo experimental que involucra dos eventos que ocurren durante la isquemia: la disfunción de la respiración mitocondrial y liberación de Glu en cultivos neuronales. Los presentes datos sugieren la convergencia de tres eventos durante la isquemia: la disminución de ATP, la producción de radicales libres y la acumulación de Ca^{2+} intracelular a través del receptor NMDA; y la posibilidad de evitar la muerte neuronal mediante sustratos energéticos alternativos a la glucosa.

Figura 11. Representación esquemática de los posibles eventos celulares involucrados en el daño inducido por el 3-NP+PDC en NGC. Los receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos (metabo), son los tres principales subtipos de los receptores a glutamato representados en la neurona postsináptica. Los transportadores de glutamato GLAST y GLT-1 son predominantes de las células gliales mientras que el transportador EAAC1 es localizado principalmente en las neuronas. El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la falla mitocondrial asociadas a la excitotoxicidad o a la excitotoxicidad secundaria podrían tener un papel fundamental en la muerte de las células nerviosas (ver texto). La ubicación de las diferentes drogas utilizadas en nuestro modelo para inducir el daño y la protección son señaladas entre paréntesis.



VII. CONCLUSIONES

- 1.- Las NGC son resistentes a la toxicidad del Glu extracelular acumulado al inhibir sus sistemas de recaptura con PDC.
- 2.- Estas células se vuelven susceptibles a los efectos tóxicos del Glu cuando sus niveles energéticos se encuentran disminuídos por la presencia del 3-NP o la AS en concentraciones en las que no producen daño celular.
- 3.- La neurodegeneración producida por la coincubación de 3-NP+PDC no se debe a un incremento adicional en la acumulación de Glu extracelular.
- 4.- La coincubación de 3-NP+PDC reproduce dos eventos que se generan durante la isquemia, esto es: la disfunción del metabolismo energético mitocondrial y la acumulación de Glu extracelular, por lo que se propone como un modelo *in vitro* de isquemia cerebral.
- 5.- El daño es exclusivo de las células neuronales ya que la administración de 3-NP+PDC no produce ninguna alteración en cultivos puros de células gliales.
- 6.- El daño producido por el 3-NP+PDC puede ser revertido por inhibidores del estrés oxidativo, antagonistas de los receptores glutamatérgicos y sustratos energéticos como el acetoacetato y el piruvato los cuales podrían ser utilizados eventualmente como agentes terapéuticos.
- 7.- Los presentes datos sugieren que en nuestro modelo isquémico convergen tres eventos: la disminución de ATP, la producción de radicales libres y la

cumulación de Ca^{2+} intracelular a través del receptor NMDA los cuales contribuyen a la muerte neuronal. La secuencia en que se presentan estos eventos y la contribución de cada uno de ellos a la muerte todavía no se conoce.

VII. REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. 3th, N.Y., USA.
- Alexi, T., Hughes, P.E., Faull, R.L.M. and Willians, C.E. 1998. 3-nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *Neuroreport* 9: R57-R64.
- Almeida, A., Bolaños, J.P. and Medina, J.M. 1999. Nitric oxide mediates glutamate-induced mitochondrial depolarization in rat cortical neurons. *Brain Res.* 816: 580-586.
- Alston, T.A., Mela, L. and Bright, H. 1977. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (9): 3767-3771.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A. and Nicoretta, P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961-973.
- Arriza, J.L.; Eliosof, S; Wadiche, J.Y.; et al. 1997. Excitatory aminoacid transporters a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 4155-4160.
- Attwell, D., Szatkowski, M. and Barbour, B. 1993. Non-vesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11: 401-407.
- Baker, A.J. Zornow, M.H., Scheller, M.S., et al, 1991. Changes in extracellular concentrations of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain. *J. Neurochem.* 57: 1370-1379.
- Beal, F., Hyman, B.T. and Koroshetz, W. 1993a. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases?. *TINS* 16 (4): 125-131.
- Beal, F. M., Brouillet, E., Jenkins, B.G., et al., 1993b. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13 (10): 4181-4192.
- Beal, F. 1995. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 38: 357-366
- Ben-Ari, Y. 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neurosci.* 14: 375-403
- Berridge, M.V. and Tan, A.S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (2): 474-482.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., and Diemer, N.H. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43: 1369-1374.
- Benveniste, H., Jorgensen, M.B., Sanberg, M. et al. 1989. Ischemic damage in hippocampal CA1 is dependent on glutamate release and intact innervation from CA3. *J.Cereb. Bloo flow Metab.* 9: 629-693.

