

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“ESTUDIO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS
DE LA MUERTE NEURONAL PRODUCIDA
POR GLUTAMATO EN RATAS
ENERGÉTICAMENTE DEFICIENTES”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A :

BIOL. PERLA MARIANA DEL RÍO ESTRADA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. DE LOURDES MASSIEU TRIGO



MÉXICO, D.F.

ABRIL 2004

COORDINACIÓN



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

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

NOMBRE: Perla Mariana Del Rio Estrada
 FECHA: 23 Marzo 04
 FIRMA: Perla Mariana Del Rio

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 01 de diciembre del 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) **Del Rio Estrada Perla Mariana**, con número de cuenta 97549554, con la tesis titulada: "Estudio sobre las características de la muerte neuronal producida por glutamato en ratas energéticamente deficientes", bajo la dirección del(a) **Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo**.

Presidente:	Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia
Vocal:	Dr. José Víctor Segovia Vila
Secretario:	Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo
Suplente:	Dr. Julio Morán Andrade
Suplente:	Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 Cd. Universitaria, D.F., a 18 de marzo de 2004.


 Dr. Juan José Morrone Lupi
 Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. LOURDES MASSIEU, EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT, PROYECTO 40306-M) Y DE PAPIIT-UNAM (PROYECTO IN222503), ASÍ COMO POR LA BECA DE MAESTRÍA OTORGADA POR EL CONACyT Y LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO (DGEP).

A DAVID Y A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Lourdes Massieu por ser una tutora excelente que además de ayudarme paso a paso en mi proyecto, me ha hecho sentir que en ella tengo una amiga.

A mis sinodales, Dr. Ricardo Tapia, Dr. Segovia, Dra. Lourdes Massieu, Dr. Julio Morán y Dr. Mauricio Díaz por sus sugerencias y comentarios.

A mi comité tutorial: Dra. Lourdes Massieu, Dr. Julio Morán y al Dr. Mauricio Díaz, por sus comentarios y sugerencias para la realización de este trabajo, así como por la ayuda en mi formación personal.

A Tere Montiel, por ser una ayuda incondicional, tanto en mi trabajo del laboratorio como en mi vida personal. ¡Gracias Tere! definitivamente eres mi segunda madre.

A Ceci por mantener el orden en el laboratorio y por las pláticas tempranas (¡qué buenos chismes!).

A Karla, por ser una amiga excepcional. Gracias amiga, realmente no sé cómo agradecerle tu apoyo incondicional, te quiero mucho.

Gracias a mis compañeros del laboratorio por hacer de éste mi segunda casa; gracias Mari, cookie, Karla, Jana, Octa, Tere, Beto, Ana, Tere y a los agregados culturales (Oscar, Miguelito).

El término de esta tesis significa para mi el término de un mal momento, sin mencionar nombres, gracias a todas aquellas personas que estuvieron a mi lado en esos momentos tan difíciles por que de ustedes tomé las fuerzas para seguir adelante, GRACIAS!

Gracias Enrique por recordarme lo que es ser feliz.

ÍNDICE

	Pág.
Lista de Abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
Introducción.....	3
Glutamato como neurotransmisor.....	3
Receptores a glutamato.....	5
Receptores a AMPA	7
Receptores a Kainato.....	8
Receptores a NMDA	9
Receptores metabotrópicos.....	11
Transportadores de glutamato.....	13
Excitotoxicidad.....	16
Excitotoxicidad y metabolismo energético.....	19
Glutamato y tipo de muerte celular.....	22
El papel del ATP como determinante del tipo de muerte neuronal.....	25
Antecedentes.....	28
Hipótesis.....	29
Objetivo.....	29
Metodología.....	30
Resultados.....	39
Discusión.....	54
Conclusiones.....	61
Referencias.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NP	ácido 3-nitropropiónico
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropionato
EAAC1	acarreador de aminoácidos excitadores - 1
EAAT4	transportador de aminoácidos excitadores - 4
EAAT5	transportador de aminoácidos excitadores - 5
GFAP	proteína acídica fibrilar glial
GLAST	transportador de glutamato / aspartato
GLT-1	transportador de glutamato – 1
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
IOA	ácido yodoacético
KA	ácido kaínico o kainato
MK-801	(+)-5-metil-10, 11-dihidro-5h-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina-maleato
NMDA	N-metil-D-aspartato
PDC	L- <i>trans</i> -pirrolidin-2,4-dicarboxilato
SDH	succinato deshidrogenasa
SNC	sistema nervioso central

RESUMEN

El glutamato es el neurotransmisor excitador de mayor abundancia en el sistema nervioso central de los mamíferos, y bajo ciertas condiciones éste puede ser tóxico. La toxicidad del glutamato se ha vinculado con la muerte subsiguiente a periodos isquémicos y con la neurodegeneración asociada a algunas enfermedades neurodegenerativas crónicas. En años recientes se ha demostrado la relación entre la toxicidad del glutamato y el estado energético celular, y se ha propuesto que los niveles de ATP son determinantes para establecer el tipo de muerte celular, ya sea de tipo necrotico ó apoptótico. En nuestro laboratorio hemos observado que el incremento de glutamato extracelular no produce daño neuronal cuando es inyectado en el estriado de ratas intactas, pero sí cuando las ratas han recibido un tratamiento previo con la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3-NP) (Sánchez-Carbente y Massieu, 1999). También hemos observado una tendencia a disminuir el volumen de daño neuronal cuando a estas mismas ratas se les administra sustratos metabólicos (Massieu et al., 2001), demostrando la importancia de los niveles energéticos y de la integridad mitocondrial en la sobrevivencia neuronal. En este trabajo se utilizó el 3-NP (15 mg / Kg), administrado durante dos días, para inducir una deficiencia energética parcial, en conjunto con la administración intraestriatal de glutamato (500 nmolas). Se analizó la evolución de la lesión producida por el glutamato en ratas intactas y en ratas tratadas previamente con el 3-NP, así como los niveles de ATP estriatales a lo largo del tiempo. Cuando el glutamato se administra 4 h después de la inyección de 3-NP se produce una lesión de tamaño considerable a partir de las 3 h. Los niveles de ATP y ADP disminuyen cerca del 50 % a las 7 h después de la administración de glutamato y se recuperan a las 24 h. La disminución en los niveles de ATP y ADP inducida por el glutamato es similar en las ratas intactas y en las tratadas con 3-NP. La recuperación de los niveles de ATP y ADP puede deberse al incremento de la actividad glucolítica en las células, gliales ó neuronales, que sobreviven al estímulo tóxico. La morfología nuclear indica que, en el sitio de lesión, la muerte inducida por glutamato es similar cuando se administra en ratas intactas y en ratas pretratadas con 3-NP. Los resultados en su conjunto indican que el glutamato tiene un efecto similar sobre los niveles de ATP y la morfología nuclear cuando se administra en el estriado de ratas intactas y de ratas comprometidas metabólicamente, aunque en estas últimas las lesiones son de mayor extensión.

Introducción

El glutamato es el neurotransmisor excitador de mayor abundancia en el sistema nervioso central de los mamíferos. Además de su papel como neurotransmisor también tiene un papel metabólico y participa en procesos de migración, diferenciación y muerte celular durante el desarrollo del sistema nervioso central (Mayer y Westbrook, 1987). La potencialidad excitadora del glutamato en el tejido nervioso fue descubierta por Curtis (Curtis y Watkins, 1960), y posteriormente se identificaron sus receptores utilizando análogos del glutamato y del aspartato. De forma paralela a su capacidad excitadora también se describió la potencialidad neurotóxica del glutamato. Lucas y Newhouse (1957) fueron los primeros en demostrar que la inyección sistémica de glutamato causa degeneración en la retina de ratones inmaduros. Posteriormente Olney (1971) postuló que los aminoácidos excitadores, en especial el glutamato, producen muerte neuronal por la activación continua de sus receptores, proponiendo la hipótesis excitotóxica. Actualmente el concepto de excitotoxicidad ha incorporado otros factores como el estado energético y oxidativo de la célula, así como la regulación de la concentración de calcio intracelular. Todos estos factores, en conjunto, llevan a la muerte neuronal, la cual presenta características tanto apoptóticas como necróticas.

Glutamato como neurotransmisor.

El cerebro tiene una alta concentración de glutamato (Schousboe, 1981) y la mayoría se encuentra en el interior de la célula, principalmente en las vesículas sinápticas. Existen dos procesos principales a través de los cuales se sintetiza el glutamato en el sistema nervioso central, a partir de la glucosa por medio de la transaminación del α -cetoglutarato,

un intermediario del ciclo de Krebs, o a partir de la glutamina por la acción de la glutaminasa.

En las terminales sinápticas, el glutamato es introducido a las vesículas a través de transportadores vesiculares y posteriormente es liberado al espacio extracelular por un proceso exocitótico. La incorporación del glutamato hacia las vesículas está impulsada por el potencial de membrana generado por la ATPasa de H^+ , localizada en la membrana vesicular y que bombea protones hacia el interior vesicular (Danbolt, 2001). Una vez liberado al espacio extracelular, el glutamato ejerce su acción activando a sus receptores, los cuales generalmente se localizan en la neurona post-sináptica. Estos receptores permiten el paso de iones o bien activan cascadas de señalización intracelular (ver receptores a glutamato). El glutamato liberado al espacio extracelular es recapturado por transportadores presentes en las células gliales (ver transportadores de glutamato). Después de su recaptura el glutamato puede ser metabolizado siguiendo diferentes rutas: 1) puede ser convertido a glutamina, por una reacción dependiente de ATP realizada por la enzima glutamina sintetasa, que es específica de las células gliales; o 2) puede ser convertido a α -cetoglutarato por la enzima glutamato deshidrogenasa o por alguna transaminasa. La glutamina sintetizada en los astrocitos puede ser liberada y tomada por las neuronas vecinas donde se utiliza como sustrato para sintetizar glutamato. Este glutamato puede utilizarse como neurotransmisor ó como sustrato metabólico. A esta forma de reciclar el glutamato se le conoce como ciclo del glutamato – glutamina (Fig. 1).

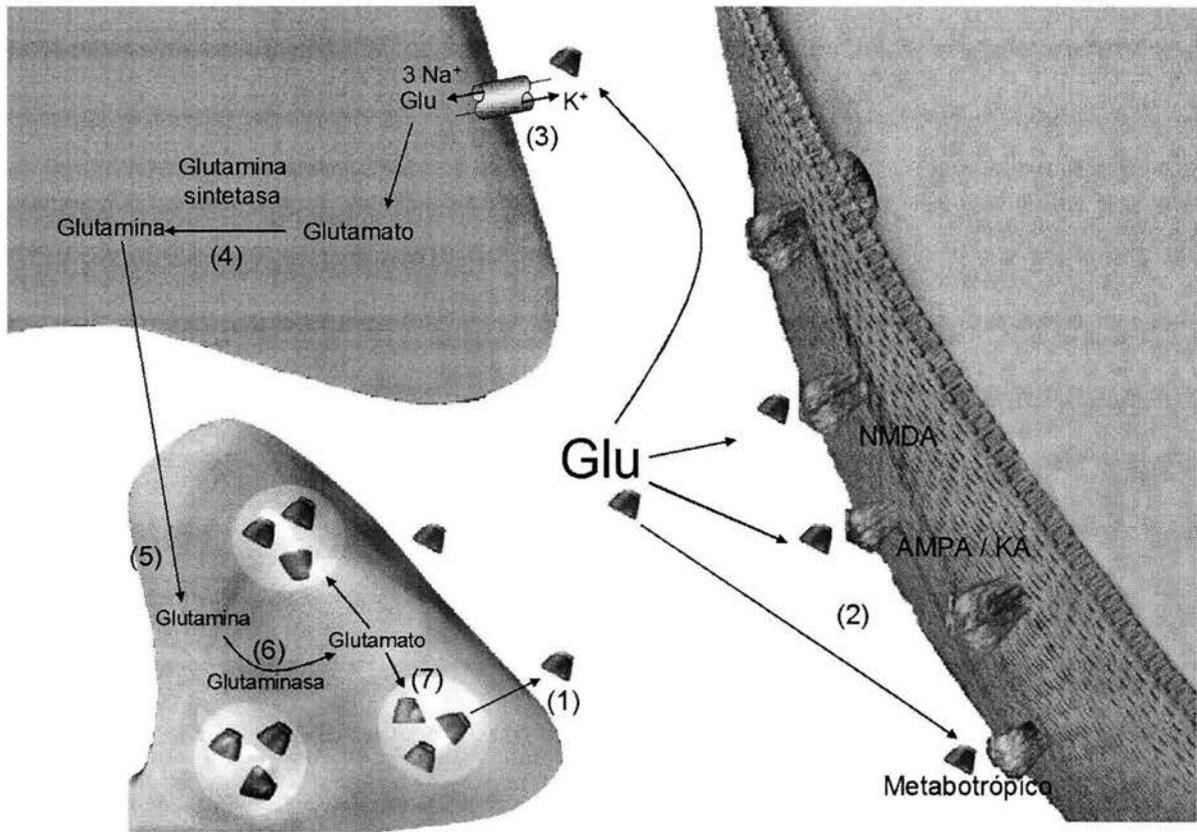


Fig. 1 Metabolismo del glutamato.

El glutamato es liberado hacia el espacio extracelular por un proceso excitotico (1) y activa a sus receptores que generalmente se encuentran en la célula post-sináptica (2). Posteriormente el glutamato es recapturado por sus transportadores, localizados en los astrocitos (3). Los astrocitos sintetizan glutamina a partir del glutamato recapturado por la reacción catalizada por la enzima glutamina sintetasa (4). La glutamina es liberada y posteriormente capturada por las terminales glutamatérgicas (5), una vez dentro de éstas, se vuelve a sintetizar glutamato por la glutaminasa (6). Este glutamato puede reabastecer las vesículas sinápticas (7).

Receptores a glutamato

Los receptores a glutamato pueden dividirse en dos grandes categorías, los metabotrópicos y los ionotrópicos. Los receptores ionotrópicos, como su nombre lo dice, están acoplados a canales iónicos y permiten el paso de Ca²⁺, Na⁺ o K⁺, dependiendo de las distintas subunidades que los conformen. Los receptores metabotrópicos transmiten su señal mediante el acoplamiento a proteínas G.

Los receptores ionotrópicos pueden distinguirse farmacológicamente por tres agonistas selectivos: el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido D-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y el kainato (KA). Los receptores a AMPA y a KA, conocidos como receptores no-NMDA, son mediadores de la transmisión en un gran número de sinapsis excitadoras y los canales que forman son principalmente permeables a Na^+ y K^+ . Los receptores a NMDA contribuyen en gran parte al componente lento de las corrientes excitadoras post-sinápticas y poseen una alta permeabilidad al Ca^{2+} (Fig 2).

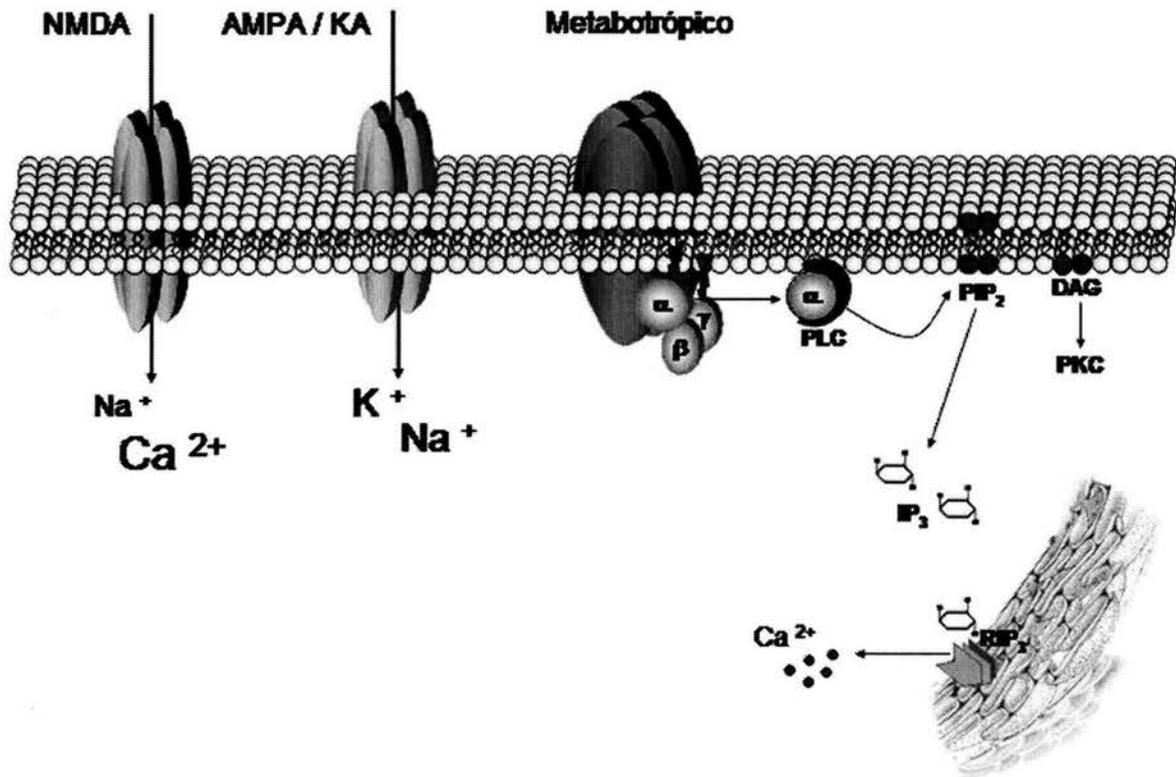


Fig. 2 Receptores a glutamato.

El glutamato puede activar a dos tipos de receptores: los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los primeros se dividen a su vez en receptores de tipo NMDA, que principalmente permiten el influjo de Ca^{2+} , y los receptores no-NMDA, que incluyen los receptores a AMPA y a KA y que permiten el flujo de iones de Na^+ y K^+ . Los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G y activan cascadas de señalización.

- **Receptores a AMPA**

Los receptores a AMPA son los encargados de mediar la transmisión rápida excitadora en la mayoría de las sinapsis del sistema nervioso central. Ésta depende de dos factores: la concentración de glutamato en el espacio extracelular y de las propiedades de estos receptores postsinápticos. Los receptores a AMPA funcionan como complejos pentaméricos y presentan conductancias a Na^+ y K^+ principalmente. Estos receptores tienen una distribución amplia en el SNC, siendo las regiones con mayor expresión de éstos las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y las capas más superficiales de la corteza, seguidas del caudado-putamen y las capas internas de la corteza cerebral. Las regiones con menos expresión de estos receptores son el diencéfalo, el cerebro medio y el tallo cerebral (Ozawa et al., 1998). Un estudio acerca de la distribución subcelular de los receptores a AMPA indicó que éstos se localizan predominantemente en la membrana plasmática de los cuerpos y dendritas de las neuronas post-sinápticas (Petralia y Wenthold, 1992).

Hasta la fecha se han encontrado cuatro subunidades del receptor a AMPA, denominadas GluR1 – GluR4. Las subunidades tienen un tamaño similar (~900 aminoácidos), presentan 70% de homología entre sí, y una baja homología (30-40%) con otros receptores como el de glicina o los receptores al ácido γ -aminobutírico (GABA). Los receptores homoméricos de la subunidad GluR2 presentan poca permeabilidad a Ca^{2+} , mientras que los receptores heteroméricos que contienen a la subunidad GluR2 tienen bajas conductancias al Ca^{2+} , indicando que la conductancia al Ca^{2+} depende de la presencia de la subunidad GluR2. Esta propiedad tan característica de la subunidad GluR2 se debe a la presencia de una arginina (R) cargada positivamente, localizada en el segmento transmembranal M2 de esta subunidad. Las subunidades restantes (GluR1, 3 y

4), presentan una glutamina (Q) con carga neutral en esta misma posición. Este sitio, llamado Q/R, se ubica cerca de la entrada del canal que se forma en estos receptores. La arginina en el sitio Q/R es el resultado del procesamiento alternativo del ARNm, de esta manera el receptor que expresa glutamina cambia las propiedades del receptor (Sommer et al., 1991). En general, las características especiales de los receptores se deben a las diversas modificaciones de las subunidades. Por ejemplo, la misma enzima que genera los cambios en la región Q/R también puede editar el ARNm en otras regiones e incorporar un codón que codifica para glicina (G), en lugar del codón para una arginina; a este sitio se le nombra sitio R/G. Como consecuencia del procesamiento alternativo en esta región, las subunidades de este receptor existen en dos formas diferentes denominadas “flip” y “flop”, que presentan diferentes cinéticas de desensibilización. En general, las isoformas “flop” se desensibilizan más rápido que las isoformas “flip” (Mosbacher et al., 1994).

