



00377
7

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN
POR EXCITOTOXICIDAD EN LA MÉDULA
ESPINAL *IN VIVO***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. JUAN CARLOS CORONA CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS: **DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA**

MÉXICO, D.F.



NOVIEMBRE, 2003

COORDINACIÓN

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

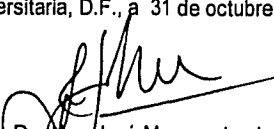
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de octubre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Corona Castillo Juan Carlos, con número de cuenta 501048563, con la tesis titulada: "Mecanismos de neurodegeneración por excitotoxicidad en la médula espinal in vivo", bajo la dirección del(a) Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia.

Presidente:	Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Vocal:	Dr. Julio Morán Andrade
Secretario:	Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia
Suplente:	Dra. Clorinda Arias Álvarez
Suplente:	Dr. Miguel Morales Mendoza

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de octubre de 2003.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

73

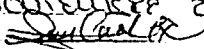
Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Ricardo Tapia y con el apoyo de la beca del CONACYT (167209), Proyecto Milenio CONACYT (W8072-35806N), DGAPA, UNAM (IN206100)

Miembros del Comité Tutorial:

Dra. Clorinda Arias Álvarez

Dr. Federico Bermúdez Rattóni

Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia.

AUTORIZO a la Dirección General de Publicaciones de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo académico.
Firma: Juan Carlos Covarrubias Castillo
Fecha: 11 NOV 2003
UNAM: 

C

Dedicatorias

A mi madre Carmen Castillo,
por todo su apoyo y cariño
que siempre me han dado
fuerzas para seguir adelante.
¡Gracias por todo mal!

A Dely por todo su amor,
confianza y sobre todo, por
su paciencia.

A mis hermanos, Gustavo,
Emilio, Angel, Isabel, César,
por que han estado conmigo
siempre que los necesito.

Investigar es ver lo que todo el mundo ha
visto, y pensar lo que nadie más ha
pensado.

Albert Szent-Györgi.

Agradecimientos

Al Dr. Ricardo Tapia por la confianza que tuvo en mí para el desarrollo de este proyecto y por todas sus enseñanzas.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Clorinda Arias y Dr. Federico Bermúdez. Por sus consejos y orientaciones.

A los miembros del jurado por sus sugerencias y comentarios.

A los amigos del laboratorio: Miguel, Fernando, Xochitl, Marina, Paty, Ivan, Bety, Nadia, Gaby Vera, Gaby Mora, Luis y Claudio, por todo el tiempo que hemos convivido.

A mis amigos de Puebla: Ricardo y Sandra por todas las pláticas que tuvimos antes y después de llegar a México y por los grandes momentos que pasamos juntos en esta ciudad.

A todos los amigos que están en el laboratorio de la Dra. Massieu, con los que he compartido momentos agradables.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
Receptores al glutamato.....	8
Transportadores.....	11
Excitotoxicidad.....	12
Glutamato y las enfermedades neurodegenerativas.....	14
II. ANTECEDENTES.....	15
Médula espinal.....	15
Médula espinal y glutamato.....	19
Receptores de glutamato en la médula espinal.....	20
Esclerosis lateral amiotrófica.....	21
Mutaciones en la SOD1.....	23
Hipótesis de excitotoxicidad por el glutamato en la ALS.....	25
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
IV. HIPÓTESIS.....	28
V. OBJETIVOS.....	28
VI. METODOLOGÍA.....	30
Cirugía y microdiálisis.....	30

F

Drogas.....	31
Observación conductual.....	32
Evaluación histológica.....	32
Inmunohistoquímica.....	33
Análisis de aminoácidos.....	34
Análisis estadístico.....	34
VII. RESULTADOS.....	35
Control.....	35
Despolarización por alto potasio.....	35
PDC.....	37
4-AP.....	41
Agonistas de los receptores de glutamato.....	45
VIII. DISCUSIÓN.....	55
Inhibición del transporte de glutamato.....	56
Aumento de la liberación de glutamato.....	58
Sobreactivación de los receptores a glutamato y neurodegeneración.....	59
IX. CONCLUSIONES.....	64
X. REFERENCIAS.....	65

G

RESUMEN

La neurodegeneración observada en varios tipos de enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica, han sido relacionada con un incremento en la neurotransmisión glutamatérgica. Sin embargo, varios experimentos *in vivo* han demostrado que un aumento en los niveles extracelulares de glutamato no necesariamente induce daño neuronal. El objetivo de esta tesis es estudiar si existe una correlación entre el incremento en la concentración extracelular de glutamato y el daño a las motoneuronas en la médula espinal de la rata *in vivo*, así como comparar la vulnerabilidad de las motoneuronas espinales a la sobreactivación de los receptores al glutamato por distintos agonistas mediante la combinación de técnicas de microdiálisis en la médula espinal, histología e inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que el incremento en la concentración extracelular de glutamato causado por el inhibidor del transportador, el ácido L-*trans*-2,4-pirrolidindicarboxílico (PDC), no produce alteraciones motoras ni daño a las motoneuronas, probablemente porque el glutamato extracelular acumulado no llega a activar sus receptores.

Al utilizar drogas que aumentan la liberación de glutamato, como la 4-aminopiridina (4-AP), se observó un aumento transitorio en la concentración extracelular de glutamato y aunque este incremento se acompañó de alteraciones motoras manifestadas por fuertes contracciones de la pata ipsilateral, no fue suficiente para causar neurodegeneración de las motoneuronas espinales. Esto sugiere que el glutamato liberado por la acción de la 4-AP aumenta la excitabilidad de las motoneuronas, pero no lo suficiente para producir excitotoxicidad.

La administración de N-metil-D-aspartato (NMDA) y de kainato no produjo alteraciones motoras ni daño a las motoneuronas. Esto indica que la activación de los receptores tipo NMDA y tipo kainato no generan

excitotoxicidad en las motoneuronas espinales, debido probablemente a que este tipo de receptores no son muy abundantes en las astas ventrales. En contraste, la administración de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA), produjo alteraciones motoras, parálisis y una severa pérdida de las motoneuronas en la médula espinal. Esto sugiere que las motoneuronas sí son altamente vulnerables a la excitotoxicidad por la sobreactivación de los receptores AMPA, lo cual fue confirmado por el hallazgo de que el antagonista de los receptores AMPA, 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo [f] quinoxalina-7-sulfonamida sal disodio (NBQX), evitó totalmente los cambios conductuales, la parálisis y la neurodegeneración de las motoneuronas que produjo el AMPA.

ABSTRACT

The neurodegeneration observed in various types of neurodegenerative diseases, as the amyotrophic lateral sclerosis, has been related with an increment in glutamatergic neurotransmission. Nevertheless, some experiments *in vivo* have shown that an increase in the extracellular levels of glutamate does not necessarily induce neuronal damage. The aim of this thesis is to study the possible correlation between the increment in the extracellular concentration of glutamate and the damage of the motor neurons in the spinal cord of rats *in vivo*, as well as to compare the vulnerability of the spinal motor neurons to the overactivation of glutamate receptors by different agonists. For this purpose we used microdialysis in the spinal cord, histology and immunohistochemistry. The results show that an increment in the extracellular concentration of glutamate induced by the transporter inhibitor, L-trans-pirrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC), does not produce motor alterations neither damage to the motor neurons, probably because the extracellular glutamate accumulated does not reach its receptors. Drugs that induce the release of glutamate, as 4-aminopyridine (4-AP), induced a transitory increase in the extracellular concentration of glutamate and motor alterations manifested by strong contractions of the ipsilateral leg. However no neurodegeneration of the spinal motor neurons was observed, suggesting that the release of glutamate by the action of the 4-AP augmented the excitability of the motor neurons, but not enough to produce excitotoxicity. The administration of N-metil-D-aspartate (NMDA) and kainate did not produce motor alterations neither damage to the motor neurons. This indicates that the NMDA or kainate type receptors do not generate excitotoxicity in the spinal motor neurons, probably because they are not abundant in the ventral horns. In contrast, the administration of α -amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA), produced paralysis and a severe loss of the motor neurons in the spinal cord. This

suggests that the motor neurons are highly vulnerable to the excitotoxicity produced by overactivation of AMPA receptors, which was confirmed by the finding that the antagonist of AMPA receptors, the 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo [f] quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt (NBQX), totally prevented the behavioral changes, the paralysis and the neurodegeneration of the motor neurons produced by AMPA.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP	4-aminopiridina
ALS	esclerosis lateral amiotrófica
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
ChAT	colina acetiltransferasa
EAAC1	transportador de glutamato identificado en conejo
EAAT	transportador de aminoácidos excitadores
GLAST	transportador de glutamato identificado en rata
GLT1	transportador de glutamato identificado en rata
NBQX	2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo [f] quinoxalina-7-sulfonamida sal disodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
PDC	ácido L- <i>trans</i> -2,4-pirrolidindicarboxílico
SNC	sistema nervioso central
SOD1	superóxido dismutasa 1

I. INTRODUCCIÓN

El glutamato ha sido considerado el principal mediador de las señales excitatorias en el sistema nervioso central (SNC) incluyendo la médula espinal desde la década de los sesenta, como quedó demostrado por Curtis y Watkins (1960). Sin embargo no fue hasta finales de la década siguiente que se reconoció ampliamente que el glutamato está involucrado en muchos aspectos de la función cerebral normal, como la cognición, la memoria, el aprendizaje, el desarrollo del SNC, la migración celular, la diferenciación y la muerte neuronal.

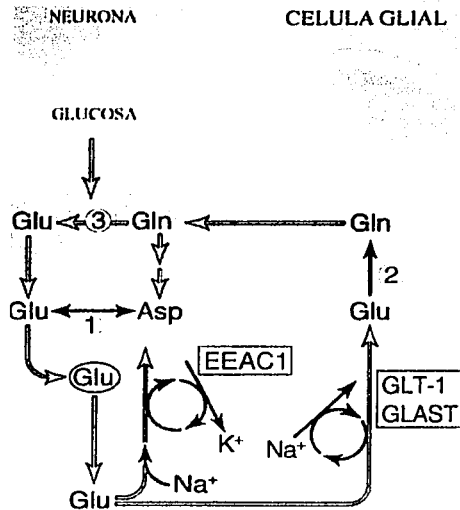
En las sinapsis glutamatérgicas, el glutamato es liberado de terminales presinápticas cuando, al llegar un potencial de acción se despolariza la membrana, lo que causa la apertura de canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje. La entrada de calcio desencadena la fusión de las vesículas sinápticas que almacenan al glutamato en concentraciones tan altas como 100 mM, con la membrana presináptica produciendo la liberación de este aminoácido por exocitosis.

Una vez en el espacio sináptico las moléculas de glutamato difunden a una distancia de entre 20-40 nm hasta unirse a sus receptores específicos localizados en la membrana postsináptica y activarlos.

Una vez que el glutamato activa a sus receptores debe ser eliminado del espacio sináptico. De los tres mecanismos conocidos de eliminación de neurotransmisores: difusión, degradación enzimática y recaptura, la recaptura parece ser el mecanismo más importante en la remoción del glutamato y parece tener un doble propósito: por un lado termina con la acción sináptica del glutamato y por el otro permite su recuperación para que esta molécula pueda ser eventualmente reutilizada. La recaptura del glutamato al interior de las células se lleva a cabo por proteínas específicas llamadas transportadores, las cuales utilizan los gradientes

iónicos establecidos en la membrana para transportar al glutamato desde el espacio sináptico hacia el interior de las neuronas y las células gliales.

El glutamato es un aminoácido no esencial que no cruza la barrera hematoencefálica por lo que tiene que ser sintetizado en el SNC a partir de la glucosa y una amplia variedad de otros precursores. Las enzimas del metabolismo del glutamato se han localizado tanto en las neuronas como en las células gliales.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Metabolismo de glutamato en estructuras sinápticas. La conversión de glutamina (Gln) a glutamato (Glu) involucra la acción enzimática de la glutaminasa ③ dentro del compartimiento mitocondrial. La formación de glutamato también ocurre por un proceso de transaminación ①. El glutamato sintetizado nuevamente es almacenado en altas concentraciones en las vesículas sinápticas. Después de ser liberado el glutamato al espacio sináptico, es eliminado por los transportadores gliales (GLT-1 y GLAST) en donde es convertido a glutamina ② por acción de la glutamina sintasa. La glutamina luego es regresada a la terminal nerviosa. Alternativamente, algunas terminales nerviosas glutamatérgicas tienen transportadores (EAAC1). (Dingledine y McBain, 1999)

El glutamato es sintetizado y almacenado dentro de las terminales sinápticas. La síntesis del glutamato involucra dos vías principales: 1) la conversión de glutamina a glutamato, mediante la acción enzimática de

la glutaminasa y 2) la transaminación, a partir del α -cetoglutarato y otros aminoácidos como la alanina o el ácido aspártico (Fig. 1).

El glutamato recién sintetizado es almacenado en las vesículas sinápticas por un transportador específico. Después de que el glutamato es liberado de las terminales nerviosas al espacio sináptico, es tomado por un sistema de transportadores de alta afinidad que se encuentran en las células gliales en donde es convertido a glutamina por la glutamina sintasa. La glutamina posteriormente es regresada a la terminal sináptica donde participa en la síntesis de glutamato al ser hidrolizado por la glutaminasa. (Dingledine y McBain, 1999; Broman et al., 2000).

Receptores al glutamato

Con los avances en técnicas de biología molecular se han clonado y caracterizado varios subtipos de receptores a glutamato (Hollman y Heinemann, 1994). Se han descrito cuatro tipos principales de receptores a glutamato, tres del tipo ionotrópico los cuales se encuentran acoplados a canales iónicos y uno metabotrópico, que transduce la señal por activación de procesos enzimáticos asociados a proteínas G. Estos receptores difieren en su estructura, función, propiedades electrofisiológicas y farmacológicas. Los receptores ionotrópicos se subdividen en dos familias, los que reconocen al N-metil-D-aspartato (tipo NMDA) y los tipo no-NMDA, que reconocen al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) y al kainato. Los receptores tipo NMDA y no-NMDA constituyen canales iónicos en la membrana plasmática y se encuentran localizados postsinápticamente (Fig. 2). El canal iónico del receptor NMDA es permeable al Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y su apertura depende de voltaje, ya que el Mg^{2+} que normalmente bloquea el poro del canal es expulsado al despolarizarse la membrana dejando el canal susceptible a abrirse (Nakanishi, 1992). La regulación de la apertura del canal NMDA es

compleja ya que además del sitio de reconocimiento para el glutamato, el receptor es modulado por glicina, que es su co-agonista esencial, y tiene además sitios para moduladores positivos como las poliaminas y otros para Mg^{2+} , Zn^{2+} , protones y agentes reactivos redox. Todos los receptores ionotrópicos tienen estructuras hetero-oligoméricas y un número de diferentes subunidades que ya han sido clonadas y caracterizadas (Hollmán y Heinemann, 1994).

Los receptores tipo NMDA tienen una subunidad NR1, que puede tener hasta ocho variantes debido al empalme alternativo de su ARNm y cuatro subunidades NR2, que en la rata son designadas como A, B, C y D. No se conoce con certeza la estequiometría o composición nativa de las subunidades del receptor NMDA. Los canales pueden ser tetrámeros o pentámeros y la hipótesis más aceptada es que los canales nativos están siempre ensamblados por una subunidad NR1 y una o más tipos NR2 (Hollman y Heinemann, 1994).

Los receptores tipo AMPA son independientes del voltaje, (Fig. 2) son permeables al Na^+ y K^+ y en general no son permeables al Ca^{2+} (Pellegrini-Giampietro et al., 1997). Están formados por cuatro diferentes subunidades, designadas como GluR1 a GluR4 (con dos variantes por empalme alternativo "flip y flop"), formando un ensamblaje de subunidades pentaméricas. La permeabilidad catiónica de los receptores tipo AMPA está determinada por la selección de subunidades, ya que canales que carecen de la subunidad GluR2 sí son permeables al Ca^{2+} (Hollmann, et al., 1991; Hollman y Heinemann, 1994; Bettler y Mülle, 1995).

Los receptores tipo kainato están ensamblados en homo o heterodímeros de las subunidades GluR5, GluR6, GluR7, los cuales tienen una baja afinidad por el kainato, y las subunidades KA1 y KA2 que tienen una alta afinidad. Todas estas subunidades tienen la estructura básica de los receptores AMPA/kainato (Bettler y Mülle, 1995).