- Blitzblau, R., Gupta, S., Djali, S. et al. 1996. The glutamate transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate indirectly evokes NMDA receptor mediated neurotoxicity I rat cortical cultures. *Eur. J. Neurosci.* 8:1840-1852.
- Borlonga, C.V., Koutouzis, T.K. and Sanberg, P.R. 1997. 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21 (3): 289-293.
- Brooks-Kayal, A.R., Munir, M., Jin, H. and Robinson, M.B. 1998. The glutamate transporter, GLT1, is expressed in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int.* 33: 95-100.
- Brorson, J. R., Schumacker, P. T. and Zhang, H. 1999. Nitric oxide acutely inhibits neuronal energy production. *J. Neurosci.* 19 (1): 147-158.
- Brouillet, E., Hyman, B.T., Jenkins, B.G., Henshaw, D.R., Schulz, J.B., Sodhi, P., Rosen, B.R., Beal, M.F. 1994. Systemic or local administration of azide produces striatal lesions by energy impairment-induced excitotoxic mechanism. *Exp. Neurol.* 129 (2): 175-82.
- Brouillet, E., Condé, F., Beal M.F. and Hantraye P. 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59: 427-468.
- Budd, S.L. and Nicholls, D.G. 1996. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 67: 2282-2291.
- Cebers, G., Cebere, A. and Liljequist, S. 1998. Metabolic inhibition potentiates AMPA-induced Ca^{2+} fluxes and neurotoxicity in rat cerebellar granule cells. *Brain Res.* 779: 194-204.
- Cebers, G., Cebere, A., Wagner, A. and Liljequist, S. 1999. Prolonged inhibition of glutamate reuptake down-regulates NMDA receptor functions in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 72: 2181-2190.
- Chalmers-Redman, R.M.E, MacLean-AD., Carlike, G.W., Pong, Aa and Tatton, W.G. 1999. Glucose protection from MPP⁺-induced apoptosis depends on mitochondrial membrane potential and ATP synthase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 257: 440-447.
- Cheng, C., Fass, D.M. and Reynolds, I.J. 1999. Emergence of excitotoxicity in cultured forebrain neurons coincides with larger glutamate-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ increases and NMDA receptor mRNA levels. *Brain Res.* 849: 97-108.
- Chittajallu, R., Braithwaite, S.P., Clarke, V.R.J. and Henley, J.M. 1999. Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *TIPS* 20: 26-35.
- Choi, D. W. 1987. Ionic dependence of glutamate of glutamate neurotoxicity in cortical cell cultures. *J. Neurosci.* 7: 369-379.
- Choi, D. W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634.
- Choi, D. W. 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channels types and role in ischemic damage. *TINS* 11: 465-469.
- Ciani, E., Groneng, L., Voltattorni, M., Rolseth, V., Contestabile, A. and Paulsen R.E. 1996. Inhibition of free radical production or free radical scavenging protects from the excitotoxic cell death mediated by glutamate in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 728: 1-6
- Clements, J.D., Lester, R.A.J., Tong, G., Jahr, C.E. and Westbrook, G.L. 1992. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science.* 258: 1498-1501.

Clements, J.D. 1996. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *TINS* 19: 163-171.

Coles, C.J., Edmondson, D. and Singer, T.P. 1979. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J. Biol. Chem.* 254 (12): 5161-5167.

Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore its role in cell death. *Biochem. J.* 341: 233-249.

Daikhin, Y. and Yudkoff, M. 1998. Ketonic bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Dev. Neurosci.* 20: 358-364.

Danbolt, N. 1994. The high affinity uptake system for excitatory amino acid in the brain. *Prog. Neurobiol.* 44: 377-396.

