



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS

EFFECTO DE LOS SUSTRATOS ENERGÉTICOS SOBRE LA
NEURODEGENERACIÓN POR EXCITOTOXICIDAD INDUCIDA
POR LA 4-AMINOPIRIDINA EN EL HIPOCAMPO *IN VIVO*

T E S I S

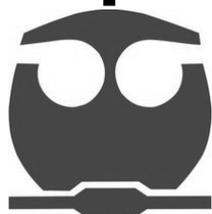
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A

QFB CITLALLI NETZAHUALCOYOZI PIEDRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA



MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2011



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.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	2
1.1.- Hipocampo	2
1.2 Neurotransmisión glutamatérgica	4
1.3.- Excitotoxicidad y neurodegeneración.....	10
2.- ANTECEDENTES	14
2.1.- La 4-aminopiridina como modelo de excitotoxicidad.....	14
2.2.- La mitocondria en el proceso excitotóxico	15
2.3.- Sustratos energéticos y neuroprotección	16
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4.- HIPÓTESIS	20
5.- OBJETIVOS	21
6.- METODOLOGÍA	22
6.1.- Sujetos de experimentación	22
6.2.- Cirugía para el implante.....	22
6.3.- Registro electroencefalográfico (EEG)	23
6.4.- Análisis conductual	23
6.5.- Microdiálisis	23
6.6.- Análisis histológico.....	24
6.7.- Cuantificación de aminoácidos.....	25
7.- RESULTADOS	26
8.- DISCUSIÓN	36
9.- CONCLUSIONES	40
11.- AGRADECIMIENTOS	41
12.- REFERENCIAS	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hipocampo

El hipocampo es una estructura cerebral que forma parte del sistema límbico y está fuertemente involucrado con la formación de nuevas memorias, particularmente las de tipo espacial en la rata. El hipocampo en la rata se origina a la altura del núcleo septal del cerebro medio y extiende por encima y por detrás del diencéfalo llegando a tener un tamaño aproximado de 4mm de longitud. El hipocampo tiene una organización laminar en donde la capa de neuronas piramidales se considera como la principal. Lorente de Nó dividió al hipocampo para su estudio en tres campos denominados cuernos de Ammón o CA asignados con los números 1, 2 y 3 (CA1, CA2, CA3). La diferencia entre CA1 y CA3 radica en que las células piramidales de la región CA3 reciben fibras musgosas del giro dentado, pero no las células piramidales del CA1. En lo que respecta a CA2, su diferenciación no es muy clara ya que es una estrecha zona interpuesta entre CA3 y CA1 pero sabemos que a pesar de presentar cuerpos celulares largos semejantes a los de CA3, no recibe inervación de las fibras musgosas del giro dentado (Martin, 1998; Witter y Amaral, 2004).

El hipocampo está conectado con diversas estructuras, pero la principal vía de entrada procede de la corteza entorrinal a través de la vía perforante que proyecta hacia el giro dentado y hacia regiones de CA3 y CA1. Otra vía de entrada al hipocampo proviene del septum a través de la fimbria fórnix e inerva las regiones CA3 y CA1, principalmente. La principal vía de salida hipocampal es a través del subiculum hacia áreas corticales en donde se incluyen la corteza entorrinal principalmente, y por la fimbria-fórnix al septum, al núcleo acumbens, al complejo amigdalino y al hipotálamo. Internamente, el hipocampo se comunica través de tres vías principales: 1) la *vía perforante*, que proyecta desde la corteza entorrinal hasta las células granulares del giro dentado; 2) la vía de *las fibras musgosas* van del giro dentado hasta las células piramidales en la región CA3 y 3) en el área CA3 se origina la *vía colateral de Schaffer* que llega hasta las células piramidales de la región CA1 (Witter y Amaral, 2004).

Respecto a la neurotransmisión hipocampal, está ampliamente documentado que el principal neurotransmisor es el glutamato; inclusive, se ha comprobado que los receptores glutamatérgicos están densamente localizados en las regiones hipocampales (Cotman et al., 1987; Monyer et al., 1994). Adicionalmente al glutamato, existen otros neurotransmisores que también ejercen su influencia en el funcionamiento hipocampal, como en el caso de la acetilcolina proveniente del septum a través de la fimbria fórnix, el ácido gamma amino butírico (GABA) liberado por los axones provenientes del septum y por las interneuronas gabaérgicas residentes en el hipocampo, la noradrenalina proveniente del locus coeruleus, la dopamina proveniente de las proyecciones neuronales del área ventral tegmental y la serotonina desde los núcleos de raphé (Witter y Amaral, 2004).

1.2 Neurotransmisión glutamatérgica

A pesar de que se sabe desde hace más de 75 años que el glutamato tiene efectos en el Sistema Nervioso Central (SNC), no fue sino hasta 1984 que se conocieron todas las características del glutamato para que se le considerara como un neurotransmisor (Fonnum, 1984).

Como todos los aminoácidos, el glutamato tiene un extremo N-terminal y otro C-terminal. El dominio C-terminal y el esqueleto de carbono que conforman al glutamato provienen directamente del metabolismo de la glucosa. Después de la glucólisis, el ácido pirúvico entra al ciclo del ácido tricarboxílico que genera α -cetoglutarato, molécula que es transaminada para recibir un grupo amino de algún aminoácido donador y formar finalmente el glutamato. Es importante resaltar que, adicionalmente a su tarea como neurotransmisor, el glutamato también funciona como un precursor metabólico del GABA y como componente de varias bases derivadas de los aminoácidos, como es el caso del antioxidante endógeno glutatión (Hassel y Dingle, 2006).

En una sinapsis glutamatérgica, el glutamato citosólico entra a la vesícula sináptica a través de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT) (Takamori, 2006). Los VGLUT son

antiportadores multiméricos protón/glutamato y hasta ahora se han clonado 3 tipos de estos. VGLUT1 y 2 están expresados principalmente en neuronas glutamatérgicas, mientras que el VGLUT3 ha sido detectado en neuronas de tipo GABAérgico, colinérgico y monoaminérgico, aunque su función en estas neuronas no glutamatérgicas aún es incierta (Fremeau et al., 2004). Interesantemente, VGLUT1 Y 2 también están expresadas en las células gliales y participan en la liberación de glutamato mediada por astrocitos despolarizados (Bezzi et al., 2004; Montana et al., 2004).

La liberación del glutamato de las vesículas sinápticas hacia el espacio sináptico es un proceso dependiente de calcio y mediado por el complejo de proteínas SNARE (Hassel y Dingledine, 2006). Una liberación de glutamato exacerbada resultaría en altas concentraciones de glutamato en el espacio sináptico lo que provocaría una sobreactivación de los receptores a glutamato, generando así el proceso conocido como excitotoxicidad, del cual se hablará ampliamente más adelante.

El glutamato es removido del espacio sináptico y transportado hacia el citosol, en contra de su gradiente de concentración, a través de los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) que se encuentran localizados principalmente en procesos astrocíticos en la sinapsis. Cinco de estos EAATs han sido identificados hasta ahora (O'Shea, 2002). EAAT1 se encuentra localizado abundantemente en la neocorteza y el cerebelo, pero se presenta únicamente en los astrocitos. EAAT2 es el transportador principal en el prosencéfalo, se expresa principalmente en estrocitos y en menor medida en las neuronas. EAAT3 es específica para neuronas y está presenta en gran cantidad en las terminales presinápticas de tipo GABAérgico. EAAT4 sólo ha sido detectado en las dendritas cerebelares de las neuronas de Purkinje. Finalmente, EAAT5 están específicamente localizados en retina (Zheng et al., 2008). Una vez en el citosol, la glutamina sintetasa, enzima específica de los astrocitos y los oligodendrocitos, convierte el glutamato en glutamina. A continuación, la glutamina sale de los astrocitos y llega a las neuronas a través de los transportadores a glutamina presentes en las células gliales (SN) y neuronas (SA). La entrada de una molécula

de glutamina se ve acompañada de la salida de 2Na^+ y la entrada de 1H^+ . Ya en las neuronas, la enzima mitocondrial glutaminasa convierte la glutamina en glutamato para su consecuente almacenamiento dentro de las vesículas sinápticas (Hassel y Dingledine, 2006) (Figura 1).

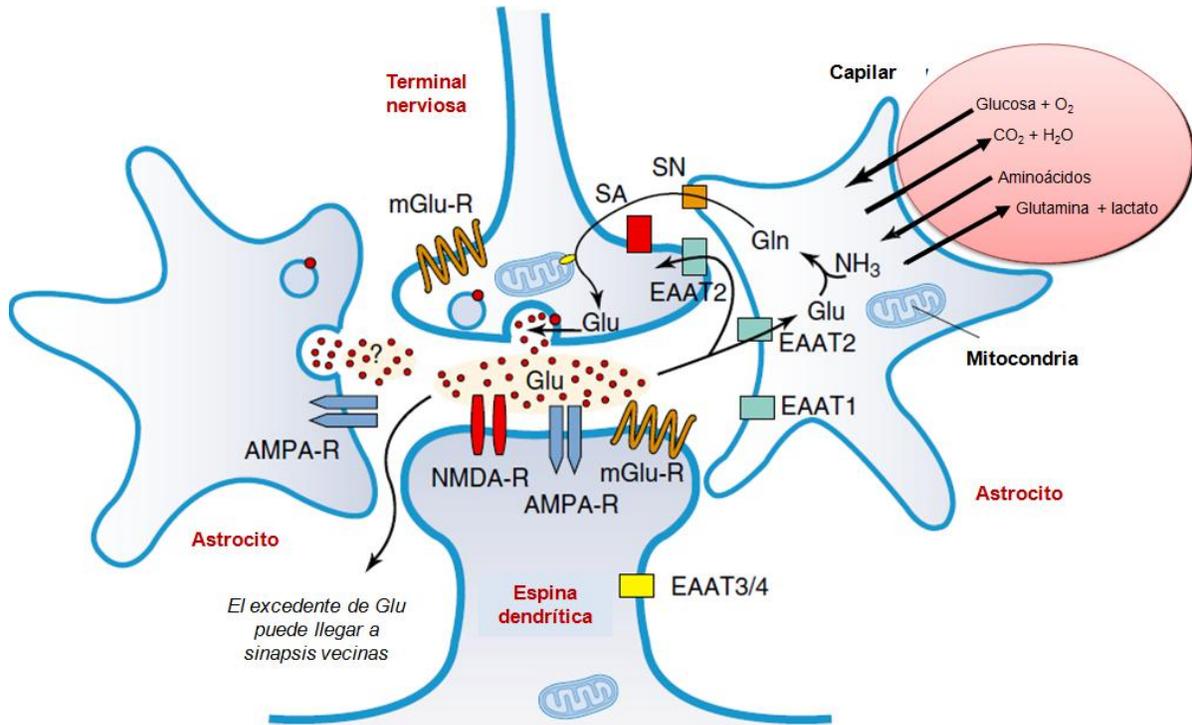


Figura 1.- Representación esquemática de una sinapsis glutamatérgica. La terminal nerviosa contiene vesículas sinápticas con sus respectivos transportadores vesiculares (punto rojo), mitocondrias (azul) con glutaminasa (punto amarillo), receptores metabotrópicos a glutamato (mGlu-R), transportadores de glutamato (EAAT2) y glutamina (SA). La membrana postsináptica tiene receptores ionotrópicos (AMPA y NMDA) y metabotrópicos, así como transportadores de glutamato (EAAT3 y EAAT4). Rodeando la sinapsis hay prolongaciones astrocíticas que tienen transportadores a glutamato (EAAT1 y EAAT2) y glutamina (SN), receptores a glutamato e incluso, vesículas con glutamato. Glu, glutamato; Gln, glutamina; EAAT, transportador de aminoácidos excitadores; AMPA-R, receptor tipo AMPA; NMDA-R, receptor NMDA, mGlu-R, receptor metabotrópico a glutamato, SA y SN, sistema de transporte tipo A y N (para glutamina). (Modificado de Hassel y Dingledine, 2006).

Actualmente, se conocen varios tipos de receptores a glutamato. De acuerdo a su mecanismo de transducción, existe una clasificación general que los divide en dos familias: los receptores del tipo **ionotrópicos** y los **metabotrópicos**.

Receptores ionotrópicos a glutamato (iGluR)

Los iGluRs operan por apertura de canales catiónicos que permiten el paso selectivo de iones sodio (Na^+), potasio (K^+) o calcio (Ca^{+2}), por lo que se encuentran involucrados en la neurotransmisión rápida del cerebro, debido a que el paso de estos iones 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 1) los **receptores NMDA** que reconocen al N-metil-D-aspartato (NMDA) y 2) y **los receptores no-NMDA** que reconocen al kainato y/o al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA).