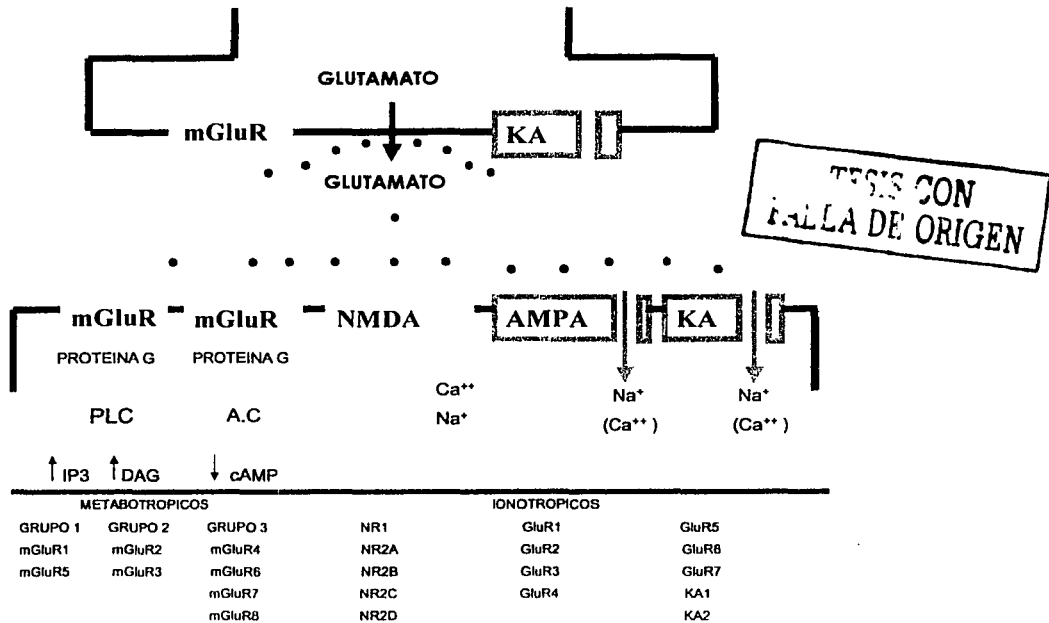


Figura 2. Familia de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato. Cada una de las dos principales divisiones de receptores de glutamato comprende tres grupos o clases de receptores funcionales. Están formados por numerosas subunidades individuales, cada una codificada por un diferente gene. PLC, Fosfolipasa C. A.C, Adenilato ciclasa. IP3, inositol (1,4,5) trifosfato. DAG, Diacilglicerol. cAMP, Adenosín monofosfato cíclico.

Los receptores metabotrópicos están presentes tanto en la membrana presináptica como en la postsináptica y no forman canales iónicos. Están compuestos por 8 subunidades, mGluR1-8. Dentro de la familia de receptores metabotrópicos hay variaciones en su secuencia. Se han clasificado en tres clases o grupos (I-III) (Nakanishi, 1994; Pin y Duvoisin, 1995). Dentro de cada clase la identidad en la secuencia de aminoácidos es del 70% y entre clases es de un 40% a 45%. Las subunidades mGluR1 y mGluR5 pertenecen a la clase I, mGluR2 y mGluR3 a la clase II y mGluR4, 6 y 8 a la clase III (Fig. 2). Cada clase de receptor activa diferentes mecanismos de transducción. La clase I activa la fosfolipasa C,

produciendo fosfoinosítidos y la consecuente liberación de Ca^{2+} de los almacenamientos intracelulares y diacilglicerol que a su vez activa a la proteína cinasa C (PKC). Las clases II y III están negativamente acoplados a la adenilato ciclasa y reducen la cantidad intracelular de AMPc (Hollmann y Heinemann, 1994; Lipton y Rosenberg, 1994).

Transportadores

Como se mencionó anteriormente, el glutamato es removido del espacio sináptico por un sistema de recaptura que consiste en una familia de transportadores de glutamato de alta afinidad dependientes de sodio que están localizados en las membranas plasmáticas tanto de astrocitos como de neuronas. Se han clasificado cinco diferentes isoformas de acarreadores de glutamato (o transportadores de aminoácidos excitadores): GLAST identificado en rata (EAAT1), GLT1 identificado en rata (EAAT2), EAAC1 identificado en conejo (EAAT3), EAAT4 y EAAT5 (Kanai y Hediger, 1992; Pines et al., 1992; Fairman et al., 1995; Arriza et al., 1997). Los transportadores muestran una secuencia de identidad de 30 a 50 % en sus aminoácidos y patrones casi idénticos de hidrofobicidad, sugiriendo que sus propiedades funcionales están basadas en rasgos estructurales similares. Los transportadores de rata y conejo son 90% idénticos a los de los humanos. La recaptura celular del glutamato, depende de los gradientes electroquímicos a través de la membrana celular (Danbolt, 2000, Trotti et al., 1998). El sodio es requerido para la unión al glutamato mientras que el potasio es requerido para el transporte neto. Los transportadores utilizan los gradientes del Na^+ , K^+ , H^+ y OH^- a través de la membrana plasmática como fuerza electromotriz para el proceso de transporte, que también está acompañado por cambios en el voltaje y en el pH (Bouvier et al., 1992). Los transportadores EAAC1 y GLT1 presentan la siguiente estequiometría: 1 glutamato es tomado junto con 3 Na^+ y 1 H^+ y son intercambiados por 1 K^+ .

Por otra parte, los transportadores también funcionan como canales de Cl⁻: el flujo de Cl⁻ es activado por glutamato pero no está termodinámicamente acoplado al transporte (Fairman et al., 1995). El transportador de glutamato GLT1 es el más abundante y representa el 1% del total de proteína de membrana en el cerebro, con altas concentraciones en el hipocampo y la corteza cerebral. El GLT1 ha sido detectado exclusivamente en células astrogliales en el SNC adulto normal, con una alta concentración en el hipocampo, corteza cerebral y médula espinal (Rothstein et al., 1994). Al igual que el GLT1, el GLAST se expresa en astrocitos y en todo el SNC a diferentes concentraciones. GLAST es más abundante en el cerebelo y en el oído interno. El GLT1 y el GLAST son expresados por igual en astrocitos (Danbolt, 2000).

El EACC1 se encuentra principalmente en neuronas, y se expresa predominantemente en hipocampo, cerebelo y corteza. El EAAT4 se ha detectado únicamente en un tipo celular del SNC, que son las células de Purkinje de la capa molecular cerebelar. Por último el EAAT5 parece ser una proteína encontrada exclusivamente en la retina (Trotti et al., 1998).

Excitotoxicidad

Los primeros estudios de las propiedades neurotóxicas del glutamato fueron hechos por Lucas y Newhouse (1957), quienes demostraron que la administración sistémica de glutamato en ratones infantiles causaba degeneración retinal. Olney demostró que la administración oral de glutamato a roedores infantiles y primates resultaba en degeneración neuronal (Olney and Ho, 1970; Olney et al., 1972). Otros trabajos demostraron una correlación directa entre las propiedades neuroexcitatorias y neurotóxicas del glutamato y asociaron la neurotoxicidad inducida por el glutamato a la sobreactivación de sus receptores (Olney, 1969). Esto condujo al concepto de excitotoxicidad

debido a la sobreactivación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato (Bittigau y Ikonomidou, 1997).

Sabemos que una excesiva activación de los receptores de glutamato es responsable de hiperexcitación, daño y muerte neuronal

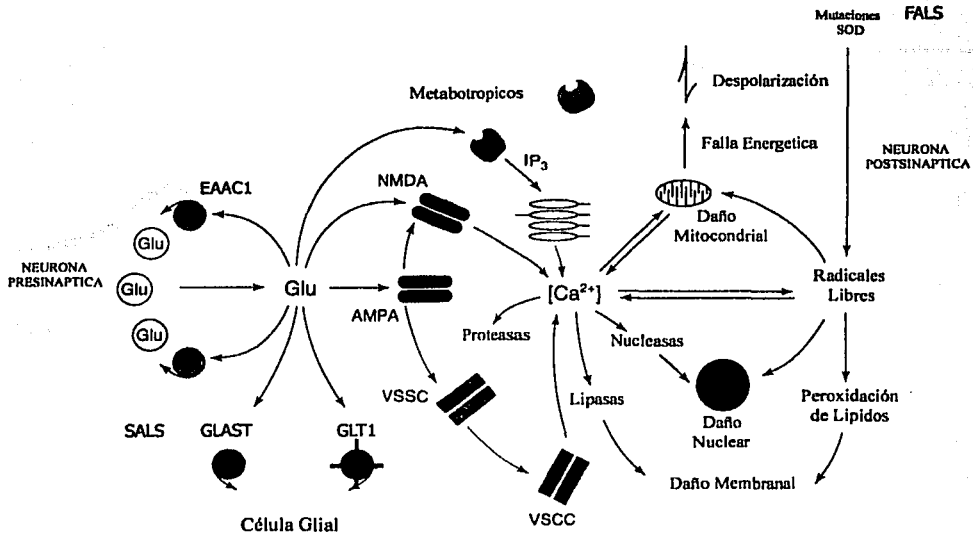


Figura 3. Representación esquemática de los sistemas bioquímicos involucrados en la excitotoxicidad neuronal. Receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos. EAAC1, GLAST y GLT1 son los tres transportadores de glutamato. IP₃, inositol (1,4,5) trifosfato. SOD, superóxido dismutasa. VSCC, canales de calcio sensibles al voltaje. SALS, esclerosis lateral amiotrófica esporádica. FALS, esclerosis lateral amiotrófica familiar.

(Olney, 1969; Lipton y Rosenberg, 1994; Tapia, 1998; Tapia et al., 1999) que se manifiesta inicialmente en forma aguda por hinchamiento celular provocado por la penetración de diferentes iones en el interior de la célula (Fig. 3). Esos cambios iónicos se acompañan de la entrada de agua y por consiguiente del hinchamiento de las neuronas. Más tarde, el daño se desencadena por la entrada masiva de Ca^{2+} a la neurona con el consecuente aumento en la concentración citoplásmica, más allá de la

capacidad de amortiguamiento intracelular del catión. Esto produce daño y muerte neuronal debido a la activación de enzimas tales como las proteasas, lipasas, endonucleasas y fosfolipasas, lo que lleva a la desintegración de proteínas y fosfolípidos de la membrana y la generación de radicales libres, así como alteraciones del metabolismo energético mitocondrial (Coyle y Puttfarcken, 1993; Tapia, 1998; Tapia et al., 1999). Esto último, disminuye la capacidad de producir ATP, por lo cual decrece la actividad de la bomba de sodio-potasio (ATPasa Na-K). El resultado es que disminuye la extrusión de Na^+ , alterándose el gradiente de concentración de este catión, despolarizándose la membrana neuronal y facilitándose la respuesta de los receptores tipo NMDA (Choi, 1988; Olanow, 1993; Louvel et al., 1997).

En estudios de microdiálisis *in vivo* se ha observado que la concentración extracelular de glutamato y aspartato aumenta durante la isquemia cerebral y la hipoglicemia y se ha demostrado que los antagonistas de los receptores tipo NMDA y no-NMDA protegen contra el daño neuronal en estas condiciones (Choi, 1988; Meldrum, 1991; Simon et al., 1984; Tapia et al., 1999). Sin embargo, cuando el glutamato extracelular aumenta por inhibición de su transporte, no se produce neurodegeneración ni en el hipocampo ni en el estriado de rata (Massieu et al., 1995; Massieu y Tapia, 1997), lo que sugiere que se necesitan otras condiciones para sus efectos tóxicos.

Glutamato y las enfermedades neurodegenerativas

Un gran número de enfermedades neurológicas, colectivamente referidas como enfermedades neurodegenerativas, comparten características patológicas de una gradual y selectiva pérdida neuronal. Parece atractivo considerar que la neurotoxicidad endógena del glutamato esté

involucrada en algunas de esas enfermedades, pero en muchos casos la evidencia no es contundente.

En los últimos años, se ha incrementado el interés en estudiar los mecanismos responsables de la muerte celular. Estos mecanismos son muy importantes en el SNC ya que la degeneración neuronal es un fenómeno que no solamente ocurre durante el envejecimiento sino también durante padecimientos agudos y crónicos tales como accidentes vasculares cerebrales (isquemia/anoxia), hipoglucemia, epilepsia y las enfermedades de Huntington, de Parkinson, de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS por sus siglas en inglés).

Las causas de la muerte neuronal en este tipo de enfermedades se desconocen, pero se han relacionado tres factores que al parecer interactúan entre sí: la sobreactivación de los receptores a aminoácidos excitadores (glutamato principalmente), un incremento en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} y la generación de especies reactivas de oxígeno o radicales libres. Estos tres factores se conjugan, de tal modo que la alteración en alguno de ellos puede generar cambios en otro y con esto desatarse una reacción en cadena, resultando con ello daño y muerte neuronal por destrucción tanto de las membranas plasmáticas como de los organelos intracelulares (Coyle y Puttfarcken, 1993; Tapia, 1998; Tapia et al., 1999).

II. ANTECEDENTES

Médula espinal

La médula espinal es una masa cilíndrica de tejido nervioso que ocupa el conducto vertebral, en el humano tiene 40 ó 45 cm de longitud y se extiende desde el agujero occipital, donde se continúa con el bulbo hasta la región lumbar. Está protegida por membranas llamadas meninges:

duramadre, aracnoides, piamadre y el líquido cefalorraquídeo (Fig. 4B). La duramadre es una membrana fuerte, densa y fibrosa que envuelve la médula espinal y todo el SNC. La aracnoides es una membrana delgada e impermeable que recubre totalmente la médula espinal, se ubica entre la piamadre, más profunda, y la duramadre, más superficial. Entre la piamadre y la aracnoides existe un espacio bastante amplio: el espacio subaracnoideo. Su importancia radica en que contiene el líquido cefalorraquídeo o cerebroespinal. El espacio subaracnoideo es atravesado por finas trabéculas aracnoideas que se unen a la piamadre. Como la aracnoides se continúa con las raíces de los nervios espinales hasta su salida por el agujero intervertebral, se forman unas pequeñas extensiones laterales del espacio subaracnoideo. La piamadre es una capa única y delgada de carácter vascular que se adosa íntimamente a la médula espinal. Por las caras laterales de la médula, a igual distancia entre las raíces dorsales y ventrales de los nervios espinales, unas 22 extensiones membranosas puntiformes de la piamadre van a insertarse firmemente a la cara interna de la duramadre y de la aracnoides: son los ligamentos dentados. Ellos facilitan la suspensión de la médula espinal justo en medio del saco dural. (Guyton, 1994).

Desde la región de la segunda vértebra lumbar, donde termina la médula, hasta el cóxis, desciende un filamento delgado llamado "filum terminale" y las raíces de los nervios sacros y lumbares, forman un manojito de fibras que recibe el nombre de "cola de caballo".

De la médula salen 31 pares de nervios que le dan un aspecto segmentado: 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacrales y 1 coxígeo. La médula está compuesta por una sustancia gris formada por cuerpos neuronales y por la sustancia blanca formada por glia y fibras mielinizadas ascendentes y descendentes (Fig. 4A).

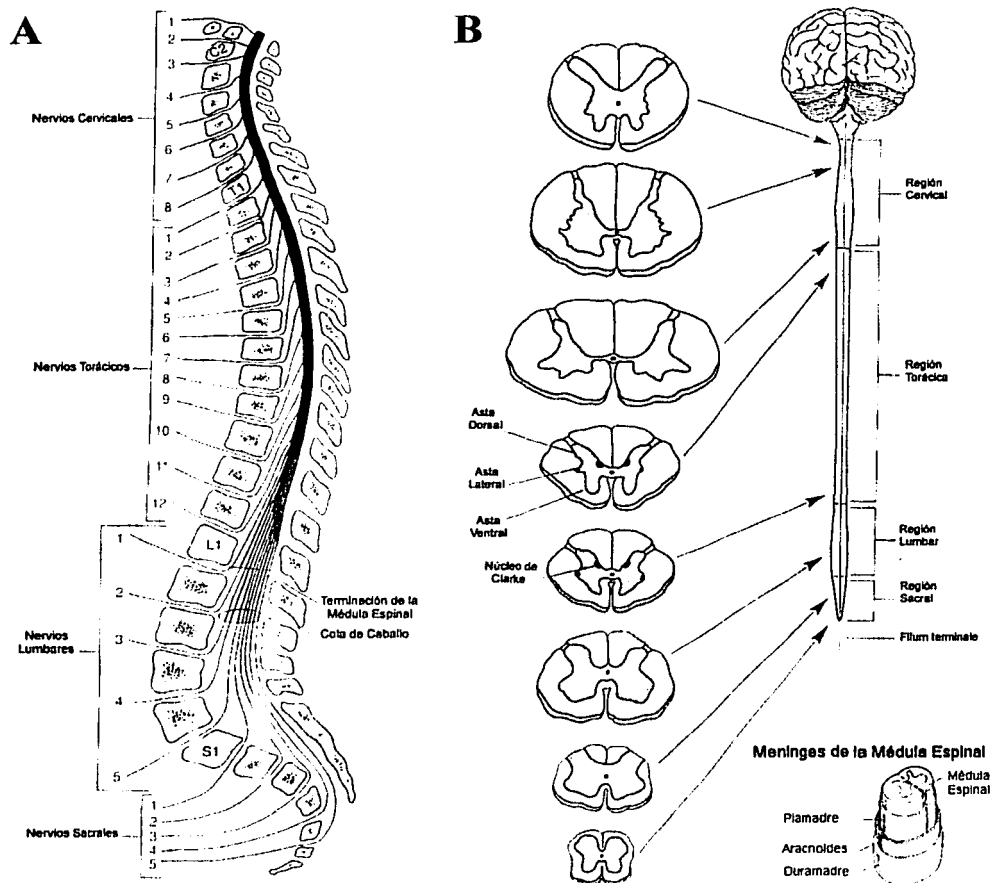


Figura 4. Organización de la médula espinal a diferentes niveles. En **A** se observan los nervios espinales individuales que están relacionados con las diferentes regiones de la médula espinal, hay 8 nervios espinales cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacrales y 1 coxígeo. En **B** vista dorsal del cerebro y la médula espinal, así como diferentes cortes que muestran las características morfológicas de la médula espinal y por último en el recuadro inferior se esquematizan las 3 meninges que recubren la médula espinal.

