



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**SUSTRATOS ENERGETICOS COMO POSIBLES  
NEUROPROTECTORES CONTRA LA MUERTE  
NEURONAL INDUCIDA POR GLUTAMATO EN  
RATAS ENERGETICAMENTE DEFICIENTES.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G A**  
P R E S E N T A :  
PERLA MARIANA DEL RIO ESTRADA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO



MEXICO, D.F.,



NOVIEMBRE DEL 2001

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Sustratos energéticos como posibles neuroprotectores contra la muerte neuronal  
inducida por glutamato en ratas energéticamente deficientes."

realizado por Perla Mariana Del Río Estrada

con número de cuenta 9754955-4 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. María de Lourdes Masieu Trigo.

Propietario

Químico Silvestre de Jesús Alavez Espidio.

Propietario

M. en C. Octavio César García González.

Suplente

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Alvarez.

Suplente

Biól. Julio Alejandro Prieto Sagredo.

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología



Dra. Patricia Ramos Morales.

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

***A David y  
a mis padres.***

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por su amor, apoyo y comprensión.

A Gonzalo por tu paciencia. Te ADO.

A Lourdes y Tere por sus enseñanzas, confianza y amistad.

A Karla por todos los momentos que hemos pasado juntas.

A mis compañeros de laboratorio.

# ÍNDICE

---

- Introducción	2
- Receptores a glutamato	
Receptores a AMPA.	3
Receptores a Kainato	3
Receptores a NMDA	5
Receptores metabotrópicos	6
Transportadores de glutamato	6
Excitotoxicidad	8
Excitotoxicidad y metabolismo energético: excitotoxicidad secundaria	10
Excitotoxicidad como causa de las enfermedades neurodegenerativas	
Desórdenes neurológicos agudos.	13
Enfermedades neurodegenerativas crónicas	14
El ácido 3-nitropropiónico	19
3-NP como modelo de la enfermedad de Huntington	22
Metabolismo y demanda energético	24
- Hipótesis	27
- Objetivo General	27
- Objetivos Particulares	28
- Metodología	29
- Resultados	35
- Discusión	44
- Conclusiones	52
- Referencias	53

Dentro de la zona de lesión las neuronas colinérgicas grandes se preservan, las neuronas no-espinosas medianas (interneuronas) también están intactas, hay una disminución de los ARNm de met-enkefalina y sustancia P, mientras que la somatostatina se preserva (Wüller et al., 1994). La toxicidad de tratamientos crónicos de 3-NP puede producir lesiones en el globo pálido, hipocampo, tálamo y sustancia nigra reticulata, las lesiones estriatales se asocian con las anomalías motoras.

Estudios conductuales también han mostrado similitud con la enfermedad de Huntington. En la enfermedad de Huntington los síntomas tempranos son hipercinesia, como resultado de los movimientos coreiformes, mientras va progresando la enfermedad estos movimientos cesan y se llega a un estado de distonia y finalmente a una rigidez muscular. Los animales tratados con 3-NP también muestran una fase temprana de hipercinesia, seguida de una fase de hipocinesia. (Borlogan et al., 1995). Aproximadamente el 73 % de los animales tratados crónicamente con el 3-NP presentan síntomas neurológicos como la falta de coordinación al caminar y en los más afectados hay una parálisis de las extremidades posteriores (quedan postradas sobre un lado) (Hamilton y Gould, 1997).

En ratas tratadas con 3-NP los síntomas son movimientos laterales, giros llamados de barril, seguidos de posturas rígidas y falta de movimiento. En etapas tardías los animales presentan parálisis de las extremidades posteriores o se postran (Hamilton y Gould, 1997). La severidad de la deficiencia motora correlaciona con la presencia de daño neuronal bilateral (Sánchez-Carbente y Massieu, 1999) y con el grado de inhibición de la enzima SDH (Brouillet et al., 1998).

## Metabolismo y demanda energética

El cerebro tiene una gran dependencia del aporte de oxígeno y de sustratos energéticos a través de la sangre. Sin embargo, a diferencia de otros tejidos no es capaz de aprovechar todos los compuestos debido a que está limitado por la barrera hematoencefálica. El principal sustrato aprovechado por el cerebro es la glucosa aunque en ocasiones especiales, como la hipoglicemia, puede utilizar otros sustratos como los cuerpos cetónicos (β-hidroxiacetato y acetoacetato), otros monocarboxilatos (manosa), la fosfocreatina, entre otros. En conjunto estos compuestos son utilizados para la producción de ATP u otras moléculas capaces de almacenar energía.

En las neuronas, el piruvato no solo proviene de la glucosa, sino que también de un sistema de reciclamiento. Este sistema tiene un papel importante cuando hay niveles bajos de Acetil-CoA como podría ser una hipoglicemia, isquemia y posiblemente la estimulación prolongada de los receptores de glutamato. Fue descrito en 1990 y produce piruvato a partir de intermediarios del ciclo de Krebs como oxaloacetato o malato por las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa y piruvato cinasa. Posteriormente el piruvato es utilizado por el ciclo de Krebs (Cruz et al., 1998).

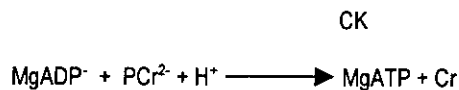
En ocasiones especiales, como periodos de inanición, el cerebro utiliza los cuerpos cetónicos como una fuente opcional de energía. Los cuerpos cetónicos, como el β-hidroxiacetato y el acetoacetato, se forman durante la β-oxidación de los ácidos grasos en el hígado y son precursores de la Acetil-CoA, la cual entra al ciclo de Krebs.

Las enzimas responsables de su metabolismo, la β-hidroxiacetato deshidrogenasa y la acetoacetato succinil coenzima A transferasa, están presentes en el cerebro y éstos son metabolizados tan pronto su concentración incrementa en la sangre. En condiciones



normales los cuerpos cetónicos en los individuos se encuentran en concentraciones basales (3 mg/100 ml) en el torrente sanguíneo y sus incrementos se han observado en situaciones que requieren de un aporte energético adicional como cuando hay periodos de ayuno (Owen et al., 1967), durante el embarazo y durante la infancia o cuando el metabolismo de la glucosa está alterado como en los pacientes diabéticos (90 mg/ 100 ml). De hecho, Owen et al. (1967) observaron que en pacientes obesos sometidos a un periodo de ayuno de 40 días los cuerpos cetónicos proveen hasta el 60% del requerimiento energético en el cerebro. Una vez que su concentración ha incrementado en la sangre, los cuerpos cetónicos son capturados por el cerebro mediante un transportador de monocarboxilatos. Se ha reportado que la afinidad de este transportador se incrementa cuando hay periodos de ayuno (Pollay y Stevens, 1980).

Por otra parte, existe una fuente alternativa para la síntesis de ATP en el cerebro, el sistema creatina/fosfocreatina (Cr y Pcr respectivamente). La creatina es sintetizada por el hígado y riñones de donde es transportada a través de la sangre y tomada por tejidos con alta demanda energética como es el cerebro. La Creatina y fosfocreatina son llamadas moléculas de transporte y se encuentran en concentraciones más altas y difunden más rápido que el ATP dentro de la célula. El ATP es continuamente generado a partir de pozas de fosfocreatina a través de la reacción catalizada por la enzima creatina cinasa (CK):



En tejidos de vertebrados existen cuatro isoformas de la enzima creatina cinasa, en el cerebro existen principalmente una forma citosólica y una mitocondrial.

El sistema Cr/PCr lleva a cabo diferentes funciones:

- Es un sistema de amortiguamiento energético temporal, es decir, proporciona molécula de ATP cuando existen altas demandas energéticas.

- Es un sistema de amortiguamiento espacial ya que cuando el ATP derivado de la fosforilación oxidativa o de la glicólisis tiene contacto con alguna isoforma de la enzima CK, mitocondrial o citosólica; se transfosforila el fosfato del ATP a la creatina produciéndose finalmente fosfocreatina, que es la molécula movilizada hacia los lugares de demanda energética. (Wallimann et al., 1992).
- Mantiene las concentraciones de ADP libre en niveles bajos y así previene una pérdida de adenin nucleótidos y la inactivación de ATPasas celulares (Iyengar, 1984)
- Previene de la acidificación global o local de las células ya que la reacción para producir ATP utiliza ADP + protones.
- Incrementa la eficiencia de la termodinámica de la hidrólisis de ATP manteniendo cocientes altos de ATP / ADP cerca del lugar donde se encuentran las ATPasas.

- **Receptores metabotrópicos**

Existe una tercera clase de receptores a glutamato que no forman canales iónicos, estos son los receptores metabotrópicos. Esta familia de receptores está acoplada a proteínas G, tiene poca homología con otros receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G; sin embargo, mantiene los 7 dominios transmembranales característicos de este tipo de receptor. Los receptores pueden ser activados con quisquilato, que también es agonista del receptor a AMPA y por ibotenato, pero no por L -aspartato, NMDA, AMPA ó KA. Estos receptores pueden estar acoplados a la cascada del inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) (mGluR1, mGluR5) ó a la activación de la adenilato ciclasa (mGluR2, mGluR4, mGluR6, mGluR7) (Nakanishi et al., 1998).

El papel de estos receptores es el de modular la transmisión sináptica, tal vez por esta razón su localización es tanto presináptica como postsináptica y sus sitios de expresión son variados: células de Purkinje, células piramidales de la región CA2 y CA4 del hipocampo, estriado, bulbo olfatorio, giro dentado, corteza cerebral.

### **Transportadores de glutamato**

Los transportadores de glutamato tienen como función principal la remoción del glutamato después que éste es liberado durante la transmisión sináptica, así como la de mantener al glutamato en concentraciones subtóxicas. El transporte de glutamato está acoplado al menos a dos iones de Na<sup>+</sup> y al cotransporte de un ión K<sup>+</sup>. Por otro lado, el transportador podría ser también un canal permeable al cloro durante la recaptura de glutamato, se ha propuesto que esta permeabilidad al cloro mantiene las neuronas con un

potencial negativo, el cual podría amortiguar la excitabilidad neuronal y potenciar la recaptura del glutamato (Tanaka, 2000).

Se han encontrado 5 subtipos de transportadores de glutamato; los transportadores gliales GLT-1 y GLAST (transportador de glutamato-1 y transportador de glutamato/aspartato, respectivamente), un transportador neuronal EAAC1 (acarreador de aminoácidos excitadores - 1), el EAAT4 (transportador de aminoácidos excitadores - 4) en células de Purkinje y los transportadores EAAT5 (transportador de aminoácidos excitadores - 5) en la retina. Los transportadores EAAC1 y EAAT4 se expresan en el soma y dendritas de neuronas. El EAAT4, también se encuentra en células GABAérgicas y células cerebelares de Purkinje; lo que indica que puede tener otra función a parte de la recaptura del glutamato (Tanaka, 2000).

El papel de los transportadores de glutamato se ha estudiado en ratones deficientes de éstos. Por ejemplo, experimentos con ratones deficientes de GLT -1 indican que este subtipo de transportador no determina el decaimiento de las corrientes sinápticas en neuronas de hipocampo, sin embargo la concentración de glutamato se mantiene elevada por tiempos mayores en los ratones deficientes de GLT- 1. Se ha sugerido que este subtipo de transportador tiene un papel importante en la inducción de la PLP a través de la regulación de los niveles extracelulares de glutamato (Tanaka et al., 1997). El transportador subtipo GLAST se expresa en los procesos gliales de Bergmann y es considerado una parte importante del sistema de transporte de glutamato en el cerebelo (Lehre et al., 1995). En la retina, GLAST se expresa predominantemente los procesos de las células gliales de Müller (Harada et al., 1998).

## Excitotoxicidad

El término excitotoxicidad, acuñado por Olney, se refiere a la habilidad del glutamato y otros aminoácidos excitadores de dañar a las neuronas. Altas dosis de glutamato (de 0.5 a 4 mg/g) administrado sistémicamente a ratones produce un hinchamiento de los cuerpos celulares con la posterior picnosis y degeneración neuronal (Olney, 1969). Otros análogos como el NMDA, homocisteato, sulfinato de cisteína y cisteato producen efectos similares.

La excitotoxicidad requiere de la activación del receptor NMDA principalmente y tiene características bien definidas. En neuronas cultivadas de la corteza cerebral se han descrito dos fases. La primera, llamada fase aguda se caracteriza por un hinchamiento del soma y las dendritas, esta fase depende de la presencia de sodio y cloro extracelular, se presenta después de unos minutos de la exposición a glutamato, es reversible y puede mimetizarse por agentes despolarizantes como el alto potasio. La mayoría de las células recuperan su volumen e incluso sobreviven. El hinchamiento característico de esta fase puede deberse al flujo del sodio extracelular y del cloro junto con agua. La segunda fase ocurre unas horas después y es dependiente de calcio, en esta fase las células se vuelven necróticas y son fagocitadas por macrófagos. El incremento de calcio puede estar asociado a la activación de los receptores de tipo NMDA. Este incremento de la concentración interna de calcio, es un factor determinante para la muerte celular (Choi, 1992; Nicholls y Budd, 1998).