La activación del receptor NMDA facilita el acceso de Ca^{2+} aunque también permite la entrada Na^+ y la salida de 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, por ello se considera a la glicina como un co-agonista obligatorio. 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 y por otro lado, si se encuentran a concentraciones mayores inhiben la activación del receptor (Dingledine y Bennett, 1994). Otro sitio reconoce al Mg^{+2} que 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 el canal 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 la actividad del receptor puede ser modulado por el mecanismo de fosforilación, éste proceso es reversible pero puede ocasionar cambios prolongados en los procesos en los que se encuentra involucrado (McDonald et al., 1998).

El receptor NMDA 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). De entre los agonistas más usados se tiene al propio NMDA y el aspartato, y los antagonistas al maleato de dizocilpina (MK-801) y el D-amino-fosfo-valerato (D-AP5).

Los receptores del tipo AMPA son permeables al Na^+ y al K^+ . 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 los canales que carecen de la subunidad GluR2 sí son permeables al Ca^{2+} (Hollman et al., 1991). De entre los agonistas más usados tenemos al propio AMPA y al quisqualato, y entre los antagonistas podemos mencionar a la 6, 7-dinitro-quinoloxalina-2, 3-diona (DNQX) y la 6-ciano-7-nitro-quinoloxalina-2, 3-diona (CNQX).

Los receptores tipo kainato son selectivamente permeables al Na^+ y al K^+ . Se encuentran formados por cuatro subunidades ensambladas en homo o heterodímero de las subunidades GluR5-7 con baja afinidad por el kainato y las subunidades KA1 y 2 con alta afinidad. A pesar de estar ampliamente distribuidos en el SNC, estos receptores son menos abundantes que los AMPA. Y sin embargo, entre ambos tipos de receptores hay similitudes farmacológicas por lo que en ocasiones se les menciona como receptores AMPA/kainato (Wenthold y Roche, 1998) (**Figura 2**).

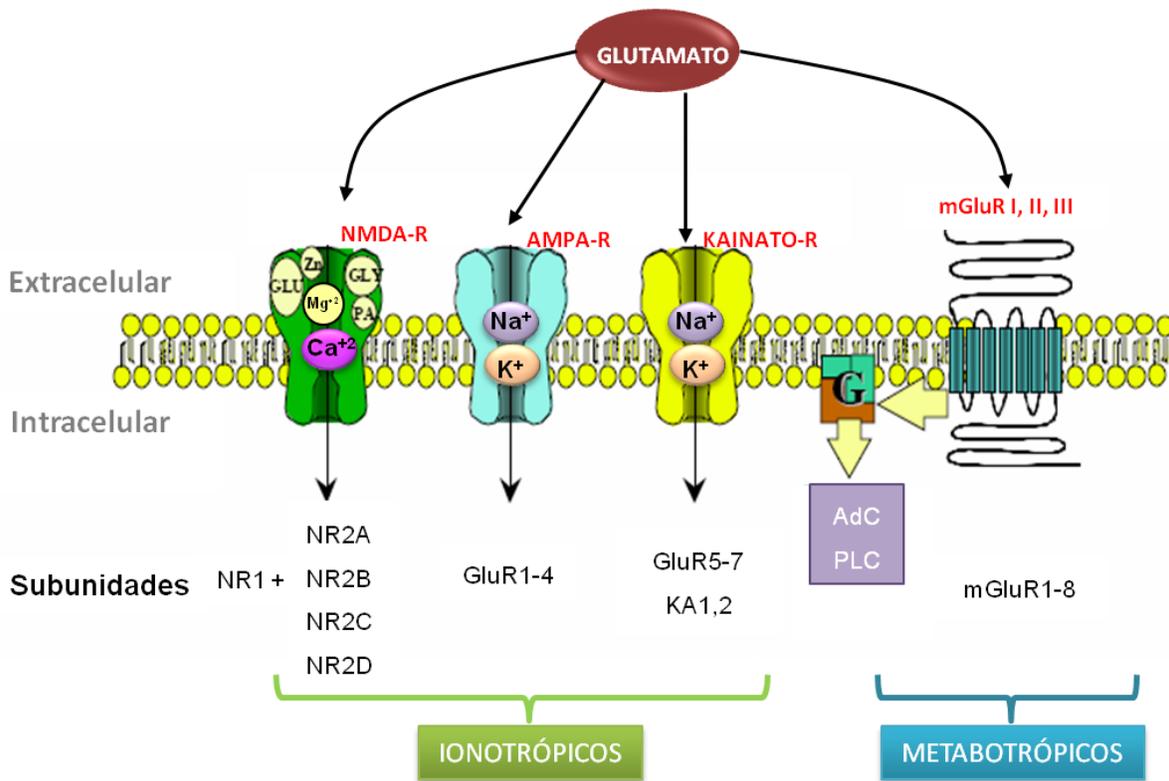


Figura 2.- Los receptores a glutamato se clasifican en ionotrópicos y metabotrópicos según su mecanismo de acción. Dentro de los receptores ionotrópicos tenemos a los receptores tipo NMDA (NMDA-R) principalmente permeables a calcio, los receptores tipo AMPA (AMPA-R) y kainato (KAINATO-R) que permean principalmente sodio y potasio. Los receptores metabotrópicos a glutamato (mGlu-R) se subdividen en 3 grupos (I, II, III) y están acoplados a sus respectivas proteínas G heterotrimérica que regulan la actividad de la adenilato ciclasa (AdC) y la fosfolipasa C (PLC). En la imagen se muestran las subunidades que conforman a cada uno de estos receptores glutamatérgicos.

Receptores metabotrópicos a glutamato (mGluR)

Los mGluR son proteínas integrales de membrana formados por una única cadena polipeptídica con 7 dominios transmembranales. Están acoplados a proteínas G heterotriméricas y operan por la generación de segundos mensajeros, regulando así la actividad de enzimas de membrana y canales iónicos. De esta manera los receptores mGluR son quienes median la actividad sináptica excitadora lenta, pero prolongada, en el SNC (Pin y Acher, 2002).

El grupo de receptores metabotrópicos a glutamato está constituido por ocho subtipos (mGluR1-8) y varias isoformas, subdivididos en tres grandes grupos de acuerdo a la homología de su secuencia de aminoácidos, a los mecanismos de transducción de señales y a sus propiedades farmacológicas: **mGluR I**, **mGluR II** y **mGluR III** (Pin y Duvoisin, 1995). El grupo I (mGluR1 y mGluR5) se localizan mayoritariamente a nivel postsináptico en cuerpos celulares, troncos dendríticos y espinas dendríticas. Este tipo de receptor está acoplado a la proteína G_q la cual está positivamente ligado a la fosfolipasa C (Cartmell y Schoepp, 2000). El grupo II (mGluR2 y mGluR3) se encuentran primordialmente localizado en glía y en sitios pre y postsinápticos alejados de las zonas activas (Neki et al., 1996; Petralia et al., 1996). El grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) tienen su localización mayoritariamente en la región presináptica de terminales axónicas en sitios de liberación de neurotransmisores (Shigemoto et al., 1996; Bradley et al., 1996). Estos dos grupos de receptores (mGluR II y III) se encuentran acoplados a la proteína G_i que inhibe la actividad de la adenilato ciclasa.

1.3 Excitotoxicidad y neurodegeneración

La concentración citoplasmática de Ca^{+2} en las neuronas en estado de reposo es mantenida en niveles bajos [≈ 100 nM] aproximadamente 10,000 veces menor que la del medio extracelular. Para asegurar esto las neuronas poseen mecanismos homeostáticos especializados como son la regulación de la entrada y salida de Ca^{+2} , la quelación por proteínas de capturan calcio, almacenamiento en la mitocondria y el retículo endoplásmico, así como la remoción de este ión por medio de las Ca^{+2} -ATPasas. En condiciones fisiológicas, el Ca^{+2} participa como mensajero intracelular en muchas funciones celulares como son el crecimiento celular, diferenciación, transducción de señales, regulación de la excitabilidad membranal, exocitosis y la actividad sináptica. Por su parte, el glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC, y juega un papel muy importante en el desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica y procesos cognitivos (Suzuki et al., 2006).

Se pueden presentar elevadas concentraciones de glutamato extracelular cuando la liberación de glutamato de las terminales sinápticas está aumentada o la recaptura en la hendidura sináptica es insuficiente y también puede resultar de la liberación del contenido intracelular de glutamato de neuronas dañadas. Este incremento de glutamato en la hendidura sináptica lleva a la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos. En este punto, la entrada excesiva de Ca^{+2} al citoplasma, aunado con su salida de los reservorios intracelulares exceden la capacidad de los mecanismos celulares encargados de la homeostasis del calcio e inicia el proceso excitotóxico. El concepto de **“excitotoxicidad”** fue propuesto por Onley en 1969 y lo describe como un efecto tóxico de una activación excesiva o prolongada de los receptores a aminoácidos excitadores ((Lau y Tymianski, 2010; Wang y Quin, 2010). En la actualidad, sabemos que los receptores a glutamato son los mediadores del proceso excitotóxico, siendo reconocido que los receptores de tipo ionotrópicos juegan un papel central (Choi, 1998).

En el proceso excitotóxico, la excesiva elevación de Ca^{+2} activa diversas enzimas como proteasas, lipasas, fosfatasas y endonucleasas, provocando alteraciones en proteínas, lípidos, membranas y ácidos nucleicos. Adicionalmente, el incremento intracelular de Ca^{+2} estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) mediante la activación de la sintasa del óxido nítrico (NOS) responsable de catalizar la producción del óxido nítrico (NO^{\cdot}). En estas condiciones la xantina deshidrogenasa es convertida a xantina oxidasa debido a la activación de proteasas, y como consecuencia, la conversión incrementada de hipoxantina y xantina a ácido úrico por medio de la xantina oxidasa da lugar a la producción del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). El NO^{\cdot} reacciona rápidamente con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ dando lugar al peroxinitrito (ONOO^{\cdot}) que puede descomponerse en el radical de oxígeno más reactivo, el hidroxilo ($^{\cdot}\text{OH}$). Por otro lado, la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ por la superóxido dismutasa (SOD) produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), molécula que puede descomponerse en presencia de Fe^{+2} en el $^{\cdot}\text{OH}$ a través de la reacción de Fenton. Asimismo, se puede dar la reacción entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 resultando en la formación de más $^{\cdot}\text{OH}$. Todas esta cadena de reacciones, lleva a la célula al estado de **“estrés oxidante”**

definido como el desequilibrio en la producción de ROS y las defensas antioxidantes endógenas, generando una concentración de radicales libres por encima de los niveles normales. Dada su alta reactividad, la producción aumentada de ROS puede desencadenar la degradación oxidativa de lípidos de membrana, el daño a enzimas, otras proteínas y ácidos nucleicos, generando así una serie de eventos dañinos hacia la estructura y función celular (Andersen, 2004; Mattson, 2007; Halliwell, 2006) (Figura 3).

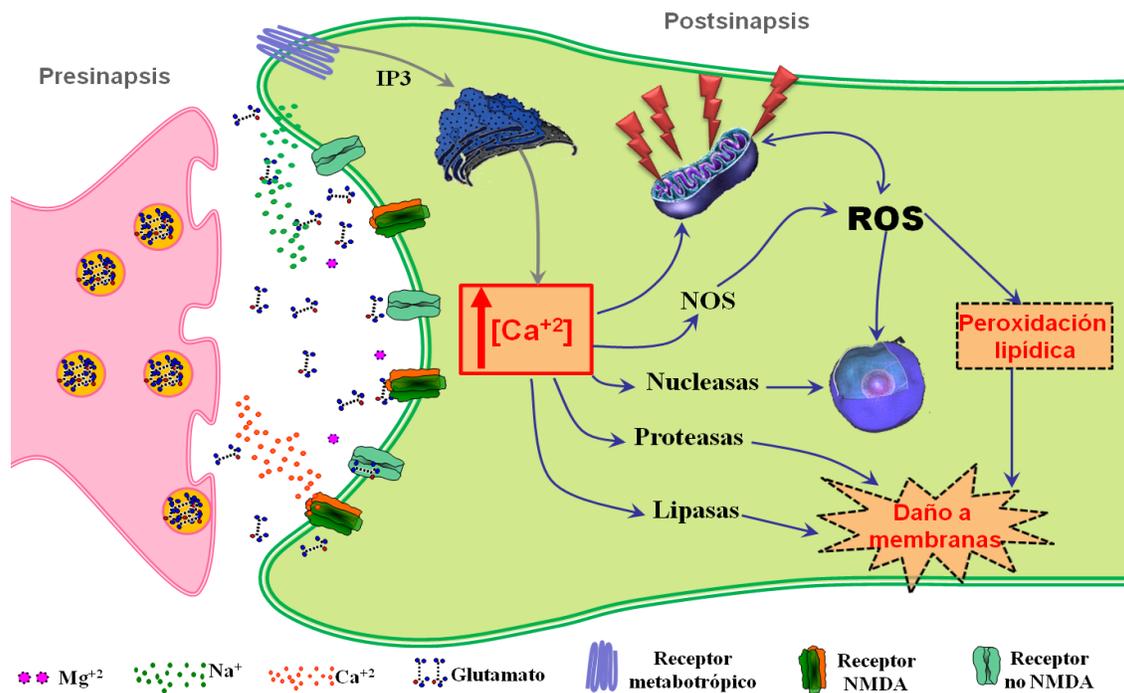


Figura 3.- Representación esquemática de los procesos bioquímicos que participan en el mecanismo de excitotoxicidad en una sinapsis glutamatérgica. La sobreactivación de los receptores a glutamato genera un incremento exacerbado en la concentración de calcio intracelular. Este proceso conocido como excitotoxicidad permite la activación de enzimas dependientes de calcio como lipasas, proteasas y nucleasas que dañarán a diversas estructuras celulares. También pueden activarse enzimas como la sintasa del óxido nítrico (NOS), lo que favorecerá la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos eventos causarán daño a la estructura y funciones metabólicas mitocondriales viéndose afectado el potencial de membrana mitocondrial, la cadena transportadora de electrones y, consecuentemente, la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa.