Las fibras ascendentes constituyen los haces ascendentes que son sensoriales y conducen los impulsos que reciben de la piel, vísceras, músculos y articulaciones a las distintas zonas cerebrales.

Las fibras descendentes constituyen los haces que son motores y conducen los impulsos que provienen de los centros superiores del cerebro

a otros que radican en la médula o bien a los músculos y las glándulas. La sustancia gris a cada lado de la médula tiene unos ensanchamientos llamados "astas": asta ventrales o anteriores, asta dorsales o posteriores y el asta lateral que se localizan entre las dorsales y las ventrales (Fig. 4B). Las astas dorsales contienen neuronas que controlan las señales sensitivas, las ventrales contienen las neuronas motoras que envían axones o fibras a través de los nervios espinales a los músculos esqueléticos para producir la contracción muscular.

En el asta lateral de la médula espinal se hallan los cuerpos celulares de las neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo y sus fibras atraviesan la raíz ventral de la médula espinal hasta el correspondiente nervio raquídeo (Nervio mixto que consta de una raíz ventral motora y una dorsal sensitiva). En el centro de la sustancia gris y a lo largo de ella hay un pequeño canal lleno de líquido cefalorraquídeo.

Otro aspecto anatómico importante de la médula es que hay interneuronas que sirven de conexión entre las fibras sensoriales y las motoras, lo que da origen a respuestas reflejas que no necesitan ser ordenadas por los centros cerebrales.

La médula espinal tiene dos ensanchamientos que son el cervical y el lumbar, cada uno está asociado con las raíces nerviosas que inervan las extremidades superiores e inferiores respectivamente.

Las motoneuronas están localizadas en cada segmento de las astas ventrales de la sustancia gris medular y en el humano pueden hallarse varios miles de ellas que son de 50 a 100 veces más grandes que la mayor parte de las otras neuronas, dan origen a las fibras nerviosas que abandonan la médula por las raíces ventrales e inervan las fibras musculares esqueléticas. Las motoneuronas son de dos tipos: las motoneuronas alfa que dan origen a grandes fibras nerviosas tipo A (alfa), que varían entre 10 y 20 μm de diámetro e inervan las grandes fibras

musculares esqueléticas y las motoneuronas gamma que están ubicadas junto con las motoneuronas alfa. Las motoneuronas gamma transmiten impulsos a través de fibras tipo A (gamma) de un diámetro promedio de 5 μm a fibras musculares especiales muy pequeñas, denominadas fibras intrafusales, que son parte del huso muscular.

Las interneuronas están presentes en todas las áreas de la sustancia gris medular, en las astas dorsales, en las astas ventrales y en las áreas intermedias entre estas dos. Son 30 veces más numerosas que las motoneuronas, son pequeñas y muy excitables, tienen numerosas interconexiones y muchas de ellas inervan a las motoneuronas ventrales.

La médula espinal también tiene un gran número de pequeñas interneuronas llamadas células de Renshaw localizadas en las astas ventrales en íntima asociación con las motoneuronas, estas son células inhibitorias (Guyton, 1994; Brodal, 1998).

Médula espinal y glutamato

Los cuerpos celulares de las motoneuronas superiores, están localizados en la capa V de la corteza motora primaria en el cerebro, y sus axones proyectan hacia la médula espinal y tallo cerebral, donde hacen contactos sinápticos con las motoneuronas inferiores. Las motoneuronas superiores proyectan sus axones hacia la médula espinal directamente a través de tracto corticoespinal.

Algunos estudios bioquímicos han apoyado que el glutamato sirve como neurotransmisor del tracto corticoespinal, como lo demuestra la presencia de altos niveles de glutamato en las terminales corticoespinales en el asta ventral (Broman et al., 2000). Recientemente se ha encontrado con estudios electrofisiológicos que la transmisión del tracto corticoespinal hacia las motoneuronas en la región cervical de la médula espinal es mediada principalmente por receptores de glutamato del tipo no-NMDA

(Hori et al., 2002). Por otro lado, también se ha propuesto que algunas neuronas intrínsecas en la médula espinal utilizan glutamato como neurotransmisor, ya que cuando se realizó la aplicación de antagonistas de los receptores NMDA y no-NMDA, se deprimió la respuesta de las neuronas en circuitos locales (Broman et al., 2000).

En la década de los cuarenta se demostró que las *la* aferentes primarias hacen contactos monosinápticos con las motoneuronas. Por lo tanto, desde que Curtis y Watkins en 1960 observaron los efectos excitatorios del glutamato en la médula espinal, una gran serie de estudios tanto farmacológicos, bioquímicos y fisiológicos han postulado el papel del glutamato, sustancia P y la encefalina como neurotransmisor de las aferentes primarias. Algunos datos importantes señalan que el bloqueo de la transmisión entre las terminales aferentes primarias y las neuronas del asta dorsal se produce con antagonistas de los receptores de glutamato.

De Biasi y Rustioni (1988), usando una técnica de inmunoro fueron los primeros en demostrar la presencia de glutamato en las terminales aferentes primarias. Ellos detectaron la presencia de glutamato en una gran proporción de las terminales del asta dorsal. La presencia de glutamato también ha sido examinada en selectas poblaciones de terminales aferentes primarias. Combinando la tinción intraaxonal con técnicas de inmunoro, se detectaron altos niveles de glutamato que probablemente se originan en las fibras *la* aferentes primarias (Maxwell et al., 1990). En conclusión, todo esto sugiere que el glutamato es el principal neurotransmisor en las terminales aferentes primarias.

Receptores de glutamato en la médula espinal

Estudios de hibridación *in situ* y de inmunohistoquímica han revelado distintos patrones de distribución de RNAm y de inmunoreactividad para los distintos tipos de receptores, tanto ionotrópicos, como metabotrópicos, en

la médula espinal de rata. A continuación se resume brevemente su distribución.

Receptores tipo NMDA: La expresión de RNAm de la subunidad NR1 en las astas ventrales de la médula espinal es muy alta y no hay expresión de RNAm de las subunidades NR2A, NR2B y NR2C, solamente hay una moderada expresión de la subunidad NR2D (Wisden et al, 2000; Petralia et al, 2000).

Receptores tipo AMPA: La expresión de RNAm de la subunidad GluR1 en las astas ventrales es muy baja, sin embargo, la expresión de RNAm de las subunidades GluR2, 3 y 4 son muy altas (Wisden et al, 2000; Petralia et al, 2000).

Receptores tipo Kainato: La expresión de RNAm de las subunidades de kainato, no es muy abundante en las astas ventrales, ya que solo hay una baja expresión de la subunidad GluR5 y una moderada expresión de la subunidad KA1, las otras subunidades no se expresan (Wisden et al, 2000; Petralia et al, 2000).

Receptores metabotrópicos: La expresión de RNAm de la subunidad mGluR1 en las astas ventrales es moderada y tiene una inmunoreactividad muy débil, no hay expresión de RNAm las subunidades mGluR2, mGluR3, mGluR5, mGluR6 y mGluR8, ni inmunoreactividad, mientras que para la subunidad mGluR4 hay una expresión de RNAm alta y no hay inmunoreactividad, por último la subunidad mGluR7 tiene una expresión de RNAm baja, pero no tiene inmunoreactividad (Shigemoto y Mizuno, 2000).

Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS), es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la pérdida progresiva y selectiva de las motoneuronas, principalmente de las porciones inferiores de la médula espinal y el tallo cerebral así como de las motoneuronas

superiores de la corteza cerebral. Esta degeneración causa una parálisis progresiva que comienza en las extremidades inferiores por pérdida de las motoneuronas produciendo una atrofia progresiva del músculo esquelético y puede llegar a los músculos de la mandíbula. Inicialmente fué descrita por el famoso neurobiólogo francés Jean-Martin Charcot en 1869. La ALS es ahora familiarmente conocida en Estados Unidos como enfermedad de Lou Gehrig en honor al gran beisbolista quien desarrolló la enfermedad en la década de los 30. La ALS también ha afectado a otros personajes, incluyendo al astrofísico nominado al premio Nobel Stephen Hawking, quien sufre de un tipo no usual de la enfermedad con una lenta progresión. Esta enfermedad no causa una disminución en la capacidad mental de los enfermos, a pesar de la parálisis completa y culmina con la muerte a causa de un paro respiratorio como consecuencia de la denervación de los músculos respiratorios. Es un padecimiento con una prevalencia de 2-3 casos por cada 100,000 habitantes. Este riesgo se incrementa en un orden de magnitud después de los 60 años. Generalmente es fatal, con una duración de aproximadamente 5 años (Gurney et al., 1998; Julien, 2001; Cleveland y Rothstein, 2002).

Se han descrito dos tipos de ALS, que tienen los mismos síntomas y patología. La primera es la esclerosis lateral amiotrófica familiar (FALS), con un 5-10% de los casos, que tiene un patrón de herencia autosómica dominante y un 20% de los casos familiares se han asociado con mutaciones en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Rosen et al., 1993). El segundo tipo es la esclerosis lateral amiotrófica esporádica (SALS) que tiene una mayor frecuencia (90-95%) y no se ha logrado identificar el factor que la produce.

La edad típica para el comienzo de la FALS es entre 50 y 60 años. Ambas formas presentan un progresivo debilitamiento, atrofia muscular que causa rigidez e interfieren con el caminar y el habla.

Se han postulado varias hipótesis de la posible generación de esta enfermedad: daño oxidativo debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno; toxicidad causada por una ganancia de función de la enzima SOD1 mutada, estrangulación axonal por la acumulación anormal de neurofilamentos y excitotoxicidad causada por la deficiencias en el transportador del glutamato.

Mutaciones en la SOD1.

La enzima SOD1 se expresa en casi todas las células del organismo y se encuentra tanto en células neuronales como no neuronales del SNC (Pardo et al., 1995). Es un homodímero de 153 aminoácidos y su principal función enzimática es la de catalizar la conversión del radical superóxido a peróxido de hidrógeno:



La catálisis depende de los iones $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$, presentes en el sitio activo de la enzima (Liochev y Fridovich., 2000). El radical superóxido es un intermediario muy reactivo formado por la reducción del O_2 en la cadena respiratoria y es un poderoso agente oxidante, por lo que si sus niveles no son controlados puede llevar a la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas. Por esta razón, cualquier cambio en la función enzimática de la SOD1 puede tener consecuencias devastadoras para el ambiente celular (Olanow, 1993; Coyle y Puttfarcken, 1993; Gurney et al., 1998; Kruman et al., 1999).

Desde que se descubrieron las mutaciones en la SOD1 asociados a la FALS, se han descrito alrededor de 90 mutaciones diferentes en el gene que codifica para esta enzima. Muchas de estas mutaciones resultan por la sustitución de un aminoácido (Cleveland y Rothstein, 2001). A partir de esto se han desarrollado ratones transgénicos con el gene humano

mutado, como el G93A (Gurney et al., 1994) que tiene cambiada una glicina por una alanina en posición 93, el G37R, el G85R (Bruijn et al., 1997) que retienen toda su actividad y uno que contiene una mutación en el gen murino G86R (Morrison y Morrison, 1999; Cleveland, 1999). También se ha desarrollado un ratón knockout de la SOD1 que, contrariamente a lo esperado no desarrolla la enfermedad de las motoneuronas (Reaume et al., 1996). Recientemente se han desarrollado dos ratas transgénicas que expresan dos diferentes mutaciones de la SOD1, G93A y H46R, que de igual forma desarrollan parálisis y selectiva pérdida de motoneuronas (Nagai et al., 2001; Howland et al., 2002).

La mayoría de estas mutaciones no se encuentran en el sitio activo de la enzima y no tienen una actividad de peroxidasa disminuida. Estos ratones y ratas son normales al nacer y desarrollan una disfunción motora a los 3 a 7 meses de edad, la cual progresa rápidamente con la disminución en la movilidad de los miembros posteriores, hasta la parálisis total y la muerte prematura (Gurney et al., 1994; Nagai et al., 2001; Howland et al., 2002). El desarrollo de la enfermedad parece estar relacionado con el número de copias del gen mutado que se introducen en los ratones y ratas, con la cantidad de SOD1 mutada que se expresa en los animales, de forma que los que expresan una mayor cantidad tienen un comienzo de la enfermedad más temprano que los que expresan una menor cantidad (Bruijn et al., 1997). Patológicamente, estos ratones y ratas transgénicos tienen degeneración de las motoneuronas de la médula espinal, con alteraciones en los componentes del citoesqueleto, astrocitosis, vacuolizaciones y algunos presentan inclusiones semejantes a cuerpos de Lewy. Estas alteraciones se asemejan mucho a las que se encuentran en los pacientes con ALS.

Entre los posibles mecanismos de daño celular producido por la SOD1 mutante está su capacidad para usar el peróxido de hidrógeno

como sustrato para generar radicales hidroxilo, que pueden dañar al DNA, proteínas y membranas lipídicas (Wiedau-Pazos et al., 1996). Se ha demostrado que en presencia de peróxido de hidrógeno la SOD1 mutada puede oxidar más a un atrapador de radicales ("spin trap") que la SOD1 normal (Yim et al., 1996). Esto sugiere que en lugar de perder su función como dismutasa como se pensó inicialmente, la SOD1 mutante adquiere una función de peroxidasa. Sin embargo es probable que el mecanismo de neurodegeneración involucre procesos independientes de esta actividad de la SOD1 mutada.

Hipótesis de excitotoxicidad por el glutamato en la ALS.

Diversos estudios han postulado la hipótesis excitotóxica de la SALS, debida a un incremento en la neurotransmisión glutamatérgica en la médula espinal como una posible causa de la enfermedad. Se encontró inicialmente que los niveles extracelulares de glutamato, tanto en plasma (Plaitakis, 1990) así como en líquido cefalorraquídeo (Rothstein et al., 1990) se encuentran aumentados en los pacientes con SALS. También hay evidencias de que en los ratones transgénicos G93A con la SOD1 mutada los niveles extracelulares de glutamato en la corteza motora se encuentran aumentados (Alexander et al., 2000).

Otros hallazgos muestran que la actividad del transportador glial de glutamato (EAAT2 o GLT1) tiene una menor actividad en la médula espinal, y corteza cerebral, en los pacientes con SALS (Rothstein et al., 1992, 1995). Esta deficiencia provocaría una disminución en la recaptura del glutamato del espacio sináptico lo cual generaría excitotoxicidad (Rothstein et al., 1992; 1995).

En apoyo a esta hipótesis, otros estudios demostraron que la inhibición farmacológica del transporte de glutamato en cultivos organótipos de médula espinal (Rothstein et al., 1993; Rothstein y Kuncl,

1995), así como el bloqueo de la expresión del transportador GLT1 con oligonucleótidos antisentido *in vivo* (Rothstein et al., 1996) causaron muerte selectiva de motoneuronas.

Se ha sugerido que el daño oxidativo causado por las mutaciones en la SOD1 puede ser otro mecanismo por el cual el transportador de glutamato pueda ser inactivado. Esta hipótesis se apoya en la observación de que las reacciones oxidativas causadas por peróxido de hidrógeno, catalizadas por las mutantes A4V y I113T de la SOD1, pero no por la silvestre (wild type) inactivaron al transportador de glutamato EAAT2 (Trotti et al., 1999, 2001). Otra posibilidad es que las propiedades tóxicas de los agregados de la SOD1 podrían estar provocando una disfunción astrocítica, con lo cual se estarían afectando los niveles del transportador EAAT2. Durante la progresión de la enfermedad en el ratón transgénico G85R, hay un incremento de inclusiones de la SOD1 en astrocitos, correlacionado con una disminución en el transportador EAAT2 (Bruijn et al., 1997).

Por otro lado, una creciente evidencia sugiere que los receptores tipo AMPA podrían estar participando en la muerte de las motoneuronas en la SALS (Rothstein, 1996). Las motoneuronas son más vulnerables a los agonistas de los receptores AMPA/kainato que otras neuronas espinales, tanto *in vivo* (Hugon et al., 1989), como en cultivos organotípicos y células disociadas de médula espinal (Rothstein et al., 1993; Rothstein y Kuncl 1995; Carriedo et al., 1996; Van Den Bosch y Robberech, 2000). Los mecanismos de la selectiva vulnerabilidad de las motoneuronas a la sobreactivación de los receptores AMPA no se conocen. En principio, las diferencias en la vulnerabilidad a agonistas de los receptores AMPA entre las motoneuronas y otras neuronas espinales podrían resultar de diferencias en la expresión del receptor AMPA y/o de diferencias en fenómenos que estarían modulando la entrada de Ca^{2+} . Se ha generado gran interés en la

posibilidad de que la vulnerabilidad selectiva de las motoneuronas puede resultar de la expresión predominante de receptores tipo AMPA que carezcan de la subunidad GluR2 en este tipo celular, los cuales como ya se mencionó, son altamente permeables al Ca^{2+} (Williams et al., 1997; Shaw et al., 1999; Shaw, 1999).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro laboratorio se han estudiado durante varios años los mecanismos de muerte neuronal en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas que se relacionan con la sobreactivación de los receptores del glutamato. Se han utilizado drogas que inhiben el transporte de glutamato, como el ácido L-*trans*-2,4-pirrolidindicarboxílico (PDC). Este compuesto induce un notable incremento de glutamato extracelular en el hipocampo y en el estriado, pero este aumento no causa degeneración en estas áreas (Massieu et al., 1995; Massieu y Tapia, 1997), o bien drogas que aumentan la liberación de glutamato, como la 4-aminopiridina (4-AP), la cual se ha demostrado que produce intensas convulsiones y neurodegeneración del hipocampo (Peña y Tapia, 1999; 2000)

IV. HIPÓTESIS

La posible neurodegeneración y la muerte de las motoneuronas que ocurre en la ALS se debe a un fenómeno de excitotoxicidad glutamatérgica, la cual puede ser ocasionada por la disminución del transporte del glutamato y/o por un aumento en su liberación, debido a que las motoneuronas espinales pueden ser más sensibles al aumento del glutamato extracelular, en comparación con las estructuras cerebrales.

