

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

157

FACULTAD DE CIENCIAS

"EPILEPSIA, NEURODEGENERACION Y AMINOACIDOS EXTRACELULARES EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA, in vivo: EFECTOS DEL INHIBIDOR DE FOSFATASAS DE PROTEINAS ACIDO OKADAICO.

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 :
NADIA MARCELA RAMIREZ MUNGUA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. RICARDO TAPIA IBARGUENCIA



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2003

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# PAGINACIÓN

# DISCONTINUA



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional,

NOMBRE: Ramírez Munguía  
Nadia Marcela

FECHA: 24 Enero 2003

FIRMA: Ramírez

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Epilepsia, neurodegeneración y aminoácidos extracelulares en el hipocampo de la rata, in vivo: efectos del inhibidor de fosfatasa de proteínas ácido okadaico."

realizado por Nadia Marcela Ramírez Munguía

con número de cuenta 9650439-6 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis

Propietario Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoytia

Propietario Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Propietario Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles

Suplente Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Suplente Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidó

FACULTAD DE CIENCIAS

**Consejo Departamental de Biología**

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

D. E. ...  
D. E. ...

B

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia, con el apoyo del CONACYT (proyecto 31750N) y de DGAPA, UNAM (proyecto IN 206100).

Agradezco sinceramente al Dr. Ricardo Tapia por la dirección y la supervisión de mi trabajo de tesis, así como por su apoyo y sus valiosos consejos, por lo enriquecedora que ha sido mi experiencia dentro su laboratorio, tanto en el aspecto científico como en el humano.

Agradezco también a mis sinodales por sus observaciones y sugerencias:

Dra. Clorinda Arias

Dra. Maria Luisa Fanjul

Dr. Silvestre Alavez

Dra. Rocio Salceda

Agradezco a Federico Jandete y Arturo Franco por su apoyo técnico.

DEDICO ESTA TESIS...

A Dios.

A mis padres Nadia y Gustavo porque me dieron la vida, porque su amor, apoyo y ejemplo me han impulsado siempre a seguir adelante, porque los admiro y los amo.

A mi esposo Héctor por su inmenso amor, apoyo, paciencia y comprensión, porque me ha hecho muy feliz, porque estar a su lado ha sido la mayor bendición que he recibido. Un millón de gracias puequeño.

A mis hermanos Bety y Gus por todos los momentos tan padres que hemos vivido y por todo el amor y apoyo que nos tenemos. También por preguntarme siempre sobre las materias que aun no he llevado.

A mi abue Lolis porque siempre me ha cuidado y defendido, porque su gran amor y sus consejos han sido muy importantes en mi vida.

A mi tío Raúl por ser un segundo padre para mí, a mi tía Marilú por ser una gran amiga y a mis primitos.

A mi abuelo Héctor por impulsarme y alentarme a seguir superándome.

A mis abuelos Bety y Armando.

A mis tíos Carmen, Héctor y mis primos, a quienes extraño mucho.

A mis tíos Vicky y René por el apoyo que siempre nos han brindado, y a todos mis tíos Bety, Armando y Martha, Lalo y Carmen, Arturo y Laura, Jorge y Bettina, y Caro por todos los momentos divertidos. También a todos mis primos que son un montón, con quienes he pasado momentos muy padres.

A los Cocos y Armando por su amor y apoyo, por consentirnos tanto, porque me han permitido ser parte de su maravillosa familia, porque son los suegros y el cuñis que cualquiera quisiera tener. A Paty y Dina, mis nuevas primas, por todo su cariño.

A Samuel, mi casero y cuñado, porque nos ha apoyado tanto, por su sincera amistad, por sus consejos y su cariño.

A mi simbiontita Gaby por su valiosa amistad, porque me ayudó a despertar, por todos los momentos tan increíbles que pasamos durante la carrera y por su colaboración en esta tesis.

A todos los del lab. porque hemos convivido y hemos pasado mucho tiempo juntos en nuestro segundo hogar: Xochitl, Gaby Mora, Bety, Marina, Juan Carlos, Luis, Miguel, Claudio, Paty. A Fer por su paciencia al enseñarme todo el trabajo del laboratorio y por su gran ayuda al inicio de esta tesis, y a Tere Montiel por sus valiosos consejos. A Luis N. y compañeros Bermúdez, a los Bargas Beto, Ncto, Carmen y Tamara.

A mis amigos de la facultad porque han sido parte importante de mi vida y porque vivimos momentos increíbles que no olvidaré: Sergio, Axa, Dulce y Eduardo, Flor, Edgar, José Luis, Ana, Aurora y los que no menciono, pero que no olvido.

A mis amigos del Alemán por tantos años de amistad: Berenice, Chel y Adriana.



## INDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
1 TRANSMISION SINAPTICA GLUTAMATERGICA	2
<b>Sinapsis</b>	2
<b>Acido glutámico</b>	3
<b>Excitotoxicidad</b>	6
2 FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION DE PROTEINAS	8
<b>Cinasas de proteínas</b>	8
<i>Cinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico (AMPc) (PKA)</i>	8
<i>Cinasa de proteínas dependiente de GMP cíclico (GMPc) (PKG)</i>	8
<i>Cinasas de proteínas dependientes de calcio y calmodulina (CaMKs)</i>	9
<i>Cinasa de proteína C (PKC)</i>	9
<i>Cinasas de proteínas de tirosina (PTKs)</i>	10
<b>Fosfatasas de proteínas</b>	10
<i>Fosfatasas de proteínas de serina/treonina</i>	10
<i>Fosfatasas de proteínas de tirosina y de especificidad dual</i>	12
<b>Acido okadaico</b>	12
3 EPILEPSIA E HIPOCAMPO	13
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>16</b>
<b>III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>IV. METODOLOGIA</b>	<b>19</b>
1 MICRODIALISIS Y REGISTRO EEG EN RATAS ANESTESIADAS	19
2 MICRODIALISIS Y REGISTRO EEG EN RATAS DESPIERTAS	20
3 EVALUACION HISTOLOGICA	20
4 ANALISIS ESTADISTICO	21

<b>V. RESULTADOS</b>	22
1 EPILEPSIA CONDUCTUAL Y ACTIVIDAD EEG	22
2 AMINOACIDOS EXTRACELULARES	26
3 EVALUACION HISTOLOGICA	33
<b>VI. DISCUSION</b>	36
1 EPILEPSIA Y ACTIVIDAD EN EL EEG	36
2 AMINOACIDOS EXTRACELULARES	39
3 NEURODEGENERACION	42
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	45
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP	4-aminopiridina
AMPe	AMP cíclico
AMPA	Acido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico
CaMKs	Cinasas de proteínas dependientes de calcio y calmodulina
DAG	Diacilglicerol
EEG	Electroencefalograma
GABA	Acido- $\gamma$ -aminobutírico
GMPC	GMP cíclico
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
KA	Acido kaínico
MK-801	Maleato de dixociplina
NMDA	N-metil-D-aspartato
OKA	Acido okadaico
PDC	Pirrolidin-2,4-dicarboxilato
PKA	Cinasa de proteínas dependiente de AMPe
PKC	Cinasa de proteína C
PKG	Cinasa de proteínas dependiente de GMP cíclico
PKs	Cinasas de proteínas
PP1	Fosfatasas de proteínas 1
PP2 (A y B)	Fosfatasas de proteínas 2 (A y B)
PPs	Fosfatasas de proteínas
PTKs	Cinasas de proteínas de tirosina
PTPs	Fosfatasas de proteínas de tirosina
SNC	Sistema Nervioso Central

# I. INTRODUCCION

## I. TRANSMISION SINAPTICA GLUTAMATERGICA

### Sinapsis

Desde que los trabajos de Santiago Ramón y Cajal en 1906 demostraron, con ayuda de la técnica de impregnación argéntica, que la neurona es la unidad estructural del sistema nervioso, numerosos estudios nos han llevado a conocer y comprender un poco más sobre su funcionamiento, incluyendo de manera primordial los mecanismos involucrados en la comunicación interneuronal. Esta comunicación se lleva a cabo en una estructura específica llamada sinapsis, la cual está conformada por una estructura encargada de emitir la información, la presinapsis, y por una estructura receptora que responde ante el estímulo, la postsinapsis.

En el sistema nervioso podemos encontrar dos tipos de transmisión sináptica, la eléctrica y la química. En la primera, las células pre- y postsinápticas se encuentran unidas por canales proteicos llamadas conexinas, las cuales permiten el paso directo de la corriente eléctrica (Kandel y Siegelbaum, 2000). En la segunda, en cambio, las neuronas emisora y receptora se encuentran separadas por el espacio sináptico, por lo que es necesario que un compuesto químico, el neurotransmisor, sea liberado de la presinapsis en un sitio específico llamado zona activa, para que difunda y llegue a la postsinapsis e interactúe con proteínas integrales de la membrana que reconocen específicamente al neurotransmisor, denominados receptores. En los mamíferos, las sinapsis químicas constituyen más del 98% del total.

La comunicación interneuronal en las sinapsis químicas comienza cuando la neurona emisora genera un potencial de acción, como respuesta a estímulos recibidos, y éste se propaga a lo largo de su axón hasta la terminal presináptica. Como consecuencia del potencial de acción, la membrana celular se despolariza, ocasionando la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje que se encuentran en las zonas activas. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la concentración intracelular de este ion, lo que incrementa la probabilidad de que las vesículas que contienen el neurotransmisor, previamente sintetizado y almacenado, se fusionen con las zonas activas de la membrana presináptica, ocasionando la liberación de las moléculas al espacio sináptico. El neurotransmisor difunde una distancia de 20 a 40 nm hasta unirse a los receptores específicos que se encuentran principalmente en la

postsinapsis. Esta unión activa a los receptores desencadenando la siguiente fase de la comunicación nerviosa.

En la actualidad se sabe que existen diversos tipos de receptores; sin embargo, podemos agruparlos en dos grandes categorías: los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los primeros son macromoléculas catalogadas como canales iónicos, debido a que constituyen al canal en sí, cuya región más externa sobresale de la membrana hacia la hendidura sináptica y está especializada en el reconocimiento del neurotransmisor. La activación del receptor ocurre cuando el transmisor se une a él y la macromolécula sufre un cambio conformacional que resulta en la apertura del canal, permitiendo el paso a cationes o aniones para los cuales es selectivamente permeable. Lo anterior se traduce en excitación, si el canal permite la entrada a cationes, o inhibición si son aniones los que pasan hacia el interior de la célula. A diferencia de los receptores ionotrópicos, los metabotrópicos no forman parte de un canal, sino que son macromoléculas que actúan desencadenando reacciones metabólicas intracelulares. Estos receptores se encuentran asociados a otras proteínas membranales denominadas proteínas G, las cuales se modifican al unirse el transmisor. Lo anterior desencadena reacciones enzimáticas cuyos productos son segundos mensajeros que activan enzimas cuya función es fosforilar o desfosforilar diversas proteínas celulares, incluyendo los propios receptores.

El sistema nervioso utiliza dos principales clases de sustancias químicas para la señalización: pequeñas moléculas transmisoras y péptidos neuroactivos. Ambos están contenidos en vesículas, pero tienen diferentes mecanismos de liberación (Schwartz, 2000). Dentro de las moléculas pequeñas se encuentran la acetilcolina, las aminas biogénicas y los aminoácidos. El ácido glutámico, el ácido aspártico, la glicina y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico son aminoácidos con función de neurotransmisor, siendo excitadores los primeros dos e inhibidores los otros dos.

### **Acido glutámico**

La síntesis del ácido glutámico se lleva a cabo en la terminal sináptica: la glutamina, principal precursor de la poza de glutamato liberable como neurotransmisor, se hidroliza por la acción de la glutaminasa dependiente de fosfato, dando como resultado ácido glutámico y amonio (Daikhin y Yudkoff, 2000). Debido a que el glutamato se sintetiza en

el citoplasma, se requiere de un mecanismo de transporte activo para acumularlo en vesículas, es decir, por medio de un gradiente electroquímico de protones generado por la ATPasa vesicular dependiente de  $Mg^{2+}$  (Fonnum et al, 1998). Como se había mencionado, la llegada del potencial de acción a la terminal sináptica inicia la exocitosis, es decir, el proceso de liberación del neurotransmisor, ya que la despolarización de la membrana abre los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje, siendo los del tipo N y del tipo P los involucrados en el proceso neurosecretor del glutamato (Turner, 1998). También algunos receptores metabotrópicos que reconocen al ácido glutámico se encuentran en la presinapsis modulando la liberación de este neurotransmisor (Gereau et al, 1995; Cartmell y Schoepp, 2000). La relación entre la entrada de  $Ca^{2+}$  y la liberación del neurotransmisor es a través de las sinapsinas, que son proteínas asociadas con la superficie de las vesículas sinápticas que contienen al glutamato, las cuales son reguladas por fosforilación en respuesta a cambios en las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Jovanovic et al, 2001). Esto permite la fusión de las vesículas con la membrana presináptica y, por consecuencia, la liberación del neurotransmisor.

En las sinapsis glutamatérgicas se pueden encontrar varios tipos de receptores, tres de tipo ionotrópico y los metabotrópicos. Los primeros inducen una transmisión sináptica rápida, mientras que los segundos, debido a que su acción es a través de segundos mensajeros, modulan la transmisión sináptica lenta. Los receptores ionotrópicos reciben su nombre de acuerdo a su sensibilidad farmacológica, es decir, en función al agonista que los activa con mayor selectividad. Estos receptores se dividen en: NMDA, por reconocer al N-metil-D-aspartato, y los no-NMDA, que incluye a los que tienen sensibilidad por el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metililoxazol-4-propiónico (AMPA), y al ácido kaínico (KA). Los metabotrópicos se dividen en tres grupos (grupos I-III), con base en su estructura molecular y homología de secuencias, mecanismos de transducción y farmacología (Nakanishi, 1994). El grupo I, donde se encuentran los subtipos mGlu1 y mGlu5, está ligado positivamente a la fosfolipasa C, la cual causa la hidrólisis de fosfoinosítidos en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ), que se une a receptores en el retículo endoplásmico y, en consecuencia, ocasiona la liberación del  $Ca^{2+}$  desde esta estructura intracelular. El grupo II (mGlu2 y mGlu3) y el grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 y mGlu8) se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa, por lo que la activación de estos receptores provoca

una inhibición de la formación de AMPc estimulada por forskolina (Cartmell y Schoepp, 2000).

Los receptores AMPA y KA son selectivamente permeables al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$ , y ciertos subtipos del receptor AMPA pueden permitir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este receptor está compuesto por cuatro subunidades, GluR1-4, las cuales pueden formar complejos homoméricos o heteroméricos. Se conocen cinco subunidades del receptor KA, GluR5-7 y KA1-2, y se piensa que se presenta como complejo heteromérico compuesto de por lo menos dos subunidades diferentes. A pesar de estar ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (SNC), los receptores KA son menos abundantes que los AMPA (Wenthold y Roche, 1998).

