



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DEL  
INHIBIDOR NO SUBSTRATO DE LOS  
TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO, DL-THREO-B-  
BENZILOXIASPARTATO (DL-TBOA), y DEL INHIBIDOR  
SUBSTRATO, L-TRANS-PYRROLIDIN-2,4-  
DICARBOXILICO (PDC) , SOBRE LOS NIVELES DE  
AMINOACIDOS EXTRACELULARES Y LA MUERTE  
NEURONAL IN VITRO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

ANA MARIA ESTRADA SANCHEZ

DIRECTORA DE TEISIS  
DRA. MARIA DE LOURDES MASSIEU TRIGO



MÉXICO, D.F.



2004

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



SECRETARÍA NACIONAL  
DE EDUCACIÓN PÚBLICA

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

NOMBRE: Estrada Sánchez  
Ana María  
FECHA: 7 de Julio 2004  
FIRMA: Estrada

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Estudio comparativo de los efectos del inhibidor no sustrato de los transportadores de glutamato, DL-threo-B-benziloxiaspartato (DL-TBOA), y del inhibidor sustrato, L-trans-pyrrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC), sobre los niveles de aminoácidos extracelulares y la muerte neuronal in vitro".  
realizado por ANA MARIA ESTRADA SANCHEZ

con número de cuenta 9731067-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

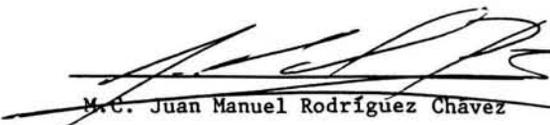
Propietario Dr. Julio Morán Andrade

Propietario Dr. Iván Velasco Velázquez

Suplente Dra. Ana María López Colomé

Suplente Dr. Silvestre Alavez Espidio

Consejo Departamental de Biología

  
M.C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGIA

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR,  
UNAM.

Estudio comparativo de los efectos del inhibidor no sustrato de los transportadores de glutamato, DL-threo-B-benziloxiaspartato (DL-TBOA), y del inhibidor sustrato, L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC), sobre los niveles de aminoácidos extracelulares y la muerte neuronal *in vitro*.

Estrada Sánchez Ana María

Asesora: Lourdes Massieu Trigo

Autodato de la Dirección General de Transmisión de la  
Educativa y de la Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.  
Elaborado por el Dr. Enrique Estrada Sánchez

ESTADO: \_\_\_\_\_  
CARRERA: \_\_\_\_\_  
SEMESTRE: \_\_\_\_\_  
MÓDULO: \_\_\_\_\_

Quiero dedicar este trabajo a mi Papi y a mi Mami, quienes me dieron los principios que ahora forman uno de los pilares de mi persona. También a Luisa y José, mis hermanos, sin ellos, no se que hubiera pasado, y ni tampoco que sería ahora de la vida. A mis amigos, que seguramente, si enlistara a cada uno de ellos, me llevaría más de una cuartilla, pero aunque no lo haga, saben a quienes me refiero. Finalmente a la persona que me dejó conocer un lado más del cariño, a René, que no solo me mostró lo que una persona puede sentir por alguien, si no que también me permitió sentirlo.

## Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Lourdes Massieu primero por haberme aceptado en su grupo de trabajo, y segundo por todo el apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

También mis agradecimientos a Tere quién además de ser una gran persona-amiga, es quien me enseña como se trabaja en un laboratorio.

Al Dr. J. Morán por haberme contactado de inmediato con Lourdes.

Agradezco a Ceci (Lab) por tener preparado lo necesario para el trabajo, y también por ser una gran amiga mañanera.

A mi amiga Ceci (Facultosa) por ser un gran apoyo, durante la entrada a uno de los mundos de rigor ficticio.

A mis compañeros de laboratorio: Alberto, Perla, Octavio, Karla, Jana y Mari, quienes en conjunto forman ese ambiente tan característico del laboratorio... ¡tan lleno de contrastes!

A Silvestre, quien me enseñó las primeras bases del apasionante mundo del S...

Agradezco a mis sinodales; Dra. Ana María López Colomé, Dr. Silvestre Alavez Expidió, Dr. Iván Velasco Velázquez, Dr. Julio Morán Andrade y a la Dra. Lourdes Massieu Trigo. Por el tiempo que cada uno dedicó durante el proceso de mejoramiento de la estructura total de este trabajo.

Finalmente, mil gracias a todos mis amigos, a los que están lejos, y también a los que ya casi no veo, que a final de cuentas TODOS se encuentran relativamente cerca.

Este trabajo se realizó con el apoyo de PAPIIT (IN222503), UNAM.

-Adiós – dijo el zorro - He aquí mi secreto.

Es muy simple:

no se puede ver bien, solo con el corazón. Lo esencial es invisible a los ojos.

El principito

Antoine de Saint-Exupéry.

## Índice

Abreviaturas	1
Prefacio	3
Resumen	5
1. Introducción	7
1.1 Transmisión glutamatérgica	8
Receptores a glutamato	10
Transportadores a glutamato	12
1.2 Excitotoxicidad	14
Isquemia cerebral	17
Papel de los transportadores de glutamato en la salida de aminoácidos excitadores y el daño neuronal isquémico	21
2. Justificación, planteamiento del problema e hipótesis	24
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos particulares	26
4. Metodología	27
4.1 Cultivos celulares	27
4.2 Tratamientos	28
4.3 Viabilidad celular	29
4.4 Cuantificación de aminoácidos	29
4.5 Inmunocitoquímica	30
4.6 Análisis estadístico	31

5. Resultados	32
6. Discusión	42
7. Conclusión	47
8. Bibliografía	48

## Abreviaturas

ACM	Arteria cerebral media
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
Asp	Aspartato
CCSV	Canales de calcio sensibles al voltaje
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
DHK	Dihidroquinato
DL-TBOA	DL- <i>threo</i> - $\beta$ -benziloxiaspartato
DLP	Depresión a largo plazo
EAL	Esclerosis amiotrófica lateral
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GAF	Glutaminasa activada por fosfatos
GFAP	Proteína ácida de la glía
GLAST	Transportador de aspartato-glutamato
GLT-1	Transportador de glutamato-1
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GMS	Glutamato monosódico
GS	Glutamina sintetasa
GSH	Glutación
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
KA	ácido kaínico o kainato
mRGlus	Receptores metabotrópicos a glutamato

MK-801	Maleato de dizocilpina
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinoxalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintasa
ON	Óxido nítrico
PBN	Fenil-N-tert-butil nitrona
PCP	Fenciclidina
PDC	L- <i>trans</i> -pirrolidin-2,4-dicarboxilato
PLC	Fosfolipasa C
PLP	Potenciación a largo plazo
SDH	Deshidrogenasa succínica
SNC	Sistema nervioso central
TAAE	Transportadores de aminoácidos excitadores

## Prefacio

El ser humano se caracteriza por su gran curiosidad que lo ha llevado a formularse preguntas sobre sí mismo, sobre el medio que lo rodea, sobre el por qué de las cosas. El origen de estas inquietudes es el cerebro. En éste se realiza la interpretación que, a través de nuestros sentidos, nos formamos del mundo. El lugar donde se originan los pensamientos ha llamado la atención desde la antigua Grecia, y ahora sin duda alguna ocupa la atención de un gran grupo de personas, por lo que en el siglo XXI el conocimiento de los procesos que tienen lugar en el cerebro ha alcanzado niveles verdaderamente sorprendentes. Es difícil describir en unos cuantos párrafos los sucesos que durante varios siglos han sido determinantes para el conocimiento tanto fisiológico como patológico del cerebro, que ahora tenemos. Sin embargo, aunque sea de forma muy breve mencionaré aquellos puntos que han sido determinantes para el conocimiento básico de este sistema.

Las Neurociencias se ocupan del estudio del Sistema Nervioso, su estudio formal data del siglo XIX cuando Santiago Ramón y Cajal al teñir las células del cerebro con una técnica desarrollada por Camilo Golgi obtuvo la primera descripción detallada de éstas. Propuso la "teoría neural" que postula que este tejido se encuentra formado por células discretas y que no presentan continuidad entre sí, de esta manera se rechazó la "teoría reticular" que había desarrollado Golgi.

A mediados de siglo XIX Sherrington denominó "*sinapsis*" al espacio observado entre estas células. A partir de este suceso, se inició una continua formulación de ideas concernientes al cómo podrían comunicarse estas células, que aparentemente no presentan comunicación entre sí. DuBois Reymond en 1887 al explicar el efecto del nervio sobre el músculo propone el concepto de transmisión química, y en 1904 Elliot apoyaba esta idea al señalar que una sustancia química podría ser la responsable del mecanismo de

comunicación. Esta idea se establece en forma definitiva hasta 1921 con los clásicos experimentos de Otto Loewi. Utilizando dos corazones de rana, él demostró que la estimulación del primero provocaba la respuesta del segundo, el cual se encontraba inmerso en el mismo medio que el primero. Posteriormente Dale, Feldberg y Vought identificaron a este compuesto químico, que ahora conocemos como acetilcolina, que es el transmisor de la sinápsis neuromuscular. Así comenzó la búsqueda de más mensajeros químicos, hasta que se llegó a una clasificación de neurotransmisores con base a su naturaleza química. Las aminas biogénicas: catecolaminas e indolaminas, que incluyen a la dopamina, norepinefrina, epinefrina y serotonina. El grupo de los aminoácidos se dividió en aminoácidos con actividad inhibitoria, como el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y la glicina (Gly), y con actividad excitadora como el ácido aspártico (Asp), y el ácido glutámico (Glu). Para 1970-1980 ya se había identificado la participación de los neuropéptidos en la actividad sináptica, y en 1990 se reconoce al óxido nítrico (ON) como el primer neurotransmisor retrógrado de tipo gaseoso (Moncada et al., 1991).

Los párrafos anteriores únicamente muestran una parte restringida del estudio del cerebro que ha sido realizado durante muchos años y sólo se refiere a la comunicación de las neuronas, principio fundamental de los estudios que se realizan actualmente. El conocimiento de los procesos que ocurren en nuestro cerebro es un apasionante mundo de preguntas y respuestas, en donde las primeras, con cada respuesta se extienden cada vez más, pero que, sin embargo, han permitido acercarnos al entendimiento de lo que nos hace ser nosotros mismos; esto último involucra nuestra interpretación del mundo y de los procesos que generan dicha interpretación.

## Resumen

El cerebro depende en un 95 % del metabolismo aerobio, lo que lo hace altamente vulnerable a cualquier disminución de sus substratos principales: la glucosa y el oxígeno, situación que se presentan durante la isquemia cerebral. La disminución severa de la formación de ATP provoca cambios que culminan en la muerte de las neuronas por un proceso conocido como excitotoxicidad. Este tipo de muerte puede ocurrir cuando existe un incremento considerable en la concentración sináptica del glutamato (Glu) - principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de los mamíferos - o durante una falla energética, la cual facilita los efectos tóxicos del Glu (Beal, 1992; Henneberry et al., 1989). La regulación de los niveles extracelulares de este neurotransmisor se debe a la actividad de proteínas transportadoras, las cuales se encargan de removerlo del espacio sináptico. Durante la falla energética los transportadores pueden funcionar deficientemente o invertir su dirección de transporte, incrementando la concentración extracelular de Glu. Por esta razón, se ha sugerido que si se inhibe a los transportadores de Glu durante un evento isquémico se podría reducir la salida del neurotransmisor, y en consecuencia disminuir la muerte neuronal. Los estudios realizados para comprobar esta hipótesis se han efectuado utilizando inhibidores que, además de no ser selectivos para los diferentes transportadores existentes, muchos de ellos son sustrato de éstos, lo que conduce a su intercambio por el Glu intracelular, contribuyendo al aumento extracelular del neurotransmisor. Esto puede limitar el uso de estos fármacos para prevenir la muerte neuronal isquémica. En el presente estudio se compararon los efectos del inhibidor no-transportable de los transportadores de glutamato, el DL-*threo*- $\beta$ -benziloxiaspartato (DL-TBOA), y del inhibidor transportable L-*trans*-pyrrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC), sobre la sobrevivencia neuronal y los niveles de algunos aminoácidos, en cultivos de neuronas

granulares del cerebelo. También se evaluó el efecto de estos dos compuestos en presencia de la toxina mitocondrial, el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), una toxina que inhibe a la enzima deshidrogenasa succínica (SDH), que forma parte del complejo II de la cadena transportadora de electrones y del ciclo de Krebs. Los resultados indican que la exposición a PDC aumenta significativamente la concentración de Glu y aspartato (Asp) en el medio extracelular pero no produce muerte neuronal después de exposiciones cortas (30 min), a concentraciones de 0.1, 0.25 y 0.5 mM. Sin embargo, a una concentración de 1 mM sí se presenta muerte neuronal. El DL-TBOA induce cambios más discretos en los niveles de Glu y ninguno en los niveles de Asp, y no produce muerte neuronal a ninguna de las concentraciones probadas, después de exposiciones cortas. Ambos inhibidores disminuyen la sobrevivencia durante tiempos prolongados de exposición (4, 8 y 24 horas). El efecto tóxico del DL-TBOA posiblemente está influenciado por un incremento en la concentración de glicina (Gly) observada después de la exposición a este inhibidor. El daño neuronal sugiere un mecanismo excitotóxico, debido a la protección obtenida en presencia del MK-801 y del NBQX, antagonistas de los receptores a Glu. También se sugiere la participación del estrés oxidativo en la muerte, debido a la protección obtenida con el antioxidante (PBN). La toxicidad del PDC se facilita en presencia del 3-NP, mas no la del DL-TBOA. Son necesarios mas experimentos para conocer el mecanismo de liberación de glicina inducida por el DL-TBOA y su papel en la muerte neuronal producida por este inhibidor.