V. OBJETIVOS

1. Conocer los posibles efectos excitotóxicos del glutamato endógeno extracelular sobre las motoneuronas en la médula espinal de la rata. Para ello se administró el PDC para inhibir el transporte de glutamato, y la 4-AP para estimular su liberación.

2. Comparar la vulnerabilidad de las motoneuronas espinales de la rata al daño producido por distintos tipos de agonistas de receptores al glutamato.
3. Conocer los posibles efectos protectores de antagonistas de los distintos tipos de receptores al glutamato en la médula espinal de la rata.
4. Caracterizar histológica e inmunohistoquímicamente el posible daño de las motoneuronas espinales de la rata por diferentes estímulos excitotóxicos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. METODOLOGÍA

Cirugía y microdiálisis

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 290-310 gr las cuales fueron anestesiadas con una mezcla de 4-5% de halotano en 95% O₂/5% CO₂ y se montaron en aparatos estereotáxicos para médula espinal, con una almohadilla isotérmica a 37 °C (Braintree Scientific, INC), para poder mantener la temperatura del animal. Una vez anestesiadas se les realizó una incisión longitudinal en la región de las vértebras lumbares, las cuales fueron expuestas después de separar y limpiar cuidadosamente el músculo que las rodea. Se taladró un orificio de aproximadamente 2 mm de diámetro y una vez expuesta la médula se procedió a eliminar las meninges muy cuidadosamente para evitar alguna hemorragia, se limpio perfectamente la médula para posteriormente introducir una cánula de microdiálisis (1 mm de longitud x 0.24 mm de diámetro, CMA / Microdialysis, Estocolmo; previamente lavada con agua destilada por 1 hora a un flujo de 15 µl / minuto), sin llegar al asta ventral, es decir en toda el área dorsal (Sundström et al., 1995).

Los animales se mantuvieron con baja anestesia (de 0.8 a 1 % de halotano) durante todo el experimento, y a través de las cánulas de microdiálisis se perfundió la médula espinal continuamente con solución Krebs ringer normal que contenía 118 mM NaCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 4.7 mM KCl, 1.18 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM de glucosa y 2.5 mM CaCl₂ (pH 7.4) a un flujo de 2 µl / minuto, usando una microjeringa montada a una bomba de microinyección (modelo CMA / 100; Carnegie). Después de un periodo de equilibrio de 60 minutos, se colectaron continuamente fracciones de 25µl (12.5 minutos) de microdiálisis. Las tres primeras fracciones colectadas se utilizaron para determinar los niveles basales de aminoácidos, y en las dos siguientes fracciones se cambió el medio de perfusión por un medio de potasio 100 mM (adicionándolo a la solución

Krebs ringer normal y reduciendo la concentración del NaCl proporcionalmente para mantener la osmolaridad) o conteniendo las diferentes drogas. Por último se procedió a recolectar 3 fracciones adicionales con solución Krebs. Una vez concluido el experimento se suturó la piel del animal, se discontinuó la anestesia y se mantuvieron los animales en cajas durante 5 días en el bioterio con agua y comida.

Drogas

Se perfundió por la cánula de microdiálisis el inhibidor del transporte de glutamato ácido L-*trans*-2,4-pirrolidindicarboxílico (PDC) (Tocris, Langford, Bristol, U.K.) a una concentración de 25 y 50 mM, durante 5 fracciones de microdiálisis. La solución fue preparada disolviendo el PDC en 1 N de NaOH y ajustando el pH a 7-7.5, y adicionándola directamente a la solución Krebs-Ringer normal hasta alcanzar las concentraciones indicadas. Cabe mencionar que la eficiencia de la cánula de microdiálisis es de alrededor del 10% como determinado previamente (Morales-Villagran et al., 1996). La osmolaridad fue mantenida por reducción de la concentración del NaCl proporcionalmente. En los experimentos con 4-aminopiridina (4-AP) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), que es un bloqueador de canales de potasio y produce liberación de neurotransmisores, se adicionó al medio de microdiálisis a diferentes concentraciones, 35 mM durante una o dos fracciones o 70 mM durante dos fracciones. La osmolaridad fue mantenida por reducción de la concentración del NaCl proporcionalmente.

Se utilizaron además agonistas de los distintos tipos de receptores de glutamato: N-Metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) y kainato, los cuales fueron usados a diferentes concentraciones: el kainato se perfundió por la cánula de microdiálisis a una concentración de 400 μ M durante una o dos fracciones y 8 mM durante dos fracciones (Tocris Cookson, Langford, Bristol, U.K.), el

AMPA se perfundió a una concentración de 1.2 mM durante una o dos fracciones, 2.4 mM durante una o dos fracciones, 6 mM durante dos fracciones y 12 mM durante dos fracciones (Tocris, Langford, Bristol, U.K.) por último el NMDA se perfundió a una concentración de 12 mM durante dos fracciones (Tocris, Langford, Bristol, U.K.). Todos los agonistas fueron disueltos en solución salina estéril, y posteriormente se adicionaron directamente a la solución Krebs-Ringer normal hasta alcanzar las diferentes concentraciones.

También se utilizó un antagonista de los receptores tipo no-NMDA como el 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo [f] quinoxalina-7-sulfonamida sal disodio (NBQX) (Tocris, Langford, Bristol, U.K.), durante cuatro fracciones de microdiálisis en combinación con AMPA 6 mM durante dos fracciones para intentar bloquear su efecto. El NBQX fue disuelto en solución salina estéril, y posteriormente se adicionó a la solución Krebs-Ringer normal para alcanzar una concentración de 500 μ M.

Observación conductual

Todos los animales tratados con las diferentes condiciones experimentales se observaron durante la cirugía y después durante 5 días, hasta que se sacrifican para realizar la evaluación histológica.

Evaluación histológica

Al quinto día después de haber realizado el experimento, los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico y se perfundieron intracardialmente con 250 ml de solución salina al 0.9%, seguidos de 250 ml de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PBS) 0.1 M, pH 7.4. Se extrajeron las médulas espinales, se mantuvieron en post fijación durante 24 horas a 4 °C, luego fueron transferidas a sacarosas de 10, 20 y 30 % durante 24 horas respectivamente. Las médulas fueron

embebidas en tissue tech y se obtuvieron cortes coronales seriados de 40-50 μm en un crióstato. Cortes alternados de la médula se tiñeron con violeta de cresilo o se trataron para inmunohistoquímica, como se describe mas adelante. Se confirmó en todos los casos la correcta localización de la cánula de microdiálisis en las astas dorsales pero sin daño mecánico de las astas ventrales. Se contaron las motoneuronas no dañadas, identificadas por su gran tamaño $> 25 \mu\text{m}$, con citoplasma claramente visible, similar en apariencia a las del asta ventral contralateral, en un campo 10X. Se analizaron en total 9 cortes por rata, dorsal y caudalmente al tracto de la cánula, cubriendo toda el área que se observa en los cuadros insertados en las microfotografías de la rata control.

Inmunohistoquímica

Dado el carácter colinérgico de las motoneuronas espinales, éstas se identificaron mediante la detección de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Los cortes de la médula se colocaron en cajas histológicas por flotación con 500 μl PBS 0.1 M, y se mantuvieron bloqueando durante 2 horas con albúmina disuelta en buffer de fosfatos (BSA) al 5%, en agitación. Los cortes se incubaron posteriormente con un anticuerpo primario de cabra anti-ChAT (Chemicon, Temecula, CA) a una dilución de 1: 200 en buffer de fosfatos con triton (PBS-Tx) 0.3 %, durante toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente.

Se realizaron controles a los cuales no se adicionó el anticuerpo primario. Al siguiente día se lavaron los cortes 2 veces durante 10 min con PBS-Tx 0.3%, y se adicionó el anticuerpo secundario (IgG Biotinilado anti-cabra) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a una dilución de 1:200 en PBS-Tx 0.3% y se incubó durante 1h. Después de 2 lavados de 10 min con PBS-Tx 0.3%, se agregó avidina acoplada a Texas Red (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a una dilución de 1:200 en PBS-Tx 0.3% (pH de 8.2). La

avidina se preparó 30 min antes, en la oscuridad, y se guardó en refrigeración. Una vez incubadas las muestras con avidina se cubre la caja totalmente con papel aluminio, se mantienen en la oscuridad y con agitación continuamente durante 1h. Por último se realizaron 2 lavados de 10 min con PBS, y los cortes se montaron en portaobjetos, con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA), y se observaron en un microscopio con aditamento de epifluorescencia.

Análisis de aminoácidos

El contenido de aminoácidos en las fracciones de microdiálisis se midió por HPLC, como se describió previamente (Salazar et al., 1994; Massieu et al., 1995). Brevemente, las fracciones recolectadas (25 μ l) se mezclaron con un mismo volumen de α -ftaldialdehído (OPA) y 3 minutos después se inyectaron en un cromatógrafo líquido de alta resolución Beckman equipado con una columna ODS (25 cm x 4 mm i.d); como fase móvil se utilizó metanol grado HPLC y acetato de potasio (0.1M, pH 5.5) y se corrió en un gradiente lineal a un flujo de 1.5 ml / minuto (duración de 15 minutos) de 25 a 75% metanol. La detección se realizó por la medición de la fluorescencia del derivado OPA, a 330 nm de excitación y 460 nm de emisión. La cuantificación de aminoácidos se realizó por comparación con una mezcla estándar de aminoácidos que fueron procesados de la misma manera.

Análisis estadístico

Para analizar los cambios en las concentraciones de aminoácidos se realizó una prueba T de Student pareada. El conteo neuronal con los diferentes tratamientos fue analizado con la prueba estadística ANOVA con comparaciones post-hoc de la prueba Fisher.

VII. RESULTADOS

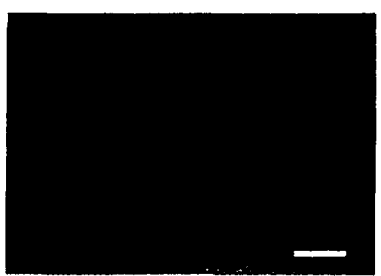
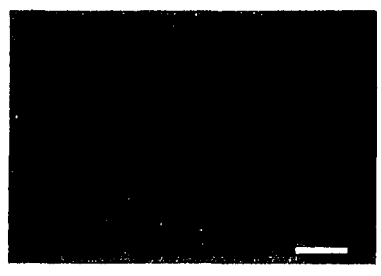
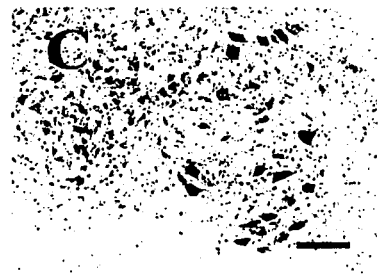
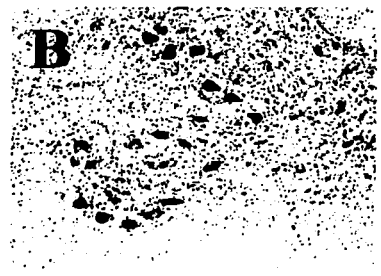
Control

Las concentraciones basales de glutamato y aspartato en las fracciones de microdiálisis de médula espinal de la rata fueron similares en cada experimento, entre 5-15 y de entre 5-10 pmolas/10 μ l, respectivamente. Los niveles de otros aminoácidos medidos como la alanina, glicina, glutamina, taurina y GABA fueron más variables entre los diferentes experimentos (datos no mostrados).

En la figura 5 se muestran las micrográficas de los cortes transversales de médula espinal de una rata control a la cual se le administró sólo solución Krebs, teñidos con violeta de cresilo y por inmunohistoquímica de la colina acetiltransferasa (ChAT), como marcador de neuronas colinérgicas. En la figura 5A se puede observar la correcta localización de la cánula de microdiálisis, que en ningún caso llegó a las astas ventrales. Las astas ventrales ipsilateral y contralateral se muestran en las Figuras 5 B y C, observándose también el daño mecánico ocasionado por la cánula en el asta dorsal ipsilateral. Este daño se caracteriza por la formación de gliosis en la zona inmediata al tracto de la cánula, pero en ningún caso se produjo lesión de las motoneuronas. La inmunohistoquímica para la ChAT (Fig. 5 F y G) muestra la apariencia normal de las motoneuronas colinérgicas. Para asegurar la especificidad de nuestro anticuerpo realizamos secciones adicionales de la misma rata, que fueron procesadas en ausencia del anticuerpo primario. No se observó inmunoreactividad en estas secciones. (Fig. 5 D y E).

Despolarización por alto potasio

Las ratas tratadas con potasio 100 mM durante dos fracciones de microdiálisis no presentaron ninguna alteración conductual durante la administración ni después de terminado el experimento.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Micrografías representativas de una rata control perfundida solo con medio Krebs (n = 8). Se muestra la morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar, 5 días después del experimento. **A, B y C**, teñido con violeta de cresilo. En **A** se observa el tracto de la cánula de microdiálisis en el asta dorsal ipsilateral (flecha); **B y C** corresponden a los cuadros en **A**. **D y E** Inmunohistoquímica de la ChAT en las astas ipsilateral y contralateral respectivamente, procesadas en ausencia de anticuerpo primario. Nótese la ausencia de tinte en las motoneuronas. **F y G** Inmunohistoquímica de la ChAT en las astas ipsilateral y contralateral, respectivamente. Nótese que las motoneuronas en las astas ventrales se encuentran bien preservadas en todas las micrografías. Barra = 400 μm en **A**, 150 μm en **B y C**, 75 μm en **D, E, F, y G**. En todas las micrografías los cortes teñidos con violeta de cresilo y con la inmunohistoquímica para la ChAT son de la misma rata. Para datos cuantitativos de ésta y las siguientes micrografías véase la figura 18.

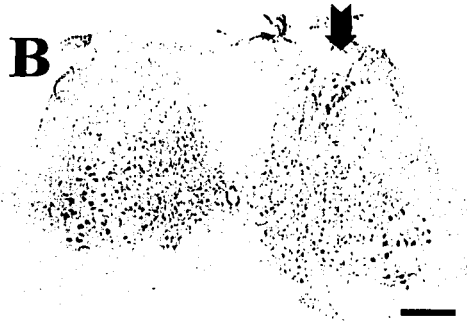
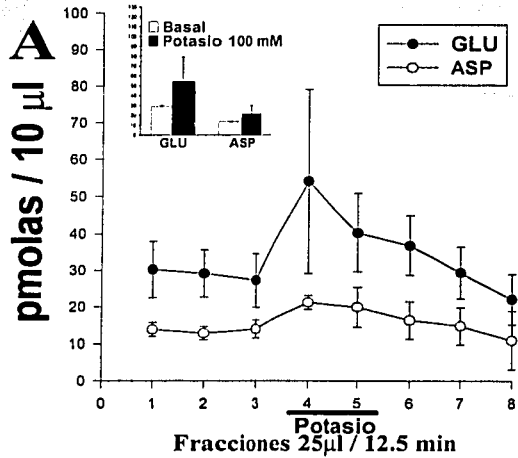
La perfusión por microdiálisis de potasio 100 mM se realizó como un control del tejido, para verificar la liberación de aminoácidos dependiente de despolarización y así verificar el funcionamiento de nuestro sistema de microdiálisis en la médula espinal. El alto K^+ produjo un ligero aumento en la concentración extracelular de glutamato y aspartato (Fig. 6A). También se observó un ligero aumento de los otros aminoácidos analizados, glutamina, glicina, alanina, taurina y el GABA (datos no mostrados). También en la figura 6 se muestran las micrografías de los cortes transversales de médula espinal de una rata tratada con potasio 100 mM, teñidas con violeta de cresilo. En estas micrografías se puede apreciar el tejido sano.

PDC

Las ratas tratadas con el inhibidor del transporte de glutamato PDC, 25 y 50 mM durante cinco fracciones de microdiálisis, no presentaron ningún tipo de alteración conductual, ni durante ni después de concluido el experimento.

