



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PAPEL DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO EN LA
EPILEPSIA Y NEURODEGENERACIÓN POR EXCITOTOXICIDAD EN EL
HIPOCAMPO, IN VIVO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. ÁNGELA GABRIELA VERA RIVERA

DIRECTOR DE TESIS

DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2014



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis Doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

- **Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia**
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- **Dra. Clorinda Arias**
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- **Dr. Fernando Peña Ortega**
Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dra. Lourdes Massieu Trigo Instituto de Fisiología Celular, UNAM
SECRETARIO	Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
VOCAL	Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova Instituto de Neurobiología, UNAM
VOCAL	Dr. José Jesús García Colunga Instituto de Neurobiología, UNAM
VOCAL	Dr. Edmundo Chávez Cossío Instituto Nacional de Cardiología

Mi especial reconocimiento al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por concederme el privilegio de realizar este proyecto de investigación dentro de las instalaciones del Instituto de Fisiología Celular.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo recibido de los proyectos por parte de CONACyT 128229, DGAPA IN215610; IN201013 y a la beca otorgada por CONACyT (becario No. 182648).

AGRADECIMIENTOS

❖ *Al Dr. Ricardo Tapia*

Por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su invaluable transmisión de conocimientos, por su revisión e interés constante en mi proyecto de investigación, lo cuál refleja su extraordinaria vocación docente y porque en todo momento estuvo dispuesto a brindarme de su tiempo para aclarar dudas, para darme explicaciones y para compartirme su gran experiencia. Y en definitiva, por su enorme perseverancia para que finalmente después de todos estos años obtuviera el grado.

“Ricardo, con gran respeto y admiración te agradezco no solo tu tutoría sino también tu valiosa amistad”. ¡Un millón de gracias! de todo corazón.

❖ *Al personal de apoyo del laboratorio:*

Técnicas Académicas: Patricia Salazar y Xochitl Ayala
Laboratorista: Marina Cristóbal

❖ *Unidad de enseñanza:*

Sara Noguera

❖ *Bióterio:*

M.V.Z. Claudia V. Rivera
M.V.Z. Héctor Alfonso Malagón

❖ *A mis padres*

Por creer siempre en mí, por que me han apoyado en todas mis decisiones y por comprenderme y aguantar las ausencias que implica la vida que he elegido. ¡Que sería de mi y de mi hija sin ustedes!

❖ *A mi familia*

A “Dios Gracias” por bendecirme con esta numerosa y gran familia. A todos y cada uno de ustedes (en primer lugar a mi abuelo Ángel, a mi hermana, tíos, tías, primos, primas, sobrinos) mi más sentido “Agradecimiento” porque sin lugar a dudas, muchos han sido los momentos especiales que hemos tenido la suerte de compartir y todos ustedes han contribuído de mucha formas con su ayuda, amor, apoyo y cariño al bienestar de mi pequeña Fernanda. Familia; ustedes representan el balance positivo de mi vida personal y profesional. A todos, mi mas sincero “¡Gracias!” por constantemente regresarme al mundo terrenal.

❖ *A mis amigos*

Afortunada soy por contar con pocas, pero muy valiosas amistades. Desde mis amigas de la Prepa, pasando por los amigos de la facultad, los amigos del laboratorio B-14, hasta los amigos Queretanos que han resultado ser un gran apoyo y como una nueva pequeña familia que no me han dejado sentirme sola, “¡Gracias!” chicos por su agradable compañía.

DEDICATORIA

❖ *A Ángel*

Por su gran apoyo durante todos estos años, muy a pesar de las circunstancias y por compartir juntos el interesante reto de la maternidad/paternidad.

❖ *A mis abuelos*

Tita Venturita, Tita Carmelita y muy especial dedicatoria al Tito Carmelito; Francisco Vera, *in memoriam*.

Aunque ya no están físicamente con nosotros siempre están presentes con sus enseñanzas, su sabiduría, su ejemplo de vida y con su gran amor sembrado entre nosotros. *Los extraño!*

INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Abreviaturas.....	5
Organización de la Tesis.....	9
I. Introducción.....	11
• Glutamato y neurotransmisión glutamatérgica.....	11
• Receptores a glutamato.....	12
1. Receptores Ionotrópicos.....	13
2. Receptores Metabotrópicos.....	16
a) Receptores mGluR I.....	19
b) Receptores mGluR II.....	20
c) Receptores mGluR III.....	21
• Recaptura de glutamato.....	24
• Transportadores de glutamato.....	24
• Excitotoxicidad y Neurodegeneración.....	28
II. Antecedentes.....	32
• Epilepsia y neurodegeneración.....	32
• El hipocampo en la epilepsia y neurodegeneración.....	35
• 4-AP.....	37
• PDC.....	38
III. Planteamiento del problema.....	38
IV. Hipótesis.....	40
V. Objetivos.....	40
VI. Diseño y procedimientos experimentales.....	41
• Cirugía para el implante de cánulas para experimentos de microdiálisis.....	41
• Microdiálisis.....	41
• Cuantificación de aminoácidos.....	42
• Registro Electroencefalográfico.....	43
• Análisis histológico.....	43
• Observación de la conducta de los animales.....	43
• Análisis estadístico.....	43
• Grupos experimentales.....	44
VII. Resultados.....	44
• Primera parte.....	44
Artículo 1: Activation of Group III Metabotropic Glutamate Receptors by Endogenous Glutamate Protects Against Glutamate-Mediated Excitotoxicity in the Hippocampus, In Vivo.....	45
• Segunda parte.....	57
Manuscrito: Activation of group III mGluRs is protective against epilepsy and excitotoxic neuronal death: An in vivo microdialysis study.....	58
VIII. Discusión.....	75
IX. Conclusiones.....	82
X. Referencias.....	85

R ESUMEN

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC. Cuando se produce incremento en la transmisión sináptica glutamatérgica se sobreactivan sus receptores, principalmente los del tipo NMDA, y se desencadenan varios mecanismos que llevan a la muerte neuronal por excitotoxicidad. Este mecanismo juega un papel importante en varias enfermedades neurodegenerativas y también en el proceso de muerte vinculado con la epilepsia. Actualmente hay evidencias que indican la participación del glutamato en esta patología; por ejemplo, en pacientes epilépticos se han encontrado índices elevados de aminoácidos excitadores en el líquido cefalorraquídeo y en los focos epilépticos. Experimentos *in vivo* con modelos animales han mostrado que el aumento en la concentración extracelular de glutamato, por estimulación de su liberación con el bloqueador de canales de K^+ , 4-aminopiridina (4-AP), produce crisis epilépticas y neurodegeneración, efectos que son revertidos con antagonistas glutamatérgicos. 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; pero en cambio, se ha demostrado que puede activar receptores presinápticos metabotrópicos que inhiben su liberación.

En el presente trabajo, se muestran los resultados del estudio de microdiálisis en el hipocampo, llevado a cabo con registro electroencefalográfico simultáneo con ratas en libre movimiento a las cuales se les administró 4-AP y el inhibidor del transporte de glutamato, PDC. La administración de una solución de 7mM de 4-AP durante una sola fracción de microdiálisis, genera fuertes crisis epileptiformes con una actividad hipsincrónica 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. Efectos neurotóxicos que son claramente visibles tanto en la conducta como en el EEG y en los cortes histológicos. Por otro lado, la perfusión continua de una solución de 50mM de PDC durante varias fracciones de microdiálisis, no generó epilepsia ni neurodegeneración, a pesar del gran aumento observado en la concentración extracelular de glutamato. La perfusión simultánea de 4-AP más PDC, lejos de generar potenciación de los efectos neurotóxicos debido a la presencia de ambos fármacos, se observó una importante protección tanto en la neurodegeneración como en las crisis

epileptiformes. La muerte en las neuronas piramidales de la capa CA1 del hipocampo fue protegida en un 50% aproximadamente y las crisis epileptiformes disminuyeron significativamente tanto en la amplitud de las espigas como en la duración de las mismas.

Estudios *in vitro* en rebanadas de cerebro sugieren que el exceso de glutamato extracelular, por inhibición de su transporte, puede ser protector debido a la probable inhibición de la liberación de glutamato al activarse los mGluR III. Con estos antecedentes quisimos probar si la activación directa de este tipo de receptores, podía inhibir la liberación de glutamato como un mecanismo protector contra la epilepsia y la muerte neuronal inducido por 4-AP. Para ello utilizamos dos distintos antagonistas para el grupo de mGluR III, el MAP₄ y MSOP ambos utilizados en combinación con el inhibidor del transporte de glutamato (PDC) y en presencia del potente convulsivante (4-AP). Los resultados demuestran una clara ausencia de protección del efecto producido por el PDC, ya que se observaron efectos más severos que los causados por la 4-AP individualmente. Por otro lado, también se utilizó el agonista específico para este grupo de receptores a glutamato, el L-AP₄ en combinación únicamente con 4-AP. Este agonista resultó ser protector, disminuyó significativamente la concentración extracelular de glutamato y a pesar de que sólo en la mitad de los animales hubo protección significativa contra las crisis epileptiformes; sí se encontró protección contra la muerte neuronal en todos los animales, aún en aquellos que presentaron el estado epiléptico.

Con estos resultados se pudo probar que la activación de los mGluR presinápticos del grupo III tiene una participación importante en el mecanismo del control de la liberación de glutamato endógeno en condiciones de hiperexcitabilidad, ya que el agonista, L-AP₄, fue capaz de disminuir la concentración de glutamato y logró proteger contra el daño excitotóxico, mientras que los antagonistas potenciaron los efectos.

A BSTRACT

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the CNS. When increase occurs in glutamatergic synapses, their receptors overload, mainly the NMDA type, and several mechanisms are triggered that lead to excitotoxic neuronal death. This mechanism plays an important role in several neurodegenerative diseases and also in the death process linked to epilepsy. Now, there is evidence indicating the involvement of glutamate in this pathology, for example, high levels of exciter aminoacids have been found in epileptic patants in de epileptic focus. In vivo experiments with animal models have shown that the increase in the extracellular glutamate concentration, by stimulating release K⁺ channel blocker, 4-AP produces epileptic seizures and neuronal death, the effects are prevented with glutamatergic antagonists. Paradoxically, when the increase in extracellular glutamate produces by blockade of its transport *in vivo*, there is no evidence that epilepsy has been induced, or neuronal death. But instead, it has been shown that can activate metabotropic presynaptic receptors that inhibit release.

