

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLOGICAS**

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

PAPEL DE LOS RECEPTORES IONOTROPICOS Y  
METABOTROPICOS DE GLUTAMATO EN LA  
NEURODEGENERACION POR EXCITOTOXICIDAD EN EL  
HIPOCAMPO, IN VIVO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLOGICAS  
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**ANGELA GABRIELA VERA RIVERA**

DIRECTOR DE TESIS. DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA

MEXICO, D. F.



NOVIEMBRE, 2005

COORDINACIÓN

0350097



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.



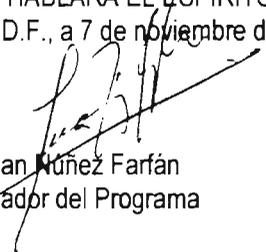
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de septiembre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **VERA RIVERA ANGELA GABRIELA** con número de cuenta **93332240** con la tesis titulada: **Papel de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato en la neurodegeneración por excitotoxicidad en el hipocampo, in vivo**, bajo la dirección del(a) **Dr. Ricardo Tapia Iburgüengoytia**.

Presidente:	Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Vocal:	Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Secretario:	Dr. Ricardo Tapia Iburgüengoytia
Suplente:	Dr. Edmundo Chávez Cossío
Suplente:	Dr. José Fernando Peña Ortega

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D.F., a 7 de noviembre del 2005

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

## DEDICATORIA

*A MI MAMÁ ...*

*Por su lucha incansable en la vida*

*A MI TÍA MARY ...*

*Por su apoyo para continuar al pie del cañón*

*A ANGEL ...*

*Por su paciencia y el amor de 12 años*

## *AGRADECIMIENTOS*

*Agradezco sinceramente al Dr. Ricardo Tapia por la dirección y la supervisión de este trabajo y sobre todo por el gran apoyo y la oportunidad de continuar realizando investigación en su laboratorio.*

*A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios, sugerencias y por la orientación brindada para mejorar este trabajo.*

*A mis compañeros del laboratorio que hacen el trabajo más divertido y agradable: a nuestra buena pos-doc, Angélica Zepeda; a nuestro querido maestro de la cánula, Juan Carlos Corona; al grupo de las Gaby's, G. Mora y la nueva adquisición, G. Michel; a nuestro muy egocéntrico Biomédico, Luis Bernardo Tovar; a nuestras técnicas, Xóchitl Ayala y Paty Salazar y a nuestra valiosísima laboratorista, Marina Cristóbal*

*" Gracias Chicos "*

# INDICE

RESUMEN .....	1
LISTA DE ABREVIATURAS .....	3
I. INTRODUCCIÓN .....	6
. Transmisión Sináptica Glutamatérgica .....	6
. Receptores a Glutamato .....	8
. Remoción del Glutamato .....	14
. Excitotoxicidad .....	15
. Epilepsia .....	19
. Neurodegeneración .....	24
II. ANTECEDENTES .....	29
III. HIPÓTESIS .....	35
IV. OBJETIVO .....	35
V. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	35
VI. METODOLOGÍA .....	37
. Cirugía para el implante .....	37
. Microdiálisis .....	37
. Cuantificación de aminoácidos .....	39
. Registro EEG .....	39
. Análisis histológico .....	40
. Observación conductual .....	40
. Análisis estadístico .....	40

<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
. Aminoácidos extracelulares .....	41
. Actividad epileptiforme .....	48
. Neurodegeneración .....	59
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>64</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	<b>73</b>
<b>X. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>73</b>
<b>XI. REFERENCIAS</b> .....	<b>75</b>

## RESUMEN

El ácido glutámico es el neurotransmisor excitador más abundante en el cerebro y un compuesto fundamental en el sistema nervioso central. Un exceso en la transmisión sináptica glutamatérgica puede inducir muerte neuronal por excitotoxicidad al interactuar con su receptor del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Este mecanismo desempeña un papel muy importante en los procesos de neurodegeneración tanto de tipo agudo como en los observados después de un trauma cerebral, en accidentes vasculares cerebrales (hipoglicemia, isquemia, anoxia), así como de tipo crónico en padecimientos neurológicos progresivos como en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y una enfermedad recientemente clasificada como demencia asociada con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), así como también en el proceso de muerte vinculado con la epilepsia.

Experimentos *in vivo* han demostrado que el aumento en la concentración extracelular de glutamato, por estimulación de su liberación con 4-aminopiridina (4-AP), produce crisis epilépticas y neurodegeneración. Paradójicamente, cuando el incremento de glutamato extracelular se produce por bloqueo de su transporte *in vivo*, no hay evidencias de que se induzca epilepsia ni muerte neuronal. Por el contrario, se ha visto que este glutamato puede activar receptores presinápticos metabotrópicos que inhiben su propia liberación.

El objetivo de esta tesis es estudiar el efecto de antagonistas y agonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III, sobre los efectos neurotóxicos de la 4-AP en el hipocampo de ratas despiertas.

Para conocer la participación de estos receptores, se utilizaron dos antagonistas para el grupo III de los receptores metabotrópicos a glutamato que son el (S)-2-animo-2-metil-4-ácido fosfonobutanoico (MAP<sub>4</sub>) y el (R-S)- $\alpha$ -metilserina-O-fosfato (MSOP), ambos

utilizados en combinación con el inhibidor del transporte de glutamato (PDC) en presencia de un potente convulsivante (4-AP) y el agonista específico L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP<sub>4</sub>) el cual fue utilizado solo en presencia de 4-AP.

Anteriormente en el laboratorio se demostró que la administración de 4-AP junto con PDC en la zona del hipocampo en ratas en libre movimiento genera protección contra la neurodegeneración y el estado epiléptico inducido por el estímulo con 4-AP. Los resultados en el presente trabajo muestran que ambos antagonistas de los mGluR III utilizados, no sólo tuvieron la capacidad de revertir el efecto protector producido por el aumento en la concentración extracelular de glutamato por el PDC, sino que además potenciaron las crisis epileptiformes y la neurodegeneración provocada por la 4-AP.

Por el otro lado, activando este grupo de receptores con su agonista L-AP<sub>4</sub> se produjo protección contra el daño excitotóxico, lo cual indica la participación de los receptores metabotrópicos a glutamato del grupo III en la inhibición de la liberación presináptica endógena de este aminoácido como un posible mecanismo de protección contra la muerte por excitotoxicidad.

## LISTA DE ABREVIATURAS

(1S,3R)-ACPD	(1S,3R)-1-aminociclopentano-1,3-ácido dicarboxílico
(1S,3S)-ACPD	(1S,3S)-1-aminociclopentano-1,3-ácido dicarboxílico
(2R,4R)-APDC	(2R,4R)-4-aminopirrolidin-2,4-ácido dicarboxílico
(R,S)-PPG	(R,S)-4- fosfonofenilglicina
4-AP	4-aminopiridina
4C3HPG	(S)-4-carboxi-3-hidroxifenilglicina
4CPG	4-carboxifenilglicina
AAE	amionoácidos excitadores
ACPT	(1S,3R,4S)-1-aminociclopentano-1,3,4-ácido tricarboxílico
ADC1	(+)-5-aminocarbonil-10,11-dihidro-5-dibenzo[a-d]cyclohepten-5,10-imina
AIDA	1-aminoindian-1,5-ácido dicarboxílico
AMPA	amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasol-4-propionato
AP7	(±)-2-amino-7-heptanoato
CBPG	-(s)-(+)-2-(3'' ciclocarboxil[1.1.1]fenilglicina
CCSV	canales sensibles al voltaje
CNQX	6-ciano-7-nitro-quinoxalina-2,3-diona
CPCCOEt	7-(hidroximino)ciclopropa[b]cromen-1a-etilester carboxilato
CPP	(+)-3-(2-carboxipiperazin-4il)-propil-1-fosfonoato
CPPG	(R,S)-ciclopropil-4-fosfonofenilglicina
CHPG	(R,S)-2-cloro-5-hidroxifenilglicina

---

DCG-IV	-(2S,1R,2R,3R)-2-(2,3-dicarboxiciclopropil) glicina
DHPG	3,5-dihidroxifenilglicina
DNQX	6,7-dinitro-quintro-quinolaxina-2,3-diona
DP	despolarización paroxística
EEG	electroencefalograma
EGLU	(2S)-ácido etilglutámico
GABA	ácido- $\gamma$ -aminobutírico
GYK1522466	1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilenedioxi-5H-2,3-benzodiazepina
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trifosfato
KA	kainato
L-AP <sub>4</sub>	L-2-amino-4-fosfonobutirato
L-CCG-1	-(2S,1S,2S)-2-(carboxiciclopropil) glicina
L-SOP	L -serina O-fosfato
LY341495	(2S)-2-amino-2-[(1S,2S)-2-carboxiciclopropil-1]-3-xantil-9) ácido propanoico
LY354740	(1S,2S,5R,6S)-(+)-2-aminobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-ácido dicarboxílico
LY367385	(+)-2-metil-4-carboxifenilglicina
LY379268	(-)-2-oxa-4-aminobiciclo[3.1.0]hexano-4,6-ácido dicarboxílico
MAP4	(S)-2-amino-2-metil-4-ácido fosfonobutanoico
MCCG	(2S,3S,4S)-2-metil-2-(carboxiciclofenil)glicina
MCPG	$\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina

---

<b>mGluR</b>	receptores metabotrópicos de glutamato
<b>MK-801</b>	maleato de dizocilpina
<b>MPEP</b>	2-metil-6-(feniletinil)piridina
<b>MSOP</b>	(R,S)- $\alpha$ -metil-serina-o-fosfato
<b>NBQX</b>	2,3-dihydro-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinoxalina
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>OPA</b>	o-ftaldialdehído
<b>PDC</b>	ácido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico
<b>SIB 1757</b>	6-metil-2-fenilazo-3-piridinol
<b>SIB 1893</b>	(E)-6-metil-2-estirilpiridina
<b>SNC</b>	sistema nervioso central
<b>t-ACPD</b>	trans-( $\pm$ )-1-aminociclopentano-1,3-ácido dicarboxílico
<b>tADA</b>	trans-azetidina-2,4-ácido dicarboxílico
<b>TTX</b>	tetrodotoxina

## I. INTRODUCCIÓN

- **Transmisión sináptica glutamatérgica.**

En el sistema nervioso las células que constituyen la unidad estructural son las neuronas. Ellas son las encargadas de recibir, procesar y transmitir la información y su característica más importante es que son células eléctricamente excitables, lo que significa que tienen la capacidad de producir potenciales de acción en respuesta a estímulos de cierta magnitud. Estos potenciales viajan por las prolongaciones de la neurona llamados axones hasta llegar a las terminales nerviosas. En este lugar estimulan la liberación de neurotransmisores, moléculas mensajeras cuya función consiste en excitar o inhibir otra neurona (Kandel et al, 2000).

Los sitios en donde se lleva a cabo la comunicación entre dos neuronas recibe el nombre de sinapsis, término acuñado por Sherrington que deriva de la palabra griega "*synapse*" que significa contacto (Kandel et al, 2000). La sinapsis química se compone de una región presináptica, que libera el neurotransmisor, y de una región postsináptica, que responde ante la presencia del neurotransmisor.

Se conocen varios tipos de moléculas de diferente naturaleza química utilizados para la señalización y que funcionan como neurotransmisores: las pequeñas moléculas transmisoras y los péptidos neuroactivos (como las endorfinas). Dentro de las moléculas pequeñas se encuentran las aminas biogénicas (como la dopamina), los aminoácidos (como el glutamato) y la acetilcolina. Dentro de toda esta gama de neurotransmisores los aminoácidos son los más abundantes y más ampliamente distribuidos en las diferentes regiones del SNC. Por su acción sobre la neurona postsináptica se han agrupado en aminoácidos inhibidores como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la glicina, y en aminoácidos excitadores como el ácido glutámico y el ácido aspártico (Kandel et al, 2000).

El ácido glutámico es el neurotransmisor más abundante en el cerebro y un compuesto fundamental en el sistema nervioso, ya que forma parte del glutatión, de péptidos y

proteínas, además participa en el metabolismo de los azúcares, de los ácidos grasos y del amonio. Es precursor del principal aminoácido inhibitorio, el GABA y tiene una participación importante en el control del volumen celular. También actúa como mediador de la transmisión sináptica y de los cambios duraderos en la eficacia sináptica, conocidos como potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD), los cuales se consideran como el sustrato molecular en los procesos de memoria y aprendizaje (Siegel et al., 1999). Además de lo anterior, este aminoácido tiene un papel importante en la formación del SNC, ya que se encuentra involucrado en procesos ontogénicos tan diversos como la proliferación, maduración, supervivencia y migración neuronal, formación, remodelación y eliminación de sinapsis, así como también en el establecimiento y refinamiento de las conexiones neuronales (Pasantes et al., 1991).

El glutamato es un aminoácido no esencial que no cruza la barrera hematoencefálica por lo que el SNC cuenta con enzimas para su metabolismo, tanto en neuronas como en células gliales. Se sintetiza a partir de glucosa, con una velocidad de recambio similar a la de los intermediarios del ciclo de Krebs, que son sus precursores directos, mediante reacciones de transaminación catalizadas por enzimas dependientes de fosfato de piridoxal. En la terminal sináptica, su principal precursor es la glutamina que se hidroliza por la acción de la glutaminasa dependiente de fosfato, dando como resultado ácido glutámico y amonio (Siegel et al., 1999).

Esta síntesis se lleva a cabo en el citoplasma, por lo que se requiere de un mecanismo dependiente del transporte activo para su acumulación dentro de las vesículas sinápticas para su posterior liberación, misma que se realiza al producirse el potencial de acción en la terminal sináptica generando la despolarización de la membrana. Este fenómeno induce la apertura de los canales de calcio sensibles al voltaje (CCSV), siendo los de tipo N y los de tipo P/Q los involucrados en el proceso neurosecretor del glutamato (Meldrum, 2000). También participan las sinapsinas, proteínas asociadas con la superficie de las vesículas sinápticas que contienen al glutamato, y que son capaces de

senar calcio, incrementando la probabilidad de fusión de las vesículas con la membrana presináptica, dando lugar a la liberación del glutamato (Jovanovic et al., 2001).

- **Receptores a glutamato**

Las acciones fisiológicas del glutamato se han podido conocer con mayor detalle gracias al progreso en el conocimiento de la transmisión glutamatérgica en términos de la identificación, caracterización y clonación de varios receptores que reconocen a este aminoácido (Bräuner-Osborne, et al., 2000; Nedergaard et al., 2002).

Actualmente, se conocen varios tipos de receptores específicos que se han caracterizado mediante diferentes estrategias experimentales, como son las respuestas electrofisiológicas, los estudios de unión al receptor y mecanismos moleculares de sistemas de transducción involucrado.

De acuerdo a su mecanismo de transducción, existe una clasificación general que los divide en dos familias: ionotrópicos y metabotrópicos

- **Receptores ionotrópicos (iGluRs):**

Los iGluRs operan por apertura de canales catiónicos que permiten el paso selectivo de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) o calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), por lo que se encuentran involucrados en la neurotransmisión rápida del cerebro, debido a que su paso por el canal produce la despolarización de las neuronas.

Dentro de esta familia se han descrito dos subfamilias en función del agonista que los activa: los que reconocen al N-metil-D-aspartato, llamados receptores NMDA y los que reconocen al kainato y/o al AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), llamados receptores no-NMDA.

La activación del receptor NMDA facilita el acceso de  $\text{Ca}^{2+}$  aunque también permite la entrada  $\text{Na}^+$  y la salida de  $\text{K}^+$ . Además del sitio de reconocimiento al glutamato, este receptor presenta varios sitios de unión a ligandos que influyen la apertura del canal. Uno de ellos es el que reconoce a la glicina, que cuando se encuentra unida al receptor, facilita la apertura del canal debido a la unión del glutamato. Es por esto que se

considera a la glicina como un co-agonista obligatorio. Lo anterior contrasta con su papel de neurotransmisor inhibidor en algunas regiones del SNC, como en la médula espinal, pero se sabe que el sitio de la glicina en el receptor NMDA tiene propiedades farmacológicas diferentes a las del receptor de glicina (Johnson y Ascher, 1992). Otro de los sitios de unión se encuentra regulado por poliaminas tales como la espermina y espermidina que a concentraciones micromolares, aumentan la posibilidad de apertura del canal. Por el contrario, si se encuentran a concentraciones mayores, inhiben la activación del receptor (Dingledine y Bennett, 1994). Otro sitio reconoce al  $Mg^{2+}$ , el cual actúa como inhibidor cuando se encuentra unido. El bloqueo que ejerce este ion se debe a que su sitio de unión se encuentra dentro del canal y su desprendimiento depende del voltaje, por lo que cuando se despolariza la membrana queda libre para abrirse por acción del ligando (Meldrum, 2000). El  $Zn^{2+}$  también tiene un sitio de reconocimiento en el receptor NMDA, solo que a diferencia del  $Mg^{2+}$ , éste ejerce un bloqueo independiente del voltaje (Dingledine y Bennett, 1994). Existen también algunos sitios importantes en los cuales el receptor puede ser modulado o activado por el mecanismo de fosforilación. Éste proceso es reversible, por acción de las proteín-cinasas y fosfatasas, y puede ocasionar cambios prolongados en los procesos en los que se encuentra involucrado (McDonald et al., 1998).

Este receptor está formado por cuatro subunidades: La NR1 con ocho isoformas, la NR2 con cuatro subunidades (A,B,C y D) y la NR3 con dos subunidades (A y B). Todos los receptores funcionan como ensamblajes heteroméricos formados obligatoriamente por la subunidad NR1 en combinación con por lo menos un tipo de subunidad NR2. Las subunidades NR3, por sí solas, no forman receptores funcionales, pero se pueden ensamblar con los complejos NR1/NR2 (Cull-Candy et al., 2001). La combinación de las distintas subunidades le confieren al receptor una gran variabilidad funcional en cuanto a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas, lo que determina diferencias en afinidad hacia sus agonistas o la sensibilidad a sus antagonistas, la cinética de las respuestas, la permeabilidad a iones y la sensibilidad al bloqueo por  $Mg^{2+}$  (Nakanishi,

1992). Los principales agonistas para este receptor son el NMDA y el aspartato y sus antagonistas el maleato de dizocilpina (MK-801), y el D-amino-fosfo-valerato (D-AP5).

Los receptores del tipo AMPA son permeables al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$ , y en general no son permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ . Se encuentran compuestos por cuatro subunidades (GluR1-4) que pueden formar complejos homoméricos o heteroméricos (Wenthold y Roche, 1998). La permeabilidad catiónica de los receptores AMPA está determinada por la selección de subunidades, ya que canales que carecen de la subunidad GluR2 sí son permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  (Hollman et al., 1991) Los principales agonistas son el quisqualato y el AMPA. Hasta la fecha se han encontrado otros agentes que modulan su actividad, por ejemplo, los barbitúricos que antagonizan y el zinc que potencia las respuestas (Wenthold y Roche, 1998).

Los receptores tipo kainato (KA) son selectivamente permeables al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$ . Se encuentran formados por cuatro subunidades ensambladas en homo o heterodímeros de las subunidades GluR5, 6 y 7, las cuales presentan baja afinidad por el Kainato y las subunidades KA1 y KA2 que tienen alta afinidad por el kainato (Wenthold y Roche, 1998). A pesar de estar ampliamente distribuidos en el SNC, los receptores KA son menos abundantes que los AMPA. Aunque sus secuencias primarias son distintas, entre ellos hay similitudes farmacológicas que generan confusiones, por lo que en ocasiones se les menciona como receptores AMPA/kainato. (Wenthold y Roche, 1998). Los antagonistas para sus sitios de unión, disponibles actualmente, son la 6, 7-dinitro-quinto-quinoxalina-2, 3-diona (DNQX) y la 6-ciano-7-nitro-quinoxalina-2, 3-diona (CNQX) que a concentraciones micromolares, inhiben las respuestas de estos receptores sin afectar las inducidas por los NMDA (Honoré et al., 1998; Blake et al., 1988).

- Receptores metabotrópicos (mGluRs):

Los mGluRs están acoplados a proteínas G y operan por la generación de segundos mensajeros, regulando así la actividad de enzimas de membrana y canales iónicos y, de esta manera pueden mediar la actividad sináptica excitadora lenta, pero prolongada, en el sistema nervioso.

El grupo de receptores metabotrópicos a glutamato esta constituido por ocho subtipos (mGluR1-8) y varias isoformas, subdivididos en tres grandes grupos: mGluR I, mGluR II y mGluR III, que se han clasificado de acuerdo a la homología de su secuencia de aminoácidos, a los mecanismos de transducción de señales y a sus propiedades farmacológicas. Los receptores de un mismo grupo comparten una homología de secuencia de aminoácidos de alrededor del 60-70%, mientras que se reduce hasta un 40-45% entre miembros de diferentes grupos (Pin and Duvoisin, 1995).

El grupo I (mGluR1 y mGluR5) se encuentra positivamente ligado a la fosfolipasa C, la cual causa la hidrólisis de fosfoinosítidos en diacil glicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), que se une a receptores del retículo endoplásmico ocasionando la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde esta estructura intracelular. Son selectivamente activados por el (S)-3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) y se localizan mayoritariamente a nivel postsináptico en cuerpos celulares, troncos dendríticos y espinas dendríticas (Luján et al., 1996; Shigemoto et al., 1993 y Cartmell y Schoepp, 2000). Su rasgo más característico es que se encuentran fuera de la densidad postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas, concretamente, en los bordes de las sinapsis conocidos como zonas perisinápticas, así como también en la membrana extrasináptica de espinas dendríticas (Luján et al., 1996).

El grupo II (mGluR2 y mGluR3) y el grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) se encuentran negativamente acoplados a la adenilato ciclasa, por lo que la activación de estos receptores provoca una inhibición de la formación de AMPc estimulada por forskolina. Los receptores del grupo II son selectivamente activados por el -(2S,1R,2R,3R)-2-(2,3-dicarboxiciclopropil)glicina (DCG-IV). Se encuentran primordialmente en glía y en sitios pre y postsinápticos alejados de las zonas activas (Neki et al., 1996; Petralia et al., 1996), mientras que los del grupo III tienen su localización mayoritariamente en la especialización presináptica de terminales axónicas en sitios de liberación de neurotransmisores (Shigemoto et al., 1996; Ohishi et al., 1995; Bradley et al., 1996). Estos receptores son selectivamente activados por el L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP<sub>4</sub>).

De manera general los mGluR tienen como ligando endógeno al glutamato y como agonistas farmacológicos al (2s,1s,2s)-2-(carboxiciclopropil)glicina (L-CCG-1) y el 1-aminociclopentano-1, 3-dicarboxilato (ACPD). Los antagonistas sintetizados son derivados de las fenilglicinas como por ejemplo, el  $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina (MCPG) que bloquea a los grupos I y II y a algunos miembros del grupo III (Cartmell y Schoepp, 2000). El NMDA, AMPA y KA no activan estos receptores y sus antagonistas no tienen efecto alguno en la activación de los receptores metabotrópicos (Schoepp et al., 1999a).

Desde el punto de vista molecular, estos receptores son proteínas integrales de membrana formados por una única cadena polipeptídica. Presentan un extremo amino-terminal que se extiende en el espacio extracelular, una porción central constituida por siete segmentos transmembranales con estructura  $\alpha$ -helice, unidos por tres asas intracelulares y tres extracelulares y también presentan un extremo carboxilo-terminal localizado intracelularmente. Los residuos de la segunda y tercera asa intracelular, constituyen la región más importante para la activación y el acoplamiento del receptor a la proteína G. Por su parte, los residuos del extremo carboxilo-terminal están implicados en la desensibilización inducida por la proteína cinasa C (PKC) y en la interacción con proteínas intracelulares como la calmodulina, proteínas Homer y otras proteínas con dominios PDZ (Pin and Acher, 2002).

En la tabla 1 se muestran algunos de los agonistas y antagonistas de los receptores metabotrópicos, sus mecanismos de regulación, afinidad, así como su localización tanto en regiones dentro del SNC como su localización subcelular en sitios específicos de las neuronas.

	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
Subtipo	mGluR1 a, b, c y d mGluR5 a y b	mGluR2 mGluR3	mGluR4 a y b mGluR6 mGluR7 a y b mGluR8
Mecanismo de Transducción	↑ Hidrólisis PI	↓ cAMP	↓ cAMP
Principal activador	DHPG	DCG-IV	L-AP4
Agonistas	Quiscualato 3-HPG CHPG TADA1S,3R-ACPD <u>1S,3S-ACPD</u> <u>L-CCG-1</u>	LY379268 LY354740 2R,4R-APDC1S,3R-ACPD <u>1S,3S-ACPD</u> <u>L-CCG-1</u>	L-SOP ACPT (R,S)-PPG1S,3R-ACPD <u>1S,3S-ACPD</u> <u>L-CCG-1</u>
Antagonistas	4-CPG AIDA (S)-4C3HPG CPCCOEt MPEP SIB 1893 SIB 1757 LY 367385 MCPG	EGLU MCCG LY341495 MCPG	CPPG MAP4 MSOP
Localización en el SNC	Hipocampo Tálamo Cerebelo Corteza	Cerebelo Hipocampo Corteza entorrinal Tálamo Hipotálamo	Hipocampo Corteza entorrinal * Retina (mGluR6)
Localización en neuronas	- Postsinápticas	- Presinápticas - Postsinápticas - glial	- Presinápticas
Mecanismo de acción	- Facilita la liberación de glutamato.	- Reduce la transmisión sináptica excitatoria.	- Reduce la transmisión sináptica excitatoria y reduce la liberación de glutamato.
Afinidad por el glutamato (IC <sub>50</sub> )	mGluR1: 0.32 μM mGluR5: 0.70 μM	mGluR2: 5.9 μM mGluR3: 0.34 μM	mGluR4: 1.6 μM mGluR6: 12.3 μM mGluR7: 869 μM mGluR8: 9.5 μM
Afinidad por el L-AP <sub>4</sub> (EC <sub>50</sub> )	mGluR1: Inactivo mGluR5: Inactivo	mGluR2: 167 μM mGluR3: Inactivo	mGluR4: 0.44 μM mGluR6: 6.8 μM mGluR7: 211 μM mGluR8: 1.7 μM

Tabla 1. Grupos de receptores metabotrópicos a glutamato.  
(Modificada de Conn y Pin, 1997)

- **Remoción del glutamato.**

Después de que el glutamato ha activado a sus receptores, es removido del espacio sináptico por un sistema de recaptura que consiste en una familia de proteínas específicas llamadas transportadores de glutamato de alta afinidad dependientes de sodio, el cual es requerido para la unión al glutamato, mientras que el potasio es requerido para el transporte neto (Nedergaard et al., 2002). Estos transportadores utilizan gradientes electroquímicos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$  a través de la membrana plasmática como fuerza electromotriz para el proceso de transporte, el cual también está acompañado por cambios en el voltaje y en el pH para remover al glutamato del espacio sináptico hacia el interior de las neuronas y de las células gliales (Takahashi et al., 1997).

Se han descrito varios tipos de transportadores los cuales tienen diferente distribución dentro del SNC, cinética y propiedades farmacológicas (Gadea y Lopez-Colome, 2001).

Actualmente se conocen 5 tipos de transportadores o acarreadores de glutamato: el EAAT1 (GLAST), el EAAT2 (GLT1), el EAAT3 (EAAC), el EAAT4 y el EAAT5, todos ellos tienen una identidad del 35-55% en la secuencia de aminoácidos y patrones casi idénticos de hidrofobicidad, sugiriendo que sus propiedades funcionales están basadas en rasgos estructurales similares (Takahashi et al., 1997).

El transportador GLT1 se encuentra únicamente en células gliales, aunque se sabe que varias poblaciones de neuronas pueden expresarlo durante el desarrollo del SNC y desaparece con la maduración. Su expresión es muy abundante en hipocampo (12,000 moléculas por  $\mu\text{m}^3$  de tejido), también se encuentra en corteza, tálamo, cerebelo y bulbo olfatorio (Danbolt, 2000). El GLAST al igual que el GLT1 es un transportador exclusivamente glial. Su mayor expresión se localiza en el cerebelo (18,000 moléculas por  $\mu\text{m}^3$  de tejido), y también se le encuentra en el bulbo olfatorio, hipocampo, corteza y tálamo (Danbolt, 2000). El EAAT3 es un transportador que se encuentra distribuido en tejidos periféricos como en riñón, intestino y retina. En el SNC se le ha encontrado en terminales presinápticas, en hipocampo, corteza, cerebelo, ganglio basal y en médula espinal (Danbolt, 2000).