El canal integral del receptor NMDA es altamente permeable al  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque también permite la entrada a  $\text{Na}^+$  y a  $\text{K}^+$  (Nakanishi, 1992). Este receptor se encuentra estrictamente regulado, ya que tiene cinco diferentes sitios de unión a ligandos endógenos que influyen en la probabilidad de apertura del canal. Dos de ellos son sitios de reconocimiento al glutamato (agonista) y a la glicina (modulador positivo); otro es un sitio regulado por poliaminas y los dos restantes son sitios de reconocimiento al  $\text{Mg}^{2+}$  y al  $\text{Zn}^{2+}$ , los cuales actúan como inhibidores cuando se encuentran unidos al receptor.

La glicina se denomina coagonista, ya que es necesario la unión simultánea del glutamato y la glicina para la activación del receptor. El sitio de unión a glicina en el receptor NMDA es farmacológicamente distinto al que se encuentra en el receptor inhibidor activado por glicina. Las poliaminas, como la espermina y espermidina, no se requieren para la activación del receptor; sin embargo, a concentraciones micromolares son moduladores positivos, ya que aumentan la posibilidad de apertura del canal. Por el contrario, si se encuentran a concentraciones más altas, las poliaminas producen un bloqueo del canal iónico dependiente de voltaje, inhibiendo la activación del receptor (Dingledine y Bennett, 1994).

La activación del receptor NMDA es inhibida por el  $\text{Mg}^{2+}$ , ya que su sitio de unión se encuentra dentro del canal. El bloqueo ejercido por este catión en el canal abierto es dependiente de voltaje, por lo que cuando se despolariza la membrana por la entrada de  $\text{Na}^+$  a través de los receptores AMPA y KA, el  $\text{Mg}^{2+}$  se desprende del canal. Otro bloqueador endógeno es el  $\text{Zn}^{2+}$ , pero a diferencia del  $\text{Mg}^{2+}$ , el bloqueo ocasionado por este ion es casi independiente de voltaje (Dingledine y Bennett, 1994).

Al igual que el resto de los receptores al glutamato, los de tipo NMDA están formados por varias subunidades: NR1 (con ocho isoformas), una familia de cuatro subunidades NR2 (A-D), y dos subunidades NR3 (A y B). Todos los receptores NMDA funcionan como ensamblajes heteroméricos formados por múltiples subunidades NR1 en combinación, por lo menos, con un tipo de las subunidades NR2. Las subunidades NR3, por sí solas, no forman receptores funcionales, pero se pueden coensamblar con los complejos NR1/NR2 (Cull-Candy et al, 2001). La combinación de las distintas subunidades le confiere al receptor una gran variabilidad funcional en las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas, lo que determina diferencias en afinidad por los agonistas, sensibilidad a los antagonistas, cinética de la respuesta y sensibilidad al bloqueo por  $Mg^{2+}$  (Nakanishi, 1992).

Estudios moleculares con el mRNA de las diferentes subunidades en el cerebro de la rata adulta demostraron que la subunidad NR1 se encuentra en prácticamente todos los tipos celulares de todas las regiones cerebrales. El mRNA de la subunidad NR2A se expresa principalmente en la corteza cerebral y en el hipocampo, mientras que el mRNA de subunidad NR2B se distribuye en el cerebro anterior. En el cerebelo predomina el mRNA de la subunidad NR2C y en las regiones del diencefalo y el tallo cerebral bajo se encuentra la NR2D (Nakanishi, 1992).

El hecho de que el receptor NMDA tenga diferentes mecanismos para su activación y su modulación es una prueba de su gran importancia en los diversos procesos en los que está involucrado. Uno de los mecanismos más importantes en la regulación de los receptores es la fosforilación, la cual es reversible y puede ocasionar cambios prolongados en la función del receptor (Raymond et al, 1993). Se han encontrado varios sitios en los cuales las distintas subunidades del receptor NMDA pueden ser fosforiladas (MacDonald et al, 1998). Este punto se discutirá más ampliamente en la sección de Antecedentes.

### **Excitotoxicidad**

El principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos es el glutamato, el cual participa en gran variedad de procesos, tales como el desarrollo y la maduración de las neuronas, la percepción, el control motor, la memoria y el aprendizaje. Es por eso que alteraciones en el funcionamiento normal de la actividad



glutamatérgica se ven reflejadas o involucradas en la fisiopatología de diversos padecimientos neurológicos, tanto de tipo agudo como crónicos, tales como la isquemia y el trauma cerebrales, la epilepsia y varias enfermedades neurodegenerativas, como la de Parkinson, Alzheimer, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (Massieu, 1999; Tapia et al, 1999).

Un factor común en estos padecimientos neurológicos es una excesiva excitación mediada por glutamato (Obrenovitch y Urenjak, 1997), la cual desencadena una serie de mecanismos celulares que llevan a la muerte neuronal. Este proceso se conoce como excitotoxicidad y depende principalmente del funcionamiento de los receptores glutamatérgicos.

También se acepta que el daño neuronal excitotóxico se debe, al menos en parte, a un aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ocasionado, inicialmente, por una excesiva entrada de este ion por los canales de calcio dependientes de voltaje, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y principalmente por los receptores NMDA (Massieu, 1999). Posteriormente, este incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se ve amplificada por un mecanismo denominado liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , en el cual este ion es liberado del retículo endoplásmico (Reynolds, 1998). La activación de los receptores metabotrópicos también contribuye al incremento en las concentraciones de este catión, ya que el  $\text{IP}_3$  estimula su liberación de pozas internas. Toda esta acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  conduce a la activación de diversas enzimas: 1) las proteasas, cuya función es degradar proteínas estructurales provocando daño celular; 2) las fosfolipasas, las cuales contribuyen al rompimiento de la membrana y a la liberación del ácido araquidónico, cuyo metabolismo favorece la producción de radicales libres (Massieu, 1999); y 3) las endonucleasas, que se encargan de la degradación de los ácidos nucleicos (Tapia et al, 1999).

Existen, además, varios mecanismos mediante los cuales ocurre daño mitocondrial dependiente de calcio, como la generación de especies reactivas del oxígeno, transporte de este catión hacia el interior de la mitocondria y la consiguiente despolarización de la membrana mitocondrial. Todos los procesos descritos se potencian unos a otros en una relación de eventos que lleva a la muerte neuronal (Tapia et al, 1999).

## 2 FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION DE PROTEINAS

En el sistema nervioso, la fosforilación de proteínas es un mecanismo clave en la plasticidad neuronal, ya que regula desde receptores y canales iónicos, vías de transducción de señales, y síntesis y liberación de neurotransmisores, hasta la expresión de genes en el núcleo que son la base de los cambios sinápticos ligados a la memoria y el aprendizaje de largo plazo (Schulman, 1995). En este mecanismo de regulación celular participan cinasas de proteínas (PKs), cuya función es fosforilar regiones específicas de una proteína, y las fosfatasa de proteínas (PPs), las cuales eliminan el grupo fosfato. Este grupo se encuentra cargado negativamente, por lo que la fosforilación de una proteína altera la carga de ésta, lo cual puede cambiar su conformación y, por lo tanto, regular su función.

### **Cinasas de proteínas**

Debido a su estructura, sólo tres residuos de aminoácidos pueden ser fosforilados por las cinasas de proteínas: la serina, la treonina y la tirosina. Con base en lo anterior, se clasifican en cinasas de proteínas de serina/treonina, y las cinasas de proteínas de tirosina. En todos los casos, estas enzimas catalizan la transferencia del grupo fosfato  $\gamma$ -terminal del ATP al grupo hidroxilo del residuo de aminoácido respectivo, para lo cual se requiere de  $Mg^{2+}$  (Nestler y Greengard, 1999). En muchos casos, las cinasas de proteínas de serina/treonina son activadas por segundos mensajeros, y es a partir de éstos que se constituye una segunda clasificación de ellas. A continuación se mencionan algunas de las más importantes.

#### *Cinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico (AMPc) (PKA)*

El AMPc es un segundo mensajero que se produce a partir del ATP por la acción de la adenil ciclasa, y es responsable de la activación de la PKA. Esta proteino-cinasa es un tetrámero formado por dos subunidades reguladoras (R) y dos catalíticas (C). La unión del AMPc con las subunidades R ocasiona la disociación del tetrámero y la liberación de las subunidades C activas. Los substratos de la PKA son receptores, canales iónicos sensibles a voltaje, proteínas citosólicas y factores nucleares de transcripción (Zimmermann, 1993).

#### *Cinasa de proteínas dependiente de GMP cíclico (GMPc) (PKG)*

Esta enzima está compuesta por un dímero de subunidades idénticas, las cuales tienen un dominio regulador, donde se une el GMPC, y un dominio catalítico. A diferencia de la PKA, la activación de la PKG no va acompañada de la separación de las subunidades. Esta proteína-cinasa muestra una distribución celular limitada y menos sustratos específicos que la PKA (Nestler y Greengard, 1999).

#### *Cinasas de proteínas dependientes de calcio y calmodulina (CaMKs)*

La calmodulina, pequeña proteína ácida, es capaz de unir cuatro iones de calcio, formando el complejo responsable de la activación de este grupo de enzimas. El cerebro contiene al menos seis tipos de proteína-cinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, cada una con propiedades muy diferentes. Las CaM cinasas I, II y IV poseen un dominio autoinhibidor, el cual interactúa con el dominio catalítico, manteniendo la enzima inactiva cuando los niveles de calcio son basales (Cruzalegui y Bading, 2000). De las tres enzimas, la CaMK II, conocida como cinasa multifuncional, traduce un gran número de señales originadas por oscilaciones en las concentraciones de calcio intracelular, se encuentra ampliamente distribuida y tiene una gran cantidad de sustratos. En el hipocampo, constituye el 2% del total de proteínas (Soderling, 2000). Esta cinasa de proteína es un complejo multimérico que contiene de seis a doce subunidades, y tiene la capacidad de autofosforilarse, manteniéndose activa aún después de que el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ha disminuido. Entre los sustratos de la CaMK II se encuentran las sinapsinas, proteínas asociadas a microtúbulos, canales iónicos, receptor a  $\text{IP}_3$  y proteasas dependientes de calcio (Zimmermann, 1993). La CaM cinasa I tiene una amplia distribución neuronal principalmente citosólica; sin embargo, el único sustrato celular identificado es la sinapsina. En cambio, la CaM cinasa II es predominantemente nuclear y fosforila, por lo tanto, múltiples factores de transcripción (Soderling, 2000).

La fosforilasa cinasa, la cinasa de cadena ligera de miosina y la CaMK III son los tres tipos de las CaMKs restantes, los cuales tienen muy pocos sustratos, por lo que modulan pocos procesos regulados por  $\text{Ca}^{2+}$  en el sistema nervioso (Nestler y Greengard, 1999).

#### *Cinasa de proteína C (PKC)*

Esta enzima es activada por calcio conjuntamente con diacilglicerol (DAG) y fosfolípidos (generalmente fosfatidilserina). Existen por lo menos siete formas de la PKC, las cuales exhiben una distribución diferente en el SNC y diversas propiedades reguladoras.

Estas últimas difieren en la habilidad que tienen el DAG y el  $Ca^{2+}$  para activarlas. La cinasa de proteína C es una cadena polipeptídica compuesta por un dominio regulador, el cual se une e inhibe al dominio catalítico. La unión del calcio y/o el DAG con el primero induce la liberación y activación del segundo. Muchos de sus sustratos se encuentran en la membrana plasmática, incluyendo receptores y canales iónicos (Nestler y Greengard 1999).

#### *Cinasas de proteínas de tirosina (PTKs)*

Menos del 1% de la fosforilación de proteínas ocurre en tirosinas. Posiblemente por esta razón fueron descubiertas hasta 1979 en el antígeno T del poliovirus. Estas enzimas se han clasificado en proteínas cinasas de tirosina de receptor (RPTKs) y no de receptor (NRPTKs). Estas últimas se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática, citosol, membranas endosomales y núcleo. Algunas de ellas son: Src, Jak, Abl, Tec, y Fak. Las RPTKs se clasifican en 14 familias incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR) y receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR), entre otros (Lau y Haganir, 1999).

#### **Fosfatasa de proteínas**

El balance que existe entre la actividad de las cinasas de proteínas y la actividad de las fosfatasa de proteínas es el responsable de la modulación de diversos procesos en el sistema nervioso. Una vez que el grupo fosfato se encuentra unido al sustrato proteico, las PPs catalizan la hidrólisis del enlace fosfoéster. Al igual que las cinasas, estas enzimas se clasifican de acuerdo con el residuo de aminoácido que desfosforilan: las fosfatasa de proteínas de serina/treonina y las fosfatasa de proteínas de tirosina. Dentro del primer grupo se encuentran las fosfatasa de proteínas 1 (PP1), 2A (PP2A), 2B (PP2B) o calcineurina, y 2C (PP2C), así como la PP4 y PP5, de las cuales poco se conoce. El segundo grupo comprende fosfatasa de especificidad dual, es decir, aquellas que desfosforilan tanto a residuos de serina/treonina como de tirosina, y las fosfatasa de proteínas de tirosina (PTPs) (Bradford, 1995).

#### *Fosfatasa de proteínas de serina/treonina*

Los subtipos de este grupo de enzimas han sido clasificados con base en su especificidad por el sustrato, su regulación por los inhibidores y sus requerimientos catiónicos (Nairn y Shenolikar, 1992). Todos los miembros de esta familia comparten un

alto nivel de identidad en la secuencia de los dominios catalíticos. La PP1 y la PP2A se presentan como complejos de alto peso molecular combinando subunidades catalíticas y reguladoras, lo que determina la unión específica del sustrato y la modulación de la actividad catalítica (Bradford, 1995). La PP2B o calcineurina es activada directamente por calcio/calmodulina a concentraciones micromolares (Zimmermann, 1993). Estudios inmunohistoquímicos han revelado que esta enzima se encuentra en grandes cantidades en el putamen caudado, hipocampo y sustancia negra (Nairn y Shenolikar, 1992). El dominio catalítico de este grupo de enzimas está formado por un sitio metálico dinuclear (el cual consiste de  $Mn^{2+}$  y  $Fe^{2+/3+}$  en la PP1, y de  $Zn^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  en la PP2B), encargado de unir el carbono terminal de dos láminas  $\beta$ . Cada uno de estos iones metálicos se une con un oxígeno del grupo fosfato y su función es facilitar la desfosforilación de tres maneras: orientando el sustrato, aumentando la electrofilia del fosfato y activando una molécula de agua para ocasionar el ataque nucleofílico del sustrato (Bradford, 1995).

Los mecanismos de regulación de las fosfatasa de proteína 1 y 2B se dividen en tres categorías: fosforilación de las subunidades reguladoras, modulación por calcio y regulación a través de cambios en la localización subcelular de la fosfatasa y/o el sustrato (Winder y Sweatt, 2001).