Como características morfológicas de la excitotoxicidad se puede mencionar que:

- 1) los cuerpos neuronales y las dendritas son principalmente afectados mientras que los axones permanecen intactos,
- 2) las neuronas son más vulnerables a la excitotoxicidad, mientras que las células gliales, las células endodiales y endoteliales no son destruidas,
- 3) existe el fenómeno de vulnerabilidad diferencial, es decir, que existen regiones cerebrales

que son más sensibles a las diferentes excitotoxinas, 4) hay una variedad de factores extrínsecos e intrínsecos que pueden estar contribuyendo a la vulnerabilidad diferencial de las neuronas como son: la disponibilidad de los aminoácidos excitadores, el número o tipo de receptores membranales, los mecanismos del mantenimiento de la homeostasis de calcio intracelular y las fuentes de compuestos atrapadores de radicales libres y sistemas antioxidantes.

Según Choi (1992), el daño citotóxico mediado por el incremento de calcio se divide en tres etapas: inducción, amplificación y expresión.

En la etapa de inducción los receptores glutamatérgicos son activados produciéndose incrementos intracelulares de calcio, cloro, sodio, agua, inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol. En la siguiente etapa existen eventos que sirven para amplificar la señal inicial (la activación de los receptores a glutamato). Dentro de estos eventos uno de los más importantes son las elevaciones locales de calcio intracelular, el cual puede activar enzimas como las cinasas, las calpaínas, las fosfolipasas y enzimas reguladas por calmodulinas. Además, existe un eflujo de glutamato que puede producir la propagación del daño citotóxico. En la etapa de expresión, se activan cascadas que son las responsables de la muerte neuronal. Por ejemplo, el calcio puede activar a la calpaína 1 que degrada proteínas estructurales en las neuronas, fosfolipasas que pueden dañar la membrana celular, activar el metabolismo del ácido araquidónico y endonucleasas que rompen el DNA genómico. Como consecuencia de la expresión de estas cascadas también se producen radicales libres, que son moléculas que tienen un electrón desapareado. El daño que producen los radicales libres se debe a que pueden inactivar enzimas, oxidar moléculas como proteínas, peroxidar lípidos de la membrana e incluso pueden dañar el DNA. En la excitotoxicidad los radicales libres se relacionan con la pérdida de la homeostasis del calcio intracelular y otra serie de eventos que llevan a la apoptosis.

## **Excitotoxicidad y metabolismo energético: excitotoxicidad secundaria.**

El concepto de excitotoxicidad secundaria surgió a partir de las observaciones hechas por Novelli et al. (1988). Los autores demostraron que inhibidores de la fosforilación oxidativa y la ausencia de glucosa o de oxígeno hacían que concentraciones subumbrales de glutamato o de NMDA fueran tóxicas. Posteriormente Zeevalk y Nicklas (1991), mostraron que el cianuro producía lesiones de tipo excitotóxicas en la retina y que éstas se evitaban con antagonistas del receptor NMDA. La toxicidad inducida por la inhibición metabólica puede ser mimetizada por agentes despolarizantes como el alto potasio y por la liberación del magnesio que se encuentra bloqueando al receptor NMDA (Zeevalk y Nicklas, 1991). Estas observaciones se extendieron con modelos *in vivo* que mostraron que toxinas mitocondriales como el ácido 3-nitropropiónico o el malonato, que son inhibidores del complejo II mitocondrial de la cadena de electrones, también producen una degeneración de tipo excitotóxica en el sistema nervioso central, esta degeneración se previene cuando se utilizan antagonistas del receptor NMDA, inhibidores de la liberación de glutamato ó cuando se remueven las aferencias glutamatérgicas (Beal et al., 1993a, Wüller et al., 1994, Greene et al., 1993, Henshaw et al., 1994). Estas observaciones llevaron a proponer que una deficiencia energética causa la despolarización de la membrana y la liberación del magnesio que bloquea al receptor NMDA incrementando la vulnerabilidad de las neuronas a las concentraciones fisiológicas de glutamato.

Algunos mecanismos por los que la inhibición metabólica puede inducir el daño excitotóxico y son :

- 1) La pérdida de los gradientes iónicos, por ejemplo, la falta de ATP puede llevar a un mal funcionamiento de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . La falla de esta bomba hace que se pierda el gradiente de  $\text{Na}^+$  afectando la recaptura de glutamato extracelular dependiente de  $\text{Na}^+$ . La pérdida del gradiente iónico también puede afectar el intercambio de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y por

- lo tanto el amortiguamiento del flujo de calcio durante la excitotoxicidad mediada por glutamato (Mattson et al. 1989).
- 2) El incremento de calcio intracelular, que puede deberse a la despolarización de la membrana que favorece la activación de los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje ó a la activación del receptor NMDA. Cuando el exceso de calcio intracelular ya no puede ser amortiguado por organelos como la mitocondria se produce una falla en la regulación de la homeostasis del calcio la cual se ha visto que precede a la muerte neuronal (Nicholls et al., 1999).
  - 3) La producción de radicales libres. Los radicales libres como el óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno pueden causar daño al DNA y la peroxidación de lípidos de la membrana. La inducción de radicales libres es dependiente del flujo de calcio extracelular y son producidos en parte por la activación de la enzima óxido nítrico sintasa y por el metabolismo de la fosfolipasa A2. Se sabe que la activación del receptor NMDA lleva a la producción de radicales libres (Lafon -Cazal et al., 1993; Schulz et al., 1995b; Gunasekar et al., 1995) y que los secuestradores de radicales libres pueden atenuar el daño excitotóxico producido por inyecciones intraestriales de NMDA, KA, y AMPA *in vivo* (Schulz et al., 1995a). Los inhibidores metabólicos también inducen la formación de radicales libres *in vivo* que también es prevenida con atrapadores de radicales libres (Schulz et al., 1995a).

En la figura 1 se esquematizan los eventos que posiblemente participan en la muerte neuronal excitotóxica durante la deficiencia energética.



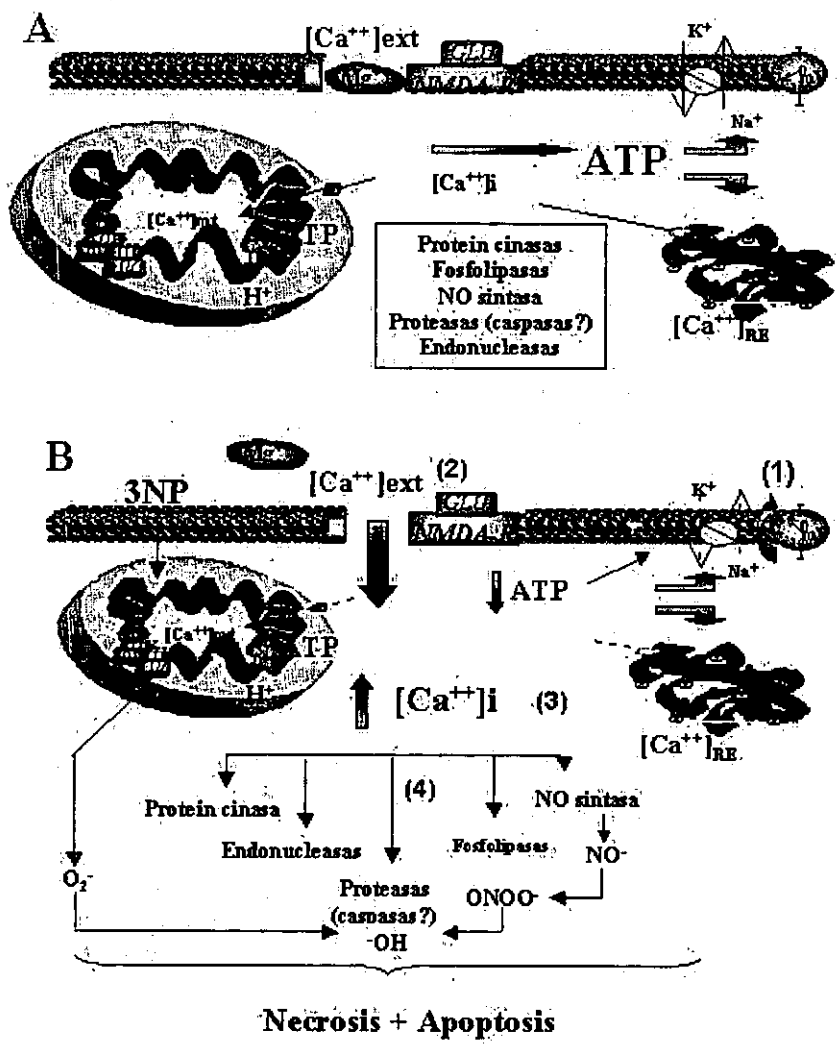


Figura. 1 A) En condiciones normales, existe una concentración baja de calcio, la bomba de  $Na^+/K^+$  funciona correctamente debido a que los niveles de ATP no han disminuido. B) Cuando existe una disminución de los niveles de ATP, hay una despolarización de la membrana por falla de la bomba  $Na^+/K^+$  (1), una activación del receptor NMDA (2), un incremento del influjo de calcio (3) y una activación de varias enzimas que llevan a la muerte (4).

## **Excitotoxicidad como causa de enfermedades neurodegenerativas**

- **Desórdenes neurológicos agudos**

Dentro de los desórdenes neurológicos agudos se encuentran la isquemia, que es el resultado de la reducción de flujo sanguíneo cerebral y de la falta de oxígeno al cerebro generalmente causado por la oclusión de una arteria cerebral debida a una embolia o a una trombosis local, la hipoxia ó falta de oxígeno y el trauma cerebral .

En todas estas condiciones existe evidencia de que el daño neuronal ocurre por un mecanismo excitotóxico. Durante los periodos isquémicos (Beneviste et al., 1984), hipoglicémicos (Sandberg et al., 1986) o de trauma cerebral (Palmer et al., 1993 y 1994a) existe un incremento de los niveles de glutamato extracelular (concentración basal de 2 a 3 incrementos de glutamato extracelular llegan a ser de tres a ocho veces mayores a los niveles basales (Beneviste et al., 1984; Obrenovitch et al., 1993), y que los niveles de éste aminoácido excitador tienden a regresar a sus niveles basales durante el periodo de reperfusión (Baker et al., 1991). Por otra parte, antagonistas del receptor NMDA pueden proteger contra el daño producido por un trauma cerebral (McIntosh et al., 1990; Fanden et al., 1998), por la hipoglicemia en el hipocampo de la rata (Simon et al., 1986), por la inhibición de la glicólisis in vivo (Massieu et al., 2000) y contra el daño neuronal isquémico in vivo (Simon et al., 1984).

Por otra parte, también se ha visto que después de los eventos isquémicos se modifica la expresión de las diferentes subunidades del receptor NMDA y de los transportadores de glutamato (Takagi et al., 1997; Aizenman et al., 2000).

- **Enfermedades neurodegenerativas crónicas**

Las evidencias que involucran a la excitotoxicidad con las enfermedades neurodegenerativas crónicas son menos directas (Beal, 1992; Albin y Greenamyre, 1992) y derivan de la relación entre el déficit energético y la activación de los receptores glutamatérgicos bajo concentraciones fisiológicas de glutamato. Se ha propuesto que la excitotoxicidad puede ser uno de los agentes causales de la neurodegeneración en la enfermedad de Huntington, la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y en la Atrofia Olivopontocerebral.

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad crónica que se manifiesta por debilidad muscular, espasmos, degeneración y pérdida de las neuronas motoras de la médula espinal, tallo cerebral y de la corteza cerebral. La causa de esta enfermedad es desconocida, pero existe evidencia de una falla relacionada con la neurotransmisión glutamatérgica. Se ha encontrado un incremento de los niveles de glutamato y aspartato entre un 100 % y 200 % en el líquido cerebroespinal de pacientes con ELA, así como elevaciones de las concentraciones del neuropéptido N-acetil-aspartil glutamato y de su metabolito N-acetil-aspartato de éstos mismos pacientes (Rothstein et al., 1990).

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por presentar anomalías motoras incluyendo acinesia (falta de movimiento), temblores y rigidez así como una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Esta enfermedad afecta al 1 % de la población mayor de 50 años (Blandini et al., 1996).

En la enfermedad de Alzheimer degeneran principalmente las sinapsis y neuronas de regiones involucradas en los procesos de memoria y aprendizaje que se encuentran en el hipocampo y corteza entorrinal. Los cerebros de pacientes con Alzheimer se caracterizan por

tener depósitos de una proteína llamada  $\beta$ -amiloide y por neuronas con filamentos intracelulares compuestos de una proteína de asociación a microtúbulos llamada TAU (Mattson et al., 1999).

La enfermedad de Huntington es una enfermedad autosómica dominante neurodegenerativa que se caracteriza por movimientos involuntarios y demencia. Generalmente los primeros síntomas de esta enfermedad se manifiestan en la edad adulta y la enfermedad evoluciona entre los 10 y 15 años posteriores hasta llegar a la muerte. En la enfermedad hay una degeneración preferencial de las neuronas GABAérgicas espinosas medias del cuerpo estriado, esto se ha demostrado por la disminución de GABA, sustancia P y Met-enkefalina, que son sustancias que colocalizan con neuronas GABAérgicas. Otra característica es la presencia de inclusiones intranucleares y fibrillas extracelulares compuestas del extremo amino terminal de la proteína mutada: la Huntingtina (Grünewald y Beal, 1999).