El transportador EEAT4, se ha localizado sólo en células de Purkinje, del cerebelo, y a muy bajas concentraciones. Finalmente el transportador EEAT5 no se ha podido caracterizar muy bien en mamíferos, sin embargo, se sabe que tiene una fuerte expresión en las células de Müller, en retina, y en neuronas de salamandra (Danbolt, 2000).

- **Excitotoxicidad.**

John Olney en la década de 1970-1980, acuñó el término de excitotoxicidad para describir la capacidad de los aminoácidos excitadores, específicamente el L-glutamato, de sobreactivar y dañar las células nerviosas, lo que se ve reflejado en diversas fisiopatologías de varios desórdenes neuronales, como es el caso de accidentes cerebrovasculares (como los observados después de un trauma-cerebral, hipoglucemia-isquemia), en trastornos cognitivos como psicosis, esquizofrenia y en las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la corea de Huntington, la demencia asociada con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y en el proceso de neurodegeneración vinculado con la epilepsia (Arias, 1991).

Las primeras observaciones que vincularon al glutamato con su acción neurotóxica se originó desde la década de 1950-60 cuando Curtis y colaboradores (1959) descubrieron que el glutamato y sus análogos, al ser administrados en la médula espinal de gato, aumentaban la tasa de disparo. En 1952, Hayashi descubrió las propiedades convulsivantes de la inyección intracerebral de glutamato en un modelo experimental con perros. Lucas y Newhouse (1957) observaron por primera vez que la exposición a cantidades elevadas de ácido glutámico aplicado sistémicamente a ratones inmaduros, producía neurodegeneración retinal. Una década después, Olney y colaboradores (1970 y 1972) encontraron que la inyección de glutamato y sus análogos en ratones inmaduros y primates, provocaba neurodegeneración en otras áreas del SNC, como el hipotálamo, y en regiones cuya barrera hematoencefálica no estaba totalmente desarrollada (Olney et al., 1999). En otros estudios, este mismo autor demostró la correlación directa entre las

propiedades neuroexcitadoras y neurotóxicas del glutamato asociadas a la sobreactivación de sus receptores (Olney, 1978).

De esta manera surge el término de excitotoxicidad para definir el daño celular producido por la activación excesiva de los receptores de glutamato (Bittigau y Ikonimidou, 1977) mismos que son responsables de la hiperexcitación, daño y muerte neuronal.

Hoy sabemos que la excitotoxicidad es un fenómeno global, que si bien se inicia por la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos, no sólo se debe a la excitación prolongada de las neuronas, sino también se debe al desencadenamiento de una serie de reacciones metabólicas que incluyen la activación de múltiples enzimas, que a su vez llevan a la destrucción neuronal. A continuación se describen estos mecanismos, que se resumen en la figura 1.

El daño cerebral característico mediado por el glutamato es de naturaleza postsináptica y se han descrito dos fases: la primera se denomina fase aguda, la cual es inmediata y puede ser reversible. Se caracteriza por un hinchamiento marcado del soma y de las dendritas, provocado por la entrada de sodio y cloro, respuesta mediada por los receptores no-NMDA. Estos receptores al activarse, permiten el paso de sodio a través del canal generándose la despolarización de la membrana y con ello la entrada de cloro y agua. Sin embargo, bajo estas condiciones no se ha visto que se produzca muerte neuronal, a menos que el fenómeno se lleve a cabo por periodos muy prolongados (Dennis, 1987). La segunda fase ocurre más tarde y se caracteriza por la destrucción gradual de las neuronas. Esta muerte depende del calcio extracelular y sus efectos tóxicos se producen por la entrada masiva de este catión, con el consecuente aumento en la concentración citoplásmica, más allá de la capacidad de amortiguamiento intracelular (Dennis, 1987).

Hoy en día existen ya muchas evidencias de que el calcio tiene una fuerte participación en el ciclo de toxicidad, ya que es capaz de inducir desajustes en varios procesos celulares, incluidos los de generación de energía (Siesjo et al., 1995). El incremento

citosólico de calcio conduce a la activación de diversas enzimas : 1) Las proteasas, como es el caso de la calpaína I, la cual degrada varias proteínas estructurales, por ejemplo, la tubulina o la espectrina, proteínas del sistema de microtúbulos. Por lo que su participación en la degradación celular es evidente (Arias, 1991). 2) Las fosfatasa también pueden activarse y producir cambios importantes en los fosfolípidos, contribuyendo al rompimiento de la membrana celular y a la liberación del ácido araquidónico, cuyo metabolismo favorece la producción de radicales libres citotóxicos. 3) Las endonucleasas que se encargan de la degradación de los ácidos nucleicos que inducen el daño del núcleo celular (Tapia et al., 1998).

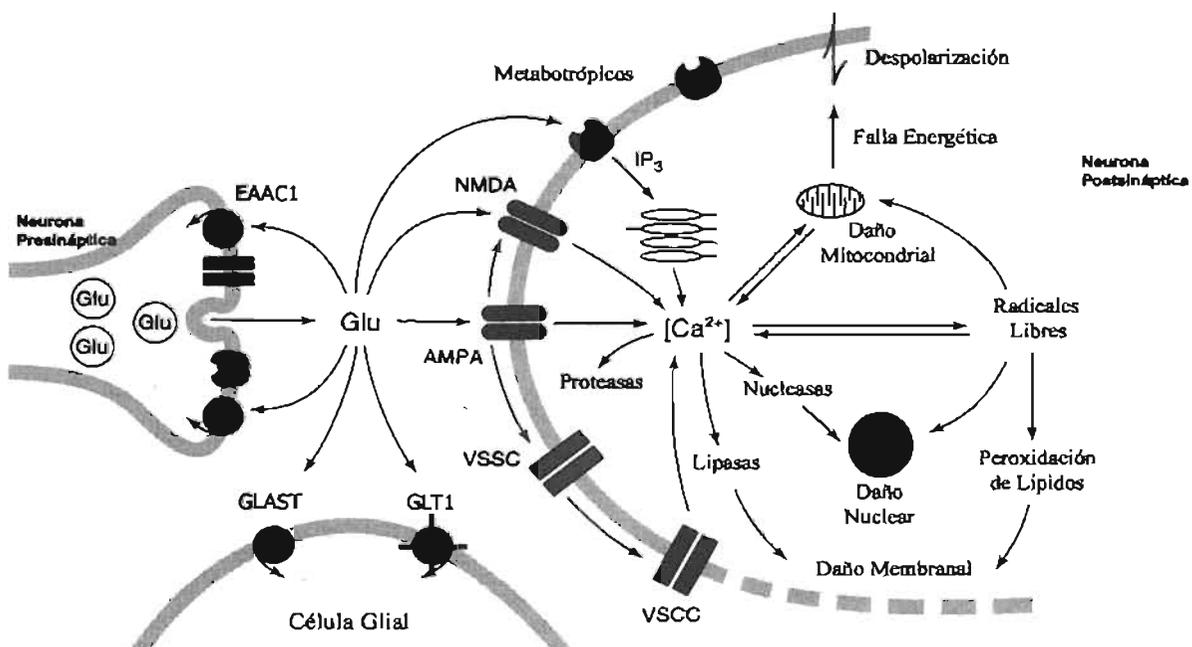
Por otro lado, también se ha visto que la activación de los receptores metabotrópicos del grupo I contribuyen al incremento en las concentraciones de calcio, ya que el  $IP_3$  estimula su liberación de pozas intracelulares (Mannaioni et al., 2001). Así como también la activación de proteín - cinasas con movilización de calcio, las cuales pueden intervenir en la activación de genes "de muerte" y completar el círculo de retroalimentación positiva que culmina con la muerte neuronal (Beal, 2000).

Además de lo anterior, se sabe que existe una fuerte participación de varios mecanismos mediante los cuales se genera daño mitocondrial dependiente de calcio, como la formación de especies reactivas de oxígeno que dan lugar a la existencia de radicales libres superóxido. Esto disminuye la capacidad de producción de ATP, por lo cual decrece la actividad de la bomba sodio-potasio ( $ATPasa Na^+-K^+$ ). El resultado es que disminuye la extrusión de  $Na^+$ , alterándose el gradiente de concentración de este catión, despolarizándose la membrana neuronal y facilitándose la respuesta de los receptores NMDA (Choi, 1988; Olanow, 1993; Louvel et al., 1997).

Los primeros experimentos que sugirieron que la función mitocondrial es un punto clave en la inducción de la muerte por excitotoxicidad fueron realizados por Schindler y colaboradores en la década de 1990-2000. En uno de sus trabajos observan que la mitocondria está involucrada directamente en el secuestro de calcio durante un episodio excitotóxico, mostrando que al producirse aumento en la concentración de calcio

generándose la apertura de la transición en la permeabilidad del poro, lo cual, colapsa el potencial (Schindler et al., 1996). Inmunosupresores como la ciclosporina A, pueden prevenir el colapso del potencial inducido por la activación del receptor NMDA, ya que en presencia de 1.6  $\mu\text{M}$  de ciclosporina A y en respuesta a 20 minutos de NMDA, la despolarización mitocondrial es transitoria y puede recuperarse en poco tiempo. Esto sugiere que la apertura persistente del poro puede ser la causa de la despolarización irremediable que evita la sobrevivencia de las neuronas (Schindler et al., 1996).

Aunque los mecanismos de excitotoxicidad no se conocen completamente, se sabe que existe una amplia correlación entre el aumento en la concentración de calcio inducida por la activación de los receptores del glutamato (especialmente del tipo NMDA) y la neurodegeneración, además de que se ha demostrado que la neurotoxicidad puede ser muy regional y selectiva. Esto debido a que puede depender, entre otros factores, de la distribución particular de los receptores glutamatérgicos y de las propiedades bioquímicas de las células blanco que pueden variar con la edad y con las características particulares del desarrollo neuronal (McDonald et al., 1990).



**Figura 1.** Representación esquemática de los procesos bioquímicos que participan en el mecanismo de excitotoxicidad en una sinapsis glutamatérgica.

Receptores: NMDA, AMPA y mGluR. Transportadores: EAAC1, GLAST y GLT1.

Canales de calcio sensibles a voltaje: VSCC. Inositol (1,4,5) trifosfato:  $\text{IP}_3$ . Calcio:  $\text{Ca}^{2+}$ . Glutamato: Glu

- **Epilepsia.**

En el desarrollo histórico de la medicina, pocas enfermedades han acumulado tantas creencias erróneas, basadas en la superstición, prejuicio e ignorancia como se ha dado en el caso de la epilepsia. En varios periodos de la historia ha sido visto como un castigo o motivo de persecución, hechizo, posesión del demonio o como una enfermedad contagiosa. El temor a esta enfermedad se ha dado en gran parte debido al desconocimiento que se tiene sobre lo que alguna vez se llamó "el mal sagrado". Esta interpretación surgió hace miles de años y proviene de la creencia de que durante los ataques epilépticos, las personas enfermas eran capaces de comunicarse con los dioses y que a diferencia del común de los mortales, podían entrar en comunión con ellos. El hombre tardó miles de años en descubrir que la epilepsia es una alteración que tiene su origen en el cerebro y que no es ni diabólica, ni sagrada. Su historia tiene mucho que ver con la historia de las ideas de las funciones cerebrales a través de las épocas. Así pues, los hallazgos de cráneos trepanados en África, Europa y Perú, de miles de años de antigüedad, son el indicativo de que el hombre ha tratado de intervenir en la expresión de las funciones cerebrales desde hace mucho tiempo.

Desde la aparición de la escritura, se tienen indicios de la existencia de la epilepsia. La enfermedad sagrada (*Morbus sacer*, en latín) figura en documentos de la antigua Mesopotamia (5000 a.C. aprox), en donde se relaciona con "la mano del pecado" y con el "dios de la Luna", de aquí el término "Lunático". Sin embargo, el texto de Hipócrates "*Sobre la Enfermedad Sagrada*", escrito hacia el año 400 a.C, es sin duda el más conocido sobre la historia de la epilepsia, ya que en esta obra se hace hincapié en el origen físico de la enfermedad y se hizo notar que, dadas sus características, esta enfermedad causaba asombro entre los hombres, es por esto que siempre se les relacionaba con cuestiones mágico-religiosas (Brailowsky, 1999).

Estas ideas predominaron hasta el inicio del siglo XIX cuando Heberden describió algunas características clínicas que se presentan de manera diferente en el niño y el adulto. Tiempo después Hughlings Jackson inició la descripción meticolosa de la

llamada epilepsia Jacksoniana, relacionando los paroxismos motores localizados (en la mano) con contracciones vasculares en la región de la arteria media y en 1862, Jean Martín Charcot junto con sus colaboradores Pierre Marie y Babinski realizaron observaciones clínicas sobre el diagnóstico diferencial de la histeria y la epilepsia, material publicado como *Iconographie Photographique de la Salpêtrière*. Más adelante los experimentos de Volta y Galván con la "bioelectricidad" añadieron un nuevo sentido a las hipótesis sobre el origen de la epilepsia. Al mismo tiempo, pero en otras tierras, la neuroanatomía se enriquecía con las preparaciones del tejido cerebral teñidas con plata, de Golgi en Italia y de Ramón y Cajal en España. Y al mismo tiempo, pero desde el punto de vista electrofisiológico, los experimentos de Caton y de Pradich-Neminsky mostraron el electroencefalograma (EEG) y los potenciales evocados por estimulación sensorial obtenidos de la corteza cerebral de animales y años más tarde Hans Berger publica los primeros registros del EEG humano (Brailowsky, 1999).

La dimensión neuroquímica apareció con los experimentos de Loewi, mostrando los efectos "humorales" de la estimulación eléctrica del nervio vago de un corazón "donador" sobre un "receptor": la acetilcolina liberada en uno disminuía la frecuencia de contracción del otro. Estos dos puntos de vista, el eléctrico y el químico, se unieron desde entonces para convertirse en el lenguaje fundamental en las neurociencias. El desarrollo de técnicas para la obtención de imágenes del cerebro como la tomografía axial computarizada, la resonancia magnética nuclear y las tomografías por emisión de fotones y de positrones, han permitido obtener información estructural y funcional más detallada para la identificación de las pequeñas lesiones asociadas a la epilepsia.

La palabra epilepsia deriva de una preposición y de un verbo irregular griego "*epilambanein*" que significa "ser tomado o sorprendido bruscamente". En la actualidad se define, de acuerdo con la Liga Internacional contra la Epilepsia y la Organización Mundial de la Salud, como una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes con manifestaciones estereotipadas, debidas a una descarga excesiva

de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas), asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas (Brailowsky, 1999).

Esta enfermedad afecta entre el 0.5 y 2% de la población general, se manifiesta en todas las edades, en el 78% de los casos se presenta antes de la adolescencia, el 16% aparece en el adulto joven, el 5% corresponde a los adultos y el 1% a ancianos. Se caracteriza por la recurrencia o repetición de crisis que pueden manifestarse como pérdida del conocimiento, movimientos involuntarios, alteraciones autonómicas, alteraciones del humor o estado de ánimo y alteraciones de las funciones mentales (Feria et al., 1997).

Existen varias causas de su origen como traumatismos, infecciones, tumores, hemorragias y/o alteraciones durante el desarrollo. Sólo en algunos casos se tiene evidencia de la influencia hereditaria, y su presencia no implica un riesgo para la descendencia, ya que en el caso de que ambos padres sean epilépticos la posibilidad de que los hijos desarrollen la enfermedad es de alrededor del 6%. Asimismo, hay más riesgo cuando la madre es epiléptica que cuando el padre es quien presenta la enfermedad. Por otro lado, también existen algunos factores que pueden facilitar la aparición de las crisis en pacientes con predisposición a la epilepsia, como son la falta de sueño, el alcohol, los niveles bajos de azúcar o de calcio en la sangre, la falta de oxígeno, la luz intermitente, la fiebre alta, etc (Brailowsky, 1999). Los factores de origen metabólico, post-traumático, ya sea secundario o daño perinatal y el traumatismo cráneo-cefálico son los principales factores etiológicos que se sincronizan con los factores neuroquímicos, que dan como resultado las alteraciones electroencefalográficas y manifestaciones clínicas que se han clasificado en parciales y generalizadas (Feria et al., 1997).

La epilepsia parcial tiene su origen en un pequeño grupo de neuronas que forman un foco epiléptico, esto determina la sintomatología dependiendo de dónde se encuentre. La epilepsia generalizada involucra a toda la corteza cerebral desde su inicio y de manera difusa, además de que puede presentar uno o varios focos epilépticos. En el origen de un foco epiléptico pueden participar múltiples factores, tales como cambios en

las propiedades intrínsecas de la membrana neuronal o alteraciones en la transmisión sináptica. Cada neurona en un foco epiléptico presenta de manera sincronizada una respuesta conocida como despolarización paroxística (DP), que se inicia por una despolarización súbita de entre 20-40 mV y de larga duración (50-200 ms), lo que genera un tren de potenciales de acción (Peña, 2001). En un solo ataque convulsivo generalizado, existe una rápida disminución de la presión sanguínea sistémica, sin embargo, difícilmente se producen lesiones morfológicas detectables macroscópicas o microscópicas en las regiones cerebrales. Es la repetitividad de las crisis lo que condiciona la mayor parte de los cambios neuromorfológicos detectables. Una de las alteraciones que representa característicamente esta asociación de convulsiones con lesiones cerebrales severas se ha demostrado con la aparición del *status epilepticus* (SE). Este término se utiliza en crisis epilépticas repetitivas, constantes y prolongadas, que establezcan una condición epiléptica continua de por lo menos 5 a 10 minutos, hasta más de una hora (Feria et al., 1997).

Los cambios que llevan a las neuronas con actividad normal a una actividad despolarizante sostenida, están relacionados con las alteraciones en el balance entre las corrientes de entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^{+}$  y las corrientes de salida de  $\text{K}^{+}$  que generan brotes espontáneos de despolarización que se manifiestan eléctricamente como una espiga epiléptica en el electroencefalograma (Feria et al., 1997).

Esta despolarización también puede darse por activación excesiva de los receptores a glutamato del tipo AMPA y NMDA (Brailowsky et al., 1997). Existen muchas evidencias que indican la participación del ácido glutámico en la patogenia de la epilepsia: en registros de pacientes epilépticos se han encontrado índices elevados de aminoácidos excitadores en el líquido cefalorraquídeo y en los focos epilépticos. En estudios de epilepsia con modelos animales se ha visto que mientras los agonistas glutamatérgicos son potentísimos convulsivantes, los antagonistas tienen notables efectos anticonvulsivantes, por ejemplo, antagonistas competitivos de los receptores NMDA como el CPP (Löscher y Schmidt, 1988) o el AP7 (Meldrum, 1982) o no

competitivos como el MK-801 (Gilbert, 1994) o el ADCI (Rogawski et al., 1991) inhiben las convulsiones producidas en varios de los modelos de epilepsia. En el caso de los receptores no-NMDA, antagonistas como la NBQX o la GYKI522466, han probado ser anticonvulsivantes discretos (Yamaguchi et al., 1993). También se ha mostrado que una expresión anormal de los receptores a glutamato o un aumento en su función, juegan un papel importante en varias formas de epilepsia (Meldrum, 1994). En ratas a las que se les indujo epilepsia por el método de kindling se demostró la existencia de alteraciones importantes en el funcionamiento del receptor NMDA (Kraus et al., 1994; Lee et al., 1994). En otros trabajos, Janjua y colaboradores (1992a) postularon que también la epilepsia podría estar asociada a un metabolismo anormal del glutamato generado por alteraciones en su transporte, pues encontraron niveles elevados de glutamato (hasta 3 veces) en pacientes con epilepsia generalizada o bien en ratones genéticamente epilépticos de la cepa E1 (1.5 veces) (Janjua et al., 1992b).

Durante el estudio de la epilepsia se ha demostrado que una de las áreas más afectadas en la patología de la epilepsia es el hipocampo (Feria et al., 1997). Estudios con drogas convulsivantes que actúan sobre la actividad neuronal en rebanadas de hipocampo, dieron lugar a muchos hallazgos importantes que revelaron los mecanismos epileptogénicos conocidos *in vivo*, ya que las neuronas piramidales en esta estructura sirven como marcapasos para las descargas epilépticas y tienden a generar brotes sincronizados espontáneos.

El hipocampo es una estructura cerebral que pertenece al sistema límbico y participa primordialmente en el almacenamiento de la memoria. La formación hipocampal comprende el giro dentado, el hipocampo, el subículum, el presubículum, el parasubículum y la corteza entorrinal. Las células que forman el hipocampo son multipolares y se conocen como células piramidales, que con base a su tamaño y apariencia se han dividido en tres regiones: CA1, CA2 Y CA3. El giro dentado está constituido por tres capas: la capa principal formada por células granulares, la capa acelular molecular localizada sobre la capa principal, y la capa de células polimórficas o

hilus, la cual se localiza debajo de las células granulares. Estas últimas son neuronas monopolares y sus axones se conocen como fibras musgosas, inervan la capa CA3 del hipocampo, región que se conecta con la capa CA1 del hipocampo, la cual proyecta al subículum y a las capas profundas de la corteza entorrinal. Esta vía se le conoce como colateral de Schaffer y forman una vía excitatoria recurrente. La región CA2 del hipocampo no recibe inervaciones del giro dentado como CA1 y CA3, sus conexiones son distintas lo que hace que existan grandes diferencias funcionales (Shepherd, 1998).

En la epilepsia la pérdida neuronal de la región CA1 con daño en CA3 e hilus, es una patología que se encuentra con gran frecuencia (Scheyer, 1978), en cambio, en otros estudios se ha comprobado que la región CA2 parece ser mucho más resistente (Corsellis y Burton, 1983).

Otro grupo de neuronas presente en la formación hipocampal son las interneuronas, las cuales forman sinapsis GABAérgicas y tienen regiones blanco localmente restringidas. Una de las hipótesis más sólidas que explican el origen de la epilepsia, es la de alteraciones en la comunicación existente entre interneuronas (estímulos inhibidores) y las células piramidales (estímulos excitadores) en alguna región cerebral. Cuando se rompe el equilibrio entre ellas por disminución en la transmisión GABAérgica y/o aumento en la glutamatérgica se puede producir una hiperexcitabilidad neuronal que da origen a descargas paroxísticas, que pueden dar lugar a la epilepsia (Feria et al., 1997).

- **Neurodegeneración.**

Gran cantidad de trabajos previos demuestran que el ácido glutámico además de estar relacionado con la aparición de las crisis epilépticas, tiene una fuerte participación en la inducción de la muerte neuronal. En pacientes epilépticos se ha encontrado que un gran número de ellos, principalmente aquellos que padecen la epilepsia del lóbulo temporal, llegan a presentar deficiencias neurológicas ocasionadas por la muerte masiva de neuronas en la zona del hipocampo. Desde hace algunos años es conocido que la estimulación excesiva de los receptores de glutamato da como resultado degeneración

neuronal. La administración neuronal de glutamato o de sus agonistas, ya sea local o sistémica, induce la muerte, misma que se previene con antagonistas de receptores glutamatérgicos (Peña, 2001).

En los últimos años se ha incrementado el interés en estudiar los mecanismos responsables de la muerte celular. Estos mecanismos son muy importantes en el SNC, ya que la neurodegeneración es un fenómeno que no solamente ocurre durante el envejecimiento sino también durante padecimientos agudos y crónicos. Un gran número de enfermedades neurológicas, normalmente referidas como enfermedades neurodegenerativas, comparten características patológicas de una gradual y selectiva pérdida neuronal. Al parecer la neurotoxicidad endógena del glutamato está involucrada en algunas de estas enfermedades, sin embargo, en muchos casos la evidencia no es contundente. En la gran mayoría de estas enfermedades, las causas de muerte neuronal se desconocen, pero se han relacionado algunos factores que podrían interactuar entre sí y que se mencionaron previamente: la sobreactivación de los receptores a aminoácidos excitadores (principalmente del tipo NMDA), un incremento en la concentración citoplásmica de calcio y la generación de especies reactivas de oxígeno o radicales libres. Estos factores se conjugan de tal modo que la alteración en alguno de ellos puede generar cambios en otro y con esto desatarse una reacción en cadena, resultando con ello, daño y muerte neuronal por destrucción tanto de las membranas plasmáticas como de los organelos intracelulares (Colyle y Puttfarcken, 1993; Tapia, 1998; Tapia et al., 1999).

Hoy en día, para el estudio del papel de los neurotransmisores en la epilepsia, se cuenta con técnicas avanzadas como lo es la microdiálisis. Gracias a ella se han podido observar incrementos importantes en los niveles extracelulares de glutamato, de entre 3-16 veces, en pacientes epilépticos con crisis de origen cortical (Carlson et al., 1992; Hamberger et al., 1993) o de origen hipocámpico (2-5 veces) (Wilson et al., 1996). En animales también se han documentado aumentos en los niveles extracelulares de glutamato en un buen número de modelos de epilepsia como el Kindling (1-3 veces) (Zang et al., 1991), por

administración de ácido kaínico (3 veces) (Stein-Behrens et al., 1992), pilocarpina (1.5 veces) (Millan et al, 1993) o por estimulación eléctrica (1.2 veces) (Walker et al., 1995).

En nuestro laboratorio, el estudio de la epilepsia y de otro tipo de enfermedades que involucran al glutamato, se ha realizado mediante la utilización de drogas capaces de estimular su liberación, y con ello se ha encontrado la correlación existente entre el incremento en sus niveles extracelulares y los efectos de excitabilidad y muerte neuronal.

La droga más utilizada desde hace algún tiempo en nuestro laboratorio es el bloqueador de canales de K<sup>+</sup>, conocido como 4-aminopiridina (4-AP) que prolonga la fase de despolarización de los potenciales de acción, aumentando la frecuencia de disparo neuronal. A nivel fisiológico, se ha reportado que bloquea preferentemente las corrientes tipo A (I<sub>A</sub>) y tipo D (I<sub>D</sub>), por lo que la prolongación de la fase despolarizante del potencial de acción, induce un disparo repetitivo que genera descargas epileptiformes (Hoffman et al., 1997).

El principal blanco de acción de la 4-AP se encuentra en las terminales sinápticas, donde produce la liberación de neurotransmisores, tanto excitadores como inhibidores en preparaciones *in vitro*, como en la placa neuromuscular, en rebanadas de cerebro, en sinaptosomas y en algunas regiones cerebrales *in vivo* (Peña y Tapia, 1999 y 2000). También, se ha demostrado que este compuesto es un potente convulsivante que induce actividad epileptiforme *in vitro* (Gean et al., 1990) y convulsiones *in vivo* en la rata (Fragoso y Tapia, 1992), en ratón (Yamaguchi y Rogawski, 1992) e incluso en el humano (Spyker et al., 1980). Estas crisis pueden ser prevenidas o disminuidas con la aplicación de antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato (Peña y Tapia, 2000). Esto significa que el efecto convulsivante se encuentra íntimamente relacionado con el aumento en la liberación de glutamato y con la sobreactivación de sus receptores.

Sin embargo, paradójicamente, cuando el incremento de glutamato extracelular se produce por bloqueo de su transporte, no hay evidencias de que se induzca epilepsia

(Obrenovitch, 1996) ni muerte neuronal (Massieu y Tapia, 1997). Uno de los compuestos más utilizados para inhibir el transporte de glutamato es el L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC). Se ha descrito que este compuesto eleva de 10 a 20 veces la concentración de glutamato sobre los niveles basales y además no existen señales de hiperexcitabilidad electrofisiológica (Obrenovitch, 1996), ni muerte neuronal (Massieu et al., 1995). También se ha visto que el efecto del PDC es mayor sobre el glutamato y aspartato comparado con otros aminoácidos, lo que comprueba su potente selectividad sobre el transportador de glutamato/aspartato (Robinson et al., 1991; Tapia et al., 1999).

Pero no sólo los iGluRs pueden modular la transmisión glutamatérgica, ya que la activación de los mGluRs también induce una amplia variedad de cambios en la fisiología neuronal, debido a que se encuentran involucrados en procesos como la excitabilidad neuronal y regulan la actividad de varios canales iónicos dependientes e independientes de voltaje, lo que se traduce en incremento o reducción en la frecuencia de disparo (Pin y Duvoisin, 1995), dando como resultado un incremento o una inhibición en la liberación de neurotransmisores.