A pesar de que no se conocen activadores de la PP1, se sabe que es regulada por inhibidores endógenos: inhibidor 1 (I-1), inhibidor 2 (I-2), fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc (DARPP-32) y el inhibidor nuclear de la PP1 (NIPP1). Estos cuatro inhibidores son proteínas de bajo peso molecular, solubles en ácido, termoestables y exhiben cierta homología en la composición de sus aminoácidos (Nestler y Greengard, 1999). La fosforilación del I-1 y de la DARPP-32 por la PKA es necesaria para su actividad inhibitoria, y ambas son selectivamente desfosforiladas por la PP2B (Winder y Sweatt, 2001). Por el contrario, la fosforilación del I-2 y del NIPP se traduce en inactivación de su acción inhibitoria.

Además de los inhibidores endógenos, se han encontrado toxinas permeables a la membrana celular, como el ácido okadaico y la caliculina, los cuales ejercen una potente inhibición sobre las PP1 y PP2A. Farmacológicamente la PP2B difiere de estas últimas, ya que es insensible a la mayoría de sus inhibidores (Winder y Sweatt, 2001). Inmunosupresores como la ciclosporina A y FK506, los cuales son derivados microbianos, actúan como inhibidores de la calcineurina, uniéndose establemente a ésta y formando

complejos con proteínas endógenas conocidas como inmunofilinas (Hunter, 1995). El ortovandato y el ácido okadaico son también inhibidores de la PP2B a altas concentraciones.

#### *Fosfatasa de proteínas de tirosina y de especificidad dual*

Las PTPs existen en forma citosólica y tipo receptor transmembranal, y se caracterizan por tener dominios catalíticos homólogos, los cuales comparten con las fosfatasa de especificidad dual. La diversidad dentro de las familias surge de las estructuras reguladoras y las secuencias blanco que se encuentran en los sitios catalíticos. Tanto las PTPs como las de especificidad dual modulan negativa y positivamente diversos procesos celulares (Bradford, 1995). La fosforilación de tirosinas está involucrada en cada etapa del desarrollo neuronal, así como en la transmisión sináptica, ya que receptores como los de acetilcolina, el NMDA y el GABA<sub>A</sub> son fosforilados en residuos de tirosinas (Nestler y Greengard, 1999).

#### **Acido okadaico**

Esta toxina es un polieter de ácidos grasos de C<sub>38</sub> (fig. 1) extraída de esponjas marinas como *Halichondria okadaei* y *Halichondria melanodocia*, las cuales se alimentan de los dinoflagelados que la producen (Cohen, 1990). Inicialmente, el ácido okadaico (OKA) fue descubierto como un promotor de tumores; sin embargo, más tarde se demostró que a diferencia de otros tipos de promotores de tumores, el OKA no activa la PKC, sino que bloquea la desfosforilación de gran variedad de proteínas (Hunter, 1995). Lo anterior llevó a postular que su mecanismo de acción es a través del bloqueo de fosfatasa de proteínas. Diversos trabajos han demostrado que la PP2A es la más sensible a la inhibición por OKA, ya que la concentración a la cual se obtiene un 50% de inhibición (IC<sub>50</sub>) es de 1 nM. La PP1 también es inhibida a concentraciones nanomolares (10 – 15 nM), mientras que la PP2B tiene su IC<sub>50</sub> a concentraciones de 4-5 μM. Otras fosfatasa de proteínas como la 2C y PTPs son insensibles a 10 μM de ácido okadaico. Los estudios de cinética enzimática muestran que esta toxina no es un inhibidor competitivo, ya que no se une al centro catalítico de las fosfatasa (Bialojan y Takai, 1988; Cohen et al, 1990).

Debido a su hidrofobicidad, el OKA puede entrar a la célula, por lo que puede ser una herramienta importante para el estudio tanto de los sustratos fisiológicos de las

fosfatasa, como de las consecuencias originadas por un desbalance en el estado de fosforilación de diversas proteínas. Por su actividad inhibitoria, el OKA produce un incremento en la fosforilación de canales de sodio y calcio sensibles a voltaje, transportadores, receptores como el NMDA, AMPA, GABA<sub>A</sub> y glicina, entre muchas otras proteínas (Tapia et al, 1999). En cultivos neuronales de cerebelo, debido a las alteraciones que se originan por el aumento en la fosforilación, el OKA puede producir neurotoxicidad caracterizada inicialmente por la desintegración de las neuritas y un hinchamiento de los cuerpos celulares, seguidos de la muerte celular (Fernández et al, 1991). Después de un tratamiento con esta toxina en cultivos celulares de corteza y de hipocampo, se encontró una hiperfosforilación de la proteína tau acompañada por degeneración de las neuritas y de la estructura sináptica (Arias et al, 1993; Malchodi-Albedi et al, 1997).

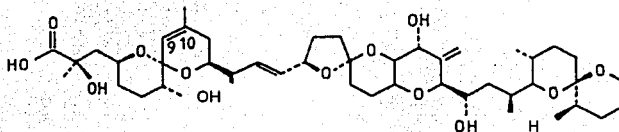


Figura 1. Estructura del ácido okadaico.

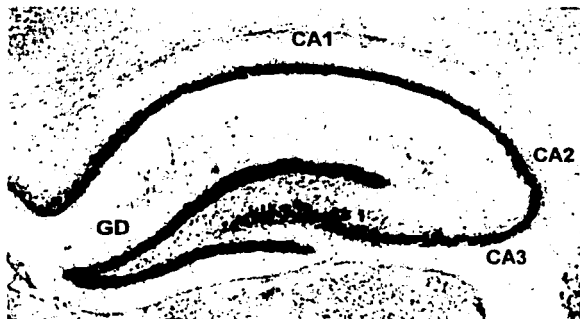
### 3 EPILEPSIA E HIPOCAMPO

La epilepsia es un trastorno paroxístico recurrente del SNC, el cual se manifiesta por alteraciones estereotipadas en el comportamiento, como resultado de una descarga neuronal excesiva, hipsincrónica y autolimitada. Es considerada como un síndrome de origen multifactorial, ya que pueden estar involucrados factores genéticos o metabólicos, o factores asociados a traumatismos cráneo-encefálicos. La descarga anormal de las neuronas se traduce en alteraciones electroencefálicas y manifestaciones clínicas que pueden ser focales o generalizadas, simples o complejas (Rubio, 1997).

Una de las áreas más afectadas en la epilepsia es la formación hipocampal (Feria et al, 1997). Esta estructura cerebral pertenece al sistema límbico y comprende el giro dentado, el hipocampo propiamente, el subículo, presubículo y parasubículo, y la corteza

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

entorrinal. El giro dentado está constituido por tres capas: la capa principal formada por células granulares, la capa acelular molecular localizada sobre la capa principal, y el hilus o capa de células polimórficas, la cual se encuentra debajo de las células granulares. Estas últimas son neuronas monopolares, ya que sus dendritas emergen sólo de la porción superior o apical del cuerpo celular, y se proyectan hacia la capa molecular. Sus axones se conocen como fibras musgosas y se proyectan hacia el hilus. Un grupo de neuronas denominadas células musgosas, inervan la capa molecular ipsilateral y contralateralmente. Las células del hipocampo, en cambio, son multipolares, ya que sus dendritas se extienden perpendicularmente a partir del cuerpo celular en ambas direcciones, y se conocen como células piramidales (Johnston y Amaral, 1998). Estas neuronas forman sinapsis excitadoras, ya que liberan ácido glutámico de sus terminales sinápticas. De acuerdo a su tamaño y apariencia, las células piramidales se han dividido en tres regiones designadas CA1, CA2 y CA3 (fig. 2). Las fibras musgosas del giro dentado inervan CA3, y esta región se conecta con CA1 a través de las colaterales de Schaffer. La región CA1 se proyecta hacia el subiculum y las capas profundas de la corteza entorrinal. La región CA2 es controversial, ya que tiene cuerpos celulares grandes como CA3, pero no recibe inervaciones del giro como CA1. Tiene conexiones distintas a las otras dos regiones y posiblemente también diferencias funcionales. En la epilepsia la pérdida neuronal de la región CA1 con un daño



**Figura 2.** Micrografía del hipocampo de una rata control, en la que se señalan las principales regiones mencionadas en esta tesis. CA1-3, regiones del cuerno de Ammon (Hipocampo); GD, giro dentado; H, hilus.



en CA3 e hilus, es una alteración morfológica que se encuentra con gran frecuencia (Scheyer, 1998). Diversos estudios han demostrado que la región CA2 parece ser, en cambio, más resistente en este síndrome (Corsellis y Burton, 1983). Otro grupo de neuronas presente en la formación hipocámpal son las interneuronas, las cuales forman sinapsis GABAérgicas y tienen regiones blanco localmente restringidas. En el giro dentado estas neuronas inhibitorias se denominan células piramidales tipo canasta y sus cuerpos celulares se localizan entre las células granulares y las polimórficas. Las interneuronas del hipocampo, con sus cuerpos celulares en la capa de células piramidales, se clasifican en: 1) axo-axónicas, las cuales forman sinapsis con el segmento inicial de la neurona piramidal, ejerciendo un fuerte control sobre el inicio del potencial de acción; 2) tipo canasta, cuya sinapsis se forma con el soma de las células piramidales; y 3) biestratificadas, las cuales tienen contactos sinápticos con las dendritas apicales y basales de las neuronas piramidales (Johnston y Amaral, 1998).

La comunicación que existe entre las interneuronas y las células piramidales muestra una estrecha relación entre la actividad excitadora y la inhibitoria. Cuando se rompe el equilibrio entre ellas, surgen desórdenes neurológicos como la epilepsia. Una disminución en la transmisión sináptica GABAérgica y/o un aumento en la glutamatérgica puede producir una hiperexcitabilidad neuronal que da origen a descargas paroxísticas. La neurodegeneración del hipocampo se asocia con la formación aberrante de circuitos excitadores e inhibitorios, los cuales pueden contribuir a la iniciación y/o propagación de las crisis epilépticas (Mathern et al, 1998).

Los receptores del glutamato juegan un papel muy importante en la epilepsia, ya que un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio, originado por una excesiva activación del receptor, lleva a una hiperexcitabilidad neuronal que puede estar involucrada en el origen y la propagación de las descargas epilépticas.

## II. ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios sobre la epilepsia; sin embargo, falta mucho por estudiar tanto para entender sus mecanismos celulares y moleculares, como para encontrar tratamientos adecuados que puedan controlarla. El hipocampo, por ejemplo, es la región cerebral con el umbral más bajo a la generación de crisis, las cuales son, en muchas ocasiones, las más difíciles de controlar médicamente (Johnston y Amaral, 1998).

Las descargas epileptiformes que se presentan en este síndrome son moduladas, al menos en parte, por los receptores NMDA (Wheal et al, 1991). La administración de agonistas, los cuales desencadenan fuertes convulsiones, y de antagonistas, cuyos efectos anticonvulsivantes son notables (Chapman, 1998), aportan evidencia sobre la participación del receptor NMDA en la epilepsia. Es por ello que el estudio de los mecanismos involucrados en la modulación de este receptor ha adquirido gran importancia. Como se mencionó anteriormente, uno de estos mecanismos es la fosforilación de las subunidades que lo forman. Diversos trabajos *in vitro* han demostrado que la fosforilación aumentada del receptor NMDA se traduce en un incremento en la probabilidad de apertura del canal y, por lo tanto, en un aumento en su actividad. Wang y colaboradores (1994) registraron canales NMDA en cultivos neuronales de hipocampo y encontraron que la probabilidad de apertura del canal se reducía al aplicar la PP2A o la PP1 al medio, y que se incrementaba con la administración de 10 y 100 nM de OKA. En neuronas del SNC de ratas adultas disociadas, Lieberman y Mody (1994) demostraron que la apertura del canal NMDA se prolonga con la administración de OKA al medio, en concentraciones que inhiben la PP2B. Posteriormente, Liao y colaboradores (2001) encontraron que la PKC puede modular directamente la actividad del receptor NMDA, debido a que fosforila los residuos de serina 1303 y 1323 que se encuentran en el carboxilo terminal de la subunidad NR2B, lo que conduce a un aumento en la corriente que pasa a través del canal.

Arias y colaboradores (1998) inyectaron ácido okadaico en el hipocampo de la rata, *in vivo*, y estudiaron su neurodegeneración en función al tiempo y la dosis. Encontraron que a las 3 horas de haber aplicado la dosis más alta (300 ng), ya eran visibles cambios morfológicos en las células piramidales, mientras que a las 24 horas la neurodegeneración era muy evidente. En cuanto a las dosis, observaron que con 50 ng se indujo daño en CA1; a dosis de 150 ng y 300 ng la muerte celular abarcó prácticamente toda la región CA1, y se

extendió hasta el hilus y el giro dentado. Posteriormente realizaron otros estudios en los cuales inyectaron 300 ng de ácido okadaico en la misma estructura cerebral y observaron crisis epileptiformes y neurodegeneración, demostrando, además, que la subunidad NR2B del receptor NMDA se encontraba hiperfosforilada (Arias et al, 2002). Sin embargo, no hay muchos trabajos acerca de los efectos del OKA sobre la liberación del glutamato y otros aminoácidos. Los estudios sobre este tema se han realizado *in vitro* y los resultados son opuestos: Sim y colaboradores encontraron un aumento en la liberación de glutamato, aspartato y GABA endógenos en sinaptosomas del cerebro anterior; por el contrario, otro grupo de investigadores reportó una inhibición de la liberación de acetilcolina estimulada por despolarización en sinaptosomas de hipocampo (Vickroy et al, 1995).

### III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Con base en los estudios anteriores se propuso la hipótesis de que el OKA no induce cambios en la concentración extracelular de glutamato, sino que las crisis epileptiformes son originadas porque el receptor al glutamato tipo NMDA se encuentra sobreesensibilizado como consecuencia de la hiperfosforilación de una o varias de sus subunidades. Para probar esta hipótesis se desarrolló el presente trabajo con el objetivo de determinar si la concentración extracelular del ácido glutámico, y otros aminoácidos, se modifica con la administración del OKA en el hipocampo de la rata, *in vivo*, y así conocer si los niveles basales del glutamato son suficientes para desencadenar epilepsia en ratas tratadas con OKA. Inicialmente el desarrollo experimental de este proyecto se realizó en ratas anestesiadas por la facilidad de emplear la técnica de microdiálisis bajo anestesia. Sin embargo, en estas condiciones la administración del OKA no originó las crisis epileptiformes observadas en trabajos anteriores con microinyección en ratas despiertas. Estos resultados preliminares nos llevaron a plantear un segundo objetivo, el cual consistió en comparar los efectos producidos por este inhibidor de fosfatasas de proteínas en ratas anestesiadas y ratas despiertas.

Para la realización del presente estudio se administró OKA por microdiálisis en la región CA1 del hipocampo de ratas despiertas y ratas anestesiadas con halotano. De los resultados obtenidos, se analizaron las crisis epileptiformes generadas, se determinaron los niveles extracelulares de glutamato y otros aminoácidos y se cuantificó la neurodegeneración midiendo el área lesionada en la región perfundida.