## 1. Introducción

El Glu está involucrado en un gran número de funciones celulares: forma parte de la estructura primaria de las proteínas, participa en el metabolismo celular como fuente de  $\alpha$ -cetoglutarato dentro del ciclo Krebs (Filer et al., 1979), en la proliferación de células cancerosas, y en la formación de huesos, puesto que en osteoblastos y osteoclastos se encuentran receptores a Glu que influyen en la osteogénesis (Nedergaard et al., 2002). Además, funciona como regulador de la homeostasis de glucosa en sangre mediante la estimulación de la secreción de glucagon, en los islotes de Langerhans en páncreas (Moriyama y Hayashi, 2003).

En el SNC de los mamíferos el Glu es el neurotransmisor excitador de mayor abundancia. Se encuentra implicado en diferentes funciones neuronales como la plasticidad neuronal (Wheal y Thompson, 1991; Moriyama y Hayashi, 2003), en procesos de aprendizaje y memoria mediante cambios en la eficacia sináptica, como en la potenciación a largo plazo (PLP) y la depresión a largo plazo (DLP) (Wheal y Thompson 1991; Smith, 2000); en procesos de desarrollo (Rafiki et al., 2000) y en el crecimiento neuronal (Kandel et al., 2001). Por otra parte, el Glu puede ser neurotóxico, y es el responsable de un tipo de muerte neuronal conocida como excitotoxicidad (Olney, 1969). Las diferentes funciones neuronales del glutamato están directamente relacionadas con la concentración extracelular de éste y con la interacción que tenga con los diferentes tipos de receptores glutamatérgicos, por ejemplo, durante la transmisión sináptica, su concentración se incrementa de 1-3  $\mu$ M hasta 1mM, que rápidamente es removido por los transportadores gliales y neuronales. Por otra parte, cuando las neuronas son expuestas a Glu a una concentración mayor o igual a 100  $\mu$ M, éste resulta tóxico (Choi et al., 1987). La muerte excitotóxica está implicada en procesos neuropatológicos asociados a la epilepsia, la

isquemia-hipoxia cerebral, la hipoglicemia y a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, las encefalopatías mitocondriales, los síndromes degenerativos espinocerebelosos, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis amiotrófica lateral (EAL) (Wheal y Thompson, 1991; Ishii, 1993; Bittigau y Ikonomidou, 1997).

### **1.1. Transmisión glutamatérgica**

La comunicación interneuronal mediada por el Glu se denomina transmisión glutamatérgica. Esta transmisión se inicia con la llegada del potencial sináptico a la terminal presináptica, provocando la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje (CCSV). La entrada de este ión es necesaria para el anclaje y fusión de las proteínas presentes en las vesículas, que en su interior contienen al Glu, con la membrana presináptica, permitiendo la liberación del neurotransmisor. El Glu una vez liberado interactúa con receptores presentes en la célula postsináptica continuando con la comunicación neuronal. Los receptores para el glutamato son metabotrópicos e ionotrópicos: los primeros desencadenan una señal que promueve la formación de segundos mensajeros (i.e.  $IP_3$ , diacilglicerol), mientras que los receptores ionotrópicos permiten la entrada selectiva de iones al interior de la neurona. La actividad de ambos produce cambios en la neurona postsináptica que culminan en la excitación o inhibición de ésta (Fig. 1).

Los receptores ionotrópicos son: el receptor al N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor al  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) y el receptor a kainato (KA), llamados así de acuerdo al agonista exógeno que los activa (Fagg y Massieu, 1991). Por último, los receptores metabotrópicos (mRGlu), son receptores acoplados a proteínas G, la unión del Glu a estos receptores activa a la fosfolipasa C (PLC), que promueve la formación

de segundos mensajeros derivados del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>): inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (Ishii et al., 1993).

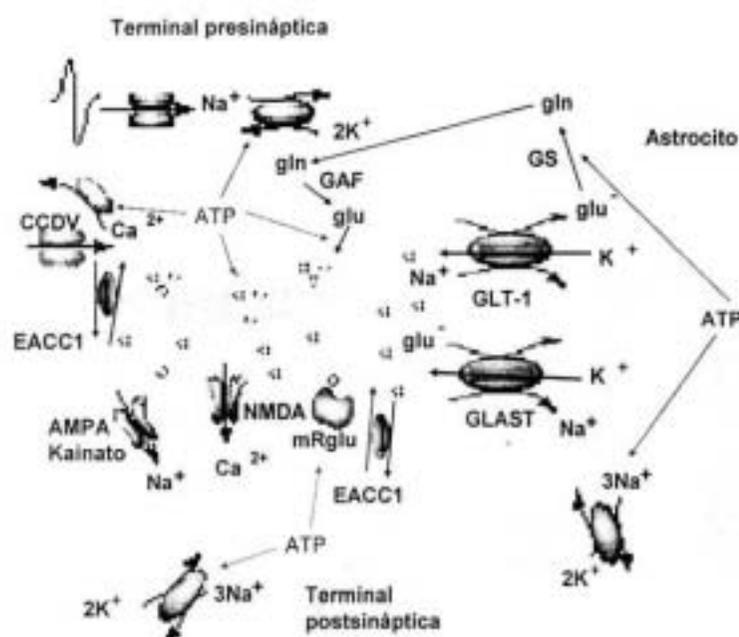


Fig. 1. Transmisión glutamatergica. La llegada del potencial de acción provoca la apertura de canales de calcio dependientes del voltaje (CCDV) que permiten la entrada de este ión a la terminal presináptica, permitiendo la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico. El glutamato interactúa con sus receptores en la membrana postsináptica, que son tanto, metabotrópicos (mRglu) como ionotrópicos (NMDA y AMPA/kainato). Estos permiten la entrada selectiva de iones: calcio principalmente por el receptor NMDA y  $Na^{+}/K^{+}$  por los receptores AMPA y kainato. La ATPasa  $Na^{+}/K^{+}$  reestablece los gradientes iónicos después de la propagación del estímulo, generando el gradiente de sodio bajo el cual operan los transportadores de Glu, que se encargan de concluir la transmisión sináptica retirando al Glu del medio extracelular. Los transportadores GLAST y GLT-1 se encuentran principalmente en astrocitos y EACC1 en las neuronas. En los astrocitos, la glutamina sintetasa (GS) convierte el Glu a glutamina, la cual posteriormente pasa al espacio sináptico donde es capturada por la neurona presináptica para metabolizarla nuevamente a Glu por la glutaminasa activada por fosfatos (GAF) para cerrar el ciclo de la transmisión glutamatergica. Modificada de Bonvento et al., 2002.

## Receptores a glutamato

El receptor AMPA se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, está formado por cuatro subunidades (Wheal y Thompson, 1991; Rongsheng et al., 2003), y es el responsable de la neurotransmisión excitadora rápida que antecede a la apertura del receptor NMDA. La entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través del receptor AMPA despolariza la neurona, y permite la extrusión del ión  $\text{Mg}^{2+}$  que bloquea a los receptores NMDA. Los antagonistas para este receptor son las quinoxalindionas como la CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona) que también bloquea al receptor a KA, y la NBQX (2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinoxalina), y el agonista principal es el AMPA (Fagg y Massieu, 1991). Los receptores a KA, al igual que los receptores a AMPA, son permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Este tipo de receptor puede ser activado por el ácido domóico y el ácido kaínico, que son toxinas provenientes de una alga. En conjunto los receptores AMPA y kainato son denominados receptores no-NMDA (Fig. 2a).

El receptor NMDA es un tetrámero transmembranal resultado de la asociación de 4 subunidades que pertenecen a tres familias: NR1, en esta subunidad se une la glicina, que es co-agonista del receptor; una de las cuatro subunidades NR2 (NR2A-NR2D), donde se une el glutamato (Ishii et al., 1993; Rafiki et al., 2000), y la subunidad NR3, la cual modula la actividad del receptor NMDA (Das et al., 1998). Este receptor es un poro permeable a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , pero principalmente a  $\text{Ca}^{2+}$ . Es un receptor que presenta varios sitios de regulación; además del sitio de unión al Glu, presenta un sitio para la Gly que funciona como co-agonista, este sitio también puede ser ocupado por la D-serina, y se ha interpretado que es la glicina el co-agonista endógeno del receptor (Schell et al., 1995). Si no se encuentra presente el co-agonista, no ocurre la apertura del canal. También presenta sitios de unión a poliaminas (espermina y espermidina) que en bajas concentraciones

incrementan la probabilidad de apertura del canal, al unirse la glicina y el glutamato (Siegel et al., 1994).

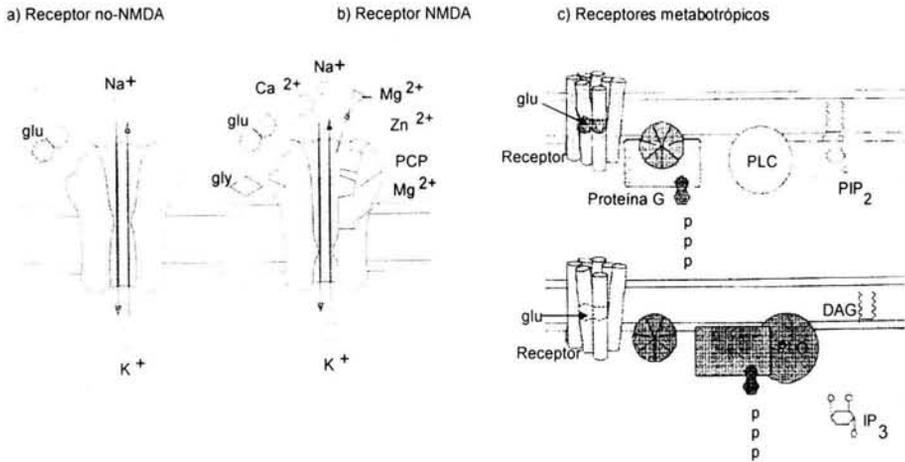


Fig. 2. Representación de los receptores a glutamato. a) Receptores ionotrópicos tipo no-NMDA. Se conoce bajo este nombre tanto a los receptores AMPA como a los receptores kainato. Ambos son receptores ionotrópicos permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . b) Receptor ionotrópico tipo NMDA. Se muestran los sitios de unión a la Gly, al Glu, al  $\text{Zn}^{2+}$ , al  $\text{Mg}^{2+}$  el cual se extruye al despolarizarse la membrana, y al antagonista PCP. Este es un canal permeable a  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  pero principalmente a  $\text{Ca}^{2+}$ . c) Receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Al darse el acoplamiento del agonista endógeno se estimula la activación de la fosfolipasa C (PLC), que lleva a la formación de segundos mensajeros derivados del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ): inositol 1,4, 5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol. Modificado de Kandel, 2001.

El Zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) bloquea el canal del receptor NMDA, al igual que el Magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), pero éste último bloquea el canal de manera dependiente del voltaje, retirándose al despolarizarse la membrana celular (Fig. 2b) (Moriyoshi et al., 1991).

En 1991 Nakanishi y colaboradores mostraron, mediante estudios de hibridación *in situ* en cerebro de rata, la distribución de la subunidad NR1 (NMDAR1). Observaron que

ésta se encuentra distribuida ampliamente en las siguientes regiones: hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza cerebral, y particularmente en la capa granular del cerebelo (Moriyoshi et al., 1991).

Los principales antagonistas del receptor NMDA son el (+)-5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo-(a,d)-cicloheptano-5,10-imina maleato (MK-801) que lo bloquea de manera dependiente del voltaje, la ketamina y la fenciclidina (PCP); estos antagonistas son inhibidores del canal abierto y se unen en un sitio diferente al de unión a  $Mg^{2+}$  (Siegel et al., 1994).

Los receptores metabotrópicos (mRGlu) son receptores que presentan siete segmentos transmembranales y se encuentran acoplados a proteínas G (Siegel et al., 1994). Se encuentran divididos en tres grupos: grupo 1 que incluye mRGlu 1 y 5: su activación produce la formación de  $IP_3$  y DAG, el primero incrementa la concentración intracelular de calcio, mientras el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC); el grupo 2 (mRGlu 2 y 3) y grupo 3 (mRGlu 4, 6, 7 y 8), los cuales inhiben a la adenilato ciclasa produciendo una disminución de cAMP, el cual participa en la depresión a largo plazo (DLP) (Fig. 2c) (Knopfel y Grandes, 2002; Pin y Acher, 2002). Una vez activados los receptores y propagada la señal, el glutamato es removido del espacio sináptico por transportadores específicos.

### **Transportadores de glutamato**

La fase final de la transmisión sináptica glutamatérgica la llevan a cabo los transportadores que se encuentra tanto en las neuronas como en células gliales. Después de la activación de los receptores y la consecuente despolarización de la membrana, éstos se encargan de retirar al glutamato del espacio sináptico (Takahashi et al., 1997; Danbolt,

2001). Su papel dentro de la transmisión sináptica es mantener los niveles de Glu extracelular alrededor de 1 a 3  $\mu\text{M}$ , y de esta manera evitar su acumulación en el espacio extracelular, protegiendo a las neuronas de su acción tóxica, resultado de la activación prolongada de los receptores (Danbolt, 2001). Los transportadores tienen la capacidad de reconocer y transportar tanto al glutamato como al aspartato, de igual manera pueden reconocer a enantiómeros de estos dos aminoácidos, mientras que el L-Glu es removido por sus transportadores, su enantiómero (D-Glu) presenta baja afinidad, por otra parte, el D-Asp y L-Asp pueden ser translocados con el mismo rango de afinidad (Campiani et al., 2003).