En algunas de estas enfermedades se ha reportado la disminución de los receptores NMDA o defectos en la expresión de los transportadores de glutamato. Por ejemplo, se ha visto que en pacientes con ELA existe una disminución del número de transportadores de glutamato de tipo GLT-1, que se expresa en la glia de la corteza motora y en la médula espinal. Tal disminución no existe en otras regiones del cerebro y tampoco existe la disminución de otros tipos de transportadores de glutamato en pacientes con ELA (Rothstein et al., 1995). En pacientes con la enfermedad de Alzheimer se ha visto que existe una disminución del número de receptores de glutamato en tejido *postmortem* (Greenamyre et al., 1986), las subunidades del receptor NMDA se reducen selectivamente en las áreas más vulnerables a la muerte neuronal y correlacionan con las alteraciones presinápticas y defectos cognitivos que se desarrollan durante esta enfermedad (Sze et al., 2001). La pérdida de los receptores de los neurotransmisores, específicamente de los receptores de

glutamato y dopamina, es una de las características patológicas en los cerebros de pacientes con Huntington. Esta pérdida de los receptores NMDA ha sido reportada por los grupos de Greenamyre (1986) y Young (1988), y se ha observado que la densidad de los receptores NMDA en el estriado de pacientes con Huntington disminuye en su etapa temprana (Young et al., 1988). Estudios recientes en ratones transgénicos que expresan el exón 1 de la proteína mutada huntingtina también han demostrado una disminución en las subunidades de los receptores metabotrópicos mGluR2, mGluR3, en los receptores a kainato (Cha et al., 1998), y de los receptores NMDA en el estriado (Higgins et al., 1999).

La similitud entre las características del daño producido por la inyección intracerebral de excitotoxinas y las del daño asociado a las enfermedades como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington es otra de las evidencias más importantes para relacionar a la excitotoxicidad con estas enfermedades. Existen modelos animales donde se reproducen los síntomas conductuales y neuropatológicos cuando se inyecta intracerebralmente algunas excitotoxinas, además de que existe una reducción del daño cuando se administran antagonistas de los receptores a glutamato (Hantraye et al., 1990; Borlogan et al., 1995). Por ejemplo, Turski et al. (1991), demostraron que la toxicidad del 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>), una toxina mitocondrial que bloquea el complejo I del transporte de electrones, en la sustancia nigra mimetiza a la enfermedad de Parkinson y que su efecto puede ser inhibido por antagonistas de los receptores NMDA y no-NMDA. Estos datos fueron confirmados por el grupo de Zuddas (1992), al demostrar que antagonistas del receptor NMDA previenen del daño neuropatológico y las anomalías conductuales que son consecuencia de la administración del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), precursor del MPP<sup>+</sup>, en primates no humanos. Los experimentos en donde se inyectó MPP<sup>+</sup> intraestriatalmente reprodujeron la disminución de GABA y de la sustancia P, la preservación del neuropéptido Y y de la somatostatina, características de la excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA en el estriado (Storey et al., 1992).

Algunas de las similitudes entre las inyecciones intraestriales de excitotoxinas, como el kainato, el quinolinato, un agonista endógeno de receptor NMDA, con la enfermedad de Huntington son: 1) la presencia de movimientos coreicos, 2) la preservación de las neuronas positivas a NADPH-diaforasa y de las neuronas grandes positivas a acetilcolinesterasa, 3) la disminución de GABA, sustancia P, encefalina, colinacetyl transferasa, 4) los incrementos de somatostatina, neuropéptido Y, neurotensina y de dopamina, y 5) una disminución del número de receptores a NMDA, receptores a acetilcolina y de receptores de GABA (Beal et al., 1986; Kanazawa et al., 1986; Hantraye et al., 1990; Beal, 1992; Ferrante et al., 1993).

También existe la posibilidad que los defectos mitocondriales puedan producir un fenómeno de excitotoxicidad secundaria y la producción de radicales libres y que éstos fenómenos sean la causa de la degeneración neuronal en las enfermedades crónicas. Existen evidencias de fallas mitocondriales en la forma esporádica de ELA (Beal, 2000), en otros trabajos se han encontrado mutaciones puntuales en la enzima superóxido dismutasa de CuZn (SOD1) en pacientes con ELA familiar (Rossen et al., 1993), una reducción en la actividad de la misma enzima y un incremento del 85% de los marcadores del daño oxidativo en el cerebro de personas con esta enfermedad (Bowling et al., 1993) y la disminución del metabolismo de la glucosa en la corteza cerebral de pacientes con ELA (Eberling et al., 1994).

Análisis de homogenados de tejido *post-mortem* de pacientes con Parkinson han proporcionado evidencias de la existencia de estrés oxidativo en las regiones vulnerables a la muerte neuronal. Existe una disminución selectiva en la actividad del complejo I mitocondrial así como una disminución de la expresión de las subunidades de este mismo complejo (Hattori et al., 1991; Janetzky et al., 1994). Además existe un incremento en la peroxidación de lípidos y de la nitrosilación de proteínas en la sustancia nigra de pacientes

con Parkinson (Dexter, 1989; Alam, 1997). Los factores responsables del incremento del estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas no son muy claros pero el hierro puede tener un papel muy importante, así como el mal funcionamiento de la mitocondria, e incluso la misma dopamina ya que su oxidación produce radicales libres (Mattson, 1999).

Se han observado defectos en el metabolismo energético de pacientes con Huntington por medio de tomografía y espectroscopia de resonancia magnética. También se ha descrito una disminución de la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa en los ganglios basales y en el hipocampo de pacientes con Huntington (Sorbi, 1983), una disminución en la respiración mitocondrial del caudado de pacientes con Huntington, siendo las enzimas citocromo oxidasa y citocromo<sub>aa3</sub> las que más disminuyen su actividad (Brennan et al., 1985). Estudios *post-mortem* muestran una deficiencia en los complejos II y III mitocondriales de la cadena de electrones caracterizada por una disminución del 39 -50% en la oxidación del succinato (Brennam et al., 1985; Gu et al., 1996; Browne et al., 1997). En ratones transgénicos que expresan el exón 1 de la proteína mutada huntingtina se ha visto una reducción del 58.8% en la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, que representa las alteraciones en el metabolismo del lactato reportado en los pacientes, anomalías de los complejos II, III y IV que forman parte de la fosforilación oxidativa (Higgins et al., 1999).

También existen experimentos que dan evidencia de las interacciones entre el estrés oxidativo, el compromiso metabólico y la sobreactivación de los receptores de glutamato en la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, el  $\beta$ -amiloide, que esta implicado en la patología de ésta enfermedad, incrementa la toxicidad del glutamato en cultivos de neuronas de corteza (Koh et al., 1990, Mattson et al., 1992), la privación de glucosa en cultivos corticales incrementa la susceptibilidad de las neuronas a la toxicidad del  $\beta$ -amiloide (Copani et al., 1991). Las evidencias de daño oxidativo que podría ser consecuencia de la

activación del receptor NMDA o del déficit del metabolismo energético en esta enfermedad son: 1) la exposición de neuronas hipocámpales y corticales al  $\beta$ -amiloide produce despolarización de la membrana e incrementa la cantidad de las especies reactivas de oxígeno (Séller et al., 1997), 2) la existencia de una reducción en la actividad de la citocromo oxidasa en la corteza cerebral (Kish et al., 1992), 3) una reducción del 50 % en la actividad de la misma enzima en mitocondrias purificadas de los cerebros de los pacientes con la enfermedad (Parker et al., 1994), y 4) un incremento de la peroxidación de lípidos en la corteza de pacientes (Palmer et al., 1994b). Análisis inmunohistoquímicos de secciones del cerebro de pacientes con Alzheimer proporcionaron pruebas de la existencia de la oxidación de proteínas, nitración de proteínas y peroxidación de lípidos en las placas neuríticas, compuestas de  $\beta$ -amiloide y de las neurofibrillas de pacientes con Alzheimer (Smith et al., 1991; Smith et al., 1997).

### **El ácido 3-nitropropiónico.**

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP), es una toxina metabolito del 3-nitropropanol que fué identificado inicialmente como un compuesto tóxico de algunas plantas como *Indigofera sp.* y *Astragalus sp.* Esta toxina fué el agente causante de la intoxicación de 900 humanos en China entre 1972 y 1989. Las personas intoxicadas habían consumido caña de azúcar contaminada con el hongo *Arthrinium*, el cual produce grandes cantidades de 3-NP y presentaron lesiones en los ganglios basales, especialmente en el putamen (Brouillet et al., 1999).

Estudios bioquímicos en preparaciones mitocondriales demostraron que el 3-NP es un inhibidor irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), la cual forma parte del ciclo de Krebs y del complejo II mitocondrial. El 3-NP inhibe a la enzima pegándose al sitio de unión del succinato donde es oxidado produciéndose ácido 3-nitroacilo ó 3-



nitroacilato que posteriormente reacciona con un grupo tiol del sitio de unión produciéndose la inhibición irreversible (Coles et al., 1979) (Fig. 2).

El 3-NP es capaz de entrar rápidamente al cerebro e inactivar a la SDH. Las lesiones que causa se asocian con un 60 -50 % de inhibición de la actividad de la enzima, sin embargo, aún se desconocen las causas del daño selectivo al estriado ya que no hay una inhibición mayor de la enzima en esta región con respecto a otras regiones como del cerebro (Brouillet et al., 1998).

A través de estudios neuroquímicos e histológicos se ha demostrado que las lesiones estriatales producidas por el 3-NP están asociadas con disminuciones en los niveles de GABA, sustancia P, neuropéptido Y y somatostatina, además de una permanencia de las aferencias dopaminérgicas (Beal, 1993).

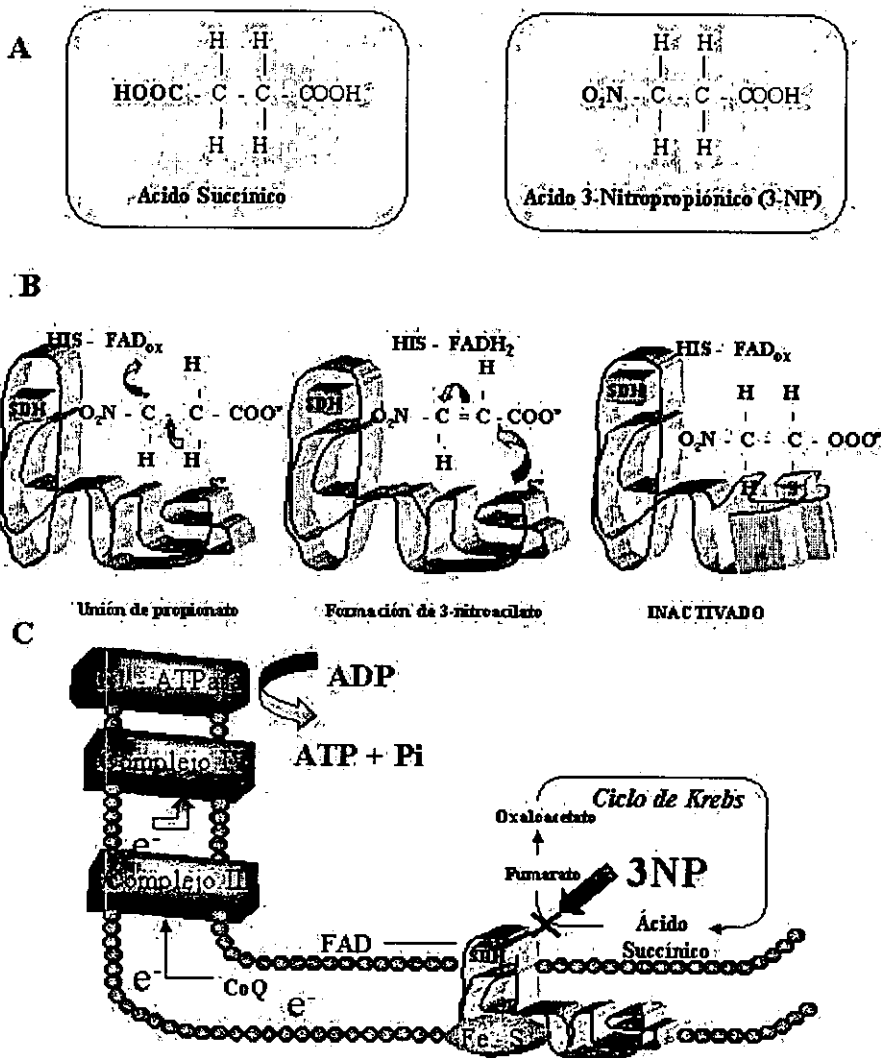


Figura 2. A) Similitud del 3-NP con el ácido succinico. B) Inactivación de la enzima succinato deshidrogenasa por el 3-NP. C) Vías metabólicas que afecta el 3-NP. Modificado de Brouillet et al. (1999)

Al parecer, el 3-NP puede producir daño por medio de varios mecanismos. En cultivos de neuronas la toxicidad del 3-NP se debe a la inhibición de la enzima SDH y a la disminución de los niveles de ATP (Riepe et al., 1994; Pang y Geddes, 1997). En preparaciones sinaptosomales el 3-NP es capaz de disminuir los niveles de compuestos fosforilados de alta energía (Erecinska y Nelson, 1994). En explantes de corteza el 3-NP además del desacople energético produce un daño excitotóxico que se inhibe con antagonistas de los receptores NMDA, aún sin restablecer los niveles de ATP (Ludolph et al., 1992). Aparentemente el daño producido por el 3-NP *in vivo* también es de tipo excitotóxico ya que las características histológicas que produce se parecen a las producidas por quinolinato y son prevenidas por la remoción de aferencias glutamatérgicas hacia el estriado (Beal et al., 1993a; Guyot et al., 1997)). También se ha visto que inyecciones sistémicas del 3-NP incrementan la apertura del receptor NMDA, monitoreado por la unión del  $[H^3]$  MK-801 (antagonista no competitivo del receptor NMDA) en el estriado (Wüller et al., 1994). *In vivo*, la inyección del 3-NP intraestriatal produce un aumento en el lactato y una disminución de ATP (Brouillet et al., 1993, Matthews et al., 1998). En primates tratados con 3-NP se produce un incremento en los niveles de N-acetil aspartato y lactato que correlaciona únicamente con la presencia de lesiones en el estriado (Brouillet et al., 1999).