## IV. METODOLOGIA

### I MICRODIALISIS Y REGISTRO EEG EN RATAS ANESTESIADAS

En todos los experimentos se utilizaron ratas machos adultos de la cepa Wistar con un peso de 220-240 g. En las ratas anestesiadas los procedimientos combinados de microdiálisis y registro EEG se realizaron como en trabajos descritos anteriormente (Peña y Tapia, 1999). Las ratas se anestesiaron con 0.5-1.5% de halotano en una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> y se montaron en aparatos estereotáxicos. Las cánulas de microdiálisis (CMA/12 de 2 mm de largo y 0.5 mm de diámetro, CMA Solna, Suiza) previamente lavadas con agua, se colocaron en el hipocampo dorsal izquierdo (AP -3.6 mm, L +2.4 mm y V -4.0 mm, Paxinos y Watson 1982) y se perfundieron continuamente, utilizando una bomba de microinyección (CMA 100/Carnegie Medicin), a un flujo de 2 µl/min con medio Krebs con la siguiente composición: 118 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 4.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, y 10 mM glucosa (pH 7.4). Después de una hora de estabilización, se colectaron 14 fracciones consecutivas de 25 µl (12.5 min). Las tres primeras fracciones colectadas se utilizaron para determinar los niveles basales de los aminoácidos, en la cuarta fracción se perfundió OKA (sal de amonio, Alomone Labs.) y se colectaron 10 fracciones adicionales con medio normal. Después de probar varias dosis (15, 30 y 300 µM), con base en trabajos previos con microinyección de OKA, se seleccionó la concentración de 150 µM en el medio de perfusión. Considerando que la eficiencia de la membrana de diálisis es alrededor del 10% bajo condiciones experimentales similares (Massieu et al, 1995; Morales-Villagrán y Tapia, 1996), la cantidad aproximada que llegó al tejido fue de 300 ng, que es una dosis efectiva utilizada en trabajos previos con microinyección (Arias et al, 1998).

El registro EEG en el hipocampo se llevó a cabo simultánea y continuamente durante la microdiálisis. La cánula de microdiálisis se utilizó como electrodo, después de haber aislado eléctricamente toda la superficie de la cánula excepto 1 mm justo arriba de donde se encuentra la membrana de microdiálisis, con el propósito de realizar el registro en el hipocampo (Peña y Tapia, 1999). Para el registro EEG se utilizó un polígrafo Grass con un filtro de baja frecuencia a 3 Hz y un filtro de alta frecuencia a 100 Hz.

La concentración de los aminoácidos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección por fluorescencia, después de haber derivatizado las muestras con *o*-ftaldialdehído (OPA) durante 3 min (Salazar et al, 1994).

## 2 MICRODIALISIS Y REGISTRO EEG EN RATAS DESPIERTAS

Las ratas se anestesiaron con halotano y se les implantó dos tornillos en el cráneo sobre la corteza parietal, los cuales funcionaron como electrodos, y una cánula guía en el hipocampo izquierdo dorsal con las mismas coordenadas que se usaron para la cánula de microdialísis en las ratas anestesiadas, excepto que la V fue de -2.0 mm. Los electrodos y la cánula guía se sujetaron al cráneo con acrílico dental. Cinco días después de la cirugía, la cánula de microdialísis se introdujo en la cánula guía para alcanzar la misma coordenada vertical usada en los animales anestesiados, y el registro EEG cortical se realizó utilizando el polígrafo Grass antes descrito. El procedimiento de microdialísis, incluyendo la adición de OKA durante la cuarta fracción y la determinación de aminoácidos en las fracciones colectadas, se llevó a cabo como se describió para las ratas anestesiadas. Las ratas control se trataron de la misma manera, excepto que no se perfundieron con el medio con OKA. El EEG se registró continuamente durante todo el experimento, comenzando al mismo tiempo que la colecta de las fracciones basales de la microdialísis, tanto en las ratas despiertas (controles y experimentales) como en las anestesiadas. Los datos se analizaron cuantitativamente calculando la media de las latencias a la primera descarga, así como su duración (medida desde el inicio de la actividad hipsincrónica hasta el final del tren de espigas de alta amplitud) y la frecuencia con la que ocurren.

## 3 EVALUACION HISTOLOGICA

A las 24 horas de haber realizado el experimento, las ratas se anestesiaron con pentobarbital y se perfundieron intracardialmente con 250 ml de NaCl al 0.9%, seguidos de 250 ml de formaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Se extrajeron los cerebros, se mantuvieron en postfijación en formaldehído por un periodo de 24-48 horas a 4°C y se pasaron por un gradiente de sacarosa del 10, 20 y 30%. Se obtuvieron cortes coronales seriados del sitio de lesión con un grosor de 40 µm en un crióstato, se tiñeron con

violeta de cresilo y se confirmó la correcta localización de la cánula de microdiálisis. Debido a que la neurodegeneración inducida por el OKA afectó prácticamente a todas las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, la extensión del daño se cuantificó midiendo el área lesionada en dicha región que mostraba pérdida neuronal, y no el número de células, utilizando un programa de análisis de imágenes NIH 1.6 para Macintosh. Se analizaron 12 cortes por rata, 6 anteriores y 6 posteriores al tracto de la cánula (n=8).

#### 4 ANALISIS ESTADISTICO

Para analizar estadísticamente los cambios en las concentraciones extracelulares de los aminoácidos, se utilizó una prueba t pareada.

## V. RESULTADOS

### I EPILEPSIA CONDUCTUAL Y ACTIVIDAD EEG

La administración del OKA en las ratas despiertas, mas no en las anestesiadas, produjo crisis epileptiformes. Como se ha descrito en trabajos previos con microinyección (Arias et al, 1998, 2002) las ratas tratadas con el inhibidor de fosfatasa de proteínas presentaron evidencias conductuales de las crisis epileptiformes. Éstas consistieron en la aparición de movimientos masticatorios, sacudidas de rata mojada, salivación, acicalamiento y, en algunos casos, tremor. Estos signos de hiperexcitabilidad comenzaron aproximadamente a los 20 min del inicio de la perfusión con OKA y coincidieron con las descargas epileptiformes que se registraron en el polígrafo.

La actividad electroencefalográfica basal de las ratas anestesiadas con halotano difiere de las ratas despiertas en que las primeras presentan ondas lentas de alta frecuencia, mientras que en las segundas las ondas son de menor frecuencia (fig. 3). Esta diferencia en los patrones del registro electroencefalográfico debido al halotano, ha sido descrita previamente (Keifer et al, 1994). Como se ejemplifica en la figura 3 (arriba), la administración del OKA en ratas anestesiadas no modificó significativamente el EEG. En contraste, en las ratas despiertas el OKA indujo descargas epileptiformes con actividad hipsincrónica inicial, seguida por trenes de espigas de gran amplitud, ejemplificadas en la figura 3 (abajo). Las crisis aparecieron con una latencia de  $31.7 \pm 1.7$  min ( $n = 14$ ; promedio  $\pm$  E.S.) después del inicio de la perfusión con OKA, pero después de una o dos descargas, sobrevino un período silencioso de aproximadamente 40 min de duración que se presentó en todos los animales tratados. Al cabo de este período, las crisis reaparecieron y aumentaron progresivamente en frecuencia, hasta alcanzar un valor máximo de 7 descargas en 20 min, aproximadamente 40 min después de la fase silenciosa, y disminuyeron a 5 descargas en 20 min a los 120-140 min, que fue el máximo tiempo estudiado. La duración de las descargas fue de 30 s durante la primera hora después de haber comenzado a profundir el fármaco, y aumentó progresivamente hasta llegar al doble (más de 1 min) al final del experimento (figs. 4 y 5; la fig. 4 ejemplifica la evolución de las crisis en dos ratas representativas y la fig. 5 muestra el promedio de 14 animales despiertos).



**ANESTESIADA**

**CONTROL**

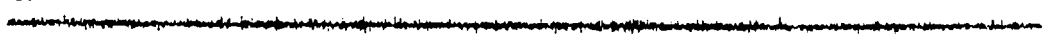


**OKA**

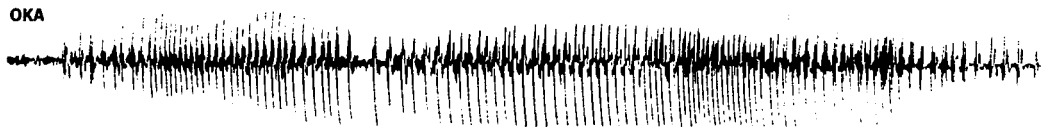


**DESPIERTA**

**CONTROL**



**OKA**



0.5 mV  
5 s

**Figura 3.** Trazos representativos del EEG en ratas anestesiadas (n=10) y despiertas (n=14). Los registros corresponden a 90 min después de la perfusión con OKA o a los tiempos equivalentes en las ratas CONTROL, perfundidas sólo con medio Krebs.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

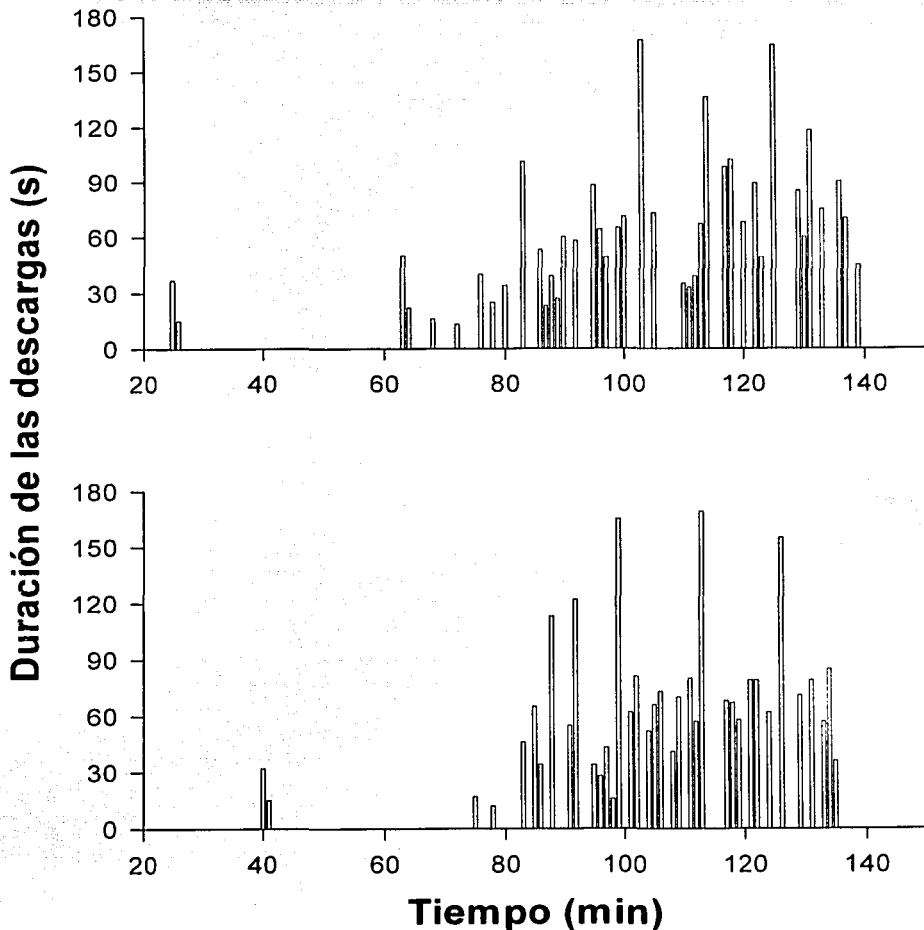
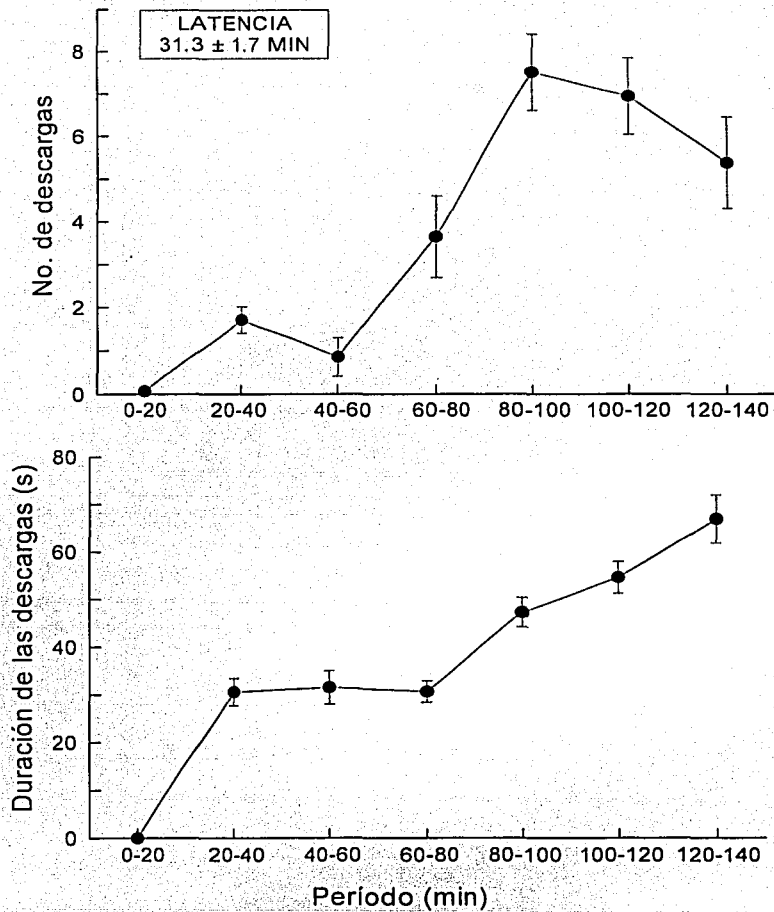


Figura 4. Ejemplos representativos del curso temporal de las crisis epileptiformes inducidas por el OKA en dos ratas. Cada barra representa una descarga de la duración señalada en las ordenadas, a los tiempos indicados en las abscisas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