This work shows the microdialysis study results implemented with simultaneous electroencephalographic with freely moving rats to which were administered 4-AP and glutamate transport inhibitor, PDC. A single fraction microdialysis of 4-AP, at a dose of 7 mM, generates strong epileptiform seizures with an initial hypersynchronic activity, (followed train high amplitude spikes) over time increased in frequency until the establishment of status epilepticus. Furthermore, neuronal loss occurs in the regions CA1 y CA3 of the hippocampus. Neurotoxic effects that are clearly visible both in behavior and in the EEG and in histological evaluation. Furthermore, continuous perfusion of several fractions with microdialysis with PDC, not generated epilepsy or neurodegeneration, despite the large increase observed in the extracellular concentration of glutamate. Simultaneous perfusion of 4-AP and PDC, far from generating potentiation of neurotoxic effects due to the presence of both drugs (4-AP and PDC), a significant protection was observed in neurodegeneration and epileptiform seizures. Death in pyramidal neurons in the hippocampal CA1 layer were protected by 50% approximately and epileptiform

seizures decreased significantly in both the amplitude of the spikes and in the duration thereof.

In vitro studies suggest that brain slices excess extracellular glutamate, by inhibition of the transport, it may be protective due to the probable inhibiting glutamate release to activate the mGluR III. With this background we wanted to test if the direct activation of such receptors could inhibit glutamate release as a protective mechanism against epilepsy and neuronal death induced by 4-AP. For this, we use two different antagonists for group of mGluR III, the MAP₄ and MSOP both used in combination with the glutamate transport inhibitor (PDC) and in the presence of the 4-AP. The results show a clear vulnerability of the protective effect of PDC as more severe effects were observed than those produced by the 4-AP alone. Furthermore, the specific agonist was also used for this group of glutamate receptor, the L-AP₄, only in combination with 4-AP. This agonist was found to be protective, significantly decreased the concentration of extracellular glutamate and despite the fact that in only half of the animals had significant protection against epileptiform seizures, was found themselves protection against neuronal death in all animals.

With these results, we were able to show that the activation of the mGluR III presynaptic plays an important role in the mechanism of controlling the release of endogenous glutamate in conditions of hyperexcitability as the specific agonist, L-AP₄, was able to decrease the concentration of glutamate and was able to protect against excitotoxic damage while antagonists enhanced the effect.

A BREVIATURAS

(1S,3R)-ACPD	(1S,3R)-1-aminociclopentano-1,3-ácido dicarboxílico
(1S,3S)-ACPD	(1S,3S)-1-aminociclopentano-1,3-ácido dicarboxílico
(R,S)-PPG	(R,S)-4- fosfonofenilglicina
2S,4R-4MG	(2S,4R)-4-metilglutamato
3,4-MPDC	L-anti-endo-3,4-metanopirrolidín-2,4-dicarboxílico
3-HPG	3-hidrofenil-glicina
4-AP	4-aminopiridina
4C3HPG	(S)-4-carboxi-3-hidroxifenilglicina
4CPG	4-carboxifenilglicina,5,10-imina
AAE	Amionoácidos excitadores
ABHxD-I	Ácido amino-bi-ciclo [2.2.1]-heptano dicarboxílico
AC	Adenilato ciclasa
ACPT-1	(1S,3R,4S)-1-aminociclopentano-1,3,4-ácido tricarboxílico
ADC-1	(+)-5-aminocarbonil-10,11-dihidro-5-dibenzo[a-d]cyclohepten-
AIDA	1-aminoindian-1,5-ácido dicarboxílico
AMPA	Amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasol-4-propionato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP5	(±)-2-amino-5-heptanoato
AP7	(±)-2-amino-7-heptanoato
ATP	Adenosín trifosfato
BAPTA-AM	1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-acidotetracetico-tetraquis N,N,N',N'(acetoximetil ester).
β- TBHA	threo-β-hydroxiaspartato
Ca²⁺	Ión calcio
CaCl₂	Cloruro de calcio
CBPG	-(s)-(+)-2-(3" ciclocarboxil[1.1.1]fenilglicina
CBPG	2-(3' carboxi-bi-ciclo [1.1.1]fentil)-glicina
CCG-III	(2S,3S,4R)-2-(carboxiciclopropil)glicina
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-hidroxfenilglicina	
DAG	Diacil-glicerol	
DCG-IV	-(2S,1R,2R,3R)-2-(2,3-dicarboxiciclopropil) glicina	
DHK	Dihidro-kainato	
DHPG	3,5-dihidroxfenilglicina	
DHPMP	Ácido-amino-(3,5-dihidroxfenil)-metil-fosfónico	
DL-TBOA	DL-threo-β-benzyl-oxyaspartato	
DNQX	6,7-dinitro-quinto-quinolaxina-2,3-diona	
DP	Despolarización paroxística	
EEG	Electroencefalograma	
EGLU	(2S)-ácido etilglutámico	
GABA	Ácido-γ-aminobutírico	
GYK1522466	1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilenedioxi-5H-2,3 benzodiazepina	
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	
HTA	(R,S)-2-amino-3-(1-hidroxi-1,2,3-triazol-5-il)propionato	
iGluRs	Receptores ionotrópicos de glutamato	
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato	
K⁺	Ión potasio	
KA	Kainato	
KCl	Cloruro de potasio	
KH₂PO₄	Fosfato de potasio monobásico	
L-AP₄	L-2-amino-4-fosfonobutirato	
L-CCG-1	-(2S,1S,2S)-2-(carboxiciclopropil) glicina	
L-SOP	L-serina O-fosfato	
LTD	Potenciación a corto plazo	
LTP	Potenciación a largo plazo	
LY314593	(2R,4R)-4-aminopirrolidin-2,4-ácido dicarboxílico	
LY341495	(2S)-2-amino-2-[(1S,2S)-2-carboxiciclopropil-1]-3-xantil-9) propanoico	ácido
LY354740	(1S,2S,5R,6S)-(+)-2-aminobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-ácido dicarboxílico	
LY367385	(+)-2-metil-4-carboxifenilglicina	

LY379268	(-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3.1.0]hexano-4,6-ácido dicarboxílico
LY389795	Ácido(-)-2-tia-4-amino-bi-ciclo[3.1.0]hexano-4,6-dicarboxílico
LY393675	α -9'-tioxantenil-metil-3-carboxiclobutil-glicina
MAP₄	(S)-2-amino-2-metil-4-ácido fosfonobutanoico
MCCG-1	(2S,3S,4S)-2-metil-2-(carboxiciclofenil)glicina
MCPG	α -metil-4-carboxifenilglicina
mGluR I	Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I
mGluR II	Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II
mGluR III	Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
MK-801	Maleato de dizocilpina
MPEP	2-metil-6-(feniletinil)piridina
MPPG	α -metil-4-fosfonofenil-glicina
MSOP	(R,S)- α -metil-serina-o-fosfato
Na⁺	Ión sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NBQX	2,3-dihydro-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinoxalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
OPA	o-oftaldialdehído
PCCG-IV	(2S, 1'S, 2'S, 3'R)-2-(2'carboxi-3'-fenilciclopropil) glicina
PDC	L-trans-pirrolidin-2-4-dicarboxílico
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PTX	Toxina pertusis
RS-PPG	(R-S)-4-fosfonofenil-glicina
SIB 1757	6-metil-2-fenilazo-3-piridinol
SIB 1893	(E)-6-metil-2-estirilpiridina
SNC	Sistema nervioso central
tADA	Trans-azetidina-2,4-ácido dicarboxílico
T3MG	(\pm)threo-3-metilglutamato
TBOA	β -threo-benziloxiaspartato
TDPA	S-2-amino-3-(1-hidroxi-1,2,5-tiadiazol-4-il)ácido propiónico

TEA	Tetraetilamonio
TFB-TBOA	(2S,3S)-3-(3-[4-(trifluorometil)-benzoilamino]- benziloxi) aspartato
TMOA	threo-metoxiaspartato
TTX	Tetrodotoxina
VSCC	Canales sensibles al voltaje
WAY-855	3-amino-triciclo[2.2.1.0 ^{2,6}]heptano-1,3-dicarboxílico

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

El presente trabajo está dividido en 9 secciones: Introducción, Antecedentes, Planteamiento del problema, Hipótesis, Objetivos, Diseño y Procedimientos Experimentales, Resultados, Discusión y Conclusiones.

En la Introducción se describe brevemente la neurotransmisión glutamatérgica y el mecanismo de excitotoxicidad causado por la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos. En la sección de Antecedentes se presenta un marco teórico sobre la Epilepsia y el hipocampo, que es una de las estructuras cerebrales afectadas en esta patología y enseguida se describe la estrategia experimental utilizada que involucra drogas como la 4-AP, sustancia que por muchos años ha sido utilizada en el laboratorio como una de las herramientas experimentales para inducir crisis epileptiformes y muerte neuronal; y el PDC, compuesto utilizado para incrementar los niveles extracelulares de glutamato por inhibición de su recaptura.

Enseguida se presenta el planteamiento del problema y se enlista la hipótesis y los objetivos de este trabajo. Posteriormente, en la sección de diseño y procedimientos experimentales se explica con detalle la manipulación estereotáxica para implantar las cánulas para los experimentos de microdiálisis, la técnica de microdiálisis utilizada con los diferentes grupos experimentales, cómo se llevó a cabo la cuantificación del glutamato, el registro electroencefalográfico, la observación conductual de los animales y el análisis histológico y estadístico.

En la primera parte de resultados se presenta el artículo “Activation of group III metabotropic glutamate receptors by endogenous glutamate protects against glutamate-mediated excitotoxicity in the hippocampus *in vivo*”, en el que se describe el efecto protector contra la excitotoxicidad de glutamato por inhibición de su recaptura con el PDC y su abatimiento por el bloqueo de los mGluR III utilizando dos antagonistas selectivos para este grupo de receptores.

A continuación, en la segunda parte de resultados se presenta un artículo más, el cuál se encuentra en preparación para su publicación, y se titula “Activation of group III mGluRs is protective against epilepsy and excitotoxic neuronal death: An *in vivo* microdialysis study”, en el que se muestra la protección contra la excitotoxicidad glutamatérgica mediada por la activación directa de los mGluR III, utilizando el agonista, LAP-4.