Danbolt, N.C., Chaudhry, F.A., Dehnes, Y., Lehre, K.P., Levy, L.M., Ullensvang, K. and Storm-Mathisen, J. 1998. Properties and localization of glutamate transporters. *Prog. Brain Res.* 116: 23-43.

Desagher, S., Glowinski, J. and Premont, J. 1997. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J. Neurosci.* 17 (23): 9060-9067.

Diamond, J.S. and Jahr, C.E. 1997. Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale. *J. Neurosci.* 17: 4672-4687.

Dietrich, W.D. 1998. Neurobiology of stroke. *Int. Rev. Neurobiol.* 42: 55-101.

Diplok, A.T. 1997. Will the 'Good fairies' please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Rad. Res.* 27: 511-532.

Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M.A. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *TINS* 22 (9): 391-397.

Eimerl, S. and Schramm, M. 1994. The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *J. Neurochem.* 62: 1223-1226.

Eimerl, S. and Schramm, M. 1995. Resuscitation of brain neurons in the presence of Ca^{2+} after toxic NMDA-receptor activity. *J. Neurochem.* 65: 739-743.

Erecinska, M. and Silver, I. A. 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43: 37-71.

Fairman, W.A., Vandenberg, R.A., Arriza, J.L., et al. 1995. An excitatory amino acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 375: 599-603.

Fink, S., Do, D.Y. and Sapolsky, R. 1996. Energy and glutamate dependency of 3-nitropropionic acid neurotoxicity in culture. *Exp. Neurol.* 138: 298-304.

Fonnum, F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42: 1-11.

Fujita, H., Sato, K., Wen, T.-C., Peng, Y. and Sakanaka, M. 1999. Differential expressions of glycine transporter 1 and three glutamate transporter mRNA in the hippocampus of gerbils with transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19: 604-615.

- Futura, A., Martin, L.J., Lin, C-LG., Dykes-Hoberg, M. and Rothstein, J.D. 1997a. Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporters 3 and 4. *Neurosci.* 81: 1031-1042.
- Futura, A., Rothstein, J.D. and Martin, L.J. 1997b. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 17: 8363-8375.
- Gegelashvili, G. and Schousboe, A. 1998. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res. Bull.* 45: 233-238.
- Gilland, E., Puka-Sundvall, M., Hillered, L and Hagberg, H. 1998. Mitochondrial function and energy metabolism after hypoxia-ischemia in the immature rat brain: involvement of NMDA receptor. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 297-304.
- Graham, S.H., Shiraishi, K., Panter, S.S., et al, 1990. Changes in extracellular amino acid neurotransmitters produced by focal cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 110: 124-130.
- Gray, A., Leonoudakis, D.J. and Yost C.S. 1997. An active-site histidine of NR1/2C mediates voltage-independent inhibition by zinc. *Mol. Brain Res.* 52: 157-161.
- Green, D.R. and Reed, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281: 1309-1312.
- Greene, J., Porter, R.H., Eller, R.V. and Greenamyre, T. 1993. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *J. Neurochem.* 61: 1151-1154.
- Greene, J.G., Sheu S-S., Gross, R.A. and Greenamyre, J.T. 1998. 3-nitropropionic acid exacerbates N-Methyl-D-Aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neurosci.* 84: 503-510.
- Gunasekar, P.G., Kanthasamy, A.G., Borowitz, J.L. and Ison, G.E. 1995. NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species implication for cell death. *J. Neurochem.* 65: 2016-2021.
- Hall, E.D. 1997. Lipid antioxidant neuroprotectants for acute and chronic neurodegenerative disorders. In *Neuroprotection in CNS diseases.* (Bar, P.R. and Beal, F.M., Ed). Marcel Dekker, USA. pp. 161-181.
- Hara, H., Sukamoto, T. and Kogure, K. 1993. Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Prog. Neurobiol.* 40: 645-670.
- Hasbani, M.J., Hyrc K.L., Faddis B.T., Romano C. and Goldberg. 1998. Distinct roles for sodium, chloride, and calcium in excitotoxic dendritic injury and recovery. *Exp. Neurol.* 154: 241-258.
- Haugland, R. 1996. *Handbook of fluorescent probes and research chemical.* 6th ed. Molecular Probes. USA.
- He, F. Zhang, S, Qian, F & Zhang, C. 1995. Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid). *Neurology.* 45: 2178-2183.
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A. and Robinson, S.R. 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 57: 417-428.
- Hodgkins, P. and Schwarcz, R. 1998a. Interference with cellular energy metabolism reduces kynurenic acid formation in rat brain slices: reversal by lactate and pyruvate. *Eur. J. Neurosci.* 10: 1986-1994.