Cabe destacar que el hipocampo es particularmente vulnerable al proceso excitotóxico debido a la densidad de neuronas glutamatérgicas que lo conforman, y además es muy propenso al daño por el estrés oxidante como consecuencia de su alto grado de gasto energético y demanda de oxígeno. De hecho, se propone que la excitotoxicidad pudiera ser la responsable de la muerte neuronal que se presenta en diversos padecimientos neurológicos y en algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (Tovar-y-Romo y Tapia 2007; Wang y Quin, 2010; Lau y Tymianski, 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1 La 4-aminopiridina como modelo de excitotoxicidad

La 4-AP (4-aminopiridina) es un bloqueador de amplio espectro de los canales de K^+ que suprime preferentemente a las corrientes transitorias de K^+ . Esta actividad de la 4-AP hace que se prolongue la fase despolarizante del potencial de acción e induce disparos repetitivos de las neuronas. Debido a estas características, la 4-AP ha sido ampliamente utilizada como agente farmacológico en diverso estudios sobre los canales de K^+ , mecanismos epileptogénicos y plasticidad sináptica (Thesleff, 1980).

En nuestro laboratorio se ha trabajado durante varios años con la 4-AP en experimentos con ratas anestesiadas. En estos experimentos se ha demostrado que la administración intrahipocampal de $[4-AP] \geq 35$ mM estimula la liberación de glutamato de las terminales sinápticas, induce de forma casi inmediata actividad epileptiforme en el registro electroencefalográfico (EEG) con $[4-AP] \geq 3.5$ mM, y de forma tardía produce neurodegeneración en las regiones CA1 y CA3 con $[4-AP] \geq 17.5$ mM. Se ha comprobado que la neurodegeneración inducida por la 4-AP es un proceso dependiente del calcio, ya que el uso del quelante de calcio como el BAPTA-AM previene la muerte de las neuronas en el hipocampo. Además, se ha comprobado que los efectos generados por la 4-AP son mediados por la sobreactivación de los receptores a glutamato, particularmente de los tipo NMDA, ya que se el uso de antagonistas de este receptor previene de los efectos tóxicos de la 4-AP (Morales-Villagrán et al., 1996; Peña y Tapia, 1999, 2000; Ayala y Tapia, 2003, 2005).

Con estos antecedentes se demuestra que la 4-AP puede ser utilizada como un modelo farmacológico de excitotoxicidad dependiente de glutamato. Sin embargo, cabe señalar que el uso de anestésicos durante la administración de 4-AP pudiera interferir en los resultados, de ahí que es preferible el uso de 4-AP en animales despiertos (Ramírez-Munguía y Tapia, 2003; Nishikawa y MacIver, 2000).

2.2 La mitocondria en el proceso excitotóxico

La mitocondria no sólo es un organelo que produce ATP a través de la fosforilación oxidativa, sino además, es un importante regulador de la homeostasis de Ca^{+2} intracelular y también es un organelo productor de ROS. Estas tareas, especialmente su actividad como reservorio de Ca^{+2} , representa un gran riesgo para la integridad estructural y metabólica de este organelo, lo cual puede llevar a las células hasta la muerte (Atlante et al., 2001).

Se ha demostrado que la exposición a altas concentraciones de glutamato resulta en una pérdida del potencial de membrana mitocondrial como consecuencia de su capacidad para almacenar Ca^{+2} . En comparación con la estimulación con kainato o cloruro de potasio, la activación de los receptores NMDA induce una más rápida captura de Ca^{+2} por parte de la mitocondria. Este hecho sugiere que el acceso de Ca^{+2} a la mitocondria posterior a la estimulación de los receptores NMDA pudiera deberse a la proximidad de las mitocondrias a estos receptores en comparación con otras rutas de entrada de Ca^{+2} (Peng y Greenamyre, 1998).

Por lo tanto, cuando se presenta el proceso excitotóxico se atenúa el potencial de membrana mitocondrial y, consecuentemente, se afecta la respiración mitocondrial que da como resultado un incremento en la producción del anión superóxido el complejo III mitocondrial y una disminución en los niveles de ATP; además se facilita la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial y se liberan proteínas mitocondriales pro-apoptóticas que conducen a la fragmentación/condensación del DNA y finalizan con la muerte celular (Ankarcroma et al., 1995; Nicholls et al., 1999; Nicholls y Ward, 2000; Ward et al., 2000). Por lo anterior, la mitocondria es considerado el mediador principal de la muerte neuronal causado por el proceso de excitotoxicidad.

2.3 Sustratos energéticos y neuroprotección

Como se mencionó en páginas anteriores, se ha propuesto que la deficiencia en la función mitocondrial es uno de los mecanismos mediante los cuales el proceso excitotóxico induce muerte neuronal. A pesar de que el efecto de los sustratos energéticos sobre la neurodegeneración inducida por el proceso excitotóxico en modelos *in vivo* en las regiones hipocampales se ha estudiado y publicado en una baja proporción; sigue resultando de gran interés su estudio, ya que nos permite conocer las implicaciones energéticas en el proceso excitotóxico, además de que da paso a la propuesta de nuevas estrategias de neuroprotección para enfermedades donde el proceso excitotóxico y el metabolismo energético celular se ven involucrados.

Se han propuesto diversos mecanismos a través de los cuales los α -cetoácidos, como el piruvato y lactato, logran proteger a las neuronas del proceso excitotóxico. Se demostró que en cultivos de neuronas estriatales expuestas a H_2O_2 durante 30 min, el piruvato previene la muerte neuronal principalmente por la capacidad que tienen los α -cetoácidos para neutralizar al H_2O_2 a través de una descarboxilación no enzimática, y no por favorecer el metabolismo energético. Se llegó a esta conclusión después de observar que el α -cetobutirato, que no es un sustrato energético, logra proteger en la misma proporción a estos cultivos neuronales; por el contrario, el lactato, un sustrato energético muy bien asimilado por las neuronas, no protege del daño producido por el H_2O_2 (Desagher et al., 1997). Trabajando con células humanas de neuroblastoma SK-N-SH se encontró que el co-tratamiento con piruvato disminuye la muerte inducida por la incubación con H_2O_2 . De hecho, la co-incubación de piruvato a concentraciones ≥ 1 mM en el medio de cultivo previene totalmente del efecto citotóxico del H_2O_2 . En este trabajo se poya la hipótesis de que el piruvato tiene actividad citoprotectora debido a su capacidad antioxidante, ya que protege del daño celular a pesar de ser adicionado al medio de cultivo 2 h después de haberlo enfrentado al insulto citotóxico. Adicionalmente, se determinó que el piruvato logra disminuir la producción del anión superóxido en mitocondria y así logra mantener el

potencial de membrana mitocondrial favoreciendo indirectamente la producción energética (Wang et al., 2006) (**Figura 4**).



Figura 4.- Reacción de descarboxilación no enzimática de los α -cetoácidos al neutralizar al H_2O_2 .

La liberación de una gran cantidad de glutamato al espacio extracelular contribuye a la muerte neuronal durante la isquemia cerebral. Utilizando cultivos de neuronas estriatales de ratón, se observó que la privación de glucosa semejante a lo que ocurre en la isquemia cerebral, incrementa la neurotoxicidad inducida con AMPA y NMDA. La adición de piruvato y lactato, protegieron en gran medida de los efectos neurotóxicos. El efecto protector del piruvato, que es más grande en ausencia de glucosa, no se asoció a la actividad de esta molécula para neutralizar al H_2O_2 . De hecho, el piruvato y el lactato lograron mantener los niveles de ATP neuronal durante el proceso excitotóxico, indicativo de que su probable mecanismo de acción es a través de la estabilización del metabolismo energético celular (Maus et al., 1999). Apoyando esta propuesta, Izumi y Zorumski (2010) reportan que la incubación de rebanadas del hipocampo de rata con NMDA disminuye significativamente los niveles de ATP e inhibe gradualmente la actividad de la enzima glucolítica gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (G3PDH). Sin embargo, la adición de piruvato al medio de cultivo logra mantener los niveles normales de ATP y la actividad de la G3PDH, previniendo así del daño neuronal y resaltando una vez más la posibilidad del uso del piruvato como sustrato energético para combatir el daño excitotóxico.

Adicionalmente a la actividad antioxidante y de sustrato energético de los α -cetoácidos, se han propuesto otros mecanismos de acción a través del cual logran proteger del daño excitotóxico. Miao et al., (2011) reportan que el piruvato previene la muerte neuronal inducida por glutamato en cultivos mixtos de neuronas corticales y astrogliá de rata, y no así en cultivos neuronales puros. Esto indica que el mecanismo de protección del piruvato implica la regulación a la alta de la síntesis del antioxidante endógeno glutatión en los

astrocitos, ayudando así a disminuir el estrés oxidante que acompaña al proceso excitotóxico y disminuyendo de esta forma el daño neuronal.

Un grupo de sustratos energéticos cuya actividad neuroprotectora ha sido ampliamente divulgada en los últimos años es la de los cuerpos cetónicos: cetona, acetoacetato (ACAC) y β -hidroxibutirato (BHB); éste último puede ser oxidado por la célula a ACAC (**Figura 5**).

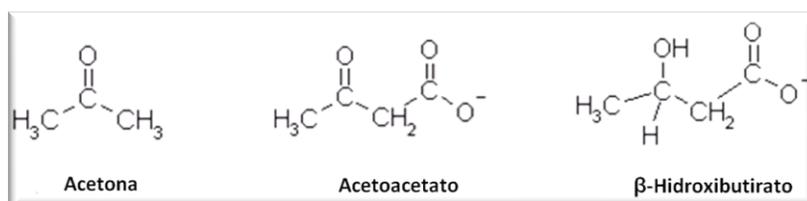


Figura 5.- Estructuras químicas de los cuerpos cetónicos presentes en el organismo humano.

Las principales cetonas en el organismo, el ACAC y el BHB, han mostrado una clara protección de la viabilidad neuronal en modelos de hipoxia, isquemia y otros modelos de degeneración neuronal que involucran al proceso excitotóxico (Dardzinski et al. 2000; Kashiwaya et al. 2000; Suzuki et al. 2001; Veech, 2004; Maalouf et al., 2007, 2008). Incluso, la molécula NTX-0101 (polímero sintético del BHB) ha dado muy buenos resultados en ensayos clínicos al disminuir el daño cognitivo en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Smith et al., 2005). Además, la molécula conocida como Axona (ACC-1201), un suplemento alimenticio que se metaboliza a cuerpos cetónicos, ha sido aprobada recientemente por la Food and Drug Administration en Estados Unidos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en etapas tempranas.

Al igual que en el caso de los α -cetoácidos, aún no es claro el mecanismo de acción de los cuerpos cetónicos para proteger a las neuronas de procesos citotóxicos donde la excitotoxicidad y el estrés oxidante intervienen de manera importante. Por un lado se propone que los cuerpos cetónicos logran favorecer la respiración mitocondrial y la producción energética al actuando como sustratos energéticos. Por otro lado, se propone que es su actividad antioxidante la responsable del efecto protector. Inclusive, se ha

propuesto que los cuerpos cetónicos promueven la regulación a la alta de genes que promoverían la supervivencia celular como Bcl2 o logran disminuir la excitabilidad neuronal al incrementar la expresión y actividad de la GABA-transaminasa (Noh et al., 2006; Cheng et al., 2007; Maalouf et al., 2007; Suzuki et al., 2009; Kim et al., 2010).