Finalmente se ofrece una discusión integral sobre los hallazgos encontrados en el presente trabajo y termina con la sección de conclusiones en donde se presenta un enfoque sobre el panorama actual de los mGluR III, la epilepsia y la neurodegeneración y su posible potencial para ser utilizados como droga antiepiléptica.

I. INTRODUCCIÓN

- Glutamato y neurotransmisión glutamatérgica.

La comunicación entre las neuronas del cerebro, en su mayoría, ocurre por medio de neurotransmisores. Dentro de esta gama de neurotransmisores, los aminoácidos son los mayormente utilizados. Uno de ellos es el glutamato, el cual se encuentra ampliamente distribuido en todas las regiones del sistema nervioso central (SNC) (médula espinal, cerebelo, tálamo, hipotálamo, ganglios basales, hipocampo, corteza, entre otras) y es considerado como un compuesto de gran importancia fisiológica (Broman et al, 2000).

Fue descubierto en 1908 por Kikunae Ikeda, pero el hallazgo de que este compuesto puede excitar el tejido nervioso tomó aproximadamente 5 décadas (Chiosa y Gane, 1956; Curtis et al., 1960). Sus propiedades como neurotransmisor se describieron por primera vez cuando se demostró que el glutamato excitaba una gran variedad de neuronas centrales (Curtis y Watkins, 1963; Watkins 1962). Y fue en la década de los 70 cuando se realizaron, en su mayoría, la gran cantidad de trabajos que demostraron que el glutamato cumplía con los criterios para considerarlo como neurotransmisor. Sin duda la presencia de receptores a glutamato en las membranas neuronales (Evans et al., 1979), su liberación mediante las terminales nerviosas después de la excitación (Hamberger et al., 1979), así como el sistema de transporte específico de alta afinidad localizado tanto en glía como en terminales nerviosas (Logan y Snyder, 1972) apoyaron fuertemente la hipótesis de que el glutamato era el neurotransmisor excitador por excelencia en el SNC de los mamíferos (Fonnum, 1984).

En la actualidad es bien conocido su papel en el metabolismo celular del cerebro participando en muchas reacciones, es un constituyente de proteínas y péptidos como el glutatión. También es el precursor del ácido γ -aminobutírico (GABA) en neuronas GABAérgicas, y precursor de la glutamina en las células gliales (Broman et al., 2000). Con respecto a la transmisión sináptica glutamatérgica, numerosos trabajos han sentado las bases para reconocer el papel que juega este aminoácido, como por ejemplo en la cognición, la memoria y el aprendizaje, ya que tiene una participación importante en los cambios duraderos en la eficacia sináptica en los fenómenos conocidos como potenciación a largo plazo (LTP, "long-term potentiation") y depresión a largo plazo (LTD, "long-term depression") que se consideran como el sustrato celular de los procesos de aprendizaje y formación de la memoria (Cotman et al., 1988; Ito, 1989). Durante el

desarrollo del sistema nervioso, se encuentra involucrado en procesos ontogénicos tan diversos como la proliferación, apoptosis, maduración, supervivencia, migración neuronal, diferenciación, formación, remodelación y eliminación de sinapsis. También participa en el establecimiento y refinamiento de las conexiones neuronales actuando como un auténtico factor trófico (Mattson et al., 1988; Balázs et al., 1988; Michaelis, 1997; Komuro y Rakic, 1993; Rossi y Slater, 1993).

De igual manera el glutamato participa en la degeneración y muerte celular en procesos neurológicos agudos como en el caso de accidentes cerebrovasculares (en el trauma cerebral y en la hipoglicemia-isquemia) (Rothman y Olney, 1986; Wieloch, 1985) y en procesos crónicos como en el caso de diversas enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (Maragos et al., 1987), enfermedad de Parkinson (Rossini et al., 1998), la esclerosis lateral amiotrófica (Rothstein et al., 1990; Tovar-y-Romo y Tapia, 2007), la corea de Huntington (Beal et al., 1986) y en el proceso de neurodegeneración vinculado con la epilepsia (Peña y Tapia, 2000).

- Receptores a glutamato

Las funciones del glutamato ocurren a través de la activación de varios tipos de receptores. De acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas, farmacológicas y bioquímicas, los receptores a glutamato se han clasificado en dos grandes grupos:

1. Receptores ionotrópicos (iGluRs)
2. Receptores metabotrópicos (mGluRs)

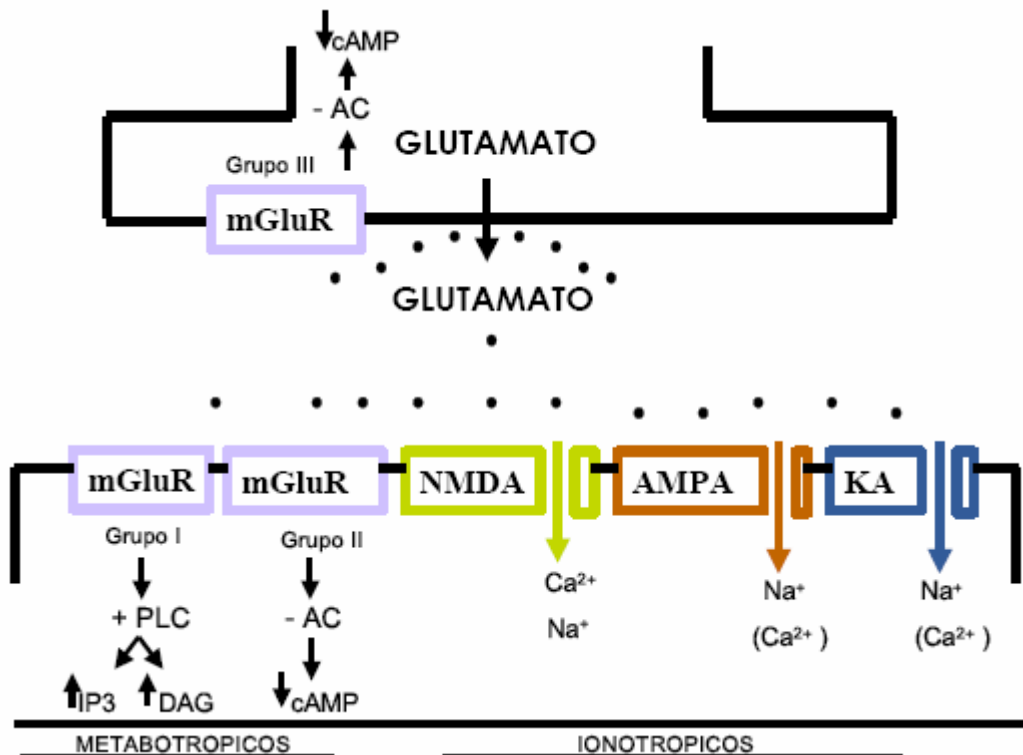


Figura 1. Clasificación de la familia de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato. Los receptores ionotrópicos forman canales permeables a los iones indicados en la figura y, de acuerdo al agonista específico que los activa se han subdividido en receptores NMDA (activados por el N-metil-D-aspartato), AMPA (activados por el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico) y KA (activados por el ácido kaínico). Los receptores metabotrópicos se encuentran acoplados a la activación (+) o inhibición (-) de las enzimas y segundos mensajeros indicados mediante la activación de proteínas G. Se han subdividido en tres grupos (mGluR I, mGluR II y mGluR III) de acuerdo a la homología de su secuencia de aminoácidos, a los mecanismos de transducción de señales y a sus propiedades farmacológicas. PLC (fosfolipasa C), IP₃ (inositol-(1,4,5)-trifosfato), DAG (diacil glicerol), AC (adenilato ciclasa), AMPc (adenosín monofosfato cíclico). Tomado de Corona y Tapia, 2005

1. Receptores Ionotrópicos (iGluR)

Estos receptores participan en la actividad sináptica rápida en el SNC. Se caracterizan por formar un canal iónico con diferente selectividad según el tipo de receptor, siendo permeables a Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. En el aspecto molecular son proteínas integrales de la membrana formadas por 4 subunidades que forman un tetrámero, cada uno con 900 aminoácidos aproximadamente (\approx 100 kDa) (Michaelis, 1998). Estas subunidades están formadas por 3 dominios transmembranales (TMI, TMIII y TMIV) y un dominio intramembranal (TMII). Su extremo carboxilo-terminal se localiza intracelularmente y representa el sitio con función reguladora, mientras que el extremo amino-terminal se

localiza en la región extracelular y es el sitio donde se une el glutamato (Bräuner-Osborne et al., 2000).

En la actualidad se han identificado algunas variantes en las subunidades de los receptores a glutamato. Esta variabilidad se debe a que los RNAs de estos receptores pueden ser modificados mediante mecanismos de procesamiento o “splicing” alternativo, generando ediciones diferentes del RNA, lo que incrementa el número de isoformas. A la fecha se han identificado 28 subunidades distintas codificadas por 17 genes diferentes (Michaelis, 1998). Consultar Tabla 1

En función del ligando específico que activa a los diferentes receptores se han subdividido en:

- a) Receptores NMDA (sensibles a N-metil-D-aspartato)
- b) Receptores No-NMDA:
 - AMPA (sensibles al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico)
 - Kainato (sensibles al ácido kaínico)

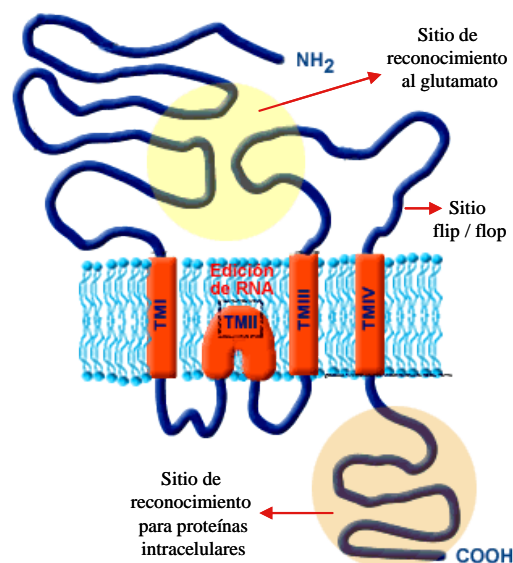


Figura 2. Estructura molecular de los receptores ionotópicos de glutamato. Los tres tipos de receptores poseen tres dominios transmembrales (TMI, TMIII y TMIV) y un segmento hidrofóbico que no cruza completamente la membrana (TMII) con el cual se forma el poro iónico. El sitio de unión al glutamato está formado por los aminoácidos de la región amino terminal y de las asas extracelulares entre el TMI y TMIII. El extremo carboxilo terminal representa la región reguladora ya que existen dominios para la unión de proteínas intracelulares. También se muestra la posición de los diferentes sitios modificados por la edición y el procesamiento alternativo del mRNA que generan las diferentes isoformas.