- Hodgkins, P. and Schwarcz, R. 1998b. Metabolic control of kynurenic acid formation in the rat brain. *Dev. Neurosci.* 20: 408-416.
- Holt, W.F. 1997. Glutamate in Health and disease: the role of inhibitors. In neuroprotection in CNS diseases (Bar, P.R. and Beal, M.F., Ed.). Marcel Dekker, USA. pp.87-120.
- Hyc, K., Handran, S.D., Rothman, S.M. and Goldberg, M.P. 1997. Ionized intracellular calcium concentration predicts excitotoxic neuronal death: observations with low-affinity fluorescent calcium indicators. *J. Neurosci.* 17: 6669-6677.
- Jabaudon, D., Scanziani, M., Gähwiler, B.H. and Gerber, U. 2000. Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97: 5610-5615.
- Kanai, Y. and Hediger, M.A. 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature.* 360: 467-471.
- Kiedrowski L. and Costa, E. 1995. Glutamate-induced destabilization of intracellular calcium concentration homeostasis in cultured cerebellar granule cells: role of mitochondria in calcium buffering. *Mol. Pharm.* 47: 140-147.
- Koschmieder N., Petersen, S., Damgaard, I., Schousboe, A. and Hoffmann E.K. 1999. Increase in $[Ca^{2+}]_i$ and changes in intracellular pH during chemical anoxia in mouse neocortical neurons in primary culture. *J. Neurosci. Res.* 56: 358-370.
- Kristián, T. and Siesjö, B.K. 1997. Changes in ionic fluxes during cerebral ischaemia. *Int. Rev. Neurobiol.* 40: 27-45.
- Krupp, J.J., Vissel, B., Heinemann, S.F. and Westbrook, G.L. 1996. Calcium-dependent inactivation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors in NR2 subunit specific. *Mol. Pharmacol.* 50: 1680-1688.
- Kvamme, E. 1998. Synthesis of glutamate and its regulation. *Prog. Brain Res.* 116: 73-85.
- Kugler, P. and Schmitt, A. 1999. Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia.* 27: 129-142.
- Leski, M.L., Valentine, S.L. and Coyle, J.T. 1999. L-Type voltage-gated calcium channels modulated kainic acid neurotoxicity in cerebellar granule cells. *Brain Res.* 828: 27-40.
- Lipton, P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79: 1431-1568.
- Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H. and Schubert, D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.* 69: 581-593.
- Longuemare, M.C., Rose, C.R., Farrell, K., Ransom, B.R., Waxman, S.G. and Swanson, R.A. K^+ -induced reversal of astrocyte glutamate uptake is limited by compensatory changes in intracellular Na^+ . *Neurosci.* 93: 285-292.
- Lucas, D.R. and Newhouse, J.P. 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* 58: 193-201.
- Madl, J.E and Burgesser, K. 1993. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* 13(10): 4429-4444.