Hasta el momento se cuenta con evidencias de que cuando existe aumento en la liberación de glutamato por inhibición de su recaptura, y este se extiende a través de la hendidura sináptica, puede activar receptores presinápticos metabotrópicos que inhiben la liberación del glutamato (Oliet, et al., 2001). En condiciones basales, durante la actividad neuronal de baja frecuencia, estos receptores no alcanzan a ser activados. Sin embargo, cuando la concentración de glutamato es incrementada, ya sea por alta actividad neuronal, o por bloqueo de la recaptura de glutamato, estos receptores se activan provocando la inhibición de su liberación (Scanziani et al., 1997). Este efecto es precisamente el mejor caracterizado en la actualidad, ya que se ha demostrado que los receptores mGluR presinápticos pueden actuar como autorreceptores reduciendo la liberación de glutamato (Baskys y Malenka, 1991; Manzoni y Bockaert, 1995; Gereau y Conn, 1995; Gereau et al., 1995; Macek, 1996).

En el hipocampo, por ejemplo, se ha demostrado que la activación persistente de los receptores mGlu III provocan reducción de las respuestas postsinápticas excitadoras (Losonczy et al., 2003). El compuesto L-AP<sub>4</sub>, un potente agonista para este grupo, induce inhibición de la transmisión sináptica de glutamato en rebanadas de hipocampo (Baskys y Malenka, 1991) al igual que en terminales nerviosas estimuladas con 1 mM de 4-AP (Rodríguez-Moreno et al., 1998). También está descrito que el L-AP<sub>4</sub> induce una marcada reducción de los potenciales postsinápticos excitatorios en las células piramidales de la región CA1 y CA3 del hipocampo (Baskys y Malenka, 1991). Estudios realizados por Pin y Duvoisin (1995) revelan que esta misma depresión de la transmisión sináptica existe en varias regiones del cerebro como son la corteza, el bulbo olfatorio, la amígdala y la neocorteza.

La activación de los mGluR del grupo II también conduce a la inhibición de la liberación de aminoácidos excitatorios (Pin y Duvoisin, 1995). En la vía media y lateral perforante en el hipocampo, el agonista específico para este grupo, el DCG-IV, reduce la transmisión sináptica excitatoria (Bushel et al., 1996). Otro de los agonistas, el LY354740, atenúa el daño que induce el incremento de glutamato en cultivos de neuronas corticales y en la glía (Allen et al., 1999).

Por otro lado, existen datos que sugieren que el grupo I puede también funcionar como autorregulador, en ciertas regiones del SNC. Usando el agonista selectivo para este grupo, la DHPG, Herrero y colaboradores (1998) encontraron que la liberación de glutamato se inhibía en sinaptosomas de hipocampo estimulando con 1 mM de 4-AP. Baskys y Malenka (1991), encontraron que los receptores del grupo I en las células piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, son capaces de disminuir la transmisión presináptica excitatoria, al igual que en el estudio realizado por Manzoni y Bockaert(1995).

Sin embargo, también existen evidencias de que bajo ciertas condiciones, la activación de este grupo de receptores puede incrementar la liberación de glutamato (Fitzjohn et al., 1996; Moroni et al., 1998) y como consecuencia producir epilepsia y daño neuronal (Camón et al., 1998; Arvanov et al., 1995; Chapman et al., 2000).

Aunque aún no se conoce con detalle el mecanismo por el cual la activación de ciertos receptores mGlu reduce la liberación de glutamato, se ha podido relacionar este efecto con base en la localización espacial dentro de las terminales glutamatérgicas. Trabajos realizados por Shigemoto y colaboradores (1997), utilizando la técnica de inmunocitoquímica, han revelado que los receptores del grupo III se encuentran presentes en el área CA1 del hipocampo y que además tienen su localización mayoritariamente en sitios de liberación de neurotransmisores (Shigemoto et al., 1996), característica que pone en ventaja a este grupo sobre el resto de los receptores metabotrópicos, ya que los miembros tanto del grupo I como del grupo II, tienen su localización en zonas más alejadas de la hendidura sináptica (Luján et al., 1996; Neki et al., 1996; Petralia et al., 1996). Por lo anterior, no es difícil pensar que la activación de los receptores metabotrópicos, principalmente los del grupo III, resulte en la inhibición de la liberación de glutamato.

## II. ANTECEDENTES

En la serie de experimentos realizados como parte mi trabajo de licenciatura (Vera y Tapia, trabajo en preparación para publicación) y, que representan los antecedentes inmediatos de la presente tesis, se mostró que la perfusión durante una sola fracción por microdiálisis de 4-AP a una dosis de 7 mM en animales en libre movimiento, genera fuertes crisis epileptiformes con una actividad hipersincrónica inicial, seguida por trenes de espigas de alta amplitud que, a través del tiempo, aumentan en frecuencia hasta el establecimiento de un estado epiléptico. Además se produce pérdida neuronal en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Estos efectos neurotóxicos son claramente visibles en la conducta, en el EEG y en los cortes histológicos, a pesar de que el aumento en la

Sin embargo, también existen evidencias de que bajo ciertas condiciones, la activación de este grupo de receptores puede incrementar la liberación de glutamato (Fitzjohn et al., 1996; Moroni et al., 1998) y como consecuencia producir epilepsia y daño neuronal (Camón et al., 1998; Arvanov et al., 1995; Chapman et al., 2000).

Aunque aún no se conoce con detalle el mecanismo por el cual la activación de ciertos receptores mGlu reduce la liberación de glutamato, se ha podido relacionar este efecto con base en la localización espacial dentro de las terminales glutamatérgicas. Trabajos realizados por Shigemoto y colaboradores (1997), utilizando la técnica de inmunocitoquímica, han revelado que los receptores del grupo III se encuentran presentes en el área CA1 del hipocampo y que además tienen su localización mayoritariamente en sitios de liberación de neurotransmisores (Shigemoto et al., 1996), característica que pone en ventaja a este grupo sobre el resto de los receptores metabotrópicos, ya que los miembros tanto del grupo I como del grupo II, tienen su localización en zonas más alejadas de la hendidura sináptica (Luján et al., 1996; Neki et al., 1996; Petralia et al., 1996). Por lo anterior, no es difícil pensar que la activación de los receptores metabotrópicos, principalmente los del grupo III, resulte en la inhibición de la liberación de glutamato.

## II. ANTECEDENTES

En la serie de experimentos realizados como parte mi trabajo de licenciatura (Vera y Tapia, trabajo en preparación para publicación) y, que representan los antecedentes inmediatos de la presente tesis, se mostró que la perfusión durante una sola fracción por microdiálisis de 4-AP a una dosis de 7 mM en animales en libre movimiento, genera fuertes crisis epileptiformes con una actividad hipersincrónica inicial, seguida por trenes de espigas de alta amplitud que, a través del tiempo, aumentan en frecuencia hasta el establecimiento de un estado epiléptico. Además se produce pérdida neuronal en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Estos efectos neurotóxicos son claramente visibles en la conducta, en el EEG y en los cortes histológicos, a pesar de que el aumento en la

concentración de glutamato no es estadísticamente significativo, debido a la dosis tan baja de 4-AP utilizada (figuras 3 y 5, se muestran en la parte de resultados).

En trabajos previos, la perfusión por microdiálisis de 4-AP en animales anestesiados, las dosis menores a 35 mM no producen aumento en la concentración de glutamato extracelular cuantificable por el método de HPLC (Peña y Tapia, 1999) pero, en animales despiertos, dosis mayores a 7 mM resultaron ser muy potentes dificultando la manipulación de los animales y llevándolos incluso a la muerte por convulsión generalizada.

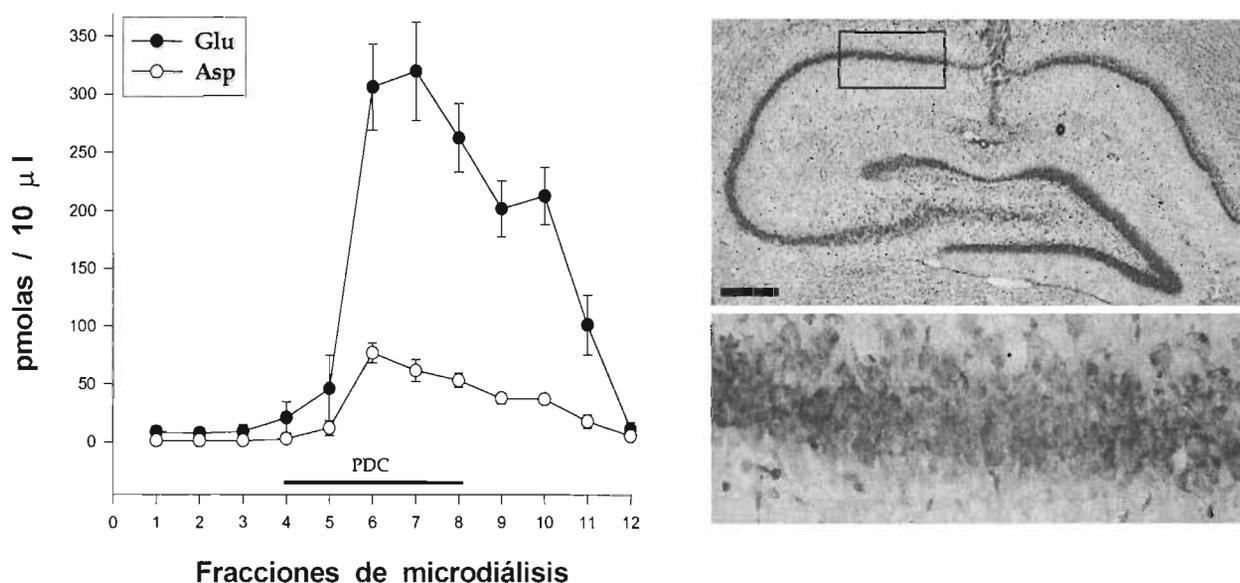
Por otro lado, la perfusión durante cinco fracciones continuas de microdiálisis del inhibidor del transporte de glutamato, PDC, no generó ni epilepsia ni neurodegeneración, a pesar del gran aumento en la concentración extracelular de glutamato, casi 25 veces más por encima de sus niveles basales (figura 2).

Contrario a lo que se esperaba, el estímulo excitotóxico producido por la 4-AP más el aumento extracelular de glutamato inducido por inhibición de su recaptura con PDC, lejos de generar potenciación de los efectos neurotóxicos de la 4-AP, la perfusión de 3, 5 ó 9 fracciones de microdiálisis con PDC co-administrado con 4-AP en una sola fracción, produjo protección tanto de las crisis epileptiformes (siendo mas visible el efecto durante el estado epiléptico), como en la neurodegeneración. Esta protección fue más significativa con el mayor número de fracciones de microdiálisis profundidas con el PDC, ya que evitó que el estado epiléptico se generara y protegió casi en un 50% la muerte neuronal. Este resultado se presenta en la figura 4.

Estos datos permitieron generar la hipótesis de que el exceso de glutamato extracelular extrasináptico, por inhibición de su transporte, podría, paradójicamente proteger contra la excitotoxicidad de la 4-AP debido a la probable inhibición de la liberación de glutamato al activarse los mGluR del tipo III.

Los resultados que se muestran a continuación son los obtenidos durante mi tesis de licenciatura, como se mencionó en los antecedentes (Vera y Tapia, trabajo en preparación). Se presentan en este trabajo, debido a que son datos fundamentales para la interpretación de los nuevos resultados.

**Ácido-L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC)  
(50 mM)**



**Registro Electroencefalográfico**

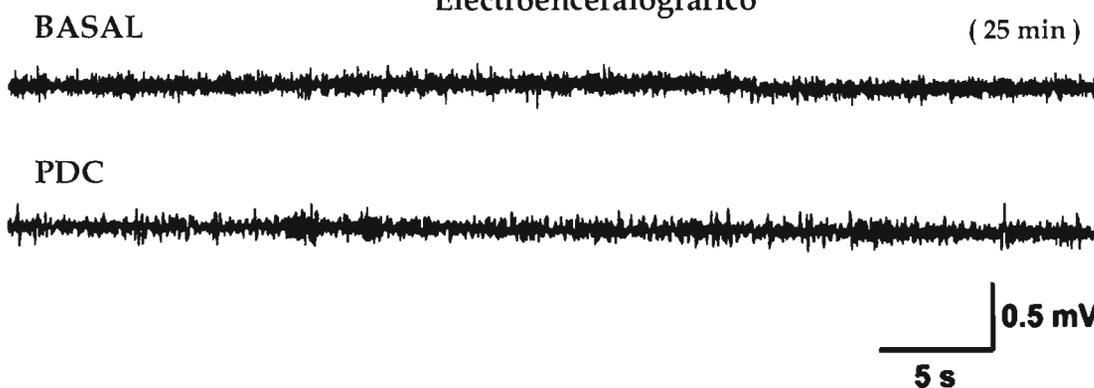
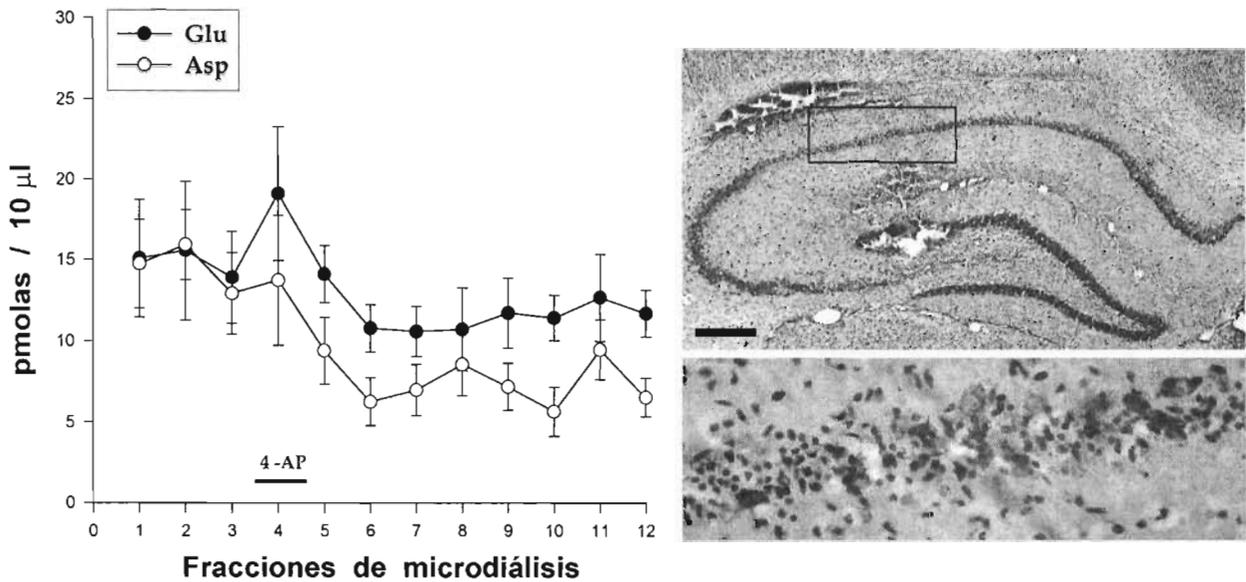
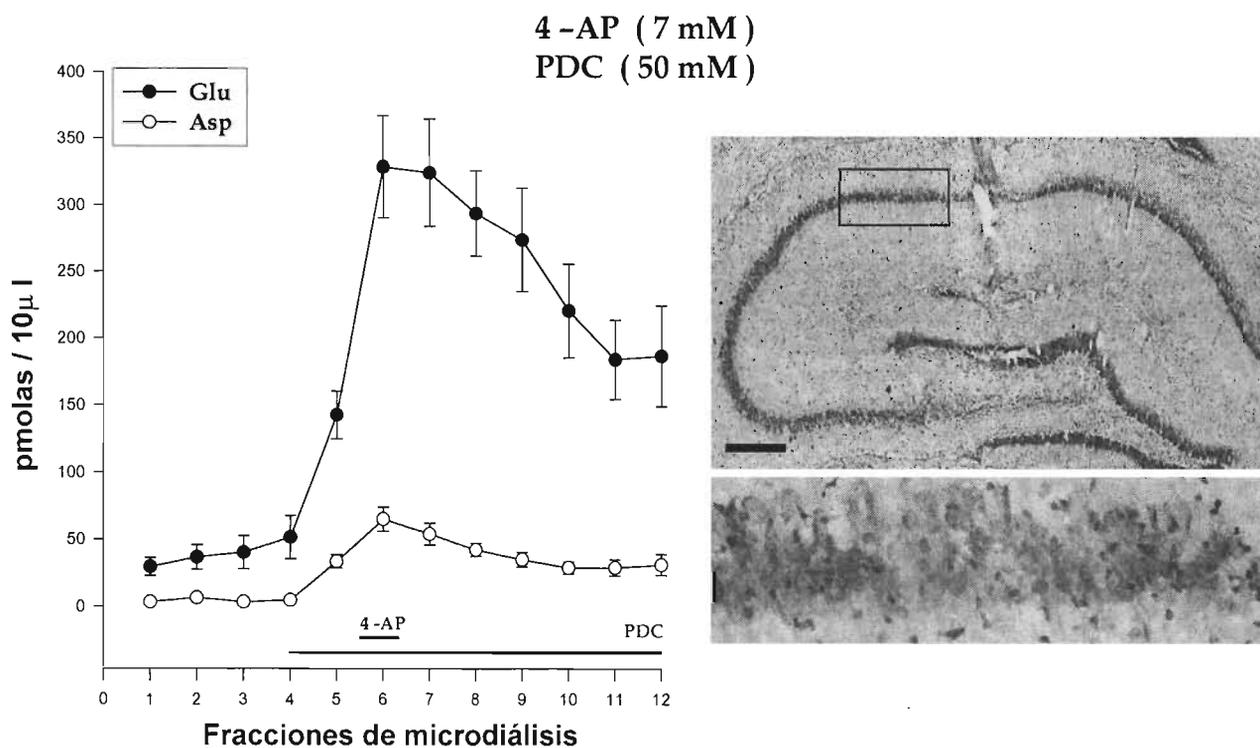


Figura 2. Efecto de la perfusión del PDC sobre la concentración extracelular de aspartato y glutamato en el hipocampo de ratas en libre movimiento (gráfica lado superior izquierdo). También se muestra una micrografía representativa de la región CA1 del hipocampo, en donde se observa la capa de células piramidales completamente sana (lado superior derecho, la barra negra horizontal corresponde a 500 μm y abajo se ve el aumento de la región perfundida que corresponde a 200 μm). En la parte inferior de la figura, se muestra el EEG en donde se puede ver que no existen cambios en el registro. Los datos son el promedio ± E.S. de 7 ratas.

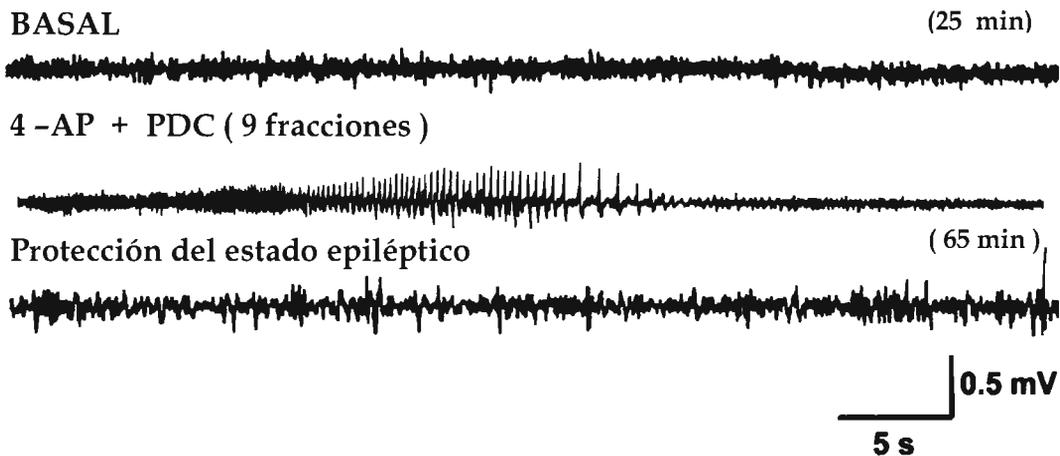
### 4-aminopiridina (4-AP) (7 mM)



**Figura 3.** Efecto de la perfusión de la 4-AP sobre la concentración extracelular de aspartato y glutamato en el hipocampo de ratas en libre movimiento (gráfica lado superior izquierdo). También se muestra el daño neurotóxico producido en la región CA1 del hipocampo (micrografía del lado superior derecho). En la parte inferior se observan las descargas epileptiformes y el estado epiléptico en el EEG. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de 7 ratas.

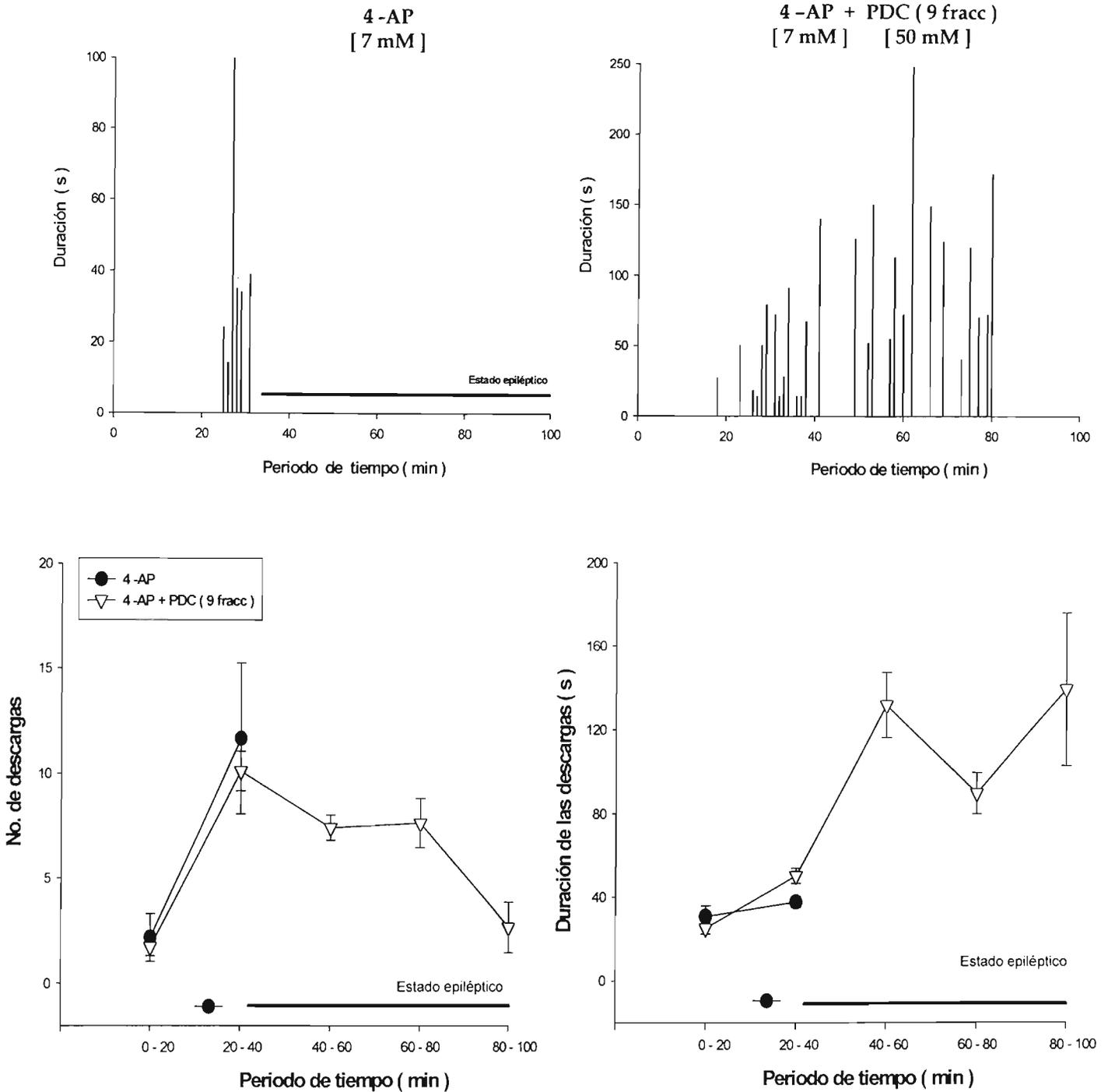


### Registro Electroencefalográfico



**Figura 4.** Efecto de la perfusión de la 4-AP + PDC (9 fracciones) sobre la concentración extracelular de aspartato y glutamato en el hipocampo de ratas en libre movimiento (gráfica lado superior izquierdo). También se muestra la protección por el PDC del daño neurotóxico producido por la 4 -AP en la región CA1 del hipocampo (micrografía del lado superior derecho) y la disminución de la duración de las descargas epileptiformes y la protección total del estado epiléptico en el EEG.

Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de 7 ratas.



**Figura 5.** En la parte superior se muestra el ejemplo representativo del curso temporal de las crisis epileptiformes y la aparición del estado epiléptico (barra horizontal) en una rata profundida con 4 -AP sola (gráfica izquierda) y con 4 -AP + PDC (9 fracc) (gráfica derecha). Cada barra representa una descarga de la duración señalada en las ordenadas, al periodo de tiempo indicado en las abscisas.

En la parte inferior se muestra la cuantificación del número y la duración de las descargas inducidas por la perfusión de la 4 -AP y 4-AP + PDC (9 fracc). La barra horizontal indica el inicio de la aparición del estado epiléptico y su duración en el caso de la 4 -AP sola. El tratamiento con 4 -AP + PDC (9 fracc) como se puede ver, genera crisis epileptiformes pero no hay inducción del estado epiléptico.

Para confirmar la interpretación de los resultados anteriores, en este trabajo, se decidió utilizar antagonistas y agonistas de este grupo de mGluR, estimulando con 4-AP y, en el caso de los antagonistas, bajo condiciones de inhibición de la recaptura de glutamato.

### III. HIPÓTESIS

El exceso en la transmisión sináptica de glutamato puede inducir epilepsia y muerte neuronal por excitotoxicidad al interactuar con el receptor NMDA, pero el incremento extracelular de este aminoácido, provocado por inhibición de su transporte, podría activar receptores metabotrópicos principalmente del grupo III que inhiban la liberación de glutamato de las terminales presinápticas. Esta depresión en la transmisión sináptica excitatoria, puede ser capaz de antagonizar los efectos generados por la 4-aminopiridina (Vera, 2004), la cual estimula la liberación de glutamato, generando epilepsia y muerte neuronal.

Por lo tanto, los antagonistas de los receptores metabotrópicos a glutamato del grupo III, deben revertir el efecto protector encontrado con el PDC, mientras que los agonistas lo deben potenciar.

### IV. OBJETIVO

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo es determinar la acción de los antagonistas y agonistas específicos para los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III, sobre los efectos neurotóxicos de la 4-AP en el hipocampo de ratas despiertas, con el fin de esclarecer la participación de estos receptores en el control del proceso excitotóxico.

### V. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este estudio se llevó a cabo en ratas implantadas en la región CA1 del hipocampo para experimentos de microdiálisis en libre movimiento. La técnica de microdiálisis, consiste en implantar una cánula, la cual se encuentra rodeada por una membrana permeable

que puede equilibrar el medio extracelular y permite medir las concentraciones extracelulares de varios aminoácidos, entre ellos el glutamato. Los detalles de la técnica se describen más adelante en la metodología.

En los experimentos realizados en este trabajo, se perfundió la 4-AP a una dosis de 7mM para inducir epilepsia y neurodegeneración, el PDC se utilizó a una dosis de 50 mM, para inhibir la recaptura de glutamato y los antagonistas MAP<sub>4</sub> y MSOP, se usaron para bloquear el grupo III de los mGluR. Finalmente el agonista L-AP<sub>4</sub> se usó para activar específicamente a este grupo de receptores.

A continuación se describe la combinación de las drogas utilizadas en cada grupo experimental.