Tabla 1. GRUPO DE RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO.
Modificada de Michaelis, 1998.

TIPO DE RECEPTOR	SUBTIPO DE RECEPTOR	FAMILIA DE GENES QUE CODIFICAN PARA LAS SUB UNIDADES	AGONISTA SELECTIVO	ANTAGONISTAS	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	AFINIDAD POR EL glu EC ₅₀ [µM]	CONDUCTANCIA
Ionotrópico	NMDA	GluN1 GluN2A GluN2B GluN2C GluN2D GluN3A GluN3B	NMDA	- 2-AP5 - 2-AP7 - CPP - Ifenprodil - MK-801 - Ketamina	Activación Lenta Permeables a Ca ²⁺ También permeables a Na ⁺ y K ⁺	Postsináptica	2.3	23-50 pS
Ionotrópico	AMPA	GluA1 GluA2 GluA3 GluA4	AMPA	- CNQX - DNQX - NBQX	Activación Rápida Permeables a Na ⁺ y K ⁺ A veces permeables a Ca ²⁺	Postsináptica	19	7-30 pS
Ionotrópico	KA	GluK1 GluK2 GluK3 GluK4 GluK5	Kainato	- γ-D-glutamil-glicina	Activación Rápida Permeables a Na ⁺ y K ⁺	Postsináptica	270-762	3-15 pS

2. Receptores metabotrópicos (mGluR)

Durante muchos años se pensó que la transmisión glutamatérgica estaba mediada únicamente por los receptores ionotrópicos. Posteriormente en cultivos neuronales de estriado, Sladeczek y su grupo (1985) demostraron la presencia de otro tipo de receptores a glutamato insensibles a NMDA, AMPA o kainato y en cambio estimulaban la actividad de la fosfolipasa C y la formación de inositol trifosfato (IP₃) a través de la activación de proteínas G. Un año después Nicoletti y colaboradores (1986 a, b, c) observaron efectos similares en rebanadas de hipocampo, en cultivos de células granulares de cerebelo, al igual que en cultivos de astrocitos (Pearce et al., 1986). Tiempo después se clonó el primer receptor metabotrópico de glutamato (Masu et al., 1991; Houamed et al., 1991) y posteriormente el resto de los mGluRs (Tanabe et al., 1992; Nakajima et al., 1993; Saugstad et al., 1994; Okamoto et al., 1994; Flor et al., 1995; Duvoisini et al., 1995). Estudios de inmunohistoquímica e hibridación in situ revelaron que los mGluRs se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC y los patrones de expresión y localización de los diferentes subtipos son muy diversos (Broman et al., 2000).

A diferencia de los receptores ionotrópicos, estos receptores no forman canales iónicos, ellos se encuentran acoplados a un sistema de segundos mensajeros a través de la activación de proteínas G. Están implicados en diversas funciones del SNC tales como, la regulación de la actividad sináptica excitadora lenta y por lo tanto prolongada (de segundos a minutos) (Pin and Duvoisin, 1995), en la modulación de canales de calcio (Chavis et al., 1995), de canales de potasio (Netzeband et al., 1997), de canales catiónicos no selectivos (Congar et al., 1997), en la inhibición y facilitación de la liberación de neurotransmisores (Schrader y Tasker 1997; Rodríguez-Moreno et al., 1998) así como también en la inducción de LTP y LTD (Conquet et al., 1994).

La diversidad funcional de los mGluRs se lleva a cabo a través de varios subtipos de receptores. La familia está constituida por ocho subtipos de receptores (mGluR1-8) y varias isoformas, divididos 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. A nivel génico, 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, por lo que se les considera dentro de la familia de receptores que ha sido clasificada como familia C ó 3, debido a que carece de homología con otros grupos de receptores acoplados a proteínas G (Bockaert y Pin, 1999).

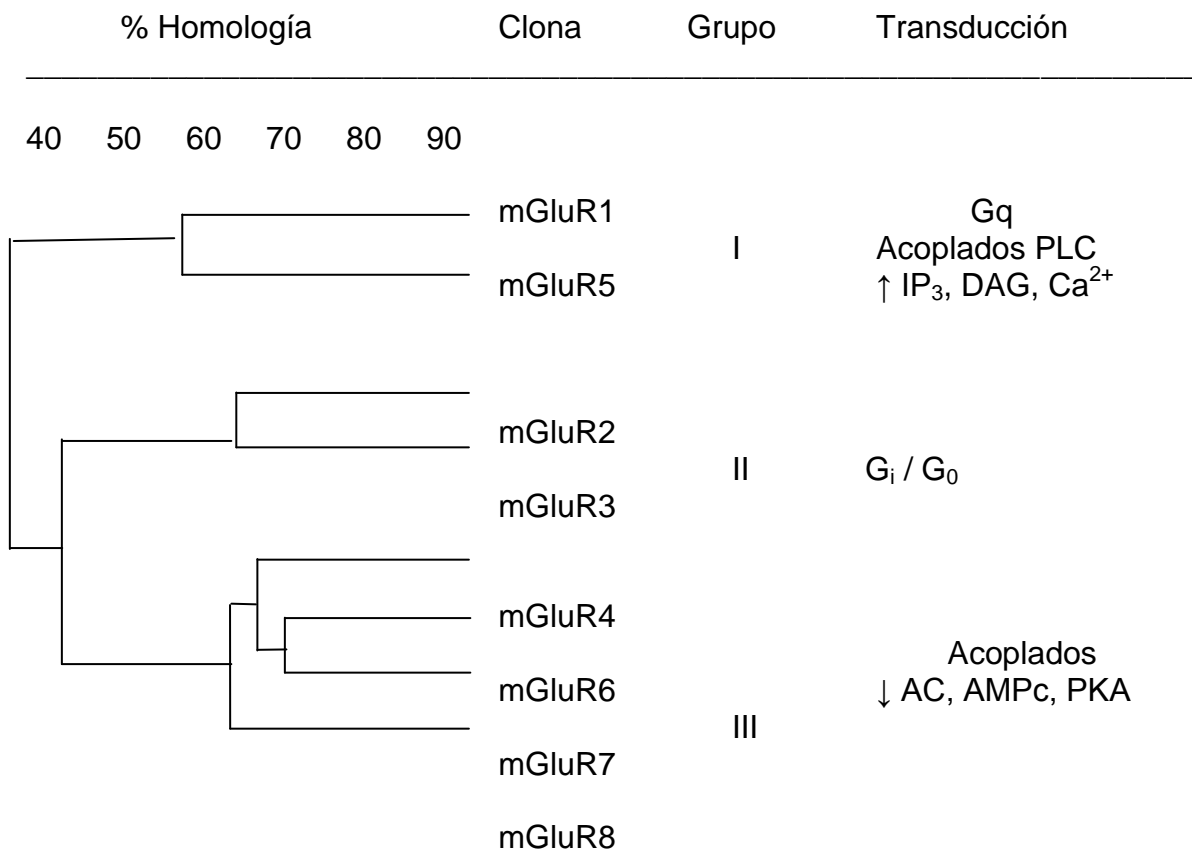


Figura 3. Dendrograma y clasificación de los miembros de la familia de mGluRs. El grupo de receptores metabotrópicos de glutamato se han dividido en tres grandes grupos de acuerdo a la homología de sus secuencias, farmacología y vía de señalización. Tomado de Conn, 2003.

En el aspecto molecular son proteínas integrales de la membrana formadas por una sola cadena polipeptídica. Se caracterizan por presentar un largo dominio amino terminal situado en el extremo extracelular (con 600 aminoácidos aproximadamente), además en ésta región se encuentran 4 sitios de glicosilación, así como 19 cisteínas altamente conservadas implicadas en la conformación tridimensional, debido a que posibilitan la formación de puentes disulfuro intramoleculares importantes para la dimerización de los receptores (Robbins et al., 1999).

También presentan 7 dominios transmembranales característicos de todos los receptores acoplados a proteínas G, se encuentran unidos por 3 asas intracelulares y 3 asas extracelulares. Trabajos previos han demostrado que la segunda asa intracelular es la responsable del reconocimiento selectivo de la subunidad α de la proteína G (Pin et al., 1994), aunque se sabe que el dominio carboxilo terminal y el resto de las asas intracelulares también tienen una fuerte participación en la eficiencia del acoplamiento entre el receptor y la proteína G (Pin y Duvoisin, 1995).

El dominio carboxilo terminal se localiza intracelularmente y es la región más variable entre los diferentes grupos de mGluRs. Este sitio presenta varios dominios de interacción con múltiples proteínas tales como las PICK1, Homer y calmodulina que regulan la localización sináptica y las propiedades funcionales del receptor (Dev et al., 2001; Brakeman et al., 1997; O'Connor et al., 1999), así como también existen sitios de fosforilación tanto por la proteína cinasa A (PKA) (Cai et al., 2001) como por la proteína cinasa C (PKC) (Nakajima et al., 1999).