- **3-NP como modelo de la enfermedad de Huntington**

Modelos animales de intoxicación con el 3-NP reproducen varios aspectos de la enfermedad de Huntington en cuanto a la degeneración estriatal, el aspecto dinámico desde la fase hiperkinética hasta la distonia y postramiento. También replica las anomalías neuroquímicas, histológicas y metabólicas de la enfermedad como es la disminución de la actividad del complejo II y los incrementos de lactato que se observan en los pacientes.

## **HIPÓTESIS**

---

*Si la inhibición de la recaptura del glutamato produce muerte neuronal solo cuando existe una inhibición mitocondrial, entonces ésta podrá prevenirse con sustratos que formen parte del metabolismo energético.*

## **OBJETIVO GENERAL**

---

El objetivo general de este trabajo es buscar compuestos que contrarresten el daño neuronal cuando se inhibe la recaptura de glutamato y se altera el metabolismo energético mitocondrial *in vivo*.

## HIPÓTESIS

---

*Si la inhibición de la recaptura del glutamato produce muerte neuronal solo cuando existe una inhibición mitocondrial, entonces ésta podrá prevenirse con sustratos que formen parte del metabolismo energético.*

## OBJETIVO GENERAL

---

El objetivo general de este trabajo es buscar compuestos que contrarresten el daño neuronal cuando se inhibe la recaptura de glutamato y se altera el metabolismo energético mitocondrial *in vivo*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

---

- Conocer en que momento la actividad de la enzima SDH tiene una mayor inhibición en el estriado de ratas inyectadas con el 3 -NP.
- Establecer si existe una relación entre la inhibición de la recaptura de glutamato por el PDC y el grado de inhibición de la enzima SDH.
- Determinar si la administración de sustratos energéticos pueden contrarrestar el daño producido por la inhibición del transporte de glutamato y la inhibición del metabolismo energético y comparar su efecto con el del antagonista glutamatérgico MK-801.

## METODOLOGÍA

---

- **Determinación de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH)**

Para la determinación de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa a diferentes tiempos después de la administración intraperitoneal de 3-NP se utilizaron ratas de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 300 g. Las ratas recibieron una inyección intraperitoneal de 3-NP (20 mg/Kg), que fué disuelto en buffer fosfatos (10 mM) y ajustado a un pH de 7-7.5 con NaOH 1N, y sacrificadas a las 1, 2, 4, 24 y 48 h después de la inyección de 3-NP. Las ratas control recibieron una inyección de buffer fosfatos 10 mM y fueron sacrificadas a los diferentes tiempos mencionados. Para sacrificar a las ratas primeramente fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital (1ml) y posteriormente perfundidas transcardiacamente con 100 ml de solución salina (NaCl 0.9 %) seguidos de 100 ml de PBS frío con 10 % glicerol.

Para determinar la actividad de la enzima se siguió el método utilizado por Brouillet et al. (1998). Inmediatamente después de la perfusión se retira el cerebro del cráneo y se congela en isopentano. Los cerebros se guardaron en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvieron cortes coronales de 16  $\mu\text{m}$  en un crióstato, posteriormente los cortes se montaron sobre cubreobjetos y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 o 2 días. Se aislaron los cortes colocando un anillo de plástico a su alrededor y se incubaron a  $37^{\circ}$  en PBS por 10 minutos para activar la enzima. Se agregaron 150  $\mu\text{l}$  de una mezcla de reacción en frío. La mezcla contenía succinato (0.05 M), que es el sustrato de la enzima SDH, un receptor de electrones llamado Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (0.3 mM) y buffer fosfatos (0.05 M pH 7.6). Para la tinción, se incubaron los cortes en una cámara húmeda a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. La reacción se detuvo agregando PBS frío por 5 minutos. Se lavaron los cortes con agua destilada por

unos segundos y se dejaron secar. Los cortes toman una coloración azul debido a las sales de fomezán que se producen cuando el NBT recibe los electrones generados por la actividad de la enzima. Para demostrar la especificidad del ensayo, algunos cortes fueron incubados con la misma mezcla de reacción pero sin succinato, estos cortes no obtuvieron la coloración azul.

La densidad óptica de la tinción de los cortes se cuantificó con un sistema analizador de imágenes (NIH Macintosh Image versión 1.6). Se escogieron tres cortes por rata, todos entre las coordenadas correspondientes a la región del estriado (0.2 a 1.0 mm anterior a Bregma según el atlas de Paxinos y Watson, 1986). Una vez capturada la imagen en la computadora se delineó el perímetro del estriado y se calculó la densidad óptica correspondiente al área marcada. La densidad óptica de los controles (promedio  $7.22 \pm 1.68$ ) fue considerada como el 100 % de actividad.

- **Tratamiento.**

En todos los experimentos se utilizaron ratas de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 300 g. Para conocer la relación entre el daño producido por el PDC y el grado de inhibición de la enzima SDH, las ratas fueron inyectadas intraestriatalmente con PDC (500 nmol) a las 4, 24 y 48 horas después de la inyección intraperitoneal de 3-NP y sacrificadas 24 h después. El PDC (500 nmol) fue disuelto en buffer fosfatos 10 mM y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 1N.

Para poder observar el efecto de los diferentes compuestos, las ratas se inyectaron intraperitonealmente con 3-NP (20 mg/Kg) y 4 h después se realizó una inyección intraestriatal de PDC (500 nmol/ $\mu$ l). Adicionalmente los compuestos metabólicos acetoacetato,  $\beta$ - hidroxibutirato, piruvato, creatina y el antagonista del receptor NMDA



llamado MK-801, se administraron a diferentes tiempos antes y/o después de la inyección del PDC.

El acetoacetato (250 mg/Kg) fué administrado intraperitonealmente a las 3.5, 4 y 6 horas después de la inyección de 3-NP. Las administraciones de  $\beta$ -hidroxibutirato (322 mg/Kg) fueron a las 3, 4 y 5.5 h después de la inyección de 3-NP. La creatina se administró en la dieta con una dosis diaria de 500 mg en 40 ml H<sub>2</sub>O durante 7 días. Al séptimo día las ratas de este grupo fueron inyectadas con el 3-NP (20 mg/Kg) y el PDC a los tiempos indicados. El piruvato fué administrado por dos vías en dos grupos independientes; el primer grupo recibió tres dosis de piruvato intraperitoneal (500 mg/Kg) a las 3.5, 4 y 6 horas después de la inyección del 3-NP; el segundo grupo recibió 250  $\mu$ l de piruvato 200 mM (50  $\mu$ molas en total), administrado intravenosamente a través de la vena lateral de la cola y con la ayuda de una micro bomba. El flujo de la bomba fué de 0.09 ml/min y la inyección se realizó 15 minutos antes del PDC. El MK-801 fué inyectado intraperitonealmente (2 mg/Kg) a las 3.5 horas después del 3-NP.

El acetoacetato y el  $\beta$ -hidroxibutirato fueron disueltos en HCl 0.1 N, (pH de 7), finalmente se llevó al volumen deseado con agua. El piruvato que se administró intravenosamente y el MK-801 fueron disueltos en solución salina (NaCl 0.9 %). La creatina se disolvió en agua. El piruvato que se administró intraperitonealmente se disolvió en buffer fosfatos 10 mM y se ajustó el pH con NaOH 1N.

- ***Inyecciones intraestriatales de PDC***

Para las inyecciones intraestriatales de PDC las ratas se anestesiaron con halotano 4-5 % y se colocaron en un aparato estereotáxico con la barra de la nariz colocada en la posición -3.3. Después de hacer un pequeño orificio (2 mm) en el cráneo, la aguja se colocó en el estriado dorsal (coordenadas: + 0.7 mm de bregma, + 2.8 mm de la línea media y - 4.0 mm

llamado MK-801, se administraron a diferentes tiempos antes y/o después de la inyección del PDC.

El acetoacetato (250 mg/Kg) fué administrado intraperitonealmente a las 3.5, 4 y 6 horas después de la inyección de 3-NP. Las administraciones de  $\beta$ -hidroxibutirato (322 mg/Kg) fueron a las 3, 4 y 5.5 h después de la inyección de 3-NP. La creatina se administró en la dieta con una dosis diaria de 500 mg en 40 ml H<sub>2</sub>O durante 7 días. Al séptimo día las ratas de este grupo fueron inyectadas con el 3-NP (20 mg/Kg) y el PDC a los tiempos indicados. El piruvato fué administrado por dos vías en dos grupos independientes; el primer grupo recibió tres dosis de piruvato intraperitoneal (500 mg/Kg) a las 3.5, 4 y 6 horas después de la inyección del 3-NP; el segundo grupo recibió 250  $\mu$ l de piruvato 200 mM (50  $\mu$ mol en total), administrado intravenosamente a través de la vena lateral de la cola y con la ayuda de una micro bomba. El flujo de la bomba fué de 0.09 ml/min y la inyección se realizó 15 minutos antes del PDC. El MK-801 fué inyectado intraperitonealmente (2 mg/Kg) a las 3.5 horas después del 3-NP.

El acetoacetato y el  $\beta$ -hidroxibutirato fueron disueltos en HCl 0.1 N, (pH de 7), finalmente se llevó al volumen deseado con agua. El piruvato que se administró intravenosamente y el MK-801 fueron disueltos en solución salina (NaCl 0.9 %). La creatina se disolvió en agua. El piruvato que se administró intraperitonealmente se disolvió en buffer fosfatos 10 mM y se ajustó el pH con NaOH 1N.

- ***Inyecciones intraestriatales de PDC***

Para las inyecciones intraestriatales de PDC las ratas se anestesiaron con halotano 4-5 % y se colocaron en un aparato estereotáxico con la barra de la nariz colocada en la posición -3.3. Después de hacer un pequeño orificio (2 mm) en el cráneo, la aguja se colocó en el estriado dorsal (coordenadas: + 0.7 mm de bregma, + 2.8 mm de la línea media y - 4.0 mm

a partir de la dura según Paxinos y Watson, 1986). Se inyectó unilateralmente 1  $\mu$ l de PDC (500 nmol) con ayuda de una microbomba a una velocidad de 0.5  $\mu$ l/min. La rata se mantuvo con baja anestesia (0.5 % halotano) y dos minutos después de terminada la inyección de PDC se retiró la aguja y se suturó la piel. Se retiró la rata del estereotáxico y se mantuvo en una caja que se encontraba debajo de una lámpara, esto para mantener la temperatura corporal de la rata y evitar la hipotermia producida por la anestesia. Las ratas se mantuvieron con agua y comida 24 h después de la inyección de PDC. Posteriormente fueron sacrificadas como se describe en la evaluación histológica.

- **Evaluación histológica**

24 h después de la inyección de PDC, se les administró a las ratas una sobredosis de anestesia (0.9 ml de pentobarbital), para inducir un paro respiratorio. Posteriormente fueron perfundidas transcardiacamente con 250 ml de solución salina seguidos de 250 ml de formaldehído al 10 % en buffer fosfatos 0.1 M. Los cerebros fueron extraídos y permanecieron en el fijador por 24 h para después ser transferidos por un gradiente de sacarosa (sacarosa 20 % por 24h y sacarosa 30 % por 48 h). Se obtuvieron cortes coronales de 40  $\mu$ m por medio de un crióstato. Los cortes montados en portaobjetos fueron teñidos con violeta de cresilo. Los cortes fueron analizados en un microscopio óptico. El área de lesión fué cuantificada con la ayuda de un sistema de cómputo acoplado a una cámara digital utilizando el programa de análisis de imágenes NIH 1.6 para Macintosh. Se calculó el volumen de lesión de la siguiente manera:

Volumen de lesión = sumatoria del área lesionada del número total de cortes analizados multiplicado por la distancia ( $\mu$ m) entre el primer y el último corte donde el daño fué visible.

- **Determinación de lactato**

Una forma de explicar el incremento en el volumen de lesión al administrar piruvato es que altas concentraciones de este compuesto produzcan una acidosis láctica. Para explorar esta posibilidad se cuantificaron los niveles de lactato bajo estas condiciones.

Para la cuantificación de lactato, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con 3-NP (20 mg/Kg). Posteriormente recibieron tres inyecciones de piruvato (500 mg/Kg) a las 3.5, 4 y 6 horas después de la inyección de 3-NP. Otro grupo de ratas recibió un tratamiento crónico de 3-NP (15 mg/Kg), con una inyección diaria durante 14 días. Las ratas fueron sacrificadas 1.5 horas después de la última inyección de piruvato ó 4 horas después de la última inyección de 3-NP, en el caso de haber recibido un tratamiento crónico. Se realizó la disección del estriado y del hipocampo. El tejido se pesó y se homogenizó con agua a una proporción 1:10 (peso/volumen). Se le agregó ácido perclórico (5 % del volumen total) y se centrifugaron por 5 minutos en una microcentrífuga (Beckman). Se recolectó el sobrenadante y se guardó en congelación (-20° C) alrededor de 24 h. Se descongeló el sobrenadante y se neutralizó con KOH 1 M hasta alcanzar un pH de 7-7.5.