En estudios *in vivo* se demostró que la inyección intravenosa de L-BHB disminuye la lesión estriatal y la lipoperoxidación generadas por glutamato (Mejía-Toiber et al., 2006). Este mismo grupo de trabajo demuestra que la actividad antioxidante de los cuerpos cetónicos no es el mecanismo principal a través del cual protegen a las neuronas, ya que el uso del isómero metabólicamente inactivo pero con actividad antioxidante, L-BHB, no protege en la misma proporción que su isómero metabólicamente activo D-BHB (Haces et al., 2006).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las mitocondrias juegan un papel importante en la respuesta de las neuronas a la estimulación excitotóxica. Es relevante conocer la importancia de la participación de estos mecanismos en la degeneración de las neuronas para poder preservar la función mitocondrial y evitar el estrés oxidante en enfermedades en las que la excitotoxicidad esté contribuyendo a la neurodegeneración.

Considerando que la 4-AP logra desencadenar un proceso excitotóxico resultado de una transmisión glutamatérgica exacerbada y conducir a las neuronas a la neurodegeneración, se propone que la facilitación de sustratos energéticos como el piruvato, BHB, α -KG y ACAC pudieran mantener el funcionamiento mitocondrial y disminuir los efectos colaterales de una falla energética, disminuyendo así la neurodegeneración producido por la 4-AP.

4. HIPÓTESIS

El proceso excitotóxico inducido por la administración de 4-AP en el hipocampo produce, entre otras cosas, una deficiencia de la función mitocondrial y trastorno del metabolismo energético, así como la generación de ROS. Estos dos mecanismos participan de manera importante en la muerte de las neuronas en el hipocampo inducida por la 4-AP.

El déficit en la función mitocondrial resultará en una disminución en la producción de ATP, lo cual es parcialmente responsable de la muerte neuronal; por lo que la facilitación de sustratos energéticos como piruvato, BHB, α -KG y ACAC puede contribuir al restablecimiento de la producción energética, y por lo tanto, mantener la homeostasis del calcio y disminuir así la neurodegeneración. Además, la capacidad antioxidante de los sustratos administrados podrá contribuir a disminuir el estrés oxidante y favorecerá la protección contra la neurodegeneración.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si el piruvato, BHB, α -KG y ACAC son capaces de proteger de la neurodegeneración provocada por la administración de 4-AP en el hipocampo de ratas despierta.

Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la administración de 4-AP en el hipocampo de ratas despiertas sobre la actividad EEG a través de su registro con electrodos de campo.
- Establecer el efecto de la 4-AP sobre la concentración de glutamato extracelular en el hipocampo de ratas despiertas a través de un análisis por HPLC.
- Determinar si existe algún efecto de los sustratos energéticos (piruvato, BHB, α -KG y ACAC) sobre la actividad convulsivante de la 4-AP, a través del análisis conductual y registro EEG de ratas en libre movimiento.
- Conocer el efecto del piruvato, BHB, α -KG y ACAC sobre la degeneración neuronal en hipocampo inducida con 4-AP en ratas despiertas.

6. METODOLOGÍA

6.1 Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (220-240 g) procedentes del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Previamente a los experimentos las ratas fueron alojadas en el vivario de la misma institución y se mantuvieron en jaulas de acrílico transparente, con agua y alimento *ad libitum*, temperatura de 24 °C, humedad del 50% y un ciclo de luz-oscuridad de 12Hr.

Todos los procedimientos descritos en este trabajo se realizaron siguiendo los lineamientos de la Guía para el Cuidado de los Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud.

6.2 Cirugía para el implante

Las ratas fueron anestesiadas con isofluorano (0.5-2.0%) en una mezcla de carbógeno (O₂ al 95% y CO₂ al 5%) y fueron colocadas en un aparato estereotáxico para pequeños roedores. Una vez anestesiadas, se realizó un corte de piel para exponer el cráneo y se colocaron 2 tornillos a nivel de la corteza parietal que funcionaron como electrodos en el registro EEG. Posteriormente, se hizo un trépano para la colocación de la cánula guía en el hipocampo dorsal izquierdo con coordenadas anteroposterior -3.6mm, lateralidad +2.4 y ventral -1.6 a partir de Bregma (Paxinos y Watson, 2007). Finalmente, se utilizó acrílico dental para fijar al cráneo los electrodos y la cánula guía.

Para permitir que el tejido se recuperara de los daños mecánicos ocasionado por la manipulación durante la cirugía estereotáxica, el experimento se llevó a cabo 5 días después de haber implantado la cánula.

6.3 Registro electroencefalográfico (EEG)

El registro EEG se llevó a cabo con el objetivo de monitorear la actividad eléctrica en la corteza parietal que, según nuestros antecedentes, refleja la misma actividad eléctrica que el hipocampo (Peña y Tapia, 1999). Para realizar el registro EEG los electrodos implantados se conectaron a un polígrafo marca GRASS con filtros de baja y alta frecuencia de 3 y 100Hz, respectivamente. Todo el registro se llevó a cabo en papel para su posterior análisis.

6.4 Análisis conductual

Durante el registro EEG se observó y registró en papel el efecto conductual producido por los diferentes tratamientos farmacológicos utilizados en este trabajo.

6.5 Microdiálisis

La microdiálisis se llevó a cabo simultáneamente con el registro EEG. Para ello, se colocó dentro de la cánula guía una cánula de microdiálisis (CMA/12 Stockholm, Sweden, 2 mm de longitud x 0.5 mm de diámetro) previamente lavada con agua destilada durante 10 min a un flujo de 10 μ l/min.

Durante un periodo de estabilización de 60 min se perfundió continuamente en el hipocampo una solución Krebs-Ringer (NaCl [118 mM], KH_2PO_4 [1.2 mM], KCl [4.7 mM], MgSO_4 [1.18 mM], NaHCO_3 [25 mM], glucosa [10 mM], CaCl_2 [2.5 mM] a un pH de 7.4) a una flujo de 2 μ l/min, mediante una microjeringa montada en una bomba de microinyección (CMA/100, Carnegie, Sweden). Después del periodo de estabilización se inició la colecta continua de 8 fracciones de microdiálisis cada una de 25 μ l en 12.5 min, a menos que se indique lo contrario. Las primeras 4 fracciones colectadas sirvieron para determinar los niveles basales de glutamato. Durante la quinta y sexta fracción se administró 4-AP [7mM] disuelta en medio Krebs-Ringer, reduciendo la concentración de NaCl para mantener la osmolaridad y ajustando el pH a 7.4. Finalmente se perfundió solución Krebs-Ringer durante las últimas 4 fracciones de microdiálisis.

Los cuatro sustratos energéticos usados en este proyecto fueron el piruvato [20 mM], α -cetoglutarato (α -KG) [20mM], L- y DL-BHB [20 y 50 mM] y ACAC [20 mM]. Las concentraciones a utilizar fueron seleccionadas en base a trabajos previos en nuestro laboratorio (Corona y Tapia, 2007; Santa-Cruz, 2009). Cada sustrato energético por separado se perfundió a través de la cánula de microdiálisis desde la estabilización hasta completar las 10 fracciones. En cada caso, se modificó la concentración de NaCl para mantener la osmolaridad y se ajustó el pH a 7.4. Cabe mencionar que en cada grupo experimental siempre se procuró contar con un animal como control positivo usando 4-AP [7 mM]. Asimismo se evaluaron los respectivos grupos controles (Krebs-Ringer o sustrato energético solo).

6.6 Análisis histológico

Veinticuatro horas después de realizar el experimento, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico para ser perfundidos intracardiamente 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). Terminada la perfusión, los cerebros fueron extraídos y colocados en formaldehído durante un periodo de 24 h a 4 °C. Posteriormente se realizó la deshidratación del tejido al colocarlos en soluciones de sacarosa al 10, 20 y 30%. A continuación, se realizaron cortes coronales seriados con un grosor de 40 μ m utilizando un criostato. Los cortes fueron teñidos con violeta de cresilo para confirmar la correcta localización de la cánula de microdiálisis, así como para el análisis de la morfología neuronal. Sólo se consideraron para este trabajo los resultados de animales que presentaron una correcta localización de la cánula en la región CA1 del hipocampo dorsal izquierdo. El conteo de neuronas sanas, identificadas como aquellas con un diámetro mayor a 15 μ m, citoplasma claro y morfología similar a la de las ratas control se llevó a cabo en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo. El conteo neuronal se realizó en un campo de 30,000 μ m² con la ayuda del sistema analizador de imagen (NIH Image 1.6). Todos los conteos neuronales fueron del tipo ciego simple y al menos 3 cortes diferentes fueron analizados por cada animal de experimentación.

6.7 Cuantificación de aminoácidos

La cuantificación de los aminoácidos se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipado con una columna ODS (25cm x 4mm i.d.) y acoplado a un detector de fluorescencia como se describe en el trabajo de Massieu et al. (1995). Los 25 µl colectados en cada fracción se mezclaron con un volumen igual de o-ftaldialdehído (OPA) durante 3 min. Enseguida, ésta solución fue inyectada en el cromatógrafo 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% de acetato de potasio y 75% metanol. La detección se llevó a cabo por la medición de fluorescencia del derivado de OPA a 330 nm de excitación y 460 nm de emisión. El análisis cuantitativo del glutamato se llevó a cabo por comparación con un estándar de concentración conocida.

7. RESULTADOS

Los resultados que se presentan en este trabajo muestran los datos de grupos de animales ($n \geq 7$ ratas) que fueron realizados a la par de un control positivo con 4-AP [7 mM]. Adicionalmente a los grupos que se presentan en las gráficas, se realizaron grupos controles para cada uno de los sustratos energéticos (perfusión intrahipocampal de solución Krebs-Ringer + sustrato energético). Ninguno de los grupos controles presentó alteraciones en los parámetros evaluados.

Registro EEG

En nuestro laboratorio se ha reportado que la actividad EEG de ratas en libre movimiento presenta ondas de baja amplitud (Ramírez-Munguía et al., 2003). Este tipo de registro coincide con el que se obtuvo en nuestros experimentos durante las fracciones basales de todos nuestros grupos (**Figura 6**).

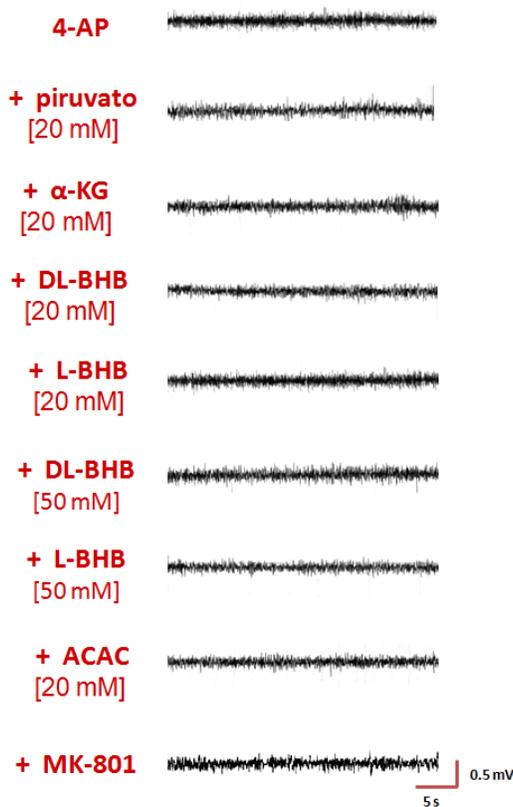


Figura 6.- Trazos representativos en el registro EEG durante la recolección de las fracciones de microdiálisis basales de ratas en libre movimiento.

En cuanto se administró la 4-AP [7 mM] el registro EEG se modificó y se presentaron descargas epileptiformes con una actividad hipersincrónica inicial, seguida por trenes de espigas de alta amplitud que incrementan su frecuencia hasta el establecimiento del estado epiléptico que se mantuvo hasta 2 h después de la perfusión de 4-AP. La co-perfusión de los sustratos energéticos con 4-AP no modificó los trazos del registro EEG (Figura 7).