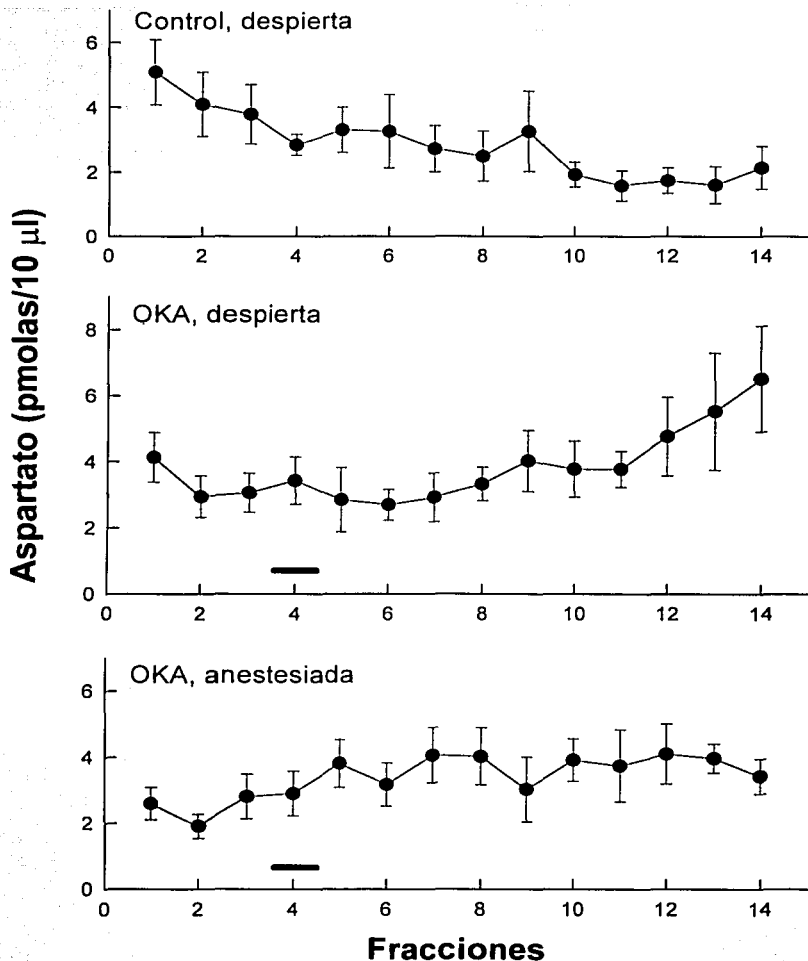


**Figura 5.** Número y duración de las descargas inducidas por la perfusión de OKA. Las cifras son el promedio ± E.S. en periodos de 20 min (n=14).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2 AMINOACIDOS EXTRACELULARES

Los niveles basales del ácido aspártico en el grupo control (despiertas) y en los dos grupos experimentales (despiertas y anestesiadas) fueron muy similares, entre 2 y 5 pmolas/10  $\mu$ l. Estos valores no se modificaron significativamente con la administración del OKA en las ratas despiertas, excepto en dos fracciones aisladas en las ratas anestesiadas, las cuales presentaron niveles más altos que las basales, y algunas fracciones en la ratas control (fig. 6). En el caso del ácido glutámico, las concentraciones basales de las ratas control y las anestesiadas se encontraron alrededor de 10 pmolas/10  $\mu$ l, mientras que las de las ratas despiertas fueron de 20 – 30 pmolas/10  $\mu$ l (fig. 7). En los tres grupos, los niveles basales de este neurotransmisor se mantuvieron a lo largo de la colecta de microdiálisis, a pesar de la variabilidad observada en las concentraciones extracelulares en las ratas despiertas. Estas diferencias, sin embargo, no fueron significativas entre las basales y las fracciones colectadas después de profundir el OKA. En cambio, las concentraciones extracelulares de otros aminoácidos como la glutamina, la glicina, la taurina y la alanina, sí se modificaron con la aplicación del inhibidor de fosfatasas de proteínas, principalmente en las ratas despiertas. En la figura 8 se muestra que la concentración de la glutamina disminuyó progresivamente en las ratas anestesiadas, después de haber perfundido el OKA, hasta llegar a la mitad de los niveles basales (de 120 a 60 pmolas/10  $\mu$ l, aproximadamente). Esta disminución fue mucho menor en las ratas despiertas, y resultó significativa en sólo una de las fracciones, mientras que los niveles basales de las ratas control permanecieron prácticamente constantes. Por el contrario, las concentraciones de glicina, taurina y alanina aumentaron de manera significativa a partir de la fracción 7 en las ratas despiertas, mas no en las ratas anestesiadas ni en los controles, los cuales se mantuvieron constantes a todo lo largo del experimento. El aumento progresivo que se presentó en glicina (fig. 9) y alanina (fig. 10) alcanzó casi 4 veces y 3 veces, respectivamente, el valor de sus niveles basales (alrededor de 30 pmolas/10  $\mu$ l en ambos aminoácidos). En el caso de la taurina (fig. 11), el incremento fue casi del doble (de 60 a 120 pmolas/10  $\mu$ l, aproximadamente), desde la fracción 7 hasta el final del experimento. Los resultados de los niveles extracelulares de GABA no se muestran debido a que presentaron gran variabilidad y en muchas ocasiones estuvieron por debajo de los límites de detección.



**Figura 6.** Efecto de la perfusión de OKA (barra horizontal) durante una fracción (12.5 min) sobre la concentración extracelular de aspartato en ratas despiertas (n=10) y anestesiadas (n=10). Las ratas control despiertas (n=7) fueron perfundidas sólo con medio Krebs. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. Las fracciones 10-14 en las ratas control, y 10 y 13 en las anestesiadas, fueron significativamente diferentes al promedio de sus basales ( $p < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

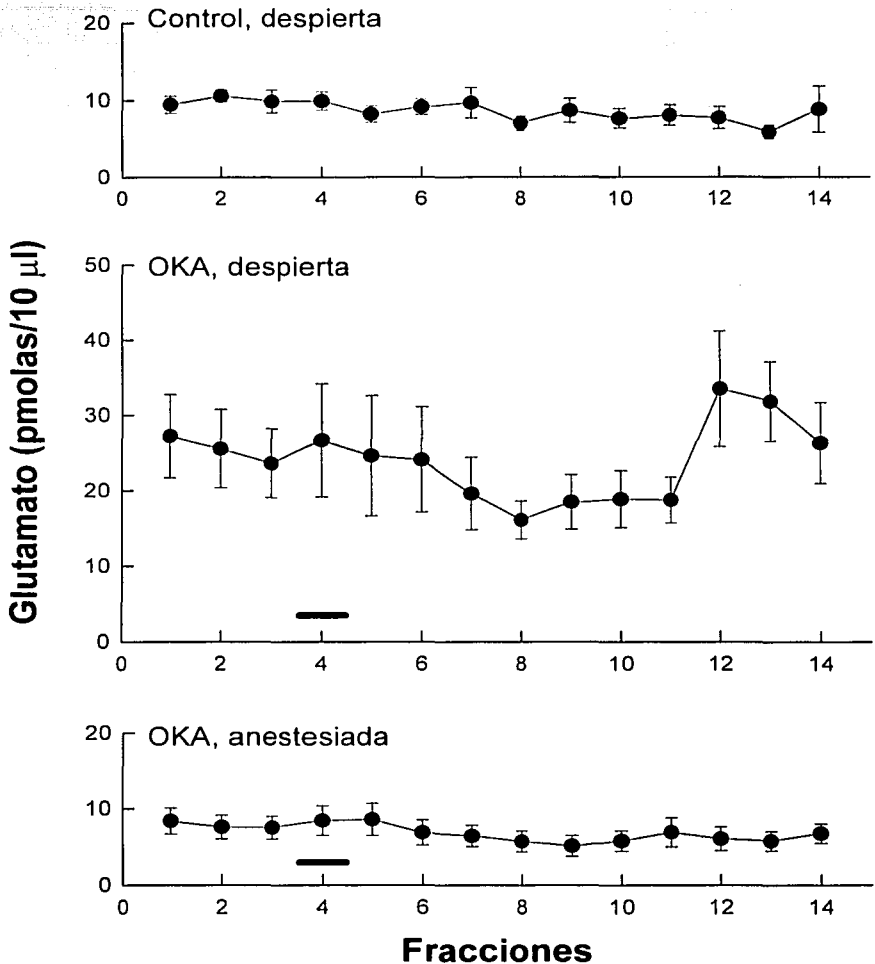
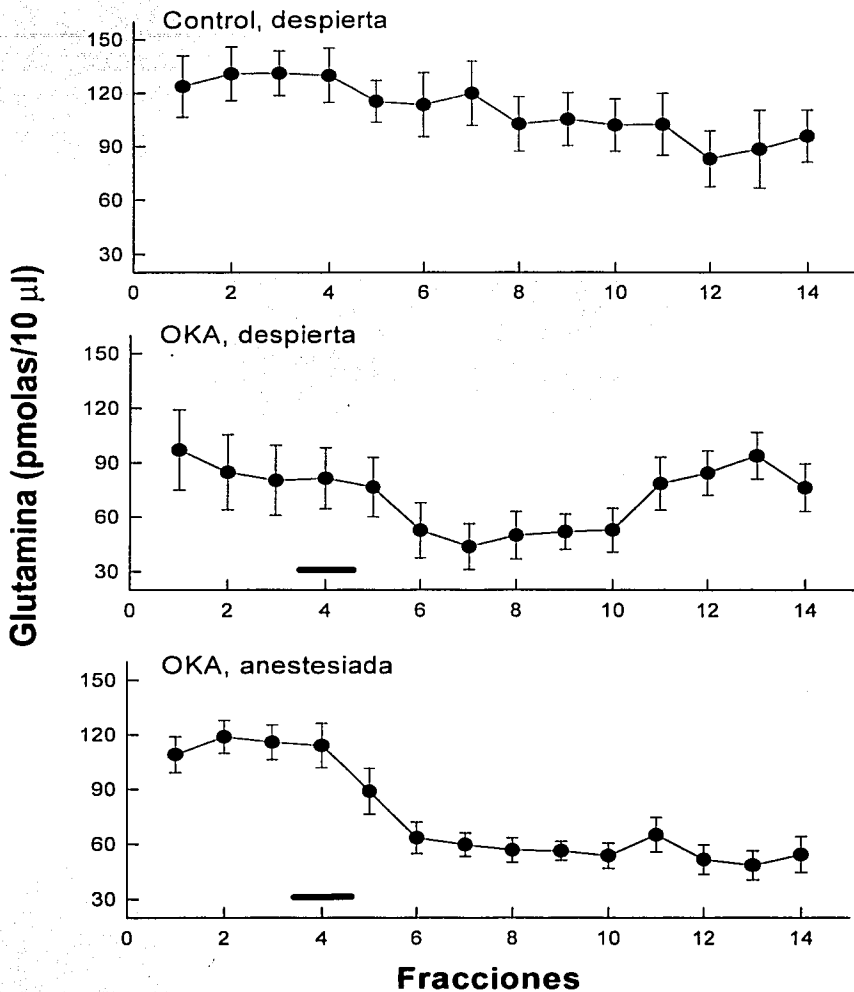
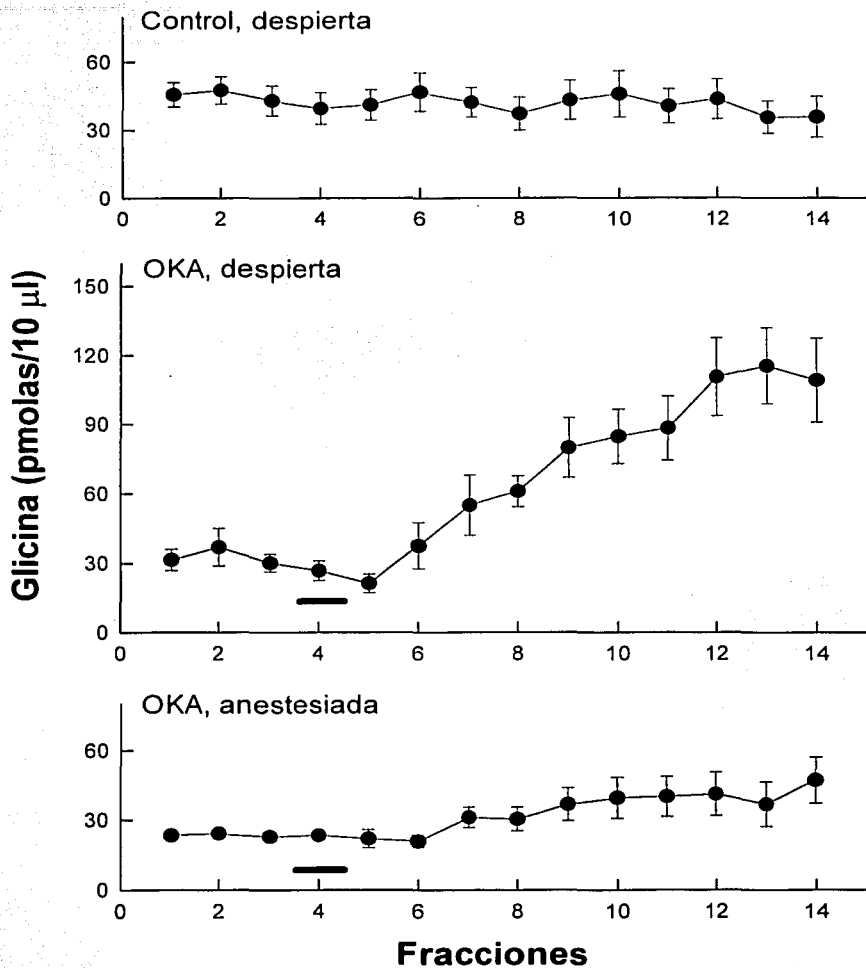


Figura 7. Efecto de la perfusión de OKA (barra horizontal) durante una fracción (12.5 min) sobre la concentración extracelular de glutamato en ratas despiertas (n=10) y anestesiadas (n=10). Las ratas control despiertas (n=7) fueron perfundidas sólo con medio Krebs. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. Las fracciones 8 en las ratas control, y 7-9 en las anestesiadas fueron significativamente diferentes al promedio de sus basales ( $p < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



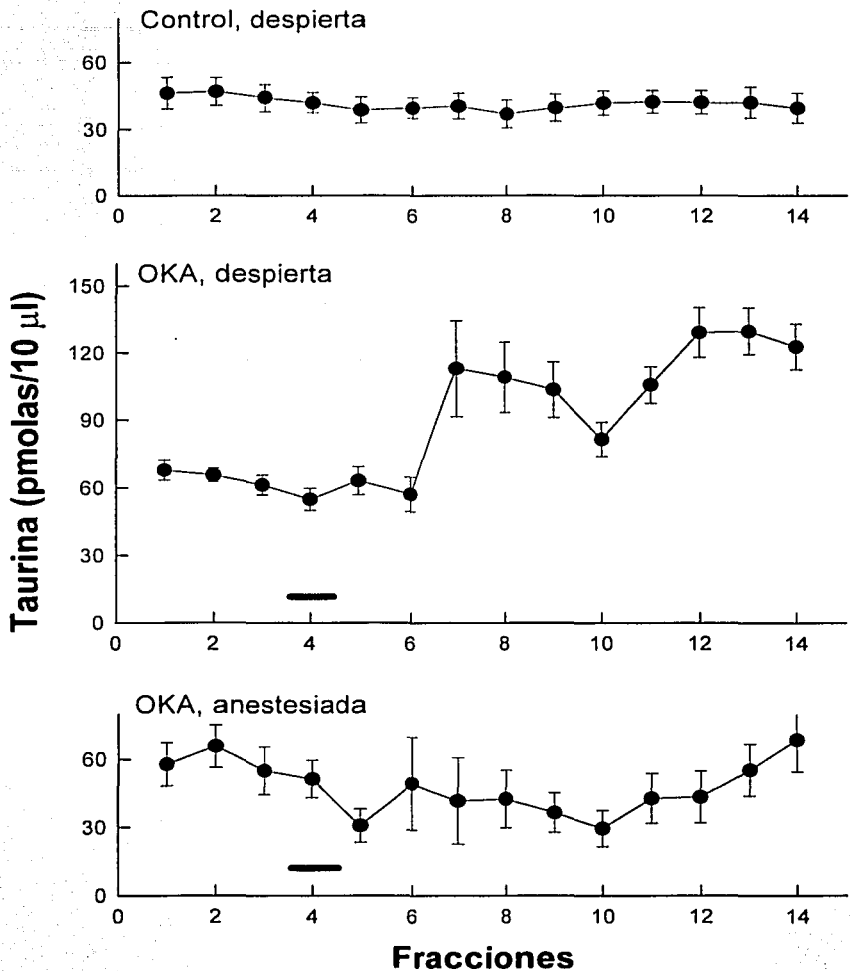
**Figura 8.** Efecto de la perfusión de OKA (barra horizontal) durante una fracción (12.5 min) sobre la concentración extracelular de glutamina en ratas despiertas (n=10) y anestesiadas (n=10). Las ratas control despiertas (n=7) fueron perfundidas sólo con medio Krebs. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. Las fracciones 5 y 12 en las ratas control, 6 en las despiertas, y 5-14 en las anestesiadas fueron significativamente diferentes al promedio de sus basales ( $p < 0.05$ ).