Cuando se administró el PDC 25 mM, se observó un aumento significativo de 1-2 veces la concentración extracelular de glutamato y de 2-3 veces la concentración extracelular de aspartato durante un período de 60-90 minutos (Fig. 7). Cuando se perfundió PDC al doble de concentración (50 mM) se observó un mayor aumento de glutamato

endógeno extracelular. Como se muestra en la figura 7, la concentración extracelular de glutamato aumentó de 4-5 veces y la de aspartato de 3-4 veces durante el período de 60-90 minutos que duró la perfusión.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Efecto de la perfusión con potasio 100 mM, durante 2 fracciones (barra horizontal) sobre la concentración extracelular de glutamato y aspartato en la médula espinal de la rata (A). **Inserto.** Gráfica que muestra el promedio de las 3 concentraciones basales y del incremento al pico, producido por el alto potasio. Los datos representan el promedio \pm E.S. de 10 ratas. **B-D** micrografías representativas del efecto del potasio 100 mM. La morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar (teñido con violeta de cresilo), 5 días después del experimento es normal. En **B** se observa el tracto de la cánula (flecha). **C** asta ventral contralateral. **D** asta ventral ipsilateral. Barra = 400 μ m en **B**, 150 μ m en **C** y **D**.

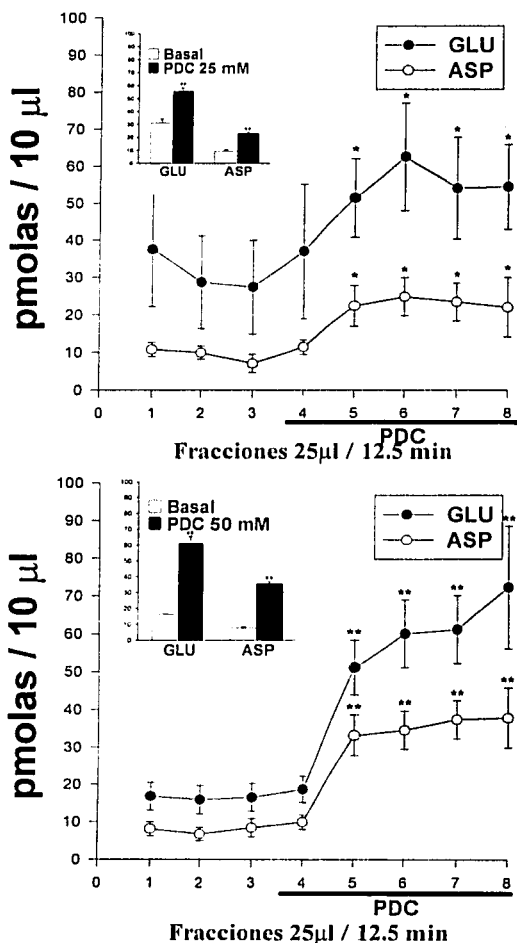


Figura 7. Efecto de la perfusión con PDC 25 y 50 mM, durante 5 fracciones (barra horizontal) sobre la concentración extracelular de glutamato y aspartato en la médula espinal de la rata. **Inserto.** Gráfica que muestra el promedio de las 3 concentraciones basales y de las 5 fracciones con PDC. Los datos representan el promedio \pm E.S. de 6 ratas para PDC 25 mM y de 15 ratas para PDC 50mM, *P < 0.05, **P < 0.01, significativamente diferentes al promedio de sus basales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

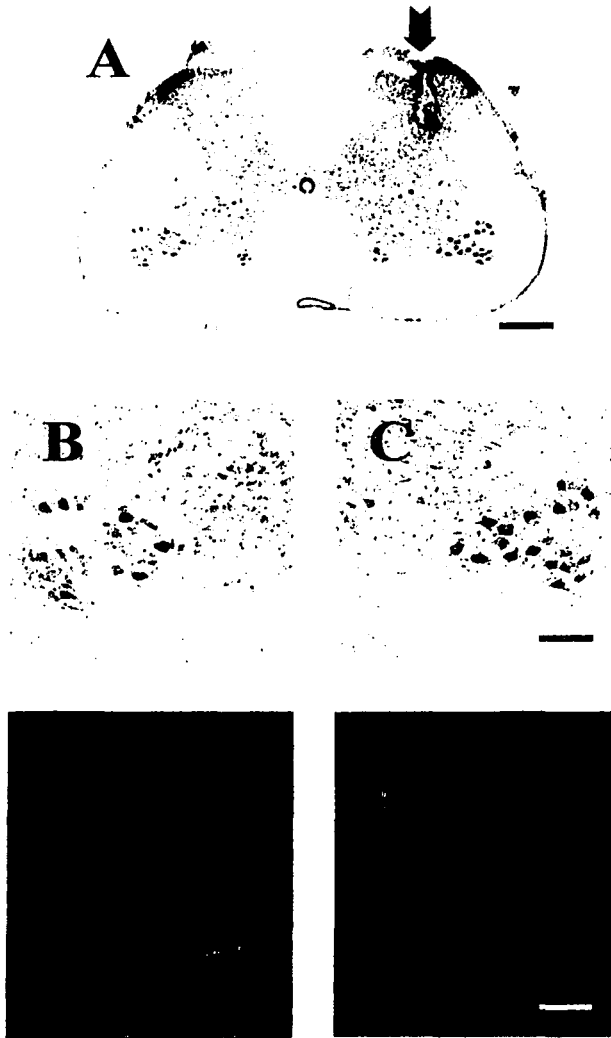


Figura 8. Micrografías representativas del efecto con PDC 50 mM, 5 días después del tratamiento observado en 15 ratas. **B** y **D**, lado contralateral, **C** y **D** lado ipsilateral. La morfología de las motoneuronas es normal, cuando se visualizan con violeta de cresilo (**A-C**), como con la inmunohistoquímica de la ChAT (**D-E**). Barra = 400 μ m en **A**, 150 μ m en **B** y **C**, 75 μ m en **D** y **E**. La flecha indica el tracto de la cánula.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La figura 8 muestra las micrografías de los cortes de médula espinal de las ratas tratadas con PDC 50 mM. A pesar del considerable aumento en la concentración extracelular de glutamato durante 60-90 minutos, no se observa neurodegeneración de las motoneuronas, como se confirma por los datos cuantitativos mostrados en la figura 19 y por la inmunohistoquímica de la ChAT.

4-AP

Todas las ratas tratadas con 4-AP 35 mM durante una o dos fracciones de microdiálisis, y con 70 mM durante dos fracciones, presentaron alteraciones conductuales. Esta alteración consistió en leves contracciones de la pata ipsilateral, que empezaron inmediatamente después de la administración de la 4-AP y que se hicieron mucho más intensas una vez que las ratas se recuperaron de la anestesia. Las contracciones se observaron durante 1-2 horas, y se acompañaron de giros contralaterales y ocasionales movimientos bruscos de la cola. Todas las ratas se recuperaron en unas 3-5 horas y al siguiente día no presentaron ninguna alteración motora.

Cuando se realizó la administración de 4-AP 35 mM durante una fracción se produjo un incremento de 3-4 veces en la concentración extracelular de glutamato y de 4-5 veces de aspartato, pero este incremento tuvo una duración de sólo 15 minutos (Fig. 9). La administración de 4-AP 35 mM durante dos fracciones produjo un aumento mucho mayor (7-8 veces) en la concentración extracelular de glutamato y su duración fue mayor (30 minutos) (Fig. 9). La administración de dos fracciones de 4-AP 70 mM produjo un aumento de 6-7 veces en la concentración extracelular de glutamato y la concentración de aspartato no aumentó significativamente, este incremento tuvo una duración de 30 minutos (Fig. 9).

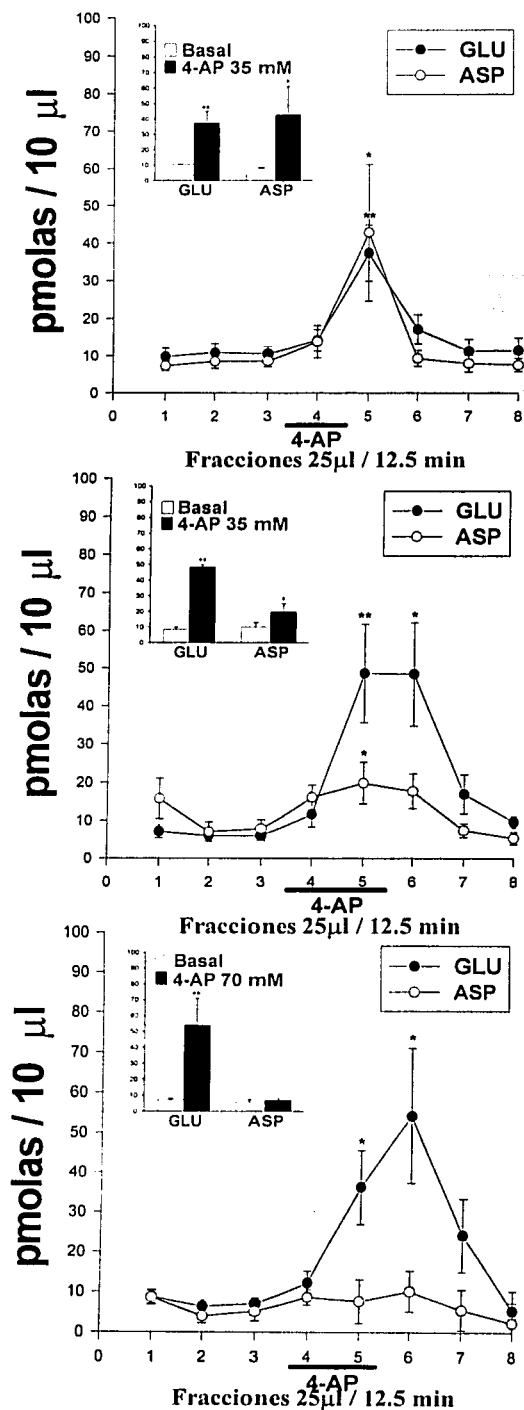


Figura 9. Efecto de la perfusión con 4-AP 35 mM, 35 mM y 70 mM, durante 1 o 2 fracciones (barra horizontal) sobre la concentración extracelular de glutamato y aspartato en la médula espinal de la rata. **Inserto.** Gráfica que muestra el promedio de las 3 concentraciones basales y el incremento al pico, en la concentración de glutamato y aspartato. Los datos representan el promedio \pm E.S. de 11 y 7 ratas para 4-AP 35 mM y de 11 ratas para 70 mM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significativamente diferentes al promedio de sus basales.

HECHO CON
PILLA DE ORIGEN

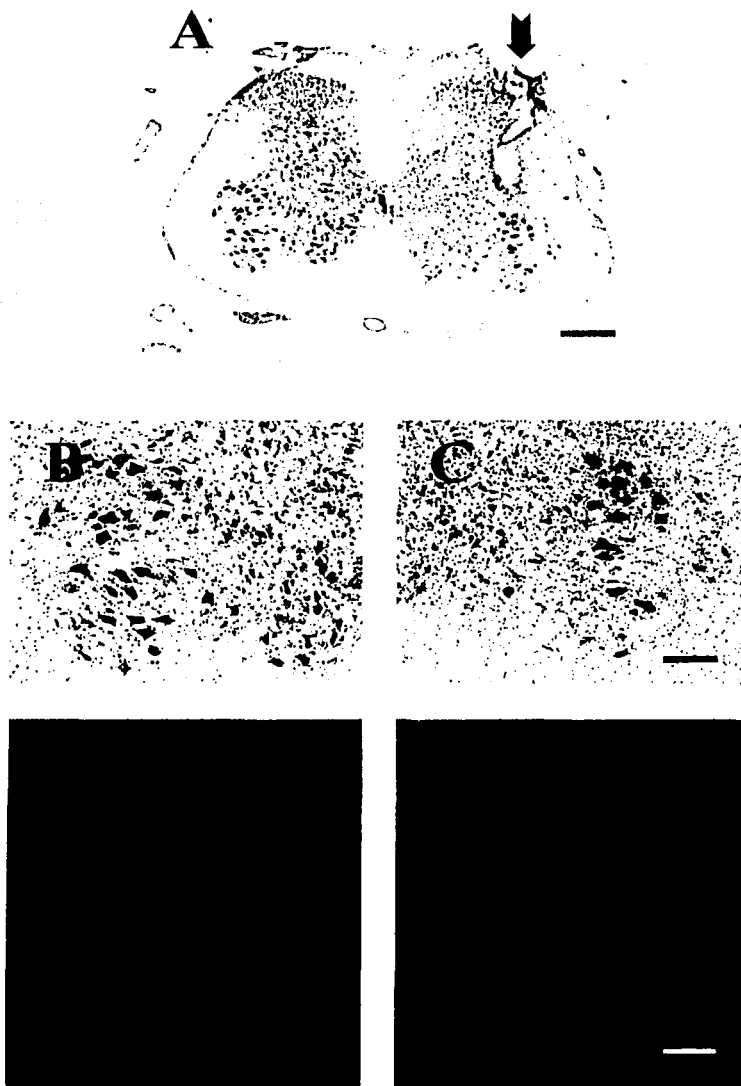


Figura 10. Micrografías representativas del efecto con 4-AP 35 mM, durante dos fracciones 5 días después del tratamiento observado en 11 ratas. **B** y **D**, lado contralateral, **C** y **D** lado ipsilateral. La morfología de las motoneuronas es normal, cuando se visualizan con violeta de cresilo (**A-C**), como con la inmunohistoquímica de la ChAT (**D-E**). Para la escala véase figura 7. La flecha indica el tracto de la cánula.

En las ratas tratadas con 4-AP 35 mM durante dos fracciones no se observó daño de las motoneuronas, a pesar de que se produjo un aumento significativo en los niveles de glutamato durante 30 minutos y a pesar de la alteración motora manifestada principalmente por las contracciones de la pata ipsilateral, (Figs. 10 y 19).

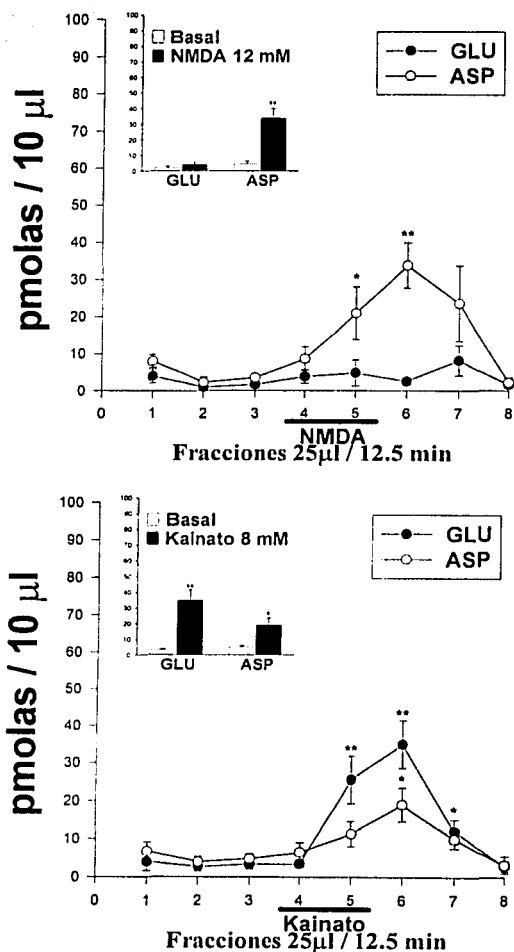


Figura 11. Efecto de la perfusión con NMDA 12 y kainato 8 mM, durante 2 fracciones (barra horizontal) sobre la concentración extracelular de glutamato y aspartato en la médula espinal de la rata. **Inserto.** Gráfica que muestra el promedio de las 3 concentraciones basales y el promedio de las 5 fracciones con NMDA o kainato. Los datos representan el promedio \pm E.S. de 7 ratas para NMDA y de 8 ratas para kainato, *P < 0.05, **P < 0.01, significativamente diferentes al promedio de sus basales.

TRABAJOS CON FALLA DE ORIGEN

Agonistas de los receptores de glutamato

Las ratas que recibieron NMDA 12 mM durante dos fracciones de microdiálisis, o kainato 8 mM durante dos fracciones, no presentaron alteraciones motoras. Algunas de las ratas tratadas con kainato 8 mM presentaron incontinencia urinaria.

Cuando se administró NMDA 12 mM durante dos fracciones no se produjo un cambio significativo en los niveles extracelulares de glutamato, pero sí un aumento de 4 veces en los niveles extracelulares de aspartato durante 30 minutos (Fig. 11). A pesar de este incremento, el NMDA no produjo daño de las motoneuronas (Figs. 12 y 19).

Cuando se realizó la administración de kainato 400 μ M durante una o dos fracciones, no se observó aumento en los niveles extracelulares de glutamato ni de aspartato (datos no mostrados). La perfusión de kainato 8 mM durante dos fracciones produjo un aumento de 4 veces en la concentración extracelular de glutamato y de 2 veces en la de aspartato durante 30 minutos (Fig. 11). Sin embargo, no se observó daño de las motoneuronas (Figs. 13 y 19).

Las ratas tratadas con AMPA 1.2 mM o 2.4 mM durante una o dos fracciones de microdiálisis no presentaron alteraciones motoras. En contraste, todas las ratas tratadas con AMPA 6 o 12 mM durante dos fracciones mostraron rigidez y contracciones de la pata ipsilateral, casi inmediatamente después de que se recuperaron de la anestesia. Alrededor de 1 hora después, todas las ratas tuvieron un periodo de giro contralateral, con movimientos bruscos de la cola, y algunas de ellas empezaron a morderla. Algunas ratas presentaron incontinencia urinaria. Después de 2-3 horas se inició la parálisis de la pata ipsilateral, que fue cada vez más severa hasta que el miembro quedó totalmente paralizado después de 3-4 horas, permaneciendo así hasta el quinto día en el cual las ratas se sacrificaron (Fig. 14).