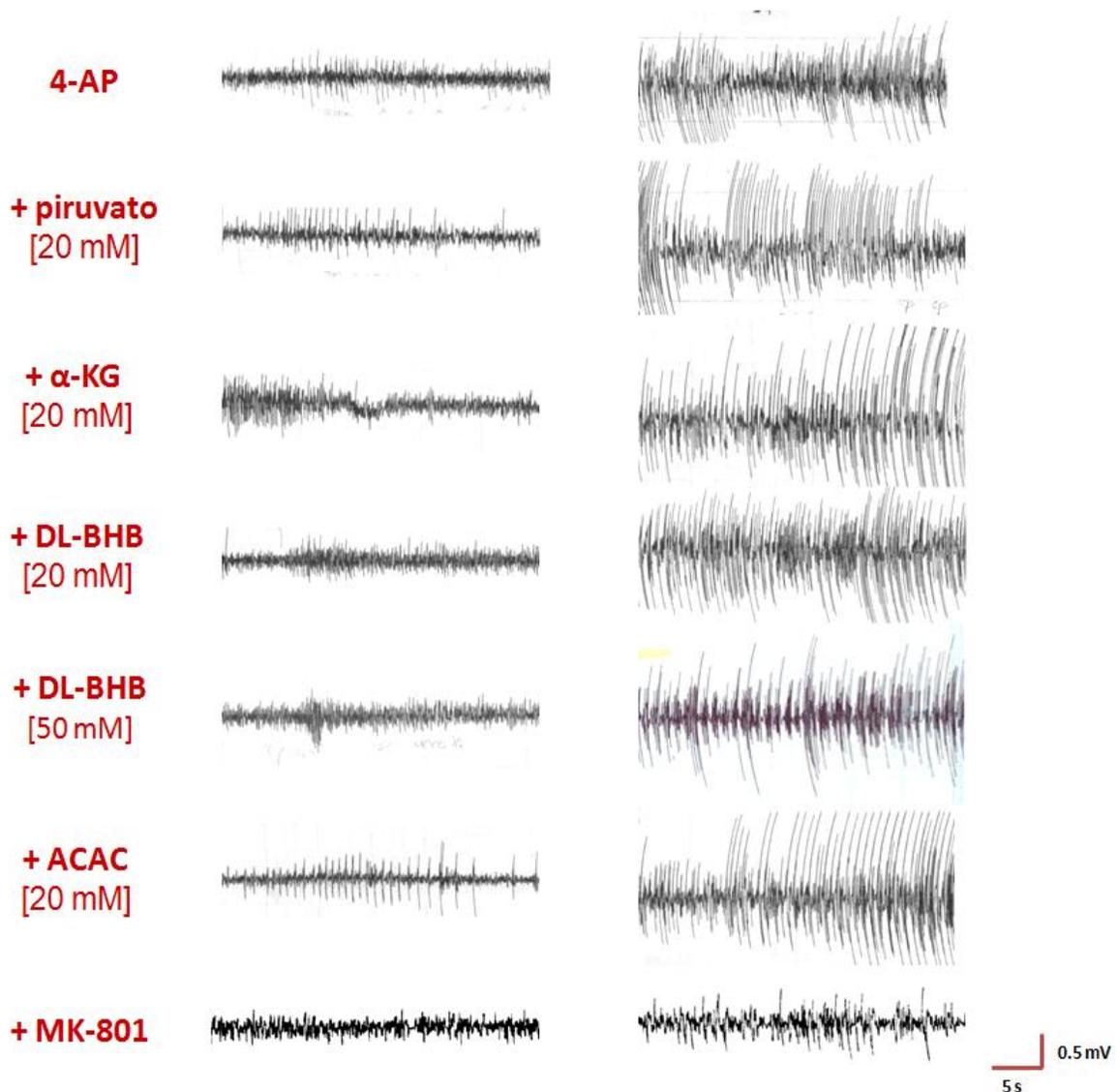


Figura 7.- Trazos representativos en el registro EEG a los 20 y 60 min después de haber perfundido la 4-AP [7 mM] en el hipocampo de ratas en libre movimiento. En el minuto 20 se presentan las espigas hipersincrónicas características de las crisis epilépticas y en el minuto 60 se observa un estado epiléptico establecido en todos los grupos.

Como se mencionó anteriormente, la perfusión intrahipocampal de 4-AP [7 mM] generó crisis epilépticas en los animales (tiempo de latencia a la primera crisis 19 ± 0.7 min) hasta establecerse el estado epiléptico (26 ± 0.8 min). El MK-801 incrementó significativamente la latencia para la primera crisis (25 ± 2.7 min) y retardó o previno el estado epiléptico (41 ± 1.6 min). Los grupos DL-BHB [20 mM], DL-BHB [50 mM], L-BHB [50 mM] y ACAC [20 mM] presentan un incremento significativo en el tiempo de latencia para el estado epiléptico (33.7 ± 2.0 , 32.6 ± 1.3 , 33.1 ± 1.6 , 33.8 ± 2.0 , respectivamente) (**Figura 8**).

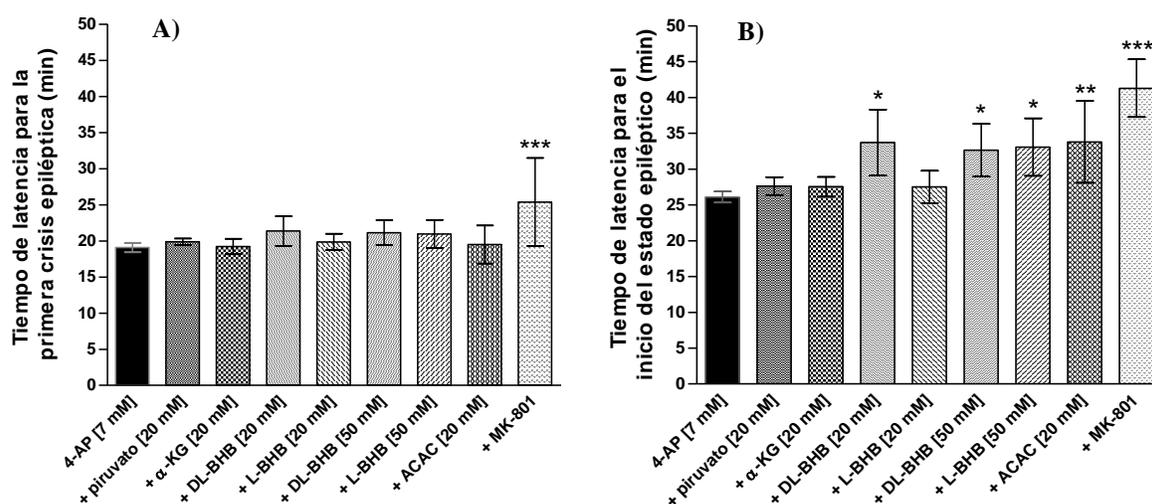


Figura 8.- A) Tiempo de latencia para la primera crisis epiléptica y **B)** el estado epiléptico inducido por la perfusión de 4-AP [7 mM] en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Los datos representan la media \pm ES de un total de $n \geq 7$ animales por grupo. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía, Tukey post-hoc * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Al cuantificar el número de crisis epilépticas en el registro EEG podemos observar que existen 3 grupos de sustratos: a) Aquellos que no modifican el número de crisis inducidas con 4-AP [7 mM], B) los sustratos que retarda significativamente la llegada del estado epiléptico y C) el grupo que retarda en gran medida o previene es establecimiento del estado epiléptico (**Figura 9**).

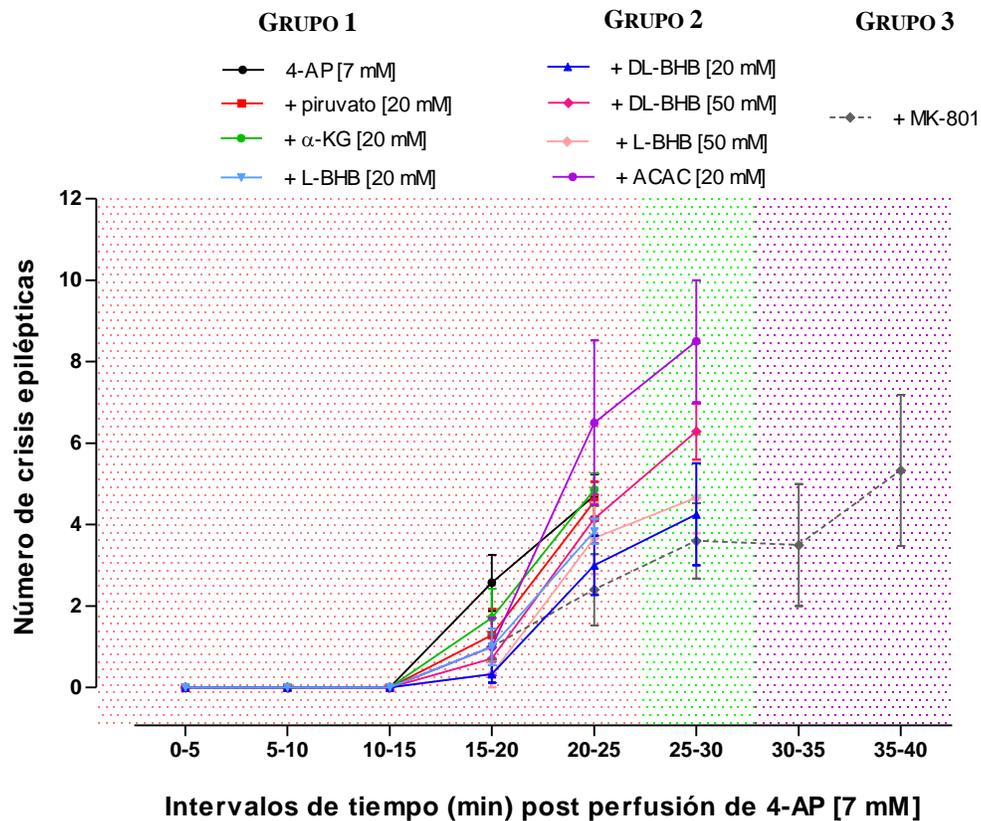


Figura 9.- Número de crisis epilépticas en el registro EEG. La eliminación de la línea que une a los puntos en la gráfica indica el inicio del estado epiléptico. Se observa la presencia de tres grupos de sustratos: **GRUPO 1** (fondo color rosa) aquellos que no modifican el número de crisis inducidas con 4-AP [7 mM], **GRUPO 2** (fondo color verde) los sustratos que retarda significativamente la llegada del estado epiléptico (verde) y **GRUPO 3** (fondo color morado) grupo en que se retarda en gran medida o previene el estado epiléptico).

Análisis conductual

La aparición de descargas en el EEG coincide con diversas alteraciones conductuales. Los animales presentan principalmente un incremento en su acicalamiento, movimientos masticatorios y de vibrisas, respiración agitada, piloerección, sacudidas de cabeza y de rata mojada, hipersalivación y secreción nasal abundante. En menor proporción se presentó rigidez de la cola, así como parpadeo mioclónico, movimientos tónico clónicos de las extremidades delanteras, así como rigidez de las extremidades traseras.

Ninguno de los sustratos energéticos alteró la conducta de los animales. Únicamente el antagonista MK-801 disminuyó la actividad motora de los animales desde su administración i.p., durante y después de la perfusión de 4-AP.

Concentración extracelular de aminoácidos

Al contrario de lo reportado en ratas anestesiadas, al recolectar fracciones de microdiálisis de 25 μ L en 12.5 min no se observó un incremento significativo en los niveles de glutamato del grupo 4-AP [7 mM] con respecto a sus fracciones basales o al grupo Krebs-Ringer. Del mismo modo, no se encontró diferencia entre el grupo 4-AP y el resto de los sustratos energéticos (**Figura 10**).

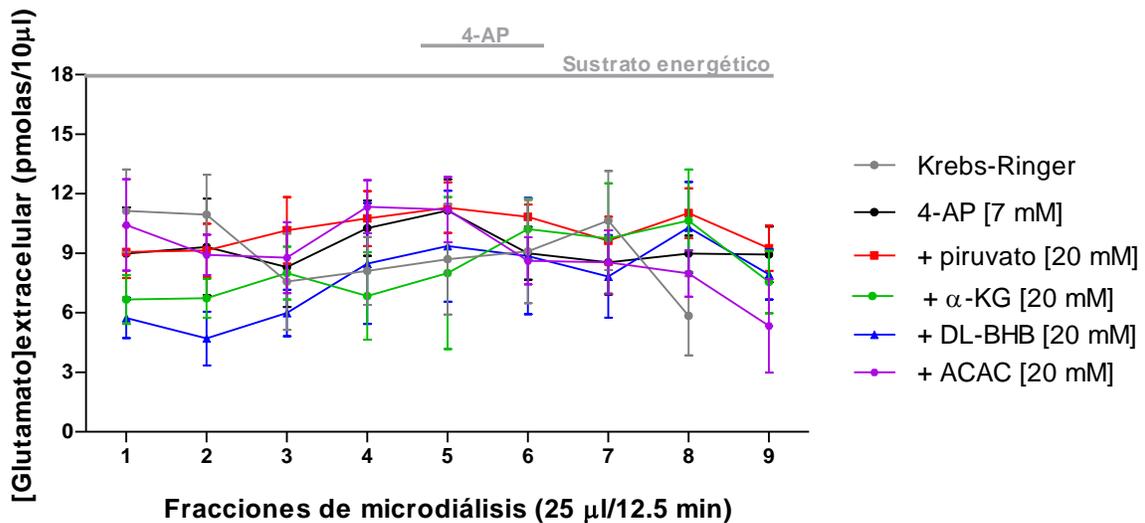


Figura 10.- Efecto de la perfusión de 4-AP y los sustratos energéticos sobre la concentración extracelular de glutamato durante nueve fracciones (25 μ l/12.5min) de microdiálisis consecutivas en el hipocampo de ratas en libre movimiento. La barra horizontal color gris indica las fracciones durante las que se perfundió la 4-AP y los sustratos energéticos. Los datos representan la media \pm ES de un total de $n \geq 7$ animales por grupo.