Se han clonado cinco tipos de transportadores de aminoácidos excitadores (TAAE): EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 y EAAT5 (Danbolt, 2001). Los transportadores GLT-1 y GLAST, se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC. El GLT-1 está presente principalmente en astrocitos, aunque recientemente se determinó su presencia en neuronas, incluso en terminales sinápticas (Chen et al., 2004), y se encuentra principalmente en el cerebro anterior. El transportador GLAST se encuentra presente en casi todo el sistema nervioso central pero preferentemente se expresa en la capa molecular del cerebelo (Danbolt, 2001). Este transportador se ha observado principalmente en células gliales y su presencia en neuronas es un tanto controvertida: existen estudios que refieren la presencia del mRNA de GLAST en células granulares del hipocampo, y también se ha detectado su expresión transitoria en cultivos de neuronas del hipocampo (Danbolt, 2001). Los transportadores EAAC1 y EAAT4 se encuentran exclusivamente en neuronas. El transportador EAAT5 está localizado en neuronas y células gliales de la retina (Gadea y López-Colomé, 2001).

El funcionamiento de los transportadores depende del gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  generado por la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Takahashi et al., 1997; Attwell, 2000). La ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$

es el sistema principal de transporte activo de iones en las neuronas, al igual que en otras células, por lo que utiliza gran parte del ATP, resultado de la glicólisis y la fosforilación oxidativa. Esta bomba extruye 3 Na<sup>+</sup> e internaliza 2 K<sup>+</sup> por molécula de ATP hidrolizada. La entrada neta de una carga positiva es lo que genera el gradiente electroquímico (Siegel et al., 1994; Hertz et al., 1999). Utilizando este gradiente, los transportadores toman del espacio extracelular una molécula de glutamato acompañado de 2-3 Na<sup>+</sup> más H<sup>+</sup>, mientras se extruye un K<sup>+</sup> (Fig. 3). Una vez internalizado el Glu por los transportadores gliales, es metabolizado a glutamina (Gln), por acción de la enzima glutamina sintetasa (GS), que se encuentra tanto en astrocitos como en oligodendrocitos, pero no en neuronas (Hertz et al., 1999). La Gln es liberada al espacio sináptico y posteriormente es capturada por las neuronas, para sintetizar nuevamente el neurotransmisor (Danbolt, 2001).

## 1.2. Excitotoxicidad

A pesar de que el Glu es el neurotransmisor excitador principal y está involucrado en numerosas funciones neuronales, bajo ciertas circunstancias, como por ejemplo a altas concentraciones y durante la deficiencia energética, es neurotóxico (Choi, 1987; Henneberry, 1989; Beal, 1992). Los estudios que demostraron el papel del Glu como neurotransmisor se dieron en paralelo con las observaciones a través de las cuales se identificó su papel neurotóxico. En 1957 Lucas y Newhouse observaron que al inyectar Glu intraperitonealmente en ratas inmaduras se producía degeneración de células en la retina. Años después, en 1959 Curtis y sus colaboradores observaron que al superfundir glutamato o sus agonistas, aumentaba la tasa de disparo en las neuronas de la médula espinal del gato. John Olney en 1969 describió que al administrar glutamato monosódico (GMS) en ratones neonatos, cuya barrera hematoencefálica no se encontraba del todo desarrollada, se

producía muerte en las neuronas del hipotálamo. De manera similar, al utilizar ácido kaínico se observaba neurotoxicidad.

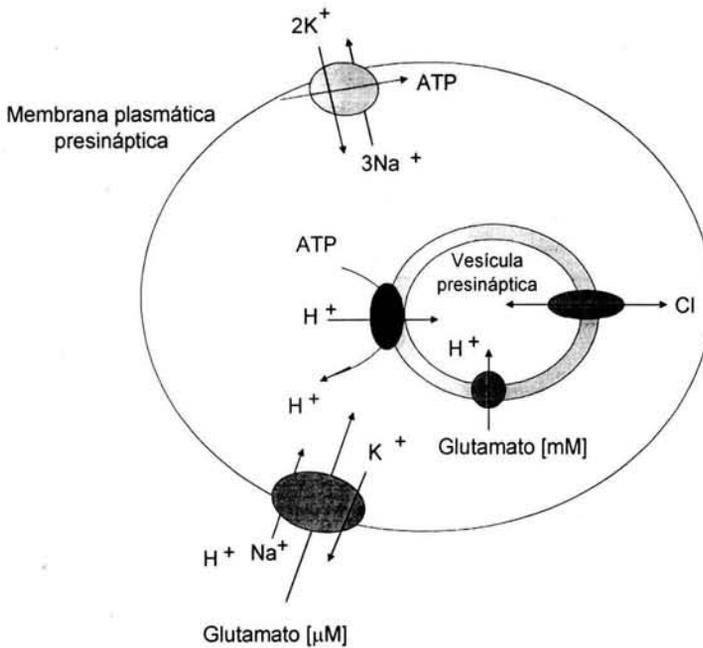


Fig. 3. Transporte activo celular. La ATPasa extruye 2-3 Na<sup>+</sup> e introduce 2 K<sup>+</sup> por molécula de ATP hidrolizada, generando el gradiente de Na<sup>+</sup> bajo el cual operan los transportadores de glutamato. Estos toman del espacio extracelular una molécula de Glu acompañada de 2-3 Na<sup>+</sup> y 1 H<sup>+</sup> y a la vez extruye 1 K<sup>+</sup>. El ácido glutámico dentro de las neuronas se vesiculiza nuevamente, por transportadores distintos a los presentes en la membrana plasmática, para volver a ser utilizado en la transmisión sináptica.

El término excitotoxicidad engloba dos características principales del ácido glutámico, hace mención a su función como neurotransmisor excitador en el SNC así como a su característica tóxica, la cual se manifiesta a altas concentraciones o bajo situaciones

limitantes de ATP, y ocurre como consecuencia de la sobre-activación de los receptores glutamatérgicos (Olney, 1969).

Se propuso inicialmente que las células morían debido al agotamiento de sus reservas energéticas inducido por la sobre-excitación (Olney, 1969). Más tarde se descubrió que el incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , por la activación continua del receptor NMDA, es un factor determinante de la excitotoxicidad (Choi, 1987; Michaels y Rothman, 1990). Durante un proceso excitotóxico, inicialmente el glutamato activa a los receptores AMPA y kainato, lo que conduce a la despolarización de la célula, provocando la extrusión del  $\text{Mg}^{2+}$  del receptor NMDA. La activación de este receptor permite el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la neurona incrementando su concentración intracelular. Como importante segundo mensajero el  $\text{Ca}^{2+}$  activa diversas proteasas; a la calmodulina y a la óxido nítrico sintasa (ONS), que genera óxido nítrico (ON). Este último es un mensajero gaseoso muy reactivo que al unirse con el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), proveniente de la mitocondria, forma peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), una molécula altamente reactiva que produce lipoperoxidación de la membrana. El  $\text{ONOO}^-$  también puede interactuar con proteínas que se encuentran en la mitocondria como el complejo I y II, y con la aconitasa, provocando disfunción de la cadena transportadora de electrones, fuente principal de la generación de ATP (Jacobson y McCarty, 2002). Así mismo el ON puede nitrosilar a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, inhibiendo su función; ésta enzima forma parte de la glicólisis (Bittigau y Ikonomidou, 1997; Sims y Anderson, 2002). La mitocondria al tratar de regular la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  excede su capacidad de capturar calcio, lo que conduce al colapso del gradiente transmembranal mitocondrial a la alteración de la fosforilación oxidativa y en consecuencia al incremento de la producción de radicales libres (Henneberry, 1997). La activación de los receptores metabotrópicos produce degradación de lípidos específicos de la membrana (*i. e.* fosfatidilinositol), a través de la estimulación de la fosfolipasa C (PLC), lo que produce la

formación de moléculas mensajeras como el inositol 1,4, 5-trifosfato ( $IP_3$ ). El  $IP_3$  se une a su receptor en el retículo endoplásmico permitiendo la liberación de  $Ca^{2+}$  de su interior, contribuyendo al incremento de la concentración citoplásmica del catión (Bittigau y Ikonomidou, 1997). Los procesos intracelulares excitotóxicos se resumen en la figura 4. La excitotoxicidad ocurre cuando la concentración de glutamato excede sus niveles extracelulares basales (1-3  $\mu M$ ). Esto puede ocurrir cuando hay una liberación excesiva de este neurotransmisor, o por una falla en su sistema de remoción. El transporte de Glu depende del gradiente de  $Na^+$ , en condiciones de falla energética la disminución de los niveles de ATP da lugar al colapso de este gradiente, provocando la disfunción de los transportadores. Si la deficiencia energética es lo suficientemente severa, el gradiente de  $Na^+$  puede invertirse y dar lugar a la operación en reversa de los transportadores extruyendo Glu al espacio extracelular. Esta situación puede presentarse durante la isquemia, la anoxia y la hipoglicemia severa. Estos estados patológicos son un claro ejemplo de muerte neuronal inducida por excitotoxicidad (Massieu, 1999).

### **Isquemia cerebral**

La isquemia cerebral resulta de una obstrucción total o parcial del flujo sanguíneo cerebral que reduce el suministro de oxígeno y nutrientes. Pueden identificarse dos tipos de isquemia cerebral: la global y la focal. La isquemia global es el resultado de la interrupción total del flujo sanguíneo cerebral, consecuencia de un paro cardíaco o hipotensión severa. El daño que se observa en el tejido cerebral se restringe a zonas vulnerables como el área CA1 del hipocampo, las capas 3, 5 y 6 de la corteza cerebral y el cerebelo (Iadecola, 1999). La isquemia focal se observa al presentarse una reducción local de la circulación cerebral circunscrita a una arteria principal como la arteria media cerebral (ACM), consecuencia de

embolias o trombosis. El daño resultante se restringe a una zona localizada del cerebro que se conoce como foco isquémico, donde hay muerte abrupta e irremediable. La zona que la rodea se conoce como *zona de penumbra*, esta zona se distingue por presentar irrigación colateral, por lo que no hay una reducción total de oxígeno y glucosa, y es potencialmente rescatable (Iadecola, 1999).

La gran dependencia del SNC del metabolismo aerobio lo vuelve susceptible a cualquier alteración del suministro de glucosa y oxígeno. Las funciones celulares dependen de la formación de ATP, del cual el 95 % proviene de la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Como se mencionó anteriormente, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  restaura los gradientes iónicos después de la despolarización o hiperpolarización de la célula y consume una gran proporción del ATP generado. El disturbio de los gradientes iónicos y la disminución del ATP asociados con la isquemia, conducen al mal funcionamiento de los transportadores de Glu, favoreciendo su operación en reversa (Fig. 5) (Reith et al., 1997, Rossi et al., 2000). Durante un evento isquémico uno de los primeros cambios observados es el aumento en la concentración extracelular de aminoácidos, incluido el glutamato (Choi y Rothman, 1990; Jacobson y McCarty, 2002). La elevación del Glu extracelular es determinante en la muerte isquémica ya que se previene con antagonistas de receptores NMDA, y AMPA/kainato (Swan y Meldrum, 1990).

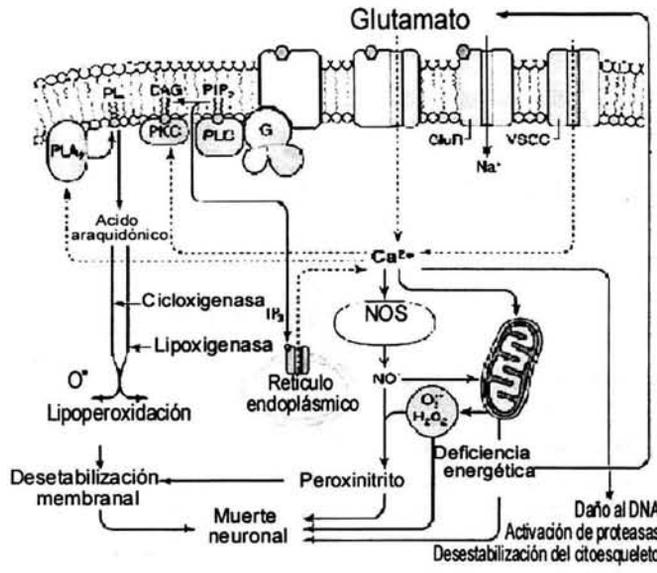


Fig. 4. Eventos intracelulares postsinápticos que se dan durante la muerte excitotóxica. La elevación en la concentración sináptica de Glu provoca la activación prolongada de los receptores glutamatergicos, que promueven el incremento del  $Ca^{2+}$  intracelular, tanto por la entrada de  $Ca^{2+}$  por el receptor NMDA, como por la liberación de este ión de las pozas internas del retículo endoplásmico. El  $Ca^{2+}$  activa proteasas e induce la formación de radicales libres, provenientes de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y de la actividad de la óxido nítrico sintasa, lo que conduce a la muerte neuronal. La degradación de la membrana plasmática, blanco de diversos radicales libres, y la activación de receptores metabotrópicos que activan fosfolipasas, conduce a su desestabilización y a la liberación del contenido intracelular, contribuyendo a la elevación del glutamato extracelular. Modificado de Dungan y Choi, en Siegel et al., 1999.