- a) Grupo control perfundido solamente con el antagonista MAP<sub>4</sub>.
- b) Grupo control perfundido solamente con el antagonista MSOP.
- c) Grupo perfundido con el antagonista MAP<sub>4</sub> y el inhibidor de la recaptura, PDC.
- d) Grupo perfundido con el antagonista MSOP y el inhibidor de la recaptura, PDC.
- e) Grupo perfundido con el antagonista MAP<sub>4</sub> y 4-AP.
- f) Grupo perfundido con el antagonista MSOP y 4-AP.
- g) Grupo perfundido con el antagonista MAP<sub>4</sub>, el inhibidor de la recaptura, PDC y 4-AP.
- h) Grupo perfundido con el antagonista MSOP, el inhibidor de la recaptura, PDC y 4-AP.
- i) Grupo control perfundido solamente con el agonista L-AP<sub>4</sub>.
- j) Grupo perfundido con el agonista L-AP<sub>4</sub> y 4-AP.

## VI. METODOLOGÍA

### ▪ Cirugía para el implante:

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 220-240g, las cuales fueron anestesiadas con una mezcla de entre 0.5-1.5% de halotano en una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> para llevar a cabo el implante. Una vez anestesiados los animales se realizó un corte en la piel para exponer el cráneo y se colocaron dos tornillos al nivel de la corteza parietal, los cuales fueron utilizados como electrodos para el EEG. Posteriormente, se taladró un orificio de 2 mm aproximadamente de diámetro para la colocación de una cánula guía en el área del hipocampo izquierdo dorsal con coordenadas: antero-posterior 3.6 mm, lateral + 2.4 mm y ventral 2.0 mm a partir de Bregma (Paxinos y Watson, 1982). Finalmente se utilizó acrílico dental para sujetar al cráneo los tornillos y la cánula guía (Ramirez-Munguía et al, 2003).

### ▪ Microdiálisis:

Cinco días después del implante se llevaron a cabo los experimentos, con la finalidad de permitir la recuperación del daño mecánico ocasionado en el tejido por la entrada de la cánula guía. Al momento de llevar a cabo el estudio, se cambió la cánula guía y en su lugar se introdujo la cánula de microdiálisis (CMA/12 Solana, Suecia de 2 mm de largo y 0.5 mm de diámetro, previamente lavada con agua destilada durante 1 hora a un flujo de 15 µl/min).

Posteriormente, a través de la cánula se perfundió continuamente en el hipocampo una solución Krebs-Ringer compuesto por NaCl 118 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.18 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucosa 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM (pH 7.4) a un flujo de 2 µl/min mediante una microjeringa montada a una bomba de microinyección (modelo CMA/100; Carnegie).

Después de un periodo de estabilización de 60 minutos, fueron colectadas continuamente 12 fracciones de 25 µl de 12.5 min cada una, a través de un colector

automático conectado a la bomba de microinyección. Las tres primeras fracciones colectadas se utilizaron para la determinación de los niveles basales de los aminoácidos estudiados: Ac. Aspártico (asp), Ac. Glutámico (glu), Glutamina (gln), Glicina (gly), Taurina (Tau) y Alanina (ala), posteriormente se cambió el medio de perfusión por una solución que contenía el compuesto, (S)-2-amino-2-metil-4-ácido fosfonobutanoico (MAP<sub>4</sub>), (R-S)- $\alpha$ -metilserina-O-fosfato (MSOP) o L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP<sub>4</sub>) más 4-aminopiridina (4-AP) y Ac. L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC), según cada experimento.

A un primer grupo de animales se perfundió a una concentración de 500  $\mu$ M, durante 9 fracciones de microdiálisis, el compuesto, (S)-2-amino-2-metil-4-ácido fosfonobutanoico (MAP<sub>4</sub>) (Tocris, Langford, Bristol, Reino Unido), el cuál es un antagonista específico de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III. En un segundo grupo se administró MAP<sub>4</sub> junto con el inhibidor del transporte de glutamato, PDC (Tocris, Langford, Bristol, U.K.) a una concentración de 50 mM durante nueve fracciones. En el tercer grupo se adicionaron nueve fracciones continuas con MAP<sub>4</sub>, para, posteriormente perfundir una sola fracción (en la sexta) del bloqueador de canales de potasio, 4-AP (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) a una concentración de 7 mM. Finalmente, en el cuarto grupo se realizó la combinación de los tres compuestos, MAP<sub>4</sub> y PDC, se adicionaron durante nueve fracciones continuas y la 4-AP, al igual que con el grupo experimental anterior, se administró únicamente en la sexta fracción. Cabe mencionar que las concentraciones de las drogas utilizadas fueron calculadas en base a la eficiencia del  $\sim$  10% de la cánula de microdiálisis según la determinación realizada por Morales-Villagran y colaboradores (1996).

El otro antagonista utilizado de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III, el (R-S)- $\alpha$ -metilserina-O-fosfato (MSOP) (Tocris, Langford, Bristol, U.K.), se usó a una concentración de 1 mM y se perfundió de igual manera que el antagonista MAP<sub>4</sub> según el grupo experimental.

El agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del Grupo III que se utilizó fue el L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP<sub>4</sub>) (Tocris, Langford, Bristol, U.K.), el cual es el

más específico, se perfundió a una dosis de 100 mM durante nueve fracciones continuas de microdiálisis. Este compuesto se administró solo en un grupo de animales, y en otro grupo se co-administró, como en grupos anteriores, junto con la 4-AP, el L-AP4 se pasó a través de la cánula de microdiálisis durante nueve fracciones y la 4-AP solamente durante la sexta fracción.

- **Cuantificación de aminoácidos:**

La concentración de los aminoácidos se midió en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección por fluorescencia, como se describe en el trabajo de Salazar et al. (1994) y Massieu et al. (1995). Los 25 µl colectados de cada fracción se derivatizaron con un volumen igual de o-ftaldialdehído (OPA) durante 3 min, inmediatamente después se inyectaron 20 µl en el cromatógrafo equipado con una columna ODS (25 cm x 4 mm i.d) utilizando como fase móvil metanol y acetato de potasio (0.1 M, pH 5.5) corriendo en un gradiente lineal a un flujo de 1.5 µl / min de 25% a 75% metanol. La detección se llevó a cabo por la medición de la fluorescencia del derivado OPA, a 330 nm de excitación y 460 nm de emisión. El análisis cuantitativo de los aminoácidos se realizó por comparación con una mezcla estándar de 7 aminoácidos mencionados anteriormente.

- **Registro electroencefalográfico (EEG):**

Simultáneamente con la microdiálisis, se realizó un registro electroencefalográfico utilizando los electrodos implantados en la corteza parietal, para monitorear la actividad eléctrica propagada a la corteza. Este registro se llevó a cabo con la utilización de un polígrafo GRASS. La señal se filtró dando un ancho de banda entre 3-35 Hz. A partir de los registros obtenidos se determinó la latencia, el número y la duración de las descargas epileptiformes, así como la latencia y duración del estado epiléptico.

- **Análisis histológico:**

24 horas después de haber realizado el experimento, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico y se perfundieron intracardialmente con 250 ml de solución salina al 0.9%, seguidos de 250 ml de formaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Los cerebros removidos, se mantuvieron en postfijación con formaldehído por un periodo de 24 horas a 4°C, posteriormente fueron transferidos a soluciones con un gradiente de sacarosa al 10, 20 y 30%. Luego se realizaron cortes coronales seriados en congelación del sitio de lesión con un grosor de 40  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con violeta de cresilo para confirmar la correcta localización de la cánula de microdiálisis en el tejido y para el análisis de la neurodegeneración.

La neurodegeneración se midió en un programa de análisis de imágenes NIH 1.6 para Macintosh, señalando el número de células sanas en 30,000  $\mu\text{m}^2$ . De cada grupo experimental, se analizaron tres cortes por rata.

- **Observación conductual:**

Durante y después del experimento (hasta 24 h), se observó cuidadosamente el efecto conductual producido por los diferentes tratamientos según las condiciones experimentales.

- **Análisis estadístico:**

Para cuantificar los cambios en las concentraciones de los aminoácidos y del daño celular, se realizó una prueba T de Student pareada.

## VII. RESULTADOS

### ▪ Aminoácidos Extracelulares

Como se mencionó en el objetivo, este trabajo está enfocado en el análisis de antagonistas y agonistas de los mGluR III. A continuación se describen los resultados obtenidos con estas drogas.

En la figura 6 se muestran los niveles extracelulares de aspartato y glutamato durante la perfusión con el antagonista MAP<sub>4</sub> durante 9 fracciones continuas de microdiálisis. Como se puede observar en la gráfica, no existen cambios significativos después de la administración del compuesto; el aspartato se mantiene en 4 pmolas/10 µl y el glutamato alrededor de 8 pmolas/10 µl.

Resultados muy parecidos se obtuvieron con el segundo antagonista utilizado. Los animales control perfundidos solamente con MSOP (figura 6), no mostraron cambios en las concentraciones extracelulares de los aminoácidos. El aspartato se mantiene entre 2 y 3 pmolas/10 µl y el glutamato alrededor de 12 pmolas/10 µl.

Al administrar PDC junto con MAP<sub>4</sub>, se observó un incremento significativo en ambos aminoácidos. El aspartato aumentó casi hasta 50 pmolas/10 µl y el glutamato hasta 250 pmolas/10 µl aproximadamente. Este incremento se observa a partir de la 4 fracción, la cual corresponde al inicio de la perfusión del PDC hasta la fracción número 12, periodo durante el cual se mantuvo la perfusión del PDC y nunca regresa a niveles basales (figura 7). Este efecto es igual al visto con la perfusión del PDC solo (ver figura 2).

Igualmente en el grupo experimental tratado con MSOP más PDC se observó el mismo patrón de aumento tanto de aspartato, el cual subió hasta 30 pmolas/10 µl aproximadamente, como de glutamato que llegó hasta valores de 200 pmolas/10 µl (figura 7).

El tratamiento con el antagonista  $MAP_4$  y 4-AP no provocó ningún cambio significativo a lo largo de todo el experimento. Los niveles extracelulares de aspartato y glutamato se mantuvieron alrededor de 4 pmolas/10  $\mu$ l y 15 pmolas/10  $\mu$ l respectivamente (figura 8). Este mismo efecto ocurrió para MSOP y 4-AP, ambos aminoácidos se mantuvieron sin cambios significativos, el aspartato en 2 pmolas/10  $\mu$ l y el glutamato entre 8 y 9 pmolas/10  $\mu$ l (figura 8).

Los animales tratados con los tres compuestos ( $MAP_4$ , PDC y 4-AP) mostraron el aumento significativo visto en experimentos anteriores a causa del PDC (figura 9). Bajo estas condiciones el aspartato alcanzó niveles cercanos a las 30 pmolas/10  $\mu$ l y el glutamato nuevamente llegó a 250 pmolas/10  $\mu$ l.

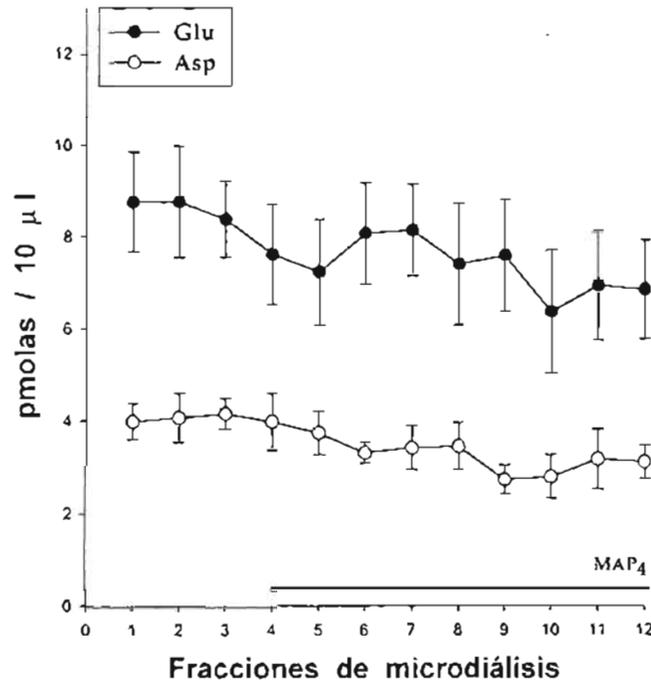
En el caso de MSOP, PDC y 4-AP, al igual que con  $MAP_4$ , hubo aumento significativo, el aspartato subió aproximadamente hasta 20 pmolas/10  $\mu$ l y el glutamato nuevamente tocó valores cercanos a 200 pmolas/10  $\mu$ l (figura 9).

El agonista de los mGluR III, el L- $AP_4$ , se probó a dosis de 1, 2, 5, 10, 50 y 100 mM, y solamente en 50 y 100mM se observó la protección de las descargas epileptiformes, por lo que fueron las dosis que se analizaron completamente, siendo la concentración de 100mM la más clara en la disminución del glutamato extracelular y en las descargas epileptiformes.

Como se muestra en la gráfica 10, a diferencia de lo que ocurrió con los antagonistas de los mGluR III, la perfusión del agonista específico L- $AP_4$ , a una dosis de 100mM perfundido durante 9 fracciones continuas de microdiálisis, ya sea solo o en combinación con la 4-AP, claramente disminuye la concentración extracelular de ambos aminoácidos llegando a valores muy cercanos a cero e incluso a valores indetectables por HPLC (figura 10).

Es importante mencionar que las concentraciones basales de glutamato varían en cada grupo experimental, debido a que se ha encontrado que, para ratas en libre movimiento, la concentración de glutamato extracelular varía entre 7 y 11 pmol / 10  $\mu$ l (Vera, 2004).

MAP<sub>4</sub>  
[ 500 μm ]



MSOP  
[ 1 mM ]

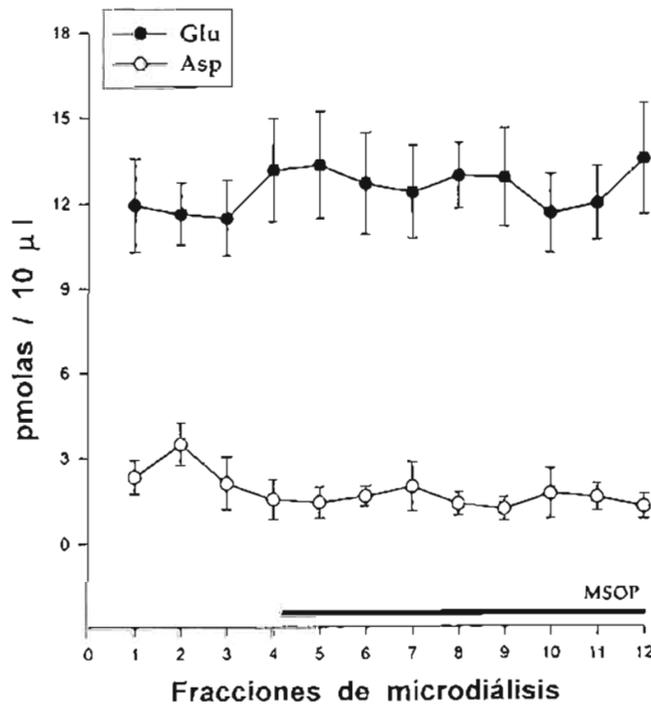
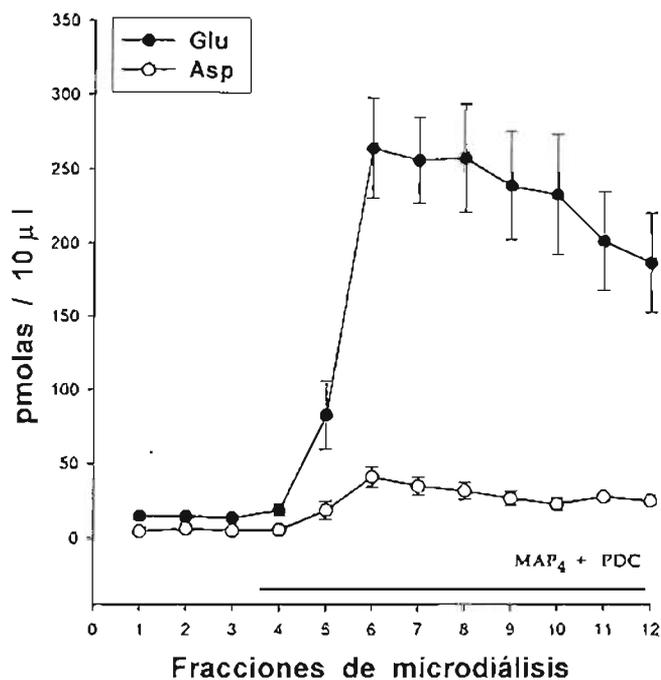


Figura 6. Efecto de la perfusión de los antagonistas solos MAP<sub>4</sub> o MSOP, sobre la concentración extracelular de aspartato y glutamato, durante nueve fracciones de microdiálisis consecutivas en el hipocampo de ratas en libre movimiento. La barra horizontal indica el número de fracciones de perfusión de los antagonistas. Los datos son el promedio ± ES de un total de 7 animales en cada gráfica.

MAP<sub>4</sub> [ 500 μm ]  
PDC [ 50 mM ]



MSOP [ 1 mM ]  
PDC [ 50 mM ]

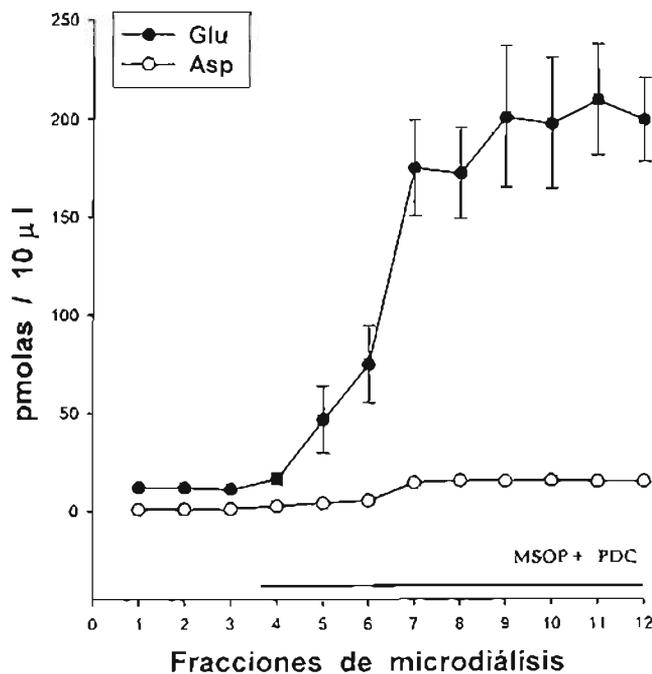
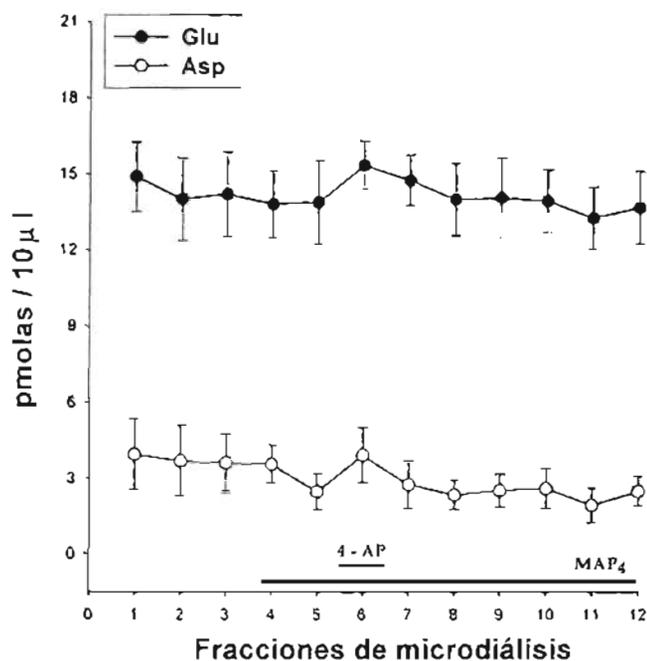


Figura 7. Efecto de la perfusión de PDC más el antagonista MAP<sub>4</sub> o MSOP, sobre la concentración extracelular de aspartato y glutamato durante nueve fracciones de microdiálisis consecutivas (barra horizontal) en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Se muestra el aumento significativo ( $p < 0.05$ ) a partir de la quinta fracción hasta el final del experimento. Estas fracciones fueron estadísticamente diferentes al promedio de sus basales.  $n = 7$

MAP<sub>4</sub> [ 500 μm ]  
4 - AP [ 7 mM ]



MSOP [ 1 mM ]  
4 - AP [ 7 mM ]

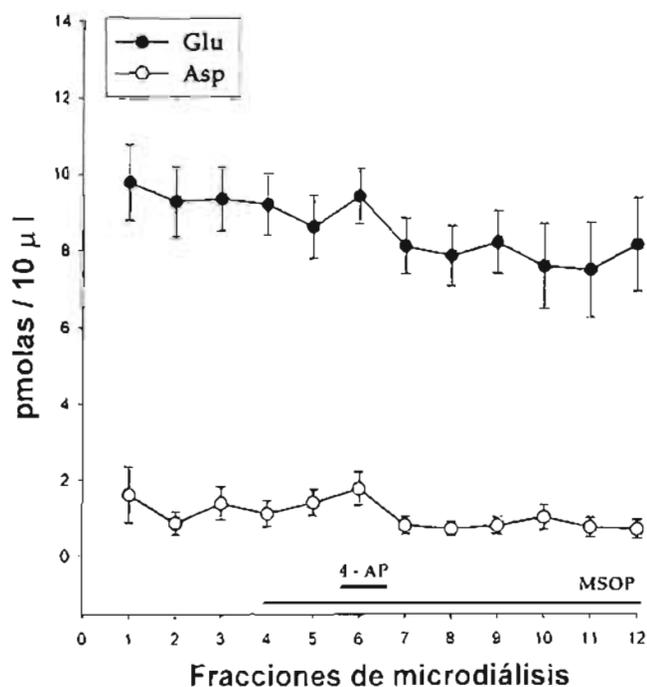
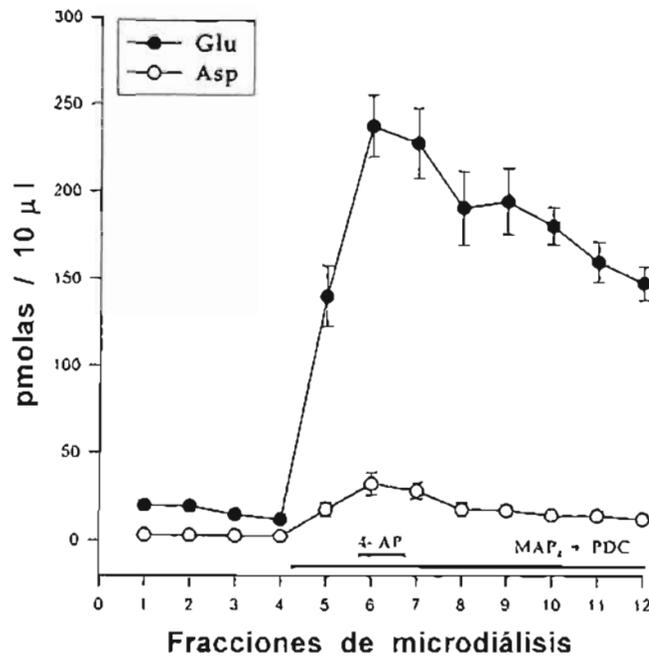


Figura 8. Efecto de los antagonistas MAP<sub>4</sub> o MSOP más 4 - AP sobre la concentración extracelular de aspartato y glutamato en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Los antagonistas se administraron durante nueve fracciones de microdiálisis consecutivas, mientras que la 4-AP se adicionó solamente en la sexta fracción (barra horizontal). Los datos son el promedio ± ES de 7 animales en cada gráfica.

MAP<sub>4</sub> [ 500 μm ]  
 PDC [ 50 mM ]  
 4- AP [ 7 mM ]



MSOP [ 1 mM ]  
 PDC [ 50 mM ]  
 4- AP [ 7 mM ]

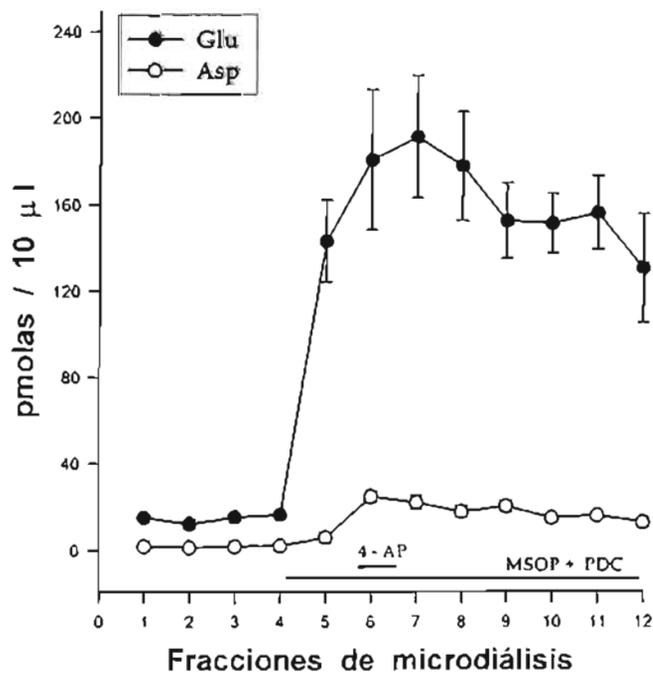
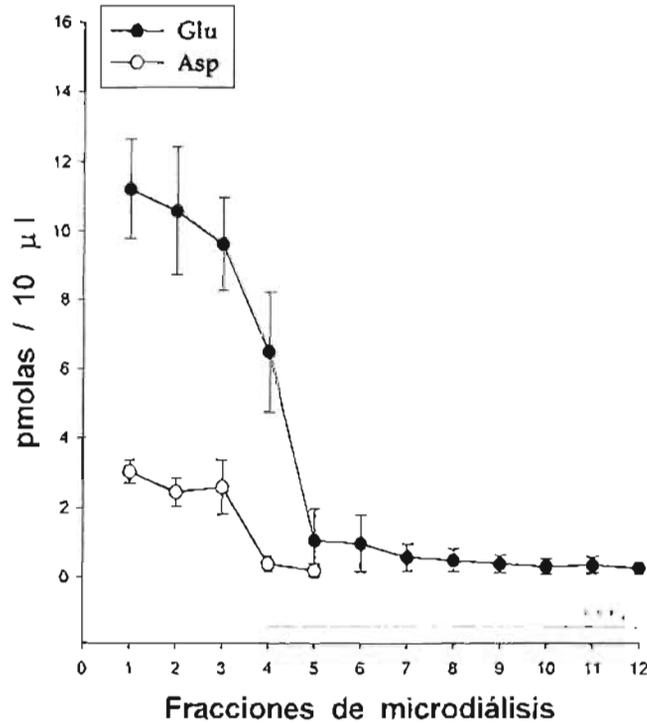


Figura 9. Efecto de la perfusión de PDC y los antagonistas MAP<sub>4</sub> o MSOP más 4- AP sobre la concentración extracelular de aspartato y glutamato en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Los antagonistas y el PDC se administraron durante nueve fracciones de microdiálisis consecutivas, mientras que la 4-AP se adicionó solamente en la sexta fracción (barra horizontal). Los datos son el promedio ± ES de 7 animales para cada gráfica. También se muestra el aumento significativo ( $p < 0.05$ ) a partir de la quinta fracción hasta el final del experimento.