Posteriormente se analizaron fracciones de 12.5 μ L en 6.25 min de dos grupos experimentales: 4-AP [7 mM] y Krebs-Ringer. La concentración extracelular de glutamato en el grupo 4-AP presenta un incremento del 71.39 ± 1.6 % con respecto a sus basales, y del 79.2 ± 2.3 % con respecto al grupo Krebs-Ringer (**Figura 11**).

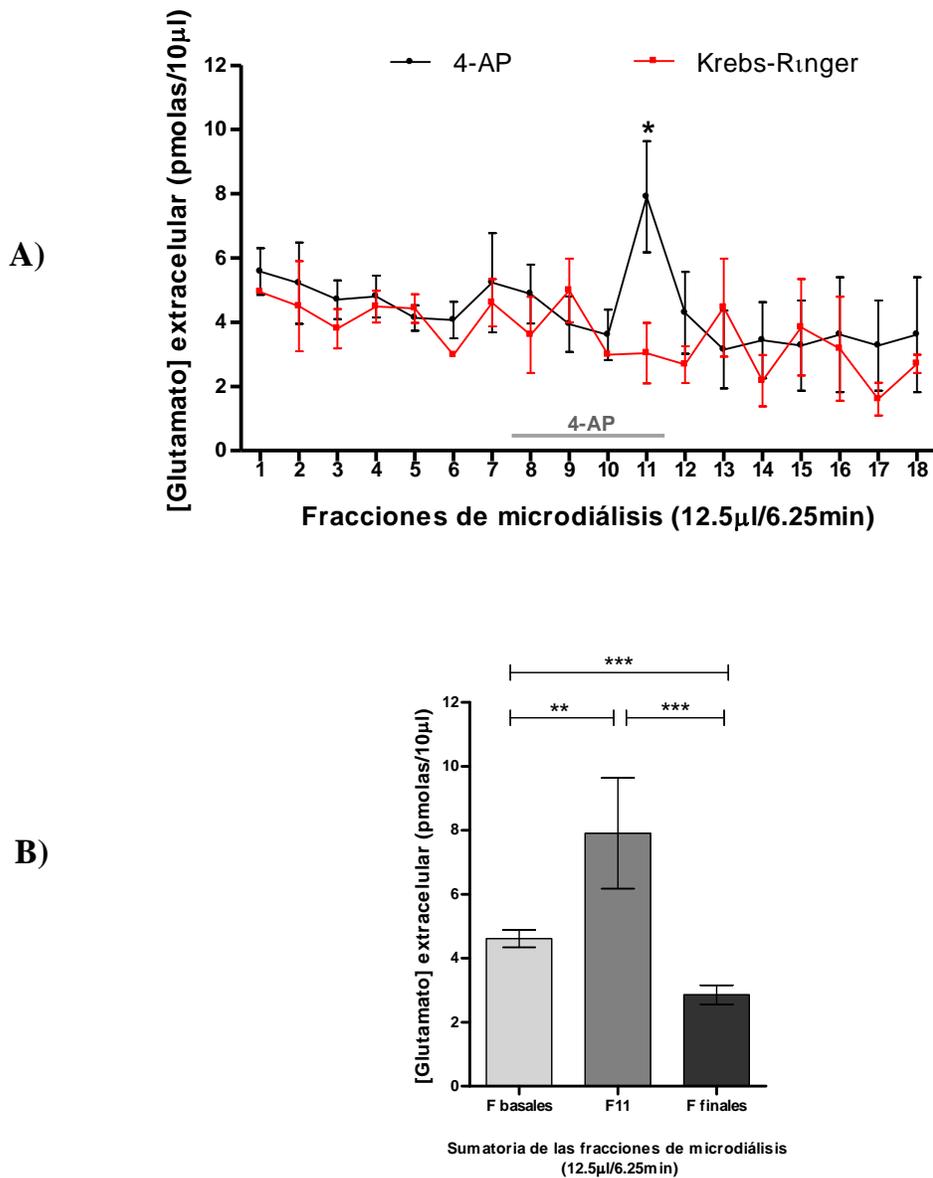


Figura 11.- Efecto de la perfusión de 4-AP sobre la concentración extracelular de glutamato. **A)** Concentración extracelular de glutamato durante 18 fracciones de microdialisis (12.5µl/6.25min) consecutivas en el hipocampo de ratas en libre movimiento. La barra horizontal color gris indica las fracciones durante las que se perfundió la 4-AP. **B)** Concentración extracelular de glutamato en las fracciones basales, en la fracción 11 y las fracciones finales. Los datos representan la media \pm ES de un total de $n \geq 7$ animales por grupo. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía, Tukey post-hoc * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Análisis histológico

La perfusión de 4-AP induce muerte neuronal en la región CA1 (83.7 ± 0.9 % de muerte neuronal en comparación con el control) y CA3 (61.7 ± 1.6 %). En la región CA2 no se presenta daño neuronal (**Figura 12**).

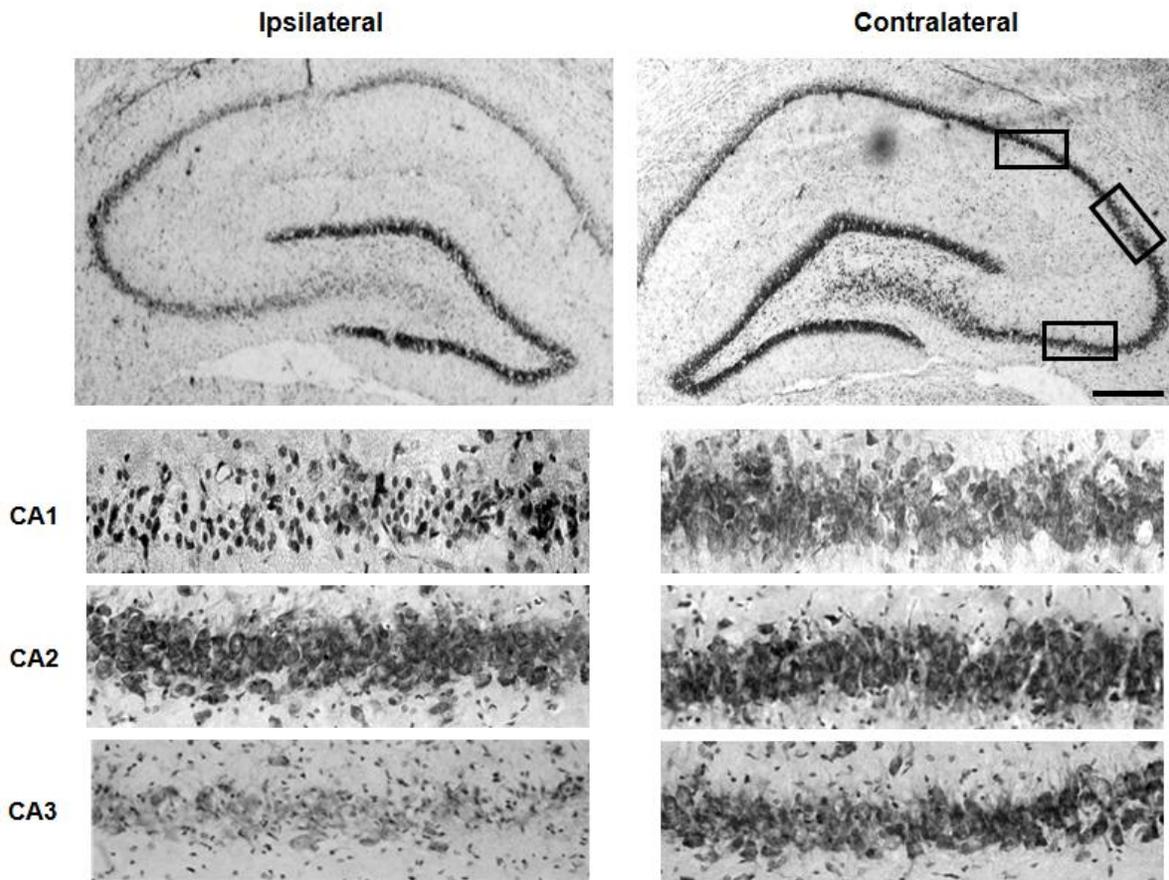


Figura 12.- Micrografías representativas del efecto de la perfusión de 4-AP en el hipocampo. Se muestra la región CA1, CA2 y CA3 del lado ipsi y contralateral a la cánula de microdiálisis. La barra horizontal negra corresponde a 500 µm. En la parte inferior se muestra un aumento correspondiente a 200 µm de las áreas marcadas por el recuadro.

Como se mencionó anteriormente, la perfusión de 4-AP [7 mM] no modificó el número de neuronas sanas en la región CA2 del hipocampo. Ninguno de los sustratos energéticos modificó el conteo neuronal en esta área (**Figura 13**).

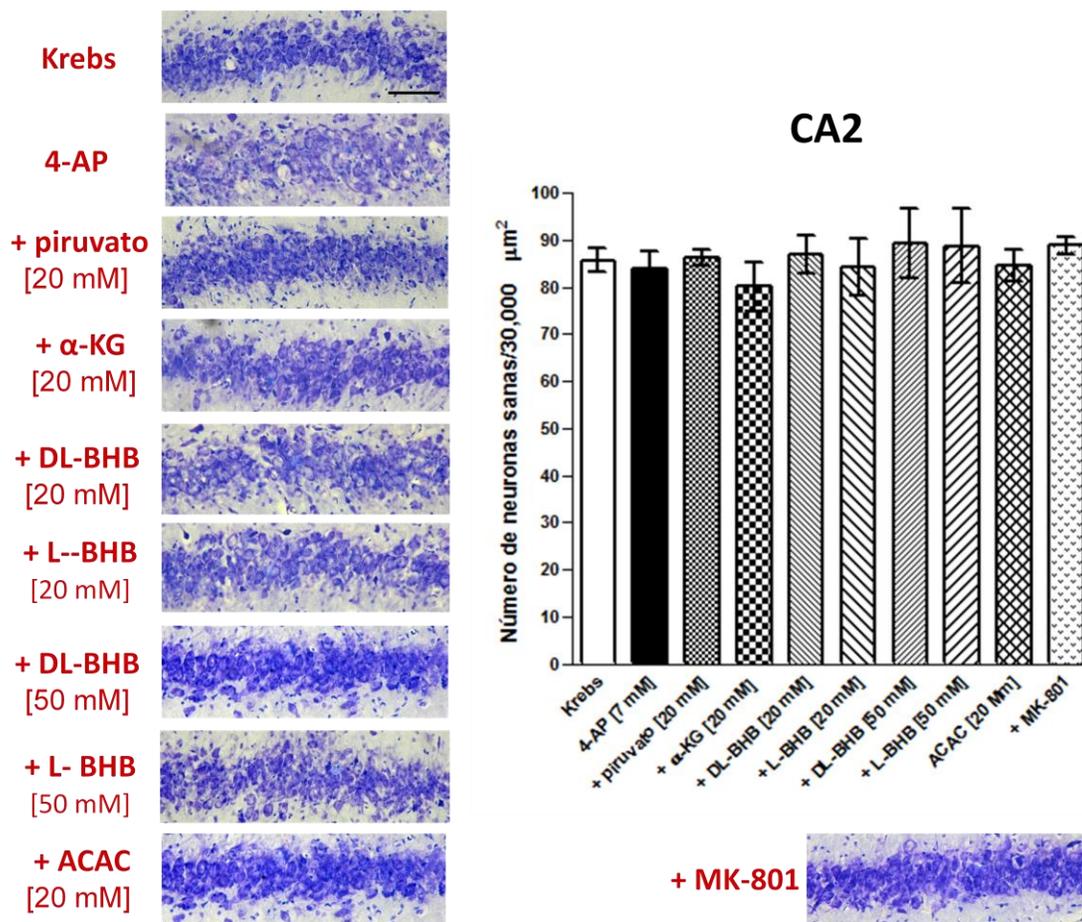


Figura 13.- Efecto de la 4-AP y su combinación con los sustratos energéticos sobre el número de neuronas sanas en la región CA2 del hipocampo. También se muestran micrografías representativas del área CA2 para cada grupo experimental. La barra negra corresponde a 50 μm . Los datos en la gráfica representan la media \pm ES de un total de $n \geq 7$ animales por grupo. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y no se encontró diferencia significativa entre ellos.