Se han postulado tres mecanismos por los cuales el ácido glutámico puede llegar a concentraciones tóxicas durante la isquemia: en la primera etapa del evento isquémico se produce la liberación del transmisor de manera dependiente de  $Ca^{2+}$ , inducida por la entrada de este catión por los CCDV o por su salida de las pozas internas (i.e. retículo endoplásmico). Posteriormente, el funcionamiento en reversa de los transportadores de Glu,

induce su extrusión al espacio extracelular. Finalmente, el hinchamiento y la actividad de las fosfolipasas, pueden llevar a la degradación progresiva de la membrana, contribuyendo a la liberación del contenido celular al espacio extracelular (Phillis y O'Regan, 2003). Algunos estudios sugieren que la vía de salida predominante en la isquemia es la operación en reversa de los transportadores de Glu (Rossi et al., 2001). Por lo anterior se ha sugerido que la inhibición de los transportadores de glutamato puede reducir el daño resultante de un periodo isquémico, al reducir la salida del neurotransmisor (Phillis et al., 2000; Anderson et al., 2001; Phillis y O'Regan 2003).

Rothstein en 1996 observó que al utilizar inhibidores de los transportadores de Glu, DL-*threo*- $\beta$ -hidroxiaspartato (THA) o L-trans-pirrolidín-2,4-dicarboxilato (PDC) en cultivos organotípicos de medula espinal, se incrementa la concentración extracelular de Glu, y que ésta era probablemente la causa de la degeneración observada en las motoneuronas. Resultados similares fueron reportados en cultivos neuronales (Velasco et al., 1996; Volterra et al., 1996). Al utilizar oligonucleótidos antisentido para el fragmento N-terminal de los transportadores GLAST, GLT-1 y EAAC1, se observó que al interferir con la síntesis de GLAST y GLT-1, ambos transportadores presentes preferentemente en células gliales, producía daño neuronal, mientras que la administración de los oligonucleótidos antisentido del transportador neuronal EAAC-1, no producía neurodegeneración (Rothstein et al., 1996). Ésto llevó a la conclusión de que los transportadores neuronales desempeñan un papel menos importante que los transportadores presentes en las células gliales, en cuanto a la regulación de la concentración extracelular de Glu, y por tanto de su toxicidad. Estudios realizados in vivo con el inhibidor selectivo para el transportador GLT-1, el dihidrokainato, sugieren una participación importante de este transportador en la salida de glutamato provocada por eventos de isquemia (Phillis y O'Regan, 2003).

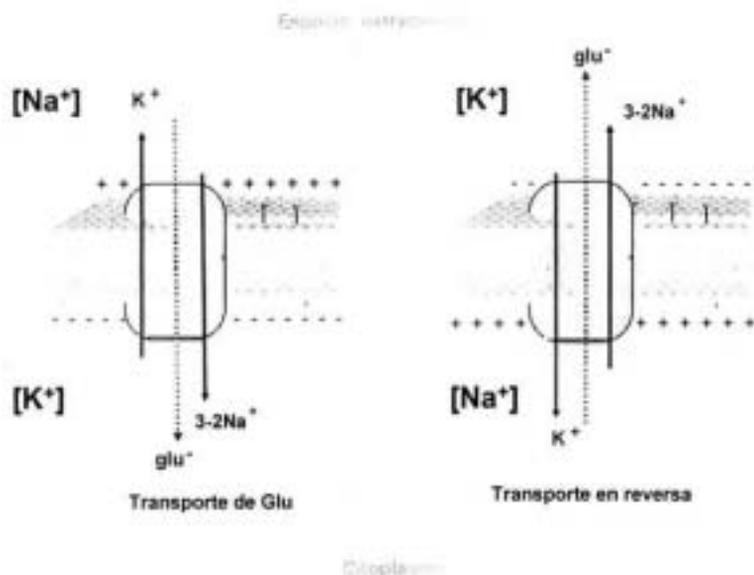


Fig. 5. Estequiometría de los transportadores de glutamato. La fase final de la transmisión sináptica la realizan los transportadores, retirando el neurotransmisor del espacio sináptico para mantener una concentración de glutamato de 1 a 3  $\mu\text{M}$  y de esta manera evitar su acción tóxica sobre las neuronas. Durante el transporte en reversa, el transportador extruye Glu, y en consecuencia eleva los niveles extracelulares del neurotransmisor. Este es el mecanismo predominante de liberación de glutamato durante un evento de isquemia cerebral.

### **Papel de los transportadores de glutamato en la salida de aminoácidos excitadores y el daño neuronal isquémico**

Como se mencionó en los párrafos anteriores, la disminución de la producción de ATP lleva a un colapso de los gradientes iónicos, generando la operación en reversa de los transportadores de Glu durante un evento isquémico, incrementándose la concentración extracelular de este aminoácido (Szatkowski et al., 1990). Por esta razón se ha propuesto que la inhibición de los transportadores puede disminuir la salida continua de Glu y en consecuencia reducir la muerte neuronal isquémica (Rossi et al., 2001). Para corroborar

esta hipótesis se han realizado estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, utilizando inhibidores del transporte. Estos inhibidores no son selectivos para los diferentes transportadores de aminoácidos excitadores (TAAE) por lo que no es posible aislar el efecto de cada uno de ellos sobre el aumento en la concentración de Glu y la resultante muerte neuronal. Los inhibidores del transporte que se han utilizado son en la gran mayoría sustrato de los transportadores, lo que significa que al unirse al transportador no detienen su actividad si no mas bien favorecen su intercambio por el glutamato intracelular, ya sea glial o neuronal (Anderson et al., 2001). El PDC es un ejemplo de inhibidor transportable, este inhibidor tiene un valor  $IC_{50}$  igual a 74  $\mu$ M de inhibición de la recaptura (Campiani et al., 2003). Es un inhibidor que interactúa con todos los TAAE y promueve la salida del glutamato por heterointercambio, es un análogo del glutamato pero no interactúa con receptores glutamatérgicos (Blitzblau et al., 1996; Volterra et al., 1996). Estudios en cultivos de corteza han mostrado que la exposición a PDC produce muerte neuronal, la cual correlaciona con la elevación de los niveles de Glu (Velasco et al., 1996; Volterra et al., 1996; Blitzblau et al., 1996). Estudios *in vivo* tanto en el hipocampo como en el estriado de la rata, muestran que la administración de PDC por microdialísis, induce incrementos en la concentración de Glu, pero contrario a lo que sucede en los cultivos corticales, esto no es suficiente para producir muerte neuronal (Massieu et al., 1995; Massieu y Tapia, 1997). Por otra parte, una inhibición prolongada (3-14 días) de los transportadores con PDC, provoca muerte neuronal en el estriado de la rata (Liévens et al., 2000).

No obstante, cuando se administra el PDC en ratas que fueron tratadas previamente con el inhibidor de la glicólisis, yodoacetato, o el inhibidor mitocondrial, ácido 3-nitropropiónico (3-NP), se presenta daño neuronal tanto en el estriado como en el hipocampo (Sánchez-Carbente y Massieu, 1999; Massieu et al., 2000). De manera similar, estudios realizados en cultivos primarios de células granulares de cerebelo, la exposición a PDC eleva la

concentración extracelular de Glu, pero no induce muerte neuronal, sin embargo, cuando se incuba el PDC con una dosis subtóxica (500 $\mu$ M) de la toxina mitocondrial 3-NP, sí hay un efecto tóxico (García y Massieu, 2001; 2003). El 3-NP inhibe de manera irreversible a la SDH, pero a una dosis de 500  $\mu$ M no induce muerte neuronal (García y Massieu, 2001). El mecanismo de muerte por PDC en estas condiciones parece ser excitotóxico ya que se observa protección con antagonistas de receptores NMDA (García y Massieu, 2001; 2003).

Recientemente se ha sugerido que el PDC no solo produce muerte de tipo excitotóxica, sino también por estrés oxidativo, como consecuencia de la disminución de los niveles de glutatión (GSH) (Himi et al., 2003). La inhibición de los transportadores de glutamato interfiere con el contratransportador de cistina, lo que lleva a una reducción en los niveles intracelulares de ésta, y por tanto del glutatión (Ré et al., 2003). El GSH es una defensa anti-oxidante, al reducirse su concentración intracelular se facilita la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), volviendo susceptibles a las células contra el daño oxidativo y ocasionando finalmente su muerte. Sin embargo, resulta difícil discernir la fuente ERO, dado que durante un proceso excitotóxico existe también el estrés oxidativo.

En 1998 se sintetizó un inhibidor no transportable de los transportadores de glutamato, el DL-*threo*- $\beta$ -benziloxiaspartato (DL-TBOA) (Shimamoto et al., 1998). Para este inhibidor se estima un valor de inhibición de la recaptura de IC<sub>50</sub> de 19  $\mu$ M en neuronas y 23.5  $\mu$ M en atrociitos (Waagepetersen et al., 2001), es un inhibidor que bloquea a los transportadores neuronales y gliales, sin embargo, en cultivos de astrociitos corticales manifiesta actividad de inhibidor substrato (Anderson et al., 2001). En cultivos de células granulares de cerebelo tanto el PDC como el DL-TBOA inhiben la captura de [<sup>3</sup>H]D-aspartato, siendo en esta preparación el DL-TBOA mas potente que el PDC, además el DL-TBOA no promueve la liberación de [<sup>3</sup>H]D-aspartato preincubado, mientras el PDC sí promueve su liberación (Waagepetersen et al., 2001). En rebanadas de hipocampo se observó que este inhibidor

eleva la concentración de Glu (Jabaudon et al., 1999). Se ha estudiado el efecto de DL-TBOA sobre la salida de glutamato y aspartato en condiciones que mimetizan la isquemia cerebral, en estas condiciones el DL-TBOA reduce la salida de Glu y Asp pero en este trabajo no se muestran datos que evidencien el efecto protector de este compuesto (Phillis et al., 2000; Phillis y O'Regan, 2003). Por otra parte, en rebanadas de hipocampo en cultivo, se observó que el DL-TBOA puede provocar muerte neuronal (Bonde et al., 2003), aunque un trabajo en la misma preparación reporta cierta insensibilidad al daño por DL-TBOA (O'Shea et al., 2002).

Estas observaciones indican que si se induce la salida de Glu favoreciendo su intercambio con el inhibidor sustrato de los transportadores de Glu, el PDC, no se produce muerte neuronal, a menos que exista una deficiencia metabólica, este efecto podría limitar el uso de este inhibidor para prevenir el daño isquémico. Por otra parte, el DL-TBOA es un potente inhibidor no-transportable (no sustrato) que podría representar una herramienta potencial para prevenir el daño isquémico. En el presente estudio se investigó si la exposición a un inhibidor no-sustrato de los transportadores de glutamato, el DL-TBOA, induce aumentos en la concentración extracelular del Glu y Asp, y si es capaz de producir muerte neuronal en presencia o ausencia de la toxina mitocondrial, 3-NP.

## **2. Justificación**

La isquemia cerebral es la primera causa de muerte y discapacidad en personas adultas en varios países. En México, con base en estadísticas realizadas por el INEGI, los padecimientos cerebrovasculares son la sexta causa de mortalidad. Las consecuencias de la isquemia cerebral pueden ser variables pero en la mayoría de los casos el daño neuronal resultante disminuye la capacidad física y mental de la persona o en casos severos ocasiona

la muerte. La búsqueda de herramientas terapéuticas es uno de los campos más vastos dentro de la ciencia. El éxito de un fármaco involucra principalmente, el conocimiento preciso de sus mecanismos de acción, que permitan una administración adecuada y oportuna. Para asegurar este resultado, la búsqueda minuciosa de los mecanismos de acción de los fármacos nos da la pauta para garantizar un tratamiento exitoso.

Las funciones que se llevan a cabo dentro de la célula son extremadamente complejas, y aún más la integración de todas éstas, por lo que antes de evaluar directamente algún tratamiento es indispensable cotejarlo en una preparación que permita aislar y examinar, ya sea en conjunto o por separado, las diversas variables involucradas. Para ello los estudios *in vitro* son una valiosa herramienta, que nos permiten simular las condiciones de un sistema vivo, que si bien no son iguales, sí son una buena aproximación, a partir de la cual puede valorarse el efecto sobre un sistema complejo.

### **Planteamiento del problema**

La inhibición del transporte de glutamato con PDC induce la liberación del Glu y Asp por heterointercambio y puede causar muerte neuronal en algunos tipos celulares, como en neuronas corticales cultivadas o bien en ciertas condiciones, como durante la inhibición del metabolismo energético. Estos efectos podrían limitar su posible efecto terapéutico contra el daño isquémico. El estudio de nuevos bloqueadores de los transportadores de Glu, es muy relevante para el conocimiento de la participación de éstos en el control de la concentración extracelular de Glu y de su toxicidad. Por esta razón, en el presente trabajo estudiamos los efectos del DL-TBOA sobre los niveles de aminoácidos extracelulares y la sobrevivencia neuronal en neuronas granulares del cerebelo en cultivo. Se estudió también el efecto de este inhibidor sobre la sobrevivencia neuronal en presencia

de una dosis subtóxica del inhibidor de la SDH, 3-NP. Los efectos del DL-TBOA se compararon con los del inhibidor sustrato, PDC.

## **Hipótesis**

El PDC se intercambia por el Glu intracelular, mientras que el DL-TBOA únicamente inhibe la captura del neurotransmisor, por lo que ambos inhibidores tendrán diferentes efectos sobre los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores y la sobrevivencia neuronal.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo General**

Conocer si la exposición a PDC o al DL-TBOA promueve cambios sobre la sobrevivencia neuronal y los niveles de aminoácidos extracelulares.

### **3.2. Objetivos Particulares**

- 1) Explorar el efecto del PDC y del DL-TBOA sobre la sobrevivencia neuronal, al ser incubados a diferentes concentraciones y durante 2, 4, 8 y 24 horas.
- 2) Conocer si la presencia de la toxina mitocondrial 3-NP facilita los posibles efectos tóxicos del PDC y del DL-TBOA.
- 3) Cuantificar el efecto del PDC y del DL-TBOA en la liberación de aminoácidos excitadores.