LAP<sub>4</sub> [ 100 mM ]



LAP<sub>4</sub> [ 100 mM ]  
4 - AP [ 7 mM ]

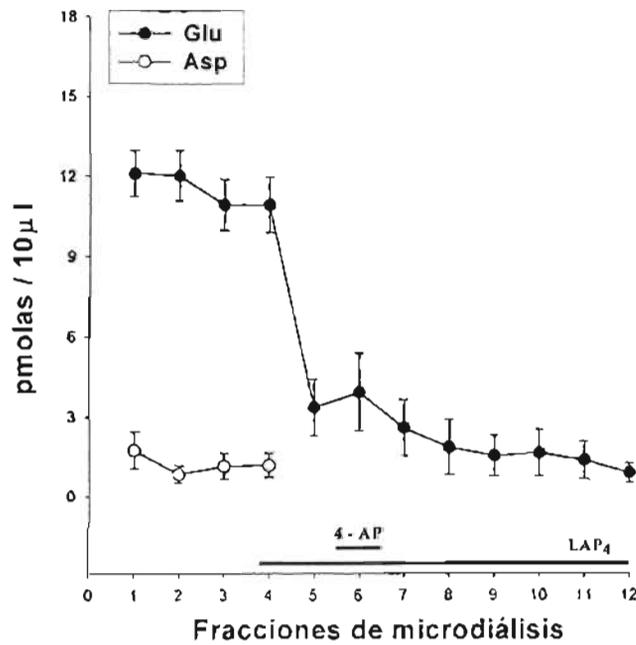


Figura 10. En la gráfica superior se muestra el efecto del agonista LAP<sub>4</sub> sobre la concentración extracelular de aspartato y glutamato en el hipocampo de ratas en libre movimiento, perfundido durante 9 fracciones de microdialisis, tal y como lo muestra la barra horizontal. En la gráfica inferior se muestra el efecto combinado del agonista LAP<sub>4</sub> más 4 - AP sobre la concentración extracelular de aspartato y glutamato. El agonista se administró durante nueve fracciones de microdialisis consecutivas, mientras que la 4-AP se adicionó solamente en la sexta fracción (barras horizontales). Los datos son el promedio ± ES de 7 animales para cada gráfica. A partir de la quinta fracción se encontró diferencia significativa con respecto al promedio de sus basales ( $p < 0.05$ ).

- **Actividad Epileptiforme**

En un trabajo anterior describimos la actividad electroencefalográfica de ratas en libre movimiento que es de ondas de baja amplitud (Ramírez-Munguía et al., 2003). Este tipo de registro coincide con el obtenido en los animales tratados con PDC (ver figura 2), en los cuales no hay evidencia de hiperexcitabilidad neuronal (Vera, 2004). Sin embargo, la administración de 4-AP a una dosis de 7 mM, produce descargas epileptiformes con una actividad hipersincrónica inicial, seguida por trenes de espigas de alta amplitud que llegan a producir un gran aumento en la frecuencia de las crisis hasta el establecimiento de un estado epiléptico (ver figura 3).

Esta sobreexcitación observada en el EEG, coincide con algunos efectos conductuales tales como acicalamiento, salivación, movimientos masticatorios, sacudidas de perro mojado, contracciones de las patas delanteras y encorvamiento del cuerpo, además de fuertes convulsiones tónico-clónicas, acompañadas de hipersalivación, rigidez de la cola, movimientos fuertes de la cabeza y pérdida total de la postura durante el estado epiléptico (Vera, 2004). El tratamiento combinado de 4-AP y PDC durante nueve fracciones de microdiálisis (ver figura 4), produce una disminución importante de las descargas epileptiformes y elimina por completo el estado epiléptico, indicando que el PDC ejerce protección contra los efectos producidos por 4-AP (Vera, 2004).

Como se mencionó anteriormente, en el presente trabajo se estudiaron los efectos de dos antagonistas y un agonista específicos para los mGluR III. En la figura 11 se pueden observar los trazos representativos de los dos antagonistas utilizados, MAP<sub>4</sub> y MSOP, perfundidos de manera individual durante nueve fracciones de microdiálisis. En ningún caso se produjeron cambios en el EEG ni en la conducta de los animales (n = 7, en cada uno de los tratamientos).

Al administrar MAP<sub>4</sub> + PDC o MSOP + PDC perfundidos de manera simultánea durante nueve fracciones de microdiálisis, tampoco se generaron cambios, ni en la conducta de los animales ni en el EEG (figura 11).

## Registro Electroencefalográfico

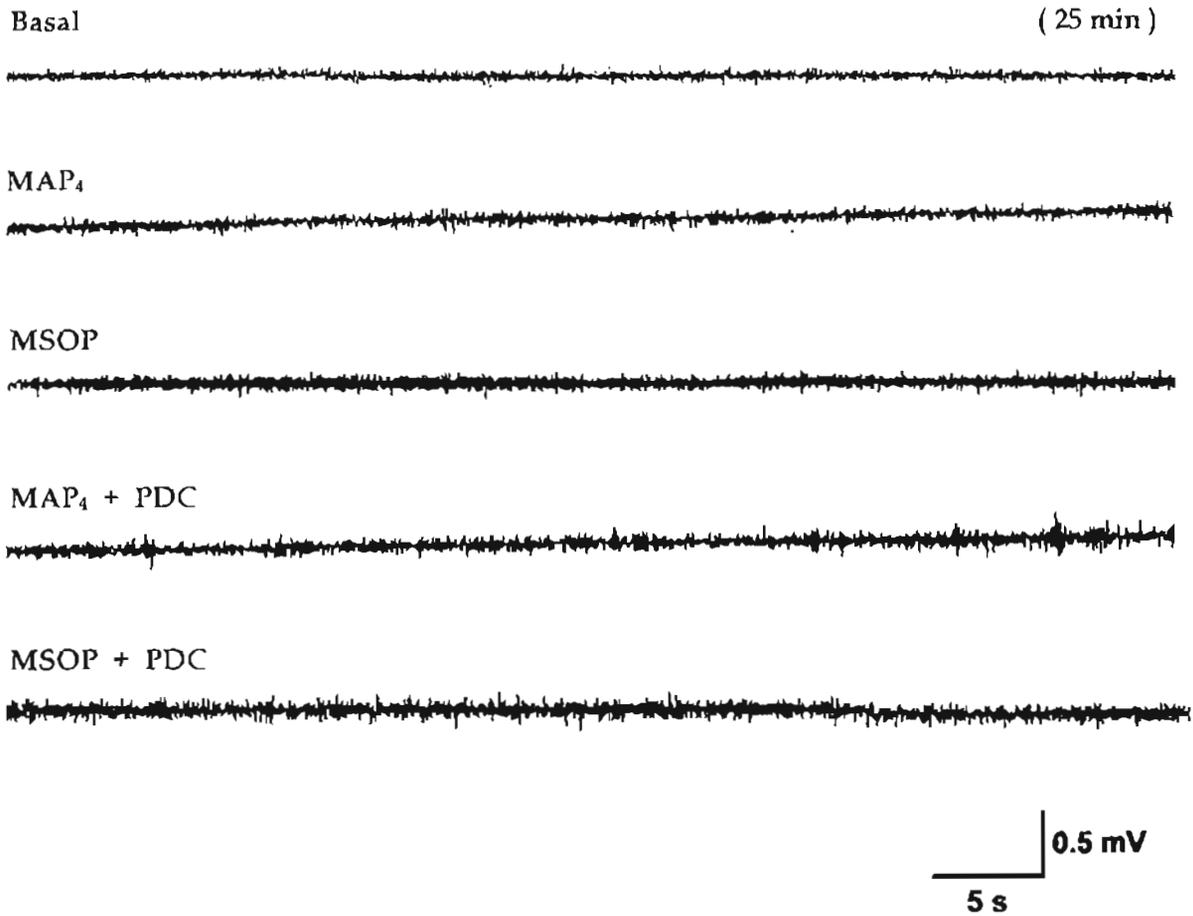


Figura 11. Trazos representativos en el EEG de la perfusión de los antagonistas MAP<sub>4</sub> o MSOP solos y en combinación con el PDC. Estos registros fueron tomados a los 25 min. También se muestra en tiempo equivalente, el registro basal de animales perfundidos con medio Krebs-Ringer.

La perfusión combinada de MAP<sub>4</sub> + 4-AP o MSOP + 4-AP, generó crisis epileptiformes (figura 12) que se manifestaron conductualmente con los efectos descritos en trabajos anteriores de microinyección en ratas anestesiadas (Arias et al., 1998, 2002) y en trabajos de microdiálisis en libre movimiento (Ramírez-Munguía et al., 2003; Vera, 2004), que corresponden al efecto de la perfusión con 4-AP sola y que se mencionaron anteriormente. Además, bajo estas condiciones, durante el estado epiléptico se registró una fuerte potenciación de la conducta en estos animales, ya que también presentaron sangrado de nariz, ojos, oídos y boca, y cabe mencionar que algunos de ellos murieron por convulsión generalizada.

La aparición de la primera descarga, después de la administración de la 4-AP, fue de  $21.2 \pm 0.41$  min (promedio de 5 ratas  $\pm$  E.S.) y el estado epiléptico comenzó al minuto  $48.4 \pm 2.29$  con una duración de  $44.2 \pm 1.91$  min, para las ratas tratadas con MAP<sub>4</sub> + 4-AP. La latencia de la primera descarga para los animales tratados con MSOP + 4-AP fue de  $19.0 \pm 1.44$  min (promedio de 6 ratas  $\pm$  E.S.) y el estado epiléptico inició al minuto  $33.25 \pm 2.26$  y duró  $55.75 \pm 2.43$  min.

En la figura 14 se presenta la gráfica del curso temporal de las crisis y, con ambos antagonistas, lo que se puede observar es que en el periodo entre 20-40 min se generan pocas descargas (entre 7 y 10) y casi a la mitad de este mismo periodo, es decir, aproximadamente a los 30 min, los animales entran en estado epiléptico. Esto mismo se puede ver con mayor claridad en las figuras 16 y 17 en donde se presenta la cuantificación del número y la duración de las crisis en periodos de 20 min en el total de las ratas analizadas para cada grupo experimental ( $n = 5$  para el tratamiento con MAP<sub>4</sub> + 4-AP y  $n = 6$  para el tratamiento con MSOP + 4-AP).

Cuando se combinó MAP<sub>4</sub>, PDC y 4-AP o MSOP, PDC y 4-AP hubo una ligera disminución en la amplitud de las descargas y también durante el estado epiléptico (figura 13). La conducta de estos animales fue muy semejante a la conducta de los animales tratados con 4-AP sola, es decir, en este caso no hubo potenciación de efectos.

## Registro Electroencefalográfico

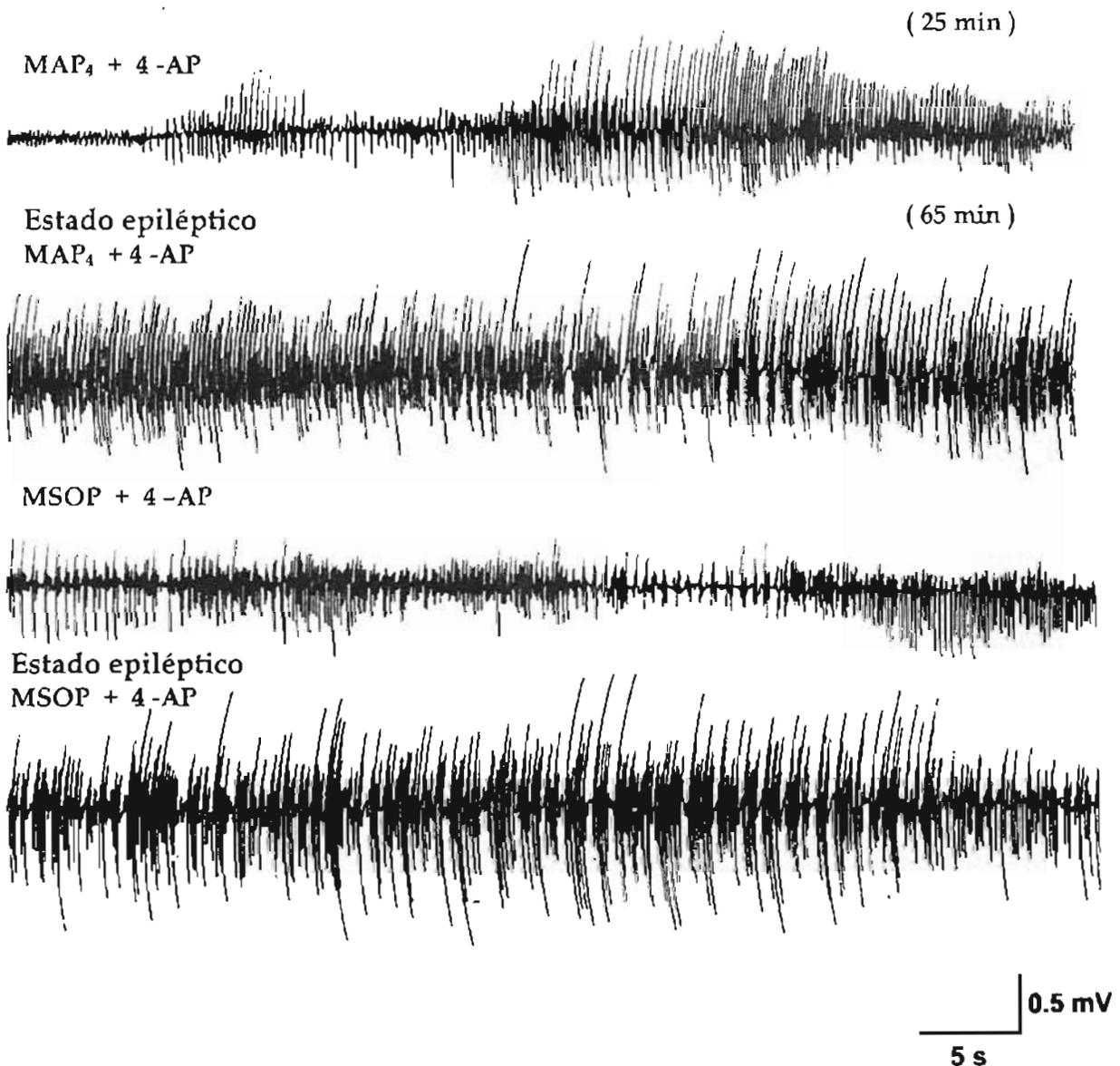


Figura 12. Trazos representativos en el EEG de las descargas epileptiformes producidas por la perfusión de los antagonistas MAP<sub>4</sub> + 4 -AP o MSOP + 4 -AP, tomados a los 25 min y los trazos representativos del estado epiléptico tomado a los 65 min después de iniciada la infusión de 4 -AP. Se muestra el aumento en la amplitud de las descargas epileptiformes y el estado epiléptico en comparación con el registro basal.

La latencia fue de  $17.0 \pm 0.4$  min (promedio de 7 ratas  $\pm$  E.S.), el estado epiléptico inició al minuto  $37.14 \pm 1.08$  con una duración de  $48.8 \pm 1.35$  min, para las ratas tratadas con  $MAP_4$ , PDC y 4-AP. En el caso de los animales perfundidos con MSOP, PDC y 4-AP la latencia fue de  $17.7 \pm 1.06$  min (promedio de 7 ratas  $\pm$  E.S.), el estado epiléptico comenzó al minuto  $31.86 \pm 2.0$  con una duración de  $51.0 \pm 1.6$  min .

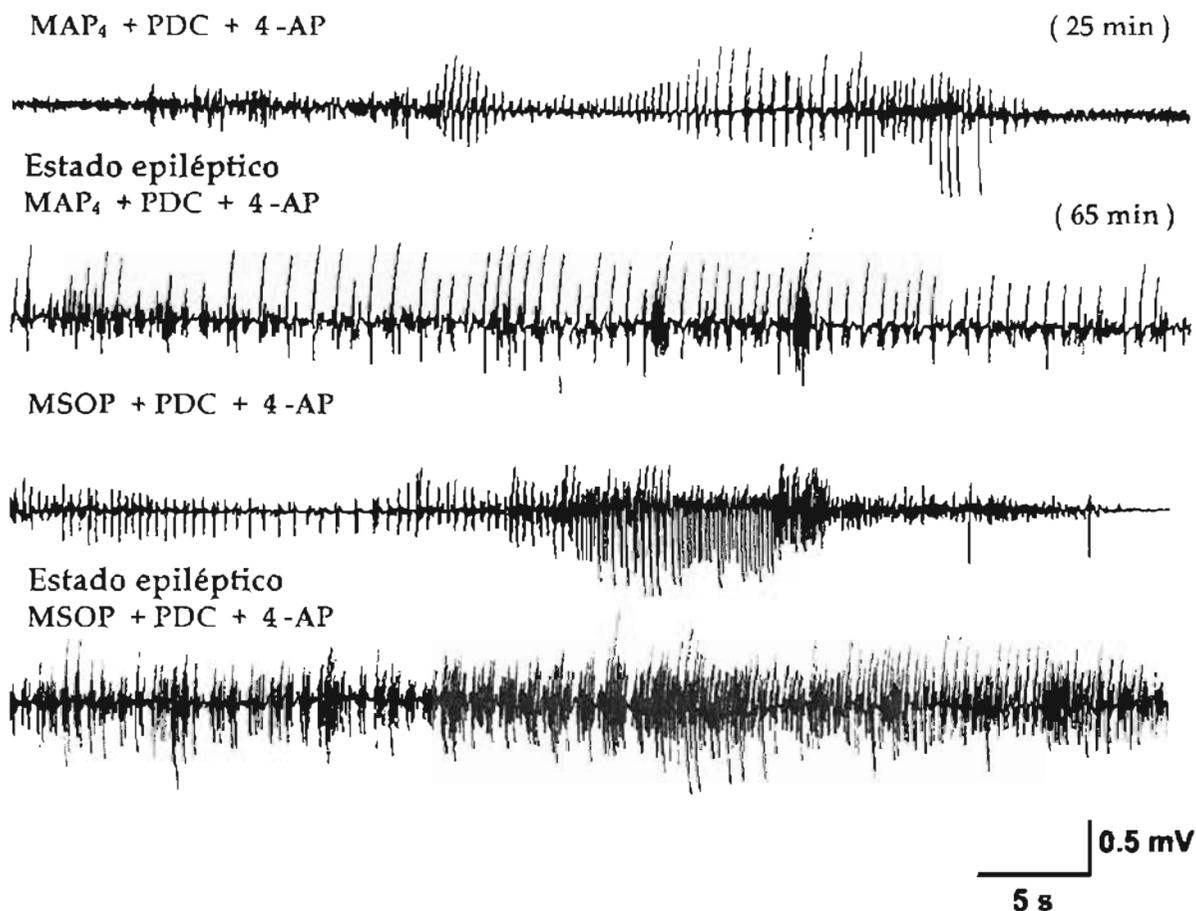
En el curso temporal de las crisis, al igual que con el tratamiento con los antagonistas y 4-AP, se observan pocas descargas (aproximadamente 11) que inician durante el periodo entre 20-40 min. Sin embargo, en estos animales se encontró un ligero retraso en el inicio del estado epiléptico (figura 15).

Al administrar el agonista de los mGluR III, L-AP<sub>4</sub> solo, a una dosis de 100 mM durante nueve fracciones de microdiálisis, al igual que con los antagonistas, no se produjeron cambios ni en la conducta ni en el EEG, tal y como se observa en los trazos representativos en la figura 18. Al administrar este agonista junto con la 4-AP, se pudo observar protección de las crisis en la mitad de los animales (figuras 18 y 20), es decir, 4 de ellos tuvieron descargas, con una latencia de  $22.5 \pm 0.42$  min y el establecimiento del estado epiléptico iniciado al minuto  $35.6 \pm 1.45$  con una duración de  $51.6 \pm 1.85$  min (promedio de 4 ratas  $\pm$  E.S.). De las cuatro ratas protegidas, dos de ellas tuvieron crisis epileptiformes y nunca llegaron al establecimiento del estado epiléptico (figuras 18 y 20), las otras dos ratas restantes, nunca presentaron crisis epileptiformes.

La figura 19 muestra el curso temporal de las crisis y se presenta un ejemplo representativo de una rata protegida contra el estado epiléptico y una no protegida. Estas últimas aunque no se protegieron del estado epiléptico, presentaron un retraso de 10 minutos en la aparición del mismo, es decir, su inicio fue hasta los 40 min.

También es importante destacar la duración de cada una de las crisis, las cuales son menores comparadas con la duración de las crisis de los antagonistas. Las descargas en el tren de espigas son de menor amplitud, aún en las ratas no protegidas (figura 18).

## Registro Electroencefalográfico



**Figura 13.** Trazos representativos en el EEG de las descargas epileptiformes producidas por la perfusión de los antagonistas MAP<sub>4</sub> + PDC + 4-AP o MSOP + PDC + 4-AP, tomados a los 25 min y los trazos representativos del estado epiléptico tomado a los 65 min después de iniciada la infusión de 4-AP. Se observa una ligera disminución en la amplitud de las descargas epileptiformes y el estado epiléptico producido por la perfusión del PDC. Comparar con la figura 4.

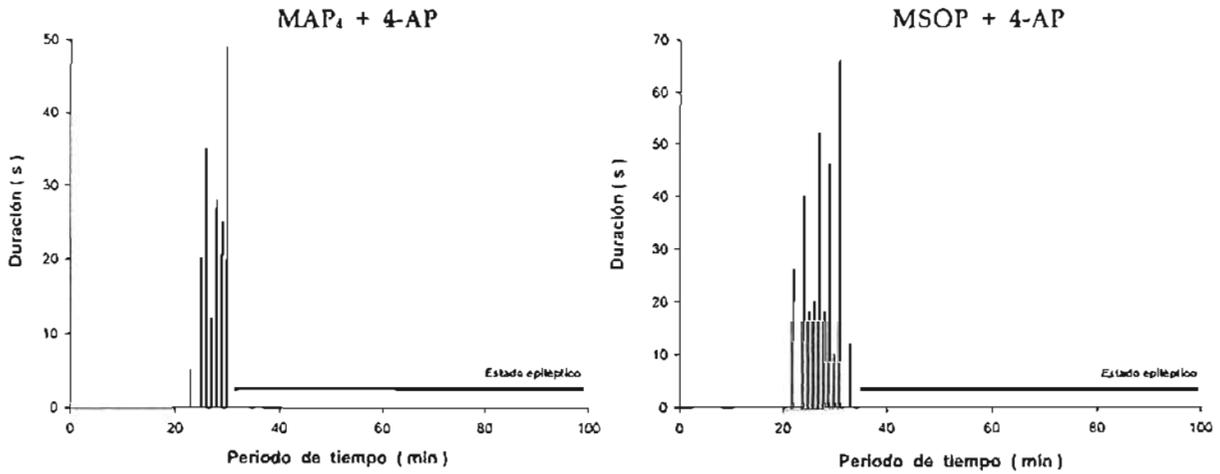


Figura 14. Ejemplos representativos del curso temporal de las crisis epileptiformes y la aparición del estado epiléptico (barra horizontal) en una sola rata durante el tratamiento con MAP<sub>4</sub> + 4-AP o MSOP + 4-AP. Cada barra representa una descarga de la duración señalada en las ordenadas, al periodo de tiempo indicado en las abscisas.

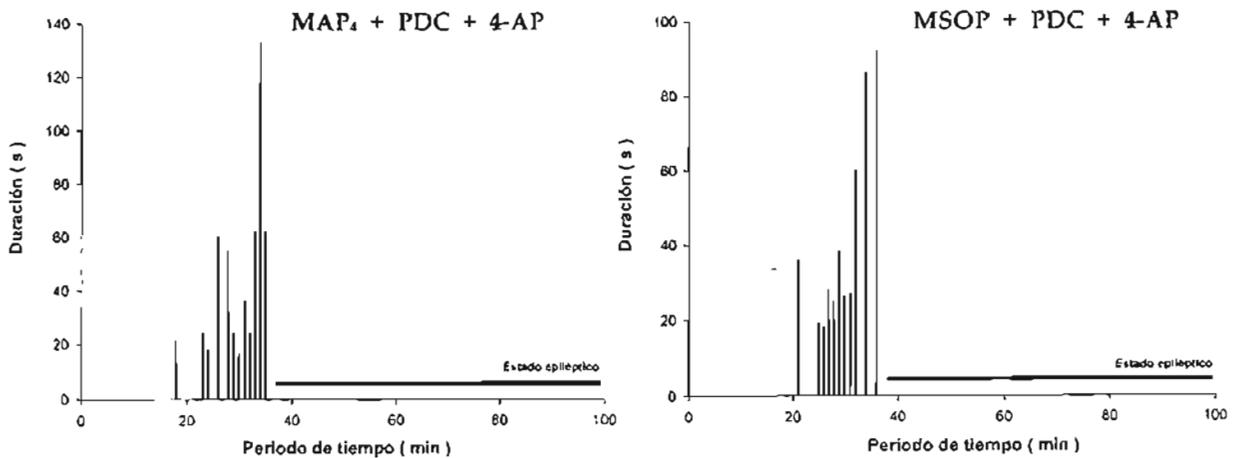


Figura 15. Ejemplos representativos del curso temporal de las crisis epileptiformes y la aparición del estado epiléptico (barra horizontal) en una sola rata, durante el tratamiento con MAP<sub>4</sub> + PDC + 4-AP o MSOP + PDC + 4-AP. Cada barra representa una descarga de la duración señalada en las ordenadas, al periodo de tiempo indicado en las abscisas. Comparar con la figura 5.

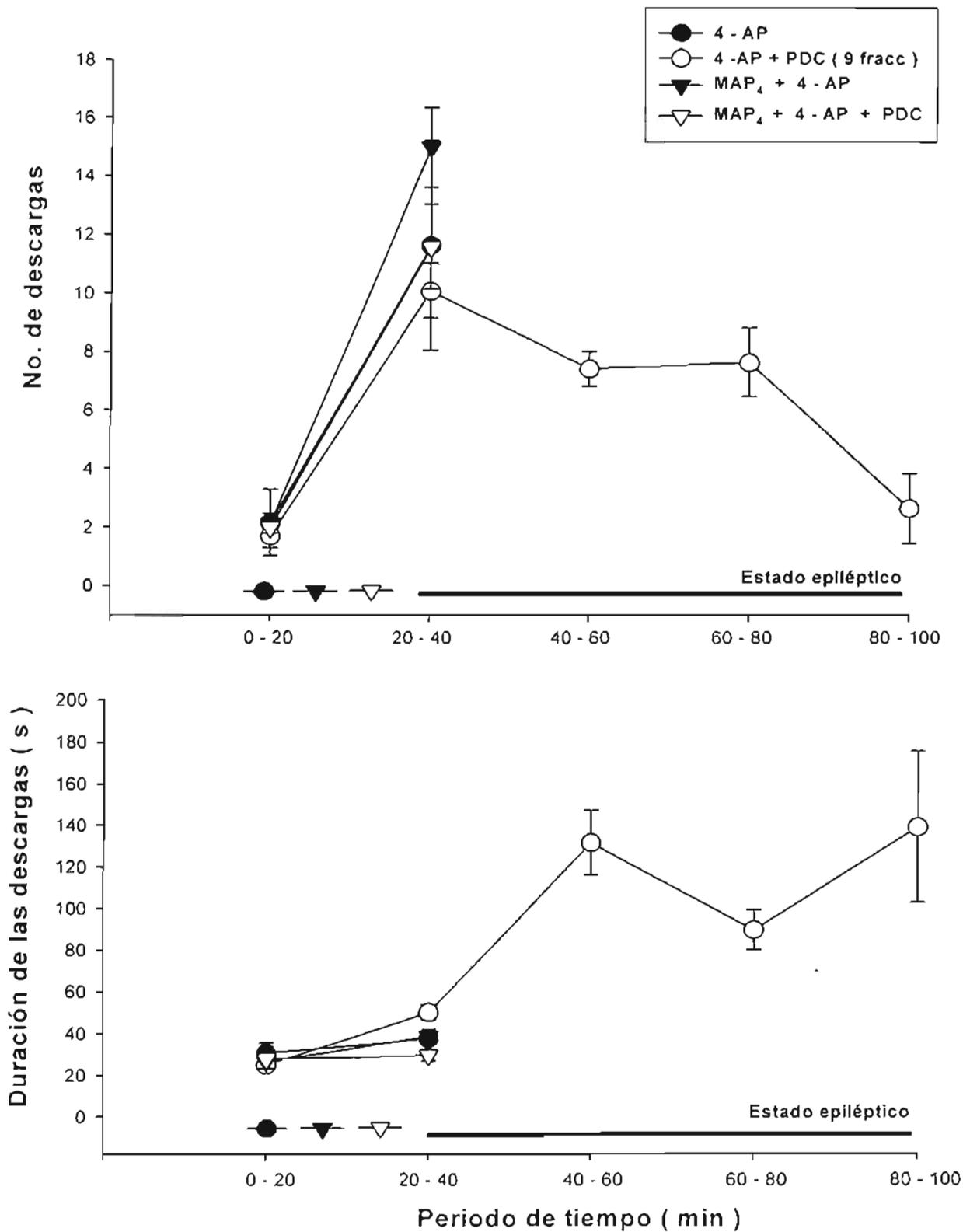


Figura 16. Número y duración de las descargas inducidas por los tratamientos de MAP<sub>4</sub> + 4 -AP y MAP<sub>4</sub> + 4 -AP + PDC en periodos de 20 min. La barra horizontal representa el tiempo de aparición y duración del estado epiléptico para los tratamientos indicados por las figuras. Se repitió el resultado del efecto de la 4-AP + PDC para su comparación (figura 5).