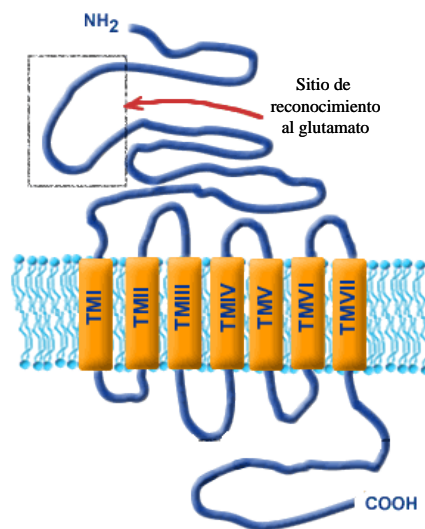


Figura 4. Estructura molecular de los receptores metabotrópicos de glutamato. Poseen 7 dominios transmembranales característicos de todos los receptores acoplados a proteínas G. El sitio de unión a glutamato está formado por los aminoácidos del extremo amino terminal y el extremo carboxilo terminal es el que interacciona con la proteína G.

a) Receptores Metabotrópicos del Grupo I (mGluR I)

El grupo I (subtipos mGluR1 y mGluR5) se expresa en diferentes regiones del SNC entre las que destacan el hipocampo, corteza cerebral, tálamo, hipotálamo y cerebelo (Shigemoto et al., 1993; Petralia et al., 1997). Se localizan mayoritariamente a nivel postsináptico en cuerpos celulares, troncos dendríticos y espinas dendríticas. Su rasgo más característico es que se les encuentra 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-Miras et al., 1996). También existe evidencia de su localización presináptica en el hipocampo (Fotuhi et al., 1993) sustancia nigra (Wittmann et al., 2000 1b) y en corteza cerebral (Romano et al., 1995).

Son selectivamente activados por el (S)-3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) a partir del cual se sintetizaron los derivados DHPMP y CHPG. El orden de potencia de los diferentes agonistas es: ácido quisquálico > ABHxD-I > glutamato > DHPMP > 1S.3R-ACPD > L-CCG-1 > 3-HPG > CHPG > t-ADA. Los compuestos que se comportan como antagonistas son: 4CHPG, CBPG, LY367385, LY393675, MPEP, AIDA, CPCCOEt (Schoepp et al., 1999a).

Su mecanismo de transducción es a través de proteínas G del tipo Gq acoplados positivamente a la fosfolipasa C (PLC), la cual causa la hidrólisis de fosfoinosítidos en diacil glicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). El IP₃ mediante su unión a receptores del retículo endoplásmico genera la liberación de Ca²⁺ desde éste compartimiento intracelular hacia el citoplasma. El DAG junto con el Ca²⁺ liberado, activan la PKC, que a su vez actúa fosforilando diferentes proteínas (Pin y Duvoisin, 1995).

La activación de mGluR I induce una amplia variedad de cambios fisiológicos. Durante el desarrollo del sistema nervioso, se sabe que estos participan activamente en los procesos de liberación de Ca²⁺ y excitabilidad neuronal, por medio de la hidrólisis de fosfoinosítidos que, tras la activación de los mGluR I, provocan movilizaciones de Ca²⁺ elevadas, mismas que son requeridas para los procesos de diferenciación y maduración neuronal, así como para el establecimiento de conexiones y formación de sinapsis (Luján-Miras et al., 2005).

También se ha descrito que los mGluR I participan en el incremento de la excitabilidad neuronal en varias regiones del SNC, debido a la modulación de canales iónicos dependientes de voltaje (Ca^{2+} y canales catiónicos no selectivos) dando como resultado la despolarización de la membrana, el incremento de la resistencia de disparo o aumentando la frecuencia de disparo (Bordi et al., 1999). Además de estos efectos excitadores, también se han reportado efectos inhibidores, concretamente de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} en células de Purkinje del cerebelo (Batchelor y Garthwaite, 1993). En el fenómeno de plasticidad sináptica conocido LTP y LTD se ha visto que los agonistas facilitan su inducción en el área CA1 del hipocampo (Balschun y Wetzel, 1998) al igual que en amígdala (Lee et al., 2002). Y finalmente se han visto implicados en los procesos de neurotoxicidad cerebral, potenciando el daño neuronal por la activación de los receptores NMDA y AMPA (Bruno et al., 1995; Allen et al., 2001).

b) Receptores Metabotrópicos del Grupo II (mGluR II)

El grupo II (subtipos mGluR2 y mGluR3) presenta una amplia distribución en el SNC. Se localizan en altas concentraciones en la corteza, hipocampo, cerebelo, tálamo, ganglios basales y bulbo olfatorio (Ohishi et al., 1998; Tamaru et al., 2001). En neuronas, su localización a nivel subcelular es tanto postsináptica como presináptica situándose regularmente en sitios lejanos de la zona activa de liberación de neurotransmisores, principalmente en las regiones extrasinápticas (Neki et al., 1996; Shigemoto et al., 1997; Petralia et al., 1996). También se les han localizado en células gliales (Shigemoto et al., 1997).

Son selectivamente activados por DCG-IV y el orden de potencia de los agonistas es: LY379268 = LY389795 > LY354740 = L-CCG-I = LY314593 > glutamato > 1S,3R-ACPD = 1S,3S-ACPD. En cuanto a los antagonistas el compuesto que ha mostrado mayor afinidad es el LY341495 y los más utilizados son: MCPG, MCCG-1, PCCG-IV (Conn y Pin, 1997; Kingston et al., 1998a; Schoepp et al., 1999).

Los mGluR II se encuentran acoplados negativamente a la vía de la adenilato ciclasa, inhibiendo la formación de AMPc y por consecuencia inhibiendo la actividad de PKA. Esta respuesta es abolida por la administración de la toxina pertusis (PTx), lo que indica la participación de una proteína G de tipo G_i/G_o (Masu et al., 1991; Pin y Duvoisin, 1995).

Uno de los efectos fisiológicos descritos para este grupo de receptores es la reducción de la neurotransmisión glutamatérgica por medio de sus receptores situados a nivel presináptico. Su localización dentro de la microestructura de la sinapsis es muy lejana de la zona activa, lo que hace que la activación de los mGluR II se lleve a cabo en aquellas situaciones en las que el glutamato difunde hasta las regiones extrasinápticas; hecho que ha sido comprobado experimentalmente por Scanziani y colaboradores (1997) en ensayos de estimulación de alta frecuencia y bloqueo de la recaptura de glutamato. Se ha propuesto que este efecto de la inhibición de la liberación de glutamato se debe principalmente al bloqueo de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo N (Chavis et al., 1995; McCool et al., 1996) y a la activación de canales de K^+ (Pin y Duvoisin, 1995).

c) Receptores Metabotrópicos del Grupo III (mGluR III)

Los mGluR III (subtipos mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) se expresan abundantemente en corteza, tálamo, hipotálamo, hipocampo, cerebelo, bulbo olfatorio, ganglios basales y también en médula espinal (Bradley et al., 1996; Shigemoto et al., 1997). El subtipo mGluR6, se encuentra únicamente distribuido en las células bipolares de la retina (Shigemoto et al., 1997). En neuronas la localización subcelular de estos receptores es fundamentalmente presináptica, situándose preferentemente en la zona activa de liberación de neurotransmisores (Shigemoto et al., 1996). También se ha descrito la localización de mGluR III en la especialización presináptica de terminales GABAérgicas (Schoepp, 2001).

Son selectivamente activados por el $L-AP_4$ y el orden de potencia de los principales agonistas sintetizados hasta la fecha es: $L-AP_4 > L-SOP > \text{glutamato} > L-CCG-1 > 1S,3S-ACPD > 1S,3R-ACPD > \text{Ibotenato} > \text{quiscuálico}$. Entre los antagonistas más potentes están: MPPG, CPPG, MAP_4 , MSOP, MCPG, AIDA (Conn y Pin, 1997; Schoepp et al., 1999).

Al igual que los mGluR II, el grupo de mGluR III, se encuentran acoplados negativamente a la vía de la adenilato ciclasa, inhibiendo la formación de AMPc y la actividad de PKA. Efecto que es bloqueado en presencia de la toxina pertusis, lo que indica que la proteína G involucrada es una proteína de tipo G_i/G_o (Masu et al., 1991; Pin y Duvoisin, 1995).

El principal papel fisiológico de los mGluR III es la potente acción inhibitoria que ejercen sobre la transmisión glutamatérgica, mecanismo descrito desde 1981 en numerosos trabajos tanto en las motoneuronas de la médula espinal como en amígdala, bulbo olfatorio, hipocampo y corteza cerebral. Este efecto se encuentra mediado por los receptores mGluR III presinápticos que actúan como autorreceptores reduciendo la liberación de glutamato (Pin y Duvoisin, 1995; Conn y Pin, 1997).

Otro efecto mediado por los mGluR III es la reducción de la actividad de canales iónicos. Se ha demostrado que los canales de Ca^{2+} tipo N pueden ser bloqueados por la activación de los mGluR III, inhibiendo la entrada de Ca^{2+} en varias regiones del cerebro, (Anwyl, 1999; Caponga, 2004). Así mismo, se ha descrito que los canales de Ca^{2+} tipo P/Q también pueden ser bloqueados por activación de mGluR III (Takahashi et al., 1996; Perroy et al., 2000; Millán et al., 2002). Por otro lado, se ha visto que la co-expresión de mGluR, 4, 6 y 7 con las subunidades de Kir3.1 y Kir 3.4 de los canales de K^+ tipo GIRK en ovocitos de *Xenopus*, activan al canal por unión de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G, después de la estimulación con el agonista de los mGluR III (Saugstad et al., 1996; Sharon et al., 1997). También pueden activar canales de K^+ rectificantes dando como resultado corrientes entrantes de K^+ en las terminales sinápticas que alejan del umbral para producir potenciales de acción (Cochilla y Alford, 1998).

Tabla 2. GRUPO DE RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO.

Modificada de Pin y Duvoisin, 1995; Con y Pin, 1997; Schoepp et al., 1999; Pin y Acher, 2002; Luján-Miras, 2005.

TIPO RECEPTOR	SUBTIPO DE RECEPTOR	SUBUNIDADES DEL RECEPTOR	VARIANTES	AGONISTA SELECTIVO	ANTAGONISTAS	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	AFINIDAD POR EL GLUTAMATO EC_{50} [μ M]
Metabotrópico	Grupo I	mGluR 1 mGluR 5	a,b,c,d,e a y b	DHPG	-4-CPG -AIDA -MPEP -SIB 1893 -SIB 1757 -LY 367385 -MCPG	↑ Hidrólisis PI Facilitan la Transmisión Sináptica	Postsináptica	mGluR 1a: 11 mGluR 1b: 56 mGluR 1c: 13 mGluR 5a: 10
Metabotrópico	Grupo II	mGluR 2 mGluR 3		DCG-IV	-EGLU -MCCG -LY 341495 -MCPG	↓ cAMP Reducen la Transmisión Sináptica	Postsináptica Presináptica Glial	mGluR 2: 12 mGluR 3: 4
Metabotrópico	Grupo III	mGluR 4 mGluR 6 mGluR 7 mGluR 8	a y b a y b a y b	L-AP ₄	-CPPG -MAP4 -MSOP	↓ cAMP Reducen la Transmisión Sináptica	Presináptica	mGluR 4: 27 mGluR 6: 16 mGluR 7:1000 mGluR 8: 9.5

- Recaptura de 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 localizados en la membrana plásmática tanto en las neuronas como en las células gliales que rodean las sinapsis.