- 4) Determinar si existe una correlación entre los niveles de aminoácidos excitadores presentes en el medio y la muerte neuronal.
- 5) En caso de presentarse muerte neuronal, conocer si ésta es dependiente de la activación de receptores a glutamato, utilizando MK-801 y NBQX, para bloquear a los receptores NMDA y AMPA/kainato, respectivamente.
- 6) Conocer si la muerte inducida por estos inhibidores involucra el estrés oxidativo, evaluando el posible efecto protector del antioxidante, Fenil-N-tert-butil nitrona (PBN).

#### **4. Metodología**

##### **4.1. Cultivos celulares**

Se analizaron los efectos de la inhibición del transporte de Glu en cultivos primarios de células granulares del cerebelo de ratas Wistar de 7 días postnatales. Los cerebelos obtenidos de la disección de siete ratas se cortan y se disocian en una solución con 0.25% de tripsina, y posteriormente se colocan en una solución que contiene DNasa e inhibidor de tripsina (0.08% y 0.52%, respectivamente). Las células se colocan en un medio basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 50 µg/ml de gentamicina y 25 mM de KCl. Finalmente se colocan en cajas Costar para cultivo de veinticuatro pozos previamente incubados con Poli-L-lisina (5µg/ml) a una densidad de  $300-350 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. Las células se incuban a una temperatura de 37° C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire. Después de veinticuatro horas se adiciono 10 µM de citosina arabinosa para limitar la proliferación de células no neuronales; al cuarto día se adicionó glucosa (5 mM). Experimentos previos de inmucitoquímica utilizando anticuerpos contra la proteína

asociada a microtúbulos (MAP-2) y la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP), marcadores neuronales y gliales, respectivamente. Los cultivos primarios presentan un  $2.4 \pm 0.4$  % de células gliales.

#### 4.2. Tratamientos

Después de 9 días *in vitro* (DIV), para probar el efecto de los inhibidores de los transportadores de glutamato sobre la sobrevivencia neuronal y los niveles de aminoácidos extracelulares, se reemplazó el medio condicionado de las células por una solución Ringer que contiene: NaCl 137 mM, KCl 5.6 mM, NaHCO<sub>3</sub> 3.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 5.6 mM, HEPES 20 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM. Se agregó el PDC o el DL-TBOA a concentraciones de 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM y 1 mM durante 30 minutos; pasado este tiempo, se retiró la solución Ringer y se guardó a -80°C para la posterior determinación del contenido de aminoácidos (ver más adelante). Se agregó el medio condicionado previamente filtrado y precalentado a 37°C y se evaluó la sobrevivencia neuronal 24 horas después. Para evaluar la posible toxicidad de los inhibidores ante una deficiencia metabólica mitocondrial se incubó el PDC o el DL-TBOA junto con el inhibidor de la SDH, el 3-NP (500 μM). Estudios previos demuestran que a esta concentración el 3-NP inhibe completamente a la SDH, sin producir muerte neuronal. Para probar la toxicidad después de tiempos prolongados de exposición, se utilizaron concentraciones de 0.1 mM y 0.5 mM de PDC o DL-TBOA con tiempos de exposición de 2, 4, 8 y 24 h. El posible efecto protector de los antagonistas de los receptores a glutamato, MK-801 (10 μM) y NBQX (50 μM), fue probado contra el daño producido por una exposición de 4 h a PDC o a DL-TBOA. Los antagonistas se adicionaron al medio Ringer simultáneamente que los inhibidores. También se probó el efecto protector del atrapador de radicales libres PBN a 4

horas. En estos últimos casos, los inhibidores de los transportadores de Glu se incubaron junto con el MK-801, el NBQX o el PBN.

### **4.3. Viabilidad celular**

Después de 24 horas de tratamiento, la viabilidad celular se monitoreó por examinación directa de los cultivos con microscopía de contraste de fases y por la prueba de reducción del bromuro [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), el cual es reducido a la sal insoluble de formazán, por las deshidrogenasas mitocondriales. Es importante destacar que el MTT no es permeable a la membrana y entra por transporte activo dependiente de ATP, por lo que aquellas células que no presentan las condiciones adecuadas para efectuar su internalización no podrán incorporarlo y ni tampoco reducirlo (Liu et al., 1997). Asimismo, las células cuyas mitocondrias no estén activas, no podrán reducir MTT. El MTT (150  $\mu$ M) se incubó durante una hora, posterior a esto, se aspira el medio y se solubiliza la sal resultante con 0.8 ml de isopropanol para posteriormente cuantificar el color azul-violeta producto de la reducción del MTT, en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 570 nm. La reducción de MTT se expresa como densidad óptica (D.O.).

### **4.1. Cuantificación de Aminoácidos**

Al finalizar los 30 minutos de exposición a los diferentes tratamientos por duplicado, se retiró el medio y las alícuotas, se almacenaron a una temperatura de  $-75^{\circ}$  C, para la determinación posterior de aminoácidos por HPLC. Después de haber retirado las alícuotas, se recupera la proteína presente en cada pozo agregando 50  $\mu$ l de "Buffer" de

lisis. La proteína recuperada se sometió a sonicación para disociar el pellet obtenido y poder cuantificarla por el método de Bradford. El valor de la proteína fue constante entre los diferentes cultivos ( $0.96 \pm 0.019$  mg/ml), por lo que los niveles de aminoácidos se expresan en  $\mu$ M.

Para cuantificar los niveles de aminoácidos en el medio extracelular por HPLC se filtró cada una de las muestras para posteriormente colocar 20  $\mu$ l de cada una en microviales, en los cuales se agrega el mismo volumen de *o*-ftaldehído (OPA) para derivatizar los aminoácidos presentes. Finalmente se analiza el contenido de aminoácidos en un volumen de 10  $\mu$ l que se inyecta en el sistema de HPLC (Waters 600) equipado con una columna ODS (25 cm x 4 mm de diámetro interno, Supelco, Inc.). La fase móvil consiste en 18% de metanol: 22% acetonitrilo: 14% isopropanol: 46% buffer fosfatos (60 mM, pH 6.65) y en un rango de flujo de 1 ml/min en un gradiente lineal de 33 minutos de duración.

#### **4.5. Inmunocitoquímica**

La presencia de los transportadores de glutamato EAAT1, EAAT2, EAAT3 y la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) en los cultivos, se determinó por inmunocitoquímica, con base en el método descrito por Chen y Swanson (2003), con algunas modificaciones. Las células se sembraron sobre cubreobjetos en cajas de 12 pozos. Las células se lavaron en buffer fosfatos-salina (PBS) y se fijaron en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente. Se bloqueó con una solución que contiene PBS/tritonX-100 y suero, 0.2% y 1%, respectivamente (se usó suero de caballo para el transportador EAAT3 y suero de cabra para el resto de los anticuerpos), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar, se incubaron los anticuerpos primarios respectivos durante toda una noche a 4° C. Los anticuerpos usados fueron: policlonal de cobayo para EAAT1 (1:500) y

EAAT2 (1:200); monoclonal de ratón para EAAT3 (1:2000) y policlonal de conejo para GFAP (1:2000). Las células se lavaron con PBS y se incubaron por un periodo de 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente. Posteriormente, se lavó con PBS y se incubaron por 1.5 horas con el complejo avidina/biotina. Después de lavar la inmunoreactividad se detectó con 3-3'-diaminobenzidina. Omitiendo los anticuerpos primarios se prepararon los controles negativos.

#### **4.6. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron con una prueba de ANOVA, se aplicó una prueba post hoc de Fisher para identificar las diferencias entre los tratamientos. Los efectos del PDC y del DL-TBOA sobre la supervivencia neuronal se compararon entre sí por una prueba estadística de ANOVA incluyendo los datos individuales de cada inhibidor, a las diferentes concentraciones utilizadas. El efecto de la toxina 3-NP sobre la toxicidad del PDC o del DL-TBOA se analizó con los datos de cada inhibidor por separado. El mismo análisis estadístico fue realizado para evaluar los efectos de los inhibidores sobre los niveles extracelulares de aminoácidos, pero en este caso se incluyeron tanto las condiciones individuales del PDC y del DL-TBOA. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos se indica en el pie de figura.

## 5. Resultados

En este estudio se comprobó la presencia de astrocitos inmunoreactivos a GFAP (Fig. 6). El transportador EAAT1 (GLAST) se encuentra presente en las células gliales (Fig. 6), el EAAT2 (GLT-1) se presenta en neuronas y no fue detectado en células gliales (Fig. 6), y EAAT3 (EAAC1) se encontró únicamente en neuronas (Fig. 6).

El efecto del PDC y del DL-TBOA sobre la sobrevivencia de las células granulares, se evaluó mediante la exposición de los fármacos a diferentes concentraciones (0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM y 1 mM), durante 30 minutos en solución Ringer. Ambos inhibidores no afectan, de manera estadísticamente importante, la sobrevivencia neuronal. Únicamente el PDC a 1 mM redujo la sobrevivencia en un 39 % (Fig. 7A).

EL PDC aumentó significativamente los niveles de Glu. A una concentración de 0.5 mM, éste alcanza un valor de 11.3  $\mu$ M y a 1 mM de 23.8  $\mu$ M, incrementando la concentración de Glu en el medio 7 y 14.7 veces su valor basal, respectivamente (Fig. 7B). El DL-TBOA a 0.25 mM no incrementa significativamente la concentración de Glu. Pero ésta si es estadísticamente diferente a 0.5 mM de DL-TBOA, alcanzando niveles de  $6.5 \pm 1.1 \mu$ M, y a una concentración de 1 mM, el DL-TBOA produjo un incremento hasta  $13.5 \pm 3.4 \mu$ M (Fig. 7B). Estos datos sugieren que hay una relación dosis respuesta, entre la concentración del inhibidor utilizada y los niveles extracelulares de Glu, pero ésta es más clara en el caso del PDC.

Por otra parte, aunque la concentración de Glu observada en presencia del DL-TBOA a 1 mM es significativamente superior a los valores basales, no es suficiente para provocar una disminución significativa de la sobrevivencia.

Para determinar si la toxicidad del PDC y del DL-TBOA se exagera ante la deficiencia metabólica, se probaron los inhibidores en las mismas condiciones, pero en presencia de la

toxina mitocondrial 3-NP. La exposición individual a 3-NP no tuvo ningún efecto sobre la sobrevivencia (Fig. 7C). Cuando se incubó PDC + 3-NP, hay un incremento gradual de la muerte neuronal dependiente de la concentración, observándose una reducción significativa de la sobrevivencia del 32 % y el 44 % a 0.25 y 0.5 mM, respectivamente.

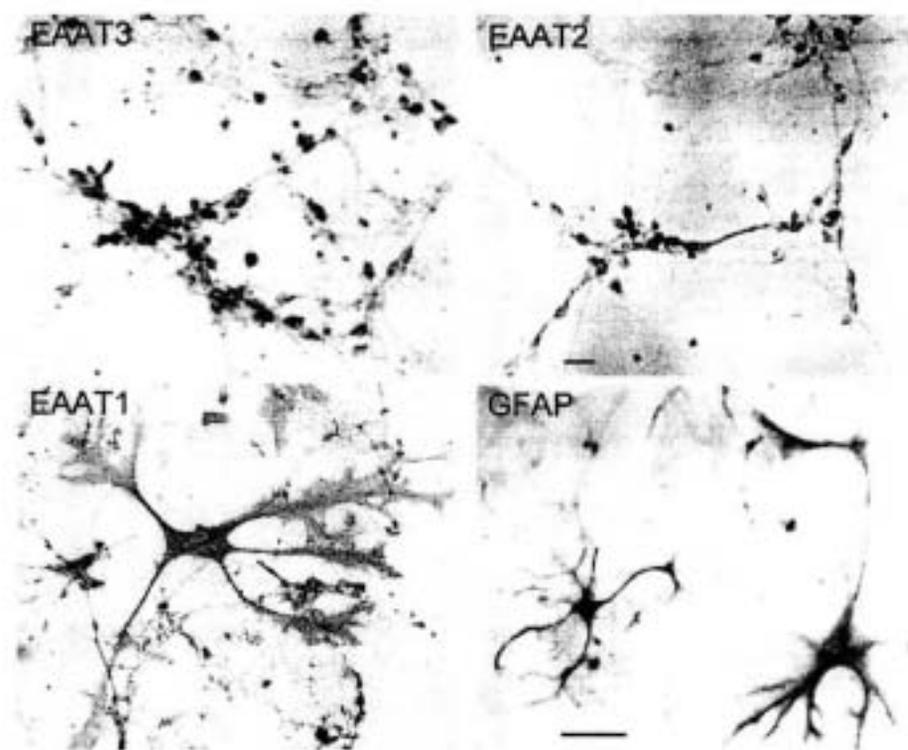


Fig. 6. Inmunocitoquímica para los transportadores de glutamato EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1) y la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) en los cultivos primarios de células granulares del cerebelo. GLT-1 y EAAC1 se encuentran en las neuronas tanto en los somas como en los procesos, mientras GLAST se expresa principalmente en células gliales. Barra = 10  $\mu$ m (para GLT-1 y EAAC1) y 50  $\mu$ m para GLAST y GFAP.

Solamente el PDC + 3-NP a 0.5 mM disminuyó la sobrevivencia neuronal significativamente, respecto a la toxicidad producida por el tratamiento individual de PDC a la misma concentración (Fig. 7C). Esta exacerbación del daño no se observó con el DL-

TBOA. La exacerbación del daño neuronal inducida por el 3-NP no se debe a un incremento adicional significativo de los niveles de glutamato inducido por la presencia de la toxina (Fig. 7D). Aunque en presencia del 3-NP los niveles de Glu obtenidos son ligeramente mayores a los alcanzados con los tratamientos individuales de PDC o DL-TBOA, éstos no son diferentes estadísticamente entre sí. Al igual que los tratamientos individuales, en presencia de 3-NP + PDC se obtuvieron niveles más altos de Glu que en presencia del DL-TBOA + 3NP.