• **Receptores a Kainato**

Los receptores a kainato fueron descritos originalmente por Watkins y colaboradores (Davies et al., 1979; Watkins y Evans, 1981), trabajos subsecuentes confirmaron la existencia de diferentes subunidades de este receptor. Hasta el día de hoy se conocen 5 subunidades diferentes que pueden formar un receptor funcional (Hollmann y Heinemann, 1994), que están divididas en dos categorías dependiendo del grado de homología y de sus diferentes agonistas. El primer grupo, constituido por las subunidades Glu_{K5}, Glu_{K6} y Glu_{K7}, tiene un 70% de homología entre sí, mientras que el segundo grupo, formado por las subunidades Glu_{K1} y Glu_{K2}, también tienen un 70% de homología entre ellas, pero solo comparte un 40% con el resto de las subunidades. Estos receptores, como todos los receptores glutamatérgicos, se localizan en todo el SNC. Estudios de hibridación *in situ* demostraron que las subunidades Glu_{K5}, Glu_{K6}, Glu_{K7} y Glu_{K2} se localizan principalmente en

la corteza cerebral, el estriado, el hipocampo y el cerebelo; mientras que la subunidad Glu_{K1} se encuentra principalmente en las regiones del giro dentado y CA3 del hipocampo (Heuttner, 2003).

Como características generales de los receptores a KA se puede mencionar que éstos se activan con concentraciones micromolares de domoato y KA, y que se pueden inhibir con lantano y CNQX (Huettnner, 2003). Las diferencias funcionales de estos receptores pueden deberse a la expresión de las diferentes subunidades, al procesamiento alternativo del ARNm y a la interacción con proteínas accesorias. Por ejemplo, los receptores con alta afinidad por sus agonistas son receptores heteroméricos que incluyen a las subunidades Glu_{K1} y Glu_{K2} (Heuttner, 2003). La región carboxilo terminal de las subunidades Glu_{K5}, Glu_{K6} y Glu_{K7} puede procesarse de manera diferente y variar su longitud o sus residuos de aminoácidos y así alterar las interacciones con proteínas accesorias de la célula (Sommer et al., 1992). Muchos de los ARNm de las subunidades de los receptores a KA pueden ser procesados alternativamente para dar como resultado la expresión de receptores maduros. Los ARNm de las subunidades Glu_{K5} y Glu_{K6} son editados y presentan un cambio de un aminoácido en la región del poro que produce cambios en la permeabilidad del receptor (Sommer et al., 1991). La edición del sitio Q/R, descrita anteriormente, determina la conductancia al calcio, de esta manera los receptores que no han sido modificados en este sitio presentan una alta permeabilidad al calcio (Köhler et al., 1993).

- **Receptores a NMDA**

Los receptores a NMDA median la neurotransmisión glutamatérgica de manera distinta a los receptores de tipo no-NMDA. Son receptores que responden al glutamato de manera lenta, por lo tanto su contribución a las corrientes sinápticas se encuentra en el

componente lento de éstas. Los receptores a NMDA generalmente se encuentran bloqueados de forma dependiente al voltaje por un ión Mg^{2+} y tienen altas conductancias al Ca^{2+} . La activación completa de este receptor requiere de la liberación del Mg^{2+} , causada por la despolarización de la membrana, y de un co-agonista, la glicina. El receptor NMDA puede permitir el paso de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ con una proporción de permeabilidad de $Ca^{2+} : Na^+$ de 10:1 (Nicholls, 1995). Fisiológicamente este receptor se ha ligado a fenómenos plásticos como la potenciación a largo plazo que ocurre en el hipocampo. Por otro lado, la activación continua del receptor se ha asociado a la muerte neuronal que ocurre, por ejemplo, durante periodos isquémicos (Choi, 1987).

Se conocen diversas subunidades del receptor a NMDA que al combinarse forman un receptor funcional, de éstas la unidad fundamental es la subunidad NMDAR1, la cual puede formar heterolígomeros con cualquiera de las isoformas de la subunidad NMDAR2 (NMDAR2A –D). La subunidad NMDAR1 fue la primer subunidad clonada, muestra cierta homología con los receptores no-NMDA y tiene cuatro dominios transmembranales y un dominio extracelular largo. Los receptores a NMDA tienen diferentes propiedades dependiendo del ensamblaje de las diferentes subunidades, pero para que exista un receptor funcional es necesario que la subunidad NMDAR1 esté presente con cualquiera de las subunidades NMDAR2. EL sitio de unión del glutamato se encuentra en la subunidad NMDAR2, mientras que el de unión a la glicina está en la subunidad NMDAR1 (Michaelis, 1998).

Una de las propiedades que cambia dependiendo de las subunidades que conforman al receptor es el bloqueo del Mg^{2+} , el cual depende de algunos residuos de aminoácidos que se encuentran en el sitio N de la subunidad NMDAR2. El sitio N se encuentra en la región transmembranal 2 (M2) y es el equivalente a la región Q/R en otros tipos de

receptores. Se ha demostrado que receptores que expresan la subunidad NMDAR2A y B son más sensibles a la inhibición por el Mg^{2+} (Cull-Candy et al., 2001). Por otro lado, existen variantes de la subunidad NMDAR1 que también se forman por el procesamiento alternativo de su ARNm, estas modificaciones afectan la propiedad de desactivación del receptor, especialmente las isoformas que contienen el exón 5 (Cull-Candy et al., 2001).

En general, las subunidades del receptor NMDA están distribuidas en todo el SNC. La subunidad NMDAR1 es la que tiene la distribución más homogénea, no obstante una de las regiones que más expresa estos receptores es la región CA1 del hipocampo. Las regiones que más expresan la subunidad NMDAR2A son la corteza cerebral, el hipocampo, la corteza cerebelar y el bulbo olfatorio. La subunidad NMDAR2B se expresa preferentemente en el telencéfalo; la subunidad NMDAR2C en las células granulares de corteza cerebelar; y la subunidad NMDAR2D en el diencefalo y el tallo cerebral (Michaelis, 1998). La expresión de las subunidades también cambia durante el desarrollo; en la etapa embrionaria la subunidad NMDAR2B se encuentra en casi todas las regiones, mientras que la subunidad NMDAR2D se encuentra en el diencefalo y el tallo cerebral. Después del nacimiento, la subunidad NMDAR2A es la subunidad que se encuentra de manera ubicua, mientras que la NMDAR2C se expresa prominentemente en el cerebelo (Monyer et al., 1994).

• *Receptores metabotrópicos*

Los receptores a glutamato de tipo metabotrópico se descubrieron en 1985 (Sladeczek et al., 1985) y se pueden dividir en 8 diferentes subtipos (mGluR1 – mGluR8). Estos 8 subtipos tienen una estructura primaria semejante, presentan 40% de homología entre ellos y todos tienen 7 regiones transmembranales, característicos de los receptores

acoplados a proteínas G. Una característica de estos receptores es que la región amino terminal extracelular es muy grande y contiene diversos sitios de glicosilación, mientras que la región carboxilo terminal se encuentra en el interior celular y presenta sitios de fosforilación (Masu et al., 1991). Los sitios de unión a los diferentes agonistas se encuentran en la región amino terminal, mientras que en las asas intracelulares están los sitios de activación de las proteínas G y los sitios de acoplamiento de la proteína fosfolipasa C (PLC). Los sitios de expresión de estos receptores son variados, se encuentran en las células de Purkinje, en las células piramidales de la región CA1 y CA3 del hipocampo, en el estriado, el bulbo olfatorio y en la corteza cerebral. Los receptores metabotrópicos de tipo mGluR1 y mGluR2/3 tienen una alta expresión en el hipocampo, el cerebelo, el bulbo olfatorio, la amígdala y en los ganglios basales (Michaelis, 1998).

Los 8 subtipos de receptores metabotrópicos están clasificados en tres grupos dependiendo de la similitud en las secuencias de aminoácidos y de los mecanismos de transducción de señales que activen. El grupo I, comprende a los receptores mGluR 1 y mGluR5; el grupo II incluye a los receptores mGluR2 y mGluR3; y el grupo III está constituido por los receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. El grupo I está acoplado a la vía de la PLC, su activación estimula la PLC con la subsiguiente formación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y la posterior liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico. Farmacológicamente son activados por quisqualato, que es el agonista más potente para este tipo de receptores. Los grupos II y III están acoplados al sistema de la adenilato ciclasa a través de la activación de proteínas G inhibitoras que conlleva a una disminución de los niveles de AMP cíclico. Estos dos grupos se diferencian en la sensibilidad a los diferentes agonistas y en el grado de inhibición de la adenilato ciclasa (Michaelis, 1998).

El papel fisiológico de estos receptores se ha estudiado extensamente mediante la utilización de agonistas y antagonistas. Por ejemplo, se conoce que los receptores mGluR6

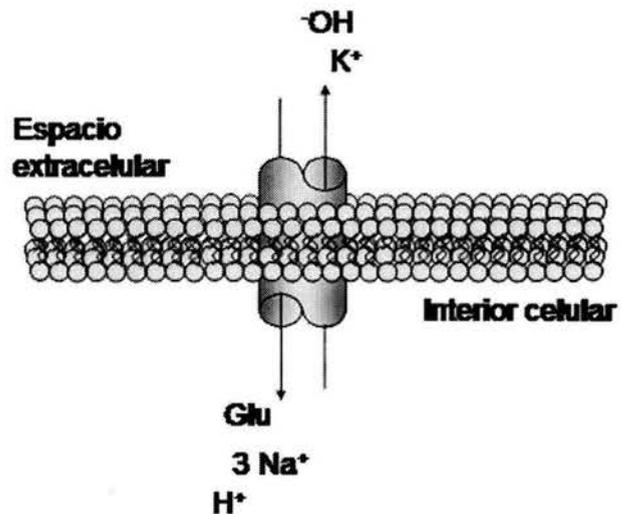
participan en la transmisión glutamatérgica de los fotorreceptores a las células bipolares de la retina (Nakanishi et al., 1998). Se ha propuesto que el papel de los receptores metabotrópicos es el de modular la transmisión sináptica, tal vez por esta razón su localización es tanto pre-sináptica como post-sináptica. También se ha encontrado que algunos receptores metabotrópicos suprimen la transmisión sináptica inhibitoria o excitadora mediante mecanismos pre-sinápticos como la disminución de la liberación de glutamato, provocada por la inhibición de los canales de calcio pre-sinápticos. Este mecanismo inhibitorio se ha demostrado en células del bulbo olfatorio y en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (Ozawa et al., 1998).

Transportadores de glutamato

Como ya se mencionó anteriormente, la acción sináptica del glutamato termina cuando éste es retirado del espacio extracelular. El proceso de recaptura de glutamato lo realizan los transportadores de glutamato que se encuentran tanto en la glia como en las neuronas (Nicholls y Artwell, 1990). La recaptura de glutamato es un proceso que está acoplado al movimiento hacia el interior de la célula de un protón junto con dos ó tres Na^+ , y al transporte hacia fuera de un hidroxilo y un K^+ (Zerangue y Kavanaugh, 1996) (Fig. 3).

Fig. 3 Transporte de glutamato.

La acción del glutamato se termina cuando es eliminado por un sistema de recaptura que se localiza principalmente en las células gliales. El glutamato es transportado hacia el interior celular junto con dos ó tres Na^+ y un protón. Al mismo tiempo un K^+ y un hidroxilo son transportados hacia el exterior celular.



Hasta la fecha se conocen cinco tipos diferentes de transportadores de glutamato dependientes de Na^+ : dos transportadores gliales, GLT-1 y GLAST (transportador de glutamato-1 y transportador de glutamato/aspartato, respectivamente), un transportador neuronal EAAC1 (acarreador de aminoácidos excitadores-1), el EAAT4 (transportador de aminoácidos excitadores-4) que se encuentra principalmente en células de Purkinje y los transportadores EAAT5 (transportador de aminoácidos excitadores-5) localizados en la retina (Gadea y López-Colomé, 2001).

GLT1 y GLAST son transportadores específicos del sistema nervioso y generalmente se encuentran en células gliales, aunque también se han encontrado en neuronas (Danbolt et al., 1992; Rothstein et al., 1994). De los 5 subtipos de transportadores a glutamato el GLT1 es el más abundante en todo el cerebro. En la rata adulta, GLT1 se encuentra principalmente en los astrocitos de la neocorteza, en el estriado y el tálamo (Lehre et al., 1995). En cuanto a la expresión de este transportador en las células neuronales, se ha encontrado que el ARNm de GLT1 se expresa en células piramidales de la región CA3 del hipocampo y en la capa VI de la corteza parietal (Schmith et al., 1997). GLAST es el transportador que más se expresa en el cerebelo y es un transportador que también se

expresa en algunos órganos periféricos como el oído interno. La mayor densidad de GLAST se encuentra en las células de Bergmann del cerebelo y es considerado un componente importante del sistema de transporte de glutamato en éste (Lehre et al., 1995). En la retina, GLAST se expresa predominantemente en los procesos de las células gliales de Müller y es el encargado de la recaptura de glutamato en ésta (Harada et al., 1998). El transportador EAAC1 se encuentra en mayor cantidad en el hipocampo, cerebelo y en los ganglios basales. También se encuentra en células GABAérgicas como en las neuronas de Purkinje en el cerebelo y en la médula espinal (Rothstein et al., 1994), mientras que en la retina se localiza en las células amácrinas y en las células bipolares, pero no en las células de Müller. EAAT4 se encuentran principalmente en las dendritas de las células de Purkinje en el cerebelo (Tanaka, 1999), y se expresa de manera transitoria en el cerebro de la rata durante el desarrollo. Finalmente, el transportador EAAT5 es un transportador que se expresa en mayor cantidad en las células de Müller en la retina (Arriza et al., 1997).

El papel de los transportadores de glutamato se ha estudiado en ratones después de la inhibición de su expresión. Por ejemplo, los ratones carentes de los transportadores GLT1 y GLAST evidenciaron el papel de estas proteínas en la remoción del glutamato, estos animales muestran signos de excitotoxicidad (Tanaka et al., 1997). Esta función de los transportadores de glutamato se hace todavía más evidente durante periodos isquémicos, ya que durante éstos se observa un incremento de los niveles de glutamato asociado al funcionamiento inverso de los transportadores de glutamato dependientes de Na^+ , con la subsiguiente muerte celular. (Benveniste et al., 1984; Seki et al., 1999; Mitani y Tanaka, 2003). Experimentos con ratones deficientes de GLT-1 indican que este subtipo de transportador también tiene un papel importante en la inducción de la potenciación a largo plazo (PLP) a través de la regulación de los niveles extracelulares de glutamato (Tanaka et al., 1997).

Los transportadores de glutamato pueden ser modulados a diferentes niveles, desde la transcripción del ADN, el procesamiento diferencial del ARNm, hasta la síntesis del mismo transportador. La modulación del transporte de glutamato se ha observado en varios modelos experimentales, por ejemplo la eliminación de las aferencias glutamatérgicas reduce la expresión de GLT-1 y GLAST, pero no de EAAC1 (Levy et al., 1995; Ginsberg et al., 1995). La expresión de GLT1 y de GLAST parece ser dependiente de algunas moléculas solubles ya que su expresión se puede incrementar por la activación de los receptores a glutamato, cuando los astrocitos son co-incubados con neuronas (Gegelashvili et al., 2000). Este mismo efecto se puede mimetizar con algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal y puede deberse a la activación de algunos factores de transcripción como el factor CREM y el ATF-1 (Gegelashvili et al., 2000). Los transportadores de glutamato también pueden ser modulados por el estado redox de la célula, ya que presentan varios sitios vulnerables a los oxidantes, en especial varias cisteínas que al ser oxidadas afectan la función de muchas proteínas, entre ellas los transportadores de glutamato (Trotti et al., 1998). Existen otros mecanismos de regulación de los transportadores como vías de señalización que involucran la activación de la PKC, algunas citocinas (Casado et al., 1993; Ganel y Crosson, 1998) y el ácido araquidónico, el cual disminuye la captura del glutamato (Dorandeu et al., 1998).

Excitotoxicidad

La propiedad neurotóxica del glutamato se describió de forma paralela a su característica excitadora. Lucas y Newhouse (1957), fueron los primeros en demostrar que la inyección sistémica del glutamato produce degeneración en la retina de ratones inmaduros. Tiempo después se demostró en ratones en desarrollo que los aminoácidos

excitadores, en especial el aspartato y el glutamato, son capaces de generar la muerte de neuronas que se encuentran en regiones del cerebro que no están protegidas por la barrera hematoencefálica (Olney, 1971). Otros estudios demostraron que compuestos con efectos excitadores como los del glutamato mimetizan la toxicidad de éste por su capacidad despolarizante. Fué Olney quien postuló la hipótesis excitotóxica, que plantea que los aminoácidos excitadores, en especial el glutamato, pueden dañar a las neuronas debido a la activación continua de sus receptores.

La muerte excitotóxica por glutamato es un fenómeno principalmente post-sináptico ya que afecta principalmente a las neuronas y mucho menos a la glia (Choi, 1987). La excitotoxicidad requiere de la activación de los receptores a glutamato, principalmente del NMDA, y tiene características bien definidas que han sido caracterizadas en cultivos de neuronas de corteza y en cultivos de retina. La incubación de cultivos de retina con glutamato (1 mM por 30 minutos) produce muerte celular caracterizada por un hinchamiento de las dendritas y del soma, condensación de la cromatina y vacuolización (Rothman y Olney, 1987). En cultivos de neuronas corticales se han descrito dos fases del daño celular por la exposición a glutamato. Durante la primera, que ocurre minutos después de la incubación con el glutamato (0.5 mM), las células se hinchan y presentan una morfología granular. Este hinchamiento es dependiente de Na^+ y Cl^- extracelular y puede ser mimetizado con agentes despolarizantes como altas concentraciones de K^+ (Choi, 1987). La mayoría de las células recuperan su volumen y sobreviven. La segunda fase ocurre horas después y es dependiente de calcio extracelular. En esta fase las células degeneran y finalmente mueren. Esta fase es mimetizada por agentes que incrementa la concentración de calcio intracelular como el ionóforo A23187 (Choi, 1987). En resumen, la muerte excitotóxica tiene dos componentes independientes, uno rápido caracterizado por el

hinchamiento celular reversible y un componente lento dependiente de calcio que finalmente conlleva a la muerte celular.