La 4-AP generó un 83.7 % de muerte neuronal en la región CA1. La administración i.p. de MK-801 protegió en su totalidad contra la neurodegeneración generada por 4-AP en la región CA1. En esta zona hipocampal los grupos con piruvato [20 mM], α -KG [20 mM], DL-BHB [20 mM], L-BHB [20 mM], DL-BHB [50 mM], L-BHB [50 mM] y ACAC [20 mM] disminuyeron la muerte neuronal a 40.2 \pm 2.8 %, 51.1 \pm 3.8 %, 48.8 \pm 3.1 %, 70.2 \pm 1.1 %, 52.8 \pm 1.8 %, 66.3 \pm 4.6 %, 52.3 \pm 1.7 %, respectivamente (**Figura 14**).

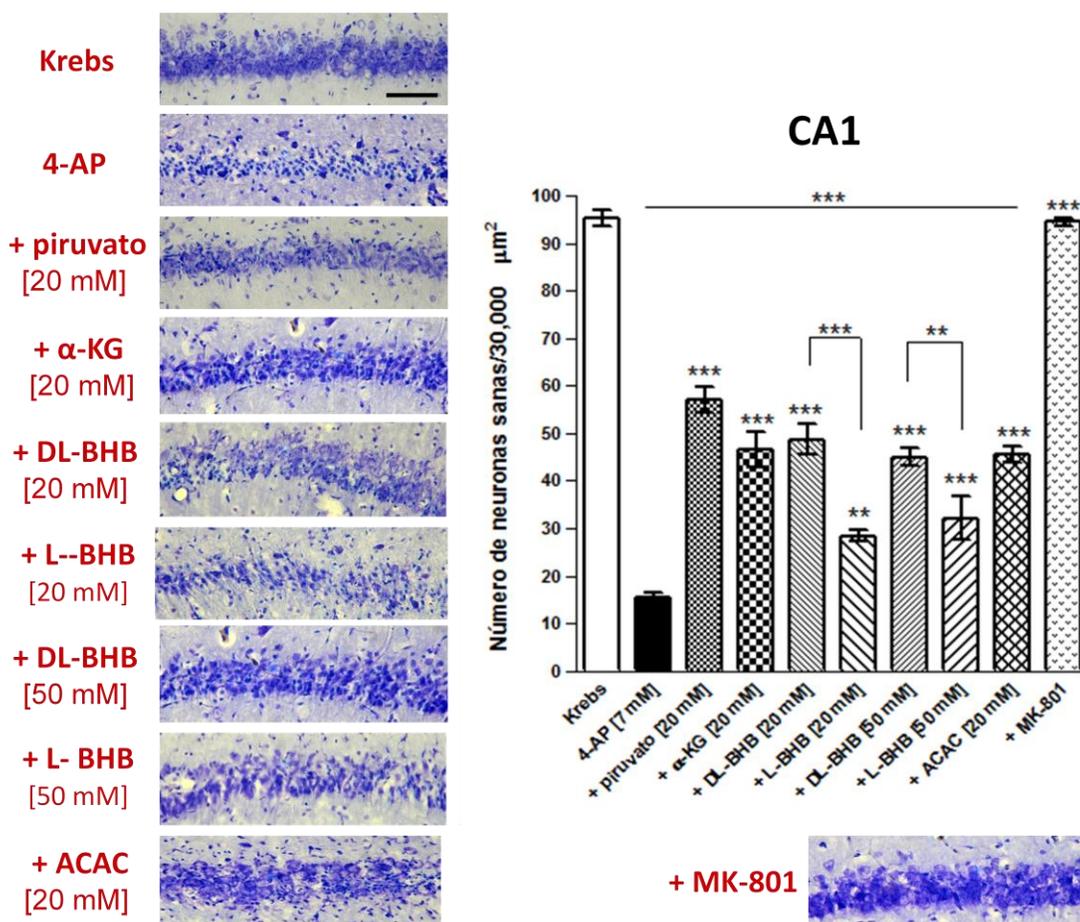


Figura 14.- Efecto de la 4-AP y su combinación con los sustratos energéticos sobre el número de neuronas sanas en la región CA1 del hipocampo. También se muestran micrografías representativas del área CA1 para cada grupo experimental. La barra negra corresponde a 50 μm . Los datos en la gráfica representan la media \pm ES de un total de $n \geq 7$ animales por grupo. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía, Tukey post-hoc * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En la región CA3 la 4-AP indujo un 61.7 % de muerte neuronal. El MK-801 protegió completamente a la región CA3 de la neurodegeneración. En esta región hipocampal la protección por parte de los sustratos energéticos fue más variable que en la región CA1. Los grupos con piruvato [20 mM], α -KG [20 mM], DL-BHB [20 mM] y DL-BHB [50 mM] disminuyeron la muerte neuronal a 24.7 ± 2.8 %, 33.5 ± 5.4 %, 20.33 ± 4.1 % y 38.3 ± 1.0 %, respectivamente. El isómero L-BHB [20 y 50 mM] y el ACAC [20 mM] no protegieron de la neurodegeneración en CA3. Cabe mencionar que tanto en CA1 como en CA3, el isómero DL- del BHB ejerce significativamente mayor protección con respecto al isómero L- (Figura 15).

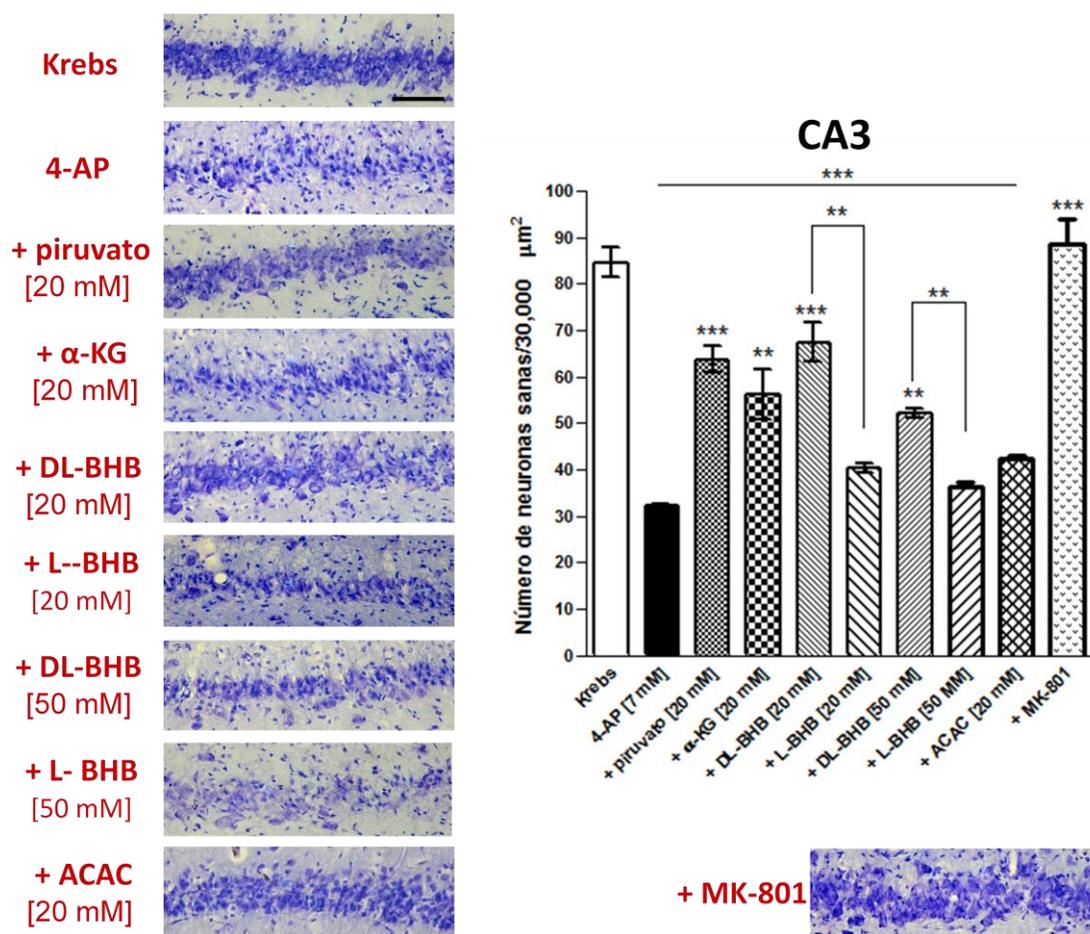


Figura 15.- Efecto de la 4-AP y su combinación con los sustratos energéticos sobre el número de neuronas sanas en la región CA3 del hipocampo. También se muestran micrografías representativas del área CA3 para cada grupo experimental. La barra negra corresponde a 50 μm . Los datos en la gráfica representan la media \pm ES de un total de $n \geq 7$ animales por grupo. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía, Tukey post-hoc * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

8. DISCUSIÓN

La perfusión de 4-AP [7 mM] en el hipocampo de ratas despiertas induce, de forma casi inmediata, crisis epilépticas cuya frecuencia se incrementa hasta establecerse un estado epiléptico. Las crisis epileptiformes en el registro EEG coinciden con modificaciones conductuales en las ratas. Estos datos nos permiten resaltar la importancia de nuestro trabajo con animales en libre movimiento, pues no sólo evitamos interferencias de los anestésicos que nos obligan a usar concentraciones muy elevadas de la 4-AP, sino además, tenemos la posibilidad de correlacionar la actividad eléctrica cerebral con la conducta de los animales (Peña y Tapia, 1999; Vera, 2005).

El uso del MK-801, antagonista de los receptores NMDA, nos permitió corroborar que el efecto epileptogénico de la 4-AP es parcialmente dependiente de la liberación de glutamato, pues el uso de MK-801 previno parcialmente la llegada del estado epiléptico en 2 de 5 ratas. Este resultado nos indica que la otra parte responsable del efecto epileptogénico de la 4-AP se debe a su actividad como bloqueador inespecífico de los canales de K⁺.

De forma tardía, la 4-AP [7 mM] genera muerte neuronal de las células piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. La resistencia de la región CA2 al efecto neurotóxico de la 4-AP se asocia a que las células de esta región cuentan con una mayor concentración de parvalbúmina y calbindina, proteínas de unión a calcio (Witter y Amaral, 2004). De esta forma, el incremento de calcio intracelular que se requiere para el proceso excitotóxico, es controlado por estas proteínas de unión a calcio y así se evita la progresión del daño neuronal mediado por la 4-AP en la región CA2. En este trabajo también logramos corroborar que el proceso de neurodegeneración inducido por la 4-AP es un evento completamente dependiente de la activación de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA. Esto lo sabemos porque el uso de MK-801, antagonista del receptor NMDA, previene por completo de la muerte neuronal inducida por la 4-AP en el hipocampo.

Adicionalmente, evidenciamos que la 4-AP [7 mM] en el hipocampo de ratas en libre movimiento incrementa de forma transitoria y en menor proporción los niveles de glutamato extracelular, en comparación con una rata anestesiada. Estos resultados nos indican que la anestesia afecta considerablemente la señalización glutamatérgica, especialmente la regulación de los niveles de glutamato extracelular. Nishikawa y MacIver (2000) reportan que en rebanadas de hipocampo los anestésicos como el isofluorano y el halotano disminuyen la liberación de glutamato de las terminales sinápticas. Si así sucediera en el animal despierto habríamos detectado una elevada concentración de glutamato al administrar la 4-AP; sin embargo, los resultados fueron completamente lo contrario. Una diferencia muy importante entre lo que estos autores reportan y lo que nosotros obtuvimos, es que nuestro trabajo se realizó en ratas vivas en libre movimiento. Con este importante detalle hay que considerar la posibilidad de que en el SNC de un animal despierto, los sistemas que regulan el funcionamiento neuronal se encuentran en mayor actividad, logrando incluso, ser capaces de prevenir el incremento mantenido en las concentraciones de glutamato extracelular a pesar de la presencia de 4-AP. Ahora bien, a pesar del leve incremento en los niveles de glutamato, comprobamos que esta breve y transitoria elevación de glutamato es suficiente para producir neurodegeneración en el hipocampo. Esto, debido quizás, a la alta sensibilidad del hipocampo a las señales glutamatérgicas, resultado de su alta densidad de receptores a este neurotransmisor (Cotman et al., 1987; Monyer et al., 1994).