El PDC aumenta significativamente los niveles de Asp en el medio, mientras que el DL-TBOA no tuvo ningún efecto (Fig. 8A). El efecto de ambos inhibidores, sobre los niveles de este aminoácido no se modificó en presencia del 3-NP (Fig. 8B). En cuanto a la glicina, el PDC y el DL-TBOA mostraron efectos distintos a los observados sobre el glutamato y el aspartato. Mientras que el PDC aumentó sus niveles únicamente a una concentración de 1 mM (aunque este efecto no fue estadísticamente significativo), el DL-TBOA produjo un aumento considerable de glicina en el espacio extracelular a concentraciones de 0.25 y 0.5 mM, siendo únicamente significativo a esta última concentración (Fig. 8C). El efecto del DL-TBOA a 1 mM sobre los niveles de glicina no pudo determinarse, ya que la presencia del DL-TBOA en el medio a esta concentración interfiere con la detección de glicina por HPLC. Para las demás concentraciones sí fue posible identificar los picos individuales de la glicina, por lo que sí se pudo realizar el análisis. Con el PDC no se presentó este problema. La presencia de 3-NP no modificó de manera significativa el efecto del PDC ni del DL-TBOA sobre los niveles de glicina. Sin embargo, con el DL-TBOA se puede apreciar una tendencia a incrementar de manera importante los niveles de este aminoácido durante la inhibición mitocondrial inducida por el 3-NP (Fig. 8D).

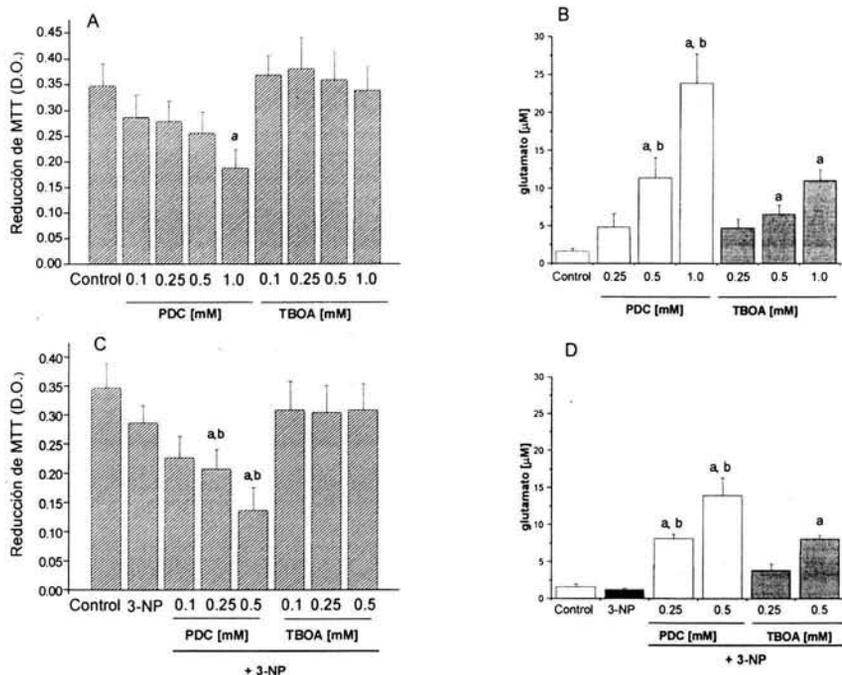


Fig. 7. Efecto del PDC y DL-TBOA (0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM) en ausencia o en presencia del 3-NP (500  $\mu$ M), sobre la viabilidad celular y los niveles de glutamato en los cultivos primarios de células granulares del cerebelo. Después de los 30 minutos de exposición, el medio fue colectado para la determinación de aminoácidos por HPLC. Los tratamientos se realizaron en cultivos hermanos, en los cuales después del tratamiento se cambió el medio Ringer por medio condicionado; 24 horas después se evaluó la sobrevivencia mediante el ensayo de MTT. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  error estándar de la densidad óptica (A y C)  $n = 4-7$ , de la concentración de glutamato (B y D)  $n = 6$  experimentos independientes por duplicado. a,  $p < 0.05$  relativo al valor del control, b,  $p < 0.05$  relativo al DL-TBOA a la misma concentración (B, D).

Los niveles basales de taurina, alanina, y glutamina no se modificaron en presencia del DL-TBOA o del PDC (Tabla 1). Debido a la baja concentración de GABA en el medio, no fue posible cuantificar los niveles de éste por HPLC.

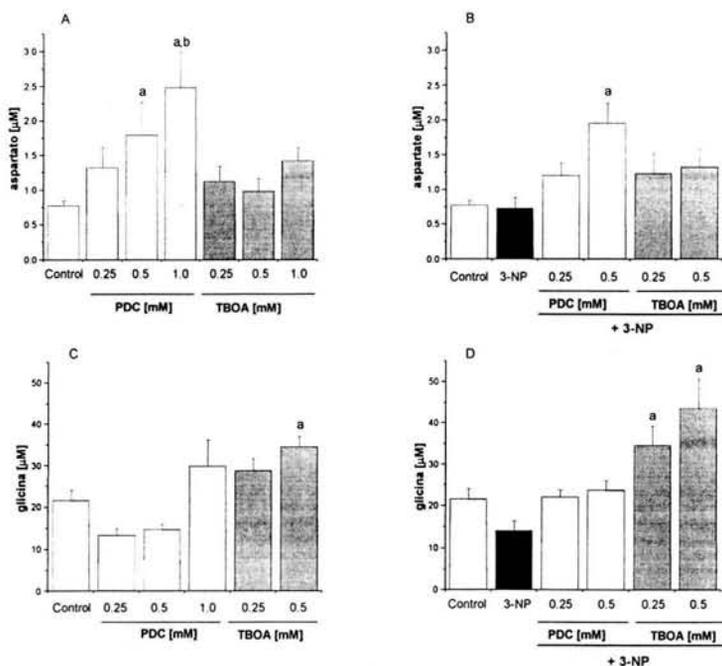


Fig. 8. Efecto del PDC o del DL-TBOA (0.25, 0.5 y 1 mM) después de 30 minutos de exposición en medio iónico en presencia o ausencia del 3-NP (500 μM), sobre los niveles extracelulares de aspartato (A, B) y glicina (C, D), en los cultivos primarios. Los cultivos fueron tratados de la misma manera como se describe en el pi de la figura 6. a,  $p < 0.05$  relativo al control, b,  $p < 0.05$  relativo al DL-TBOA a la misma concentración. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  error estándar de 4-7 experimentos independientes por duplicado.

Para determinar el porcentaje de muerte neuronal resultante de la inhibición de los transportadores de glutamato durante tiempos prolongados se realizaron exposiciones de 2, 4, 8 h. La muerte que se observa con ambos inhibidores a concentraciones de 0.1 mM y 0.25 mM es muy similar, por lo que a partir de estos experimentos se utilizó únicamente la concentración de 0.1 mM. En general el comportamiento de los dos inhibidores es muy parecido (Fig. 9).

Tratamiento	Concentración de aminoácidos [ $\mu$ M]		
	Glutamina	Taurina	Alanina
Control	29.4 $\pm$ 3.0	19.0 $\pm$ 2.1	4.4 $\pm$ 0.5
PDC 0.25 mM	26.2 $\pm$ 3.3	15.8 $\pm$ 2.3	4.3 $\pm$ 0.9
PDC 0.5 mM	27.3 $\pm$ 3.4	15.9 $\pm$ 2.1	5.4 $\pm$ 0.9
PDC 1 mM	28.9 $\pm$ 4.5	18.1 $\pm$ 2.9	8.3 $\pm$ 2.4
DL-TBOA 0.25 mM	26.4 $\pm$ 2.6	16.9 $\pm$ 2.2	5.1 $\pm$ 0.9
DL-TBOA 0.5 mM	27.1 $\pm$ 3.0	19.4 $\pm$ 2.1	5.3 $\pm$ 1.3
DL-TBOA 1 mM	27.3 $\pm$ 3.4	18.6 $\pm$ 2.8	4.1 $\pm$ 1.0
3-NP 500 $\mu$ M	26.0 $\pm$ 2.9	15.5 $\pm$ 2.7	3.8 $\pm$ 0.6
	+ 3- NP 500 $\mu$ M		
PDC 0.25 mM	24.2 $\pm$ 3.0	18.8 $\pm$ 2.1	6.3 $\pm$ 1.3
PDC 0.5 mM	26.4 $\pm$ 2.7	21.9 $\pm$ 1.7	6.4 $\pm$ 0.9
DL-TBOA 0.25 mM	25.2 $\pm$ 3.2	19.1 $\pm$ 1.9	3.5 $\pm$ 1.0
DL-TBOA 0.5 mM	27.1 $\pm$ 2.4	19.8 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 2.4

Tabla I. Niveles extracelulares de glutamina, taurina y alanina. Cambios inducidos por la exposición a PDC o DL-TBOA, en presencia o ausencia de 3-NP. Los cultivos de células granulares de cerebelo fueron expuestas por 30 minutos en medio Ringer a PDC o DL-TBOA, en presencia o ausencia de la toxina mitocondrial. Los aminoácidos presentes en el medio se determinaron mediante HPLC. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  error estándar, n= 4-6 experimentos independientes realizados por duplicado.

Ambos inhibidores presentan una tendencia a reducir la viabilidad celular de manera semejante, sólo después de dos horas de exposición el DL-TBOA fue más tóxico que el PDC, sin embargo, no hay diferencia entre ambos compuestos a las 4 y 8 horas de incubación. A las 4 horas de exposición se presenta una disminución significativa de la viabilidad celular de 41.0% y 31.3 % para el PDC y el DL-TBOA, respectivamente, a una concentración de 0.1 mM (Fig. 9A, B). A 0.5 mM el PDC reduce la sobrevivencia neuronal en un 42.0 % y el DL-TBOA en un 28.0 %, el efecto para ambos inhibidores muestra

significancia estadística. A las 8 horas la reducción de la sobrevivencia para ambos compuestos es cercana al 45 % (Fig. 9B). Para determinar el tipo de receptores de Glu involucrados en la muerte inducida por PDC y DL-TBOA, se utilizaron antagonistas de los receptores NMDA y AMPA/kainato, MK-801 y NBQX, respectivamente, incubados con el PDC o el DL-TBOA durante 4 horas. Los resultados muestran protección completa del efecto tóxico de ambos compuestos con MK-801, por lo que se deduce que la muerte ocurre principalmente por la activación de receptores tipo NMDA. El NBQX mostró un efecto protector ante la toxicidad inducida por el PDC y el DL-TBOA a 0.5 mM (Fig. 10 A, B).

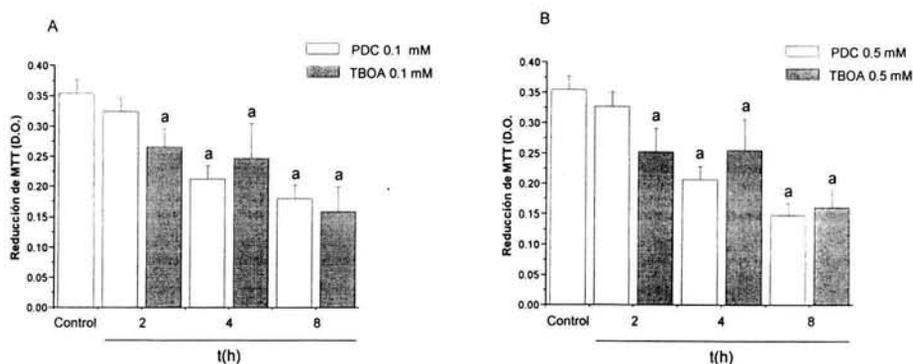


Fig. 9. Efecto de los inhibidores PDC o DL-TBOA (0.1 mM y 0.5 mM) sobre la sobrevivencia de las células granulares, después de 2, 4 y 8 horas de exposición en medio Ringer. Pasado el tiempo de exposición se retiró el medio Ringer y se colocó medio condicionado. La viabilidad celular se evaluó 24 horas después. Los datos se expresan como densidad óptica.  $\alpha$ ,  $p < 0.02$  relativo al valor control.  $n = 7-9$  experimentos independientes por duplicado.

También se probó el efecto protector del antioxidante PBN, con el fin de conocer si la generación de radicales libres esta involucrada en el mecanismo tóxico del PDC y del DL-TBOA. Los resultados muestran un efecto protector del PBN contra la toxicidad inducida por PDC y DL-TBOA a 0.5 mM (Fig. 10A, B).

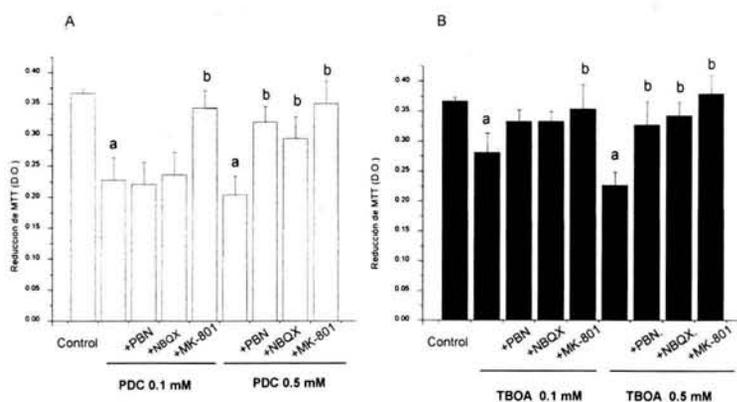


Fig. 10. Efecto protector de los antagonistas de receptores glutamatérgicos (NBQX y MK-801) así como del antioxidante PBN ante la toxicidad del PDC (A) o el DL-TBOA (B), incubados en solución Ringer durante 4 horas. Los datos se expresan como densidad óptica, n= 5-7 experimentos independientes realizados por duplicado. a,  $p < 0.05$  relativo al valor control. b,  $p < 0.05$  relativo a la condición con PDC o DL-TBOA.