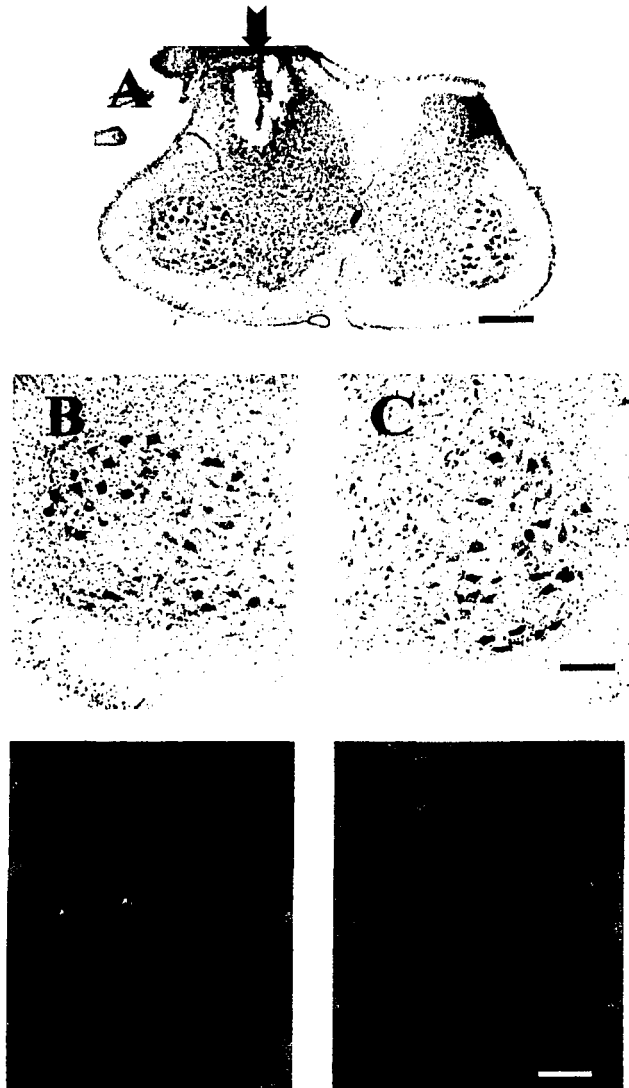


Figura 12. Micrografías representativas del efecto con NMDA 12 mM, durante dos fracciones 5 días después del tratamiento observado en 8 ratas. C y E lado contralateral, B y D lado ipsilateral. La morfología de las motoneuronas es normal, cuando se visualizan con violeta de cresilo (A-C), como con la inmunohistoquímica de la ChAT (D-E). Para la escala véase figura 7. La flecha indica el tracto de la cánula.

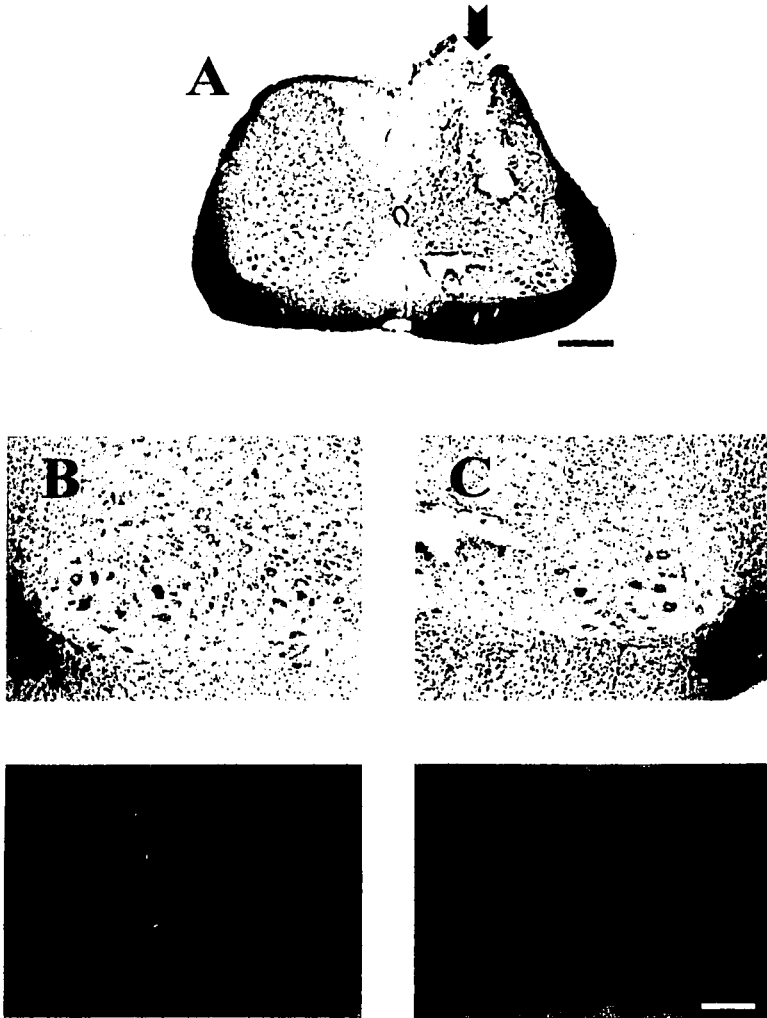


Figura 13. Micrografías representativas del efecto con kainato 8 mM, durante dos fracciones 5 días después del tratamiento observado en 7 ratas. **B** y **D** lado contralateral, **C** y **E** lado ipsilateral. La morfología de las motoneuronas es normal, cuando se visualizan con violeta de cresilo (**A-C**), como con la inmunohistoquímica de la ChAT (**D-E**). Para la escala véase figura 7. La flecha indica el tracto de la cánula.



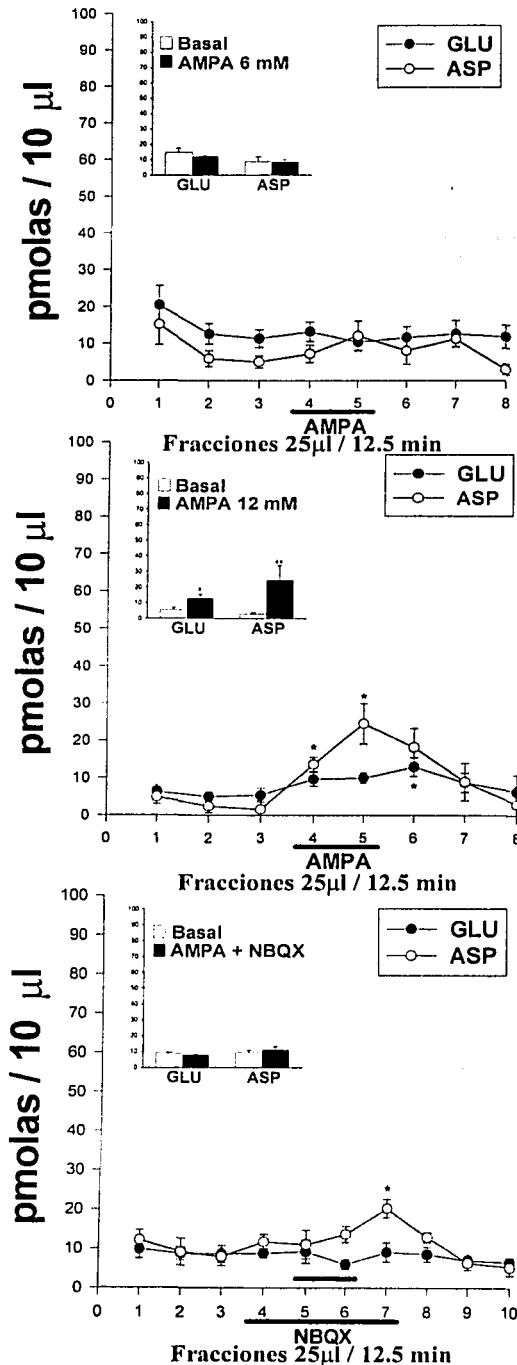
Figura 14. Fotografía de las ratas tratadas con AMPA 6 mM, 24 h. después del experimento. Las ratas presentaron parálisis de la pata trasera.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuando se realizó la administración de AMPA 1.2 o 2.4 mM durante una o dos fracciones, respectivamente, no se observó un incremento en la concentración extracelular de glutamato ni de aspartato (datos no mostrados). La administración de AMPA 6 mM durante dos fracciones no modificó significativamente la concentración extracelular de glutamato ni de aspartato (Fig. 15), mientras que con 12 mM durante dos fracciones se observó un aumento en los niveles extracelulares de glutamato de 1-2 veces, y la de aspartato de 3-4 veces, durante 30 minutos (Fig. 15).

A pesar de que con 6 mM de AMPA no se modificó significativamente la concentración extracelular de glutamato ni de aspartato, sí se produjo una severa neurodegeneración de las motoneuronas en el asta ventral, confirmada por violeta de cresilo y por la inmunohistoquímica contra la ChAT (Fig. 16) y en la figura 17 se muestra la degeneración producida con 12 mM de AMPA. En la figura 19 se muestran los datos cuantitativos, que indican una destrucción de más del 80 % de las motoneuronas del lado ipsilateral con AMPA 6 mM. Con 12 mM de AMPA la destrucción fue mayor, ya que se produjo un daño del 100 % de las motoneuronas del lado ipsilateral, y de aproximadamente un 40 % del lado contralateral.

Para correlacionar la muerte de las motoneuronas con la activación de los receptores AMPA, se coadministró AMPA 6 mM con el antagonista NBQX. Todos los cambios conductuales, incluyendo la parálisis, fueron bloqueados cuando se coadministró este antagonista, no se observaron cambios significativos en la concentración de glutamato, pero sí se observó un ligero aumento en la concentración de aspartato (Fig. 15). El NBQX protegió en un 60 % contra la degeneración de las motoneuronas que produce el AMPA (Figs. 18 y 19).



TESIS CON
FECHA DE ORIGEN

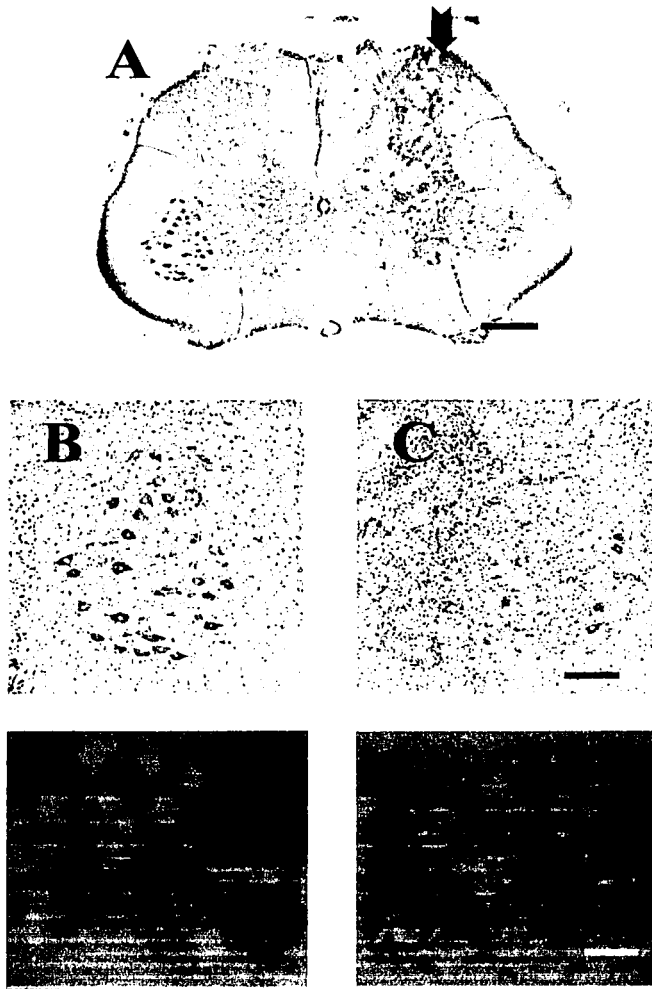


Figura 16. Micrografías representativas del efecto con AMPA 6 mM, 5 días después del tratamiento observado en 8 ratas. Nótese la pérdida de motoneuronas en el lado ipsilateral, cuando se visualizan con violeta de cresilo (A-C), como con la inmunohistoquímica para la ChAT (D-E), y la preservación de la morfología normal en el lado contralateral. Para la escala véase figura 7. La flecha indica el tracto de la cánula.

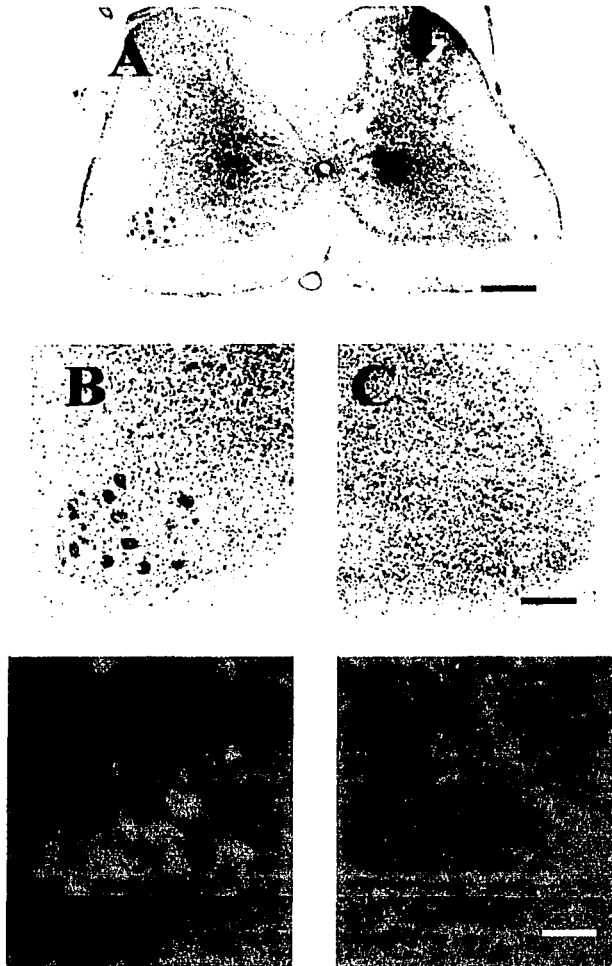


Figura 17. Micrografías representativas del efecto con AMPA 12 mM, 5 días después del tratamiento observado en 11 ratas. Nótese la pérdida de motoneuronas en el lado ipsilateral, cuando se visualizan con violeta de cresilo (A-C), como con la inmunohistoquímica para la ChAT (D-E), y la pérdida parcial de motoneuronas en el lado contralateral. Para la escala véase figura 7. La flecha indica el tracto de la cánula.

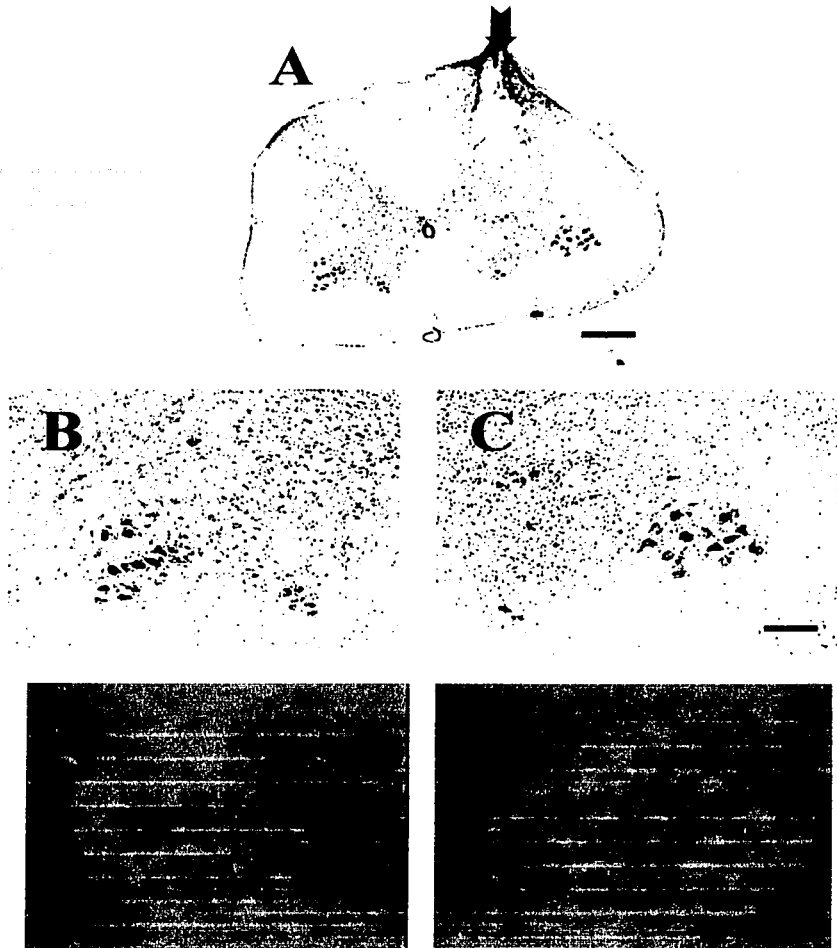


Figura 18. Micrografías representativas del efecto con AMPA 6 mM + NBQX 500 μ M, 5 días después del tratamiento observado en 9 ratas. Nótese la protección por el NBQX contra la pérdida neuronal producida por el AMPA, cuando se visualizan con violeta de cresilo (A-C), como con la inmunohistoquímica para la ChAT (D-E), y la preservación de la morfología normal en el lado contralateral. Para la escala véase figura 7. La flecha indica el tracto de la cánula.