El incremento de la concentración de calcio intracelular es uno de los factores determinantes para la muerte excitotóxica (Choi, 1992; Nicholls y Budd, 1998). El flujo de este ión hacia el interior celular puede ocurrir a través de los receptores glutamatérgicos, en especial el NMDA (MacDermott et al., 1986), de los canales de calcio dependientes de voltaje y del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. El aumento de la concentración de este ión en el interior celular despliega una serie de eventos que culminan con la muerte celular. Entre estos eventos están: 1) la activación de proteasas como la calpaína, 2) la activación de fosfolipasas que contribuyen al rompimiento de la membrana celular y a la liberación del ácido araquidónico, cuyo metabolismo favorece la producción de radicales libres, y 3) la producción de radicales libres. Los radicales libres son moléculas altamente reactivas que tienen un electrón desapareado, pueden causar daño al DNA, proteínas y a la membrana celular. La activación de los receptores NMDA produce un incremento en la concentración de calcio intracelular, el cual puede activar enzimas que incrementen la producción de radicales libres como la fosfolipasa A2 y la sintasa del óxido nítrico (Dawson et al., 1992; Schulz et al., 1995b; Gunasekar et al., 1995), agentes antioxidantes pueden atenuar el daño excitotóxico producido por inyecciones intraestriatales de NMDA, KA, y AMPA *in vivo* (Schulz et al., 1995a). El óxido nítrico formado puede reaccionar con el anión superóxido y formar peroxinitrito, el cual induce la peroxidación de los lípidos de la membrana. En resumen, la activación de los receptores glutamatérgicos, en especial del NMDA, produce una entrada excesiva de calcio, éste activa una serie de enzimas que contribuyen al deterioro celular; a su vez, también estimula la producción de radicales libres. Todos estos eventos culminan en la muerte celular (Fig. 4).

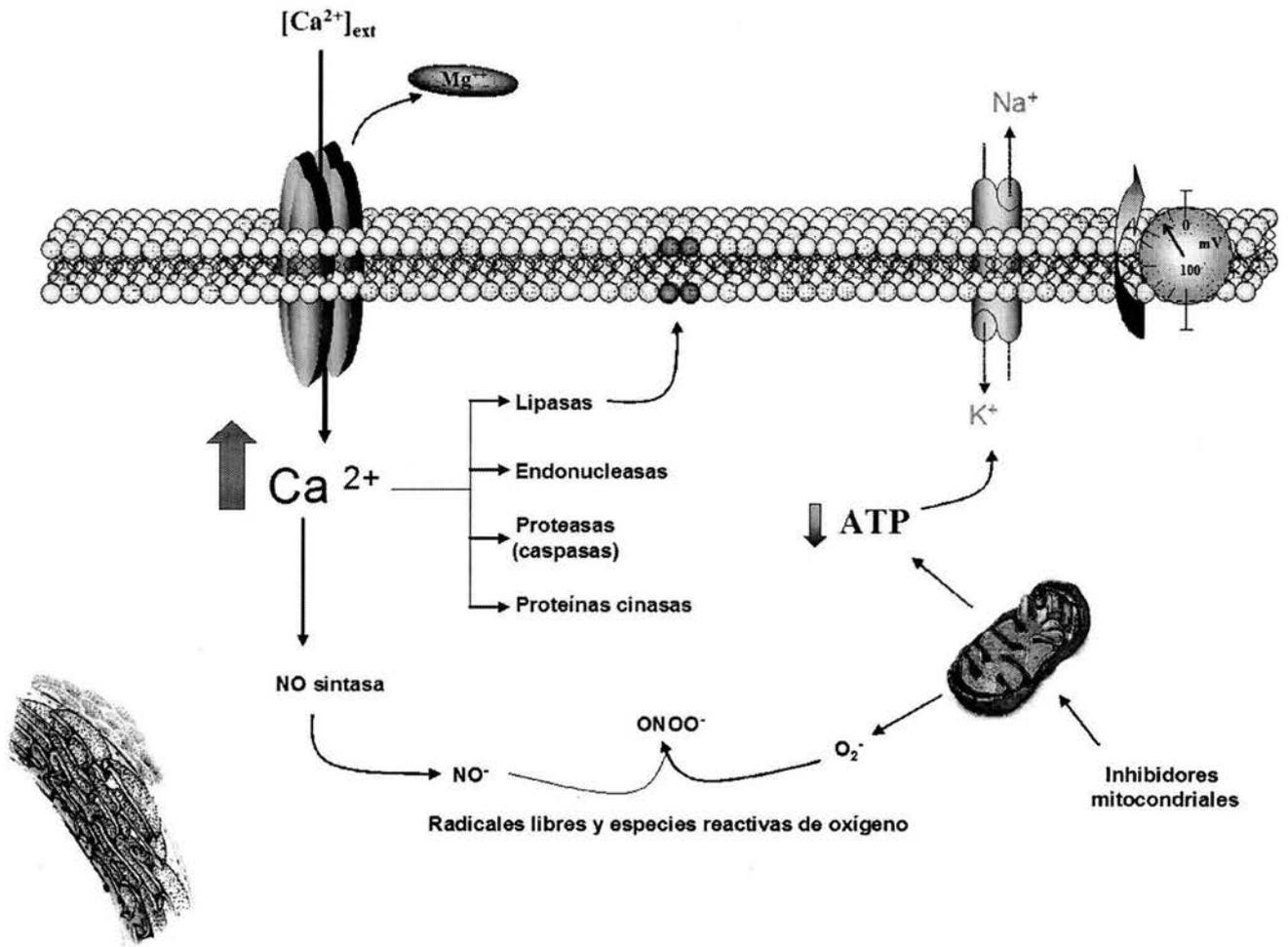


Fig. 4 Mecanismos de excitotoxicidad. Con la activación continua de los receptores a glutamato, en especial del receptor NMDA, se incrementa la concentración de calcio en el interior celular. Este calcio activa enzimas proteolíticas e hidrolíticas que producen daño celular. Por otro lado, también se incrementa la producción de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno. Posteriormente ocurre daño mitocondrial, se disminuyen los niveles de ATP y el funcionamiento de la ATPasa de Na^+ / K^+ . Todos estos eventos, en conjunto, contribuyen al daño neuronal producido por el glutamato.

Excitotoxicidad y metabolismo energético.

La toxicidad del glutamato se ha asociado a la muerte neuronal que ocurre durante periodos de isquemia y de hipoglucemia ya que en éstos ocurre un incremento de los

niveles de glutamato extracelular (Benveniste et al., 1984; Sandberg et al., 1986), y a que la administración de antagonistas del receptor NMDA protegen contra el daño neuronal (Albers et al., 1989; Steinberg et al., 1994). También se le ha asociado a la muerte neuronal que se observa en las enfermedades neurodegenerativas crónicas como la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Beal, 1992; Massieu y García, 1998). En los últimos años se ha observado que el incremento de los niveles extracelulares de glutamato no es suficiente para generar la muerte de células neuronales (Massieu et al., 1995), y se piensa que existen otros factores que en conjunto con el glutamato llevan a la muerte de las neuronas. Se ha propuesto que la toxicidad del glutamato depende del estado energético celular y que su toxicidad se incrementa cuando los niveles energéticos son bajos (Novelli et al., 1998, Green y Greenamyre, 1996).

La primera evidencia que asoció al receptor NMDA con la muerte neuronal durante la inhibición metabólica fue dada por Novelli (1988), quien demostró en cultivos de neuronas de cerebelo que la inhibición del complejo IV mitocondrial vuelve susceptibles a las neuronas a concentraciones subtóxicas de glutamato. Este hecho se ha visto apoyado por estudios posteriores, por ejemplo, Zeevalk y Nicklas quienes demostraron que un estrés metabólico producido por un inhibidor glucolítico, el yodoacetato (IOA), o una concentración baja de glucosa produce lesiones con características excitotóxicas que son revertidas por antagonistas del receptor NMDA como el MK-801 (Zeevalk y Nicklas, 1991, 1992). Estas observaciones se extendieron con modelos *in vivo* que mostraron que toxinas mitocondriales como el ácido 3-nitropropiónico o el malonato, que son inhibidores del complejo II mitocondrial de la cadena de electrones, también producen una degeneración de tipo excitotóxica en el SNC que se previene cuando se utilizan antagonistas del receptor NMDA o cuando se remueven las aferencias glutamatérgicas que llegan al estriado de la

rata (Beal et al., 1993; Wüller et al., 1994, Greene et al., 1993; Henshaw et al., 1994). De esta manera, se vinculó el estado metabólico celular con la toxicidad del glutamato. Existen diversos estudios que demuestran que la deficiencia en el metabolismo energético da lugar a una degeneración nerviosa parecida a la excitotóxica. La caracterización histológica de las lesiones producidas por inhibidores del metabolismo mitocondrial han sido ampliamente estudiadas; éstas presentan características citológicas y neuroquímicas parecidas a las que se presentan con la administración de agonistas glutamatérgicos (Beal et al. 1993; Green et al. 1993). Por ejemplo, la inyección con inhibidores metabólicos como el malonato muestra una disminución del marcador neuronal MAP2 en el área lesionada y una permanencia de las neuronas positivas a la NADPH diaforasa, mismas neuronas que son resistentes a estímulos excitotóxicos y que no mueren en la enfermedad de Huntington (Ferrante et al., 1993). La inyección intraestriatal de 3-NP ó el tratamiento crónico con esta toxina mitocondrial produce una disminución de marcadores de las neuronas espinosas y espinosas medianas del estriado, con un patrón histoquímico comparable al producido por la inyección de AMPA y Kainato (Beal et al. 1993). Observaciones similares se han descrito con otros inhibidores metabólicos como el MPP⁺ (inhibidor del complejo I mitocondrial) (Storey et al. 1992).

Los mecanismos por los cuales la deficiencia metabólica incrementa la vulnerabilidad neuronal a concentraciones subtóxicas de glutamato han sido objeto de estudio. Cox et al. (1989), propusieron que la deficiencia energética parcial, inducida por la privación de glucosa, disminuye los niveles de ATP, los cuales son necesarios para el funcionamiento de la ATPasa Na⁺/K⁺. El mal funcionamiento de esta ATPasa genera un desequilibrio iónico y como consecuencia la despolarización de la membrana, que a su vez produce una activación del receptor NMDA ya que el ión Mg²⁺ que se encuentra bloqueando el canal se libera de manera dependiente del voltaje. Una vez que el Mg²⁺ se ha liberado, la activación

del NMDA puede darse de manera continua y por concentraciones subtóxicas de glutamato (Novelli et al., 1988; Zeevalk y Nicklas, 1992). De esta manera, si la célula tiene su metabolismo energético disminuido ó inhibido, la probabilidad de que el receptor NMDA se active es mayor y por lo tanto que se inicie un proceso de muerte excitotóxico. Por otro lado, el estrés oxidativo también se ha asociado al daño neuronal producido por glutamato y la deficiencia energética (Zeevalk et al., 1998). Los inhibidores metabólicos también inducen la formación de radicales libres *in vivo*, y ésta puede prevenirse con atrapadores de radicales libres (Schulz et al., 1995a). Se han desarrollado estrategias de protección contra el daño excitotóxico por medio de la utilización de antioxidantes como el α -tocoferol, ácido ascórbico ó el β -caroteno, (Beal et al., 1988, Uhler et al., 1994).

En resumen, los mecanismos por los que la inhibición metabólica puede producir un daño excitotóxico son: una pérdida de la homeostasis iónica que, entre otras cosas, produce la activación del receptor NMDA con concentraciones fisiológicas de glutamato; la pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} , y la excesiva producción de radicales libres. Estos dos últimos eventos causan un daño mitocondrial (Nichols y Budd, 1998; Schinder et al., 1996).

Glutamato y tipo de muerte celular

Por lo revisado en las secciones anteriores, queda claro que la activación excesiva de los receptores glutamatérgicos produce muerte neuronal. Sin embargo, el tipo de muerte que se produce sigue siendo un tema muy controversial, se ha observado que la muerte neuronal por glutamato puede producir muerte neuronal con características necróticas

(Choi et al., 1987; Dessi et al., 1993; Sohn et al., 1998) o apoptóticas (Kure et al., 1991; Bonfoco et al., 1995).

Existen dos tipos de muerte celular que son reconocidos generalmente: la necrosis y la apoptosis. Ambos tipos de muerte son diferenciados por sus características morfológicas y bioquímicas. La muerte necrótica, que se asocia a procesos que alteran la homeostasis celular, generalmente es iniciada por un estímulo agudo, la célula presenta un hinchamiento, ruptura de la membrana celular y daño a organelos como la mitocondria. Las células que mueren de manera necrótica liberan el contenido celular al espacio extracelular generando una respuesta inflamatoria (Wyllie et al., 1980; Arends y Wyllie, 1991). Durante la muerte necrótica los niveles de ATP disminuyen de un 70 a un 100 % y existe una gran producción de especies reactivas de oxígeno (McConkey, 1998).

En cambio la apoptosis es un proceso activo y organizado, ocurre fisiológicamente durante el desarrollo y es el proceso por el cual se eliminan del organismo algunas células cancerosas. La apoptosis está caracterizada por presentar condensación del núcleo, ruptura internucleosomal del material genético y no se presenta hinchamiento de los organelos. Durante el proceso apoptótico ocurre la activación de proteasas llamadas caspasas, las cuales son proteasas que rompen en residuos de aspartato. Las caspasas se consideran los principales ejecutores de la muerte apoptótica y se dividen en dos categorías: caspasas iniciadoras (que incluyen las caspasas 1, 2, 8, 9 y 10) y las caspasas efectoras (3, 6 y 7). Algunos sustratos de las caspasas pueden ser la enzima polimerasa poli(ADP-ribosa) (PARP), la cual es inactivada por la caspasa 3; las caspasas también pueden degradar algunos componentes celulares como la laminina. Al final de este proceso se da la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son eliminados de los tejidos por los macrófagos. Este tipo de muerte ocurre durante la degeneración neuronal en las

enfermedades de Alzheimer y la corea de Huntington (Cotman y Anderson, 1995; Portera-Cailliau et al., 1995).

Aparentemente es fácil discernir entre los dos tipos de muerte celular, sin embargo, no se ha demostrado con claridad que la muerte excitotóxica sea de un solo tipo. La primera evidencia que demostró un mecanismo apoptótico fue el hecho que el glutamato produce una fragmentación internucleosomal en neuronas de corteza *in vitro* (Kure et al., 1991). Otros estudios mostraron posteriormente que la muerte neuronal inducida por la activación del receptor NMDA puede ser tanto necrótica como apoptótica, dependiendo de la intensidad del estímulo. La exposición de dosis altas de NMDA (2 mM) produce una muerte necrótica que se observa desde los 30 minutos después de la exposición a éste, mientras que la exposición con dosis bajas genera muerte hasta 18 horas después. Este mismo efecto se observó cuando las células se incubaron con la especie reactiva peroxinitrito (Bonfoco et al., 1995). Posteriormente se observó que el glutamato produce dos tipos de muerte, una muerte rápida de tipo necrótica en la que las neuronas pierden rápidamente el potencial de membrana mitocondrial, con la posterior disminución de la carga energética y una muerte lenta con características apoptóticas. Esta última se presentó en las células que recuperaron su carga energética y regeneraron su potencial de membrana mitocondrial después del estímulo inicial (Ankarcrona et al., 1995). La controversia en cuanto al tipo de muerte que produce el glutamato aún continúa. Se han publicado reportes donde se ha observado las neuronas que mueren después de la exposición al glutamato presentan características de ambos tipos de muerte como condensación de la cromatina pero con ruptura de la membrana celular (Seonghyang et al., 1998). Para complicar más este escenario también se ha propuesto que la muerte excitotóxica es un continuo entre la muerte necrótica y la apoptótica, y que las características morfológicas dependen del tipo

de receptor a glutamato que se estimule (Portera-Caillau, 1997a; 1997b). Con todos estos datos se puede decir que la muerte neuronal debida a la exposición a glutamato depende de la intensidad del estímulo inicial, del estado energético de la célula y del tipo de receptor a glutamato que se esté activando (Bonfoco et al., 1995; Portera-Caillau et al., 1997b; Ankarcrona et al., 1995).

El papel del ATP como determinante del tipo de muerte neuronal.

En la muerte apoptótica, el ATP se requiere para producir algunos cambios morfológicos típicos de este tipo de muerte, como la condensación nuclear y la marginación de la cromatina hacia la membrana nuclear (Kass et al., 1996). También se necesita para la activación de ciertas caspasas, en especial la caspasa 9, ya que se necesita de ATP para la formación del complejo formado por la procaspasa 9, el citocromo c, Apaf-1 y ATP, llamado apoptosoma (Eguchi et al., 1999).

En 1996 Richter et al., propusieron que los niveles de ATP eran los determinantes del tipo de muerte celular que tendrán las células. Cuando éstos disminuyen rápidamente las células mueren de manera necrótica, mientras que si ésta se previene, entonces existirá suficiente energía para llevar a cabo los procesos involucrados en la muerte apoptótica como la hidrólisis enzimática y la condensación nuclear. Usando líneas celulares, se determinó que un cociente ADP/ATP de 0.2 es el umbral para la decisión entre la vida y la muerte: si el cociente es mayor a 0.2 el proceso de muerte no cuenta con suficiente energía para mantener características apoptóticas y las células mueren de manera necrótica (Bradbury et al., 2000). Por otro lado, si los niveles de ATP disminuyen después de haberse

iniciado el proceso apoptótico, entonces ocurrirá una muerte con características necróticas (Pang y Geddes, 1997).

Se han realizado desde entonces varios estudios para conocer el papel del ATP en el destino y tipo de muerte celular. En experimentos con linfocitos T se observó que las células con niveles bajos de ATP morían por necrosis ante estímulos que son conocidos por iniciar una muerte de tipo apoptótica como lo son la estaurosporina y la estimulación del receptor CD95. Las células T a las cuales se les agregó glucosa, y por tanto se les permitió recuperar sus niveles energéticos, restauraron su capacidad de morir por la vía apoptótica (Leist et al., 1997). La manipulación de los niveles de ATP, ya sea por la inhibición glucolítica ó de la cadena de electrones, permitió conocer los eventos que se inhabilitan ante la falta de ATP. Estos eventos son diferentes dependiendo del tipo celular y del estímulo inicial. Por ejemplo, la incubación sin glucosa y con oligomycin previno la activación de la caspasa 3 y la enzima PARP en células Jurkat, una línea celular de linfocitos, sólo cuando éstas fueron incubadas con estaurosporina, pero no cuando se inició la apoptosis por la activación del receptor CD95 (Ferrari et al., 1998). La incubación de células Jurkat con donadores de óxido nítrico también disminuyó los niveles de ATP, en este caso se necesitó una disminución de ATP mayor al 50% para observar cambios morfológicos y prevenir la activación de las caspasas 3 y 7 (Leist et al., 1999). En hepatocitos, la disminución de ATP mayor al 50% previene la liberación del citocromo c hacia el citoplasma, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la activación de las caspasas 9 y 3 generando una muerte con características necróticas (Latta et al., 2000). Con todos estos estudios queda claro que el ATP efectivamente es un determinante para el tipo de muerte celular debido a que éste se necesita en diferentes pasos de la muerte apoptótica. La falta de ATP puede interrumpir este proceso y llevar a una muerte de tipo necrótico.

A pesar de que se ha demostrado que el ATP puede determinar el destino necrótico ó apoptótico en diferentes tipos celulares, aún queda la duda si en el sistema nervioso central, *in vivo*, el ATP es realmente la molécula clave para el destino celular. Recientemente se reportó la existencia de un tipo de muerte neuronal apoptótica dependiente de caspasas y otro tipo de muerte independiente de caspasas, pero ambos dependientes de los niveles energéticos (Ohgoh et al., 2000). Esto indica que existen otros factores dependientes de ATP que pueden influenciar el tipo de muerte neuronal. En cultivos de células granulares de cerebelo, Ankarcona et al. (1995), demostraron que un 30-50% de las células expuestas a glutamato mueren por necrosis presentando ruptura de la membrana celular, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y disminución de los niveles de ATP. Las células que recuperan tanto el potencial de membrana mitocondrial como los niveles energéticos, sobreviven temporalmente, pero mueren tiempo después por apoptosis (Ankarcona et al., 1995). De manera similar, la exposición de cultivos neuronales al 3-NP, un inhibidor del complejo II mitocondrial, produce una muerte rápida con características necróticas que involucra un proceso excitotóxico y una deficiencia energética severa. Las células que sobreviven mueren posteriormente de manera apoptótica e independiente de la activación de los receptores a glutamato (Pang y Geddes, 1997). En presencia de glutamato, se induce un cambio en el tipo de muerte hacia la necrosis. Este cambio está asociado a una mayor disminución de los niveles de ATP, un incremento del calcio intracelular y a una despolarización mitocondrial rápida (Nasr et al., 2003). Esto indica que en las neuronas, los niveles de ATP también determinan el tipo de muerte celular. En estas células la muerte necrótica también se asocia a una disminución excesiva de los niveles de ATP, mientras que en la muerte apoptótica los niveles de ATP no se modifican tanto.