Dado que la sobrevivencia celular disminuye aún en condiciones control, cuando las células son expuestas por periodos prolongados en un medio iónico, se estudio el efecto neurotóxico de los inhibidores, después de una exposición continua de 24 horas, en medio condicionado. Los resultados muestran una reducción de la sobrevivencia neuronal del 40% con ambos inhibidores. Bajo estas condiciones se obtuvo una protección completa con el

MK-801 (Fig. 11). Los efectos del DL-TBOA y el PDC sobre la morfología de las células y el efecto protector del MK-801 se muestran en la figura 11. La incubación con PDC o DL-TBOA modifica la morfología de las células de manera apreciable, éstas presentan adelgazamiento de los procesos neuronales y los somas se observan translúcidos. Los cultivos tratados con PDC o DL-TBOA más el MK-801 muestran procesos gruesos y somas oscuros con la morfología similar a los cultivos control.

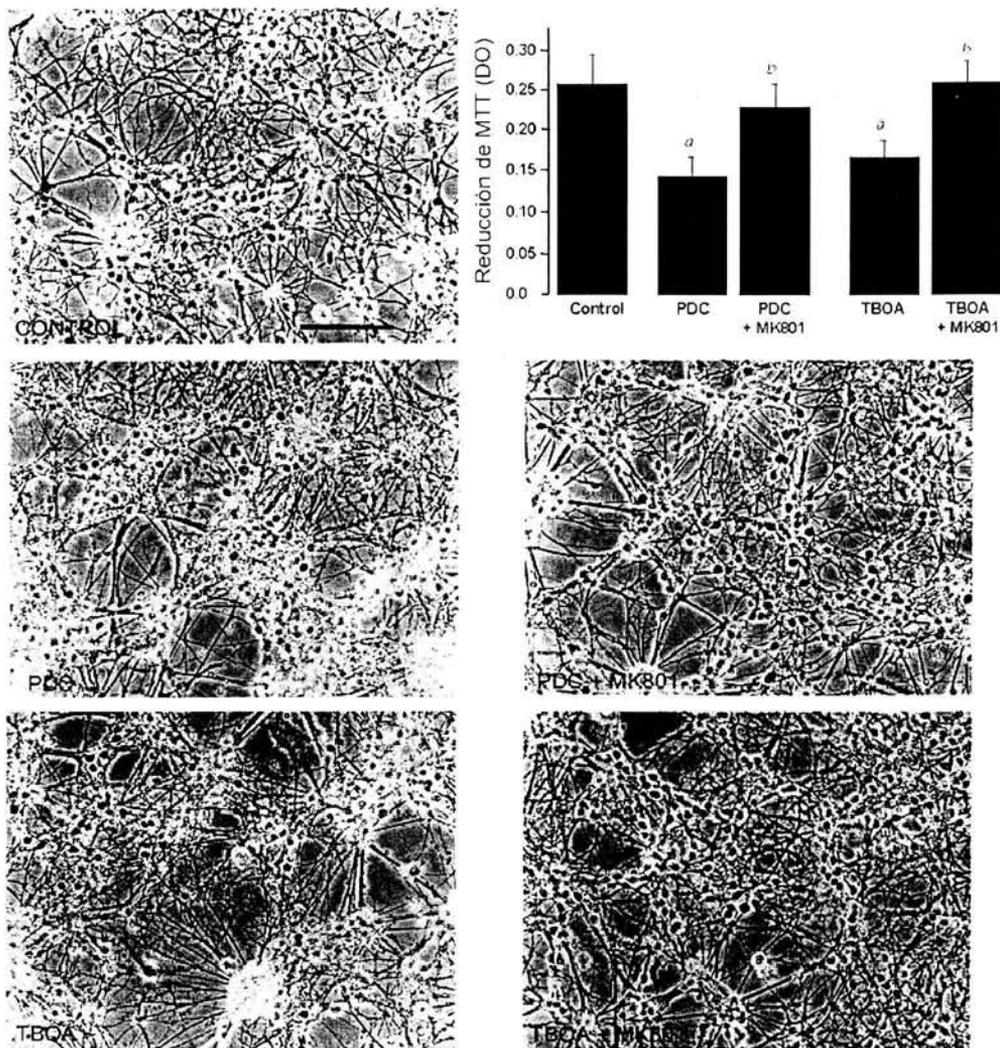


Fig. 11. Efectos tóxicos del PDC y del DL-TBOA (0.5 mM) sobre las células granulares del cerebelo después de 24 horas de exposición en medio condicionado, así como su protección con MK-801. La gráfica muestra la cuantificación de los datos en densidad óptica. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  error estándar de cuatro experimentos independientes por duplicado. *a*,  $p < 0.05$  relativo al valor del control. *b*,  $p < 0.05$  relativo a la condición sin MK-801. Barra = 100  $\mu$ m

## 5. Discusión

Desde su síntesis en 1998 hasta ahora, los trabajos *in vivo* que han evaluado el papel del inhibidor no sustrato de los transportadores de glutamato, DL-TBOA, se han enfocado a estudiar su efecto sobre la liberación de aminoácidos excitadores inducida por la isquemia (Phillis et al., 2000). En éste se mostró que el DL-TBOA disminuye la liberación de glutamato y aspartato provocada por un periodo de isquemia global de 20 minutos, pero en este trabajo no se provee ninguna evidencia histológica de la protección del tejido contra la muerte (Phillis et al., 2000). En diversos estudios *in vitro* se ha estudiado la acción del DL-TBOA sobre el transporte de glutamato (Shimamoto et al. 1998; Anderson et al 2001; Waagepetersen et al. 2001). De acuerdo con estos trabajos, el DL-TBOA inhibe la captura de [<sup>14</sup>C]-aspartato y [<sup>3</sup>H]D-aspartato en cultivos primarios de neuronas y astrocitos, de la corteza y del cerebelo, respectivamente (Anderson et al., 2001; Waagepetersen et al. 2001). Sin embargo, el DL-TBOA induce la liberación de [<sup>14</sup>C]-aspartato en cultivos de astrocitos corticales (Anderson et al., 2001). En rebanadas de hipocampo el DL-TBOA induce muerte neuronal cuando se incuba por periodos largos (Bonde et al., 2003).

El presente estudio muestra que tanto el PDC como el DL-TBOA, en las células granulares del cerebelo, producen la acumulación de glutamato en el medio, a concentraciones de 0.1, 0.25 y 0.5 y 1 mM, durante 30 minutos de exposición. Sin embargo, este incremento no produce muerte neuronal, excepto cuando se incuba PDC a 1 mM. En este caso el PDC reduce la viabilidad celular en un 43 %, e incrementa el Glu extracelular hasta 23  $\mu$ M. Cuando el aumento del neurotransmisor alcanza concentraciones de 11 a 13  $\mu$ M no es tóxico, probablemente porque en estas circunstancias, las células pueden regular el aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, consecuencia de la activación de los receptores glutamatérgicos, principalmente de los receptores a NMDA. El

efecto diferencial de los inhibidores sobre la concentración de aminoácidos excitadores indica que el PDC se comporta como inhibidor substrato, y el DL-TBOA como no substrato (Shimamoto et al., 1998; Waagepetersen et al. 2001), ya que en presencia de PDC los niveles de aminoácidos excitadores se elevan en mayor magnitud. Durante la inhibición mitocondrial, el 3-NP exagera la toxicidad del PDC a 0.25 y 0.5 mM, mientras que la toxicidad del DL-TBOA no se afectó. La exposición del 3-NP no afecta la sobrevivencia neuronal ni los niveles de Glu y Asp, por lo que la exacerbación del efecto tóxico del PDC no se debe a un aumento adicional del glutamato extracelular. La muerte posiblemente se debe a que las neuronas en condiciones de estrés energético, no pueden regular el incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Schinder et al., 1996). Por otra parte se ha sugerido que el transporte del PDC, al igual que el Glu, se co-transporta con 2-3  $Na^+$ , lo que aumentaría la concentración intracelular de este ión, activando a la ATPasa  $Na^+/K^+$  (Cebers et al. 1999), esta ATPasa consume un gran porcentaje del ATP generado (Bonvento et al. 2000), por lo que probablemente el ATP se limita durante la inhibición del metabolismo energético por el 3-NP, y quizá aunado al incremento progresivo del  $Ca^{2+}$  intracelular promueven la muerte de las células. La inhibición de la SDH por el 3-NP a una concentración de 500  $\mu$ M, que afecta el complejo II de la cadena transportadora de electrones y el ciclo de Krebs, no disminuye de manera importante los niveles de ATP (García y Massieu, 2003), pero posiblemente la toxicidad del DL-TBOA se incrementaría si es que se presentaran condiciones de deficiencia energética mas severas.

La toxicidad del DL-TBOA a tiempos prolongados de incubación es clara y similar a la que produce el PDC. La elevación de los niveles de glutamato, inducida por el DL-TBOA, a tiempos largos no fue determinada en este estudio, pero dadas sus características de inhibidor no substrato es predecible que sea menor a la inducida por el PDC. Esto nos haría suponer que la toxicidad de ambos inhibidores sería diferente a tiempos prolongados de

exposición, sin embargo, esto no sucede. La toxicidad es similar después de 4 y 8 horas de incubación. Posiblemente durante tiempos largos, la acumulación de Glu inducida por el DL-TBOA es suficiente para producir muerte. También se examinó la toxicidad de ambos compuestos en el medio en que fueron sembradas las células, después de 24 horas de exposición. En esta condición el efecto tóxico de ambos inhibidores también es claro y similar al que se observa durante una exposición de 8 horas en medio iónico. Posiblemente la toxicidad de ambos inhibidores se favorece en el medio iónico, porque éste no contiene  $Mg^{2+}$ , lo que permite una facilitación de la activación de los receptores NMDA. Esto último es una estrategia experimental con la cual se hace más perceptible la activación de estos receptores. La muerte neuronal inducida por ambos inhibidores es producto principalmente de la activación de receptores NMDA. Dado que el efecto del antagonista de los receptores AMPA/kainato, el NBQX, fue más evidente para prevenir el daño inducido por 0.5 mM de PDC y de DL-TBOA, se puede concluir que a altas concentraciones de los inhibidores, hay contribución de estos receptores en la toxicidad.

Recientemente se ha sugerido que la inhibición de los transportadores de glutamato por el PDC no sólo provoca muerte neuronal por vía excitotóxica. Dado que la disminución de Glu intracelular inhibe el transporte de cistina a través del contratransportador de cistina/glutamato, la inhibición de los transportadores de Glu conduce a la disminución de los niveles de glutatión (GSH) (Himi et al., 2003). Por otra parte, el transportador de glutamato neuronal (EAAT3) también transporta cisteína del medio extracelular, la cual se utiliza para la síntesis de GSH (Chen y Swanson, 2003). El GSH es un tripéptido formado por cisteína, glicina y glutamato, encargado de la defensa anti-oxidante, contra las diferentes especies reactivas de oxígeno (ERO) que constantemente se forman por el metabolismo aerobio o ante diversas situaciones patológicas (Dringen et al., 2000). En cultivos de hipocampo, el PDC reduce los niveles de GSH y de cisteína intracelular, e

induce la formación de radicales libres. Mientras el MK-801 previene parcialmente la muerte neuronal, cuando se expone el PDC con precursores de cisteína, se obtiene una protección mayor (Himi et al., 2003). En cultivos de astrocitos diferenciados de estriado, los antagonistas de receptores glutamatérgicos no proveen protección ante la toxicidad por PDC, y la muerte de los astrocitos es consecuencia de la disminución del GSH y la producción de ERO (Ré et al., 2003). En nuestro modelo, la toxicidad del PDC y del DL-TBOA se previno con el PBN, lo que sugiere la formación de radicales libres durante el proceso de muerte, pero dado que se obtuvo una protección total con el MK-801 el mecanismo de muerte dominante es el excitotóxico. Durante la muerte por excitotoxicidad hay formación de radicales libres, y la protección con PBN es probablemente por atenuación de éstos. De manera interesante, la protección por PBN se observó ante la toxicidad producida por el PDC y por el DL-TBOA, a 0.5 mM, lo que sugiere que a esta concentración hay una formación importante de especies reactivas de oxígeno.

El DL-TBOA causa un aumento en los niveles de glicina en el medio. Posiblemente este efecto está involucrado en la toxicidad del inhibidor. El incremento de este aminoácido, que es co-agonista de los receptores NMDA, y la constante acumulación del glutamato, podrían ser los responsables de la activación de los receptores a NMDA y de la muerte a tiempos prolongados. Se ha demostrado que el flujo de  $Ca^{2+}$  por los receptores NMDA depende directamente de la concentración de la glicina en el espacio extracelular (Chen et al., 2003; Billups y Attwell, 2003). Aunque el mecanismo de acumulación de glicina no fue explorado, quizá el DL-TBOA podría tener algún efecto sobre los transportadores de glicina. Los transportadores de glicina, en las zonas glutamatérgicas, son los encargados de mantener la homeostasis de este aminoácido (Supplisson y Roux, 2002). Son transportadores que operan bajo un gradiente de sodio y se encuentran tanto en las neuronas como en los astrocitos (Supplisson y Roux, 2002). En experimentos futuros sería

importante estudiar la ruta de salida de la glicina, por ejemplo incubando al DL-TBOA en presencia del inhibidor del transporte de glicina, la sarcosina. Estos experimentos están en curso.