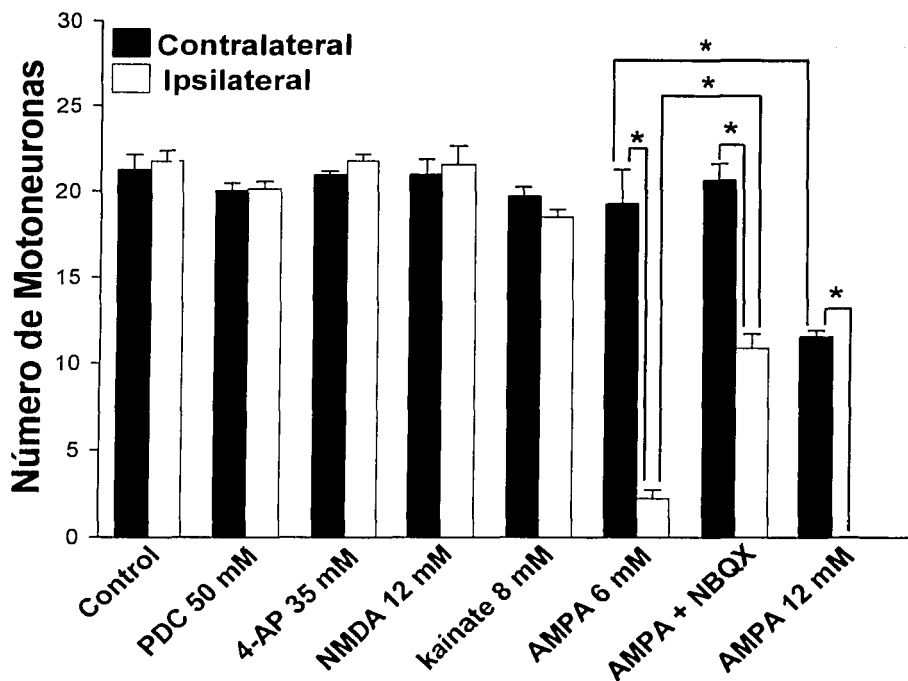


Figura 19. Número de motoneuronas en las astas ventrales en las ratas sometidas a los tratamientos señalados. Nótese la pérdida de motoneuronas con AMPA 6mM en el lado ipsilateral, y su prevención con NBQX. La pérdida de motoneuronas ipsilaterales con AMPA 12 mM fue total, e inclusive se observó daño del lado contalateral. Los datos representan el promedio \pm E.S. del número de ratas indicado en los pies de las figuras 4, 7, 9, 11, 12, 15, 16 y 17, *P < 0.0001, significativamente diferentes entre los datos señalados.

FALTA DE ORIGEN
TESIS CON

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió mediante la combinación de técnicas de microdiálisis, neuroquímicas, inmunohistoquímicas e histológicas, la correlación que existe entre un incremento en la concentración extracelular de glutamato y la neurodegeneración en la médula espinal, *in vivo*. Con los resultados obtenidos podemos concluir que la acumulación de glutamato extracelular debido a la inhibición en su transporte o a un incremento en su liberación desde terminales nerviosas no es un factor determinante en la producción de neurodegeneración de las motoneuronas *in vivo*. Sin embargo, al sobreactivar los receptores de glutamato tipo AMPA sí se produjo neurodegeneración de las motoneuronas, la cual además resultó en parálisis de la pata ipsilateral.

Usando la técnica de microdiálisis se pueden monitorear los cambios en la concentración extracelular de varios neurotransmisores. Por lo tanto es posible estudiar cambios en la liberación *in vivo* en respuesta a varias condiciones experimentales. Estudios de la liberación de neurotransmisores y aminoácidos por microdiálisis han sido realizados principalmente en regiones cerebrales como el hipocampo y el estriado (Massieu et al., 1995; Morales-Villagrán y Tapia, 1996; Massieu y Tapia, 1997; Tapia et al., 1999; Peña y Tapia, 1999; 2000), pero hay pocos estudios por microdiálisis en la médula espinal *in vivo*. Sundström et al. (1995) mostraron la liberación de glutamato y aspartato por la administración por microdiálisis de 100 mM de potasio en la médula espinal de la rata. En otros estudios se observaron incrementos importantes en la concentración extracelular de varios aminoácidos, incluyendo glutamato, en la médula espinal *in vivo*, producidos por el traumatismo mecánico de la médula (McAdoo et al., 1999). Sin embargo, en estos trabajos la cánula de microdiálisis utilizada atraviesa horizontalmente las astas dorsales de la médula espinal. Por lo tanto, nosotros recurrimos a la metodología usada por Sundström et al., en

la cual, se usa el mismo tipo de cánula introducida transversalmente en el asta dorsal, pero sin tocar el asta ventral que es donde están las motoneuronas. Es de importancia hacer notar que la cánula de microdiálisis que nosotros usamos mide sólo 1 mm de longitud x 0.24 mm de diámetro, por lo que produce únicamente daño mecánico del asta dorsal ipsilateral. Otra ventaja de nuestro sistema de microdiálisis es que el asta ventral contralateral funciona como control. Cabe mencionar que no hay ningún trabajo en la literatura en donde se hayan administrado por microdiálisis las drogas que aquí usamos para incrementar la concentración extracelular de glutamato y correlacionarlo con el daño en las motoneuronas.

Se ha reportado previamente en el laboratorio que al administrar una alta concentración de potasio se estimula la liberación de glutamato extracelular *in vivo* (Morales-Villagrán y Tapia, 1996; Peña y Tapia, 1999) pero esta liberación de glutamato no causa epilepsia ni neurodegeneración del hipocampo. Estos resultados sugieren que la liberación de glutamato no es de las terminales sinápticas sino más bien de las células gliales y de los somas neuronales, por lo que el glutamato no es capaz de llegar a sobreactivar a los receptores de glutamato. Esta misma interpretación puede aplicarse a nuestros resultados con alto potasio en la médula espinal.

Inhibición del transporte de glutamato

La hipótesis excitotóxica de la SALS surgió debido a una serie de estudios en los cuales se encontró que los niveles extracelulares de glutamato, tanto en plasma (Plaitakis, 1990) como en líquido cefalorraquídeo (Rothstein et al., 1990), estaban aumentados en los pacientes con SALS. Otros hallazgos demostraron que la actividad del transportador glial de glutamato (EAAT2

o GLT1) tiene una menor actividad en la médula espinal, y en la corteza cerebral, en los pacientes con SALS (Rothstein et al., 1992, 1995), por lo que la disminución en el transportador estaría causando una excesiva acumulación de glutamato en el espacio sináptico y en consecuencia sobreactivaría sus receptores, lo que culminaría en degeneración de las motoneuronas por la serie de mecanismos que se revisaron en la introducción.

Una de las principales aportaciones del presente trabajo es la demostración de que no hay correlación entre el incremento en la concentración extracelular de glutamato y el daño de las motoneuronas. Como se muestra en los resultados, los niveles extracelulares de glutamato se incrementaron por el PDC varias veces sobre el valor basal, durante más de una hora y a pesar de este considerable aumento no se observaron alteraciones conductuales ni degeneración de las motoneuronas. En un estudio *in vivo* con otro inhibidor del transporte de glutamato, el DL-treo- β -hidroxiaspartato (THA), administrado en el espacio subaracnoideo a través de bombas miniosmóticas, tampoco se observó daño neuronal aparente (Hirata et al., 1997). Por otro lado varios trabajos han demostrado que el incremento de los niveles extracelulares de glutamato *in vivo* por la inhibición de su recaptura con PDC no es suficiente para provocar neurodegeneración, ni en el hipocampo ni en el estriado (Massieu et al., 1995; Obrenovitch et al., 1996; Massieu y Tapia, 1997). Una posible explicación para estos resultados es que el glutamato extracelular acumulado como consecuencia de la inhibición en su recaptura por el PDC, no es capaz de llegar a sus receptores y sobreactivarlos (Tapia et al., 1999).

En cultivos organotípicos de médula espinal (Rothstein et al., 1993), y en cultivos corticales (Velasco et al., 1996; Volterra et al., 1996), los inhibidores del transporte de glutamato producen neurotoxicidad, y en

cultivos de células hipocampales la toxicidad fue potenciada por la exposición al PDC (Robinson et al., 1993). Esto podría explicarse porque, a diferencia de lo que sucede *in vivo*, en los cultivos el glutamato acumulado podrían fácilmente llegar a sus receptores postsinápticos. Otra posibilidad es que la excitabilidad neuronal pueda ser modificada por las interacciones que ocurren entre otras neuronas y con la glía. Esto podría ser la causa de las diferencias entre los estudios *in vivo* y los estudios *in vitro*.

De los resultados de este estudio se puede concluir que un sustancial aumento en la concentración extracelular de glutamato endógeno en el espacio extracelular como resultado del bloqueo en su recaptura *in vivo*, aun durante 60-90 minutos, no es suficiente para inducir neurodegeneración de las motoneuronas en la médula espinal. Por lo tanto, estos resultados no apoyan la hipótesis de deficiencias en el transportador de glutamato (Rothstein et al., 1992; 1995) como una causa o mecanismo que genere la ALS. Sin embargo la posibilidad de que un aumento crónico del glutamato extracelular pueda inducir excitotoxicidad no puede ser descartada.

Aumento de la liberación de glutamato

Los animales tratados con 4-AP, inmediatamente después de la infusión mostraron alteraciones motoras, principalmente contracciones de la pata ipsilateral, pero estos animales no mostraron parálisis ni muerte de las motoneuronas a pesar de un notable aumento transitorio en la concentración de glutamato. Estos resultados confirman la acción de esta droga, que produce la liberación de neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores en diferentes preparaciones *in vitro*, en la placa neuromuscular, rebanadas de cerebro y en sinaptosomas (Tapia y Sitges, 1982; Tapia et al., 1985), así como en algunas regiones cerebrales *in vivo* (Morales-Villagran et al., 1996; Peña y Tapia, 1999). Esta liberación ocurre

desde terminales sinápticas, ya que es inhibida por tetrodotoxina y por antagonistas de canales de Ca^{2+} tipo N (Peña y Tapia, 2000).

De lo anterior se desprende que el glutamato liberado en las terminales presinápticas por la acción de la 4-AP juega un papel importante en el aumento de la excitabilidad de las motoneuronas en la médula espinal, pero su estimulación no es suficiente para producir excitotoxicidad de las motoneuronas en estas condiciones experimentales. Esto contrasta con los resultados de la administración de 4-AP en el hipocampo *in vivo*, que produce intensas convulsiones y neurodegeneración (Peña y Tapia, 1999; 2000). Esto sugiere que las motoneuronas espinales son más resistentes a la excitotoxicidad por el mecanismo activado por la 4-AP en comparación con las neuronas del hipocampo, o bien que la distribución de los receptores de glutamato en la médula espinal es diferente. En efecto, los receptores involucrados en la excitotoxicidad sobre las motoneuronas son los receptores AMPA, como se discute más adelante. En el caso del hipocampo, los antagonistas de los receptores NMDA fueron más eficientes que los de AMPA para proteger contra la epilepsia y la neurodegeneración producidos por la 4-AP (Peña y Tapia, 2000).

Sobreactivación de los receptores de glutamato y neurodegeneración

Cuando se realizó la perfusión de NMDA no se observaron cambios en la conducta de las ratas tratadas, ni neurodegeneración de las motoneuronas, aunque sí se indujo un incremento en los niveles de aspartato. Young y Bradford (1991), administraron NMDA por microdiálisis en el estriado de la rata y observaron aumentos en la concentración de aspartato y glutamato. Sundström et al. (1995) observaron también aumento en la concentración de glutamato en la médula espinal de la rata por la administración por microdiálisis de NMDA. Este aumento podría

deberse a que la activación de los receptores NMDA puede estar acoplada a la síntesis, liberación y difusión retrógrada de ciertos neuromoduladores como el óxido nítrico, el cual puede difundir a las terminales sinápticas y aumentar la liberación de aspartato (Sorkin, 1993). Otra posibilidad es que una porción de esos receptores puedan estar localizados presinápticamente, y al ser activados por el NMDA podría incrementar la conductancia de calcio en la terminal nerviosa y por lo tanto aumentar la liberación de aspartato (Bustos et al., 1992). Sin embargo no hay una explicación clara para esta observación.

La perfusión de kainato produjo un aumento en la concentración extracelular de glutamato y aspartato, pero tampoco se observaron cambios conductuales ni degeneración de las motoneuronas. En el estriado de la rata, la administración de kainato por microdiálisis produjo aumentos en la concentración de glutamato y aspartato (Young et al., 1988), lo que podría deberse a una acción directa del kainato sobre receptores presinápticos. La administración intratecal de kainato en ratones produjo un limitado daño de las motoneuronas, mientras que el NMDA no produjo daño neuronal, pero sí se observó daño principalmente de interneuronas (Urca y Urca, 1990). Hugon et al. (1989), observaron que la administración intratecal de kainato en la médula espinal de rata produjo daño neuronal. En otros trabajos *in vivo* se demostró que la administración sistémica (subcutánea, intravenosa e intraperitoneal) de ácido acromélico que es un análogo del kainato, así como la administración subaracnoidea de kainato y de ácido acromélico solo produjo un daño selectivo de interneuronas en la médula espinal (Shin et al., 1992; Kwan y Nakamura, 1995). En un estudio *in vivo* con inyección intraespinal con dosis muy altas de NMDA se observó daño neuronal, predominantemente en el asta dorsal, pero no se observó un daño aparente de las motoneuronas (Liu et al., 1997).

De especial interés es el hecho de que nosotros no encontramos efectos neurotóxicos de la administración por microdialisis de NMDA o de kainato en la médula espinal. Esto es inesperado en vista de que la amplia gama de datos en la literatura que implica a los receptores NMDA y kainato en la muerte neuronal. Esta diferencia se debe probablemente al hecho de que la médula espinal de la rata posee relativamente poca o nula expresión de RNAm de las diferentes subunidades de los receptores NMDA y de kainato en las astas ventrales (Wisden et al, 2000; Petralia et al, 2000).

En contraste, la perfusión con AMPA no modificó los niveles extracelulares de glutamato y aspartato, pero todos los animales presentaron parálisis de la pata ipsilateral. Estos resultados sugieren que las motoneuronas son altamente vulnerables al daño por la sobreactivación de los receptores tipo AMPA, como ha sido observado en previos estudios llevados a cabo *in vivo* administrando AMPA intratecalmente o intraespinalmente (Nakamura et al., 1994; Liu et al., 1997). *In vitro*, en cultivos de médula espinal, también se ha demostrado que las motoneuronas son más vulnerables al daño mediado por los receptores AMPA en comparación a las neuronas del asta dorsal (Carriedo et al., 1996; Van Der Bosch et al., 2000; Van Der Bosch y Robberech, 2000; Vandenberghe et al., 2000).

Lo anterior correlaciona muy bien con la distribución de los receptores AMPA en la médula espinal, ya que éstos se expresan mayoritariamente en las astas ventrales (Wisden et al, 2000; Petralia et al, 2000). Esta alta densidad regional de los receptores AMPA y la alta vulnerabilidad a la neurotoxicidad inducida por este tipo de receptores, apoya la noción de que el daño neuronal observado en este estudio está mediado por los receptores AMPA. Esta conclusión se confirmó muy

claramente por la perfusión del antagonista de los receptores AMPA, NBQX, que bloqueo totalmente las alteraciones en la conducta motora y la parálisis, y previno la degeneración de las motoneuronas producida por la administración de AMPA. Estos resultados son consistentes con los efectos neuroprotectores de los antagonistas de los receptores AMPA sobre el daño en la médula espinal *in vivo* producido por AMPA (Nakamura et al., 1994; Liu et al., 1997; Hirata et al., 1997) o *in vitro* producido por kainato (Carriedo et al., 1996; Van Der Bosch et al., 2000; Van Der Bosch y Robberech, 2000).