- Marcaida, G., Miñana, M-D., Grisolia, S. and Felipo, V. 1995. Lack of correlation between glutamate-induced depletion of ATP and neuronal death in primary cultures of cerebellum. *Brain Res.* 695: 146-150.
- Martin, L.J., Brambrink, A.M., Lehmann, C., Portera-Cailliau, C., Koehler, R., Rothstein, J. and Traystman, R.J. 1997. Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann. Neurol.* 42: 335-348.
- Martin, L.J., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Kirsc, J., Sieber, F. and Portera-Cailliau, C. 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia and traquet deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.* 46 (4): 281-309.
- Mason, R.P., Leeds, P.R., Jacob, R.F., Hough, C.J., Zhang, K-G., Mason, P.E., and Chuang, D-M. 1999. Inhibition of excessive neuronal apoptosis by the calcium antagonist amlodipine and antioxidants in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 72: 1448-1456.
- Massieu, L. and Tapia R. 1994. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline protects against both AMPA and Kainate-induced lesion in rat striatum in vivo. *Neurosci.* 59: 931-938.
- Massieu, L., Morales-Villagran, A. and Tapia, R. 1995. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 64: 2262-2272.
- Massieu, L. and Tapia, R. 1997. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rat in vivo. *J. Neurochem.* 69: 1151-1160.
- Massieu, L. and Garcia, O. 1998. The role of excitotoxicity and metabolic failure in the pathogenesis of neurological disorders. *Neurobiology.* 6 (1): 99-108.
- Massieu, L. 1999. Muerte por Excitotoxicidad. En *Enfermedades Neurodegenerativas. Mecanismos Celulares y Moleculares.* (Ed. Pasantes, H, et al.). Fondo de Cultura Económica. México. pp.64-79.
- Maus, M., Marin, P., Israël, M., Glowinski, J. and Pré,ont, J. 1999. Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-metyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* 11: 3215-3224.
- Mennerick, S., Dhond R.P., Benz, A., Xu, W., Rothstein, J.D., Danbolt N.C., Isenberg, K.G. and Zorumski, C.F. 1998. Neuronal expression of the glutamate transporter GLT-1 in hippocampal microcultures. *J. Neurosci.* 18: 4490-4499.
- Milani, D., Guidolin, D., Facci, L., Pozzan, T., Busso, M., Leon, A. and Skaper S.D. 1991. Excitatory amino acid-induced alterations of cytoplasmic free Ca^{2+} in individual cerebellar granule neurons: role in neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 28: 434-441.
- Mizuta, I., Katayama, M., Watanabe, M., Mishina, M. and Ishii, K. 1998. Developmental expression of NMDA receptor subunits and the emergence of glutamate neurotoxicity in primary cultures of murine cerebral cortical neurons. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 721-725.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 12: 529-540.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.

Murphy, A.N., Fiskum, G., and Beal, M.F. 1999. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J. Cereb. Flow Metab.* 19: 231-245.

Nadler, J.V. ; Perry, B.W. and Cotman, C.W. 1978. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature.* 271: 676-677.

Nehlig, A. and Pereira de Vasconcelos, A. 1993. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog. Neurobiol.* 40: 163-221.

Nicholls, D.G. 1998. Presynaptic modulation of glutamate release. *Prog. Brain Res.* 116: 15-21.

Nicholls, D. G. and Budd, S. L. 1998. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366: 97-112.

Nicholls, D.G. and Budd, S. L. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80: 315-360.

Novelli, A. Reilly, J.A., Lysko, P.G. and Henneberry, R.C. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* 451: 205-212.

Obrenovitch, T.P. and Urenjak, J. 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog. Neurobiol.* 51: 39-87.

Olney, J.W. 1969. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 164: 719-721.

Olney, J.W. 1971 Glutamate induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. *J. Neurophatol. Exp.Neurol.* 30: 75-90.

Olney, J.W. 1979. Excitotoxic amino acids: research applications and safety implications. In Glutamic acid: advances in biochemistry. Filer, L.J. et al. (Ed) Raven Press, New York. pp. 287-319.

Olsen, C., Rustad, A., Fonnum, F., Paulsen, R.E. and Hassel, B. 1999. 3-nitropropionic acid: an astrocyte-sparing neurotoxin in vitro. *Brain Res.* 850: 144-149.

Ozawa, S., Kamiya, H. and Tsuzuki, K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54: 581-618.

Pang, Z. and Geddes, J.W. 1997. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J. Neurosci.* 17: 3064-3073.

Patel, M. N., Yim, G.K.W and Isom, G. E. 1992. Potentiation of cyanide neurotoxicity by blockade of ATP-sensitive potassium channels. *Brain Res.* 593: 114-116.

Patel, A.J., Lauritzen, I., Lazdunski, M. and Honoré, E. 1998. Disruption of mitochondrial respiration inhibits volume-regulated anion channels and provokes neuronal cell swelling. *J Neurosci.* 18 (9): 3117-3123.