En lo que respecta al efecto de los sustratos energéticos sobre el efecto epileptogénico de la 4-AP, resultó sorpresivo que los cuerpos cetónicos L-, DL-BHB y ACAC, atrasaran significativamente la llegada del estado epiléptico. Ya se ha reportado el efecto antiepiléptico de los cuerpos cetónicos tanto en modelos animales como en humanos, sin embargo, aún sigue sin quedar claro el mecanismo de acción a través del cual se logra este efecto (Bough y Eagles, 1999; Bough et al., 2006, 2007; Suzuki et al., 2009). Considerando que el tratamiento que damos con cuerpos cetónicos es de tipo agudo, y que a pesar de ello se observa ya un efecto antiepiléptico, podemos descartar, con reserva, aquellas

propuestas que indican que los cuerpos cetónicos tienen actividad antiepiléptica al regular a la alta algunos genes de interés como la GABA-Transaminasa (Suzuki et al., 2009). Del mismo modo, con nuestros resultados y las condiciones experimentales usadas, es imposible apoyar la hipótesis de que los cuerpos cetónicos ejercen un efecto antiepiléptico debido a su capacidad para proteger preferencialmente a las neuronas inhibitoras al inducir biogénesis mitocondrial en ellas (Bough et al., 2006). Por otro lado, nuestros resultados apoyan parcialmente aquellas hipótesis como la de Juge et al., (2010), donde se propone que el ACAC ejerce una actividad alostérica negativa sobre el transportador vesicular de glutamato, disminuyendo así la liberación de este neurotransmisor y, consecuentemente, reduciendo los disparos neuronales. A pesar de estas propuestas, aún queda sin explicarse el por qué el isómero L-BHB, molécula que no puede ser oxidada a ACAC, logra atrasar la llegada del estado epiléptico. Quizás, este efecto esté relacionado a la actividad antioxidante del L-BHB y una posible protección preferencial por neuronas inhibitoras.

Con respecto al efecto protector de los sustratos energéticos sobre la neurodegeneración inducida con 4-AP, los resultados indican que todos los sustratos, incluyendo aquellos metabólicamente inactivos, protegen de la muerte neuronal, pero lo hacen en diferentes proporciones. En la región CA1 y CA3 el sustrato que ejerce una mayor protección es el piruvato [20 mM]. A continuación le siguen en conjunto el α -KG [20 mM], DL-BHB [20 y 50 mM] y ACAC [20 mM]. Finalmente, el sustrato que ejerció menor protección en CA1 y que inclusive no logró proteger de la muerte neuronal en CA3, es el isómero L-BHB (**Figura 16**).

Sustrato	Retardan estado epiléptico	Neuroprotección	Capacidad antioxidante	Metabólicamente activo
Piruvato	-	+++	H ₂ O ₂	Si
α -cetoglutarato	-	++	H ₂ O ₂	Si
D- β -Hidroxiacetato	+	++	\cdot OH, HOCl, ONOO \cdot , 1 O ₂	Si
L- β -Hidroxiacetato	+	+	\cdot OH	No
Acetoacetato	+	++	\cdot OH, HOCl, ONOO \cdot , 1 O ₂	Si

Figura 16.- Tabla que resume parcialmente los resultados obtenidos en este trabajo.

Los resultados nos indican que si L-BHB protegió parcialmente de la neurodegeneración, es porque su actividad para neutralizar al radical $\cdot\text{OH}$ es importante pues podría estar ayudando a disminuir el proceso oxidante y, consecuentemente, el deterioro neuronal. Este resultado también resalta la importancia del radical hidroxilo en el mecanismo de daño inducido con la 4-AP y, consecuentemente, en el proceso excitotóxico.

Por otro lado, aquellos sustratos metabólicamente activos muestran mayor protección en comparación con aquellos que sólo actúan como antioxidantes. Esto indica que los sustratos metabólicamente activos pudieran ser incorporados al metabolismo energético celular y colaborar con la producción de ATP favoreciendo el estado energético celular que, aunado a su actividad antioxidante, disminuiría el daño celular y favorecería en mayor proporción la supervivencia neuronal. Este último resultado nos indica claramente que el metabolismo energético celular se ve comprometido durante el proceso excitotóxico.

9. CONCLUSIONES

La excitotoxicidad inducida por la 4-AP en ratas despiertas es mediada por una neurotransmisión glutamatérgica excesiva que sobreactivación, particularmente, al receptor NMDA. También encontramos que el estrés oxidante, resaltando la participación del radical hidroxilo, así como la disfunción energética mitocondrial están involucrados en el mecanismo de neurodegeneración inducido por la 4-AP.

Con nuestros resultados sabemos ahora que el suministro a las células de sustratos que cuentan con la capacidad de realizar ambas tareas, como antioxidante y sustrato energético, favorecerá en una mayor proporción la protección de la célula ante el proceso excitotóxico incrementando así la supervivencia celular.

Los datos que reportamos dan la pauta para que las nuevas estrategias terapéuticas contra el proceso excitotóxico se enfoquen en mecanismos que favorezcan la disminución del estrés oxidante e incrementen la producción energética.

10. AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Dr. Ricardo Tapia por aceptarme en su laboratorio y permitirme trabajar bajo su tutela.

A CONACyT por otorgarme una beca durante mis estudios de Maestría.

Y a las instituciones que financiaron el presente proyecto:

CONACyT (60322)

DGAPA, UNAM (IN215610)

11. REFERENCIAS

- Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med Suppl* 10:S18-S25.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, et al. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15:961-73.
- Arundine M y Tymianski M (2003) Molecular mechanism of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell calcium* 34:325-37.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, et al. (2001) Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* 497:1-5.
- Ayala G y Tapia R (2003) Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus in vivo. *Neuropharm* 45:649-60.
- Ayala G y Tapia R (2005) Late NMDA receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Eur J Neurosci* 22:3067-76.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, et al. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7:613-20.
- Bough KJ y Eagles DA (1999) A ketogenic diet increases the resistance to pentylenetetrazole-induced seizures in the rat. *Epilepsia* 40(2):138-43.
- Bough KJ y Rho JM (2007) Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia* 48(1):43-58.
- Bough KJ, Wetherington J, Hassel B, Pare JF, et al. (2006) Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann Neurol* 60(2):223-35.
- 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* 16:2044-56.
- Cartmell J y Schoepp DD (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* 75:889-907.
- Cheng B, Yang X, Hou Z, Lin X, et al. (2007) D-beta-hydroxybutyrate inhibits the apoptosis of PC12 cells induced by 6-OHDA in relation to up-regulating the ratio of Bcl-2/Bax mRNA. *Auton Neurosci* 134(1-2):38-44.
- Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11(10):465-9.

- Cotman CW, Monaghana DT, Ottersenb OP, Storm-Mathisenb J (1987) Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends in Neurosciences* 10(7):273-80.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-35.
- Dardzinski BJ, Smith SL, Towfighi J, Williams GD, et al. (2000) Increased plasma beta-hydroxybutyrate, preserved cerebral energy metabolism, and amelioration of brain damage during neonatal hypoxia ischemia with dexamethasone pretreatment. *Pediatr Res* 48:248–55.
- Desagher S, Glowinski J, Prémont J. (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 17(23):9060-7.
- Dingledine R y Bennett JA (1994) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14:373-84.
- Dingledine R y Bennett JA (1994) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14:373-84.
- Erecinska M, y Silver IA (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 35:245-96.
- Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42:1-11.
- Fremeau RT Jr, Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH (2004). VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27:98-103
- Haces ML, Hernández-Fonseca K, Medina-Campos ON, Montiel T, et al. (2008) Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol* 211(1):85-96.
- Halliwel B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-58.
- Hassel B y Dingledine R (2006) Glutamate. In: *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects* (Siegel GJ, Albers RW, Brady AT, et al. eds) Capitulo 15. (Séptima edición) Elsevier Academic Press.
- Hollman M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-3.
- Izumi Y y Zorumski CF (2010) Neuroprotective effects of pyruvate following NMDA-mediated excitotoxic insults in hippocampal slices. *Neurosci Lett* 478(3):131–5.

- Johnson JW y 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.
- Juge N, Gray JA, Omote H, Miyaji T, et al. (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 68(1):99-112.
- Kashiwaya Y, Takeshima T, Mori N, Nakashima K, et al. (2000) D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5440-4.
- Kim DY, Vallejo J, Rho JM (2010) Ketones prevent synaptic dysfunction induced by mitochondrial respiratory complex inhibitors. *J Neurochem* 114:130-41.
- Lau A y Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Eur J Physiol* 460:525-42.
- Maalouf M y Rho JM (2008) Oxidative impairment of hippocampal long-term potentiation involves activation of protein phosphatase 2A and is prevented by ketone bodies. *J Neurosci Res* 86:3322-30.
- Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY et al. (2007) Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145:256-64.
- Martin J (1998) *Neuroanatomía*. (Segunda edición) Prentice Hall.
- 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* 64:2262-72.
- Mattson MP (2007) Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6(3):337-50.
- Maus M, Marin P, Israel M, Glowinski J, et al. (1999) Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11(9):3215-24.
- McDonald JF, Xiong XG, Lu WY, et al. (1998) Modulation of NMDA receptors. *Prog Brain Res* 116:191-208.
- Mejía-Toiber J, Montiel T, Massieu L (2006) D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition *in vivo*. *Neurochem Res* 31(12):1399-408.
- Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130: 1007S-15S.
- Miao Y, Qiu Y, Lin Y, Miao Z, et al. (2011) Protection by pyruvate against glutamate neurotoxicity is mediated by astrocytes through a glutathione-dependent mechanism. *Mol Biol Rep* 38(5):3235-42.
- Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, et al. (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 24:2633-42.

- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, et al. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12(3):529-40.
- Morales-Villagran A, Ureña-Guerrero, Tapia R (1996) Protection by NMDA receptor antagonist against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur J Pharmacol* 305:87-93.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
- Neki A, Ohishi H, Kaneko T, Shigemoto R, et al. (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.
- Nicholls DG y Ward MW (2000) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci* 23:166–74.
- Nicholls DG, Budd SL, Ward MW, Castilho RF (1999) Excitotoxicity and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 66:55-67.
- Nishikawa K, MacIver MB (2000) Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA receptors is more sensitive to isoflurane than are non-NMDA receptor-mediated responses. *Anesthesiology* 92(1):228-36.
- Noh HS, Hah YS, Nilufar R, Han JH, et al. (2006) Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci Res* 83:702–9.
- Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719–21.
- O'Shea RD (2002) Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:1018–23.
- Paxinos G y Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (Sexta edición) Elsevier Academic Press.
- Peña F y 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* 72:2006-14.
- Peña F y 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* 101:547-61.
- Peng TI y Greenamyre JT (1998) Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 53:974–80.

- Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS, Wenthold RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* 71:949-76.
- Pin JP y Acher F (2002) The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets* 1:297-317.
- Pin JP y Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Ramírez-Munguía N, Vera G, Tapia R. (2003) Epilepsy, neurodegeneration, and extracellular glutamate in the hippocampus of awake and anesthetized rats treated with okadaic acid. *Neurochem Res* 28(10):1517-24.
- Santa Cruz de Alba LD (2009) Efecto de los sustratos energéticos sobre la neurodegeneración de motoneuronas espinales *in vivo* (Tesis de Maestría-Universidad Nacional Autónoma de México).
- Shigemoto R, Kulik A, Roberts JDB, Ohishi H, et al. (1996) Target-cell-specific concentration of metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381:523-5.
- Smith SL, Heal DJ, Martin KF (2005) KTX 0101: a potential metabolic approach to cytoprotection in major surgery and neurological disorders. *CNS Drug Rev* 11:113-40.
- Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K et al. (2006) Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci* 24:645-53.
- Suzuki M, Sato K, Dohi S, Sato T, et al. (2001) Effect of beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Jpn J Pharmacol* 87:143-50.
- Suzuki Y, Takahashi H, Fukuda M, Hino H, et al. (2009) Beta-hydroxybutyrate alters GABA-transaminase activity in cultured astrocytes. *Brain Res* 1268:17-23.
- Takamori S (2006) VGLUTs: exciting times for glutamatergic research? *Neurosci Res* 55:343-51.
- Thesleff S (1980) Aminopyridines and synaptic transmission. *Neurosci* 5:1413-9.
- Tovar-y-Romo LB y Tapia R (2007) Excitotoxicity as a mechanism of motoneuron death in amyotrophic lateral sclerosis. In: *The neurochemistry of neuronal death* (Massieu L, Arias C, Morán J. eds) Research Signpost.
- Veech RL (2004) The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids* 70:309-19.

- Vera Rivera AG (2005) Papel de los receptores ionotropicos y metabotropicos de glutamato en la neurodegeneración por excitotoxicidad en el hipocampo *in vivo* (Tesis de Maestría-Universidad Nacional Autónoma de México).
- Wang X, Perez E, Liu R, Yan LJ, et al. (2006) Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res* 1132(1):1-9.
- Wang Y y Qin Z (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15:1382–1402.
- Ward MW, Rego AC, Frenguelli BG, Nicholls (2000) Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* 20:7208–19.
- Wenthold RJ y Roche KW (1998) The organization and regulation of non-NMDA receptors in neurons. *Prog Brain Res* 116:133-52.
- Witter MP y Amaral DG (2004) The hippocampal formation. In: *The rat nervous system* (Paxinos G ed). Capitulo 4 (Tercera edición). Elsevier Academic Press.
- Zheng K, Scimemi A, Rusakov DA (2008) Receptor actions of synaptically released glutamate: the role of transporters on the scale from nanometers to microns. *Biophys J* 95:4584–96.