Antecedentes

No cabe duda que la activación de los receptores a glutamato produce muerte neuronal, sin embargo no existe una relación directa entre el incremento de los niveles de glutamato y la muerte neuronal (Obrenovitch y Urenjak, 1997; Massieu et al., 1995; Tapia et al., 1999). Diversos estudios han demostrado que el incremento en los niveles extracelulares de glutamato no es suficiente para producir neurodegeneración (Massieu et al., 1995; García y Massieu, 2003). Dada la participación de éste aminoácido en la muerte neuronal asociada a la isquemia y a la hipoglucemia, condiciones en las que existe una falla energética importante, se ha sugerido que la deficiencia energética pueda ser determinante en la muerte celular.

Con base en este conocimiento, en el laboratorio hemos utilizado la toxina mitocondrial, el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) a dosis subtóxicas, para producir una inhibición parcial del metabolismo mitocondrial y exacerbar los efectos tóxicos del glutamato. La administración de una sola inyección sistémica de 3-NP (20 mg / Kg) no produce lesión estriatal, pero sí facilita los efectos tóxicos de un inhibidor del transportador de glutamato, el L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC), el cual incrementa significativamente los niveles extracelulares de glutamato y aspartato (Massieu et al., 1995; Sánchez-Carbente y Massieu, 1999). Las lesiones producidas por el PDC en el estriado o en el hipocampo de la rata se incrementan significativamente en las ratas tratadas con 3-NP (Sánchez-Carbente y Massieu, 1999; Massieu et al., 2001). Por otra parte, la administración de sustratos energéticos alternativos a la glucosa, como el piruvato o el acetoacetato, previene parcialmente la muerte excitotóxica inducida por PDC en ratas previamente tratadas con 3-NP (Massieu et al., 2001). Estos resultados confirman que las células nerviosas son vulnerables a la acumulación de glutamato extracelular cuando su

metabolismo energético se encuentra alterado y sugieren que la muerte neuronal producida por glutamato *in vivo* está influenciada de forma importante por el metabolismo energético celular.

HIPOTESIS

El incremento en la vulnerabilidad neuronal a la toxicidad del glutamato en condiciones de inhibición metabólica *in vivo*, está relacionado con una disminución rápida y significativa de los niveles de ATP.

OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el papel del estado energético celular en la muerte neurona inducida por la administración de glutamato en el estriado de la rata *in vivo*.

Para cumplir este objetivo nos interesó lo siguiente:

1. Conocer si la administración sistémica de dos dosis de 15 mg / kg de 3-NP produce una deficiencia metabólica.
2. Conocer si la posible deficiencia metabólica producida por el 3-NP da lugar al daño neuronal en el estriado de la rata.
3. Conocer si una dosis subtóxica de glutamato produce daño neuronal en el estriado de ratas tratadas previamente con 3-NP.
4. Conocer el efecto de la administración de glutamato sobre el estado energético celular en ratas intactas y en ratas tratadas previamente con 3-NP.

METODOLOGÍA

Diseño Experimental

Con base en los antecedentes citados anteriormente, se desarrolló un modelo experimental que permitió estudiar la muerte neuronal inducida por glutamato en condiciones de inhibición metabólica. Para inducir la deficiencia metabólica se utilizó la toxina mitocondrial 3-NP. El 3-NP es una toxina capaz de entrar rápidamente al cerebro e inactivar a la SDH, se conoce que el 3-NP produce una lesión en el estriado de la rata únicamente cuando es inyectado crónicamente (Brouillet et al., 1999). En base a estudios previos del laboratorio, conocemos que la administración de una o dos dosis de 15 a 20 mg / Kg de 3-NP no son suficientes para producir muerte neuronal en el estriado de la rata, pero sí para facilitar la toxicidad del PDC (Sánchez-Carbente, 1999; Massieu et al., 2001). En el presente estudio decidimos modificar el modelo utilizado anteriormente y administrar una dosis subtóxica de glutamato (500nmol / μ l) en vez de PDC a ratas previamente tratadas con dos inyecciones de 3-NP. La utilización del glutamato permite estudiar los efectos de una elevación súbita y transitoria de los niveles de glutamato sin alterar sus sistemas de remoción. Recientemente se reportó que el PDC produce un aumento en las especies reactivas de oxígeno, debido a que inhibe el transporte de cisterna y por lo tanto, los niveles de glutatión (Himi et al., 2003). En el modelo estudiado descartaríamos éste y algunos otros posibles efectos colaterales del bloqueo del transportador de glutamato.

• **Tratamientos**

En todos los experimentos se utilizaron ratas de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 300 g, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Los animales tuvieron agua y alimento *ad libitum*.

Las ratas recibieron dos dosis de 3-NP (15 mg / Kg), la segunda inyección se administró 24 h después de la primera. El 3-NP se disolvió en buffer de fosfatos (10 mM) y se ajustó a un pH de 7 con NaOH (1 M). 4 h después de la última administración de 3-NP las ratas se inyectaron intraestriatalmente con glutamato (500 nmolas en un volumen total de 1 μ l). El ácido glutámico fue disuelto en buffer de fosfatos (10 mM). Las ratas control se inyectaron con buffer de fosfatos (10 mM, pH 7.5). Los cerebros de las ratas fueron procesados para determinar los niveles de ATP, ADP y lactato, realizar la inmunohistoquímica de la proteína GFAP (glial fibrillary acidic protein), marcador de células gliales, y para cuantificar los núcleos condensados y fragmentados dentro de la lesión.

Para realizar las inyecciones intraestriatales de glutamato, las ratas se anestesiaron con 3.5 % de halotano en una mezcla de O₂ 95 % y CO₂ 5%. Una vez anestesiadas se montaron en un aparato estereotáxico y se fijaron de los espacios interaurales con la barra dental en la posición -3.3. Durante la cirugía la anestesia se mantuvo entre 2 y 1.5 % de halotano. Las coordenadas utilizadas fueron: anteroposterior: + 0.7, lateral: + 2.8 y vertical: -4; de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986). Después de perforar el cráneo, se inyectó el glutamato unilateralmente (500 nmolas totales en un volumen de 1 μ l). La inyección se realizó a un flujo de 0.5 μ l / min a través de una aguja conectada por medio de una cánula a una jeringa Hamilton de calibre 27 y con la ayuda de una bomba de microinyección. Al terminar la inyección, se dejaron pasar 2 minutos antes de retirar la aguja. Después la piel fue suturada. Los animales control recibieron una inyección intraestriatal de buffer de fosfatos (10 mM).

Evaluación de la deficiencia metabólica

A) Determinación de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH).

Para determinar la actividad de la enzima SDH se siguió el método histoquímico utilizado por Brouillet et al. (1998). La actividad de esta enzima fue cuantificada en el estriado de ratas tratadas con 3-NP, para lo cual se utilizó succinato como sustrato específico de la enzima y un aceptor de electrones llamado Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Los cortes incubados con succinato y NBT adquieren una coloración azul debido a las sales de formazan que se producen cuando el NBT recibe los electrones generados por la actividad de la enzima en presencia de su sustrato. La densidad óptica del color azul fue cuantificada en un sistema analizador de imágenes (NIH Macintosh Image, versión 1.6) como se describe posteriormente.

Las ratas recibieron dos inyecciones i.p. de 3-NP (15 mg / Kg) y se sacrificaron a las 1, 2, 4, 7, 11 y 24 h después de la segunda administración de 3-NP. Para sacrificar a las ratas, éstas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital (1ml). Posteriormente fueron perfundidas transcárdiacamente con 100 ml de solución salina (NaCl 0.9%) seguidos de 100 ml de PBS frío con 10% glicerol. Inmediatamente después de la perfusión, se retiró el cerebro del cráneo y se congeló en alcohol isoamílico. Los cerebros se guardaron en congelación a -70°. Se obtuvieron cortes coronales de 16 μm en un criostato. Posteriormente los cortes se montaron sobre portaobjetos y se guardaron a -20° durante 1 ó 2 días.

Los cortes se incubaron con PBS a 37° por 10 minutos. Para la tinción de los cortes se agregó una mezcla que contiene succinato (0.05M), NBT (0.3mM) y buffer de fosfatos

(0.05M pH 7.6). Los cortes se incubaron con esta mezcla a 37° por 30 minutos. La reacción se detuvo agregando PBS frío por 5 minutos. Los cortes se lavaron con agua destilada por unos segundos y se dejaron secar.

Para cuantificar la densidad óptica, se escogieron de 6 a 9 cortes por rata, todos entre las coordenadas correspondientes a la región del estriado (0.2 a 1.0 mm anterior a Bregma, según el atlas de Paxinos y Watson, (1986). Los cortes que no se incubaron con succinato no adquieren esta coloración. Una vez capturada la imagen en la computadora, se delineó el perímetro del estriado y se calculó la densidad óptica correspondiente al área marcada (mm^2). La densidad óptica de los controles (con un promedio de 15846 ± 71.69 pixeles) fue considerada como el 100 %. Los resultados se presentan como % de actividad con respecto a las ratas control.

B) Determinación de los niveles de ATP, ADP y AMP en el estriado de la rata.

Los niveles de ATP, ADP y AMP se cuantificaron por medio de HPLC. Para sacrificar a las ratas se usó el método de congelación *in situ* descrito por Suzanne y Geiger (1996). Para esto las ratas fueron anestesiadas con halotano (3.5 %) y se colocaron en un aparato esteroetáxico, durante el procedimiento la anestesia se mantuvo al 1%. Para exponer el cerebro, se removió un segmento del cráneo, se vertió nitrógeno líquido directamente al cerebro hasta que la rata presentó un paro respiratorio (signo del congelamiento del tallo cerebral). Se removió el cerebro del cráneo y se guardó a -70°.

Posteriormente se realizó la disección del estriado en un cuarto frío (4°) y sobre hielo seco. El tejido se pesó y se homogenizó con ácido perclórico (8 %) con una relación 1:10 p/v y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y éste se

neutralizó con K_2CO_3 (2 M), agregando aproximadamente el 12 % del volumen de ácido perclórico añadido inicialmente. Las muestras se quedaron en congelación. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron en una microcentrifuga durante 10 segundos. Se colectó el sobrenadante y éste se utilizó para cuantificar los niveles de ATP.

Para la cuantificación de los nucleótidos, se tomaron 25 μ l de una dilución 1:4 de la muestra neutralizada y se inyectaron en el sistema de HPLC (LD / Milton Roy). Se utilizó una columna μ bondapack C18 (3.9 x 300 mm, Waters). La fase móvil consistió de buffer de KH_2PO_4 (0.1M, pH 6) y 10 % de metanol con un flujo de 1.5 ml / min. Los nucleótidos se detectaron con luz UV a 250 nm. Para cuantificar los niveles de ATP, ADP y AMP se utilizaron estándares externos, los picos de los nucleótidos fueron identificados con los tiempos de retención. Los datos se expresan como pmolas / μ g de peso de tejido.

C) *Determinación de los niveles de lactato.*

Para la cuantificación de los niveles de lactato, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con 3-NP y 4 h después inyectadas intraestriatalmente con glutamato. Los tiempos de sacrificio fueron a las 7 y 24 h después de la inyección de glutamato. Otro grupo de ratas sólo recibió la inyección de glutamato y éstas fueron sacrificadas a los mismos tiempos. Las ratas se sacrificaron por decapitación e inmediatamente después se realizó la disección del estriado. El tejido se pesó y se homogenizó en agua (proporción 1:10 p/v). Se agregó ácido perclórico (5% del volumen) para precipitar las proteínas. Los homogenados se centrifugaron por 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se neutralizó con KOH (1M). Este sobrenadante se utilizó para cuantificar la cantidad de lactato en el tejido.

Para la cuantificación del lactato se utilizó un kit de determinación de lactato (Sigma). El kit utilizado se basa en un ensayo enzimático donde el ácido láctico es convertido a piruvato y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la lactato oxidasa. El H_2O_2 formado es degradado por la peroxidasa que a su vez produce la condensación oxidativa de un cromóforo. La coloración de éste es medida a 540 nm en un espectrofotómetro. Se colocaron 150 μ l del homogenado y 860 μ l de un buffer de reacción reconstituido con 10 ml de agua y que contiene a la enzima lactato oxidasa y a la enzima peroxidasa (pH 7.2). Se dejan pasar 5 minutos y se registra la lectura de la absorbancia a 540 nm. Para conocer las concentraciones de lactato se utilizó como referencia una curva de calibración con concentraciones de 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg de lactato/ dl. Para determinar la cantidad de lactato en el tejido se utiliza esta curva de calibración como referencia, los datos se muestran como μ mol de lactato / g de peso fresco.

Evaluación de la presencia de daño neuronal

A) Cuantificación del volumen de lesión.

Para cuantificar el volumen de lesión producido por el glutamato, las ratas fueron sacrificadas a las 2, 3, 4, 7 y 24 h después de la inyección intraestriatal de éste. Para esto, las ratas recibieron una sobredosis de pentobarbital (1 ml). Posteriormente, las ratas fueron perfundidas transcárdicamente con 250 ml de solución salina (NaCl 0.9 %) seguidos de 250 ml de formaldehído al 10 % en buffer de fosfatos (10 mM) pH 7.4. Los cerebros se removieron del cráneo y se dejaron en el fijador por 24 h. Posteriormente los cerebros se pasaron por un gradiente de sacarosa al 20 y 30 % disuelta en buffer de fosfatos 1 mM (0.1 %). Se obtuvieron cortes coronales de 40 μ m por medio de un criostato. Los cortes fueron montados en portaobjetos y después teñidos con violeta de cresilo.

Para cuantificar el volumen de lesión los cortes fueron analizados en un microscopio óptico, y se cuantificó el área de lesión de todos los cortes donde el daño fue visible. Ésta se visualiza como una zona pálida debida al encogimiento ó desaparición de las células y por lo tanto a la ausencia de tinción con el violeta de cresilo. Para esto se delineó manualmente el área lesionada y se cuantificó el área de lesión con la ayuda de una cámara acoplada a un sistema de análisis de imágenes NIH para Macintosh (NIH 1.6). El volumen de lesión se calculó de la siguiente manera: se realizó la sumatoria del área de lesión del número total de cortes analizados multiplicado por el grosor de cada corte (40 μm) y por el número total de cortes analizados.

B) Cuantificación de núcleos condensados y fragmentados

Para detectar la presencia de núcleos condensados o fragmentados, se realizó una tinción con Hoechst 33258. Éste es un compuesto permeable a la membrana que se une específicamente a pares de bases de A-T del ADN y que tiñe la cromatina nuclear. Para estos ensayos, las ratas fueron sacrificadas a diferentes tiempos después de la inyección intraestriatal de glutamato (2, 4, 7 y 24 horas), las ratas fueron perfundidas con 250 ml de solución salina (NaCl 0.9%) seguidos de 250 ml de formaldehído al 5 % en buffer de fosfatos. Los cortes se pasaron por un gradiente de sacarosa y se hicieron cortes de 20 μm en un criostato.

Para la tinción con Hoechst, los cortes se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos con D-PBS. Posteriormente se incubaron con Hoechst (0.01% en D-PBS) a temperatura ambiente en un cuarto oscuro. Los cortes se lavaron dos veces con D-PBS y se cubrieron con una resina a base de agua llamada Fluoromount-G (Electrón Microscopy Sciences). Los cortes se visualizaron en el microscopio con un filtro de fluorescencia UV-2A. Primeramente se localizó la lesión y se cuantificó el número de núcleos condensados o fragmentados, así como el número total de núcleos por campo visualizado dentro de la

lesión. Se cuantificaron los núcleos de 5 campos diferentes (2 cortes por animal). Los resultados se muestran como % de células con núcleo condensado y/o fragmentado.

C) Inmunohistoquímica contra GFAP

Se realizó una inmunohistoquímica contra la proteína GFAP (glial fibrillary acidic protein), la cual sólo se encuentra en células gliales. Para esto, las ratas fueron perfundidas con 250 ml de solución salina seguidos de 250 ml de paraformaldehído 4 % en buffer de fosfatos (0.1 M). Los cerebros se pasaron por un gradiente de sacarosas y se hicieron cortes de 40 μm que se mantuvieron en buffer de fosfatos hasta realizar la inmunohistoquímica.

Para la inmunohistoquímica, los cortes se lavaron tres veces en PBS (0.1M) y posteriormente se realizó un bloqueo incubando el tejido por 2 horas en buffer PBSGT, que contiene PBS (0.1 M), suero de cabra (1:100) y triton (0.3%), a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario. Este anticuerpo es un anticuerpo policlonal que reconoce a la proteína GFAP, se utilizó una dilución 1:2000 en PBSGT y se incubó por 72 horas a 4°. Posteriormente los cortes se lavaron en PBS y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario AntiRabbit IgG (biotinilado) con una dilución 1:200 en PBSGT.

Para visualizar la unión del anticuerpo se utilizó el complejo Avidina-Biotina (Kit ABC peroxidase-rabbit IgG Vectastain Elite, Vector Laboratories), el cual se pega al anticuerpo secundario. Para esto, los cortes se incubaron con este complejo durante 2 horas a temperatura ambiente. Para el proceso de revelado se utilizó 3,3'-diaminobenzidina (DBA) como cromóforo; los cortes se lavaron tres veces y se incubaron en una solución que contenía DBA 30 mg / 50 ml de TRIZMA (0.1M) y peróxido de hidrógeno (1 μl /ml). Los

tejidos se incubaron por 5 min. hasta obtener una coloración café. Los cortes se montaron en portaobjetos y se cubrieron con Permount.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de significancia de Fisher, utilizando el programa de estadística Statview 4.5. Todos los resultados se presentan como media \pm error estándar.

Resultados

El 3-NP es una toxina que inhibe a la enzima succinato deshidrogenasa, la cual forma parte del complejo II mitocondrial y del ciclo de Krebs. Estudios *in vivo* han demostrado que esta enzima se inhibe rápidamente después de una administración sistémica de 3-NP (Brouillet et al., 1998; Massieu et al., 2001). Dado que nos interesaba conocer el efecto tóxico del glutamato en condiciones de inhibición mitocondrial parcial, primeramente se quiso conocer el grado de inhibición de la SDH después de dos administraciones intraperitoneales de 3-NP. Para esto, las ratas se trataron con una inyección diaria de 3-NP (15 mg/Kg) durante dos días y se sacrificaron a las 1, 2, 4, 7, 24 horas después de la última inyección, como se describió en la metodología.

Cuando se cuantificó la actividad de la SDH, se observó que la enzima se encuentra inhibida en un 60 % desde la primera hora y se mantiene inhibida hasta las 7 h. A partir de las 11 h comienza una pequeña recuperación de la actividad enzimática (55%), la cual es más evidente a las 24 h (77 % de actividad), aunque ésta no es total (Fig. 5). Ninguna de las ratas presentó lesión en el estriado (Fig. 7) y tampoco mostraron alteraciones conductuales como las descritas por Hamilton y Gould (1987) después de una administración crónica de esta toxina. A pesar de que la actividad de la SDH se encuentra disminuida significativamente desde la primera hora, el tratamiento con 3-NP no disminuye significativamente los niveles de ATP ni de ADP a tiempos cortos. Los niveles de ATP disminuyen un 40% y los de ADP un 34% a las 11 h después de la segunda inyección de 3-NP (Fig. 8 y 9). Al parecer se requiere que la SDH esté inhibida continuamente para que la disminución de ATP sea evidente. De manera similar a la actividad de la enzima, los niveles de ATP y ADP se recuperan 28 h después, tiempo en el que la actividad de la SDH es del

77%. Posiblemente la recuperación de los niveles de ATP y ADP se deba en parte a esta recuperación en la actividad de la SDH.