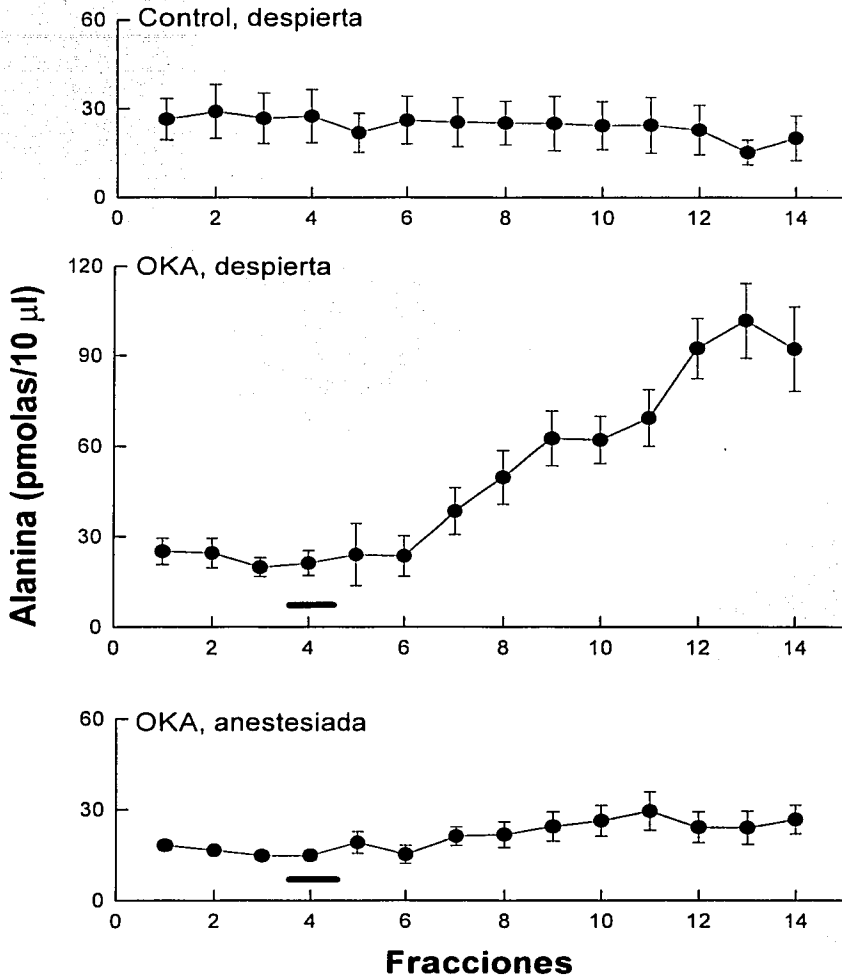
**Figura 9.** Efecto de la perfusión de OKA (barra horizontal) durante una fracción (12.5 min) sobre la concentración extracelular de glicina en ratas despiertas (n=10) y anestesiadas (n=10). Las ratas control despiertas (n=7) fueron perfundidas sólo con medio Krebs. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. Las fracciones 4, 7 y 8 en las ratas control, y 5 y 8-14 en las despiertas fueron significativamente diferentes al promedio de sus basales ( $p < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**Figura 10.** Efecto de la perfusión de OKA (barra horizontal) durante una fracción (12.5 min) sobre la concentración extracelular de taurina en ratas despiertas (n=10) y anestesiadas (n=10). Las ratas control despiertas (n=7) fueron perfundidas sólo con medio Krebs. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. Las fracciones 8 en las ratas control, 9-14 en las despiertas, y 5 y 9-11 en las anestesiadas fueron significativamente diferentes al promedio de sus basales ( $p < 0.05$ ).



**Figura 11.** Efecto de la perfusión de OKA (barra horizontal) durante una fracción (12.5 min) sobre la concentración extracelular de alanina en ratas despiertas (n=10) y anestesiadas (n=10). Las ratas control despiertas (n=7) fueron perfundidas sólo con medio Krebs. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. Las fracciones 5 en las ratas control, y 9-14 en las despiertas fueron significativamente diferentes al promedio de sus basales ( $p < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

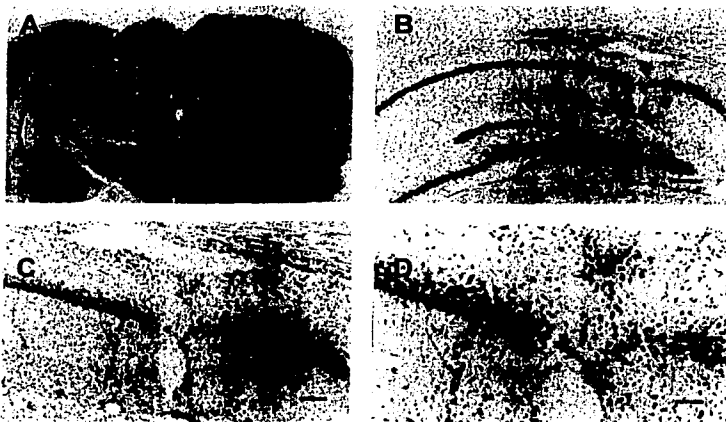
### 3 EVALUACION HISTOLOGICA

En la figura 12 se muestran las micrografías de los cortes coronales de cerebro de una rata control teñidos con violeta de crisol, en donde se puede observar el daño mecánico ocasionado por la cánula en la región CA1 del hipocampo. Este daño mecánico se caracteriza por una destrucción del tejido únicamente en el tracto de la cánula, así como la formación de gliosis en la zona inmediatamente vecina. En ningún caso se observó muerte celular (caracterizada por núcleos picnóticos y desaparición del citoplasma) en las neuronas vecinas de CA1 ni en otras regiones del hipocampo.

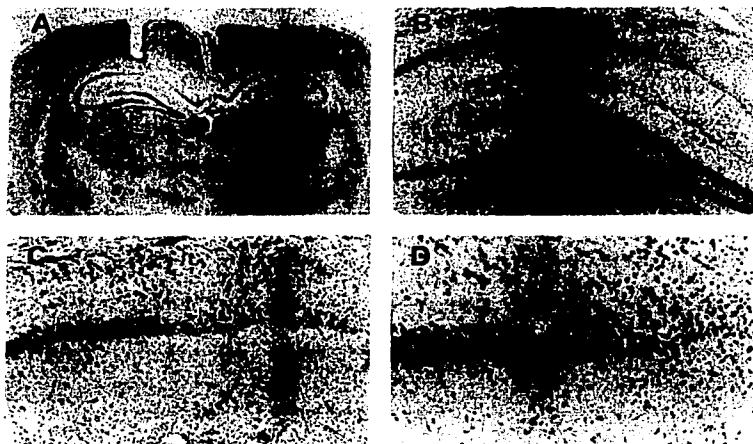
La figura 13 muestra micrografías de los cortes coronales de cerebro de las ratas despiertas (sacrificadas 24 horas después de la perfusión del OKA), en donde es evidente una total destrucción de la región CA1 del hipocampo en el lado inyectado (fig 13), mientras que el lado contralateral permanece intacto (fig. 13 A). Los mismos resultados se observan en las ratas anestesiadas (fig. 14). A pesar de que las crisis epileptiformes se desencadenaron únicamente en las ratas en libre movimiento, la neurodegeneración se presentó tanto en ratas despiertas como anestesiadas. En la mayoría de las ratas, tanto despiertas como anestesiadas, se dañaron otras regiones del hipocampo, como CA3, hilus y giro dentado, y en ningún caso hubo neurodegeneración en CA2. La cuantificación del área lesionada en los dos grupos experimentales resultó en valores muy similares, ya que ambos grupos de ratas tratados con OKA presentaron áreas lesionadas de  $0.18 \text{ mm}^2$  (Tabla 1).

TRATAMIENTO	AREA LESIONADA ( $\text{mm}^2$ )
OKA, RATA DESPIERTA (n=8)	$0.18 \pm 0.013$
OKA, RATA ANESTESIADA (n=7)	$0.18 \pm 0.016$

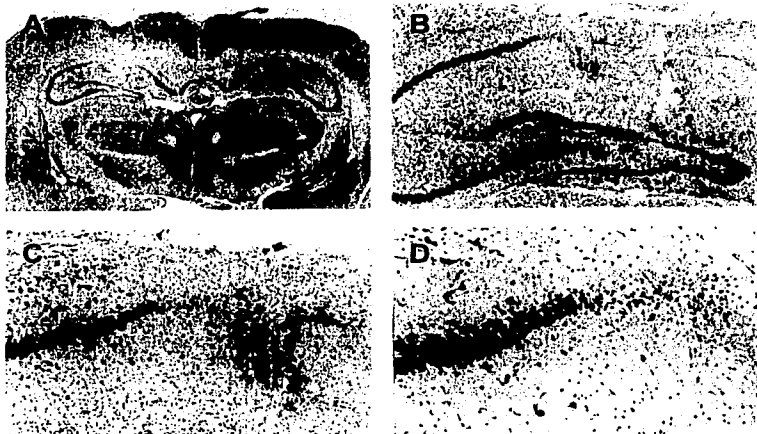
**Tabla 1.** Cuantificación de la neurodegeneración de la región CA1 del hipocampo producida por la perfusión de OKA. No se muestran datos de las ratas control debido a que no presentan daño, como se muestra en la figura 12. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S.



**Figura 12.** Micrografías representativas de una rata control perfundida sólo con medio Krebs y sacrificada a las 24 horas. Se muestran distintos aumentos de la región CA1 del hipocampo donde se observa el tracto de la cánula. Barra = 1mm en A, 300  $\mu$ m en B, 100  $\mu$ m en C, 50  $\mu$ m en D.



**Figura 13.** Micrografías representativas del efecto neurotóxico del OKA en rata despierta sacrificada 24 horas después del tratamiento. Se muestran distintos aumentos del daño de la región CA1 del hipocampo. Para la escala véase figura 12.



**Figura 14.** Micrografías representativas del efecto neurotóxico del OKA en rata anestesiada sacrificada 24 horas después del tratamiento. Se muestran distintos aumentos del daño de la región CA1 del hipocampo. Para la escala véase figura 12.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI. DISCUSION

### I EPILEPSIA Y ACTIVIDAD EN EL EEG

Los resultados del presente trabajo muestran que las crisis epileptiformes ocasionadas por la administración del OKA en ratas en libre movimiento, son inhibidas por la anestesia con el halotano. En diversos estudios realizados con ratas anestesiadas, en los cuales se administraron drogas convulsivantes, se observaron crisis epileptiformes y se determinaron las concentraciones extracelulares de algunos aminoácidos (Peña y Tapia, 1999; Peña y Tapia, 2000). En los trabajos de Peña y Tapia, la perfusión por microdiálisis de 4-aminopiridina (4-AP), un bloqueador de canales de potasio y potente convulsivante, estimuló la liberación de neurotransmisores excitadores, indujo crisis epileptiformes y provocó neurodegeneración en ratas anestesiadas con halotano, efectos que se bloquearon por antagonistas del receptor NMDA. En el presente trabajo, sin embargo, la anestesia interfirió con el desarrollo de las crisis epileptiformes producidas por el OKA en las ratas despiertas (fig. 3). De hecho, este es uno de los hallazgos más importantes del presente estudio, ya que en los artículos citados la acción convulsivante y neurodegenerativa de la 4-AP, que es predominantemente mediada por un exceso de glutamato endógeno extracelular, se observó en las ratas anestesiadas con halotano.

Como se mencionó en los Antecedentes, la inyección intrahipocámpica de OKA en ratas despiertas produjo epilepsia, que fue bloqueada por antagonistas del receptor NMDA como el maleato de dizocilpina (MK-801), así como hiperfosforilación de la subunidad NR2B del propio receptor (Arias et al, 2002). Por esto, una posible explicación de la falta de efecto epileptogénico del OKA en los animales anestesiados podría ser que el anestésico utilizado, el halotano, interfiere con la transmisión glutamatérgica. Diversos trabajos que se han hecho sobre el mecanismo de acción de distintos anestésicos como el pentobarbital o el propofol muestran que su efecto se debe a un incremento en la transmisión sináptica inhibitoria, ya que al administrar bicuculina (un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>) en rebanadas de hipocampo, se antagonizaron sus efectos (Wakasugi et al, 1999). Sin embargo, se ha encontrado que, en el caso de anestésicos como la ketamina, el isoflurano y el halotano, el efecto anestésico se debe también a una disminución en la transmisión sináptica excitadora, ya que disminuye las espigas poblacionales de neuronas de la región

CA1 del hipocampo y su efecto anestésico es bloqueado sólo parcialmente por la bicuculina (Wakasugi et al, 1999). En rebanadas de hipocampo se ha encontrado que el halotano aumenta la inhibición mediada por el receptor GABA<sub>A</sub> y disminuye, además, la transmisión excitadora (Nishikawa y MacIver, 2000). En este punto, sin embargo, existe controversia. MacIver y colaboradores (1996), registrando neuronas de la región CA1 del hipocampo, encontraron un aumento en la facilitación de pulsos pareados, lo que sugiere que la anestesia tiene efectos presinápticos al disminuir la liberación de aminoácidos excitadores. Sin embargo, en el presente trabajo no se encontraron diferencias en los niveles extracelulares de glutamato y aspartato ni de otros aminoácidos en las ratas control despiertas y las ratas anestesiadas con halotano. Asimismo, estudios realizados en la corteza fronto-parietal de la rata, utilizando la técnica de microdiálisis, demostraron que el halotano no tiene efectos sobre las concentraciones extracelulares de aspartato, glutamato y glicina (Rozza et al, 2000). Es probable, por lo tanto, que el efecto anestésico del halotano no se debe a una disminución en la liberación de glutamato y aspartato.