Para la cuantificación de lactato se utilizó un kit de determinación de lactato (Sigma). Este kit se basa en el hecho que la enzima lactato oxidasa produce piruvato y  $H_2O_2$  a partir del ácido láctico. En presencia de  $H_2O_2$  la enzima peroxidasa cataliza la condensación de los precursores de un cromógeno produciéndose una coloración rosamorado con una absorbancia de 540nm.

Se siguieron las instrucciones del proveedor y se modificó la cantidad de muestra a 150  $\mu$ l. Se utilizó un espectrofotómetro para medir el incremento en la absorbancia a 540 nm, el cual es proporcional a la concentración de lactato en la muestra. Se colocó en las celdas 1

ml del reactivo de lactato que fué reconstituido con 10 ml de agua y que contiene la enzima lactato oxidasa, peroxidasa y buffer pH 7.2. A las celdas que contenían 1ml del reactivo de lactato se les agregó 10  $\mu$ l de soluciones de concentraciones conocidas de lactato: 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/dl. Para las soluciones patrón, el lactato (sal de litio) fué pesado y disuelto en agua. Para realizar una curva patrón, se agregaron 10  $\mu$ l de las diferentes soluciones patrón a 1ml del reactivo (Sigma). Para la determinación de lactato en la muestra, se agregó 860  $\mu$ l del reactivo (Sigma) y 150  $\mu$ l de la muestra neutralizada. En ambos casos, se dejan pasar 5 minutos y se toma la lectura de la absorbancia (540 nm). Para determinar la cantidad de lactato en la muestra, se utiliza la curva de calibración como referencia y los datos se muestran como  $\mu$ mol de lactato/g de peso fresco. Ninguno de los animales que recibieron el tratamiento crónico de 3-NP presentaron las anomalías motoras descritas por Hamilton y Gould (1987).

- **Materiales**

La creatina, piruvato, acetoacetato  $\beta$ -hidroxibutirato, el succinato, el NBT, el ácido 3-nitropropiónico y el kit de determinación de lactato fueron obtenidos de Sigma (St. Lius MO Estados Unidos), el MK-801 de RBI (Natick, MA, Estados Unidos) y el PDC de Tocris (Bristol, Inglaterra).

- **Análisis estadístico.**

Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA de seguida de la prueba de Fisher de comparación múltiple utilizando el programa Statview 4.5 para Macintosh y se presentan como media  $\pm$  error estándar.

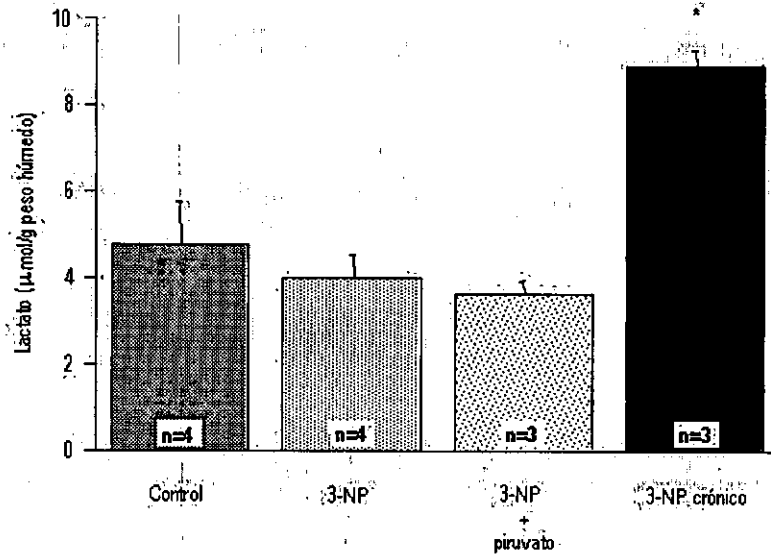


Figura 7. Niveles de lactato en homogenados de cerebro de ratas tratadas con una sola dosis de 3-NP (20 mg/Kg), o con una dosis de 3-NP más tres dosis de piruvato i.p. (500 mg/Kg) y de ratas que recibieron un tratamiento crónico de 3-NP (15 mg/Kg) durante 14 días. \*  $P < 0.05$  con respecto a las ratas control, tratadas con 3-NP y 3-NP más piruvato. Los datos mostrados son Medias  $\pm$  Error Estándar. El número de ratas tratadas en cada grupo se muestra en la barra correspondiente.

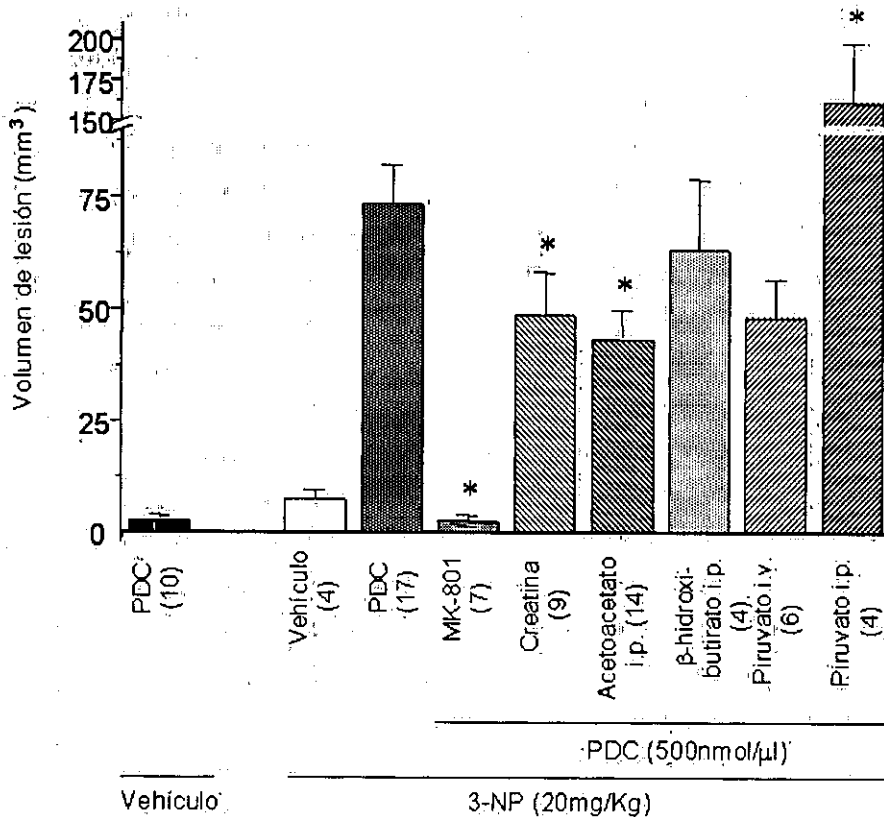


Figura 5. Efecto de diversos sustratos energéticos y del compuesto MK-801 sobre el volumen de lesión producido por el PDC en ratas energéticamente deficientes. \*  $P < 0.05$  con respecto a las ratas tratadas con PDC (500 nmol) más 3-NP(20 mg/Kg). Los datos mostrados son Medias  $\pm$  Error Estándar. El número de ratas tratadas en cada grupo se muestra en la barra correspondiente.

En la figura 6 se muestran cortes representativos de las lesiones producidas en cada uno de los grupos de protección. En las ratas inyectadas únicamente con PDC la apariencia del tejido es similar a la del lado contralateral, las células tienen apariencia normal, no hay núcleos picnóticos excepto en el tracto de la aguja. En las ratas inyectadas con 3-NP i.p. más PDC se observa un incremento en el área de lesión donde hay una disminución en la cantidad de neuronas y una gran cantidad de núcleos picnóticos. La morfología del estriado en el área de lesión se pierde totalmente. En las ratas tratadas con los sustratos energéticos dentro de la lesión existen células con morfología normal y en algunas ocasiones el perímetro de la lesión no está bien definido debido a la coexistencia de núcleos no picnóticos y picnóticos. En las ratas inyectadas con MK-801 i.p. las células tienen una morfología normal, es decir son células con núcleos bien definidos, aún cerca del tracto de la aguja.



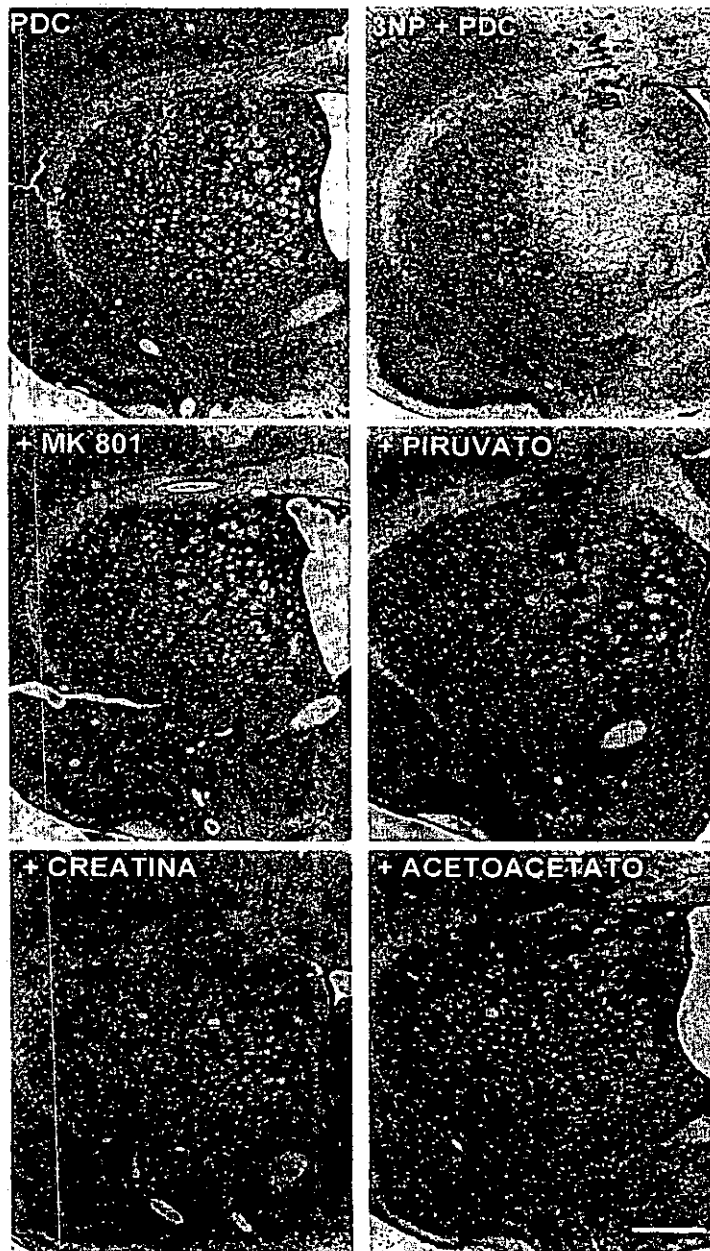


Figura 6. Microfotografías de las lesiones en el estriado de animales representativos de cada grupo de protección. Las ratas fueron tratadas con 3-NP (20mg/Kg) e inyectadas con PDC (500nmol) algunos grupos de ratas recibieron tratamientos con sustratos energéticos o con MK-801. La barra de escala = 0.7mm

## Discusión

---

Existen reportes que han demostrado la relación entre la toxicidad del glutamato y el desacople energético principalmente por la inhibición mitocondrial tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, se conoce que el daño excitotóxico se exagera en ausencia de glucosa o cuando se inhibe la fosforilación oxidativa en cultivos neuronales (Novelli, 1988; Heneberry, 1989) y cuando se inhibe la cadena del transporte de electrones en cultivos de retina, daño que es prevenido por antagonistas del receptor NMDA (Zeevalk y Nicklas, 1990). Las lesiones inducidas por NMDA, AMPA, glutamato y ácido quinolínico *in vivo* también se incrementan cuando las funciones mitocondriales se interrumpen (Green y Greenamyre, 1995; Bazzett, 1996), además en ratas tratadas con inhibidores de la glicólisis ó del ciclo de Krebs, la lesión producida por el aumento en la concentración de glutamato extracelular debido a la inhibición de su recaptura también se exageran (Sánchez-Carbente y Massieu, 1999; Massieu et al., 2000).

En el laboratorio se demostró anteriormente que la inyección intraestriatal del inhibidor del transporte de glutamato, el L- trans-pirrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC), produce un incremento de las concentraciones extracelulares de 6 a 7 veces sobre las concentraciones basales de aspartato y glutamato en el estriado y en el hipocampo de la rata (Massieu et al., 1995; Massieu et al., 2000). En estas ratas cuyos niveles energéticos no han sido alterados el PDC no induce daño neuronal lo que indica que las neuronas en condiciones normales pueden tolerar un incremento en las concentraciones de glutamato y aspartato y sobrevivir. El daño neuronal inducido por PDC, tanto en estriado como en hipocampo se incrementa si las ratas son tratadas crónicamente con un inhibidor de la glicólisis, el yodoacetato (Massieu et al., 2000), o con un inhibidor del ciclo de Krebs y de la cadena de electrones mitocondrial, el 3-NP (Sánchez-Carbente y Massieu, 1999). Los resultados presentados en este trabajo indican que una deficiencia energética transitoria también hace más vulnerables a las

neuronas a los retos excitotóxicos, ya que una sola inyección de 3 -NP (20 mg/Kg) es suficiente para que el daño por el PDC se incremente.