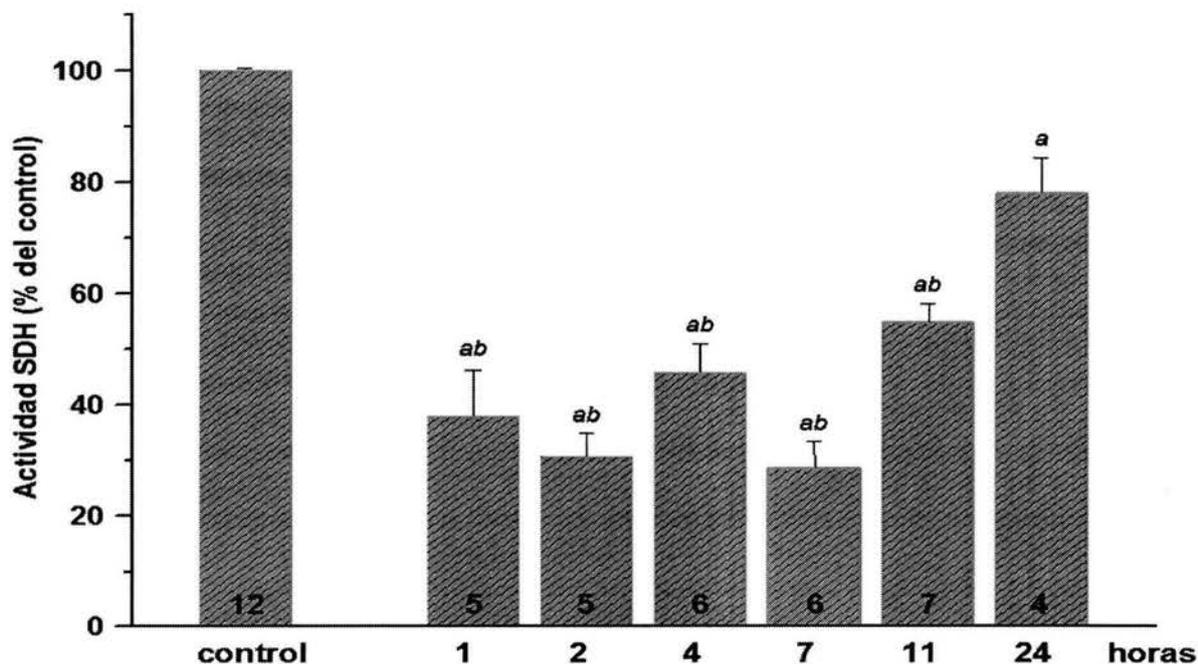


Fig.5 Curso temporal de la actividad de la enzima SDH en el estriado de ratas tratadas con 3-NP (15 mg / Kg) por dos días. La actividad de la SDH fue cuantificada con un método histoquímico en cortes de cerebro a través de una técnica colorimétrica (Brouillet et al. 1998; Massieu et al. 2001). Los datos mostrados son promedios \pm error estándar y fueron analizados a través de una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. *a* = $P < 0.05$ con respecto al control. *b* = $P < 0.05$ con respecto al dato de 24 horas. La n de cada grupo se muestra dentro de cada barra.

Dada la importancia del estado energético celular en la toxicidad del glutamato, se quiso conocer la evolución del daño producido por el glutamato cuando éste se inyecta en el estriado de ratas que tienen una deficiencia energética moderada. El glutamato se inyectó en el estriado de las ratas y éstas se sacrificaron a las 2, 4, 7 y 24 h después de la inyección de glutamato. En las ratas tratadas con 3-NP, el glutamato se inyectó 4 h después de la última inyección de 3-NP, tiempo en el que la SDH se encuentra inhibida significativamente. La dosis de glutamato utilizada en este trabajo produce una lesión muy

pequeña ($17.13 \pm 3.76 \text{ mm}^3$) que no es significativamente diferente a la lesión producida por su vehículo ($6.28 \pm 0.579 \text{ mm}^3$, analizados 24 horas después de su administración). La lesión producida por el glutamato presenta un tamaño similar en todos los tiempos estudiados y abarca únicamente el trayecto hecho por la aguja. En contraste, la lesión producida por el glutamato cuando las ratas fueron tratadas previamente con 3-NP es significativamente mayor a la producida por el glutamato inyectado en ratas intactas y se puede observar claramente a partir de las 3 h. En los cortes teñidos con violeta de cresilo la lesión se distingue por la falta de tinción en la zona donde las células están encogidas o muertas (Fig. 7). Dentro de esta zona de color pálido, se pueden observar células que han perdido su morfología y la presencia de muchos núcleos picnóticos, condensados ó fragmentados. Al cuantificar el volumen de lesión se observó que éste tiende a incrementarse progresivamente, observándose el máximo volumen de lesión a las 7 h ($110.5 \pm 26.24 \text{ mm}^3$) (Fig.6).

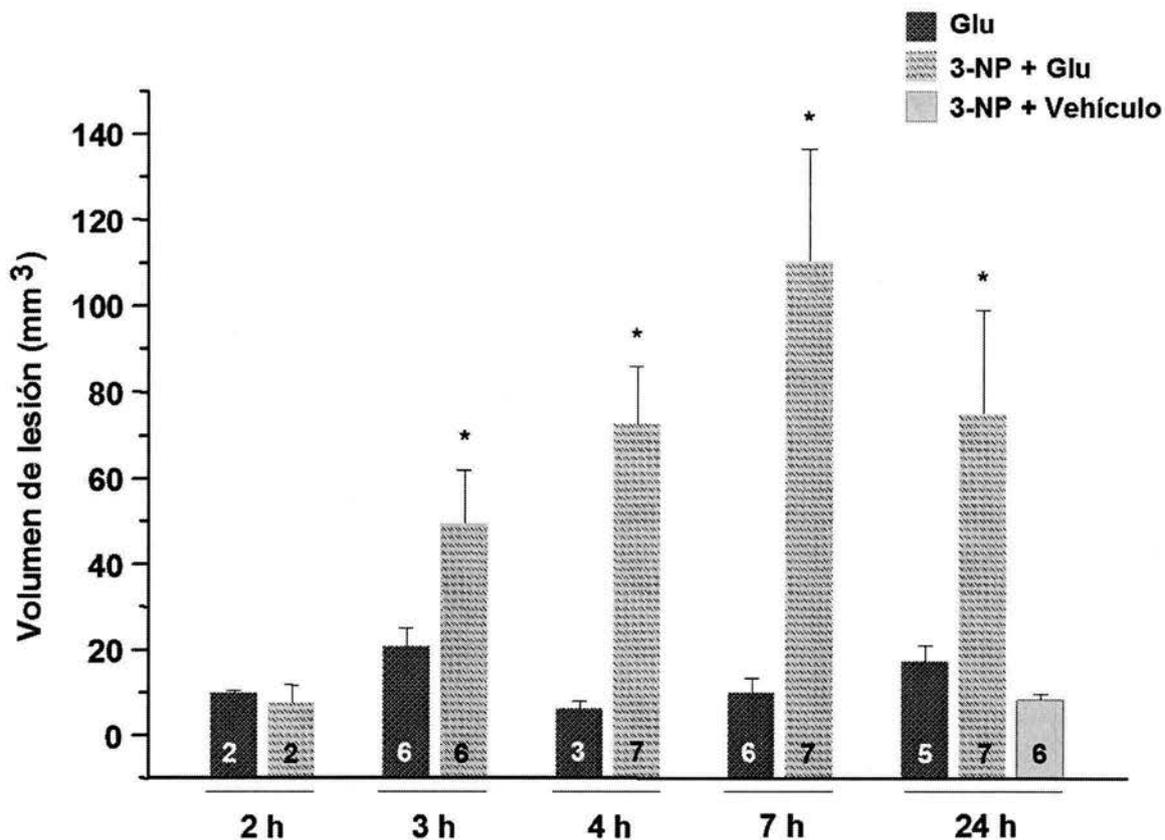


Fig 6. Cuantificación del volumen de lesión producido por glutamato en ratas intactas y en ratas pretratadas con 3-NP, éste se determinó en cortes de cerebro a través de un analizador de imágenes, como se describe en la metodología. Las ratas se sacrificaron a diferentes tiempos después de la inyección intraestriatal de glutamato. *P < 0.05 con respecto al control. La n de cada grupo se muestra dentro de cada barra. Los datos fueron analizados a través de una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple.

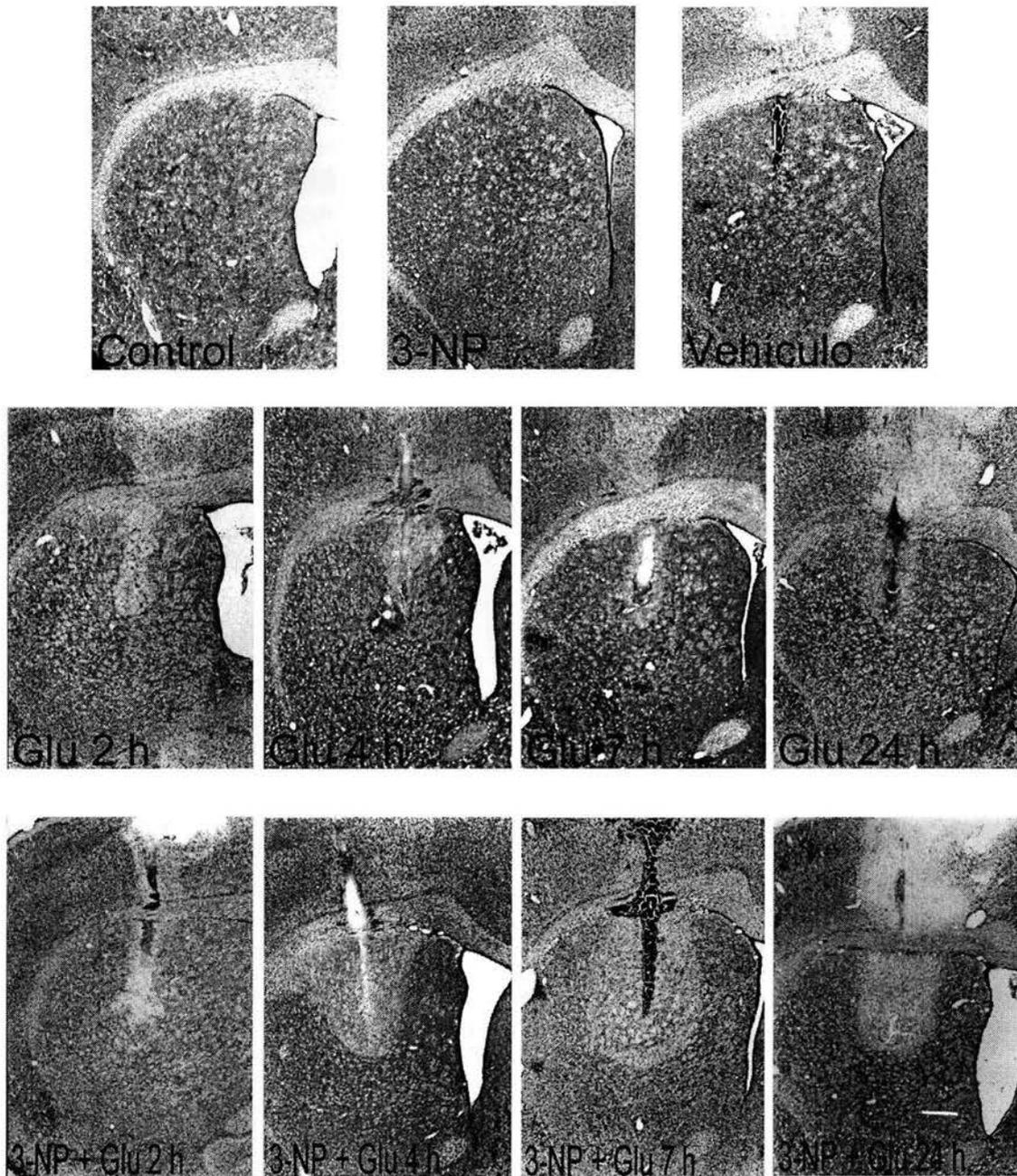


Fig. 7 Fotografías del estriado de animales representativos de cada grupo que muestran la evolución de las lesiones producidas por glutamato, a diferentes tiempos después de su inyección (2, 3, 4, 7 y 24 h). Las lesiones se observan como una región pálida debido a la falta de tinción del violeta de cresilo. Los animales tratados únicamente con 3-NP sistémico no muestran una lesión. La lesión producida por el glutamato en ratas sin 3-NP no difiere de la producida por su vehículo, pero sí aumentan su tamaño cuando las ratas son tratadas previamente con 3-NP; esta lesión se hace evidente a partir de las 3 horas. Barra = 250 μ m.

De acuerdo con reportes de experimentos *in vitro* la exposición de glutamato produce una disminución en los niveles de ATP (Tsuji et al., 1994; Marcaida et al., 1995), la cual es mayor si las células son tratadas previamente con un inhibidor metabólico (Pang y Geddes, 1997; Nasr et al., 2003). En este trabajo se utilizó la técnica de determinación de los nucleótidos por HPLC ya que ésta ofrece la ventaja de poder determinar los niveles de ATP, ADP y AMP en la misma muestra. Desafortunadamente, no pudimos detectar el pico correspondiente al AMP en ninguna de nuestras muestras, pero sí se cuantificaron los niveles de ADP y ATP. Los niveles de ATP y ADP se cuantificaron a diferentes tiempos después de la inyección de glutamato (3, 4, 7 y 24 h), en el estriado de ratas con y sin tratamiento previo con 3-NP. La inyección intraestriatal de vehículo no disminuye los niveles de ATP, analizados por un ensayo luminométrico 1 h después (control 2.51 ± 0.175 , n=6; vehículo 1.89 ± 0.16 , n=3). Este ensayo luminométrico se utiliza en el laboratorio como un método alternativo para determinar los niveles de ATP y ha sido validado y publicado anteriormente (Massieu et al., 2003; García y Masieu, 2003).

El análisis de los niveles estriatales de ATP y ADP revela que la inyección de 500 nmol de glutamato en el estriado de ratas intactas produce un decremento transitorio del 30-40 % en los niveles de ATP y ADP; este decremento no es mayor cuando las ratas son tratadas previamente con la toxina mitocondrial (Fig. 8 y 9). En ambas condiciones, glutamato inyectado en ratas intactas y glutamato inyectado en ratas tratadas con 3-NP, la disminución de ATP y ADP es significativa a las 7 h después de la administración del aminoácido. Esta disminución es transitoria ya que los niveles de los niveles de ATP y ADP se recuperan a las 24 horas, en ambos casos (Fig. 8 y 9). A pesar de que la administración de glutamato produce cambios muy similares en los niveles de ATP estriatales en las ratas intactas y en las ratas pretratadas con la toxina mitocondrial, su administración en las ratas

intactas produce una lesión mínima, mientras que en las ratas tratadas produce una lesión muy severa.

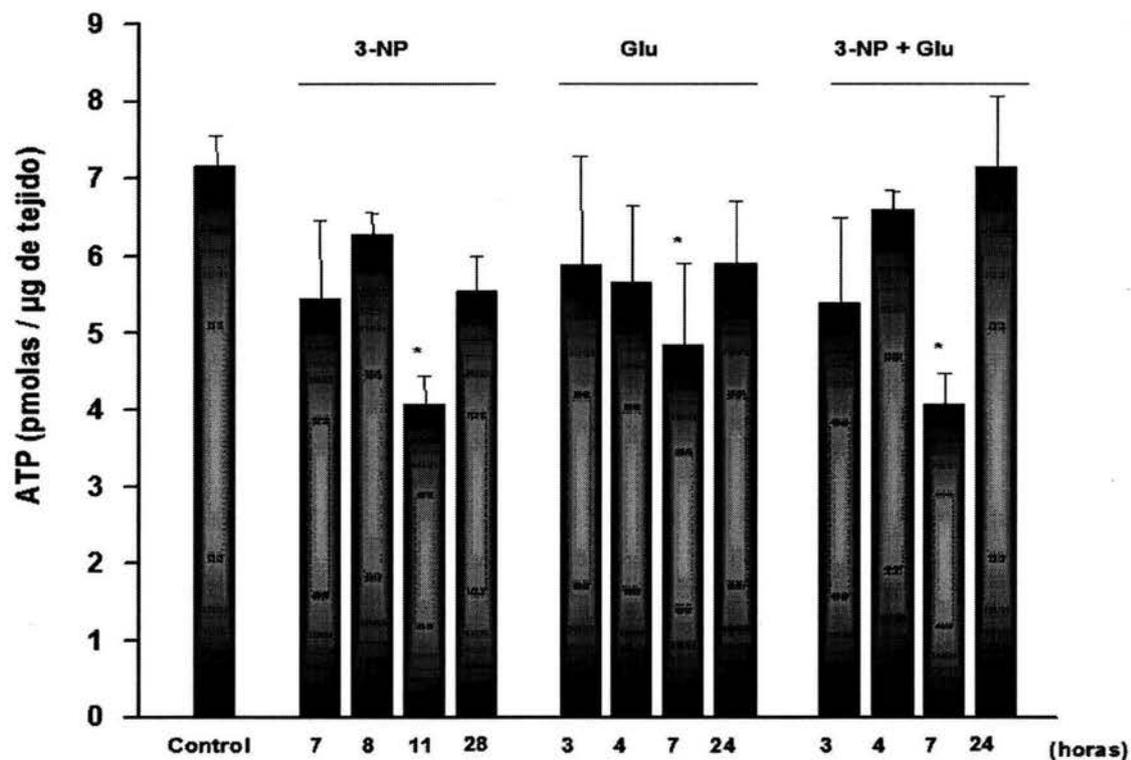


Fig. 8 Niveles de ATP determinados por HPLC en el estriado de ratas con los diferentes tratamientos. Los niveles de ATP después de la administración sistémica de 3-NP se cuantificaron a las 7, 8, 11 y 28 horas después de la segunda administración de 3-NP (15 mg / Kg). Los niveles de ATP después de la inyección intraestriatal de glutamato (500 nmolas) se cuantificaron 3, 4, 7 y 24 horas después de ésta. En las ratas tratadas previamente con 3-NP el glutamato se inyectó 4 horas después de la última administración. *P < 0.05 con respecto al control. n = 3 ratas en cada grupo.