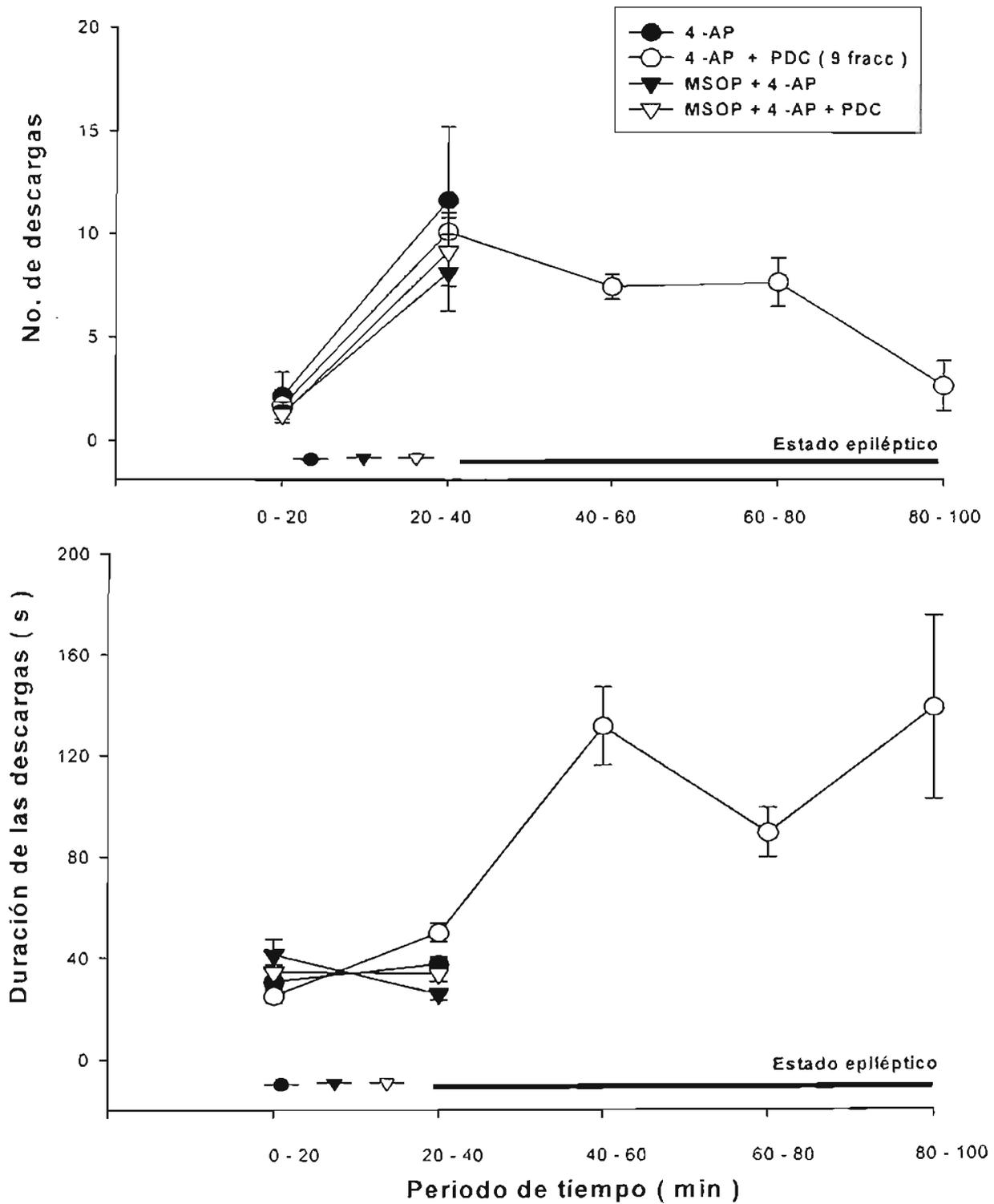


Figura 17. Numero y duración de las descargas inducidas por los tratamientos de MSOP + 4 -AP y MSOP + 4 -AP + PDC en periodos de 20 min. La barra horizontal representa el tiempo de aparición y duración del estado epiléptico para los tratamientos indicados por las figuras. Se repitió el efecto de la 4-AP + PDC para su comparación (figura 5).

Registro Electroencefalográfico

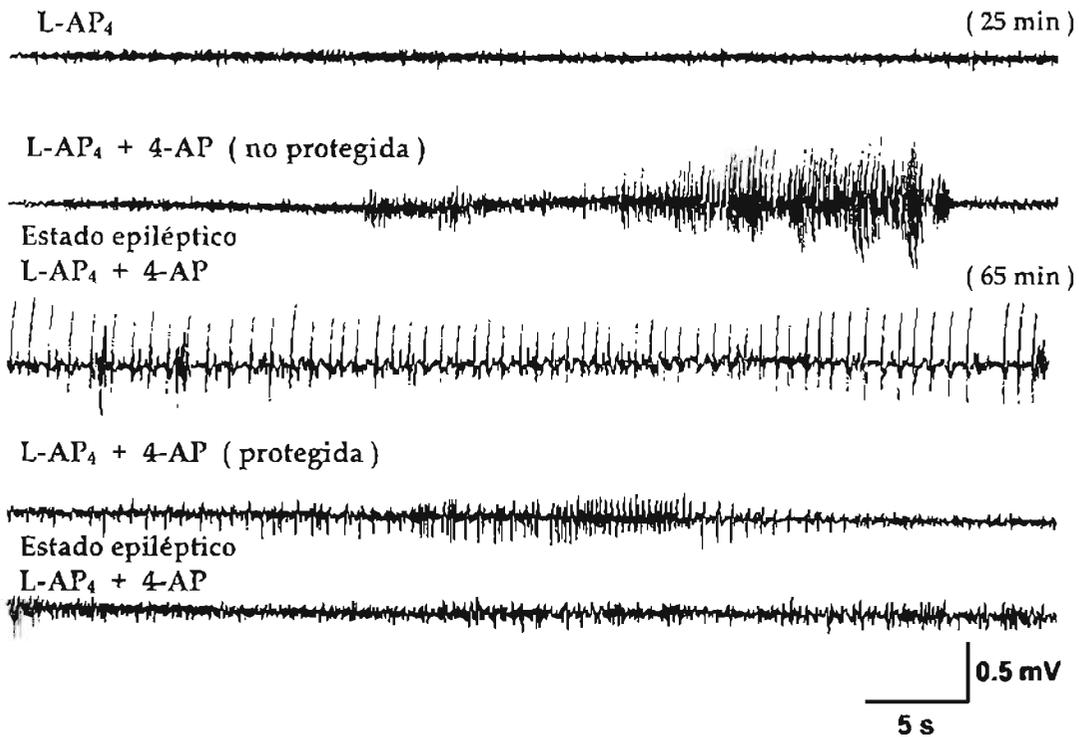


Figura 18. Trazos representativos en el EEG durante la perfusión del agonista L-AP<sub>4</sub> solo y de la combinación de L-AP<sub>4</sub> + 4-AP. Se muestra la disminución en la amplitud de las descargas epileptiformes tomadas a los 25 min después de iniciada la infusión de 4-AP y del estado epiléptico a los 65 min en las ratas no protegidas (n = 4). También se muestran los trazos de las ratas que se protegieron durante el estado epiléptico en los tiempos equivalentes (n = 7).

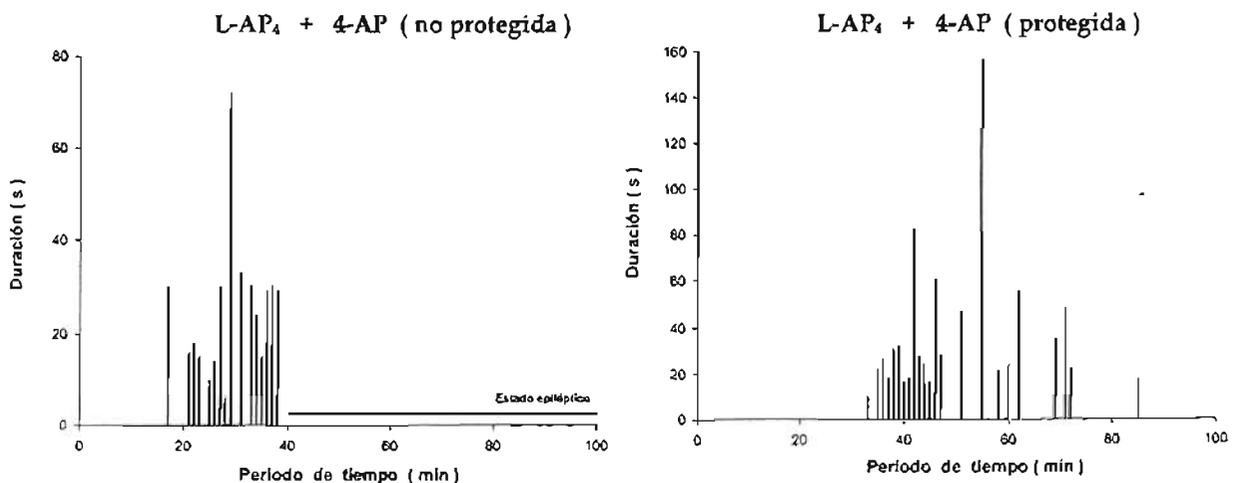


Figura 19. Ejemplos representativos del curso temporal de las crisis epileptiformes y la aparición del estado epiléptico (barra horizontal) en una rata no protegida durante el tratamiento con L-AP<sub>4</sub> + 4-AP (n = 4) y el curso temporal de las crisis epileptiformes de una rata protegida durante el estado epiléptico (n = 4). Cada barra representa una descarga de la duración señalada en las ordenadas, al periodo de tiempo indicado en las abscisas.

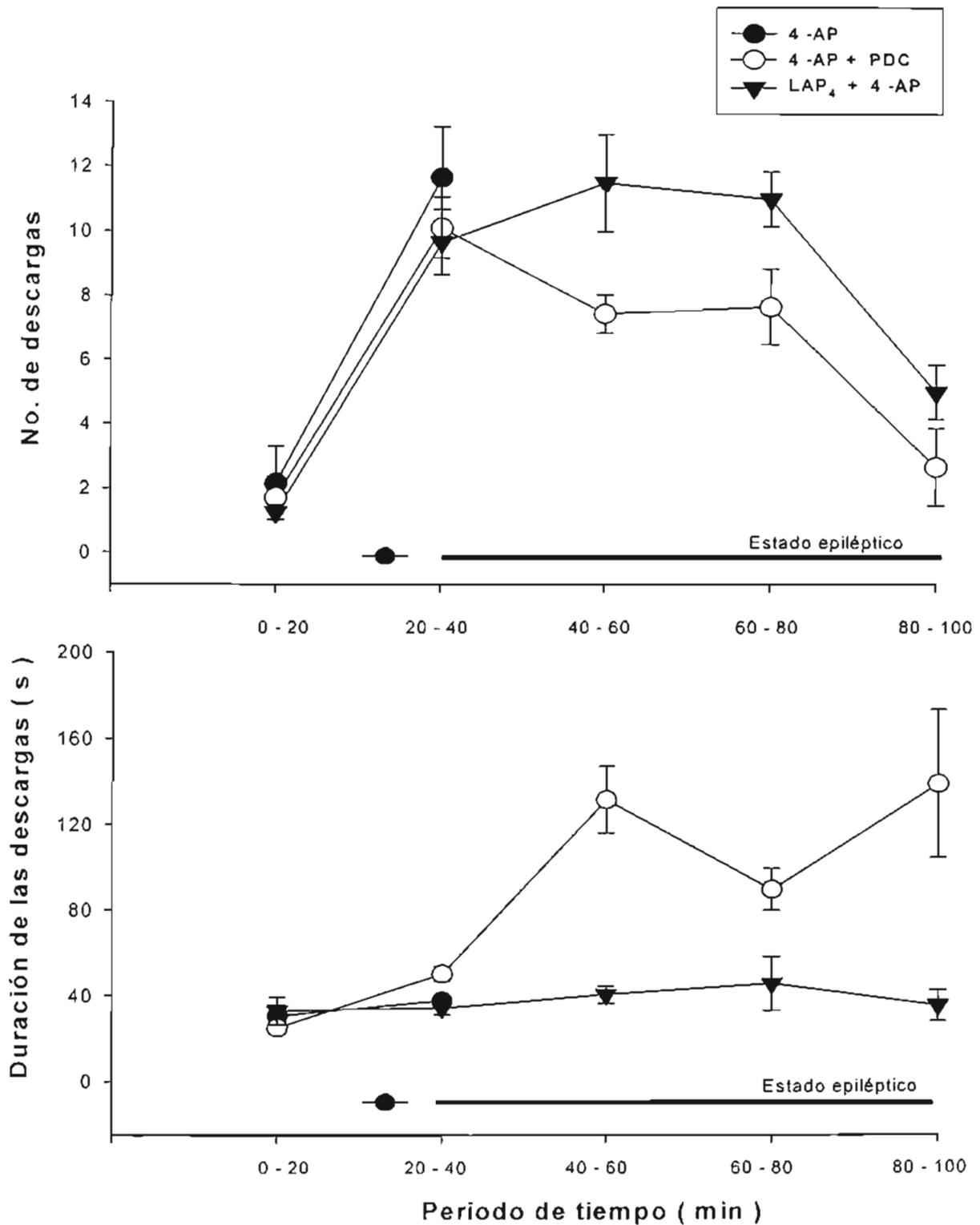


Figura 20. Número y duración de las descargas inducidas por la perfusión del agonista L-AP<sub>4</sub> + 4-AP en periodos de 20 min. La barra horizontal representa el tiempo de aparición y duración del estado epiléptico para el tratamiento con 4-AP sola.

- **Neurodegeneración**

La neurodegeneración producida por la 4-AP en animales despiertos se puede observar en la figura 3, así como también el efecto protector ejercido por el PDC (figura 4) perfundido durante nueve fracciones de microdiálisis. La cuantificación de estos resultados se presenta en la figura 27.

Las microfotografías de las figuras 22 y 24 muestran los cortes coronales de cerebro de ratas perfundidas durante nueve fracciones con los antagonistas solos, en ambos casos no hubo neurodegeneración, se pueden observar las células de la capa piramidal del hipocampo bien preservadas (ver los datos cuantitativos en la figura 21).

A pesar del alto nivel de glutamato alcanzado en el espacio extracelular durante el bloqueo de su transporte, tampoco hubo neurodegeneración en el tejido de la capa de células piramidales del hipocampo cuando se administró el PDC junto con los antagonistas (figura 22 y 24). El daño que puede apreciarse en el tejido es producto del daño mecánico; sólo las zonas más próximas al sitio lesionado son las que se encuentran dañadas (ver los datos cuantitativos en la figura 27).

Por otro lado, la perfusión de estos antagonistas no bloqueó el efecto neurotóxico de la 4-AP, ya que produjo la pérdida neuronal en CA1 y CA3. Esta neurodegeneración, fue similar a la observada con 4-AP sola, la cual se caracteriza por el adelgazamiento de la capa de neuronas piramidales como puede apreciarse en las figuras 23 y 25. En ambos tratamientos es muy notable el estrato piramidal destruido en el área de CA1 hasta el límite con CA2, el cual se encuentra bien preservado. La cuantificación del daño se muestra en la figura 27.

La administración del agonista específico L-AP<sub>4</sub> perfundido solo, al igual que los antagonistas, no produjo neurodegeneración, tal y como se muestra en la micrografía de la figura 26 y en la cuantificación del daño celular en la figura 21. Cuando se administró junto con la 4-AP se encontró claramente protección de la muerte neuronal, como se

puede ver en la figura 26, aún en los cuatro animales que presentaron el estado epiléptico (figura 27).

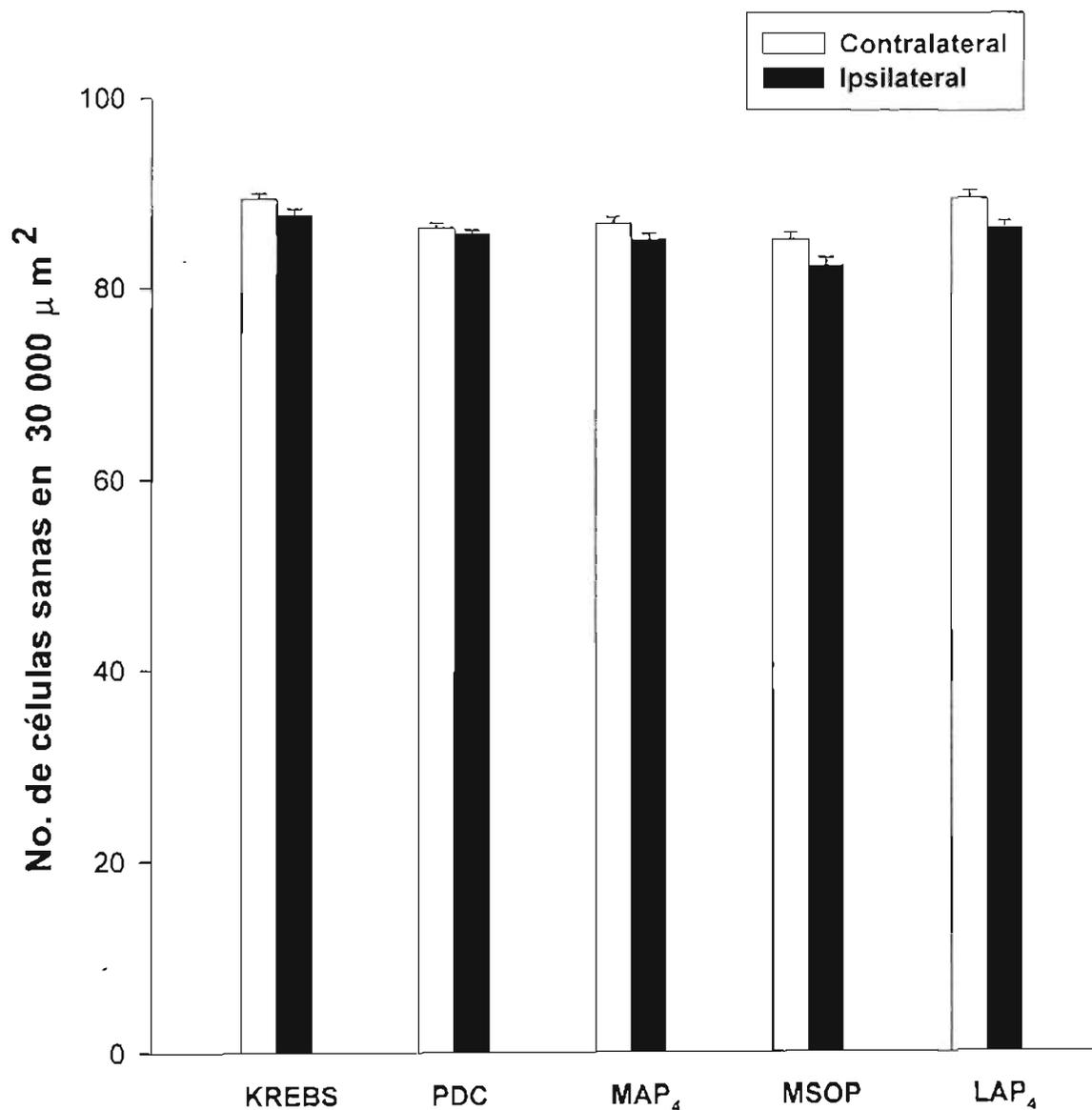
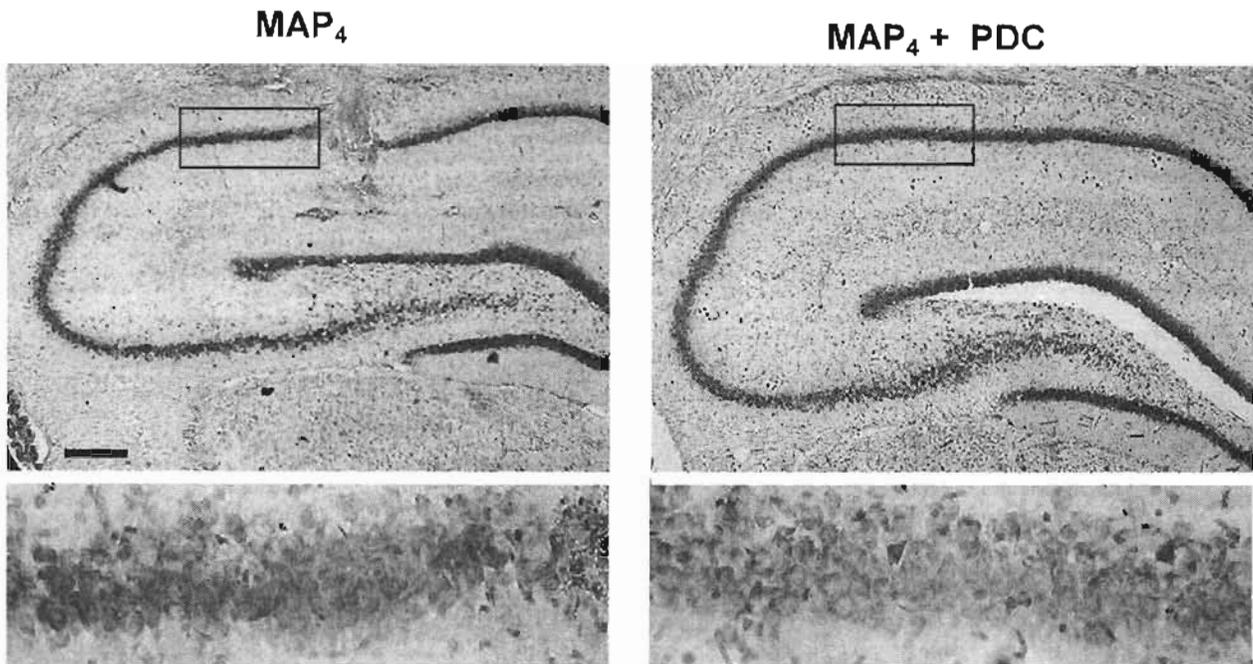
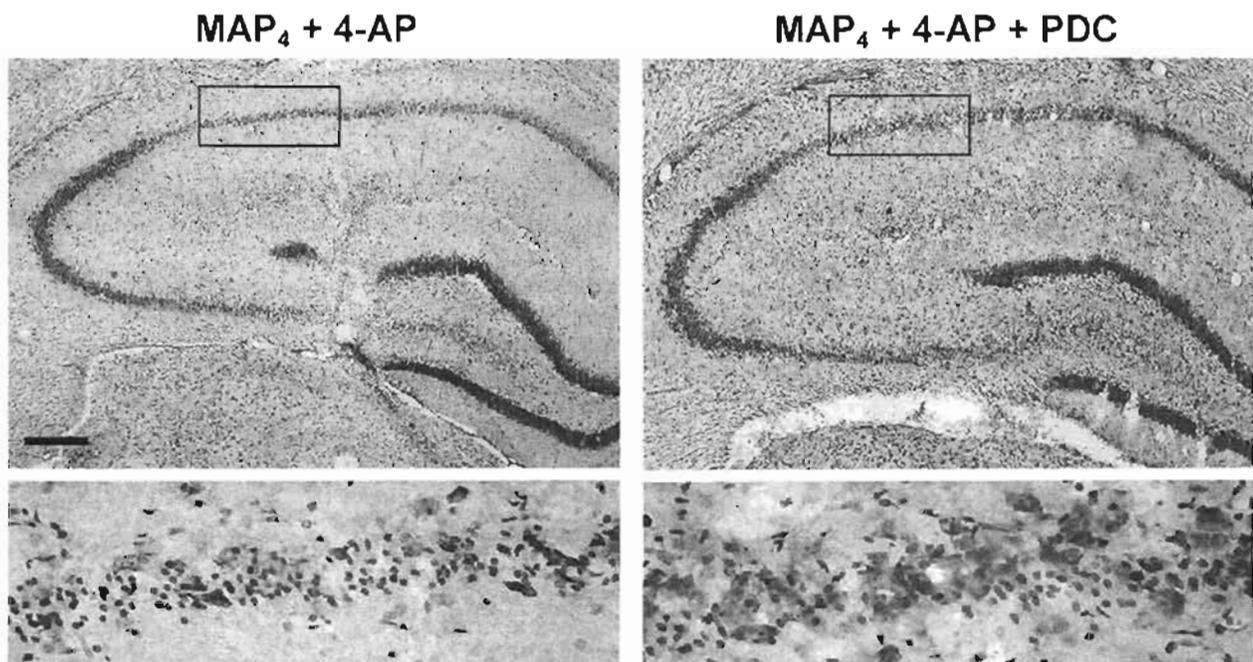


Figura 21. Cuantificación del número de células sanas en la región CA1 del hipocampo después de la perfusión de Krebs- Ringer, PDC solo, MAP<sub>4</sub> solo, MSOP solo y L-AP<sub>4</sub> solo. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de 3 cortes por rata de un total de tres ratas en cada uno de los tratamientos.



**Figura 22.** Micrografías representativas del efecto del antagonista  $MAP_4$  (lado izquierdo) en el hipocampo ipsilateral. Se muestra la región CA1 en donde se pueden observar las células piramidales completamente sanas. En el panel derecho se observa el efecto de  $MAP_4$  + PDC y solamente se observa el daño producido por el tracto de la cánula. La barra horizontal negra en las fotografías superiores corresponde a  $500\ \mu\text{m}$  y en la parte inferior se muestra en mayor aumento las áreas marcadas por el recuadro de la región profundida que corresponde a  $200\ \mu\text{m}$ .



**Figura 23.** Micrografías representativas del efecto del antagonista  $MAP_4$  + 4-AP (lado izquierdo) y  $MAP_4$  + 4-AP + PDC (lado derecho) en el hipocampo. Se muestra el daño neurotóxico en la región CA1 y CA3 de la capa de células piramidales. En la parte inferior se muestra en mayor aumento la región profundida en donde claramente se pueden observar los núcleos picnóticos indicando muerte celular. Ver escala de aumento en la figura anterior.

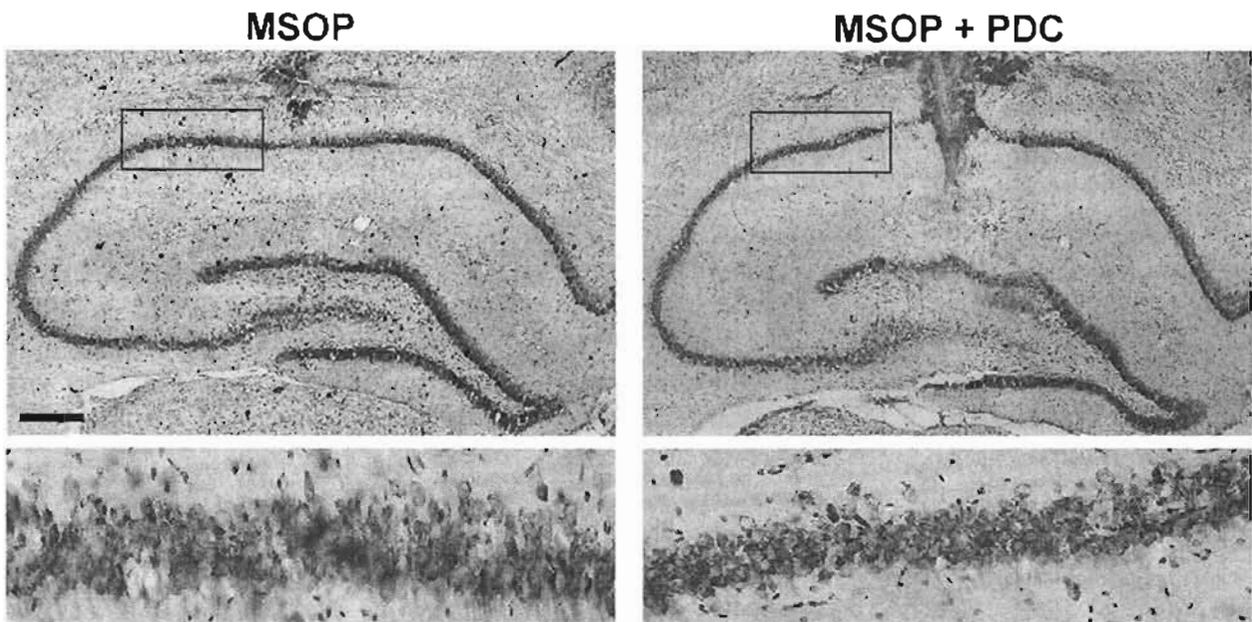


Figura 24. Micrografías representativas del efecto del antagonista MSOP (lado izquierdo) sobre el tejido del hipocampo ipsilateral. Se muestra la región CA1 en donde se puede observar la capa de células piramidales sanas. En el panel derecho se observa el efecto de MSOP + PDC en donde solamente se observa el daño producido por el tracto de la cánula. La barra horizontal negra en las fotografías superiores corresponde a 500  $\mu\text{m}$  y en la parte inferior se muestra en mayor aumento las áreas marcadas por el recuadro de la región profundida que corresponde a 200  $\mu\text{m}$ .