El glutamato captado por los astrocitos reacciona con el amoniaco para formar glutamina por medio de la glutamina sintetasa, enzima dependiente de adenosín trifosfato (ATP). La glutamina es exportada al líquido extracelular y tomada por las neuronas glutamatérgicas, en la terminal sináptica de estas neuronas, la glutamina es hidrolizada a ácido glutámico y amonio por la acción de la glutaminasa activada por fosfato, que es una enzima mitocondrial. Tanto los astrocitos como las neuronas tienen transportadores que son impulsados por el gradiente de Na^+ y concentran la glutamina dentro de las células (Broman et al., 2000; Kandel et al., 2000; Hassel y Dingledine, 2006).

Estos transportadores utilizan gradientes electroquímicos de Na^+ , K^+ , H^+ y 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; Medina-Ceja et. al., 2007).

- Transportadores de glutamato

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 también llamados acarreadores de glutamato: el EAAT1 (GLAST1), el EAAT2 (GLT1), el EAAT3 (EAAC1), el EAAT4 y el EAAT5. El tamaño promedio varía entre 523 y 573 aminoácidos, tienen del 35-55% de homología en la secuencia de aminoácidos, presentando patrones casi idénticos de hidrofobicidad, sugiriendo que sus propiedades funcionales están basadas en rasgos estructurales similares (Takahashi et al., 1997), identificándose de seis a ocho dominos transmembranales en α -hélice en la región amino terminal y de una a dos asas reentrantes. La región carboxiloterminales presenta un dominio altamente conservado de 50 residuos aproximadamente y es hidrofóbico.

El transportador GLT1 se encuentra 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 μm^3 de tejido), también se encuentra en corteza, tálamo, cerebelo y bulbo olfatorio (Danbolt, 2000). Este transportador participa con más del 90% de la actividad del transporte total de glutamato en el cerebro, debido a que se localiza en los procesos de los astocitos y no en el soma, haciendo contacto con la sinapsis neuronal. El GLAST al igual que el GLT1 es un transportador glial. Su mayor expresión se localiza en el cerebelo (18,000 moléculas por μm^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).

Con base en estudios de estequiometría del transporte de glutamato, de baja ($K_m < 500\mu\text{M}$) y alta afinidad ($K_m < 1-100\mu\text{M}$), se determinó que el transporte lleva 3 Na^+ cotransportados con un glutamato/ H^+ por un intercambio de K^+ . El ciclo completo del transporte de glutamato involucra 2 pasos:

1.- Paso de traslocación de carga: el transportador vacío se carga con tres iones Na^+ y el glutamato/ H^+ para pasar la membrana plasmática y liberarlos en el interior de la célula; este paso se caracteriza por corrientes evocadas por glutamato altamente dependientes de voltaje.

2.- Paso de reubicación: el K^+ se une al transportador en el interior de la célula y lo libera al exterior para quedar nuevamente listo para la captura de Na^+ y glutamato/ H^+ .

La constante de tiempo de un ciclo completo del transportador es aproximadamente 70ms; sin embargo la unión de glutamato al transportador es muy rápida (1ms) por lo cual la eliminación del aminoácido de la hendidura sináptica es muy eficiente (Medina-Ceja et. al., 2007). Si el ciclo completo no se realiza porque el transportador no puede

entrar al paso de reubicación, el Na⁺ y el glutamato se unen al transportador en el interior de la célula y los trasloca en dirección inversa para comportarse como un intercambiador (Bellen, 1999; Kanai et al., 2002; Bridges y Esslinger, 2005).

Los 5 subtipos de transportadores muestran diferencias farmacológicas importantes y hoy en día existe una gran variedad de inhibidores que han sido desarrollados para bloquear su actividad. Los primeros inhibidores fueron sintetizados para mimetizar al glutamato, los siguientes compuestos estuvieron basados en restringir espacialmente el sitio de unión del glutamato con grupos funcionales que sirvieron para aumentar tanto la potencia como la selectividad de los análogos inicialmente utilizados. Un avance importante en términos farmacológicos ha sido la síntesis de nuevos inhibidores para diferenciar con más detalle los procesos de unión y traslocación de los compuestos existentes, en este sentido se ha podido distinguir entre inhibidores substrato y no substrato.

Los inhibidores substrato pueden inducir liberación de aminoácidos excitadores por intercambio intracelular del inhibidor por el substrato y son fácilmente identificados porque generan corrientes; a diferencia de los inhibidores no- substrato, los cuales no inducen corrientes por ellos mismos, pero pueden bloquear corrientes inducidas por los substratos cuando son co- aplicados (Anderson, et al., 2001); es decir , los inhibidores no-substrato se unen al sitio por el lado extracelular del transportador bloqueando su posible actividad como intercambiador. Ejemplo de estos compuestos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE GLUTAMATO.
 Modificada de Bridges y Esslinger, 2005.

ORGANIZACIÓN CON BASE A SU ESTRUCTURA QUÍMICA	NOMBRE DEL COMPUESTO	CLASE DE INHIBIDOR	TIPO DE TRANSPORTADOR QUE BLOQUEA
Modificaciones en β -hidroxi aspartato	a) β - TBHA	Substrato	EAAT1-3
	b) TBOA	No Substrato	EAAT1-3
	c) TMOA	No Substrato	EAAT2 y EAAT5
	d) TFB-TBOA	No Substrato	EAAT1-3
Modificaciones en Metil- glutamato	a) 2S, 4R-4MG	No Substrato	EAAT2
	b) T3-MG	Substrato No Substrato	EAAT1 EAAT2
Modificaciones en Carboxiciclopropil-glicina	a) CCG-III	Substrato	EAAT1 y EAAT2
Modificaciones en Pirrolidin-dicarboxílico	a) DHK	No Substrato	EAAT1-3
	b) L-trans-2,4-PDC	Substrato	EAAT1-4
	c) L-trans-2,3-PDC	No Substrato	EAAT2
	d) L-anti-endo-3,4-MPDC	No Substrato	EAAT2
Modificaciones en Grupo azol	a) TDPA	No Substrato	EAAT1-3
	b) HTA	No Substrato	EAAT1 y EAAT2
Modificaciones en Amino ciclopentano dicarboxílico	a) WAY-855	No Substrato	EAAT1-3

- Excitotoxicidad y Neurodegeneración

La transmisión sináptica glutamatérgica finaliza rápidamente por medio de la remoción del glutamato del espacio extracelular, esto es importante para mantener su concentración por debajo de los niveles neurotóxicos, y evitar así la sobreactivación de sus receptores en la neurona postsináptica. Cuando no se lleva a cabo la remoción eficientemente, el glutamato es capaz de dañar las células nerviosas lo que se ve reflejado en diversas fisiopatologías de varios desórdenes neuronales (Arias, 1991).

John Olney acuñó el término de excitotoxicidad para describir la capacidad de los aminoácidos excitadores, específicamente el L-glutamato, de sobreactivar y llevar a la muerte a las células nerviosas. 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 en la retina. 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 a 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 5.

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 el exceso en la concentración de calcio citosólico lleva a una activación inapropiada de los procesos dependientes de calcio generando desajustes en varios procesos celulares, incluidos los de generación de energía (Siesjo et al., 1995). Entre las consecuencias de tal incremento están 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 los cuales generan alteraciones químicas en todas las macromoléculas celulares participando en la inducción de la muerte neuronal a través de diferentes procesos como apoptosis, autofagia y necrosis (Maycotte y Morán, 2007). 3) Las endonucleasas que se encargan de la degradación de los ácidos nucleicos que inducen el daño del núcleo celular (Bano y Nicotera, 2007).

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 IP₃ estimula su liberación de pozas intracelulares (Mannaioni et al., 2001). Así como también la activación de proteínas - 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 como el superóxido. Esto disminuye la capacidad de producción de ATP, por lo cual decrece la actividad de la bomba sodio-potasio (ATPasa Na⁺-K⁺) provocando la disminución en 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).

Hace algún tiempo se consideraba que los receptores tipo NMDA eran los únicos que participaban en la excitotoxicidad (Choi, 1988b); sin embargo, ahora está claro que la activación de los receptores no-NMDA es igual de importante (Koh et al., 1990; Prehn et al., 1995). De esta manera, el mediador predominante del daño neuronal es la sobrecarga en la concentración intracelular de Ca²⁺ libre, que se puede dar por un mayor flujo a través de los receptores tipo NMDA, de los receptores tipo AMPA permeables a Ca²⁺, por su liberación de sitios donde se acumula intracelularmente (como el retículo endoplásmico) y por su deficiente amortiguamiento por las mitocondrias. Por lo tanto, la excitotoxicidad es un proceso en el cual la sobreactivación de los receptores postsinápticos de glutamato, da lugar a una despolarización prolongada de las neuronas, permitiendo una entrada masiva de Ca²⁺ principalmente a través de los receptores a glutamato, desencadenando la activación no controlada de procesos perjudiciales que eventualmente producen la muerte neuronal (Arundine y Tymianski, 2003) y que, suele ser muy regional y selectiva, debido a que puede depender, entre otros factores, de la distribución particular de los receptores glutamatérgicos y de las propiedades bioquímicas y eléctricas de las células blanco (McDonald et al., 1990).