Los datos respecto a la inhibición de la enzima SDH mostrados en el presente estudio, concuerdan con los reportados por el grupo de Brouillet (1998) en que la administración de 3-NP (25 mg/Kg) produce una inhibición del 50 % de la SDH a las dos horas y una recuperación de su actividad 48 h después de haber inyectado el 3 -NP.

Por otro lado, reportes previos muestran que la inhibición de la SDH por el 3- NP o por malonato, que es un inhibidor reversible de la SDH, exagera el daño producido por NMDA en el estriado de rata *in vivo* (Green y Greenamyre, 1995). En este caso, se demostró que el PDC también produce un incremento en el volumen de lesión en el estriado de ratas inyectadas con 3-NP. En conjunto, los resultados mostrados en la figura 3 indican que existe una relación entre la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa y el volumen de daño producido por la inhibición de la recaptura del glutamato ya que, cuando se inyecta el PDC a las 4 h, punto en el que la enzima esta más inhibida, se producen las lesiones más grandes; en cambio, cuando la enzima esta inhibida únicamente un 10% el PDC no produce daño. En cultivos primarios de neuronas estriatales se ha demostrado que el incremento de la toxicidad de NMDA causada por la inhibición de la SDH se debe al sinergismo entre la liberación del ión  $Mg^{2+}$  del receptor NMDA, lo cual aumentaría su actividad, y a un mecanismo adicional como podría ser la desregulación de la homeostasis del calcio (Green et al., 1998), este mismo mecanismo podría ser el responsable del efecto del 3 -NP más PDC *in vivo*.

El mecanismo por el que el 3-NP produce una muerte neuronal todavía no está clarificado pero se ha sugerido a la excitotoxicidad secundaria como probable mecanismo. Bajo las condiciones utilizadas en este trabajo, el inhibidor del receptor NMDA, el MK- 801,

produjo una protección del 100 %. Este resultado indica que efectivamente el receptor NMDA está involucrado en el daño producido por el déficit energético. El MK-801 es un antagonista de los receptores NMDA y su efecto protector se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de daño producido por la inhibición de la glicólisis, contra el daño isquémico y contra el daño producido por la azida de sodio (Barth et al., 1996; Frandsen y Schousboe., 1996; Miyabe et al., 1997; Massieu et al., 2000).

Situaciones como esta, donde existe una deficiencia energética y un incremento de los niveles extracelulares de glutamato son similares a las que ocurren en la isquemia. Durante la isquemia existe una inhibición de la fosforilación oxidativa, disminución de los niveles de ATP, producción de radicales libres causados por la inhibición de la cadena de electrones, incrementos en las concentraciones intracelulares de  $\text{Na}^+$  y una despolarización de la membrana como resultado del mal funcionamiento de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Lipton, 1999). La causa del incremento en las concentraciones de glutamato durante la isquemia puede deberse al funcionamiento inverso del transportador de glutamato (Rossi et al., 2000), a la liberación de glutamato dependiente de calcio, ya sea extracelular ó proveniente de pozas intracelulares (Drejer et al., 1985; Katchman y Hershkowitz, 1993), ó a la liberación de glutamato por canales iónicos dependientes del hinchamiento (Bednar et al., 1992). En este modelo *in vivo* el incremento se debe al bloqueo de la recaptura de glutamato por el PDC, el cual es un inhibidor substrato del transportador de glutamato que produce la salida de glutamato al intercambiarse con éste (Volterra et al., 1996).

Debido a que el daño se produjo durante una deficiencia energética, se probaron distintos sustratos energéticos que, de diferentes maneras, incrementan los niveles de ATP. El efecto protector de la creatina ya se ha mostrado contra el daño hipóxico en rebanadas de hipocampo de rata (Chung, 1998; Balestrino, 1999), *in vivo* en modelos en rata de la enfermedad de Parkinson mediante la utilización de la toxina MPTP (Matthews et al., 1999),

en modelos animales de la enfermedad de Huntington (Matthews et al., 1998), contra el daño producido por inyecciones intraestriales de NMDA y malonato (Malcon et al., 2000), además de que incrementa la vida media de ratones transgénicos que expresan el exon 1 del gen de la proteína huntingtina, la cual es la proteína mutada en la enfermedad de Huntington (Ferrante et al., 2000). En este trabajo la creatina disminuyó en aproximadamente un 30 % el daño producido por el 3-NP mas el PDC. La protección parcial observada en el modelo de 3-NP + PDC, puede deberse a que el pretratamiento con creatina únicamente duró 7 días, mientras que en los reportes anteriores donde la protección es clara, el pretratamiento con creatina dura al menos 14 días. En este trabajo se utilizó la concentración de creatina (1 %) que produce mejores resultados en el reporte del grupo de Matthews (1998).

La creatina puede tener varios mecanismos por los cuales puede ejercer sus efectos protectores. En primer lugar, restablece los niveles de compuestos fosfatados como el ATP y la fosfocreatina (Matthews et al., 1998) los cuales pueden servir como reservas energéticas. La creatina se transforma a fosfocreatina por medio de la creatina cinasa mitocondrial y es capaz de movilizarse hacia los sitios de alta demanda energética donde el fosfato de la fosfocreatina se transfiere a un ADP produciéndose ATP. Algunos otros efectos de la creatina que pueden contribuir a su efecto neuroprotector en este modelo *in vivo* son: un retraso en el incremento de calcio intracelular producido por el 3-NP en astrocitos corticales y estriales *in vitro* (Desphande et al., 1997), disminución de los incrementos de marcadores de la generación de radicales hidroxil inducidos por malonato (Floyd et al., 1984) e inhibir la activación del poro de transición mitocondrial por medio de la estabilización de la enzima creatina cinasa mitocondrial (O'Gorman et al., 1997).

Por otro lado, los cuerpos cetónicos son precursores de la acetil- CoA la cual es capaz de entrar al ciclo de Krebs. Se sabe que durante periodos de inanición, el movimiento

de los cuerpos cetónicos hacia el cerebro se incrementa debido a que existe una mayor afinidad por su transportador (Pollay y Stevens, 1980). En el cerebro, los cuerpos cetónicos son transportados hacia el cerebro por un transportador de monocarboxilatos que es altamente regulado durante periodos de inanición (Janigro, 1999). La recaptura de la glucosa también está controlada por transportadores transmembranales como el GLUT1, se sabe que cuando hay periodos largos de inanición los niveles de cuerpos cetónicos modulan la actividad de éste transportador (Janigro, 1999). Por lo tanto, el incremento en los niveles de cuerpos cetónicos en el plasma no solo representa un sustrato alternativo para el cerebro, sino que también incrementa la actividad del transportador GLUT1 por su efecto directo en el transporte de glucosa.

Este es el primer trabajo que demuestra que el acetoacetato puede ejercer un efecto sobre el volumen de lesión en el estriado de ratas adultas con deficiencia energética y por lo tanto que los cuerpos cetónicos pueden ser utilizados como sustratos alternativos en animales adultos. El efecto observado del acetoacetato puede deberse a que puede proporcionar moléculas de Acetil-CoA y regenerar el ciclo de Krebs, así como de aumentar los niveles de GABA lo cual evitaría la sobreexcitación de las neuronas y por tanto su muerte. Este incremento de GABA ya ha sido reportado en ratones que fueron tratadas con cuerpos cetónicos (Daikhin y Yudkoff, 1998). Otro posible mecanismo del acetoacetato es que prevenga del daño excitotóxico ya que se ha reportado que los cuerpos cetónicos incrementan la formación del ácido kinurénico, un antagonista endógeno del receptor NMDA (Hodgkins y Schwarcz, 1998a, b).

El efecto parcial de los cuerpos cetónicos puede deberse a que la actividad de las enzimas encargadas de su metabolismo disminuyen en los adultos, el transporte de éstos en las neuronas también puede ser determinante para su utilización como sustrato energético ya que se ha visto que la cantidad de  $\beta$ -hidroxibutirato que se acumula en las células

neuronales de ratas de 28 días es de solo la mitad del que se acumula en ratas de 15 días (Tildon y Roeder, 1988). O bien, deberse a que existe una captura de cuerpos cetónicos que difiere según la región cerebral siendo las capas corticales las que más consumen los cuerpos cetónicos, mientras que el estriado tiene una captura media (Hawkins y Biebuyck, 1978). La diferencia entre la protección de acetoacetato y la no protección de  $\beta$ -hidroxibutirato, puede deberse a que el  $\beta$ -hidroxibutirato necesita ser metabolizado a acetoacetato antes de entrar al ciclo de Krebs, por lo que es posible que se necesiten dosis mas altas de  $\beta$ -hidroxibutirato para poder observar un efecto similar al del acetoacetato.

El efecto neuroprotector  $\beta$ -hidroxibutirato del no queda claro todavía, se ha reportado que el  $\beta$ -hidroxibutirato es capaz de mantener los niveles de ATP pero no la función sináptica de rebanadas de hipocampo en ausencia de glucosa (Wada et al., 1997), que puede ser un sustrato para la producción de compuestos fosfatados energéticos pero no mantiene la actividad neuronal en rebanadas de hipocampo de cobayos (Arakawa et al., 1991); sin embargo preserva la integridad funcional y morfológica en rebanadas de hipocampo de ratas inmaduras (Izumi et al., 1998), y tiene un efecto neuroprotector contra la toxicidad del MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridinium) y del fragmento 1-42 de la proteína  $\beta$ -Amiloide en neuronas mesencefálicas *in vitro* (Kashiwaya et al., 2000).

El piruvato, por poder restablecer el ciclo de Krebs directamente, es uno de los compuestos con mayor capacidad de proteger a las neuronas contra la muerte. Se ha reportado que el piruvato protege contra el daño neuronal producido por el H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> (Desagher et al., 1997), contra el daño producido por el glutamato (Ruiz et al., 1998) y contra el daño inducido por el NMDA y el AMPA en ausencia de glucosa *in vitro* (Eimerl y Schram, 1995; Maus et al., 1999). *In vivo*, también se demostró la capacidad protectora del piruvato en un modelo de inhibición de la glicólisis y en el daño producido por el PDC, el inhibidor de la recaptura de glutamato (Massieu et al., 2000)

Los mecanismos por los que el piruvato puede proteger contra los diferentes tipos de daño no se conocen bien, pero puede deberse a su capacidad de regenerar los niveles de ATP y de incrementar la capacidad reductora de las deshidrogenasas mitocondriales (Maus et al., 1999). Además se ha observado que en presencia de piruvato y malato los incrementos de calcio intracelular causados por glutamato son menores (Ruiz et al., 1998). Por otro lado, el efecto neuroprotector del piruvato también puede deberse a que es cosustrato de las transaminasas del ácido kinurénico (KAT I y II), las cuales sintetizan ácido kinurénico. El incremento del ácido kinurénico por piruvato se ha demostrado anteriormente y puede darse tanto en condiciones normoglicémicas como hipoglicémicas (Hodgkins y Schwarcz, 1998). El piruvato puede también proteger contra el daño oxidativo induciendo la degradación del  $H_2O_2$  por una reacción no enzimática. Se ha reportado que el estrés oxidativo tiene un papel en la excitotoxicidad causada por el 3-NP. En estas lesiones hay un incremento de radicales libres (Schulz et al., 1996) y la toxicidad del 3-NP es atenuada por atrapadores de radicales libres o por antioxidantes (Schulz et al., 1996; La Fontaine et al., 2000).

Es importante tomar en cuenta que de acuerdo a nuestros resultados el piruvato puede ser neuroprotector, pero también puede incrementar el daño excitotóxico cuando es administrado en dosis altas (tres inyecciones i.p. de 500 mg/Kg). Este incremento del daño no se debe a una acidosis láctica, ya que la concentración de ácido láctico en homogenados de cerebro no se incrementó después de la administración de tres dosis de piruvato en ratas tratadas con 3-NP. Se ha observado que el piruvato en altas concentraciones no protege contra el daño producido por  $H_2O_2$  e incluso lo exacerba (Desagher et al., 1997). Se ha propuesto que este efecto se debe a la acidificación producida al transportarse el piruvato al interior celular a través del transportador  $H^+$ /monocarboxilato. Además a pH ácido no se favorece la degradación no-enzimática del  $H_2O_2$  por el piruvato (Desagher et al., 1997). Si en este modelo *in vivo* existe un incremento en los radicales libres debido a la acción directa del



3-NP sobre la cadena de electrones, y si ya se observó que la capacidad de captura de radicales del piruvato no solo se pierde cuando éste se encuentra en concentraciones elevadas sino que también incrementa el daño producido por  $H_2O_2$  *in vitro*, es posible que el piruvato al ser inyectado i.p. tres veces a una dosis de 500 mg/kg tenga un efecto similar.

## CONCLUSIONES

---

El presente trabajo permite concluir lo siguiente:

- 1) Existe una relación entre el grado de inhibición de la enzima SDH, causado por el 3-NP, y el incremento del daño causado por el aumento de los niveles de glutamato extracelular inducido por el PDC
- 2) La inhibición metabólica promueve o facilita la activación del receptor NMDA ya que el MK-801 protegió totalmente contra el daño neuronal.
- 3) El daño que se produce por la deficiencia energética y la inyección intraestriatal de PDC sólo es parcialmente disminuido al utilizar compuestos que incrementen los niveles energéticos de la célula. Esto sugiere que otros mecanismos como la producción de radicales libres o a la pérdida de la homeostasis de calcio pueden estar involucrados. Alternativamente la deficiencia energética no es revertida en su totalidad con las estrategias experimentales utilizados en este estudio.