Pellegrini-Giampietro, D.E., Gorter, J.A., Bennett, M.V.L. and Zukin, S.R. 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺ permeable AMPA receptor in neurological disorders. *TINS* 20: 464-470.

Peng T-l., Greenamyre T.J. 1998. Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.* 53: 974-980.

- Pin, J. P. and Bockaert, J. 1995. Get receptive to metabotropic glutamate receptors. *Curr. Op. Neurobiol.* 5:342-349.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., et al. 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature.* 360: 464-467.
- Pissani, A., Calabresi, P., Tozzi, A., D'angelo, V and Bernardi, G. 1998. L-type Ca^{2+} channel blockers attenuate electrical changes and Ca^{2+} rise induced by oxygen/glucose deprivation in cortical neurons. *Stroke.* 29: 196-202.
- Plachez, C., Danbolt, N.C. and Récasens, M. 2000. Transient expression of the glial glutamate transporters GLAST and GLT1 in hippocampal neurons in primary culture. *J. Neurosci. Res.* 59: 587-593.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. and Meldolesi, J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74: 525-536.
- Rafiki, A., Bernard, A., Medina, I., Gozlan, H. and Khrestchatisky, M. 2000. Characterization in cultured cerebellar granule cells and in the developing rat brain of mRNA variants for the NMDA receptor 2C subunit. *J. Neurochem.* 74: 1798-1808.
- Riepe, M., Hori, N., Ludolph, A.C., Carpenter, D.O., Spencer, P.S. and Allen, C.N. 1992. Inhibition of energy metabolism by 3-nitropropionic acid activates ATP-sensitive potassium channels. *Brain Res.* 586: 61-66.
- Robinson, M.B. 1999. The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT1/EAAT2 subtype. *Neurochem. Int.* 33: 479-491.
- Rossi, D.J., Oshima, T. and Attwell, D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia in mainly by reversed uptake. *Nature* 403: 316-321.
- Rothstein, J. D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M & Kuncl, R.W. 1993. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6591-6595.
- Rothstein, J.D.; Martin, L.; Levey, A.I. et al. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-725.
- Rothstein, J.D.; Dykes-Hoberg, M.; Pardo, C.A. et al., 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686.
- Ruiz, F., Alvarez, G., Pereira, R., Hernández, M., Villalba, M., Cruz, F., Cerdán, S., Bogónez, E. and Satrustegui, J. 1998. Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *Neuroreport.* 9: 1277-1282.
- Sakaguchi, T., Kuno, M. and Kawasaki, K. 1999. Disparity of cell swelling and rapid neuronal death by excitotoxic insults in rat hippocampal slice cultures. *Neurosci. Lett.* 274: 135-138.
- Sanchez-Carbente, M.R. and Massieu, L. 1999. Transient inhibition of glutamate uptake in vivo induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J. Neurochem.* 72: 129-138.
- Sattler, R., Charlton, M.P., Hafner, M. and Tymianski, M. 1998. Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J. Neurochem.* 71: 2349-2364.