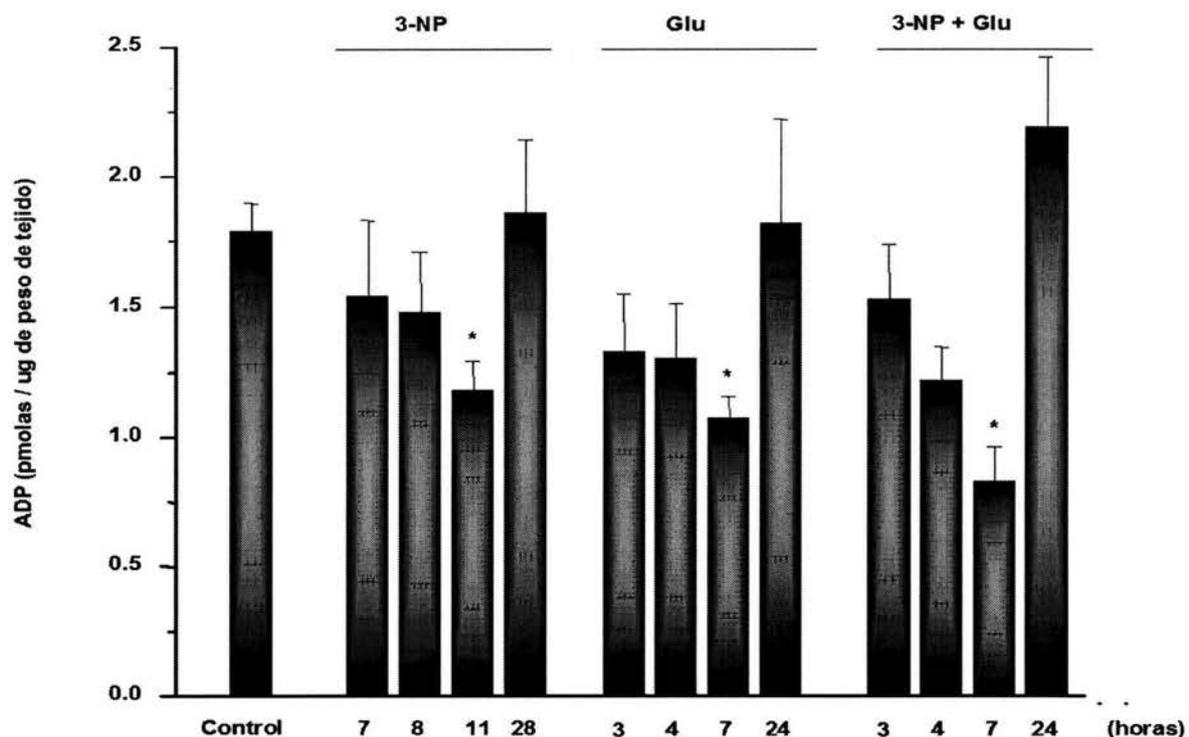


Fig. 9 Niveles de ADP determinados por HPLC en el estriado de ratas con los diferentes tratamientos. Los niveles de ADP después de la administración sistémica de 3-NP se cuantificaron a las 7, 8, 11 y 28 horas después de la segunda administración de 3-NP (15 mg / Kg). Los niveles de ADP después de la inyección intraestriatal de glutamato (500 nmolas) se cuantificaron 3, 4, 7 y 24 horas después de ésta. En las ratas tratadas previamente con 3-NP el glutamato se inyectó 4 horas después de la última administración. *P < 0.05 con respecto al control. n = 3 ratas en cada grupo.

En conjunto, el análisis de los niveles de ATP difiere de los datos encontrados *in vitro* por otros autores (Nasr et al., 2003), quienes muestran que el glutamato en presencia de toxinas mitocondriales induce un mayor déficit energético. Aparentemente en la rata *in vivo* existen mecanismos compensatorios que contrarrestan el déficit energético; la recuperación de los niveles de ATP a las 24 h puede deberse en parte, a un incremento en la tasa glucolítica. Se conoce que la recaptura de glutamato por parte de los transportadores gliales, induce un incremento en la tasa glucolítica, evidenciado por el aumento en la captura de glucosa y el incremento de los niveles de lactato extracelular, tanto *in vitro* como

in vivo (Pellerin y Magistretti, 1994; Schurr et al., 1999; Voutsinos-Porche et al., 2003). Dado que en nuestro modelo se incrementa la concentración de glutamato extracelular es muy posible que su sistema de recaptura esté activado, y por lo tanto que la tasa glucolítica se encuentre acelerada. Por esta razón decidimos cuantificar los niveles de lactato en homogenados de estriado de las ratas con los diferentes tratamientos, a las 7 y 24 h después de la inyección de glutamato.

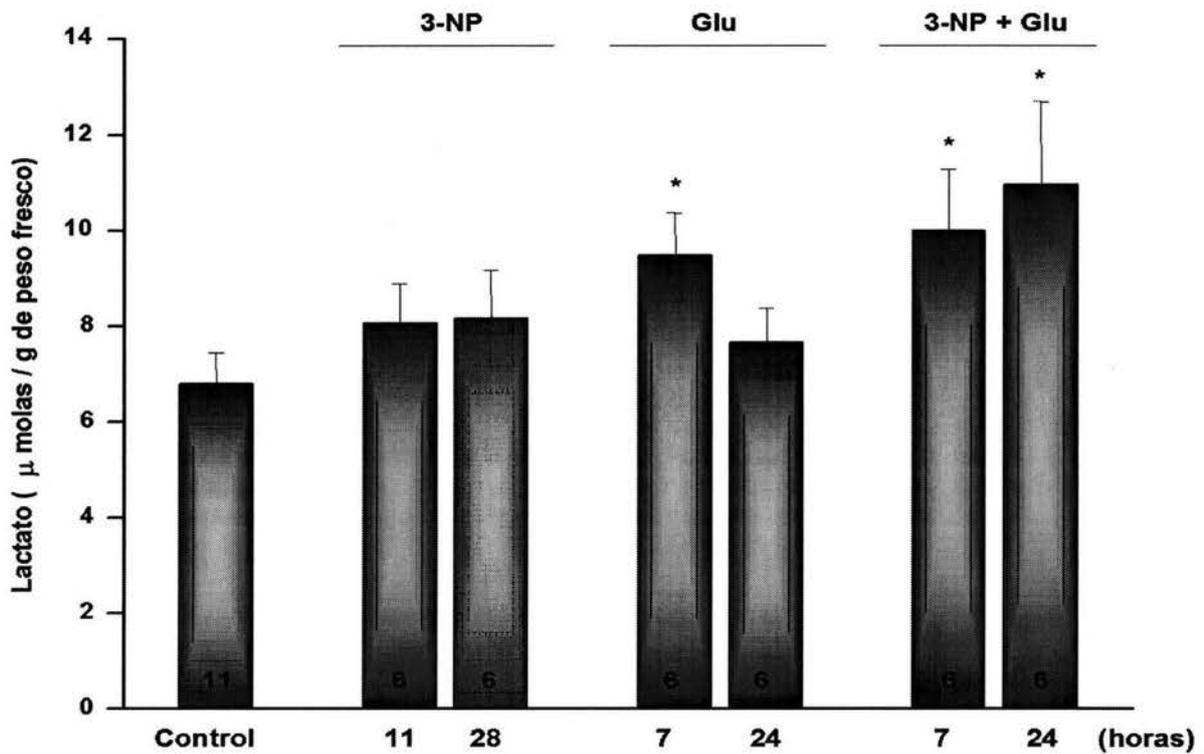


Fig. 10 Niveles de lactato después de la inyección intraestriatal de glutamato (500 nmolas). En las ratas tratadas únicamente con 3-NP el lactato se cuantificó a las 11 y 28 horas después de la última administración de éste. Los niveles de lactato se determinaron en homogenados de estriado de las ratas tratadas mediante una técnica espectrofotométrica como se describe en la metodología. *P < 0.05 con respecto al control. La n de cada grupo se muestra dentro de cada barra. Los datos fueron analizados a través de una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple.

El tratamiento sistémico con 3-NP no incrementa los niveles de lactato en el estriado, de acuerdo a un trabajo previo del laboratorio (Massieu et al., 2001). El incremento en los niveles de lactato inducido por el glutamato se observó solamente a las 7 horas (39 % con respecto al control). En las ratas que recibieron un pre-tratamiento con 3-NP se observó un incremento sostenido de los niveles de lactato desde las 7 hasta las 24 horas (Fig. 10). Estos datos indican que el glutamato induce un incremento en la tasa glucolítica que, en las ratas tratadas previamente con 3-NP, se conserva y que puede estar contrarrestando un posible déficit energético producido por el glutamato y por la inhibición mitocondrial. Es posible que la recuperación de los niveles de ATP a las 24 horas en las ratas tratadas con 3-NP y glutamato se deba en parte a este incremento en la tasa glucolítica.

Gran parte del lactato producido como consecuencia de la captura de glutamato proviene de los astrocitos (Pellerin y Magistretti, 1996). Es posible entonces, que la recuperación de los niveles energéticos y la producción de lactato a las 24 horas se deba a las células gliales. De acuerdo a esto, decidimos hacer una inmunohistoquímica contra la proteína GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), la cual es indicativa de la presencia de glia reactiva. En estas ratas se observó que el tratamiento sistémico con 3-NP no incrementa la cantidad de glia reactiva (n=4). Los cortes de ratas inyectadas sólo con glutamato mostraron que, en general, esta inyección no incrementa la cantidad de glia reactiva; sin embargo en 2 ratas se observó un pequeño incremento en la inmunoreactividad a GFAP. En estos animales la lesión producida por el glutamato fue ligeramente más grande. En las ratas tratadas con 3-NP más glutamato (n=4) se encontró que la cantidad de glia reactiva es mayor sí se compara con la glia reactiva presente en las ratas sin pretratamiento (Fig 11).

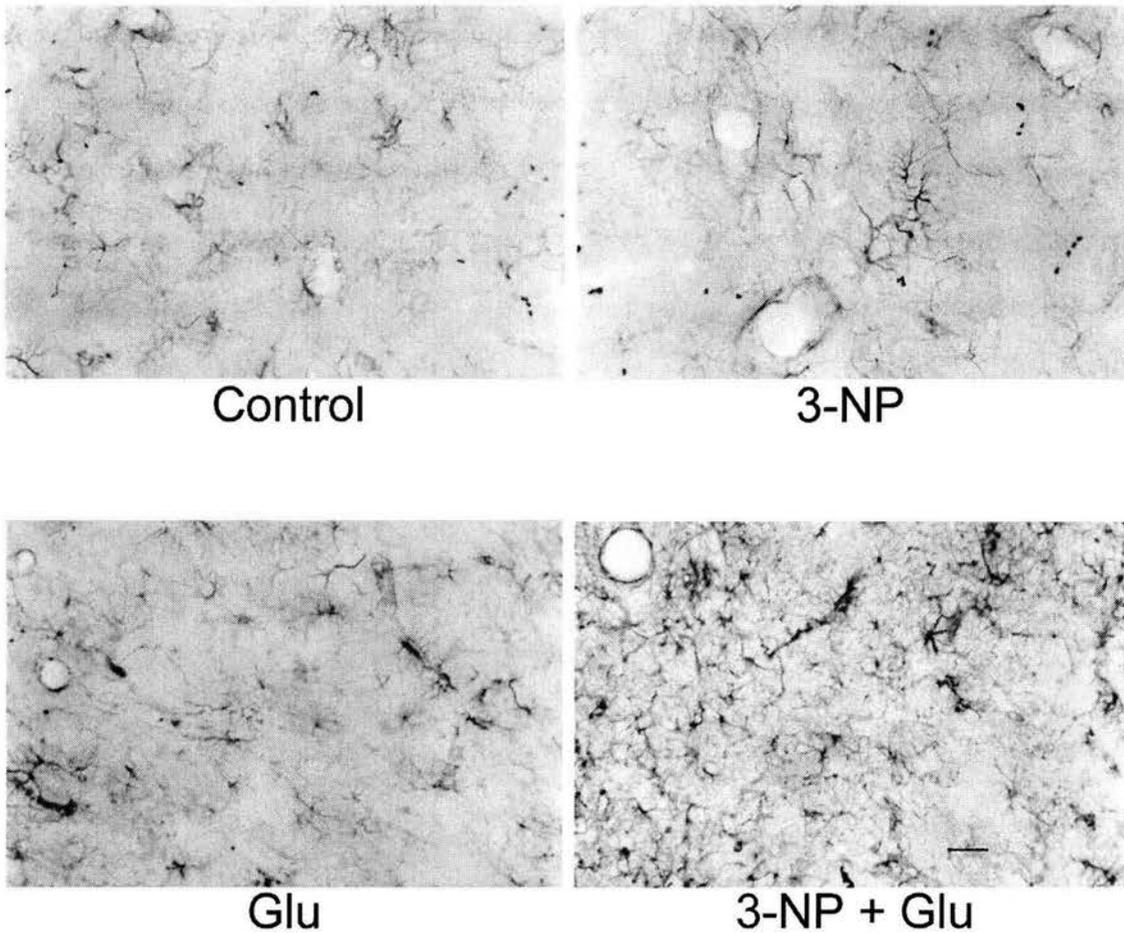


Fig. 11 Inmunohistoquímica para detectar glia reactiva. Las ratas fueron sacrificadas 24 h después de la inyección intraestriatal de glutamato y los tejidos fueron procesados como se indicó en la metodología. El tratamiento con 3-NP ó la inyección de glutamato no incrementan la cantidad de glia reactiva. En cambio, en las ratas tratadas con 3-NP más glutamato la presencia de glia reactiva es más evidente. Barra de escala = 40 μ m

Los resultados concernientes a la cantidad de glia reactiva después de la lesión producida por glutamato son únicamente cualitativos. Cabe mencionar, que la lesión producida por el glutamato en las ratas tratadas con 3-NP es de aproximadamente el 30 % del volumen total del estriado, lo que sugiere que la recuperación de los niveles energéticos puede deberse a las células que se encuentran en el 70 % restante; es decir, que la

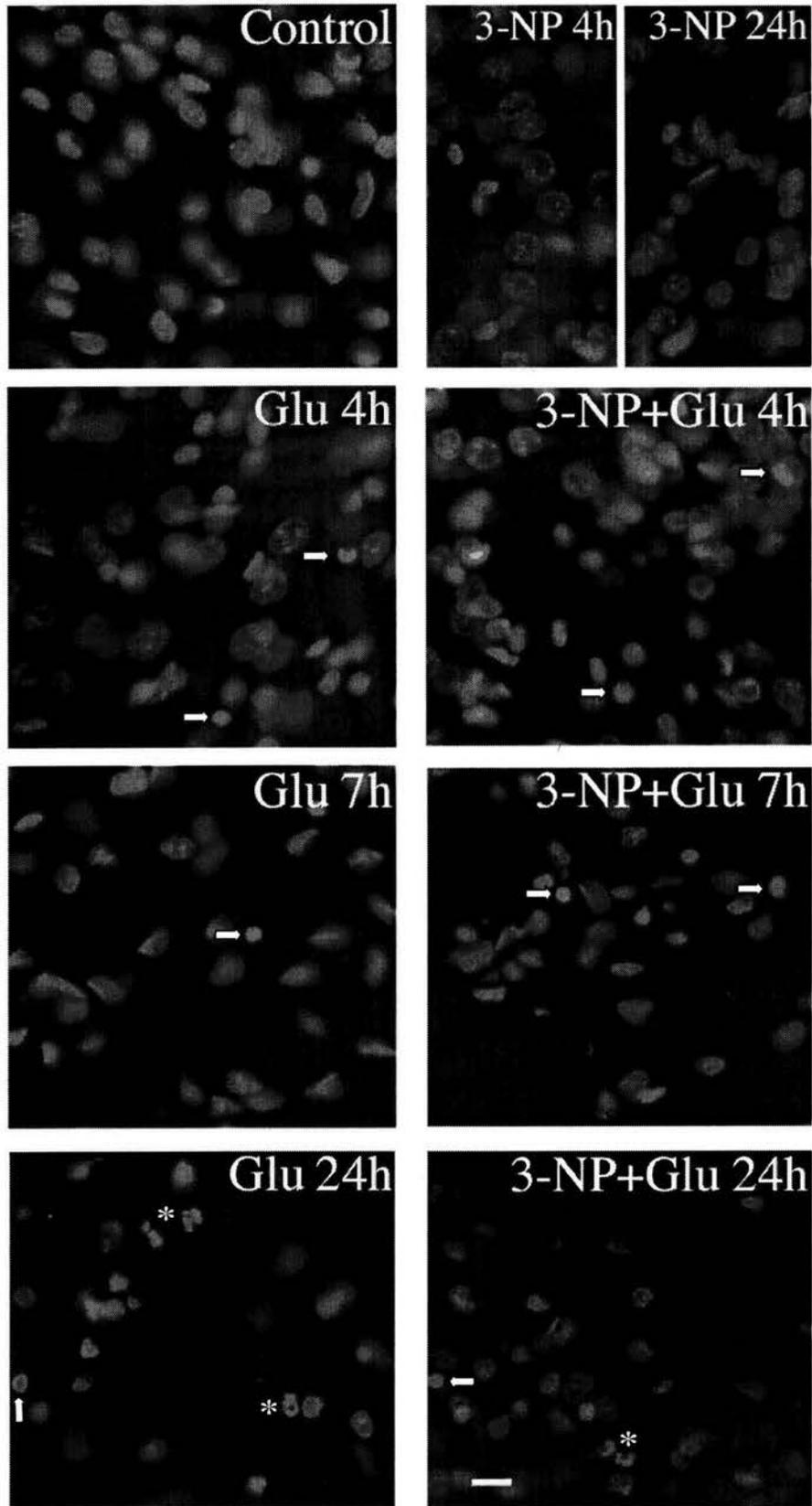
recuperación en los niveles energéticos se deba al incremento en la tasa glucolítica no sólo de la glia sino también de las neuronas que no murieron.

Como se mencionó en la introducción, el tipo de muerte que produce el glutamato puede ser de los dos tipos, dependiendo de la severidad del estímulo inicial (Ankarcrona et al., 1995; Pang y Geddes, 1997). Se ha demostrado *in vitro* que cuando se combina la deficiencia energética con la administración de glutamato el tipo de muerte neuronal, que inicialmente es apoptótico, se vuelve necrótico (Pang y Geddes, 1997). Uno de los cambios que subyacen a la muerte neuronal es la fragmentación o condensación nuclear, durante la muerte apoptótica la fragmentación es más ordenada y muy común. Los núcleos de las células normales tienen forma ligeramente ovalada o redonda, cuando los núcleos se condensan se observan de menor tamaño; algunos núcleos se observan con forma de media luna, lo que se debe a que la cromatina se condensa hacia un lado de la membrana nuclear.

Como una aproximación para conocer si la muerte que produce el glutamato cuando se administra en ratas previamente tratadas con el 3-NP es diferente a la que produce en ratas intactas, se analizó la morfología nuclear de las lesiones producidas por éste. Para el análisis de la morfología del núcleo celular, las ratas se sacrificaron a diferentes tiempos después de los tratamientos (2, 4, 7 y 24 h). Los cortes coronales se tiñeron con Hoechst y se observaron en un microscopio de fluorescencia. Posteriormente se cuantificaron los núcleos condensados y fragmentados dentro de las lesiones producidas por el glutamato. Los resultados muestran que, tanto en ratas que recibieron el pre-tratamiento con 3-NP como en ratas intactas, el glutamato produce cambios en la morfología nuclear caracterizados por condensación y fragmentación. En las ratas tratadas con 3-NP se observó un hinchamiento nuclear a las 4 h después de la última inyección, aunque la

mayoría recuperan su morfología normal a las 24 h (Fig. 12). Al hacer la cuantificación se observó que el porcentaje de núcleos condensados y fragmentados incrementa conforme va evolucionando la lesión, pero no se encontró diferencia en la cantidad de núcleos condensados y fragmentados, ni en la morfología nuclear, entre el tratamiento con glutamato solo y cuando éste se administra en las ratas pretratadas con 3-NP (Fig 13).