## REFERENCIAS

---

- Aizenman E., Sinor J. D., Brimecombe J. C., y Herin G. A. 2000 Alterations of N-methyl-D-aspartate receptor properties after chemical ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 572-7.
- Alam Z. I., Janner A., Daniel S. E., Lees A. J., Mardsen C. D., Jenner P. y Halliwell B. 1997 A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not in accidental Lewy bodies. *J. Neurochem.* 69:1326-1329.
- Albin R. L. y Greenamyre J. T. 1992 Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology.* 42: 733-738.
- Arakawa T. Goto T. y Okada Y. 1991 Effect of ketone body (*D*-3 -hydroxybutyrate) on neural activity and energy metabolism in hippocampal slices of the adult guinea pigs. *Neurosci. Lett.* 130: 53-56.
- Artola A. y Singer W. 1987 Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature.* 330: 649 - 652.
- Baker A. J., Zornow M. H., Sellar M. S., Yaksh T. L. y Skilling S. R. 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.
- Balestrino M., Rebaudo R. y Lunardi G. 1999 Exogenous creatine delays anoxic depolarization and protects from hypoxic damage: dose-effects relationships. *Brain Res.* 816: 124-130.
- Barth A.; Barth L. y Newell D. W. 1996 Combination therapy with MK-801 and alpha-phenyl-*tert*-butyl-nitron enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slices cultures. *Exp. Neurol.* 141: 330- 336.
- Bazzet T. J., Falik R. C., Becker J. B., y Albin R. L. 1996 Synergistic effects of chronic exposure to subthreshold concentrations of quinolinic acid and malonate in the rat striatum. *Brain. Res.* 718: 228-232.
- Beal F. M. 1992 Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* 31: 119- 130.
- Beal M. F. 2000 Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *TINS* 23: 298-304.
- Beal M. F., Brouillet E., Jenkins B., Ferrante R., Kowall N., Miller J., Storey E., Srivastava R., Rosen B. y Imán B. T. 1993a Neurochemical and histologic characterization of

- striatal lesions produced by mitochondrial toxin 3- nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13 : 4181–4192.
- Beal M. F., Brouillet E., Jenkins E., Henshaw R., Rosen B., y Imán B. T. 1993b Age - dependent striatal lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J. Neurochem.* 61: 1147–1150.
- Beal M. F., Kowall N. W., Ellison D. W., Mazurek M. F., Swartz K. J. y Martín J. B. 1986 Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321: 168–171.
- Bednar M., Kohut J., Kimelbeerg H., Gross J. y Gross C. 1992 In vitro evidence supporting two mechanisms of action for the anion transport inhibitor L-644,711 in cerebral ischaemia. *Neurol. Res.* 14: 53-56.
- Benevise H. , Drejer J., Schousboe A., y Diemer H. N. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43: 1369–1374
- Blandini F., Porter R. y Greenamyre T. 1996 Glutamate and Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.* 12: 73–94.
- Borlogan C. V., Koutousis T. K., Freeman T. B., Cahill D. W. y Sanberg P. R. 1995 Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3 –nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease. *Brain Res.* 697: 254 – 257.
- Boulter J., Hollmann M., O'Shea-Greenfield A., Hartley M., Deneris E., Maron C. y Heinemann S. 1990 Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science.* 249: 1033 - 1037.
- Bowling A. C., Schulz J. B., Brown R. H. Jr. y Beal M. F. 1993 Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 61: 2322–2325.
- Brennan W. A., Bird E. D. y Aprille J. R. 1985 Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J. Neurochem.* 44: 1948–1950.
- Brouillet E., Condé F. y Beal M. 1999 Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59: 427 – 268.
- Brouillet E., Guyton M. C., Mittoux V., Altairac S., Condé F., Palfi S. y Hantraye P. 1998 Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3- nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* 70: 794–805.

- Brouillet E., Jenkins B., Imán B., Ferrante R. J., Kowall N. W., Srivastava R., Roy D. S., Rosen B. y Beal M. F. 1993 Age dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 60: 356–359.
- Browne S. E., Bowling A. C., Macgarvey U., Baik M. J., Berger S. C., Muqit M. K., Bird E. D. y Beal M. F. 1997 Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 41: 646–653.
- Cao X. y Phillis J. W. 1994  $\alpha$ -phenyl-*tert*-butylnitronone reduces cortical infarct and edema in rats subjected to focal ischemia. *Brain. Res.* 644: 267–272.
- Cha J. J., Kosisnski C. M., Kerner J. A., Alsdorf S. A., Mangiarini L., Davies S. W., Penney J. B., Bates G. P. y Young A. B. 1998 Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human Huntington disease gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6480–6485.
- Choi D. W. 1988 Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuro n.* 1: 623–634
- Choi D.W. 1992 Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23:1261-1276.
- Chung I., Zhang Y., Eubanks J. H. y Zhang I. 1998 Attenuation of hypoxic current by intracellular applications of ATP regenerating agents in hippocampal CA1 neurons of rat brain slices. *Neuroscience.* 86: 1101–1107.
- Coles C. J., Edmonson D. E. y Singer T. P. 1979 Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J. Biol. Chem.* 255: 4772–4780.
- Copani A., Koh J. Y. y Cotman C. W. 1991 Beta -amyloid increases neuronal susceptibility to injury by glucose deprivation. *Neuroreport.* 2: 763- 765.
- Cruz F., Scott S. R., Barroso I., Santisteban P. y Cerdán S. 1998 Ontogeny and cellular localization of the pyruvate recycling system in rat brain. *J. Neurochem.* 70: 2613–2619.
- Daikhin Y. y Yudkoff M. 1998 Ketone bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Dev. Neurosci.* 20: 358-364.
- Desagher S., Glowinski J. y Prémont J. 1997 Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J. Neurosci.* 17: 9060–9067.
- Desphande S. B., Fukuda A. y Nishino H. 1997 3-nitropropionic acid increases the intracellular  $Ca^{2+}$  in cultured astrocytes by reversed operation of the  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  exchanger. *Exp. Neurol.* 145: 38-45.
- Dexter D. T., Carter C. J, Wells F. R., Javoy-Agí F., Lees A., Jenner P. y Marsden C. J. 1989 Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52: 381-389.

- DiFiglia M. 1990 Excitotoxic injury of the neostriatum is a model for Huntington's disease  
TINS 13: 286–289.
- Dirnagl U., Ladecola C. y Moskowitz A. 1999 Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated  
view. TINS 22: 391–397.
- Drejer J., Beneviste H., Diemer N., y Schousboe A 1985 Cellular origin of ischemia-induced  
glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. J. Neurochem. 45: 145 –  
151.
- Eberling J. L., Richardson B. C., Reed B.R., Wolfe N. y Jagust W. J. 1994 Cortical glucose  
metabolism in Parkinson's disease without dementia. Neurobiol. Aging 15: 329-  
335.
- Eimerl S. y Schramm M. 1995 Resuscitation of brain neurons in the presence of Ca<sup>2+</sup> after  
toxic NMDA- receptor activity. J. Neurochem. 65: 739–743.
- Erecinska M. y Nelson D. 1994 Effects of 3-nitropropionic acid on synaptosomal energy and  
transmitter metabolism: relevance to neurodegenerative brain disease s. J.  
Neurochem. 63: 1033–1041.
- Fanden A. L., Demediuk P., Panter S. S. y Vink R 1989 The role of excitatory amino acids  
and NMDA receptors in traumatic brain injury. Science. 244: 789 -800.
- Ferrante R. J., Andreassen O. A., Jenkins B. G., Dedeoglu A., Kuemmerle S., Kubilus J. K.,  
Kaddurah-Daouk R., Hersch S. M. y Beal. M. F. 2000 Neuroprotective effects of  
creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease J. Neurosci. 20:  
4389–4397.
- Ferrante R. J., Kowall N. W., Cipolloni P. B., Storey E. y Beal M. F. 1993 Excitotoxin lesions  
in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and  
neurochemical characterization Exp. Neurol. 119: 46–71.
- Floyd R. A., Watson J. J. y Wong P. K. 1984 Sensitive assay of hydroxyl radical formation  
utilizing high pressure liquid chromatography with electrochemical detection of  
phenol and salicylate hydroxylation products. J. Biochem. Meth. 10: 221– 235.
- Frandsen A. y Schousboe A. 1996 Characterization of a chemical anoxia model in cerebellar  
granule neurons using sodium azide protection by nifedipine and MK- 801. J.  
Neurosci. Res. 44: 40-46.
- Gjedde A. y Crone C. 1975 Induction process in blood- brain barrier transfer of ketone bodies  
during starvation Am. J. Physiol. 299: 1165- 1169.
- Green J. G. y Greenamyre J. T. 1995 Exacerbation of NMDA, AMPA and L- glutamate  
excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate. J. Neurochem.  
64: 2332-2338.

- Green J. G., Sheu S. S., Gross R. A. y Greenamyre J. T. 1998 3-nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience*. 84: 503-510.
- Greenamyre J. T., Penney J. B., Young A. B., D'Amato C. J., Hicks S. P. y Shoulson I. 1986 Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Science*. 227: 1496-1499.
- Greene J. G. y Greenamyre J. T. 1996 Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Progress in Neurobiol.* 48: 613-634.
- Grünewald T. y Beal F. 1999 Bioenergetics in Huntington's disease. *Ann. N Y Acad. Sci.* 893: 203-213.
- Gu M., Gash M. T., Mann V. M., Javoy-Agid F., Cooper J. M. y Shapira A. H. 1996 Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* 39: 385-389.
- Gunasekar P. G., Kanthasamy A. G., Borowitz J. L. y Isom 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.
- Guyot M. C., Hantraye P., Dolan R., Palfi S., Mazière M. y Brouillet E. 1997 Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 79: 45-56.
- Hamilton B. F. y Gould D. H. 1987 Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxia (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol.* 72: 286-297.
- Hantraye P., Riche D., Mazière M. y Isacson O. 1990 An experimental primate model of Huntington's disease: anatomical and behavioural studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp. Neurol.* 108: 91-104.
- Harada T., Harada C., Watanabe M., Inoue I., Sakagawa T., Nakayama N., Sasaki S., Okuyama S., Watase K., Wada K. y Tanaka K. 1998 Functions of the two glutamate uptake carrier in salamander retinal glial cells. *J. Neurosci.* 16: 6722-6731.
- Hattori N., Tanaka M., Ozawa T. y Mizuno Y. 1991 Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondrial in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 30: 563-571.
- Hawkins R. A. y Biebuyck J. F. 1978 Ketone Bodies are selectively used by individual brain regions. *Science* 295: 325-327

- Henneberry R. C. 1989 The role of neuronal energy in the neurotoxicity of excitatory amino acids. *Neurobiol. Aging* 10: 611–613.
- Hensahw R., Jenkins B. G., Schulz J. B., Ferrante R. J., Kowall N. W., Rosen B. R. y Beal M. F. 1994 Malonate produces striatal lesions by indirect NMDA receptor activation *Brain. Res.* 647: 161–166.
- Higgins D. S., Hoyt K. R., Baic C., Vensel J. y Suka M. 1999 Metabolic and glutamatergic disturbances in the Huntington's disease transgenic mouse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893: 298–300.
- Hodgkins P. S. y Schwarcz R. 1998b Metabolic control of kynurenic acid formation in the brain. *Dev. Neurosci.* 20, 408-416.
- Hodgkins P.S. y 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.
- Ito M. 1989 Long-term depression. *Ann. Rev. Neurosci.* 12: 85 - 102.
- Iyengar M. R. 1984 Creatine kinase as an intracellular regulator. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 5: 527-534.
- Izumi Y., Benz A. M., Katsuki H. y Zorumski C. F. 1997 Endogenous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation *J. Neurosci.* 17: 9448–9457.
- Izumi Y., Ishii K., Katsuki H., Benz A. M. y Zorumski C. F. 1998  $\beta$ -hydroxybutyrate fuels synaptic function during development. *J. Clin. Invest.* 101: 1121-1132.
- Janetzky B., Hauck S., Youdim M. B. H., Riederer P., Jellinger K., Pantucek F., Zochling R., Boissl K. W. y Reichmann H. 1994 Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 169: 126-128.
- Janigro D. 1999 Blood-brain barrier, ion homeostasis and epilepsy: possible implications towards the understanding of ketogenic diet mechanisms. *Epilepsy Res.* 37: 223-232.
- Kanazawa I., Kimura M., Murrata M., Tanaka Y. y Cho F. 1986 Choreic movements induced by unilateral kainate lesions of the striatum and L-Dopa administration in monkey. *Neurosci. Lett.* 71: 241–246.
- Kashiwaya Y., Takeshima T., Mori N., Nakashima K., Clarke K. y Veech R. L. 2000 D- $\beta$ -hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 5440 -5444.



ESTATIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- Katchman A. Y Hershkowitz N. 1993 Early anoxia-induced vesicular glutamate release: results from mobilization of calcium from intracellular stores. *J. Neurophysiol.* 70: 1-7.
- Kish S. J., Bergeron C., Rajput A., Dozic S., Mastrogiacomo F., Chang L. J., Wilson J. M., DiStefano L. M. y Nobrega J. N. 1992 Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 59: 776-779.
- Koh J.Y., Yang L. L. y Cotman C. W. 1990 Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res.* 533: 315-320.
- Komuro H. y Rakic P. 1993 Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260: 95 - 97.
- La Fontaine M. A., Geddes J. W., Banks A. y Butterfield A. 2000 Effect of exogenous and endogenous antioxidants on 3- nitropropionic acid -induced in vivo oxidative stress and striatal lesions: Insights to Huntington's disease. *J. Neurochem.* 75: 1709-1715.
- Lafon-Cazal M., Pietri S., Culcasi M. y Bockaert J. 1993 NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535 -537.
- Lehre K. P., Levy L.M., Ottersen O. P., Storm-Mathisen J. y Danbolt N. C. 1995 Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 15: 1935 - 1853.
- Lipton P. 1999 Ischemic Cell Death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79: 1431 -1568.
- Lucas D. R. y Newhouse J. P. 1957 The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch. Ophthalmol.* 58: 193- 201.
- Ludolph A. C., Seeling M., Ludolph A. G., Sabri M. I. y Spencer P. S. 1992 ATP deficits and neuronal degeneration induced by 3- nitropropionic acid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 648: 300-302.
- Malcon C., Kaddurah-Daouk R. y Beal M. F. 2000 Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. *Brain Res.* 860: 195-198.
- Massieu L y Tapia R. 1997 Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J. Neurochem.* 69: 1151-1160.
- Massieu L., Gómez-Román N. y Montiel T. 2000 *In vivo* potentiation of glutamate- mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp. Neurol.* 165: 257- 267.
- Massieu L., Morales-Villagrán A. y 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.

- Matthews R. T., Ferrante R. J., Klivenyi P., Yang L., Klein A. M., Mueller G., Kaddurah -Daouk R. y Beal M. F. 1999 Creatine and cyclocreatine attenuated MPTP neurotoxicity. *Experimental Neurol.* 157: 142–149.
- Matthews R. T., Yang L., Jenkins B. G., Ferrante R. J., Rosen B. R., Kaddurah -Daouk R. y Beal M. F. 1998 Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 18: 156–163.
- Mattson M. P., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I. y Rydel R. E. 1992 Beta- amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12: 376-389.
- Mattson M. P., Guthrie P. B. y Kater S. B. 1989 A role for Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> extrusion in protection against neuronal excitotoxicity *FASEB J.* 3: 2519 – 2526.
- Mattson M. P., Pederson W. A., Duan W., Culmsee C. y Camandola S. 1999 Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893: 154–175.
- Maus M., Marin P., Israel M., Glowinski J. y Prémont J. 1999 Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity *Eur. J. Neurosci.* 11: 3215–3224.
- McIntosh T. K., Vink R., Soares H., Hayes R. y Simon R. 1990 Effect of noncompetitive blockade of N-methyl-D-aspartate receptors on the neurochemical sequelae of experimental brain injury *J. Neurochem.* 55: 1170-1179.
- Michaelis E. K. 1998 Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54: 369 - 415.
- Miyabe M., Kirsch J. R., Nishikawa T., Koehler R. C. y Traystman R. J. 1997 Comparative analysis of brain protection by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists after transient focal ischemia in cats. *Crit. Care Med.* 25: 1037- 1043.
- Nakanishi S., Nakajima Y., Masu M., Ueda Y., Nakahara K., Watanabe D., Yamaguchi S., Kawabata S. y Okada M. 1998 Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Rev.* 26: 230 - 235.
- Nicholls D. 1995 *Proteins, Transmitters and Synapses.* Blackwell Science. pp155-183. Gran Bretaña.
- Nicholls D. G. y Budd S. L. 1998 Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366: 97 – 112.

- Nicholls D. G., Budd S. L., Casthilo R. Y Ward M. 1999 Glutamate excitotoxicity and neuronal energy metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893: 1 – 12.
- Novelli A., Reilly J. A., Lysko P. G. y 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.
- O'Gorman E., Beutner G., Wallimann T. y Brdiczka D. 1996 Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart and brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1276: 161–170.
- Obrenovitch T. P., Urenjak J., Richards D. A., Ueda Y., Curzon G. y Simón L. 1993 Extracellular neuroactive amino acids in rat striatum conditions and ischaemia with sustained anoxic depolarisations. *J. Neurochem.* 61: 178 - 186.
- Olney J. W. 1969 Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.
- Olney J.W., Ho O. L., y Rhee V. 1971 Cytotoxic effects of acidic and sulfur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain. Res.* 14: 61 - 76.
- Owen O. E., Morgan A. P, Kemp H. G., Sullivan J. M., Herrera M. G. y Cahill G. F. Jr. 1967 Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.* 46: 1589-1595.
- Palmer A. M., Marion D. W., Botschelles M. L., Bowen D. M. y DeKosky S. T. 1994a Increased transmitters amino acid concentration in human ventricular CSF after brain trauma. *Neuroreport* 6: 153-156.
- Palmer A. M. y Burns M. A. 1994b Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 645: 333– 337.
- Palmer A. M., Marion D. W., Botschelles M.L., Swedlow P. E., Styren S. D. y DeKosky S. T. 1993 Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J. Neurochem.* 61: 2015- 20124.
- Pang Z. y 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.
- Parker W. D., Parks J, Filley C. M. y Kleinschmidt-DeMasters B. K. 1994 Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology.* 44: 1090– 1096.
- Paxinos G. y Watson C. 1986 *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, Sydney
- Phren J. H., Karkoutly C., Nuglish J., Peruche B. y Kriegelstein J. 1992 Dihydropyridone reduces neuronal injury after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12: 78–87.

- Pollary M. y Stevens F. A. 1980 Starvation-induced changes in transport of ketone bodies across the blood-brain barrier J. Neurosci. Res. 5: 163-172.
- Rae C., Lawrance L., Dias L. S., Provis T., Bubb W. A. y Balcar V. J. 2000 Strategies for studies of neurotoxic mechanisms involving deficient transport of L-glutamate : antisense knockout in rat brain *in vivo* and changes in the neurotransmitter metabolism following inhibition of glutamate transport in guinea pigs. Brain Res. Bull. 53: 373-381.
- Riepe M., Ludolph A., Seeling M., Spencer P. S. y Ludolph A. C. 1994 Increase of ATP levels by glutamate antagonists is unrelated to neuroprotection. Neuroreport 5: 2130 - 2132.
- Rosen D. R., Sidique T., Patterson D., Figlewicz D. A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J. P. y Deng H. X. 1993 Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 392: 59-62.
- Rossi D. J., Oshima T. y Attwell D. 2000 Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. Nature 403: 316-321.
- Rothman S. M. 1984. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. J. Neurosci. 4: 1845 -1891.
- Rothstein J. D., Tsai G., Kuncl R. W., Clawson L., Comblatch D. R., Drachman D. B., Pestronk A., Stauch B. L. y Coyle J. T. 1990 Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis Ann. Neurol. 28: 18 - 25
- Rothstein J. D., Van Kammen M., Levery A. I., Martín L. J. y Kuncl R. W. 1995 Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis Ann. Neurol. 38: 73-84.
- Rothstein, J. D., Martín I. J. y Kuncl R. W. 1992 Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. New Eng. J. Med. 326:1464 - 1468.
- Ruiz F., Alvarez G., Pereira R., Hernández M., Villalba M., Cruz F., Cerdán S., Bogónez E. y Satrustegui J. 1998 Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. Neuroreport 9: 1277-1282.
- Sánchez-Carbente M. R. y Massieu L. 1999 Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. J. Neurochem. 72: 129-138.
- Sandberg M., Butcher S. P., y Handberg H. 1986 Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *in vivo* dialysis of the rat hippocampus. J. Neurochem. 47: 178- 184.

- Schinder A. F., Olson E. C., Spitzer N. C., y Montal M., 1996 Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity *J. Neurosci.* 16: 6125–6133.
- Schulz J. B., Henshaw D. R., Siwek D., Jenkins B. G., Ferrante R. J., Cipolloni P. B., Kowall N. W., Rosen B. R., y Beal M. F., 1995a Involvement of free radicals in excitotoxicity *in vivo* *J. Neurochem.* 63: 2239–2247.
- Schulz J. B., Henshaw D. R., Matthews R. T. y Beal M. F. 1995b Coenzyme Q<sub>10</sub> and nicotinamide and a free radical spin trap protect against MPTP neurotoxicity. *Exp. Neurol.* 132: 279–283.
- Schulz J. B., Matthews R. T., Henshaw D. R. y Beal M. F. 1996 Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins: implications for neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 71: 1043–1048.
- Séller J. N., Pang Z., Geddes J. W., Begles J. G., Germeyer A., Waeg G. y Mattson M. P. 1997 Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid- $\beta$ -peptide: Role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J. Neurochem.* 69:273-284.
- Shintaro G., Karp A. y Greenberg J. H. 2000 Regional alterations in an excitatory amino-acid transporter, blood flow, and glucose metabolism after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp. Brain. Res.* 130: 521 -528.
- Simon R. P., Schmidley J. W., Meldrum B. S., Swan J. H. y Chapman A. G. 1986 Excitotoxic mechanisms in hypoglycaemic hippocampal injury. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 12: 567-576.
- Simon R. P., Swan J. H., Griffiths T. y Meldrum B. S. 1984. Blockade of *N*-methyl-D- aspartate receptor may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 266: 850 – 852.
- Simpson J. R. y Isaacson O. 1993 Mitochondrial impairment reduces de threshold for *in vivo* NMDA-mediated neuronal death in the striatum. *Exp. Neurol.* 121: 57 -64.
- Smith C. D., Carney J. M., Starke-Reed P. E., Oliver C. N., Stadtman E. R., Floyd R. A. y Markesbery W. R. 1991 Excess of brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 10540-10543.
- Smith M. A., Harris P. L., Sayre L. M., Beckman J. S. y Perry G. 1997 Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 17: 2653-2657.
- Sorbi S., Bird E. D. y Blass J. P. 1983 Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Ann. N eurol.* 13: 72–78.

- Storey E., Hyman B. T., Jenkins B.T., Brouillet E., Miller J. M., Rosen B. R. y Beal M. F. 1992 MPP<sup>+</sup> produces excitotoxic lesions in rat striatum due to impairment of oxidative metabolism. *J. Neurochem.* 58: 1975- 1978.
- Sze C. I., Bi H. B., Kleinschmidt-DeMasters B. K., Filley C. M. y Martin L. J. 2001 N-methyl—D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 182: 151– 159.
- Takagi N., Shinno K., Teves L., Bissoon N., Wallace M. C. y Gurd J. W. 1997 Transient ischemia differentially increases tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits 2A and 2B. *J. Neurochem.* 69:1060 - 1065.
- Tanaka K. 2000 Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci. Res.* 37: 15-19.
- Tanaka K., Watase K. y Manabe T. 1997 Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT- 1. *Science* 276: 1699-1702.
- Tildon J.T. y Roeder L.M. 1988 Transport of 3-hydroxy<sup>13-14C</sup>butyrate by dissociated cells from rat brain. *Am. J. Physiol.* 255: C133- 139.
- Turski L., Bressler K., Rettig K. J., Loschmann P.A. y Wachtel H. 1991 Protection of substantia nigra from MPP<sup>+</sup> neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature.* 349: 414-418.
- Uemura Y., Kowal N. W. Y Beal M. F. 1990 Selective sparing of NADPH-diaphorase-somatostani-neurpeptide Y neurons in the rat striatum. *Synapse* 9: 129–135.
- Verderio C., Coco S., Pravettoni E., Bacci A., y Matteoli M. 1999 Synaptogenesis in hippocampal cultures. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 1448 -1462.
- Volterra A., Bezzi P., Rizzini B. L., Trotti D., Ullensvang K., Danbolt N. C. y Racagni G. 1996 The competitive transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2, 4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2019 - 28.
- Wada H., Okada Y., Nabetani M. y Nakamura H. 1997 The effects of lactate and  $\beta$ -hydroxybutyrate on the energy metabolism and neural activity of hippocampal slices from adult and immature rat. *Dev. Brain Res.* 101: 1-7.
- Walliman T., Wyss M., Brdiczka D., Nicolay K. y Eppenberger H. 1992 Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 281: 21 –40.
- Wiener R., Hirsch H. J. y Spitzzerr J. J. 1997 Cerebral extraction of ketone bodies and their penetration into CSF in the dog. *Am. J. Physiol.* 220: 1542- 1546.
- Wüller U., Young A., Penney J. y Beal M. F. 1994 3- nitropropionic acid toxicity in the striatum. *J. Neurochem.* 63: 1772–1781.

- Young A. B., Greenamyre J. T., Hollingsworth Z., Albin R., D'Amato C., Shoulson I. y Penney J. B. 1988 NMDA receptors losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 241: 981–983
- Yue T. Z., Gu J. L., Lysko P. G., Cheng H. Y., Barone F. C. y Feverstein G., 1992 Neuroprotective effects of phenyl-*tert*-butyl nitron in gerbil global ischemia and in cultured rat cerebellar neurons. *Brain Res.* 574: 193–197.
- Zeevalk G. D. y Nicklas W. J. 1991 Mechanisms underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 870 – 878
- Zeevalk G. D. y Nicklas W. J. 1992 Evidence that the loss of the voltage -dependen  $Mg^{2+}$  block at the *N*-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J. Neurochem.* 59: 1211-1220.
- Zeevalk G. D., Der. – Yellin E. y Nicklas W. J. 1995 NMDA receptor involment in toxicity to dopamine neurons in vitro caused by the succinate dehydroganase inhibitor 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 64 : 455 - 458
- Zeevalk G. D: y Nicklass W. J. 1990 Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor- mediated toxicity in retina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 1285 – 1292.
- Zuddas A. Oberto G. Vaglini F. Fascetti F. Fornai F. y Corsini G. U. 1992 MK -801 prevents 1-methyl-4-phenyl- - 1,2,3,6-tetrahydropyridine – induced parkinsonism in primates *J. Neurochem.* 59: 733 - 739.