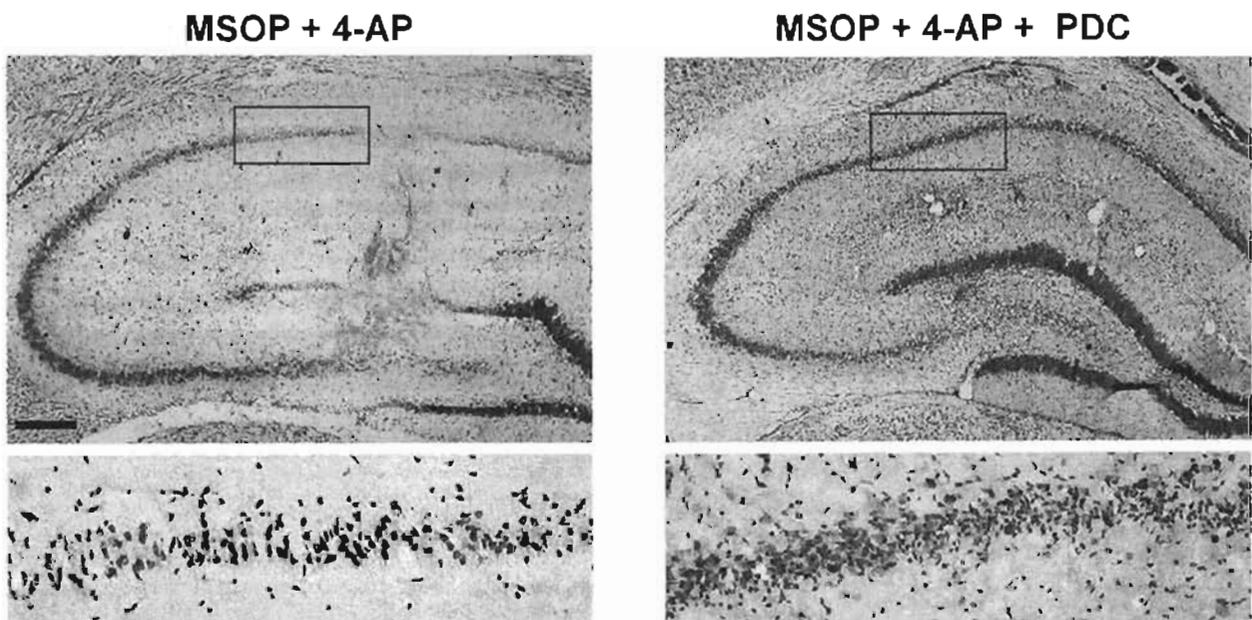


Figura 25. Micrografías representativas del efecto del antagonista MSOP + 4-AP (lado izquierdo) y MSOP + 4-AP + PDC (lado derecho) sobre el tejido del hipocampo ipsilateral. Se muestra el daño neurotóxico en la región CA1 y CA3 de la capa de células piramidales. En la parte inferior se muestra en mayor aumento la región profundida en donde claramente se puede observar los núcleos picnóticos indicando muerte celular. La barra horizontal negra en las fotografías superiores corresponde a 500  $\mu\text{m}$  y en la parte inferior se muestra en mayor aumento las áreas marcadas por el recuadro de la región profundida que corresponde a 200  $\mu\text{m}$ .

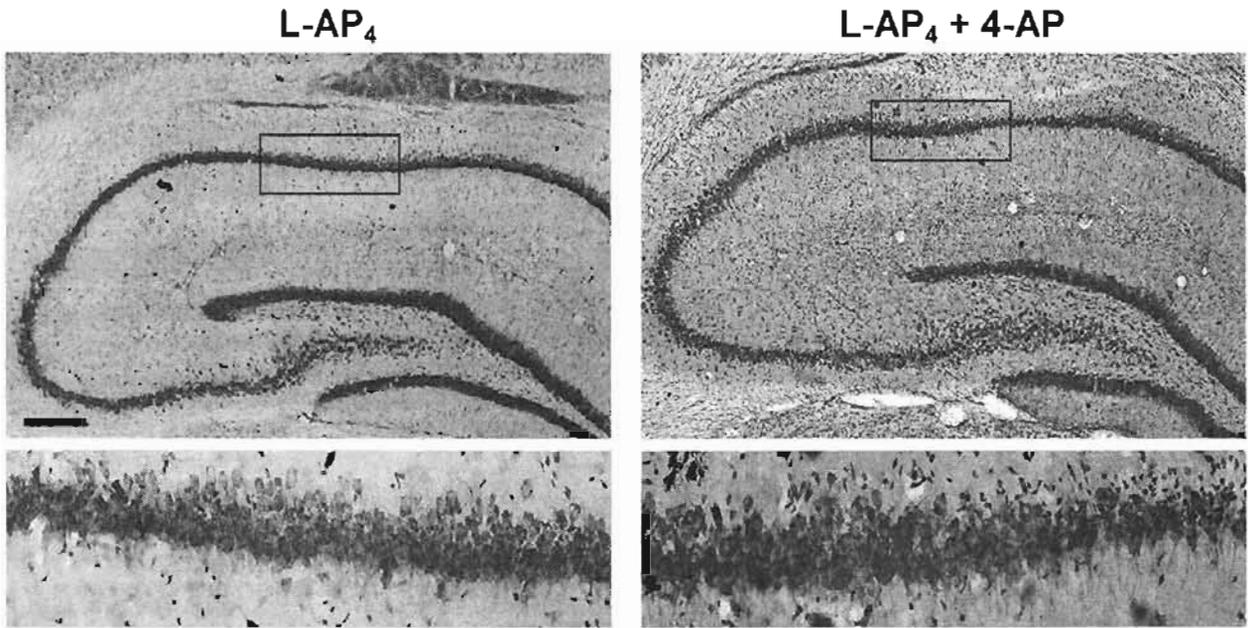


Figura 26. Micrografías representativas del efecto del agonista L-AP<sub>4</sub> (lado izquierdo) sobre el tejido del hipocampo ipsilateral. Se muestra en mayor aumento (parte inferior) la región CA1 en donde se puede observar la capa de células piramidales sanas. En el panel derecho se observa el efecto protector del L-AP<sub>4</sub> contra la neurodegeneración producida por la 4-AP en una rata que presentó estado epiléptico.

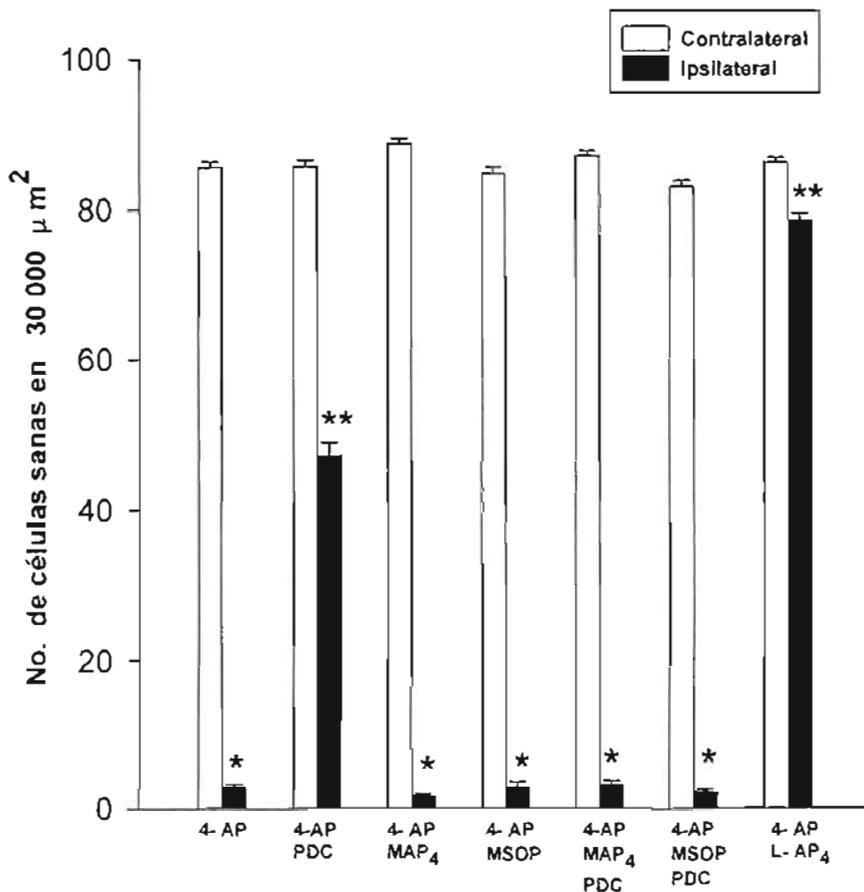


Figura 27. Cuantificación de la neurodegeneración de la región CA1 del hipocampo producida por la 4-AP sola y en combinación con los antagonistas de los mGluR III más PDC. También se muestra la protección ejercida por el tratamiento con el agonista L-AP<sub>4</sub> y con el tratamiento con PDC (9 fracc). Los datos son el promedio ± E.S. de 3 cortes por rata de un total de tres ratas para cada grupo experimental. \* < 0.05 con respecto a las basales de Krebs y \*\* < 0.05 con respecto a la 4-AP.

## VIII. DISCUSIÓN

Mediante la combinación de estudios neuroquímicos, electroencefalográficos e histológicos, se ha estudiado la fuerte correlación que existe entre un incremento en la concentración extracelular de glutamato con la inducción de epilepsia y la neurodegeneración. Como ya se ha mostrado previamente, la perfusión por microdiálisis de 4-AP en el hipocampo es capaz de provocar la liberación de glutamato e inducir crisis epileptiformes y muerte neuronal a dosis de 17.5 mM o mayores, en ratas anestesiadas (Peña y Tapia, 1999, 2000; Ayala y Tapia, 2003). En animales en libre movimiento, se han visto los mismos efectos de neurotoxicidad pero, a una dosis mucho menor (7mM). Bajo estas condiciones, es decir, con la rata despierta, hemos encontrado que el efecto tóxico de la 4-AP utilizando dosis mayores, es demasiado intenso, como se describió anteriormente (Vera, 2004).

Esta notable diferencia en el efecto de las dosis utilizadas sugiere que el halotano utilizado como anestésico bloquea la inducción de las crisis epileptiformes. Diversos trabajos realizados sobre el mecanismo de acción de varios anestésicos como la ketamina, isoflurano y el propio halotano revelan que su efecto se debe a una disminución en la transmisión sináptica excitadora, ya que disminuyen las espigas de neuronas de la región CA1 del hipocampo (Wakasugi et al., 1999). También se ha mostrado que el halotano bloquea la transmisión sináptica excitatoria a través de diversos efectos alostéricos en el mecanismo de activación del canal iónico del receptor tipo NMDA y en el sitio de unión al glutamato (Martín et al., 1995). Otro dato importante que demuestra que el halotano ejerce una acción inhibitoria sobre el receptor NMDA, es el obtenido por Ramírez-Munguía y colaboradores (2003), en el cual la anestesia con halotano interfirió en el desarrollo de las crisis epileptiformes producidas por la perfusión del ácido okadaico en experimentos de microdiálisis con ratas anestesiadas, aún cuando muy probablemente el receptor se encuentra hiperfosforilado por la acción de esta droga, que es un inhibidor de fosfatasa de proteínas. A diferencia de las ratas despiertas, las cuales si desarrollaron crisis epileptiformes. Con estos

estudios se demuestra que el halotano bloquea la acción del receptor NMDA, por lo que a dosis bajas de 4-AP en animales despiertos, los efectos tóxicos son más potentes comparados con los de animales anestesiados.

Por otro lado, también se ha demostrado que no es suficiente provocar la acumulación extracelular de glutamato para producir neurotoxicidad. En trabajos previos se ha demostrado que el incrementar los niveles extracelulares, *in vivo*, por inhibición de su recaptura no es suficiente para la inducción de epilepsia (Obrenovitch et al., 1996) o neurodegeneración (Massieu et al., 1995; Massieu y Tapia, 1997; Corona y Tapia, 2004). Por microdiálisis en animales en libre movimiento, la inhibición de la recaptura de glutamato con PDC a una concentración de 50 mM durante cinco fracciones de microdiálisis, no induce epilepsia ni muerte neuronal, a pesar de que se produce un aumento importante en la concentración extracelular de glutamato, entre 20 y 25 veces sobre sus niveles basales (Vera, 2004).

Lo anterior apoya la hipótesis de que para que exista neurotoxicidad por causa del glutamato endógeno, es necesario que éste sea de origen sináptico, como se ha demostrado en trabajos en los cuales la estimulación de la liberación del glutamato por la 4-AP es inhibida por la aplicación de una toxina específica que bloquea los canales de sodio sensibles a voltaje, la TTX, o por la  $\omega$ -conotoxina GVIA, que bloquea los canales de calcio tipo N, y que también reduce la liberación de glutamato (Peña y Tapia, 2000). La apertura de los canales de sodio y los canales de calcio tipo N, es esencial para inducir la liberación de los neurotransmisores en las terminales nerviosas, por lo cual se ha hipotetizado que aquella liberación bloqueada por antagonistas de estos canales es de origen neuronal y proviene principalmente de terminales nerviosas (Lada et al., 1998). Estos bloqueadores y especialmente la TTX, protegen eficazmente contra la epilepsia y la neurodegeneración producida por la 4-AP, al igual que los antagonistas del receptor NMDA (Peña y Tapia, 2000), lo que confirma que el exceso de liberación de glutamato desde la terminales sinápticas es la causa de la excitotoxicidad de la 4-AP.

En otros estudios la aplicación por microdiálisis de alto potasio (50 mM) o tetraetilamonio (TEA), los cuales producen un importante aumento en la concentración de glutamato extracelular, no inducen efectos tóxicos. Esto se debe a que a diferencia de la 4-AP, el glutamato liberado por estos fármacos no proviene en su totalidad de las terminales nerviosas y por lo tanto es ineficaz en la generación de epilepsia y daño neuronal, pues su liberación no es en su mayoría en el espacio sináptico y la probabilidad de alcanzar los receptores glutamatérgicos es muy baja (Peña y Tapia, 1999). Esta interpretación es la que puede explicar la ausencia de toxicidad del incremento en el glutamato extracelular inducido por la inhibición de su transporte por el PDC.

En los últimos años se ha descrito que en la región del hipocampo, el aumento en la concentración de glutamato extracelular por inhibición de su recaptura, puede activar al grupo de receptores metabotrópicos de glutamato (Oliet, 2001) dando como resultado la inhibición de la transmisión sináptica excitatoria (Scanziani et al., 1997). A finales de década de 1970 y principios de 1980 comenzaron las evidencias de que la liberación del glutamato también podía ser regulado por la vía de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Cotman y su grupo (1979, 1982) fueron de los primeros en encontrar que el L-AP<sub>4</sub> inhibe la transmisión excitatoria en la formación hipocampal, al igual que Watkins y colaboradores (1982) quienes describieron que este mismo agonista reduce las respuestas excitatorias en la médula espinal. En estos trabajos se muestra claramente que el efecto del L-AP<sub>4</sub> no es mediado por los receptores AMPA, kainato o NMDA, sino, por lo que estos autores describieron como un nuevo subtipo de receptor que opera por un mecanismo distinto que no es mediante un canal.

A mediados de 1980 se publica la evidencia directa de la existencia de receptores a glutamato acoplados a sistemas de producción de segundos mensajeros vía proteínas G (Sladeczek et al., 1985) y más tarde Nicoletti y su grupo obtuvieron resultados similares en rebanadas de hipocampo y en células granulares del cerebelo (1986). Finalmente Sugiyama et al., (1987) demuestra la expresión del mRNA en ovocitos de *Xenopus* de los

mGluR y se determina la existencia de un nuevo receptor de glutamato acoplado a la activación de la hidrólisis de fosfoinosítidos en el cerebro de rata. Posteriormente, con la ayuda del primer agonista sintetizado, el trans -1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxilato (trans-ACPD) (Curry et al., 1988) se pudo demostrar algunas de las acciones fisiológicas de la activación del grupo de receptores metabotrópicos a glutamato. Estudios subsecuentes utilizando este compuesto como agonista selectivo, revelaron diversos efectos moduladores, como la inhibición del post potencial hiperpolarizante (AHP) y la inhibición de la transmisión sináptica tanto excitatoria como inhibitoria en las neuronas del hipocampo (Conn, 2003). Posteriormente estos efectos fueron asociados con la activación de otras vías acopladas a proteínas G (Conn y Pin, 1997) y de aquí su clasificación en tres grandes grupos. (Pin y Duvoisin, 1995).

En la actualidad se ha visto que uno de los efectos fisiológicos de los receptores metabotrópicos a glutamato es precisamente el de generar la reducción de la transmisión sináptica excitatoria por medio de sus receptores situados a nivel presináptico (Schoepp, 2001). Como se mencionó en la introducción, existen tres grupos de este tipo de receptores de los cuales el grupo III, el cual se encuentra acoplado negativamente a la adenilato ciclasa, es el que podría estar jugando un papel muy importante como autorreceptor e inhibir la liberación de glutamato, ya que se sabe que su localización es presináptica (Bradley et al., 1996) y muy cercana a los sitios de liberación de neurotransmisores (Cartmel y Schoepp, 2000).

En estudios realizados por Baskys y Malenka (1991), se describe que el principal activador conocido para este grupo, el L-AP<sub>4</sub>, induce la inhibición de la transmisión sináptica de glutamato en rebanadas de hipocampo. Gereau y colaboradores (1996) determinaron que el grupo III actúa como autorreceptor en la vía lateral perforante y en la vía colateral de Schaffer, reduciendo la transmisión sináptica de glutamato en rebanadas de hipocampo. A su vez Vázquez y Sánchez-Prieto (1997), en un estudio con sinaptosomas corticales describen que el L-AP<sub>4</sub> reduce la liberación de glutamato estimulado con alto potasio, al igual que en terminales nerviosas de hipocampo

estimuladas con 4-AP (Rodríguez-Moreno et al., 1998). También se ha visto que este mismo compuesto induce una marcada reducción en la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias en las células piramidales de la región CA1 del hipocampo (Gereau et al., 1995).

Lo anterior sugiere que los receptores metabotrópicos del grupo III son los responsables de la inhibición de la liberación de glutamato y por lo tanto de la protección contra la muerte por excitotoxicidad inducidas por la 4-AP. El objetivo de este trabajo fue probar esta hipótesis mediante el uso de antagonistas y un agonista de estos receptores en el modelo experimental de la perfusión hipocampal de la 4-AP y determinar el posible efecto de los mGluR III como mediadores en la actividad sináptica excitatoria.

Se utilizaron dos diferentes antagonistas, debido a que el MAP<sub>4</sub> aunque es uno de los más específicos, se sabe que bajo ciertas condiciones experimentales también puede tener acción como agonista del grupo II, por lo que se decidió buscar un compuesto que fuera más específico y que no tuviera acción en los otros grupos de receptores, lo cual ocurrió con el MSOP (Pin y Acher, 2002). En cuanto al agonista L-AP<sub>4</sub>, hasta el día de hoy es el compuesto que presenta mayor especificidad por el grupo III y tomando en cuenta los resultados obtenidos, no fue necesaria la utilización de otro agonista.

La perfusión de los antagonistas MAP<sub>4</sub> y MSOP, en presencia del estímulo excitotóxico con 4-AP, no solo revirtieron el efecto protector producido por el aumento en la concentración extracelular de glutamato generado por el PDC, sino que además potenciaron las crisis epileptiformes, como lo demuestran las figuras 12, 14, 16 y 17.

De estos resultados se puede concluir que el bloqueo de los mGluR presinápticos del grupo III tiene una participación importante en el mecanismo del control de la liberación de glutamato en condiciones de hiperexcitabilidad. Esta conclusión fue confirmada al utilizar el agonista específico, L-AP<sub>4</sub>, el cual al activar directamente a estos receptores fue capaz de disminuir la concentración de glutamato extracelular muy por debajo de sus niveles basales, casi llegando a cero. Hasta donde sabemos, este es el primer

hallazgo de disminución de la concentración extracelular de glutamato en un modelo experimental *in vivo*, con agonistas de los mGluR.

Esta importante disminución en el glutamato extracelular logró proteger a la mitad de los animales de la inducción del estado epiléptico e incluso hubo animales que ni siquiera mostraron crisis, como se observa en las figuras 18, 19 y 20.

Algo que llama mucho la atención dentro de estos experimentos es la concentración tan elevada utilizada de L-AP<sub>4</sub>. Como se mencionó en los resultados, se probaron varias dosis del agonista y las dosis bajas no tuvieron efecto protector contra el estado epiléptico (datos no mostrados), en cambio, las dosis de 50 y 100 mM, protegieron significativamente contra las crisis epileptiformes y la neurodegeneración, además de que fue muy clara la disminución de glutamato (Figuras 10, 20 y 27).

En la tabla 1 se muestran los subtipos de cada grupo de mGluRs. Dentro del Grupo III se han reportado cuatro subtipos : mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Los mGluR6 son solamente expresados en retina y los tres restantes tienen su localización en varias regiones del cerebro, por ejemplo, los mGluR4 tienen mayor distribución en el cerebelo y los mGluR8 en el bulbo olfatorio, aunque ambos están presentes en el hipocampo, se ha reportado que es con muy baja expresión (Schoepp, 2001). Los mGluR7 tienen mayor presencia en el hipocampo y en terminales presinápticas en sitios activos, pero la afinidad que presenta tanto por el glutamato como por el L-AP<sub>4</sub> es muy baja comparada con los demás subtipos de receptores del mismo grupo (ver tabla 1), por lo que para estos experimentos requerimos mayor concentración del compuesto y además como se mencionó en el método, la eficiencia de la cánula de microdiálisis es alrededor de un 10%, por lo que en realidad el agonista se perfundió a una concentración de 10 mM, dosis que sigue pareciendo muy alta, pero no hay que olvidar que los experimentos fueron realizados *in vivo* con animales despiertos.

Como se mencionó en los antecedentes, existen múltiples estudios que muestran que el glutamato participa en la generación de crisis epilépticas. La evidencia más contundente

que lo demuestra es, sin duda, el resultado obtenido con la aplicación de antagonistas para los diferentes receptores ionotrópicos tanto del tipo NMDA como del tipo no-NMDA, los cuales previenen contra las crisis epileptiformes inducidas por la 4-AP *in vivo* (Fragoso-Veloz y Tapia, 1992; Morales-Villagran et al., 1996) e *in vitro* (Perrault y Avolí, 1991). Sin embargo, el uso clínico de estos fármacos no resulta ser del todo satisfactoria, ya que producen casi en su totalidad la inhibición de la transmisión sináptica excitadora rápida, y con ello una gran cantidad de efectos secundarios como sedación, ataxia, pérdida o ganancia de peso o dan lugar a algún tipo de anemia (Luján, 2005). Por este motivo la utilización de los mGluR podría desempeñar un papel central en el control de la epilepsia.

Aunque no existe ningún agonista o antagonista de los mGluR en uso clínico para la disminución de ataques epilépticos, los modelos animales de epilepsia resaltan su gran potencial. Ya está comprobado que los agonistas de los receptores mGluR I son convulsivantes y sus antagonistas son efectivos anticonvulsivos (Tizzano, et al., 1995). Por su parte, los agonistas de los receptores mGluR II y III tienen actividad anticonvulsivante (Moldrich et al., 2001; Gasparini et al., 1999), por lo que los mGluRs podrían ser utilizados con fines terapéuticos en la patología de la epilepsia. A este respecto, en pacientes con epilepsia crónica del lóbulo temporal se ha descrito la disminución en la expresión de los mGluR II y III localizados en terminales presinápticas de la capa molecular del hipocampo (Tang y Lee, 2001), así como el incremento en la expresión de los mGluR I, lo cual podría facilitar el aumento en la excitabilidad glutamatérgica (Tang et al., 2001c). Estos datos sugieren que existe una fuerte participación de los mGluR en condiciones patológicas.

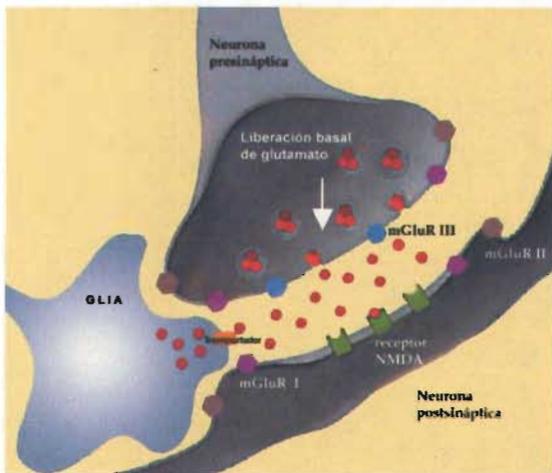
Lo anterior indica que los mGluR podrían ser los nuevos blancos moleculares para las enfermedades que involucran aumento o disminución de la neurotransmisión glutamatérgica, como en el caso de la epilepsia. Sin embargo, aún falta disponer de fármacos de alta potencia y selectividad que amplíen el conocimiento de los mGluRs.

En cuanto a la muerte neuronal en el hipocampo producida por el aumento de la estimulación de la liberación de glutamato endógeno ha sido descrita en el trabajo de Peña y Tapia (1999, 2000), en donde se demostró que el glutamato es determinante en la neurodegeneración producida por 4-AP, ya que en las concentraciones en las cuales se detecta acumulación de glutamato extracelular, se produce una intensa neurodegeneración en el hipocampo, misma que resultó ser dependiente de la dosis y los antagonistas como el MK-801 y el CPP tienen una notable neuroprotección (Peña y Tapia, 2000; Ayala y Tapia, 2003).

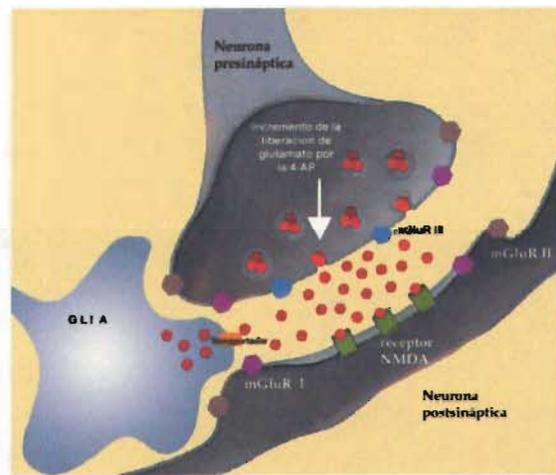
En ese sentido, en el presente trabajo, se pudo demostrar que activando los mGluR III se protege contra la muerte por excitotoxicidad glutamatérgica y bloqueando estos receptores se produce el efecto contrario, lo cual confirma el papel tan importante que juegan estos receptores en el mecanismo de protección contra la muerte y una vez más la fuerte relación existente entre el incremento en la concentración extracelular de glutamato con la inducción de epilepsia y la neurodegeneración.