Fig. 12 Microfotografías de cortes coronales de estriado que muestran la condensación y fragmentación nuclear a diferentes tiempos después de la inyección de glutamato. Las ratas fueron sacrificadas a diferentes tiempos (4, 7 y 24h), los cerebros fueron procesados y los cortes teñidos con Hoechst como se indica en la metodología. El tratamiento con 3-NP induce un hinchamiento nuclear a las 4 h después de la segunda administración; los núcleos celulares recuperan la morfología normal a las 24h. La cantidad de núcleos condensados y fragmentados incrementa conforme pasa el tiempo en las lesiones producidas por glutamato en ratas intactas y en las ratas tratadas con 3-NP. Los núcleos celulares condensados muestran un incremento en la fluorescencia y una disminución de su tamaño (flechas). La cantidad de núcleos fragmentados es más evidente a las 24 h (-). Barra de escala = 10 μ m



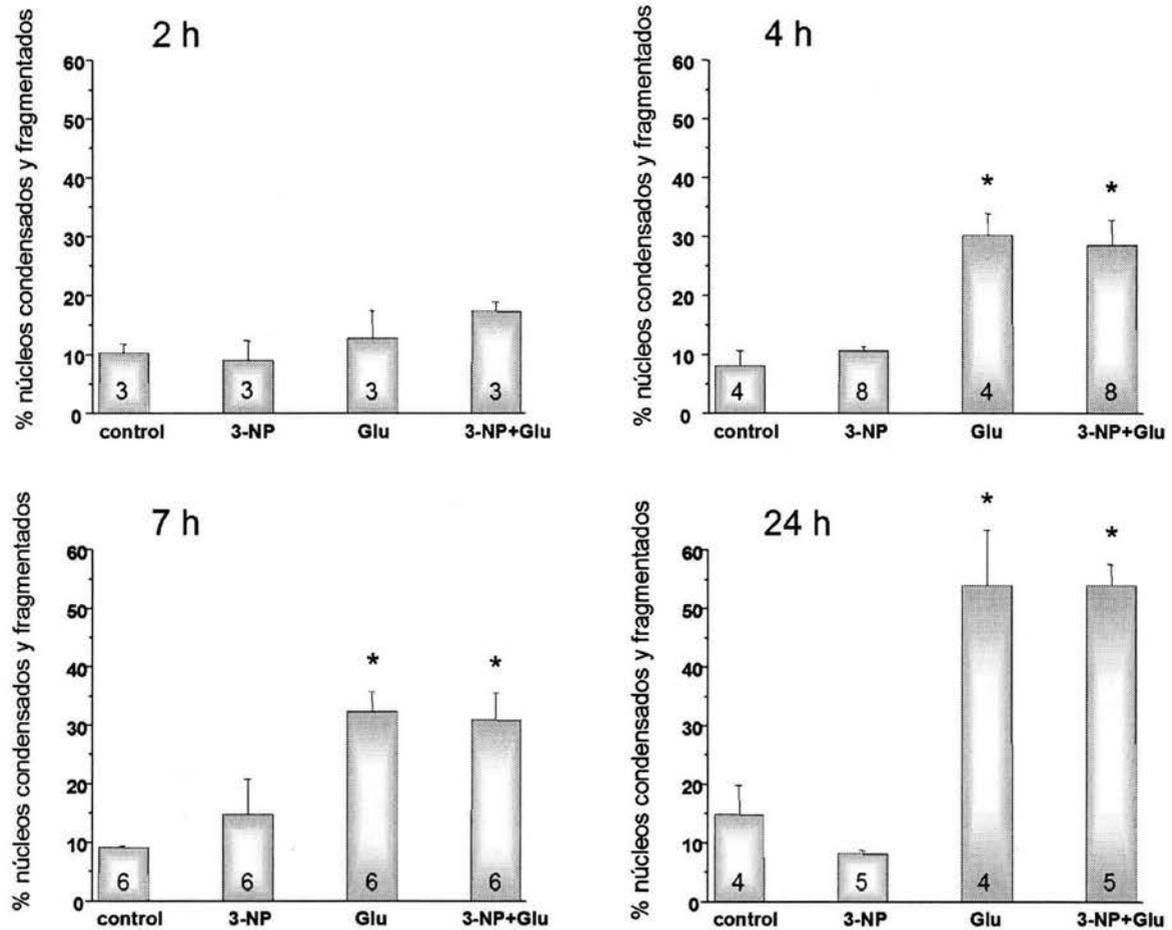


Fig. 13. Porcentaje de núcleos condensados y fragmentados producidos por el tratamiento sistémico de 3-NP, por la inyección de glutamato en ratas intactas y por la inyección de glutamato en ratas pre-tratadas con 3-NP. Los animales se sacrificaron a diferentes tiempos después de la inyección con glutamato, el tejido se procesó como se indicó en la metodología. El porcentaje de núcleos condensados y fragmentados se determinó cuantificando el total de núcleos en el campo visualizado y el número de núcleos condensados ó fragmentados en el mismo. Dado que el tratamiento con 3-NP no produce una lesión evidente, los núcleos condensados y fragmentados se cuantificaron en la región central del estriado, mientras que en las ratas inyectadas con glutamato los núcleos se cuantificaron dentro de la lesión. *P < 0.05 con respecto al control. La n de cada grupo se muestra dentro de las barras. Los datos fueron analizados a través de una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple.

Discusión

Efecto del 3-NP sobre el metabolismo energético

El ácido 3-nitropropiónico es una toxina mitocondrial que se ha utilizado en animales como modelo de la enfermedad de Huntington ya que puede mimetizar las deficiencias motoras que presentan los pacientes con esta enfermedad (Brouillet et al., 1999). La administración crónica de esta toxina produce muerte neuronal en el estriado con un patrón citopatológico similar al descrito en los pacientes con esta enfermedad (Hamilton y Gould, 1987; Beal et al. 1993; Guyot et al. 1997; Palfi et al. 1996). En la rata induce preferentemente la muerte de las neuronas GABAérgicas espinosas medianas, mismas neuronas que degeneran en el transcurso de esta enfermedad (Brouillet et al. 1999). Los mecanismos por los que el 3-NP produce muerte neuronal han sido ampliamente estudiados y se ha propuesto que ésta se debe a un mecanismo excitotóxico secundario ya que se ha demostrado neuroprotección al eliminar las proyecciones glutamatérgicas hacia el estriado de la rata, y a través de la administración del antagonista al receptor NMDA, MK-801 (Kim et al., 2000; Lee et al., 2002a, 2002b). Igualmente se ha observado que el 3-NP inyectado sistémicamente disminuye los niveles de ATP (Beal et al., 1993; Ludolph et al., 1994; Matthews et al., 1998), incrementa los niveles de lactato (Vis et al., 2002) y la producción de radicales libres (Schulz et al., 1996); y que aumenta la concentración de calcio mitocondrial y citosólico en cultivos de neuronas de hipocampo y de una línea celular neuronal N2T (Lee et al., 2002b; Nasr et al., 2003). En este trabajo se demostró que la inhibición de la enzima SDH no genera daño neuronal aparente; sin embargo, bajo estas condiciones se produce un desequilibrio metabólico manifestado por la disminución transitoria de ATP y ADP. Aparentemente es necesaria la inhibición continua de la enzima, ya que la disminución en los niveles de ATP y ADP se observó después de 11 h de la administración de la toxina. Se ha observado que hay disminución de los niveles de ATP

después de tratamientos crónicos con el 3-NP que producen degeneración neuronal (Beal et al. 1993; Matthews et al. 1998); de igual manera la exposición de 3-NP (5mM) en cultivos de neuronas de hipocampo induce la disminución de los niveles de ATP (Pang y Geddes, 1997). De manera similar, el grupo de Riepe (1994) demostró que el 3-NP disminuye los niveles de ATP *in vitro*, y que la administración de MK-801 protege de la muerte neuronal pero no incrementa los niveles de ATP, sugiriendo que las células son capaces de permanecer vivas a pesar de tener los niveles energéticos bajos. Los resultados concernientes al tratamiento con 3-NP en este trabajo indican que, bajo las condiciones utilizadas en este trabajo, el desequilibrio metabólico transitorio no origina muerte neuronal, pero que es suficiente para que las células se vuelvan vulnerables al aumento de glutamato extracelular.

Efecto del glutamato sobre los niveles energéticos

El efecto que tiene el glutamato sobre los niveles energéticos ha sido ampliamente estudiado (Biziere y Coyle, 1978; Retz y Coyle, 1992; Espanol et al., 1994; Tsuji et al., 1994; Marcaida et al., 1995; Ankarcrona et al., 1995; García y Massieu, 2003). De manera similar a estos estudios, realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, los resultados del presente trabajo muestran que el glutamato produce una deficiencia energética transitoria. La disminución de ATP inducida por el glutamato ocurre tardíamente (7 horas) y los mecanismos que la producen no se conocen con exactitud. Estudios previos, realizados en cultivos de neuronas de cerebelo, en rebanadas de estriado y en el estriado de ratones, mostraron que el glutamato produce un estrés metabólico iniciado por la activación de sus receptores (Biziere y Coyle, 1978; Konrad y Coyle, 1982; Marcaida et al., 1995). Por otra parte, el antagonista del receptor a NMDA, MK-801, previene tanto la disminución de los niveles de ATP como la muerte neuronal (Espanol M. et al., 1994, García y Massieu, 2003).

Además de la disminución de los niveles de ATP se ha observado que el glutamato produce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y de la homeostasis del calcio intracelular antes de presentarse la muerte neuronal (Ankarcrona et al., 1995, Schinder et al., 1996). Por otro lado, en un trabajo *in vitro*, se observó que la muerte neuronal excitotóxica se previene con inhibidores de la enzima cinasa PKC y por inhibidores de la producción de óxido nítrico, a pesar de que éstos no evitan la disminución de los niveles de ATP (Marcaida et al., 1995), lo que sugiere que existen otros mecanismos involucrados en la muerte neuronal excitotóxica que son independientes de los niveles energéticos.

En este trabajo se observó una recuperación en los niveles de ATP 24 horas después de la inyección de glutamato, acompañada del incremento de lactato en el estriado de las ratas. La recuperación de los niveles de ATP posiblemente se deba al incremento en el metabolismo glucolítico de las células menos afectadas, tanto neuronas como glia. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que el glutamato estimula la glucólisis en los astrocitos (Pellerin y Magistretti, 1996; Schurr et al. 1999; Voutsinos-Porche et al. 2003). Se propone que la remoción del glutamato del espacio extracelular por los astrocitos incrementa la concentración de Na^+ intracelular de éstos. Este incremento de Na^+ estimula la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ , incrementando a su vez el consumo de glucosa y la producción de lactato en los astrocitos. Este lactato es liberado al espacio extracelular y utilizado como sustrato metabólico en las células neuronales. El incremento de lactato y de la recaptura de glucosa en los astrocitos, dos indicadores del incremento en la actividad glucolítica, han sido observados tanto *in vitro* como *in vivo* después de la estimulación con glutamato (Pellerin y Magistretti, 1996; Shurr et al., 1999; Voutsinos-Porche et al., 2003; Loaiza et al., 2003). Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran estas observaciones ya que la inyección de glutamato incrementó los niveles de lactato.

Neurodegeneración por glutamato en condiciones de deficiencia energética

Los resultados mostrados en este trabajo corroboran los obtenidos en trabajos previos de nuestro laboratorio, en los que se observó que el incremento de la concentración de glutamato extracelular inducido por la inhibición de su recaptura, no genera muerte neuronal (Massieu et al., 1995). Sin embargo, cuando este incremento ocurre en condiciones de inhibición metabólica, la vulnerabilidad de las neuronas a los efectos tóxicos del glutamato se incrementa, produciéndose una lesión de tamaño considerable (Sánchez-Carbente et al., 1999; Massieu et al., 2001, 2003). De la misma manera, en el presente trabajo se demostró que el incremento de los niveles extracelulares de glutamato, inducido por la inyección intraestriatal de glutamato, sólo produce una lesión importante cuando éste es inyectado después de inhibir el metabolismo mitocondrial con el 3-NP.

Sin embargo, los resultados concernientes a los niveles energéticos difieren de los encontrados *in vitro* por nosotros mismos (García y Massieu, 2003) y otros autores (Pang y Geddes, 1997; Nasr et al., 2003) quienes muestran que el glutamato, en presencia de toxinas mitocondriales, induce un déficit energético severo que se puede observar a partir de los 30 minutos de su exposición. En este trabajo, la disminución de ATP y ADP se observó 7 h después de la inyección de glutamato y no fue mayor en las ratas tratadas previamente con el 3-NP. Los resultados de esta tesis indican que la disminución de los niveles de ATP no se debe a una muerte neuronal ya que: 1) la concentración de glutamato utilizada produce una lesión mínima, pero sí disminuye los niveles de ATP a las 7 horas, y 2) no se observó una mayor disminución de los niveles de ATP en las ratas tratadas previamente con el 3-NP, a pesar de que en estas ratas la lesión producida por glutamato es mucho mayor.

Es posible que no haya sido detectada una mayor disminución de los niveles de ATP/ADP en las ratas pretratadas con 3-NP, debido a las siguientes razones: 1) tiempos posteriores a las 7 h no fueron analizados, siendo factible que se presentara una disminución mayor en los niveles energéticos entre las 7 y las 24 h, y 2) dado que la cuantificación del ATP se realizó en el estriado completo, es posible que una disminución rápida y severa de los niveles de ATP en el centro de la lesión haya sido enmascarada por la presencia de tejido aledaño no dañado.

Por otro lado, también es posible que en la rata *in vivo* existan mecanismos compensatorios que contrarrestan el déficit energético, como la estimulación de la vía glucolítica. De acuerdo a nuestros resultados existe una acumulación sostenida de lactato en el estriado de las ratas tratadas con 3-NP y posteriormente inyectadas con glutamato, mientras que en el estriado de las ratas no tratadas con la toxina mitocondrial la administración de glutamato produce una acumulación transitoria de lactato. Es posible que las células que se encuentran alrededor de la lesión, tanto células gliales como neuronales, sean las responsables de esta compensación de la deficiencia energética, ya que se observó una tendencia a incrementar la presencia de glia reactiva en el estriado de las ratas tratadas con 3-NP más glutamato. Estos mecanismos compensatorios serían menos evidentes en preparaciones *in vitro* dada la menor proporción de células gliales en cultivos neuronales, en comparación con el cerebro de la rata.

Los mecanismos por los que se incrementa la vulnerabilidad neuronal a la excitotoxicidad en condiciones de deficiencia energética han sido ampliamente estudiados *in vitro*, y se le ha dado gran importancia tanto al estado energético celular previo al estímulo inicial, así como a la evolución que éste tenga en el transcurso de la muerte excitotóxica. En este trabajo no se encontró una diferencia en la disminución de los niveles

de ATP y ADP entre los tratamientos, sin embargo esto no se descarta que la falla mitocondrial sea un factor determinante de la vulnerabilidad neuronal a la muerte mediada por glutamato. La falla mitocondrial tiene consecuencias directas sobre la regulación de la homeostasis del calcio intracelular, la producción de especies reactivas de oxígeno, la apertura del poro de transición mitocondrial y la subsecuente liberación de factores que promueven la muerte neuronal como el citocromo c (Ankarcrona et al., 1995; Pang y Geddes, 1997; White y Reynolds, 1995; Budd y Nicholls, 1996; Schinder et al., 1996; Calabresi et al., 2001; Lee et al., 2002a; Kim et al. 2003; Nasr et al., 2003). En favor de esta hipótesis se ha demostrado que el tratamiento con 3-NP dificulta la regulación de los niveles de calcio intracelular por la activación del receptor NMDA, y que potencia el incremento de calcio producido por el NMDA en rebanadas de hipocampo (Calabresi et al., 2001; Nasr et al., 2003).

La administración de glutamato en el estriado de ratas intactas y de ratas previamente tratadas con 3-NP produce cambios similares en la morfología nuclear.

El fenotipo de la muerte neuronal inducido tanto por glutamato como por 3-NP puede ser apoptótico o necrótico, dependiendo de la severidad del estímulo inicial y de la duración de éste (Ankarcrona et al., 1995; Pang y Geddes, 1997; Sato et al., 1997; Vis et al., 2001; Antonawich et al., 2002). Cuando se combina el estrés metabólico, inducido por el 3-NP, con la administración de dosis subtóxicas de glutamato el tipo de muerte neuronal se vuelve necrótico (Pang y Geddes, 1997; Nasr et al., 2003). Este cambio en el tipo de muerte celular sólo se ha observado en cultivos de neuronas de hipocampo, y se ha asociado con la actividad de la proteasa calpaína, la disminución de potencial de membrana mitocondrial con la consecuente disminución de los niveles de ATP, y con la pérdida de la homeostasis del calcio (Nasr et al., 2003).

En este trabajo encontramos que la administración de glutamato tanto en ratas intactas como en ratas pre-tratadas con 3-NP, resulta en la presencia de núcleos tanto fragmentados como condensados, sugiriendo el mismo fenotipo de muerte a este nivel. Se conoce que el ATP es necesario para el movimiento del material genético hacia la periferia nuclear, pero no para el rompimiento en fragmentos de alto peso molecular (HMM, por sus siglas en inglés, high-molecular-mass), el cual ocurre en ausencia de ATP (Kass et al., 1996). La condensación y fragmentación del núcleo celular no debe ser considerada como un marcador único de la muerte apoptótica (Kaasik et al. 1999). Para poder discernir entre la muerte necrótica y la apoptótica es necesario analizar otros aspectos como la ruptura de la membrana celular, la activación de caspasas, la liberación del citocromo c de la mitocondria y la traslocación de la fosfatidilserina a la cara extracelular de la membrana plasmática, lo cual es materia de estudios futuros.

Conclusiones

Los resultados mostrados en esta tesis confirman que concentraciones subtóxicas de glutamato en condiciones de inhibición mitocondrial se vuelven tóxicas, produciendo un incremento en el volumen de lesión. A pesar de que la disminución de ATP y ADP es similar en las dos condiciones estudiadas, no se puede descartar la posibilidad de que las cascadas de muerte sean distintas cuando hay una inhibición mitocondrial previa a la administración de glutamato. Por esta razón es interesante analizar otros factores como la activación proteasas involucradas en la muerte celular como las calpaínas y caspasas, la liberación del citocromo c y la presencia de estrés oxidativo en las dos condiciones experimentales estudiadas.

Referencias

- Albers G., Goldberg M. y Choi D. 1989 N-methyl-D-aspartate antagonists: ready for clinical trial in brain ischemia? *Ann Neurol.* 25:398 - 403.
- Ankarcrona M., Dypbukt J., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S. y Nicotera L. 1995 Glutamate-induced neuronal death: a sucession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961 – 973.
- Antonawich F., Fiore-Marasa S. y Perder C. 2002 Modulation of apoptotic regulatory proteins and early activation of cytochrome c following systemic 3-nitropropionic acid administration. *Brain Res. Bull.* 57: 647 – 649.
- Arends M. y Wyllie A. 1991 Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32: 223 – 254.
- Arriza J., Eliasof S., Kavanaugh M. y Amara S. 1997 Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 4155 – 4160.
- Atlante A., Calissano P., Bobba A., Giannattasio B., Marra E. y Passarella S. 2001 Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Letters* 497: 1 – 5.
- Beal M. 1992 Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 657 – 662.
- Beal M., Brouillet E., Jenkins B., Ferrante R., Kowall N., Miller J., Storey E., Srivastava R., Rosen B. y Imán B. 1993 Neurochemical and histologic characterization of striatal lesions produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13 : 4181–4192.
- Beal M., Kowal N., Swartz K., Ferrante R. y Martin J. 1988 Systemic approaches to modifying quinolinic acid striatal lesions in rats. *J. Neurosci.* 8: 3901 – 3908.
- Benveniste H., Drejer J., Schousboe A. y Diemer H. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43: 1369–1374
- Biziere K. y Coyle J. 1978 Effects of kainic acid on ion distribution and ATP levels of striatal slices incubated in vitro. *J. Neurochem.* 31: 513 – 520.
- Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P. y Lipton S. 1995 Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 7162 – 7166.
- Bradbury D., Simmons T., Slater K. y Crouch S. 2000 Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J. Immunol. Methods* 240: 79 – 92.