En cambio, otros trabajos apoyan la idea de que la anestesia afecta la transmisión sináptica excitadora en la postsinapsis. Estudios *in vitro*, en rebanadas de hipocampo, muestran que el halotano inhibe las corrientes excitadoras postsinápticas tanto de receptores NMDA como no-NMDA, a concentraciones de anestesia utilizadas en la clínica (Perouansky et al, 1998), y deprime las espigas poblacionales de estos tipos de receptores, evocadas en la región CA1 del hipocampo (Wakasugi et al, 1999). Kirson y colaboradores (1998), en estudios realizados en rebanadas de hipocampo de ratón, encontraron que los receptores AMPA son más sensibles a la acción inhibitoria del halotano que los NMDA, y que en ambos casos la interacción de este anestésico con los receptores parece ser no competitiva. Otros trabajos muestran que algunos anestésicos, entre ellos el halotano, bloquean la transmisión sináptica excitadora a través de diversos efectos alostéricos en el mecanismo de activación del canal iónico del receptor y en el sitio de unión a glutamato (Martín et al, 1995). Beirne y colaboradores (1998), estudiando cultivos de células corticales, encontraron que el halotano antagoniza, en un porcentaje bajo y en una gama muy limitada de concentraciones, la excitotoxicidad ocasionada por NMDA y que, además, es menos potente que los antagonistas específicos del receptor a glutamato. Otro dato que apoya la idea de que el halotano tiene efectos sobre el receptor NMDA, es un estudio en el que se utilizó una dosis de 7.5 mM de 4-AP en ratas despiertas, debido a que dosis más

altas indujeron crisis tan severas que culminaron en la muerte del animal (Vera y Tapia, datos no publicados). En cambio, en las ratas anestesiadas con halotano la dosis mínima que produjo los mismos efectos fue 17.5 mM (Peña y Tapia, 2000), lo que sugiere que el halotano bloquea parcialmente el receptor y que, por lo tanto, se requieren dosis más altas de 4-AP para poder contrarrestar el efecto bloqueador de este anestésico. Todos estos estudios, junto con los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que el halotano ejerce una acción bloqueadora sobre el receptor NMDA, aunque no tan potente como la que ocasiona un antagonista específico. Esta inhibición del receptor, sin embargo, es suficiente para impedir que se desencadenen crisis epileptiformes, aun cuando el receptor probablemente se encuentra hiperfosforilado por acción del OKA, como se discutirá más adelante.

En las ratas despiertas las crisis epileptiformes producidas por el OKA fueron muy reproducibles con la dosis utilizada, así como el número de descargas y la duración de las mismas. Se probaron dosis más bajas, 15 y 30  $\mu\text{M}$ , las cuales no indujeron descargas epileptiformes. Dosis más altas, como 300  $\mu\text{M}$ , produjeron crisis convulsivas muy intensas, por lo que se decidió trabajar con la de 150  $\mu\text{M}$ . La perfusión de OKA a esta concentración durante 12.5 min, y considerando la eficiencia de la cánula ( $\approx 10\%$ ), la cantidad del compuesto que llegaría al tejido es de 300 ng, que es la dosis efectiva administrada con microinyección en trabajos previos (Arias et al, 1998, 2002) Sin embargo, los resultados de este último trabajo difieren en algunos puntos con los resultados obtenidos en el presente trabajo. La latencia, la cual fue muy constante en todas las ratas, se presentó aproximadamente a los 30 min de haber comenzado a perfundir el OKA, mientras que en el estudio mencionado, las crisis comenzaron a los 19 min de haber inyectado el fármaco. Otra diferencia es que el período silencioso, es decir, el tiempo en el que no se presentaron crisis epileptiformes (como se describió en los Resultados de esta tesis), no se indica en el estudio con las ratas microinyectadas. También la frecuencia de las crisis fue diferente: entre los 80 y los 140 min después de haber comenzado a perfundir el OKA, es decir, en la última hora del experimento, el número de crisis fue aproximadamente 17, mientras que en el trabajo de Arias y colaboradores se observó un promedio de 9 crisis/hora. Es probable que estas diferencias se deban a la manera en que se administró el OKA, ya que en la microdiálisis el fármaco pasa continuamente a un flujo de 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  a través de una membrana de diálisis durante 12.5 min, mientras que en la microinyección toda la cantidad



del OKA es administrada directamente sobre el tejido y mucho más rápidamente (2 min). Las crisis epileptiformes de las ratas despiertas tratadas con OKA fueron originadas, al parecer, por el ácido glutámico endógeno basal, como se discutirá más adelante.

## 2 AMINOACIDOS EXTRACELULARES

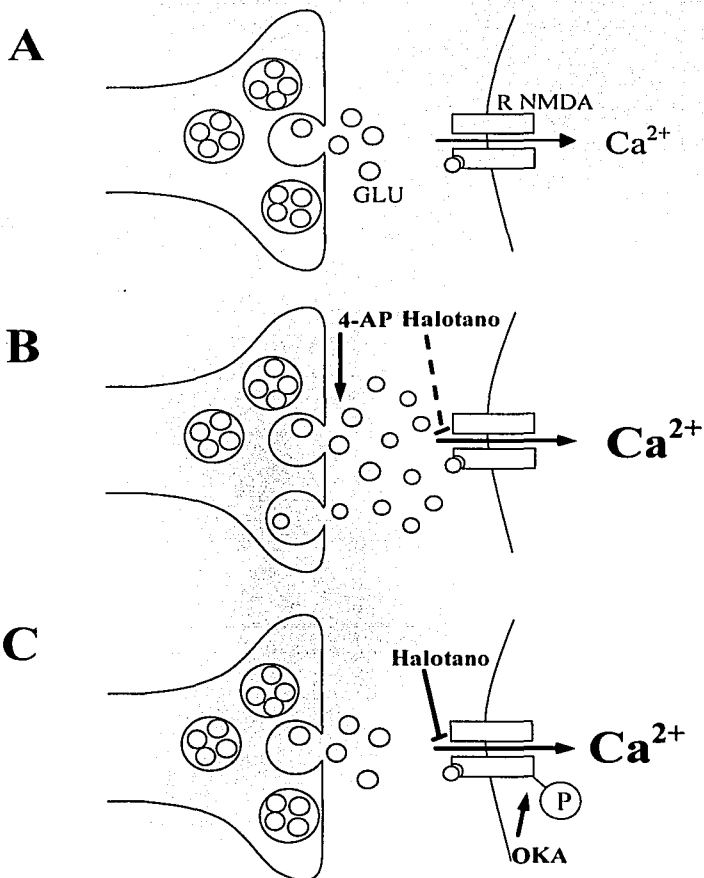
Como se muestra en los resultados, a pesar de la variabilidad de los niveles extracelulares de los aminoácidos, no se encontraron diferencias significativas que indiquen un aumento o disminución en las concentraciones extracelulares de aspartato y glutamato después de haber administrado el OKA en las ratas despiertas. Si bien en algunas fracciones se encontraron diferencias significativas en las ratas anestesiadas, éstas no se deben directamente a la administración del inhibidor de fosfatasa de proteínas, ya que estas fracciones se encuentran aisladas una de la otra, es decir, no reflejan un aumento consecutivo, y no corresponden, en ningún caso, a la fracción cinco, que es donde se deberían observar cambios ocasionados por la perfusión del fármaco, como se encontró en otros estudios. En el hipocampo de la rata, la administración por microdialísis de 25 mM de pirrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC), un inhibidor del transportador de glutamato, ocasionó un aumento de 18 y 26 veces en los niveles extracelulares de glutamato y aspartato, respectivamente (Massieu y Tapia, 1997). Este incremento comenzó inmediatamente después de haber perfundido el PDC y se mantuvo durante la administración del mismo. Efectos similares se obtuvieron con 75 mM de 4-AP, la cual indujo una liberación masiva de glutamato (20 veces) y aspartato (10 veces) al administrarlo en el estriado de ratas anestesiadas y despiertas (Morales-Villagrán y Tapia, 1996). La perfusión de este fármaco a concentraciones de 75 mM en el hipocampo de ratas anestesiadas arrojó resultados muy similares (Peña y Tapia, 1999). En ambos estudios el aumento en los niveles extracelulares de glutamato y aspartato ocurrió en la siguiente fracción a la aplicación de la 4-AP y fue decreciendo en las dos siguientes fracciones hasta alcanzar niveles basales. Por todo lo anterior, se puede decir que el efecto epileptogénico del OKA en el hipocampo no se debe a un aumento en la liberación de aminoácidos excitadores.

Como se ha mencionado con anterioridad, es probable que las crisis epileptiformes observadas en las ratas despiertas se deban a un aumento en la sensibilidad del receptor tipo NMDA ocasionado por la hiperfosforilación que produce la administración del OKA. En

diversos estudios se ha demostrado que el receptor NMDA es fosforilado en sus subunidades NR1, NR2A y NR2B por la PKA y por varias isoformas de la PKC (Leonard y Hell, 1997; Grosshans y Browning, 2001), así como en la subunidad NR2B por la CaMKII (Mayadevi et al, 2002). Lan y colaboradores (2001) encontraron que al administrar activadores de las cinasas de proteínas como el 12-O-tetradecanoil forbol-13 acetato (TPA) en ovocitos de *Xenopus* que expresan el receptor NMDA, la actividad del canal fue potenciada, ya que incrementa la probabilidad de apertura del receptor. La aplicación de inhibidores de fosfatasa de proteínas como el ácido okadaico en cultivos de neuronas del hipocampo (Wang, et al, 1994), y la calcineurina en células del hipotálamo (Nijholt et al. 2000), ocasionan la hiperfosforilación del receptor, lo que conduce a un aumento en su actividad. Arias y colaboradores (2002) demostraron que el aumento en la fosforilación de la subunidad NR2B provocado por la administración del OKA *in vivo*, está relacionado con la sobreactividad del receptor, ya que lleva al desarrollo de crisis epileptiformes que son abolidas por el MK-801.

Tomando en cuenta estos antecedentes conjuntamente con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que las crisis fueron originadas por el ácido glutámico endógeno basal, el cual es capaz de inducir descargas debido a que el receptor se encuentra sobresensibilizado como consecuencia de la hiperfosforilación de una o varias de sus subunidades.

Con base en los resultados del EEG en ratas despiertas y anestesiadas, y de las concentraciones extracelulares de aspartato y glutamato, y tomando en cuenta los antecedentes mencionados, proponemos una posible explicación a los distintos efectos observados con OKA en relación con otros fármacos convulsivantes como la 4-AP (fig. 15). Un aumento en el glutamato sináptico, como el que produce la 4-AP, sobreactiva a los receptores NMDA lo suficiente como para superar el efecto bloqueador que el halotano tiene sobre el receptor. En cambio, el OKA no modifica la concentración extracelular de glutamato, pero sí aumenta la sensibilidad de su receptor por fosforilación. Este aumento es suficiente para sobreactivar al receptor y producir crisis epileptiformes por el glutamato endógeno basal. En este caso, sin embargo, el halotano es capaz de bloquear al receptor. Otra explicación para la diferencia en la capacidad de inducir descargas epileptiformes bajo anestesia, es que el receptor hiperfosforilado pudiera ser más sensible al bloqueo por halotano que el no hiperfosforilado.



**Figura 15.** Esquema de la interpretación de los resultados experimentales en las sinapsis glutamatergicas. **A** Funcionamiento normal. **B** Sobreactivación del receptor NMDA por un aumento en la liberación sináptica del glutamato inducido por la 4-AP. El halotano solo ejerce un bloqueo parcial sobre el receptor, insuficiente para inhibir la epilepsia y la neurodegeneración (Peña y Tapia, 1999,2000). **C** Sobreactivación del receptor NMDA por el glutamato endógeno extracelular normal, debido a que se encuentra sobresensibilizado como consecuencia de la hiperfosforilación inducida por el OKA. El bloqueo del receptor por el halotano, en este caso, es suficiente para inhibir totalmente la epilepsia producida por el OKA.

Por otra parte, los niveles extracelulares del resto de los aminoácidos estudiados fueron muy similares en las ratas anestesiadas y las ratas control despiertas. En el caso de la glutamina, tanto las ratas despiertas como las anestesiadas tratadas con OKA mostraron decrementos en los niveles extracelulares; sin embargo, en las ratas despiertas esta disminución no fue significativa. Las concentraciones de taurina, glicina y alanina, en cambio, aumentaron en las ratas despiertas tratadas con ácido okadaico. Sin embargo, este aumento fue tardío, es decir, no se presentó inmediatamente después de haber profundido el inhibidor de fosfatasa de proteínas, lo cual indica que estas variaciones no se debieron directamente al fármaco, como ya se discutió en párrafos anteriores. Las diferencias que presentó este grupo experimental pudieron deberse a diferentes demandas metabólicas o al manejo y al estrés al que estuvieron sometidas las ratas debido a las crisis epileptiformes generadas por el OKA, a pesar de que, paradójicamente, las concentraciones de glutamato y aspartato no cambiaron significativamente.

### 3 NEURODEGENERACION

La muerte neuronal en el hipocampo inducida por la administración de OKA ya ha sido descrita en estudios previos (Arias et al, 1998; He et al, 2001). Arias y colaboradores demostraron que la microinyección de este fármaco en el hipocampo de la rata lleva a la muerte celular de la región CA1, el giro dentado y el hilus; esta neurodegeneración comenzó a las 3 horas de haber administrado el ácido okadaico y fue más evidente a las 24 horas. Asimismo, observaron que el OKA indujo la expresión la Hsp 72 (proteína de estrés calórico) en las células sobrevivientes y en el lado contralateral, la cual fue bloqueada por el MK-801. En otro estudio, He y colaboradores (2001) encontraron que la microinyección de OKA en esta misma estructura neuronal ocasiona un déficit en la memoria espacial como resultado de la neurodegeneración de la zona inyectada.

La presencia de muerte neuronal en las ratas anestesiadas y despiertas, a pesar de que las primeras no presentaron crisis epileptiformes, es un dato muy interesante. Primero, como se mencionó en la metodología, la muerte neuronal fue prácticamente total, de tal manera que no fue posible hacer un conteo celular, por lo que la extensión del daño fue cuantificada midiendo el área dañada en la región CA1 del hipocampo. El valor obtenido fue muy similar en ambos grupos de ratas. El hecho de que el halotano protegiera contra las crisis epileptiformes pero no contra la neurodegeneración, coincide con el trabajo de Arias

y colaboradores (2002), en donde la muerte neuronal inducida por la microinyección del OKA no fue prevenida por el MK-801, pero sí las crisis, como se mencionó en párrafos anteriores. Esto sugiere que el receptor NMDA está involucrado en el desarrollo de las crisis epileptiformes, sin embargo, su participación en la neurodegeneración parece no ser tan importante.