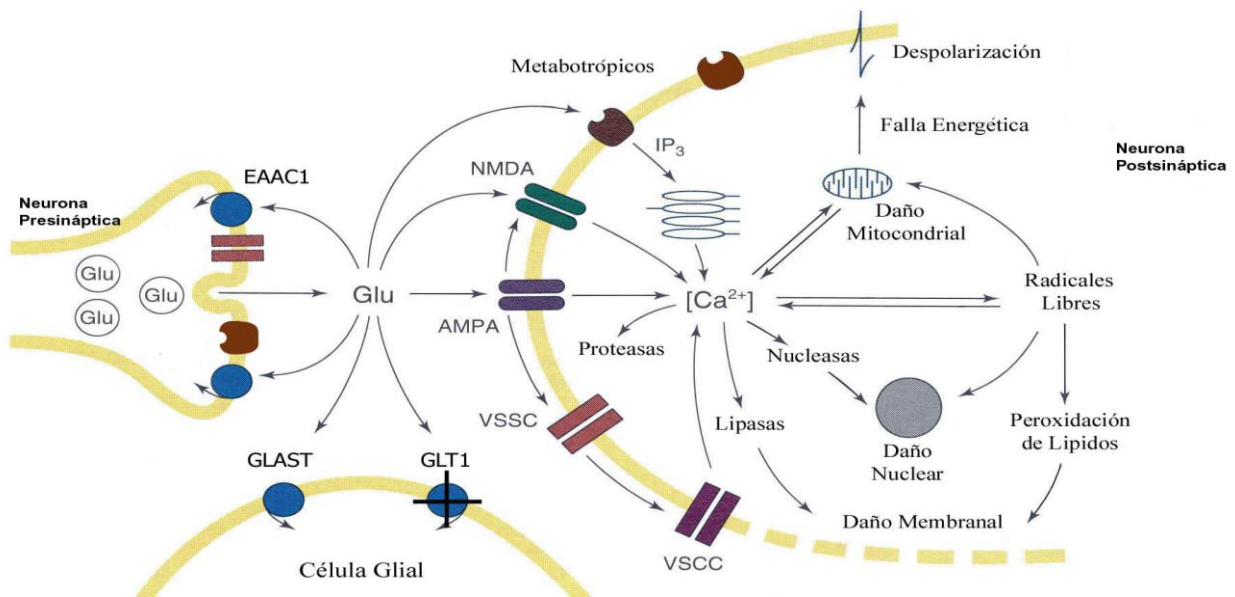


Figura 5. Representación esquemática de los procesos bioquímicos que participan en el mecanismo de excitotoxicidad en una sinapsis glutamatérgica. Receptores: NMDA, AMPA y mGluR. Transportadores: EAAC1, GLAST y GLT1. Canales de calcio sensibles a voltaje: VSCC. Inositol (1,4,5) trifosfato: IP₃. Calcio: Ca²⁺. Glutamato: Glu

II. ANTECEDENTES

- Epilepsia y neurodegeneración.

En varios periodos de la historia la epilepsia se ha visto como un castigo, posesión del demonio, persecución o como una enfermedad contagiosa. Desde la aparición de la escritura, se tienen indicios de su existencia referida como enfermedad sagrada (*Morbus sacer*, en latín) la cual figura en documentos de la antigua Mesopotamia (5000 a.C. aprox). 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, y dado el asombro que causaba entre los hombres, siempre estuvo relacionada con cuestiones mágico-religiosas (Brailowsky, 1999).

Estas ideas predominaron hasta el inicio del siglo XIX cuando Heberden describió algunas características clínicas. Tiempo después Hugligns Jackson inició la descripción meticulosa 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*. Muchos años más tarde 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 tiempo después Hans Berger publica los primeros registros del EEG de humano (Brailowsky, 1999).

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 el cambio de ideas a través del tiempo sobre las funciones cerebrales en las diferentes épocas.

La palabra epilepsia deriva de una preposición y de un verbo irregular griego “*epilambanein*” que significa “ser tomado o sorprendido bruscamente”. 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. 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, 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 manifestaciones clínicas y las alteraciones electroencefalográficas catalogadas como crisis epilépticas. Según la Asamblea General de la Liga Internacional contra la Epilepsia en el XXIV Congreso Internacional de Epilepsia efectuado en el 2001, aprobó la actual clasificación de las crisis epilépticas tomando en cuenta la causa y los posibles trastornos relacionados en:

1) Crisis Parciales o Focales. Tienen su origen en un pequeño grupo de neuronas que forman un foco epiléptico, esto determina la sintomatología dependiendo de la región cerebral donde se encuentre.

a) Crisis sensoriales focales; crisis del lóbulo parietal y occipital

b) Crisis experienciales; crisis del lóbulo tempo-parieto-occipital

c) Crisis motoras; crisis del lóbulo temporal.

2) Crisis Generalizadas. Involucra a toda la corteza cerebral desde su inicio y de manera difusa, además de que puede presentar uno o varios focos epilépticos.

Involucra las crisis Tónicas, Clónicas, Ausencias Típicas y Atípicas y Atónicas (Coulter, D y Mathern G, 2001).

Los términos ataque, crisis, epilepsia, espasmo son comúnmente utilizados para definir una descarga anormal cerebral. En un foco epiléptico cada neurona 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 constituyan 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 Ca^{+2} y Na^{+} y las corrientes de salida de K^{+} que generan brotes espontáneos de despolarización que se manifiestan eléctricamente como una espiga epiléptica en el electroencefalograma (EEG) (Feria et al., 1997).

También se ha demostrado que esta despolarización 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 y específicamente se sabe que la causa de varios tipos de epilepsia se debe precisamente a alteraciones en la transmisión glutamatérgica (Chapman, et al., 1996; Bräuner-Osborne et al., 2000). 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 el NBQX o el GYKI522466, han probado ser anti-convulsivantes 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 en el líquido cefalorraquídeo 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).

- El hipocampo en la epilepsia y la neurodegeneración.

Durante el estudio de la epilepsia se ha demostrado que una de las estructuras cerebrales más afectadas 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 celular 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 excitadora 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 característica 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).

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 y Tapia, 2001).

En los últimos años se ha incrementado el interés por 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 se desconocen las causas de muerte neuronal, pero se han relacionado algunos factores que podrían interactuar entre sí, tales como, 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).

- 4-AP (4- aminopiridina).

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^+ , 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_A) y tipo D (I_D), 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.

- PDC (L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico).

Por otro lado, 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).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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). Cuando la concentración de glutamato incrementa significativamente, 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-AP₄, 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-AP₄ 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 reducción de la liberación de glutamato por la activación de ciertos receptores mGluR, se ha podido relacionar 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-Miras 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.

Por otro lado, el acoplamiento negativo de mGluR III a la vía adenilato ciclasa/AMPC coincide con el efecto inhibitorio de la transmisión sináptica, dado que la activación de esta vía con forskolina, induce el incremento de la liberación espontánea de glutamato dependiente de la elevación de los niveles intracelulares de AMPC (Herrero y Sánchez-Prieto, 1996b). Por lo que es posible pensar que los mGluR III puedan modular, a través de la inhibición de esta vía, la transmisión glutamatérgica y reducir el daño causado por excitotoxicidad.

En los antecedentes presentados se sugiere que los mGluR III podrían activarse como un posible mecanismo de protección contra la excitotoxicidad inducida por el glutamato bajo condiciones de incremento excesivo de glutamato extracelular. Por lo anterior, es relevante el estudio de estos receptores para poder conocer el mecanismo de

protección. Para ello, en el presente trabajo se utilizó la técnica de microdiálisis en el hipocampo de ratas en libre movimiento y se realizaron perfusiones del inhibidor competitivo de la recaptura de glutamato, el ácido L-trans-2,4-pyrrolidin-dicarboxílico (PDC) en presencia de 4-AP con y sin el agonista y antagonista selectivo para los mGluR III con registro simultáneo de la actividad electroencefalográfica cortical.

IV. HIPÒTESIS

El incremento de glutamato producido por 4-AP, puede inducir epilepsia y muerte neuronal por excitotoxicidad por la sobreactivación, principalmente, del receptor tipo NMDA; pero el incremento extracelular de este aminoácido, provocado por inhibición de su recaptura, podría activar receptores metabotrópicos principalmente del grupo III que inhiban la liberación de glutamato de las terminales presinápticas, resultando la neuroprotección. Esta depresión en la transmisión sináptica excitadora, podría antagonizar los efectos excitotóxicos de la 4-aminopiridina. Por lo tanto, por un lado, los antagonistas de los mGluR III, deben revertir la neuroprotección, mientras que el agonista debe potenciar la excitotoxicidad.

V. OBJETIVOS

Con base en lo anterior, los objetivos del presente trabajo son:

1. Demostrar si la inhibición de la recaptura del glutamato por el ácido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC), en el hipocampo de la rata *in vivo*, es capaz de proteger contra los efectos de epilepsia y neurodegeneración producidos por la 4-aminopiridina (4-AP) debido a la activación de los mGluR III, utilizando dos antagonistas específicos para estos receptores, (S)-2-amino-2-metil-4-ácido fosfonobutanoico (MAP₄) y (R-S)- α -metilserina-O-fosfato (MSOP).
2. Demostrar si la activación selectiva de los mGluR III con el agonista, L(+)-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP₄), produce protección contra la epilepsia y la neurodegeneración inducidas por la 4-AP en el hipocampo de la rata *in vivo*.

VI. DISEÑO Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.

▪ **Cirugía para el implante de cánulas para experimentos de microdiálisis:**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 220-240g, las cuales fueron anestesiadas con halotano de entre 0.5-1.5% en una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ para llevar a cabo el implante de cánulas de microdiálisis. Una vez anestesiados los animales se realizó un corte en la piel para exponer el cráneo y se colocaron dos tornillos a nivel de la corteza parietal, los cuales fueron utilizados como electrodos para el electroencefalograma (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:**

Con la finalidad de permitir la recuperación de los animales del daño mecánico ocasionado en el tejido por la entrada de la cánula guía después de la cirugía, se esperó un tiempo de cinco días para llevar a cabo los experimentos. El día de la microdiálisis, 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 10 µl/min para eliminar el glicerol, sustancia con la cual es empaquetada.

Posteriormente, a través de la cánula se perfundió continuamente en el hipocampo una solución Krebs-Ringer compuesto por NaCl 118 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.18 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 10 mM, CaCl₂ 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 diferentes

aminoácidos: 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 los diferentes compuestos utilizados: 4-aminopiridina (4-AP) a una concentración de 7mM, ácido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC) a una concentración de 50mM, (S)-2-animo-2-metil-4-ácido fosfonobutanoico (MAP₄) a una concentración de 500µM, (R-S)-α-metilserina-O-fosfato (MSOP) a una concentración de 1 mM y L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP₄) a una concentración de 100mM.