## 7. Conclusión

Los resultados indican que la exposición prolongada a DL-TBOA puede resultar tóxica. Demostramos que el DL-TBOA aumenta los niveles de ácido glutámico a tiempos cortos, sin embargo, a tiempos prolongados quizá este incremento se vuelva mayor como consecuencia de la inhibición de su captura y el heterointercambio del DL-TBOA en astrocitos. Por lo anterior, el mecanismo tóxico involucra la acumulación de Glu, y posiblemente también la liberación de glicina. La manera en la cual interfiere el DL-TBOA con este aminoácido no se conoce aún, por lo que es necesario realizar más experimentos para determinar el mecanismo de liberación de la glicina por el DL-TBOA y así conocer el efecto que presenta este aminoácido sobre la toxicidad inducida por el inhibidor. Por otra parte, no se encontró un efecto de la presencia de 3-NP sobre la toxicidad del DL-TBOA. De acuerdo a datos obtenidos en el laboratorio sabemos que la dosis de 3-NP usada en este trabajo no disminuye los niveles de ATP, sin embargo, no podemos descartar que ante situaciones de deficiencia energética más severas, como sucede durante la isquemia cerebral, se podría exacerbar el efecto tóxico del DL-TBOA. Estudios *in vivo* realizados en el laboratorio, en el hipocampo y el estriado de la rata, muestran que la administración del DL-TBOA en estas regiones cerebrales produce lesiones considerables y dependientes de la dosis. Además, este inhibidor aumenta los niveles extracelulares de glicina de manera significativa (datos no publicados). Estos resultados demuestran que el DL-TBOA es potencialmente tóxico *in vivo*, por lo que si se utiliza en situaciones en las que el metabolismo celular está comprometido, como lo es durante la isquemia cerebral, podría resultar contraproducente.

## 8. Bibliografia

- Anderson C., Bridges R., Chamberlin R., Shimamoto K., Yasuda-Kamatani Y., Swanson R. Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *Journal of Neurochem.* 79: 1207-1216 (2001).
- Attwell D. Brain uptake of glutamate: food for thought. *J. Nutr.* 130: 1023S-1025S (2000).
- Beal M. F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* 32: 119-130 (1992).
- Bittigau P., Ikonomidou C. Glutamate in neurologic disease. *Journal of Child Neurology* 12:471-485 (1997).
- Billups D. Attwell D. Active release of glycine or D-serine saturates the glycine site of NMDA receptors at the cerebellar mossy fiber to granule cells synapse. *Federation of European Neuroscience Societies* 18: 2975-2980 (2003).
- Blitzblau R., Gupta S., Djali S., Robinson M. B., Rosenberg P. A. The glutamate transport inhibitor *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate indirectly evokes NMDA receptor mediated neurotoxicity in rat cortical cultures. *Eur. J. Neurosci.* 8: 1840-1852 (1996).
- Bonde C., Sarup A., Schousboe A., Gegelashvili G., Zimmer J. and Noraber J. Neurotoxicity and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem Int.* 43: 371-380 (2003).
- Bonvento G., Sibson N., Pellerin L. Does glutamate image your thought?. *TRENDS in Neuroscience* 25: 359-364 (2000).
- Campiani G., Fattorusso C., De Angelis M., Catalonotti B., Butin S., Fattorusso R., Fiorini L., Nacci V., Novellino E. Neural high-affinity sodium-dependent glutamate transporters (EAATs): targets for development of novel therapeutics against neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Desing* 9: 599-625 (2003).
- Chen L., Muhlhauser M., Yang CR. Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. *J. Neurophysiol* 89 (2): 691-703 (2003).
- Chen Y. Swanson R. The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *J. Neurochem.* 84: 1332-1339. (2003).
- Chen W., Mahadomrongkul V., V. Berger U., Bassan M., Desilva T., Tanaka K., Irwin N., Aoki C., Rosenberg P. The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminal of mature hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24 (5): 1136-1148. (2004).

- Choi D. W., Malucci-Gedde M. A., Kriegstein A. R. Glutamate neurotoxicity in cortical cells culture. *J. Neurosci.* 7: 357-368 (1987).
- Choi D. W., Rothman S. M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:171-182 (1990)
- Cebers G., Cebere A., Wagner A., Liljequist S. Prolonged inhibition of glutamate reuptake down-regulates NMDA receptor functions in Cultured Cerebellar Granule Cells. *J. Neurochem.* 72: 2181-2190 (1999).
- Danbolt N. C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65: 1-105 (2001).
- Das S., F. Sasaki Y., Rothe T., S. Premkumar L., Takasu M., E. Crandall J., Dikkes P., A. Conner D., Rayudu P., Cheung W., Vincent Chen H., Sucher N., Nakanishi N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393: 377-381 (1998).
- Dringen R., Gutterer J., Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain. *Eur. J. Biochem.* 267: 4912-4916 (2000).
- Dungan L., Choi D. Hypoxic-Ischemic brain injury and oxidative stress: en Siegel G., Agranoff B., Fisher S., Uhler M. 1999. *Basic Neurochemistry*. Lippincott-Raven. NY.
- Fagg G., Massieu L. Excitatory amino acid receptor subtypes en: Meldrum B., Excitatory amino acids antagonists. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1991.
- Filer L., Garattini S., Kare M., Reynolds A., Wurtman R. Glutamic acid: Advances in Biochemistry and physiology. Raven Press. NY. Library of Congress cataloging. 1979.
- Gadea A., Lopez-Colomé A. Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I Glutamate transporters. *Journal of Neuroscience Research* 63: 453-460 (2001).
- García O., Massieu L. Strategies for neuroprotection against *L-trans*-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro. *J. Neurosci. Res.* 64: 418-428 (2001).
- García O., Massieu L. Glutamate inhibitor *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentration of mitochondrial toxin 3-nitropropionate: involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. *J. Neurosci. Res.* 74: 956-966 (2003).
- Henneberry R. C. The role of neuronal energy in the neurotoxicity of excitatory amino acids. *Neurobiol. Aging* 10: 611-613 (1989).
- Henneberry R. C. "Excitotoxicity as a consequence of impairment of energy metabolism: the energy-linked excitotoxic hypotesis" en: Beal F., Howell N., Van Bosis-

- Wollner. *Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative diseases*. Wiley-liss. 1ed. 1997.
- Hertz L., Dringem R., Schousboe A. and Robinson S. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research* 57:417-428 (1999).
- Himi T., Ikeda M., Yasuhara T. and Murota S. Oxidative neuronal death caused by glutamate uptake inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Neuroscience Research* 71: 679-688 (2003).
- Iadecola, *Cerebral Ischemia; molecular and cellular pathophysiology*. Humana press. Canadá. 1999.
- Ishii T., Moriyoshi K., Sugihara H., Kadotani H., Yokoi M., Akazawa C., Shigemoto R., Mizuno N., Masu M., Nakanishi S. Molecular characterization of the family of the N-Metyl-D-Aspartate receptor subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (4): 2836-2843 (1993).
- Jabaudon D., Shimamoto K., Yasuda-Kamatani Y., Scanziani M., Gahwiler B. H. and Gerber U. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8733-8738 (1999).
- Jacobson M., McCarty N. *Apoptosis*. 1era ed. Oxford University press 2002.
- Kandel E., Schwartz J., Jessel T. *Principles of Neuroscience*. Mc-Graw Hill. Interamericana. 4 ta ed. 2001.
- Knopfel T., Grandes P. Metabotropic glutamate receptors in the cerebellum with a focus on their Function in Purkinje cells. *Cerebellum*. 1 (1): 19-26 (2002).
- Liévens J. C., Salin P., Had-Aissouni L., Mahy N., Kerkerian-Le Goff L. Differential effects of corticostriatal and thalamostriatal deafferentation on expression of the glutamate transporter GLT-1 in the rat striatum. *J. Neurochem*. 74: 909-919 (2000).
- Liu Y, Petersen D. A. Kimura H. Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem* 69: 581-593 (1997).
- Massieu L., Muerte por excitotoxicidad: en Pasantes H., Arias C., Massieu L., Zentella A., Tapia R. *Enfermedades Neurodegenerativas mecanismos celulares y moleculares*. Fondo de Cultura Económica. SEP. México. 1999.
- Massieu L., Morales-Villagran A., Tapia R. 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 (1995).
- Massieu L. and Tapia R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J. Neurochem*. 69: 1151-1160 (1997).

- Massieu L., Gómez-Román N. and Montiel T. In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp. Neurol.* 165: 257-267 (2000).
- Michaels R. L., Rothman S. M. Glutamate neurotoxicity in vitro; antagonist, pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J. Neurosci.* 10: 283-292 (1990).
- Miroyama Y., Hayashi M. Glutamate-mediated signaling in the islets of Langerhans: a thread entangled. *Trends in Pharmacological Sciences* 24 (10):511-517 (2003).
- Moncada S., Palmer R. M., Higos E. A. Nitric oxide; physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142 (1991).
- Moriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-36 (1991).
- Nedergaard M., Takano T., Hansen A. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature* 3: 748-754 (2002).
- Olney J. W. Brain lesions, obesity and other disturbance in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-921 (1969).
- O'Shea R. D., Fodera M. V., Apricó K., Dehnes Y., Danbolt N. C., Crawford D., Beart P. M. Evaluation of drugs action at glutamate transporters in organotypic hippocampal cultures: new evidence on substrates and blockers in excitotoxicity. *Neurochem. Res.* 27: 5-13 (2002).
- Phillis J., O'Regan M. Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochemistry International* 43: 461-4677 (2003).
- Phillis J., Ren J., O'Regan M. Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo- $\beta$ -benzyloxiaspartate. *Brain Research* 868:105-112 (2000).
- Pin J. P., Acher F. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr. Drug Target CNS Neurol. Disord.* 1 (3): 297-317 (2002).
- Ré D. B., Boucraut J., Samuel D., Birman S., Kerkerian-Le Goff L., Had-Aissouni L. Glutamate transport alteration triggers differentiation-state selective oxidative death of cultured astrocytes: a mechanism different from excitotoxicity depending on intracellular GSH contents. *J. Neurochem.* 85: 1159-1170 (2003).
- Rafiki A., Bernard A., Medina I., Gozlan H., Khrestchatisky M. Characterization in cultured cerebellar granule cells and in the developing rat brain of mRNA variants for the NMDA receptor 2C subunit. *J. Neurochem.* 74: 1798-1808 (2000).
- Reith M. Neurotransmitter transporters: Structure, function and regulation. Humana Press. Ney Jersey. 1997.

- Rongsheng J., Banke T., Mayer S., Traynelis S., Gouaux E. Structural basis for partial agonist at ionotropic glutamate receptors. *Nature Neuroscience* 6(8): 803-810 (2003).
- Rossi D., Oshima T., Attwell D. Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403(20):316-312 (2000).
- Rothstein J. D., Dykes-Hober M., Pardo C. A., Bristol L. A., Jin L., Kuncl R.W., Kanai Y., Hediger M. A., Wang Y., Schielke J. P. Welty D. F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686 (1996).
- Sánchez-Carbente M. R. Massieu L. Transient inhibition of glutamate uptake in vivo induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J. Neurochem.* 72: 129-138 (1999).
- Schinder A. F., Olson E. C., Spitzer N.C., Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16: 6125-6133. (1996)
- Schell M., Molliver M., Snyder S. D-Serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*92: 3948-3952 (1995).
- Shimamoto K., Leburn b., Yasuda-Kamatani Y., Sakaitani M., Shigeri Y., Yomuto N., Nakajima T. DL-threo- $\beta$ -Benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Molecular Pharmacology* 53: 195-201 (1998).
- Siegel G., Agranoff B., Albers W., Molinoff P. *Basic Neurochemistry*. Raven Press. 5ta ed. NY. 1994.
- Sims N., Anderson M. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochemistry International* 40: 511-526 (2002).
- Smith Q. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J. Nutr.* 130: 1016S-1022S (2000).
- Supplisson S., Roux M. J. Why glycine transporters have different stoichiometries. *FEBS Lett.* 2; 529(1):93-101 2002.
- Swan J. and Meldrum J. C. Protection by NMDA antagonist against selective cells lost following transient ischaemia. *J. cereb. Blood Flow Metab.* 10: 343-351 (1990).
- Szatkowski M., Barbour R., Attwell D., Non-vesicular release of glutamate from glial cells by in vitro ischemia in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 81: 1872-1880 (1990).

- Takahashi M., Billups B., Rossi D., Sarantis M., Hemann M., Attwell D. The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *The Journal of Experimental Biology* 200: 401-409 (1997).
- Velasco I., Tapia R. and Massieu L. Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J. Neurosci. Res.* 44: 551-561 (1996).
- Volterra A., Bezzi P., Rizzini B. L., Trotti D., Unlesvang K., Danbolt N. C. and Racagni G. The competitive transport inhibitor L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2019-2028 (1996).
- Waagepetersen H. Shimamoto K. Schousboe A. Comparison of effects of DL-threo- $\beta$ -benziloxiaspartato (DL-TBOA) and L-*trans*-pyrrolidin-2,4-dicarboxilate (t-2,4-PDC) on uptake and release of [ $^3$ H]D-aspartate in astrocytes and glutamate neurons. *Neurochemical Reserch.* Jun 26 (6): 661-666 (2001).
- Wheal H., Thompson A. Excitatory amino acids and synaptic transmission. Academic Press. EUA. 1991.