- Savidge, J. R and Bristow, D.R. 1997. Routes of NMDA-and K⁺-stimulated calcium entry in rat cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 229: 109-112.
- Schinder, A.F., Olson, E. R., Spitzer, N. C. and Montal, M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary even in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16 (19): 6125-6133.
- Schulz, J.B., Matthews, R.T., Henshaw, D.R. and Beal, M.F. 1996. Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins: implications for neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 71 (4): 1043-1048.
- Seo, S.Y., Kim, E.Y., Harriet, K. and Gwag, B.J. 1999. Neuroprotective effect of high glucose against NMDA, free radical, and oxygen-glucose deprivation through enhanced mitochondrial potentials. *J. Neurosci.* 19: 8849-8855.
- Sheardown, M.J., Nielsen, E.O., Hansen A.J., et al., 1990. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science.* 247: 571-574.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. and Ames, B. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 10771-10778.
- Simon P.R., Swan, J.H., Griffiths, T. and Meldrum, B.S. 1984. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptor may protect against ischemic damage in the brain. *Science.* 226: 850-852.
- Simantov, R., Liu, W., Broutman, G. and Baudry, M. 1999. Antisense knockdown of glutamate transporters alters the subfield selectivity of kainate-induced cell death in rat hippocampal slice cultures. *J. Neurochem.* 73: 1828-1835
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. and Stoffel, W. 1992. Structure, expression and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 10955-10959.
- Stuiver, B.T., Douma, B.R.K., Bakker, R., Nyakes, C. and Luiten, P.G.M. 1996. In vivo protection against NMDA-induced neurodegeneration by MK-801 and nimodipine: combined therapy and temporal course of protection. *Neurodegeneration* 5: 153-159.
- Takahashi, M., Billups, B., Rossi, D., et al., 1997. The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J. Exp. Biol.* 200: 401-409.
- Tanaka, K. et al. 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1- *Science.* 276: 1699-1702.
- Thomas, C.E. 1997. Nitron spin traps as protectants against oxidative damage. In *Neuroprotection in CNS disease* (Bar, P.R. and Beal, M.F., Ed). Marcel Dekker, USA. pp. 183-204.
- Tian G-F. and Baker A. 2000. Glycolysis prevents anoxia-induced synaptic transmission damage in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 83: 1830-1839.
- Torp R., Lekieffre, D., Levi, L.M., Haug, F.M., Danbolt, N.C., Meldrum, B.S. and Ottersen, O.P. 1995. Reduced postischemic expression of glial glutamate transporter, GLT1, in the rat hippocampus. *Exp. Brain Res.* 103: 51-58.
- Trussel, L. 1998. Control of time course of glutamatergic synaptic currents. *Prog. Brain Res.* 116: 61-69.

- Varming, T., Drejer, J., Frandsen, A. and Schousboe, A. 1996. Characterization of a chemical anoxia model in cerebellar granule neurons using sodium azide: protection by nifedipine and MK-801. *J. Neurochem Res.* 44 (1): 40-46.
- Viallba, M., Martínez-Serrano A., Gómez-Puertas, P., Blanco, P., Börner, C., Villa, A., Casado, M., Giménez, C., Pereira R., Bogonez, E., Pozzan, T., and Satrustegui, J. 1994. The role of pyruvate in neuronal calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* 269: 2468-2476.
- Velasco, I., Tapia, R. and Massieu, L. 1996. Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J. Neurosci. Res.* 44: 551-561.
- Volterra, A., Bezzi, P., Lodi Rizzini, B., et al. 1996. The competitive Transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate trigger excitotoxicity in rat cortical neuron astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2019-2018.
- Vornov, J.J., Tasker, R.C. and Park, J. 1995. Neurotoxicity of glutamate transport blockade depends on coactivation of both NMDA and AMPA/Kainate receptors in organotypic hippocampal cultures. *Exp. Neurol.* 133: 7-17.
- Watanabe, M., Mishina, M. and Inoue, Y. 1994. Distinct spatiotemporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 343: 513-519.
- Weller, M. and Paul, S. 1993. 3-Nitropropionic acid is an indirect excitotoxin to cultured cerebellar granule neurons. *Eur. J. Pharmacology.* 248: 223-228.
- White, R.J. and Reynolds, I.J. 1996. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxic exposure. *J. Neurosci.* 16 (18): 5688-5697.
- Wieloch, T., Lindvall, O., Blomquist, P. and Gage, F.H. 1985. Evidence for amelioration of ischemic neuronal damage in the hippocampal formation by lesions of the perforant path. *Neurol. Res.* 7: 24-26.
- Wullner, U., Young, A.B., Penney, J.B. and Beal, M.F. 1994. 3-Nitropropionic acid toxicity in the striatum. *J. Neurochem.* 63: 1772-1781.
- Yamada, K., Tanaka, T., Han, D., Senzaki, K., Kameyama, T and Nabeshima, T. 1999. Protective effects of idenedone and α -tocopherol on β -amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication oxidative stress in β -amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 11: 83-90.
- Yamakura, T, and Shimoji, K. 1999. Subunit-and site specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog. Neurobiol.* 59: 279-298.
- Zeevalk, G. and Nicklas, W. 1992. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg^{2+} block at the N-Methyl-D-Aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neural metabolism. *J. Neurochem.* 59: 1211-1220.