Pocos estudios se han centrado en investigar la correlación entre los ligandos de los mGluRs y la neuroprotección. Tizzano y su grupo (1995) han enfatizado la neurodegeneración vista después de la inyección intracerebral a dosis convulsivantes de agonistas del grupo I, al igual que Camón et al (1998) quienes muestran que dosis proconvulsivantes del agonista DHPG induce pérdida neuronal severa en la región CA1 y CA3 del hipocampo, toxicidad que es comparable a la inducida por kainato (Camón, et al., 2001). Sin embargo, ellos no utilizan antagonistas del grupo II o III para prevenir las crisis epilépticas y la pérdida neuronal. Otros estudios, por su parte, si han reportado neuroprotección tanto *in vivo* como *in vitro*, utilizando justamente antagonistas del grupo I y agonistas del grupo II y III (Movsesyan et al., 2001; Gasparini et al., 1999; D'Onofrio et al., 2001), pero nunca haciendo una clara relación entre glutamato, epilepsia y muerte neuronal, tal y como se reporta en el presente trabajo.

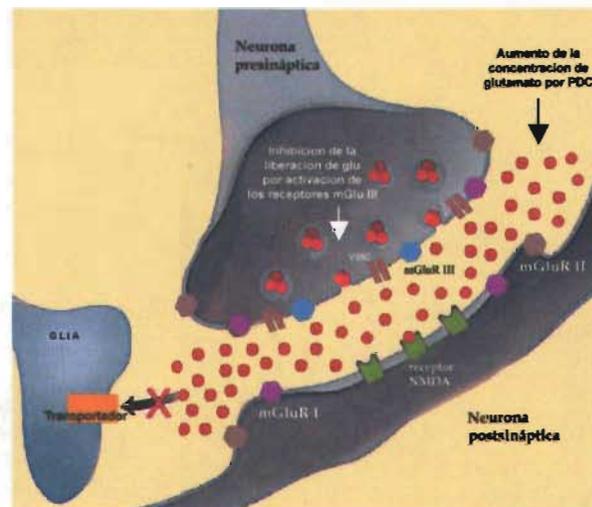
A continuación se describe de manera esquemática la interpretación de los resultados encontrados en el presente trabajo.



**Figura 28.** Liberación basal de glutamato en una terminal sináptica glutamatérgica.



**Figura 29.** Sobreactivación del receptor NMDA por aumento en la liberación de glutamato inducido por la 4-AP en una terminal sináptica glutamatérgica.



**Figura 30.** Activación de los receptores presinápticos metabotrópicos del grupo III debido a la inhibición de la recaptura de glutamato por PDC.

En la figura 28 se representa la liberación basal, en condiciones normales de glutamato endógeno, el cual después de liberado activa el receptor del tipo NMDA y posteriormente es removido de la hendidura sináptica por medio de sus transportadores.

En la figura 29 se esquematiza el aumento en el glutamato extracelular endógeno liberado de la presinapsis producido por la 4-AP. En este caso se produce la activación de los receptores del tipo NMDA lo suficiente como para generar crisis epileptiformes y muerte neuronal.

En la figura 30 se muestra que cuando la concentración de glutamato extracelular aumenta en el espacio sináptico por inhibición de su recaptura, con PDC, no se producen ni crisis ni daño neuronal. Este glutamato liberado en exceso de otras regiones cerebrales, es capaz de activar receptores presinápticos del tipo metabotrópicos del grupo III, los cuales se encuentran localizados en sitios muy cercanos a la liberación de glutamato. El resultado de su activación es la inhibición de la liberación de glutamato y este es uno de los mecanismos de protección que se encienden en la vía de señalización de los receptores mGluR para contrarrestar la excitotoxicidad glutamatérgica.

## IX. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de la liberación de glutamato en nuestro modelo experimental con 4-AP en el presente trabajo podemos concluir que la activación de los mGluR III presinápticos juegan un papel importante en la regulación de la excitotoxicidad provocada por el glutamato endógeno liberado por la 4-AP, ya que el agonista específico logró proteger contra el daño excitotóxico, mientras que los antagonistas potenciaron los efectos.

## X. PERSPECTIVAS

Los grandes avances de la biología molecular que han proporcionado la identificación de los ocho subtipos de mGluRs, junto con el conocimiento detallado de su estructura, localización celular y subcelular, han sido de gran ayuda para entender el funcionamiento de estos receptores. Sin embargo, no se conocen con detalle los mecanismos de señalización en condiciones fisiológicas y mucho menos en condiciones patológicas. En el caso de los mGluR II y III, de los cuales se sabe que al activarse

En la figura 29 se esquematiza el aumento en el glutamato extracelular endógeno liberado de la presinapsis producido por la 4-AP. En este caso se produce la activación de los receptores del tipo NMDA lo suficiente como para generar crisis epileptiformes y muerte neuronal.

En la figura 30 se muestra que cuando la concentración de glutamato extracelular aumenta en el espacio sináptico por inhibición de su recaptura, con PDC, no se producen ni crisis ni daño neuronal. Este glutamato liberado en exceso de otras regiones cerebrales, es capaz de activar receptores presinápticos del tipo metabotrópicos del grupo III, los cuales se encuentran localizados en sitios muy cercanos a la liberación de glutamato. El resultado de su activación es la inhibición de la liberación de glutamato y este es uno de los mecanismos de protección que se encienden en la vía de señalización de los receptores mGluR para contrarrestar la excitotoxicidad glutamatérgica.

## IX. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de la liberación de glutamato en nuestro modelo experimental con 4 -AP en el presente trabajo podemos concluir que la activación de los mGluR III presinápticos juegan un papel importante en la regulación de la excitotoxicidad provocada por el glutamato endógeno liberado por la 4 -AP, ya que el agonista específico logró proteger contra el daño excitotóxico, mientras que los antagonistas potenciaron los efectos.

## X. PERSPECTIVAS

Los grandes avances de la biología molecular que han proporcionado la identificación de los ocho subtipos de mGluRs, junto con el conocimiento detallado de su estructura, localización celular y subcelular, han sido de gran ayuda para entender el funcionamiento de estos receptores. Sin embargo, no se conocen con detalle los mecanismos de señalización en condiciones fisiológicas y mucho menos en condiciones patológicas. En el caso de los mGluR II y III, de los cuales se sabe que al activarse

inhiben la enzima adenilato ciclasa dando lugar a la disminución de la formación del cAMP y por lo tanto a la reducción de la actividad de la proteína cinasa A (PKA), no se conoce el mecanismo exacto por el cual pueden reducir la liberación de glutamato. Hay evidencias que sugieren que este efecto se debe a la inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje en las terminales sinápticas (Millán et al., 2002; Rusacov et al., 2004), por lo que son necesarios otros estudios para conocer si la inhibición de la liberación de glutamato por activación de los mGluR III involucra un bloqueo en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Estos resultados podrían sentar las bases para la comprensión de la patogénesis en los procesos de varias enfermedades neurológicas y se abriría otra potencial estrategia terapéutica. De aquí la importancia por conocer con mayor profundidad los mecanismos moleculares que regulan la señalización de este grupo de receptores metabotrópicos.

## XI. REFERENCIAS

- Allen JW, Ivanova SA, Fan L, Espey MG, Basile AS, Faden AI (1999) Group II metabotropic receptor activation attenuates traumatic neuronal injury and improves neurological recovery after traumatic brain injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290:112-120.
- Arias C, Montiel T, Peña F, Ferrera P, Tapia R. (2002) Okadaic acid induces epileptic seizures and hyperphosphorylation of the NR2B subunit the NMDA receptor in rat hippocampus in vivo. *Exp. Neurol.* 177:284-291.
- Arvanov VL, Holmes KH, Keele NB and Shinnick-Gallagher P (1995) The functional role of metabotropic glutamate receptors in epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the rat amigdala slice. *Brain Res.* 669: 40-144.
- Ayala X, Tapia R (2003) Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus in vivo. *Neuropharmacology.* 45:649-660.
- Baskys A, Malenka R.C (1991) Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol.* 444:687-701.
- Beal MF (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 23:298-304.
- Bittigau P, Ikonomidou C (1977) Glutamate in neurologic diseases. *J. Child. Neurol.* 12:471-485.
- Blake JF, Brown MW, Collingridge GL (1988) A quantitative study of the actions of excitatory amino acid and antagonists in rat hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 95:291-299.
- Bordi F y Ugolini A (1999) Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Prog. Neurobiol.* 59:55-79.
- Bradley SR, Levey AI, Hersch SM, Conn PJ (1996) Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* 16:2044-2056.
- Brailowski S., Hirsch E y Marescaux C (1997) Epilepsia, aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. Ediciones del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Departamento de Publicaciones Científicas Cap VI.
- Brailowsky, S. (1999) Epilepsia. Fondo de Cultura Económica. México.
- Bräuner-Osborne H, Egebjerg J, Nielsen EQ, Madsen U and Krosgaard-Larsen P (2000) Ligands for glutamate receptors: Design and therapeutic prospects. *J. Med. Chem.* 43:2609-2645.
- Bushell TJ, Jane DE, Watkins JC, Davies CH, Garthwaite J, Collingridge GL (1996) Antagonism of the synaptic depressant actions of L-AP4 in the lateral perforant path by MAP4. *Neuropharmacology.* 34:239-241.
- Camón L, De Vera N and Martínez E (2001) Polyamine metabolism and glutamate receptor agonist-mediated excitotoxicity in the rat brain. *J. Neurosci. Res.* 66:1101-1111.

- Camón L, Vives P, De Vera N and Martínez E (1998) Seizures and neuronal damage induced in the rat by activation of group I metabotropic glutamate receptors with their selective agonista 3,5-dihydroxyphenylglycine. *J. Neurosci. Res.* 51:339-348.
- Carlson H, Ronne-Engstrom E, Ungerstedt U and Hillered L (1992) Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy. *Neurosci. Lett.* 140:30-32.
- Cartmell J, Schoepp DD (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 75:889-907.
- Chapman AG, Nanan K, Williams M and Meldrum BS (2000) Anticonvulsivant activity of two metabotropic glutamate group I antagonists selective for the mGlu5 receptor: 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), and (E)-6-methyl-2-styryl-pyridine (SIB 1893) *Neuropharmacology.* 39:1567-1574.
- Choi DW, Ko JY and Peters S (1988) Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J. Neurosci.* 8:185-196.
- Conn PJ (2003) Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1003:12-21.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:205-237.
- Corona JC y Tapia R (2004) AMPA receptor activation, but no accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in spinal cord *in vivo*. *J. Neurochem.* 89:988-997.
- Corsellis JA and Burton CJ (1983) Neuropathology of status epilepticus in humans. *Adv. Neurol.* 34:129-139.
- Cotman CW and Koerner JF (1982) Response of Schaffer collateral-CA1 cell synapses of the hippocampus to analogues of acidic amino acids. *Brain Res.* 251:105-115.
- Cotman CW, White WF and Nadler JV (1979) The effect of acidic amino acids antagonists on synaptic transmission in the hippocampal formation *in vitro*. *Brain Res.* 164:177-194.
- Coyle JT and Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 262:689-695.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:327-335.
- Curry K, Peet MJ, Magnuson DS and McLennan H (1988) Synthesis, resolution and absolute configuration of the isomers of the neuronal excitant 1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic acid. *J. Med. Chem.* 31:864-867.
- Curtis DR, Phillis JW and Watkins JC (1959) Chemical excitation of spinal neurones. *Nature.* 183:611-612.
- D'Onofrio M, Cuomo L, Battaglia G, Ngomba RT, Storto M, Kingston AE, Orzi F, De Blassi A, Di Lorio P, Nicoletti F and Bruno V (2001) Neuroprotection mediated by glial group II metabotropic glutamate receptors requires the activation of the Map kinase and the phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *J. Neurochem.* 78:435-445.

- Danbolt NC (2000) Handbook of chemical neuroanatomy. Elsevier Vol 18. Glutamate. Cap. 8
- Dennis W (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7:369-379.
- Dingledine R, Bennett JA (1994) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron.* 14:373-384.
- Feria A, Martínez de Muñoz D, Rubio F (1997) Epilepsia, aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. Ediciones del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Departamento de Publicaciones Científicas 426 pp.
- Fitzjohn S, Irving AJ, Palmer MJ, Harvey J, Lodge D and Collingridge GL (1996) Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 203:211-213.
- Fragoso-Veloz J, Tapia R (1992) NMDA receptor antagonist protect against seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 221:275-280.
- Gadea A and López-Colomé AM (2001) Glial transporters for glutamate, glycine and GABA. Glutamate transporters. *J. Neurosci. Res.* 63:453-460.
- Gallo V, Chittajallu R (2001) Unwrapping glial cells from the synapse: What lies inside? *Science.* 292:872-873.
- Gasparini F, Bruno V, Battaglia G, Lukie S, Leonhardt T, Inderbitzin W, et al. (1999) (R,S)-4-phosphonophenylglycine, a potent and selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, is anticonvulsive and neuroprotective in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290:1678-1687.
- Gean P, Chou S, Chang F (1990) Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat amygdala neurons: the involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 184:213-221.
- Gereau RW, Conn PJ (1995) Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 15:6879-6889.
- Gereau RW, IV, Conn PJ, Robert W (1995) Roles of specific metabotropic glutamate receptor subtypes in regulation of hippocampal CA1 pyramidal cell excitability. *J. Neurophysiol.* 74:122-129.
- Gilbert M (1994) The NMDA antagonist MK-801 suppresses behavioral seizures, augments afterdischarges, but does not block development of prefrontal path kindling. *Epilepsy Res.* 17:145-156.
- Hamberger A, Haglid K, Nystrom B and Silfvenius H (1993) Co-variation of free amino acids in human epileptogenic cortex. *Neurochem. Res.* 18:519-525.
- Hayashi T (1952) A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jap. J. Physiol.* 3:46-64.
- Herrero I, Miras-Portugal MT, Sánchez-Prieto J (1998) Functional switch from facilitation to inhibition in the control of glutamate release by metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* 273:1951-1958.
- Hoffman D, Magee J, Colbert C, Johnston D (1997) K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature.* 387:869-875.

- Hollman M, Hartley M and Heinemann S (1991) Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*. 252:851-853.
- Honoré T, Davies SN, Drejer J, Fletcher EJ, Jacobsen EJ, Lodge D, Nielsen FE (1998) Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science*. 241:701-703.
- Janjua NA, Itano T, Kugoh T, Hosokawa, Nakano M, Matsui H, and Hatase O (1992a) Familial increase in plasma glutamic acid in epilepsy. *Epilepsy Res*. 11:37-44.
- Janjua NA, Kabuto H and Mori A (1992b) Increased plasma glutamic acid in a genetic model of epilepsy. *Neurochem. Res*. 17:293-296.
- Johnson D and Amaral DG (1998) Hippocampus. The synaptic organization of the brain. (Shepherd G.M.ED.), Oxford University Press, New York. Pp 417-458.
- Johnson JW and Ascher P (1992) Equilibrium and kinetic study of glycine action on the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured mouse brain neurons. *J. Physiol*. 455:339-365.
- Jovanovic J, Sihra T, Nairn A, Hemmings H, Greengard P, Czernik A (2001) Opposing changes in phosphorylation of specific sites synapsin I during Ca<sup>2+</sup> -dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J. Neurosci*. 15:7944-7953.
- Kandel, ER, Schwartz, JH, Jessell, TM (2000) Principles of neural science. 4ª edición McGraw-Hill. cap 15.
- Kraus JE, Yeh GC, Bonhaus DW, Nadler JV, McNamara JO (1994) Kindling induces the long-lasting expression of a novel population of NMDA receptors in hippocampal region CA3. *J. Neurosci*. 14:4196-4205.
- Lada MW, Victory TW, Kennedy RT (1998) Evidence for neuronal origin and metabotropic receptor-mediated regulation of extracellular glutamate and aspartate in rat striatum in vivo following electrical stimulation of the prefrontal cortex. *J. Neurochem*. 70:617-625.
- Lee S, Miskovsky J, Williamson J, Howells R, Devensky O, Lotham E y Christakos S (1994) Changes in glutamate receptor and proenkephalin gene expression after kindled seizures. *Brain. Res. Mol. Brain. Res*. 24:34-42.
- Löscher W, Schmidt D (1988) Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res*. 2:145-181.
- Losonczy A, Somogyi P and Nusser Z (2003) Reduction of excitatory postsynaptic responses by persistently active metabotropic glutamate receptors in the hippocampus. *J. Neurophysiol*. 89:1910-1919.
- Louvel E, Hugon J, Doble A (1997) Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis. *TIPS*. 18:196-203.
- Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effects of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol*. 58:193-201.
- Luján R, Nusser Z, Roberts JDB, Shigemoto R, Somogyi P (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 8:1488-1500.

- Luján-Miras R (2005) Receptores metabotrópicos de glutamato: nuevas dianas moleculares en la terapia de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. *Rev. Neurol.* 40:43-53.
- Macek TA, Winder DG, Gereau RW, IV, Ladd CO, Conn PJ (1996) Differential involvement of group II and group III mGluRs as autoreceptors at lateral and medial perforant path synapses. *J. Neurophysiol.* 76:3798-3806.
- Mannaioni G, Marino MJ, Valeti O, Traynelis SF, Conn PJ (2001) Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J. Neurosci.* 21:5925-5934.
- Manzoni O, Bockaert J (1995) Metabotropic glutamate receptors inhibiting excitatory synapses in the CA1 area of rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 7:2518-2523.
- Martin D, Plagenhoef M, Abraham J, Dennison R, Aronstam R. (1995) Volatile anesthetic and glutamate activation of N-metil-D-aspartate receptors. *Biochem. Pharmacol.* 49:809-817.
- Massieu L, Gomez-Roman N, Montiel T (2000) In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp. Neurol.* 165:257-267.
- Massieu L, Morales-Villagran A, Tapia R (1995) Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 64:2262-2271.
- Massieu L, Tapia R (1997) Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J. Neurochem.* 69:1151-1160.
- Massieu L. (1999) Muerte por excitotoxicidad en enfermedades neurodegenerativas: Mecanismos celulares y moleculares. (Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R). Fondo de cultura económica. México, D.F. pp 64-80.
- McDonald JF, Xiong XG, Lu WY, Raouf R, Orser BA (1998) Modulation of NMDA receptors. *Prog. Brain. Res.* 116:191-208.
- McDonald JW, Johnston MW, Young AB (1990) Differential ontogenic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Exp. Neurol.* 110:237-247.
- Meldrum B (1982) Pharmacology of GABA. *Clin Neuropharmacol.* 5:293-316.
- Meldrum B (1994) The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology.* 44:14-23.
- Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130: 1007 S-1015 S.
- Millan C, Luján R, Shigemoto R and Sánchez-Prieto J (2002) The inhibition of glutamate release by metabotropic glutamate receptor 7 affects both  $[Ca^{2+}]_c$  and cAMP. *J. Biol. Chem.* 277:14092-14101.
- Moldrich RX, Griffey KI, Talebi A, Beart PM, Chapman AG and Meldrum BS (2001) Antiepileptic activity of group II metabotropic glutamate receptor agonists (-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3,1,0]hexane-4,6-dicarboxylate (LY379268) and (-)-2-thia-4-aminobicyclo[3,1,0]-hexane-4,6-dicarboxylate (LY3897950). *Neuropharmacology.* 41:8-18.

- Morales-Villagran A, and Tapia R (1996) Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem. Int.* 28:35-40.
- Morales-Villagran A, Ureña-Guerrero and Tapia R (1996) Protection by NMDA receptor antagonist against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 305:87-93.
- Moroni F, Cozzi A, Lombardi G, Sourtcheva S, Leonardi P, Carfi M and Pellicciari R (1998) Presynaptic mGlu1 type receptors potentiate transmitter output in the rat cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 347:189-195.
- Movsesyan VA, o'Leary DM, Fan L, Bao W, Mullins PGM, Knoblach SM and Faden AL (2001) mGluR5 antagonists 2-methyl-6-(phenylethyl)-pyridine and (E)-2-methyl-6-(2-phenylethenyl)-pyridine reduce traumatic neuronal injury in vitro and in vivo by antagonizing N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296:41-47.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 258:597-603.
- Nedergaard M, Takano T and Hansen AJ (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:748-755.
- Neki A, Ohishi H, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1996) Pre- and postsynaptic localization of metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the rat brain: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci. Lett.* 202:197-200.
- Nicoletti F, Iadarola MJ, Wroblewski JT and Costa E (1986) The activation of inositol phospholipids metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 6:1905-1911.
- Nicoletti F, Meek JL, Iadarola MJ, Chang DM, Roth BL and Costa E (1986) Coupling of inositol phospholipids metabolism with excitatory amino acid recognition sites in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 46:40-46.
- Obrenovitch TP, Urenjak J and Zilkha E (1996) Evidence disputing the link between seizure activity and high extracellular glutamate. *J. Neurochem.* 66:2446-2454.
- Ohishi H, Nomura S, Ding Y, Shigemoto R, Wada E, Kinoshita A, Li J, Neki A, Nakanishi S, Mizuno N (1995) Presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor, mGluR7, in the primary afferent neurons: an immunohistochemical study in the rat. *Neurosci. Lett.* 202:85-88.
- Olanow CW (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS.* 16:439-444.
- Oliet SHR, Piet R, Poulain DA (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science.* 292:923-925.
- Olney JW (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: *Kainic acid as a tool in neurobiology* (McGeer EG, Olney JW, McGeer PL, eds) New York: Raven. Pp 95-121.
- Olney JW and Ishimaru MJ (1999) Excitotoxic cell death. De "Cell death and diseases of the nervous system" (10:197-219) editado por Koliatsos y Ratan: Humana Press.
- Olney JW, Ho OL (1970) Brain damage in infantile mice following oral intake of glutamate. *Nature.* 227:609-610.
- Olney JW, Sharpe LG, Feigin RD (1972) Glutamate-induced brain damage in infantile primates. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 31:464-488.

- Pasantes H, Sánchez J y Tapia R (1991) Neurobiología celular. Fondo de cultura económica, S.A. de C.V. México. Cap VIII.
- Paxinos G, Watson C. (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academia Press, Sydney.
- Peña F, Tapia R (1999) Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem.* 72:2006-2014.
- Peña F, Tapia R (2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: Role of glutamate- and GABA- mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience.* 101:547-561.
- Peña F (2001) Papel del glutamato en la epilepsia y la neurodegeneración producidas por la 4-aminopiridina en el hipocampo in vivo. Tesis de doctorado en ciencias biomédicas. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.
- Perrault P and Avoli M (1991) Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 65:771-785.
- Petralia RS, Wang YX, Neidzielski AS, Wenthold RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience.* 71:949-976.
- Pin J-P and Acher F (2002) The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr. Drug. Targets.* 1:297-317.
- Pin J-P, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* 34:1-26.
- Ramírez-Munguía N, Tapia R. (2003) Epilepsy, neurodegeneration and extracellular glutamate in the hippocampus of awake and anesthetized rats treated with okadaic acid. *Neurochem. Res.* 20:1517-1524.
- Robinson M, Hunter-Ensor M, Sinor J (1991) Pharmacologically distinct sodium-dependent L-[<sup>3</sup>H] glutamate transport processes in rat brain. *Brain Res.* 544:196-202.
- Rodríguez-Moreno A, Sistiaga A, Lerma J, Sánchez-Prieto J (1998) Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization. *Neuron.* 21:1477-1486.
- Rogawski MA, Yamaguchi SM, Jones S, Rice KC, Thurkauf A y Monn JA (1991) Anticonvulsant activity of the low-affinity uncompetitive N-methyl-D aspartate antagonist (+)-5-aminocarbonyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-10-imine (ADCI): comparison with the structural analogs dizocipine (MK-801) y carbamazepine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259:30-37.
- Rusakov DA, Wuerz A and Kullman DM (2004) Heterogeneity and specificity of presynaptic Ca<sup>2+</sup> current modulation by mGluRs at individual hippocampal synapses. *Cerebral Cortex.* 14:748-758.
- Scanziani M, Salin PA, Vogt K.E. Malenka RC, Nicoll RA (1997) Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature.* 385:630-634.
- Scheyer RD (1998) Involvement of glutamate in human epileptic activities. *Prog. Brain. Res.* 116:359-369.

- Schindler AF, Olson EC, Spitzer NC and Montal M (1996) Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16:6125-6133.
- Schoepp DD (2001) Unveiling the functions of the presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299:12-20.
- Schoepp DD, Jane DE and Monn JA (1999a) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 38:1431-1476.
- Shepherd GM (1998) The synaptic organization of the brain. Fourth Edition. Oxford University Press. N.Y.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17:7503-7522
- Shigemoto R, Kulik A, Roberts JDB, Ohishi H, Nusser Z, Kaneko T, Somogyi P (1996) Target-cell-specific concentration of metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature.* 381:523-525.
- Shigemoto R, Nomura S, Ohishi H, Sugihara H, Nakanishi S, Mizuno N. (1993). Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 163:53-57.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (1999) Basic neurochemistry. Lippincott-Raven. New York. Cap 2.
- Siesjo BK, Katsura K, Kristian T (1995) The biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 7:47-52.
- Simón RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS (1984) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science.* 226:850-852.
- Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J and Weiss S (1985) Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurons. *Nature.* 317:717-719.
- Spyker DA, Lynch C, Shabanowitz J, Sinn JA (1980) Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clin. Toxicol.* 16:487-497.
- Stein-Behrens BA, Elliot EM, Miller CA, Schilling JW, Newcombe R and Sapolsky RM (1992) Glucocorticoids exacerbate kainic acid-induced extracellular accumulation of excitatory amino acids in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 58:1730-1735.
- Sugiyama H, Ito I, and Hirono C (1987) A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipids metabolism. *Nature (Lond).* 325:531-533.
- Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M and Attewell D (1997) The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J. Exp. Biol.* 200:401-409.
- Tang FR, Lee WL (2001) Expression of the group II and III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J. Neurocytol.* 30:137-143.
- Tang FR, Lee WL, Yeo TT (2001c) Expression of the group I metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J. Neurocytol.* 30:403-411.

- Tapia R (1998) Cellular and molecular mechanisms of neurodegeneration. *Gac. Med. Mex. Spanish*. 134:685-703.
- Tapia R, Medina-Ceja L, Peña F (1999) On the relationship between extracellular glutamate, hiperexcitation and neurodegeneration, *in vivo*. *Neurochem. Int.* 34:23-31.
- Tizzano JP, Griffery KI and Schoepp DD (1995) Induction and protection of limbic seizures in mice by mGluR subtype selective agonists. *Neuropharmacology*. 34:1063-1067.
- Vázquez E, Sanchez-Prieto J (1997) Presynaptic modulation of glutamate release targets different calcium channels in rat cerebrocortical nerve terminals. *Eur J Neurosci*. 9:2009-2018.
- Vera G (2004) Protección paradójica de la excitotoxicidad glutamatérgica por acumulación de glutamato extracelular en el hipocampo de la rata, *in vivo*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Wakasugi M, Hirota K, Roth S, Ito Y (1999) The effects of general anesthetics on excitatory and inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the hippocampus *in vitro*. *Anesth. Analg.* 88:676-680.
- Walker MC, Gallery PT, Errington ML, Shorvon SD and Jefferys JG (1995) Ascorbate and glutamate release in the rat hippocampus after perforant path stimulation: a "dialysis electrode" study. *J. Neurochem.* 65:725-731.
- Watkins JC and Davies J (1982) Actions of D and L forms of 2-amino-5-phosphonovalerate and 2-amino-4-phosphonobutyrate in the cat spinal cord. *Brain Res.* 235:378-386.
- Wenthold RJ, Roche KW (1998) The organization and regulation of non-NMDA receptors in neurons. *Prog. Brain Res.* 116:133-152.
- Wielochot T (1985) Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an NMDA antagonist. *Science*. 230:681-683.
- Wilson CL, Maidment NT, Shomer MH, Behnke EJ, Ackerson L, Fried I and Engel J Jr. (1996) Comparison of seizure related amino acid release in human epileptic hippocampus versus a chronic, kainate rat model of Hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res.* 26:245-254.
- Yamaguchi S, Rogawski MA (1992) Effects of anticonvulsant on 4-aminopyridine induced seizures in mice. *Epilepsy Res.* 11:9-16.
- Yamaguchi S., Donevan SD, Rogawski MA. (1993) Anticonvulsant activity of AMPA/kainate antagonists: comparison of GYKI 52466 and NBQX in maximal electroshock and chemoconvulsant seizure models. *Epilepsy Res.* 15:179-184.
- Zang WQ, Hudson PM, Sobotka TJ, Hong JS and Tilson HA (1991) Extracellular concentrations of amino acid transmitters in ventral hippocampus during and after the development of kindling. *Brain Res* 540:315-318.