- Brouillet E., Guyton M. C., Mittoux V., Altairac S., Condé F., Palfi S. y Hantraye P. 1998 Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* 70: 794–805.
- Brouillet E., Condé F., Beal M. y Hantraye P. 1999 Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress Neurobiol.* 59 : 427 – 468.
- Budd S. y Nicholls D. 1996 Mitochondria, calcium regulation and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 67: 2287 – 2291.
- Calabresi P., Gubellini P., Picconi B., Centonze D., Pisan A., Bonsi P., Greengard P., Hipskind R., Borelli E. y Bernardi G. 2001 Inhibition of mitochondrial complex II induces a long term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J. Neurosci.* 21: 5110 – 5121.
- Casado M., Bendahan A., Zafra F., Danbolt N., Aragon C., Jiménez C. y Kanner B. 1993 Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J. Biol.Chem.* 268: 27313 – 27317.
- Choi D. 1987 Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7: 369 – 379.
- Choi D. 1988 Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends in Neurobiol.* 10: 465 – 469.
- Choi D. 1992 Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23: 1261 – 1276.
- Choi D., Maulucci-Gedde M. y Kriegstein A. 1987 Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7 : 357 – 368.
- Cotman C. y Anderson A. 1995 A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 10: 19 - 45.
- Cox J., Lysko P. y Henneberry R. 1989 Excitatory amino acid neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured neurons: role of the voltage-dependent magnesium block. *Brain Res.* 499: 267 – 272.
- Cull-Candy S., Brickley S. y Farrant M. 2001 NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 327 – 335.
- Curtis D. y Watkins J. 1960 The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* 6: 117 – 141.
- Danbolt N. 2001 Glutamate uptake. *Progress Neurobiol.* 65: 1 – 105.
- Danbolt N., Storm-Mathisen J. y Kanner B. 1992 A [Na⁺ K⁺] coupled glutamate transporter purified from rat brain is located on glial processes. *Neuroscience* 51: 295 – 310.
- Davies J., Evans R., Francis A. y Watkins J. 1979 Excitatory amino acid receptors and synaptic excitation in the mammalian central nervous system. *J. Physiol.* 75: 641 – 654.
- Dawson T., Dawson V. y Snyder S. 1992 A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol.* 32: 297 – 311

- Dessi F., Charriaut-Marlangue C., Khrestchatski M. y Ben-Ari Y. 1993 Glutamate-induced neuronal death is not programmed cell death in cerebellar culture. *J. Neurochem.* 60: 1953 -1955.
- Dorandeu F., Antier D., Pernot-Marino I., Lapeyre P. y Lallement G. 1998 Venom phospholipase A2-induced impairment of glutamate uptake: an indirect and nonselective effect related to phospholipid hydrolysis. *J. Neurosci. Res.* 51: 349 - 359.
- Eguchi Y., Srinivasan A., Tomaselli K., Shimizu S. y Tsujimoto Y. 1999 ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction *Cancer Res.* 59: 2174 – 2181.
- Espanol M., Xu Y., Litt L., Yang G., Chang L., James T., Weistein P. y Chan P. 1994 Modulation of glutamate-induced intracellular energy failure in neonatal cerebral cortical slices by kinurenic acid, dizocilpine and NBQX. *J. Cereb Blood Flow* 14: 269 – 278.
- Ferrante R., Kowall N., Cipolloni P., Storey E. y Beal M. F. 1993 Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization *Exp. Neurol.* 119: 46–71.
- Ferrari D., Stepczynska A., Los M., Wesselborg S. y Schulze-Osthoff K. 1998 Differential regulation and ATP requirement for caspase 8 and caspase 3 activation during CD96 anti-cancer drug-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 188: 979 – 984.
- Gadea A. y López-Colomé A. 2001 Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *J. Neurosci. Res.* 63: 453 – 460.
- Ganel R. y Crosson C. 1998 Modulation of human glutamate transporter activity by phorbol ester. *J. Neurochem.* 70: 993 – 1000.
- García O. y Massieu L. 2001 Strategies for neuroprotection against L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment *in vitro*. *J. Neurosci. Res.* 64: 418 – 428.
- Garcia O. y Massieu L. 2003 Glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine 2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentrations of mitochondrial toxin 3-nitropropionate: involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. *J. Neurosci. Res.* 74: 956 – 966.
- Gegelashvili G., Dehnes Y. Danbolt N y Schousboe A. 2000 The high-affinity glutamate transporter GLT1, GLAST and EAAT4 are regulated via different signaling mechanisms. *Neurochem. Int.* 37: 163 – 170.
- Ginsberg S., Martin L. y Rothstein J. 1995 Regional deafferentation down regulates subtypes of glutamate transporter proteins. *J. Neurochem.* 65: 2800 – 2803.
- Green D. y Reed D. 1998 Mitochondria and apoptosis *Science* 281: 1309 – 1312
- Greene J. y Greenamyre J. 1996 Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Progress in Neurobiol.* 48: 613–634.
- Greene J., Porter R., Eller R. y Greenamyre J. 1993 Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *J. Neurochem.* 61: 1151 – 1154.

- Gunasekar P., Kanthasamy A., Borowitz J. y Isom G. 1995 NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J. Neurochem.* 65: 2016-2021.
- Guyot M., Hantraye R., Dolan R., Palfi S., Maziere M. y Brouillet E. 1997. Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 79, 45 – 56.
- Hamilton B. y Gould D. 1987 Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neurophatol.* 72, 286-297.
- Harada T., Harada C., Watanabe M., Inoue Y., Sakagawa T., Nakayama N., Sasaki S., Okuyama S., Watase K., Wada K. y Tanaka K. 1998 Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT1 in the retina. *Pron. Natl. Acad. Sci.* 4663 – 4666.
- Hensahw R., Jenkins B., Schulz J., Ferrante R., Kowall N., Rosen B. y Beal M. 1994 Malonate produces striatal lesions by indirect NMDA receptor activation *Brain. Res.* 647: 161–166.
- Himi T., Ikeda M., Yashura T., Nishida M. y Morita I. 2003 Role of neuronal glutamate transporter in the cysteine uptake and intracellular glutathione levels in cultured cortical neurons. *J. Neural Transm.* 110: 1337 – 1348.
- Hollmann M. y Heinemann S. 1994 Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 37 – 108.
- Huettner J. 2003 Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 70: 387 – 407.
- Kaasik A., Vassijev V., Poldoja E., Kalda A. y Zharkovsky A. 1999 Do nuclear condensation or fragmentation and DNA fragmentation reflect the mode of neuronal death? *Neuroreport* 10: 1937 – 1942.
- Kass G., Eriksson J., Weis M., Orrenius S. y Chow S. 1996 Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem. J.* 318: 749 – 752.
- Kim G., Copin C., Kawase M., Chen F., Sato S., Gobbel T. y Chan P. 2000. Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 119-129.
- Kim J., He L. y Lemasters J. 2003 Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 304: 463 – 470.
- Köhler M., Burnashev N., Sakmann B. y Seeburg P. 1993 Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainite receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron* 10: 491 – 500.
- Konrad C. y Coyle J. 1982 Effects of Kainic acid on high-energy metabolites in the mouse striatum *J. Neurochem.* 38: 196 – 203.
- Kure S., Tominaga T., Yoshimoto T., Tada K. y Narisawa K. 1991 Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 39 – 45.

- Lafon-Cazal M., Pietri S., Cilcasi M. y Bockaert J. 1993 NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535 – 537.
- Latta M., Künstle G., Leist M. y Wendel A. 2000 Metabolic depletion of ATP by fructose inversely controls CD-95 and Tumor Necrosis Factor Receptor 1- mediated hepatic apoptosis. *J. Exp. Med.* 191: 1975 – 1985.
- Lee W., Itoh T. y Pleasure D. 2002b Acute and chronic alterations in calcium homeostasis in 3-nitropropionic acid-treated human NT2-N neurons. *Neuroscience* 113: 699 – 708.
- Lee W., Yin H. y Shen Z. 2002a The mechanisms of neuronal death produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: the roles of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and mitochondrial calcium overload. *Neuroscience* 112: 707 -716.
- Lehre K., Levy L., Ottersen O., Storm-Mathisen J. y Danbolt N. 1995 Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 15: 1835 – 1853.
- Leist M., Single B., Castoldi A., Kühnle S. y Nicotera P. 1997 Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185: 1481 – 1486.
- Leist M., Single B., Haumann H., Fava E., Simon B., Kühnle S. y Nicotera P. 1999 Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Experimental Cell Res.* 249: 396 – 403.
- Levy L., Lehre K., Walas S., Storm-Mathisen J. y Danbolt N. 1995 Down regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 7: 2036 – 2041.
- Loaiza A., Porras O. y Barros L. 2003 Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J. Neurosci.* 23: 7337 – 7342.
- Lucas D. y Newhouse J. 1957 The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch. Ophthalmol.* 58: 193-201.
- Ludolph A., Seelig M., Ludolph A., Sabri M. y Spencer P. 1994 ATP deficits and neuronal degeneration induced by 3-nitropropionic acid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 300 – 302
- MacDermott A., Mayer M., Westbrook G., Sith S. y Barker J. 1986 NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature* 321: 519 – 522.
- Marcaida G., Miñana M., Grisolia S. y Felipo V. 1995 Lack of correlation between glutamate-induced depletion of ATP and neuronal death in primary cultures of cerebellum. *Brain res.* 695: 146 – 150.
- Massieu L. y García O. 1998 The role of excitotoxicity and metabolic failure in the pathogenesis of neurological disorders. *Neurobiology* 6: 99 – 108.

- Massieu L., Haces M. Montiel T. Hernández-Fonseca K. 2003 Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120: 365 – 378.
- Massieu L., Morales-Villagrán A. y Tapia R. 1995 Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 64: 2262–2272.
- Massieu, L., Del Río P. y Montiel T. 2001. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience* 106, 669-677.
- Masu M., Tanabe Y., Tsuchida K., Shigemoto R. y Nakanishi S. 1991 Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349: 760 – 765.
- Matthews R., Yang L., Jenkins B., Ferrante R., Rosen B., Kaddurah-Daouk R. y Beal M. 1998 Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 18, 156-163.
- Mayer y Westbrook 1987 The physiology of excitatory aminoacids in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 28 197 – 276.
- McConkey D. 1998 Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol. Letters.* 99: 157 – 168.
- Meldrum B. 2000 Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130: 1007 – 1115.
- Michaelis E. 1998 Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54: 369 - 415.
- Mitani A. y Tanaka K. 2003 Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: an in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1. *J. Neurosci.* 23: 7176 - 7182.
- Monyer M., Burnashev N., Laurie D., Sakmann M. y Seeburg P. 1994 Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529 – 540.
- Mosbacher J., Schoepfer R., Monyer H., Burnashev N., Seeburg P. y Ruppersberg J. 1994 A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science* 266: 1059 – 1062.
- Nakanishi S., Nakajima Y., Masi M., Ueda Y., Ankara K., Watanabe D., Yamaguchi S., Kawabata S. y Okada M. 1998 Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Rev.* 26: 230 – 235.
- Nasr P., Gursahani H., Pang Z., Bondada V., Lee J., Hadley R. y Geddes J. 2003 Influence of cytosolic and mitochondrial Ca²⁺, ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity

- on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem. Int.* 43: 89 – 99.
- Nicholls D. 1995 *Proteins, Transmitters and Synapses*. Blackwell Science. pp155-183. Gran Bretaña
- Nicholls D. G., Budd S. L., Casthilo R. y Ward M. 1999 Glutamate excitotoxicity and neuronal energy metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893: 1 – 12.
- Nicholls D. y Artwell D. 1990 The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 462 – 468.
- Nicholls D. y Budd S. 1998 Neuronal excitotoxicity: the role of mitochondria. *BioFactors* 8: 287 – 299.
- Novelli A., Reilly J., Lysko P. y Henneberry R. 1988 Glutamate becomes neurotoxic via the *N*-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* 451: 205–212
- Obrenovitch T. y Urenjak J. 1997 Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury? *J. Neurotrauma.* 14: 677 - 698.
- Ohgoh M., Shimizu H., Ogura H. y Nishizawa Y. 2000 Astroglial trophic support and neuronal cell death: influence of cellular energy level on type of cell death induced by mitochondrial toxin in cultured rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 75: 925 - 933.
- Olney J.W., Ho O. L., y Rhee V. 1971 Cytotoxic effects of acidic and sulfur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain. Res.* 14: 61 - 76.
- Ozawa S., Kamiya H. y Tsusuki K. 1998 Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress Neurobiol.* 54: 581 – 618.
- Palfi S., Ferrante R., Brouillet E., Beal M., Dolan R., Guyot MC., Peschanski M. y Hantraye 1996. Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's Disease. *J. Neurosci.* 16, 3019-3025.
- Pang Z. y Geddes J. W. 1997 Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J. Neurosci* 17: 3064-3073.
- Parone P. y Martinou J 2002 Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84: 105 – 111.
- Paxinos G. y Watson C. 1986 *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sidney
- Pellerin L. y Magistretti P. 1994 Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 10625 – 10629.
- Petralia R. y Wenthold R. 1992 Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 318: 329 – 354.
- Portera-Cailliau C., Hedreen D., Price D. y Koliatsos V. 1995 Evidence for apoptotic cell death in Huntington's disease and excitotoxic animal models. *J. Neurosci.* 15: 3775 – 3787.
- Portera-Cailliau C., Price D. y Martin L. 1997a Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J. Comparative Neurol.* 378: 70 – 87.

- Portera-Cailliau C., Price D. y Martin L. 1997b Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxicity neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J. Comparative Neurol.* 378: 88 – 104.
- Retz k. y Coyle J. 1982 Effects of kainic acid on high-energy metabolites in the mouse striatum. *J. Neurochem.* 38: 196 – 203.
- Richter C., Schweizer M., Cossarizza A. y Franscechi C. 1996 Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Letters* 378: 107 – 110.
- Riepe M., Ludolph A., Seeling M., Spencer P. y Ludolph C. 1994 Increase of ATP levels by glutamate antagonists is unrelated to neuroprotection. *Neuroreport* 5: 2130 – 2132.
- Rothman S. y Olney J. 1987 Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurobiol.* 10: 299 – 302.
- Rothstein J., Martin L., Levey A., Dykes-Hoberg M., Jin L., Wu D., Nash N. y Kuncl R. 1994 Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713 – 725.
- Sánchez-Carbente M. y Massieu L. 1999 Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J. Neurochem.* 72: 129–138.
- Sandberg M., Butcher S. P., y Handberg H. 1986 Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: *in vivo* dialysis of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 47: 178–184.
- Sato S., Gobbel G., Honkaniemi J., Li Y., Kondo T., Murakami K., Sato M., Copin J-C. Y Chan P. 1997 Apoptosis in the striatum of rats following intraperitoneal injection of 3-nitropropionic acid. *Brain Res.* 745: 343 – 347.
- Schinder A., Olson E., Spitzer N. y Montal M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16, 6125-6133.
- Schmith A., Asan E., Püschel B. y Kugler P. 1997 Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive *in situ* hybridization and comparative immunocytochemistry. *J. Neurosci.* 17: 1 – 10.
- Schousboe A. 1981 Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int. Rev. Neurobiol.* 22: 1 – 45.
- Schulz J., Henshaw D., Matthews R. y Beal M. 1995b Coenzyme Q₁₀ and nicotinamide and a free radical spin trap protect against MPTP neurotoxicity. *Exp. Neurol.* 132: 279–283.
- Schulz J., Henshaw D., Siwek D., Jenkins B., Ferrante R., Cipolloni P., Kowall N., Rosen B. y Beal M. 1995a Involvement of free radicals in excitotoxicity *in vivo* *J. Neurochem.* 63: 2239–2247.
- Schulz J., Henshaw R., Macgarvey U. y Beal F. 1996 Involvement of oxidative stress in 3-Nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem. Int.* 29, 167-171.
- Schurr A., Miller J., Payne R. y Rigor B. 1999 An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *J. Neurosci.* 19: 34 – 39.

- Seki Y., Feustel P., Keller R., Tranmer B. y Kimelberg H. 1999 Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihidrokinate and an anion channel blocker. *Stroke* 30: 433 – 440.
- Seonghyang S., Kim E. y Byoung J. 1998 Glutamate neurotoxicity in mouse cortical neurons: atypical necrosis with DNA ladders and chromatin condensation. *Neurosci. Letters* 240: 147 – 150.
- Sladeczek F., Pin J., Recasens M., Bockaert J. y Weiss S. 1985 Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurons. *Nature* 317: 717 – 719.
- Sohn S., Kim E. y Gwag B. 1998 Glutamate neurotoxicity in mouse cortical neurons: atypical necrosis with DNA ladders and chromatin condensation. *Neurosci. Letters* 240: 147 – 150.
- Sommer B., Burnashev N., Verdoorn T., Keinänen K., Sakmann B. y Seeburg P. 1992 A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainite. *EMBO J.* 11: 1651 – 1656.
- Sommer B., Kholer M., Sprengel R. y Seeburg P. 1991 RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67: 11 – 19.
- Steinberg G., Yoon E., Kunis D., Sun G., Maier G. y Grant G. 1994 Neuroprotection by N-methyl-D-aspartate antagonists in focal cerebral ischemia is dependent on continued maintenance dosing. *Neuroscience* 64: 99 – 107.
- Storey E., Hyman B., Jenkins B., Brouillet E., Miller J., Rosen B. y Beal M. 1992 1-Methyl-4-phenylpyridinium produces excitotoxic lesion in rat striatum as a result of impairment of oxidative metabolism. *J. Neurochem.* 58: 1975 – 1978.
- Suzanne G. y Geiger J. 1996 Brain regional levels of adenosine nucleotides in rats killed by high-energy focused microwave irradiation. *J. Neurosci.* 64: 151 – 156.
- Tanaka K. 1999 Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci. Res.* 37: 15 – 19.
- Tanaka K. Watase K., Manabe T. 1997 Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276: 1699 – 1702.
- Tapia R., Peña F. y Arias C. 1999 Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *Neurochem. Res.* 24: 1423 - 1430.
- Trotti D. Danbolt N. y Volterra A. 1998 Glutamate transporters are oxidant-vulnerable : a molecular link between oxidative and excitotoxic degeneration? *Trends. Pharmacol. Sci.* 19: 328 – 334.
- Tsuji K., Nakamura Y., Ogata T., Shibata T. y Kataoka K. 1994 Rapid decrease in ATP content without recovery phase during glutamate-induced cell death in cultured spinal neurons. *Brain Res.* 662: 289 – 292.
- Uhler T., Frim D., Pakzaban P. y Isacson O. 1994 The effects of megadose methylprednisolone and U-78517F on toxicity mediated by glutamate receptors in the rat neostriatum. *Neurosurgery*, 34: 122 – 128.
- Vis J., Boer-van Huizen R., Verbeek M., de Waal R., Donkelaar H. y Kremer B. 2002 3-nitropropionic acid produces cell death and mitochondrial dysfunction in rat corticostriatal slice cultures. *Neurosci. Letters* 329: 86 – 90.

- Vis J., Verbeek M., de Waal R., ten Donkelaar H. y Kremer B. 2001 The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces differential expression patterns of apoptosis-related markers in rat striatum. *Neuropathol. Applied Neurobiol.* 27: 68 – 76.
- Voutsinos-Porche B., Bonveto G., Tanaka K., Steiner P., Welter E., Chatton J., Magistretti P. y Pellerin L. 2003 Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37: 275 – 286.
- Watkins J. y Evans R. 1981 Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21: 165 – 204.
- White R. y Reynolds I. 1995 Mitochondria and Na⁺/Ca⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* 15: 1381 – 1328.
- Wüller U., Young A., Penney J. y Beal M. F. 1994 3-nitropropionic acid toxicity in the striatum. *J. Neurochem.* 63: 1772–1781.
- Wyllie A., Kerr J. y Curie A. 1980 Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251 – 306.
- Zeevalk G. y Nicklas W. 1991 Mechanisms underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 870 – 878.
- Zeevalk G. y Nicklas W. 1992 Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J. Neurochem.* 59: 1211 – 1220.
- Zeevalk G., Bernard L., Sinha C., Ehrhart J. y Nicklas W. 1998 Excitotoxicity and oxidative stress during inhibition of energy metabolism. *Dev. Neurosci.* 20: 444 – 453.
- Zerangue N. y Kavanaugh M. 1996 Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383: 634 – 637.