Es probable, entonces, que la muerte neuronal observada tanto en las ratas despiertas como las anestesiadas se deba al efecto que tiene el OKA sobre muchas otras proteínas, entre ellas, las de citoesqueleto. Tau, por ejemplo, es una proteína asociada a los microtúbulos del citoesqueleto, la cual contribuye de manera importante al dinamismo y la estabilidad de éstos. Se ha visto que la fosforilación aumentada de esta proteína ocasiona agregaciones aberrantes de las neuronas (Sánchez et al, 2001), la pérdida de procesos neuronales y un decremento en el número de sinapsis, características que se observan en la enfermedad de Alzheimer (Malchiodi-Albedi et al, 1997). Asimismo, se ha visto que en neuronas corticales en cultivo y en células de neuroblastoma, la hiperfosforilación de tau inducida por la aplicación de OKA conduce a cambios en el citoesqueleto y finalmente a la muerte neuronal (Arias et al, 1993). Otros efectos ocasionados por el ácido okadaico en células de neuroblastoma son la condensación de la cromatina y reorganización del citoesqueleto, procesos típicos de la apoptosis (Fernández-Sánchez et al, 1996). Sacher y colaboradores (1993) encontraron que el tratamiento con OKA en cultivos neuronales de ganglio de la raíz dorsal induce alteraciones en la red de neurofilamentos ocasionadas por un aumento en sus niveles de fosforilación. En fibroblastos y células epiteliales, la administración de este inhibidor de fosfatasa de proteínas causó un rompimiento rápido y completo de los microtúbulos estables del citoesqueleto (Gurland y Gundersen, 1993). En todos los estudios antes mencionados es evidente que el OKA altera los niveles de fosforilación de distintos elementos del citoesqueleto, lo que conduce finalmente a la muerte celular.

Como se mencionó anteriormente, la magnitud del área lesionada fue muy similar tanto en las ratas que desarrollaron crisis epileptiformes como las que no presentaron descargas (ratas despiertas y anestesiadas, respectivamente). Estos resultados y los datos de los trabajos antes mencionados nos llevan a concluir que la neurodegeneración es ocasionada por los efectos directos e indirectos que tiene el ácido okadaico sobre muchas

**proteínas y procesos celulares, cuyo desajuste conduce a la muerte neuronal, independientemente de las crisis epileptiformes.**

## VII. CONCLUSIONES

La concentración extracelular de aspartato y glutamato no se modificó por la administración de OKA, ni en las ratas despiertas ni en las anestesiadas, lo que confirma que la epilepsia producida por este fármaco se debe principalmente a un aumento en la sensibilidad de los receptores NMDA.

Mientras que en las ratas despiertas el OKA produjo intensas convulsiones, las ratas anestesiadas con halotano fueron totalmente resistentes a este efecto. La explicación más probable es que el halotano bloquea al receptor NMDA (Beirne et al, 1997; Kirson et al, 1998).

El hallazgo de que el halotano protegiera contra las crisis pero no contra la neurodegeneración, puede explicarse porque el OKA ocasiona la hiperfosforilación de muchas proteínas, como las de citoesqueleto, lo que lleva a la muerte neuronal, por mecanismos diferentes a la activación de receptores a glutamato.

Estos mecanismos de la neurodegeneración son independientes de la actividad epiléptica, ya que aunque las ratas anestesiadas no tuvieron epilepsia, el daño neuronal fue idéntico al observado en las ratas despiertas.

## VIII. REFERENCIAS

- Arias C., Montiel T., Tapia R. (1990) Transmitter release in hippocampal slices from rats with limbic seizures produced by systemic administration of kainic acid. *Neurochem. Res.* 15: 641-645.
- Arias C., Sharma N., Davies P., Shafit-Zagardo B. (1993) Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J. Neurochem.* 61: 673-682.
- Arias C., Becerra-García F., Arrieta I., Tapia R. (1998) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus *in vivo*. *Exp. Neurol.* 153: 242-254.
- Arias C., Montiel T., Peña F., Ferrera P., Tapia R. (2002) Okadaic acid induces epileptic seizures and hyperphosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in rat hippocampus *in vivo*. *Exp. Neurol.* 177: 284-291.
- Barford D. (1995). Protein phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 728-734.
- Beirne J., Pearlstein R., Massey G., Warner D. (1998) Effect of halothane in cortical cell cultures exposed to N-methyl-D-aspartate. *Neurochem. Res.* 23: 17-23.
- Bialojan C., Takai A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* 256: 283-290.
- Cartmell J., Schoepp D. (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 75: 889-907.
- Chapman A. G. (1998) Glutamate receptors in epilepsy. *Prog. Brain Res.* 116: 371-383.
- Cohen P., Holmes C., Tsukitani Y. (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* 15: 98-102.
- Corsellis J. A., Burton C. J. (1983) Neuropathology of status epilepticus in humans. *Adv. Neurol.* 34: 129-139.
- Cruzalegui F., Bading H. (2000) Calcium-regulated protein kinase cascades and their transcription factor targets. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 402-410.
- Cull-Candy S., Brickley S., Farrant M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 327-335.
- Daikhin Y., Yudkoff M. (2000) Glutamate and glutamine in the brain. *J. Nutr.* 130: 1026S-1031S.



- Dingledine R., Bennett J.A. (1994) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14: 373-384.
- Feria A., Castillo S., Ortiz G. (1997) Cambios neuromorfológicos asociados a las convulsiones. En *Epilepsia: Aspectos Neurobiológicos, Médicos y Sociales* (Feria A., Martínez de Muñoz D. y Rubio F., Eds.) Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México, D.F., pp 25-44.
- Fernández M., Zitko V., Gazcón S., Novelli A. (1991) The marine toxin okadaic acid is a potent neurotoxin for cultured cerebellar neurons. *Life Sci.* 49: 157-162.
- Fonnum F., Fykse E. M., Roseth S. (1998) Uptake of glutamate into synaptic vesicles. *Prog. Brain Res.* 116: 87-101.
- Fragoso-Veloz J., Tapia R. (1992) NMDA receptor antagonist protect against seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 221: 275-280.
- Fernández-Sánchez M., García-Rodríguez A., Díaz-Trelles R., Novelli A. (1996) Inhibition of protein phosphatases induces IGF-1-blocked neurotrophin-insensitive neuronal apoptosis. *FEBS Lett.* 398: 106-112.
- Gereau IV, Conn P. J., Robert W. (1995) Roles of specific metabotropic glutamate receptor subtypes in regulation of hippocampal CA1 pyramidal cell excitability. *J. Neurophysiol.* 74: 122-129.
- Grosshans D., Browning M. (2001) Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *J. Neurochem.* 76: 737-744.
- Gurland G., Gundersen G. G. (1993) Protein phosphatase inhibitors induce the selective breakdown of stable microtubules in fibroblasts and epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8827-8831.
- He J., Yamada K., Zou L., Nabeshima T. (2001). Spatial memory deficit and neurodegeneration induced by the direct injection of okadaic acid into the hippocampus in rats. *J. Neural Transm.* 108: 1435-1443.
- Hunter T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236.
- Johnston D., Amaral D. G (1998) Hippocampus. En *The Synaptic Organization of the Brain*. (Shepherd G. M. Ed.), Oxford University Press, New York, pp 417-458.
- Jovanovic J., Sihra T., Nairn A., Hemmings Jr H., Greengard P., Czernik A. (2001) Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during  $Ca^{2+}$ -dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J. Neurosci.* 21: 7944-7953.

- Kandel E. R., Siegelbaum S. A. (2000) Overview of synaptic transmission. En *Principles of Neural Science* (4<sup>th</sup> Ed.) (Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. Eds.) McGraw-Hill, New York, pp 175-186.
- Keifer J. C., Baghodoyan H. A., Becker L., Lydic R. (1994) Halothane decreases spontine acetylcholine release and increases EEG spindles. *NeuroReport* 5: 577-580.
- Kirson E., Yaari Y., Perouansky M. (1998) Presynaptic and postsynaptic actions of halothane at glutamatergic synapses in the mouse hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 124:1607-1614.
- Lan J., Skeberdis V., Jover T., Grooms S., Lin Y., Araneda R., Zheng X., Bennett M., Zukin S. (2001). Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nature Neurosci.* 4: 382-390.
- Lau L-F, Haganir R. (1999) Tyrosine phosphorylation. En *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects.* (Siegel G. J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S. K. y Uhler M. D., Eds.) Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 497-522.
- Leonard A., Hell J. (1997) Cyclic AMP-dependent C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J. Biol. Chem.* 272: 12107-12115.
- Liao G., Wagner D., Hsu M., Leonard J. (2001) Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Mol. Pharmacol.* 59: 960-964.
- Lieberman D., Mody I. (1994) Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatase. *Nature* 369:235-239.
- MacDonald J.F., Xiong X-G., Lu W-Y, Raouf R., Orser B.A. (1998) Modulation of NMDA receptors. *Prog. Brain Res.* 116: 191-208.
- MacIver M., Mikulec A., Amagasu S., Monroe F. (1996) Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions. *Anesthesiology* 85: 823-834.
- Malchodi-Albedi F., Petrucci T., Picconi B., Iosi F., Falchi M. (1997) Protein phosphatase inhibitors induce modification of synapse structure and tau hyperphosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 48:425-438.
- Martin D., Plagenhoef M., Abraham J., Dennison R., Aronstam R. (1995) Volatile anesthetics and glutamate activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochem. Pharmacol.* 49: 809-817.
- Massieu L., Morales-Villagrán A., Tapia R. (1995) Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 64: 2262-2272.

- Massieu L., Tapia R. (1997) Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats *in vivo*. *J. Neurochem.* 69: 1151-1160.
- Massieu L. (1999) Muerte por excitotoxicidad. En *Enfermedades Neurodegenerativas: Mecanismos Celulares y Moleculares* (Pasantes H., Arias C., Massieu L., Zentella A. y Tapia R.), Fondo de Cultura Económica, México D.F., pp 64-80.
- Mathern G. W., Babb T. L., Armstrong D. L. (1998) Hippocampal Sclerosis. En *Epilepsy: A Comprehensive Textbook* (Engel Jr. y Pedley T. A., Eds.) Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 133-155.
- Mayadevi M., Praseeda M., Kumar K. S., Omkumar R. V. (2002) Sequence determinants on the NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor responsible for specificity of phosphorylation by CaMKII. *Biochem. Biophys. Acta* 1598: 40-45.
- Morales-Villagrán A., Tapia R. (1996) Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum *in vivo*. *Neurochem. Int.* 28: 35-40.
- Nakanishi S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597-603.
- Nakanishi S. (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation and plasticity. *Neuron* 13: 1031-1037.
- Nairn A., Shenolikar S. (1992) The role of protein phosphatases in synaptic transmission, plasticity and neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 296-301.
- Nestler E. J., Greengard P. (1999) Serine and Threonine Phosphorylation. En *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects.* (Siegel G. J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S. K. Y Uhler M. D., Eds.) Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 471-495.
- Nijholt I., Blank T., Liu A., Kugler H., Spiess J. (2000) Modulation of hypothalamic NMDA receptor function by cyclic AMP-dependent protein kinase and phosphatases. *J. Neurochem.* 75: 749-754.
- Nishikawa K., MacIver M. (2000) Membrane and synaptic action of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and inhibitory interneurons. *J. Neurosci.* 20: 5915-5923.
- Obrenovitch T., Urenjak J. (1997) Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog. Neurobiol.* 51: 39-87.
- Paxinos G., Watson C. (1982) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.

- Peña F., Tapia R. (1999) Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J. Neurochem.* 72: 2006-2014.
- Peña F., Tapia R. (2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus *in vivo*: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience.* 101: 547-561.
- Perouansky M., Kirson E., Yaari Y. (1998) Mechanism of action of volatile anesthetics: effects of halothane on glutamate receptors *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 100-101: 65-69.
- Raymond L., Blackstone C., Huganir R. (1993) Phosphorylation of amino acid neurotransmitter receptors in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 16: 147-153.
- Reynolds I. J. (1998) Intracellular calcium and magnesium: critical determinants of excitotoxicity? *Prog. Brain Res.* 116: 225-243.
- Rozza A., Masoero E., Favalli L., Lanza E., Govoni S., Rizzo V., Montalbetti L. (2000) Influence of different anesthetics on extracellular amino acids in rat brain. *J. Neurosci. Meth.* 101:165-169.
- Rubio F. (1997) Aspectos generales y clasificación de la epilepsia. En *Epilepsia: Aspectos Neurobiológicos, Médicos y Sociales*. (Feria A., Martínez de Muñoz D. y Rubio F., Eds) Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México, D.F., pp 1-24.
- Sacher M. G., Athlan E.S., Mushynski W. E. (1993) Okadaic acid induces the rapid and reversible disruption of the neurofilament network in rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 524-530.
- Salazar P., Montiel T., Brilowsky S., Tapia R. (1994) Decrease of glutamate decarboxylase after *in vivo* cortical infusion of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Neurochem. Int.* 24: 363-368.
- Sánchez M., Álvarez-Tallada V. y Ávila J. (2001) The microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases. *Taupathies. Rev. Neurol.* 33: 169-177.
- Scheyner R.D. (1998) Involvement of glutamate in human epileptic activities. *Prog. Brain Res.* 116: 359-369.
- Schulman H. (1995) Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 375-381.
- Schwartz J. H. (2000) Neurotransmitters. En *Principles of Neural Science* (4<sup>th</sup> Ed.) (Kandel E. R, Schwartz J. H. Y Jessel T. M., Eds.), McGraw-Hill, New York, pp 280-297.

- Sim A. T. R., Lloyd H. G. E., Jarvie P. E., Morrisom M., Rostas J. A. P., Dunkley P. R. (1993) Synaptosomal amino acid release: effect of inhibiting protein phosphatases with okadaic acid. *Neurosci. Lett.* 160: 181-184.
- Soderling T. (2000) CaM-Kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 375-380.
- Tapia R., Medina-Ceja L., Peña F. (1999) On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem. Int.* 34:23-31.
- Tapia R., Peña F., Arias C. (1999) Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *Neurochem. Res.* 24: 1423-1430.
- Turner T. J. (1998) Calcium channels coupled to glutamate release. *Prog. Brain Res.* 116: 3-14.
- Vickroy T. W., Malphurus W. L., Carriger M. L. (1995) Regulation of stimulus-dependent hippocampal acetylcholine release by okadaic acid-sensitive phosphoprotein phosphatases. *Neurosci. Lett.* 191: 200-204.
- Wakasugi M., Hirota K., Roth S., Ito Y. (1999) The effects of general anesthetics on excitatory and inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus in vitro. *Anesth. Analg.* 88: 676-680.
- Wang L., Orser B., Brautigam D., MacDonald J. (1994) Regulation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons by protein phosphatases 1 and 2A. *Nature* 369:230-232.
- Wentholt R. J., Roche K.W. (1998) The organization and regulation of non-NMDA receptors in neurons. *Prog. Brain Res.* 116: 133-152.
- Winder D., Sweatt D. (2001) Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nature Rev. Neurosci.* 2: 461-474.
- Zimmermann H. (1993) Second messenger cascades. En *Synaptic Transmission Cellular and Molecular Basis*. Thieme Verlag/Oxford University Press, New York, pp 94-104.