La razón de la muerte selectiva de las motoneuronas en la ALS es aun desconocida, pero hay una creciente evidencia que implica alteraciones en el metabolismo y neurotransmisión del glutamato. Es posible que los receptores de glutamato, principalmente los receptores tipo AMPA, están contribuyendo a la muerte selectiva de las motoneuronas, como se ha demostrado en estudios tanto *in vivo* (Hugon et al., 1989) como en cultivos organotípicos y disociados de médula espinal (Rothstein et al., 1993; Carriedo et al., 1996; Van Den Bosch y Robberech, 2000). Esta vulnerabilidad de las motoneuronas podría deberse a la expresión en la médula espinal de receptores AMPA altamente permeables a calcio que carecen de la subunidad GluR2 (Williams et al., 1997; Shaw et al., 1999; Shaw, 1999). Esta posibilidad se apoya por los estudios en cultivos de motoneuronas, en los cuales se ha observado que la muerte neuronal es dependiente de calcio, el cual penetra por los receptores AMPA que no tienen la subunidad GluR2, ya que la toxina de araña Joro, bloquea selectivamente estos receptores AMPA y protegió contra el daño neuronal (Van Der Bosch et al., 2000; Van Der Bosch y Robberech, 2000). Otros experimentos realizados en cultivos de motoneuronas para identificar la presencia de receptores AMPA permeables al calcio, es con una tinción histoquímica con cobalto

(Carriedo et al., 1995; Carriedo et al., 1996; Terro et al., 1998; Van Der Bosch et al., 2000; Van Der Bosch y Robberech, 2000). Los resultados de estos experimentos concuerdan con la conclusión de que la entrada de calcio vía receptores AMPA permeables al calcio son los responsables de la selectiva muerte de las motoneuronas.

Nuestros resultados de la selectiva vulnerabilidad de las motoneuronas espinales a la sobreactivación de los receptores AMPA correlacionan con la hipótesis en la cual se propone que los receptores de glutamato, particularmente los receptores tipo AMPA podrían estar participando en la patogénesis de la ALS.

IX. CONCLUSIONES

1. La inhibición aguda del transporte de glutamato con PDC produjo un notable y persistente aumento en los niveles extracelulares de glutamato, el cual no causó daño de las motoneuronas. Estos resultados contradicen la hipótesis de daño excitotóxico como consecuencia de una disminución en la función de los transportadores de glutamato.
2. El aumento de glutamato endógeno extracelular producido por la 4-AP no causó daño en las motoneuronas espinales, pero sí contracciones en los músculos correspondientes. Esto sugiere que la estimulación de la liberación de glutamato por la 4-AP fue suficiente para sobreexcitar a las motoneuronas pero no para producir neurodegeneración.
3. El efecto excitotóxico del AMPA demuestra que estos receptores sí pueden ser sobreactivados en las condiciones experimentales empleadas, y que como consecuencia se produce la muerte de las motoneuronas y la parálisis de la pata ipsilateral. Este tratamiento puede ser un modelo experimental de muerte de motoneuronas semejante a la ALS.
4. El efecto protector del antagonista de los receptores no-NMDA (NBQX), contra las contracciones de la pata ipsilateral, contra la parálisis y la muerte de las motoneuronas, confirma la participación de los receptores AMPA.
5. Los efectos de los agonistas kainato y NMDA en las condiciones y concentraciones empleadas no produjeron daño, probablemente por que este tipo de receptores no son muy abundantes en las astas ventrales de la médula espinal, en contraste con los receptores AMPA.

X. REFERENCIAS

- Alexander, G.M., Deitch, J.S., Seeburger, J.L., Del Valle, L., Heiman-Patterson, T.D. (2000) Elevated cortical extracellular fluid glutamate in transgenic mice expressing human mutant (G93A) Cu/Zn superoxide dismutase. *J. Neurochem.* **74**, 1666-1673.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G. (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4155-4160.
- Beal, M.F. (1996) Mitochondria, free radical, and neurodegeneration. *Curr. Op. Neurobiol.* **6**, 661-666.
- Bettler, B., Mülle, C. (1995) Review: neurotransmitter receptors II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacol.* **34**, 123-139.
- Bittigau, P., Ikonomidou, C. (1997) Glutamate in neurologic diseases. *J. Child Neurol.* **12**, 471-485.
- Bouvier, M., Szatkowski, M., Amato, A., Attwell, D. (1992) The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* **360**, 471-474.
- Brodal, P. (1998) *The Central Nervous System (structure and function)*. Oxford University Press, Inc. Second Edition. Chapter III.
- Broman, J., Hassel, B., Rinvik, E., Ottersen, O.P. (2000) Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate. *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 18: Glutamate*. Editors. Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. Chapter I, 1-44. Elsevier Science.
- Bruijn, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., Cleveland, D.W. (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* **18**, 327-338.
- Bustos, G., Abarca, J., Forray, M.I., Gysling, K., Bradberry, C.W., Roth, R.H. (1992) Regulation of excitatory amino acid release by N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum: *in vivo* microdialysis studies. *Brain Res.* **585**, 105-115.

- Carriedo, S.G., Yin, H.Z., Lamberta, R., Weiss, J.H. (1995) *In vitro* kainate injury to large, SMI-32(+) spinal neurons is Ca^{2+} dependent. *Neuroreport*. **6**, 945-948.
- Carriedo, S.G., Yin, H.Z., Weiss, J.H. (1996) Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury *in vitro*. *J. Neurosci.* **16**, 4069-4079.
- Cleveland, D.W. (1999) From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron*. **24**, 515-520.
- Cleveland, D.W., Rothstein, J.D. (2002) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 806-819.
- Coyle, J.T., Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-695.
- Curtis, D.R., Watkins, J.C. (1960) The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* **6**, 117-141.
- Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.
- Danbold, N.C. (2000) Sodium- and potassium-dependent excitatory amino acid transporters in brain plasma membranes. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 18: Glutamate. Editors. Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. Chapter VIII, 231-254. Elsevier Science.
- De Biasi, S., Rustioni, A. (1988) Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 7820-7824.
- Dingledine, R., MacBain, C.R. (1999) Glutamate and aspartate. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 6th Ed., Edited by Siegel, G.J. et al. Chapter 15, 315-333. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G. (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of ligand-gated chloride channel. *Nature* **375**, 599-603.

- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R.L., Siddique, T. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772-1775.
- Gurney, M.E., Liu, R., Althaus, J.S., Hall, E.D., Becker, D.A. (1998) Mutant CuZn superoxide dismutase in motor neuron disease. *J. Inher. Metab. Dis.* **21**, 587-597.
- Guyton, A.C. (1994) Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso (Neurociencia básica). Médica Panamericana. Segunda edición. Capítulo II y III.
- Hirata, A., Nakamura, R., Kwan, S., Nagata, N., Kamakura, K. (1997) AMPA receptor-mediated slow neuronal death in the rat spinal cord induced by long-term blockade of glutamate transporter with THA. *Brain Res.* **771**, 37-44.
- Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S. (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* **252**, 851-853.
- Hollmann, M., Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 31-108.
- Hori, N., Carp, J.S., Carpenter, D.O., Akaike, N. (2002) Corticospinal transmission to motoneurons in cervical spinal cord slices from adult rats. *Life Sci.* **72**, 389-397.
- Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., DeGennaro, L.D., Cleveland, D.W., Rothstein, J.D. (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1604-1609.
- Hugon, J., Vallat, J.M., Spencer, P.S., Leboutet, M.J., Barthe, D. (1989) Kainic acid induces early and delayed degenerative neuronal changes in rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* **104**, 258-262.
- Julien, J.P. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* **104**, 581-591.

- Kanai, Y., Hediger, M.A. (1992) Primary structure and functional characterization of high-affinity glutamate transporter. *Nature* **360**, 467-471.
- Kruman, I.I., Pedersen, W.A., Springer, J.E., Mattson, M.P. (1999) ALS-Linked Cu/Zn-SOD Mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp. Neurol.* **160**, 28-39.
- Kwak, S., Nakamura, R. (1995) Acute and late neurotoxicity in the rat spinal cord *in vivo* induced by glutamate receptors agonist. *J. Neurol. Sci.* **129**, 99-103.
- Lin, C.G., Bristol, L.A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L., Rothstein, J.D. (1998) Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for Absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **20**, 589-602.
- Liochev, S., Fridovich, I. (2000) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and superoxide oxidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 38482-38485.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A. (1994) Mechanism of disease: excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Engl. J. Med.* **330**, 613-622.
- Liu, S., Ruenes, G.L., Yeziarski, R.P. (1997) NMDA and non-NMDA receptor antagonist protect against excitotoxic injury in the rat spinal cord. *Brain Res.* **756**, 160-167.
- Louvel, E., Hugon, J., Doble, A. (1997) Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis. *TIPS* **18**, 196-203.
- Lucas, D.R., Newhouse, J.P. (1957) The toxic effects of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol.* **58**, 193-201.
- McAdoo, D.J., Xu, G.Y., Robak, G., Hughes, M.G. (1999) Changes in amino acid concentration over time and space around and impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* **159**, 538-544.

- 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.
- Maxwell, D.J., Christie, W.M., Short, A.D., Storm-Mathisen, J., Ottersen, O.P. (1990) central boutons of glomeruli in the spinal cord of the cat are enriched with L-glutamate-like immunoreactivity. *Neurosci.* **36**, 83-104.
- Meldrum, B. (1991) Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res.* **10**, 55-61.
- Meldrum, B. (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutrition* **130**, 1007S-1015S.
- Morales-Villagran, A., Tapia, R. (1996) Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum *in vivo*. *Neurochem. Int.* **28**, 35-40.
- Morales-Villagran, A., Ureña-Guerrero, M.E., Tapia, R. (1996) Protection by NMDA receptor antagonist against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* **305**, 87-93.
- Morrison, B.M., Morrison, J.H. (1999) Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in superoxide dismutase: a putative mechanism of degeneration. *Brain Res. Rev.* **29**, 121-135.
- Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasi, N., Brown Jr, R.H., Itoyama, Y. (2001) Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci.* **21**, 9246-9254.
- Nakamura, R., Kamakura, K., Kwak, S. (1994) Late-onset selective neuronal damage in the rat spinal cord induced by continuous intrathecal administration of AMPA. *Brain Res.* **654**, 279-285.

- 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.
- Obrenovitch, T.P., Urenjak, J., Zilkha, E. (1996) Evidence disputing the link between seizure activity and high extracellular glutamate. *J. Neurochem.* **66**, 2446-2454.
- Olanow, C.W. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS* **16**, 439-444.
- Olney, J.W. (1969) Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719-721.
- Olney, J.W., Ho, O.L. (1970) Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate. *Nature* **227**, 609-610.
- Olney, J.W., Sharpe, L.G., Feigin, R.D. (1972) Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **31**, 464-488.
- Pardo, C.A., Xu, Z., Borchelt, D.R., Price, D.L., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W. (1995) Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 954-958.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., Gorter, J.A., Bennett, M.V.L., Zukin, R.S. (1997) The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptor in neurological disorders. *TINS* **20**, 464-470.
- 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. *Neurosci.* **101**, 547-561.
- Petralia, R.S., Rubio, M.E., Wang, Y.X., Wenthold, R.J. (2000) Regional and synaptic expression of ionotropic glutamate receptors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 18: Glutamate.* Editors.

Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. Chapter V, 145-182. Elsevier Science.

- Pin, J.P., Duvoisin, R. (1995) Review: neurotransmitter receptors I. the metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol.* **34**, 1-26.
- Pines, G., Danbolt, N.N., Bjoras, M., Zhang, Y., Vendan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.I. (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* **360**, 464-467.
- Plaitakis, A. (1990) Glutamate dysfunction and selective motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: A hypothesis. *Ann. Neurol.* **28**, 3-8.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Scott, R.W., Snider, W.D. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* **13**, 43-47.
- Robinson, M.B., Djali, S., Buchhalter, J.R. (1993) Inhibition of glutamate uptake with L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate potentiates glutamate toxicity in primary hippocampal cultures. *J. Neurochem.* **61**, 2099-2103.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewics, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'reagan, J.P., Deng, H.X., Rahmani, Z., Krizus, A., Yasek, D.M., Cayabyab, A., Gston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., Van der Bergh, R., Hung, W.Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R., Brown jr, R.H. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62.
- Rothstein, J.D. (1996) Excitotoxicity Hypothesis. *Neurology* **47**, 19-26.
- Rothstein J.D., Kuncl, R.W. (1995) Neuroprotective strategies in a model of chronic glutamate-mediated motor neurons toxicity. *J. Neurochem.* **65**, 643-651.

- Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, A., Stauch, B.L., Coyle, J.T. (1990) Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **28**, 18-25.
- Rothstein, J.D., Martin, L.J., Kuncl, R.W. (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *New Engl. J. Med.* **326**, 1464-1468.
- Rothstein, J.D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Kuncl, R.W. (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6591-6595.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13**, 713-725.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., Kuncl, R.W. (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **38**, 73-84.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, I.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Heideger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675-686.
- Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S., Tapia, R. (1994) Decrease of glutamate decarboxylase activity after *in vivo* cortical infusion of γ -aminobutyric acid. *Neurochem. Int.* **24**, 363-368.
- Shaw, P.J. (1999) Calcium, glutamate, and amyotrophic lateral sclerosis: more evidence but no certainties. *Ann. Neurol.* **46**, 803-805.
- Shaw, P.J., Williams, T.L., Slade, J.Y., Eggett, C.J., Ince, P.G. (1999) Low expression of GluR2 AMPA receptor subunit protein by human motor neurons. *NeuroReport* **10**, 261-265.
- Shigemoto, R., Mizuno, N. (2000) Metabotropic glutamate receptors – immunocytochemical and *in situ* hybridization analyses. *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 18: Glutamate*. Editors: Otfersen, O.P., Storm-Mathisen, J. Chapter III, 63-98. Elsevier Science.

- Shin, K., Hitoshi, A., Michiko, I., Haruhiko, S. (1992) Acromelic acid, a novel kainate analogue, induces long-lasting paraparesis with selective degeneration of Interneurons in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* **116**, 145-155.
- Simon, R.P., Swan, J.H., Griffiths, T., Meldrum, B.S. (1984) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* **226**, 850-852.
- Sorkin, L.S. NMDA evokes an L-NAME sensitive spinal release of glutamate and citrulline. *NeuroReport*. **4**, 479-482.
- Sundström, E., Mo, L.L., Seiger, A. (1995) In vivo studies on NMDA-evoked release of amino acids in the rat spinal cord. *Neurochem. Int.* **27**, 185-193.
- Tapia, R. (1998) Cellular and molecular mechanisms of neurodegeneration. *Gac. Med. Mex. Spanish* **134**, 685-703.
- Tapia, R., Sitges, M. (1982) Effects of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* **250**, 291-299.
- 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., Sitges, M., Morales, E. (1985) Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* **361**, 373-382.
- Terro, F., Yardin, C., Esclaire, F., Ayer-Lelievre, C., Hugon, J. (1998) Mild kainate toxicity produces selective motoneuron death with marked activation of Ca²⁺-permeable AMPA/kainate receptors. *Brain Res.* **809**, 319-324.
- Trotti, D., Aoki, M., Pasinelli, P., Berger, U.V., Danbolt, N.C., Brown, Jr. R.H., Hediger, M.A. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *J. Biol. Chem.* **276**, 576-582.
- Trotti, D., Danbolt, N.C., Volterra, A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration?. *TIPS* **19**, 328-334.

- Trotti, D., Rolfs A., Danbolt, N.C., Brown, Jr. R.H., Hediger, M.A. (1999) SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat. Neurosci.* **2**, 427-433.
- Urca, G., Urca, R. (1990) Neurotoxic effects of amino acids in the mouse spinal cord: quisqualate and kainate but not N-metil-D-aspartate induce permanent neural damage. *Brain Res.* **529**, 7-15.
- Vandenberghe, W., Robberech, W., Brorson, J.R. (2000) AMPA receptor calcium permeability, GluR2 expression, and selective motoneuron vulnerability. *J. Neurosci.* **20**, 123-132.
- Van Den Bosch, L., Robberech, W. (2000) Different receptors mediate motor neuron death induced by short and long exposures to excitotoxicity. *Brain Res. Bull.* **53**, 383-388.
- Van Den Bosch, L., Vandenberghe, W., Klaassen, H., Houtte, E.V., Robberech, W. (2000) Ca²⁺-permeable AMPA receptor and selective vulnerability of motor neurons. *J. Neurol. Sci.* **180**, 29-34.
- Velasco, I., Tapia, R., Massieu, L. (1996) Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J. Neurosc. Res.* **44**, 551-561.
- Volterra, A., Bezzi, P., Rizzini, B.L., Trotti, D., Ullensvang, K., Danbolt, N.C., Racagni, G. (1996) The competitive transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur. J. Neurosc.* **8**, 2019-2028.
- Wiedau-Pazos, M., Goto, J.J., Rabizadeh, S., Gralla, E.B., Roe, J.A., Lee, M.K., Valentine, J.S., Bredesen, D.E. (1996) Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **271**, 515-518.
- Williams, T.L., Day, N.C., Ince, P.G., Kamboj, R.K., Shaw, P.J. (1997) Calcium-permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **42**, 200-207.
- Wisden, W., Seeburg, P.H., Monyer, H. (2000) AMPA, kainate and NMDA ionotropic glutamate receptor expression – an *in situ* hybridization atlas. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 18:

Glutamate. Editors. Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. Chapter IV, 99-143. Elsevier Science.

- Yim, M.B., Kang, J.H., Yim, H.S., Kwak, H.S., Chock, P.B., Stadtman, E.R. (1996) A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in K_m for hydrogen peroxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 5709-5714.
- Young, A.M.J., Crowder, J.M., Bradford, H.F. (1988) Potentiation by kainate of excitatory amino acid release in striatum: complementary *in vivo* and *in vitro* experiments. J. Neurochem. **50**, 337-345.
- Young, A.M.J., Bradford, H.F. (1991) N-metil-D-aspartate release excitatory amino acids in rat corpus striatum *in vivo*. J. Neurochem. **56**, 1677-1683.