El bloqueador de canales de potasio, 4-AP (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) se perfundió a través de la membrana, únicamente durante una fracción de microdiálisis, el bloqueador del transporte de glutamato, PDC (Tocris, Langford, Bristol, Reino Unido) se perfundió durante 3, 5 y 9 fracciones continuas de microdiálisis en grupos experimentales independientes. Los antagonistas de los mGluR III, MAP₄ y MSOP (Tocris, Langford, Bristol, Reino Unido) y el agonista de los mGluR III, LAP-₄ (Tocris, Langford, Bristol, Reino Unido) se perfundieron durante nueve fracciones continuas de microdiálisis. Las concentraciones de las drogas utilizadas fueron calculadas con base a la eficiencia del ~ 10% de la cánula de microdiálisis según la determinación realizada por Morales-Villagran y colaboradores (1996).

▪ **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, 5 µm de poro) 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 ml / 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 diferente porcentaje de sacarosa al 10, 20 y 30%. Luego se realizaron cortes coronales seriados en congelación del sitio de lesión con un grosor de 40 μm y se tiñeron con violeta de cresilo para confirmar la correcta localización de la cánula de microdiálisis en el tejido y para el conteo de la muerte neuronal.

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 μm^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.

- **Grupos experimentales:**

En el presente estudio se utilizaron ratas implantadas en la región CA1 del hipocampo para experimentos de microdiálisis en libre movimiento. A continuación se describe la combinación de los compuestos utilizados en cada grupo experimental.

1. Grupo perfundido con 4-AP durante 1 fracción de microdiálisis.
2. Grupo perfundido con PDC durante 5 fracciones de microdiálisis.
3. Grupo co-administrado con 1 fracción de 4-AP y 3 fracciones de PDC.
4. Grupo co-administrado con 1 fracción de 4-AP y 5 fracciones de PDC.
5. Grupo co-administrado con 1 fracción de 4-AP y 9 fracciones de PDC.
6. Grupo perfundido con MAP₄ durante 9 fracciones.
7. Grupo perfundido con MSOP durante 9 fracciones.
8. Grupo co-administrado con 1 fracción de 4-AP y 9 fracciones de MAP₄.
9. Grupo co-administrado con 1 fracción de 4-AP y 9 fracciones de MSOP.
10. Grupo co-administrado con 9 fracciones de PDC y MAP₄.
11. Grupo co-administrado con 9 fracciones de PDC y MSOP.
12. Grupo control de LAP₋₄ durante 9 fracciones.
13. Grupo co-administrado con 1 fracción de 4-AP y 9 fracciones de LAP₋₄.

VII. RESULTADOS

- **Primera parte:**

En el siguiente artículo de investigación original se presentan las evidencias que apoyan la hipótesis mencionada previamente en este trabajo, en el cual describimos el efecto excitotóxico producido por la 4-AP y la protección paradójica ejercida por el bloqueo del transporte de glutamato por la posible activación de los mGluR III, ya que los antagonistas específicos utilizados para estos receptores, fueron capaces de revertir el efecto protector producido por el PDC.

Se presenta el artículo publicado en Journal of Neuroscience Research.

Activation of Group III Metabotropic Glutamate Receptors by Endogenous Glutamate Protects Against Glutamate-Mediated Excitotoxicity in the Hippocampus In Vivo

Gabriela Vera and Ricardo Tapia*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Perfusion of 4-aminopyridine (4-AP) by microdialysis in the hippocampus produces intense epileptiform behavioral and electrical activity and neurodegeneration, resulting from a stimulated release of glutamate from nerve endings. In contrast, accumulation of extracellular glutamate by blockade of its transport in vivo in anesthetized rats is innocuous, and studies in vitro in brain slices suggest that under these conditions glutamate may activate presynaptic group III metabotropic glutamate receptors (mGluRs) and inhibit its own release. Therefore, using microdialysis, EEG recording, and histological evaluation, we studied the effect of increased endogenous extracellular glutamate by blockade of its transport with pyrrolidine dicarboxylic acid (PDC) on the excitotoxic action of 4-AP in the hippocampus of awake rats. We found that up to a 20-fold increase in extracellular glutamate during >90 min with PDC does not induce any sign of excitotoxicity. On the contrary, this glutamate increase notably protected against the 4-AP-induced seizures and neurodegeneration, and, remarkably, this protection was dependent on the time of perfusion with PDC and thus on the duration of extracellular glutamate accumulation. To test whether this protective action was mediated by the activation of group III mGluRs, we used specific antagonists of these receptors and found that they clearly prevented the protective effect of PDC, without affecting the accumulation of extracellular glutamate. We conclude that the spillover of the excess extracellular glutamate activates presynaptic group III mGluRs and inhibits the stimulatory effect of 4-AP on its release, thus preventing the activation of postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptors and its deleterious consequences. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: 4-aminopyridine; epilepsy; glutamate transport; metabotropic glutamate receptors; neurodegeneration

An excessive neurotransmission at glutamatergic synapses, mediated mainly by overactivation of the glutamate ionotropic receptors, may be involved in epilepsy and in some acute and chronic disorders of the CNS,

such as anoxia-ischemia, cerebral trauma, and several neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. Systemic or intracerebral administration of glutamate receptor agonists is frequently used to induce this kind of excitotoxicity, but there are few data in vivo demonstrating neuronal damage by excessive glutamatergic transmission resulting from endogenous glutamate. We have shown that such an effect in vivo is produced by the intrahippocampal administration of the K⁺ channel blocker 4-aminopyridine (4-AP), which stimulates the release of endogenous glutamate from nerve endings and induces intense epileptic seizures and neurodegeneration, effects that seem to be mediated by overactivation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, because they are prevented by antagonists of this receptor (Morales-Villagrán et al., 1996; Peña and Tapia, 1999, 2000; Ayala and Tapia, 2003, 2005).

In contrast to these effects of glutamate release stimulation, large increases in the concentration of extracellular glutamate induced by inhibitors of glutamate transport in vivo in the cortex, hippocampus, striatum, and spinal cord did not result in excitotoxicity (Massieu et al., 1995; Obrenovitch et al., 1996; Massieu and Tapia, 1997; Corona and Tapia, 2004; Tovar-y-Romo and Tapia, 2006; Tovar-y-Romo et al., 2009).

Contract grant sponsor: Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM; Contract grant numbers: IN209807, IN215610; Contract grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico; Contract grant numbers: 60322, 128229; Contract grant sponsor: CONACYT (to G.V.).

*Correspondence to: Ricardo Tapia, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, 04510-México D.F., México. E-mail: rtapia@ifc.unam.mx

Received 29 July 2011; Revised 21 October 2011; Accepted 17 November 2011

Published online 18 January 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23006

These results suggest that, in contrast to its intense excitotoxic action when released in excess from nerve endings, the extracellular endogenous glutamate accumulated as a consequence of transport blockade does not reach the ionotropic postsynaptic receptors.

On the other hand, there is evidence that, in slices of the hippocampus and other brain regions, when glutamate transport is blocked it can diffuse to neighboring synapses and activate presynaptic metabotropic glutamate receptors (mGluRs), particularly those of group III, and as a consequence inhibits the release of glutamate itself and of other transmitters such as γ -aminobutyric acid (GABA; Scanziani et al., 1997; Oliet et al., 2001; Piet et al., 2003). In fact, group III mGluRs are located predominantly in presynaptic active zones (Ohishi et al., 1995; Bradley et al., 1996; Shigemoto et al., 1996, 1997), and their activation results in inhibition of neurotransmitter release (for review see Cartmell and Schoepp, 2000; Schoepp, 2001; Piet et al., 2004; Pinheiro and Mulle, 2008).

These findings led us to postulate that increased levels of extracellular glutamate induced by its transport blockade could paradoxically protect against the excitotoxicity produced by 4-AP *in vivo*, because the stimulated release of glutamate could be inhibited by activation of group III mGluRs. The aim of the present work was to test this hypothesis. For this purpose, we perfused *L-trans*-2,4-pyrrolidine-dicarboxylic acid (PDC), a potent competitive inhibitor of glutamate uptake, by reverse microdialysis in the hippocampus of awake rats, previous to perfusion of 4-AP with or without antagonists of group III mGluRs, by the same microdialysis procedure, with simultaneous recording of the cortical EEG. Extracellular glutamate concentration was measured in the microdialysis perfusates, and the hippocampus was studied histologically 24 hr later to assess the neuronal damage. Our results show that, in the awake, freely moving rat, 1) the excitotoxic effects of 4-AP are more intense than in anesthetized animals but are also blocked by NMDA receptor antagonists; 2) a large increase of extracellular glutamate resulting from transport blockade is innocuous; 3) this increase notably protects against both the behavioral and EEG epileptiform activity and the neurodegeneration induced by 4-AP; and 4) this protection is prevented by group III mGluR antagonists, indicating that it is due to the inhibition of glutamate release stimulated by 4-AP.

MATERIALS AND METHODS

Microdialysis and Amino Acid Determination

Male Wistar rats (220–240 g) were used in all experiments and were handled according to international standards of animal welfare (Assurance of the Office of Laboratory Animal Welfare number A5281-01) and to the Rules for Research in Health Matters (México), with approval of the local Animal Care Committee. Rats were anesthetized with 0.5–1.5% halothane in 95% O₂/5% CO₂, placed in a stereotaxic frame, and implanted with two cranial electrode screws

over the parietal cortex for EEG recording and with a cannula guide in the left dorsal hippocampus (coordinates: AP –3.6, L 2.4 and V –4.0 from bregma; Paxinos and Watson, 1982). The electrodes and cannula guide were fixed to the skull with dental cement. After surgery, anesthesia was discontinued, and rats were returned to individual cages and provided with food and water *ad libitum*. Five to seven days after surgery, microdialysis was carried out in the awake, freely moving rats, to avoid the known effects of anesthesia on glutamatergic neurotransmission (Ramírez-Munguía et al., 2003). Previously water-flushed microdialysis cannulas (CMA/12, CMA Solna, Sweden) were inserted into the cannula guide, to reach the vertical coordinate mentioned above. The animals were then placed in the bowl of a free-movement microdialysis system (CMA 120), and the cannulas were continuously perfused using a microinjection pump (CMA 400/Camegie Medicin) at a flow rate of 2 μ l/min with Krebs medium of the following composition (in mM): 118 NaCl, 1.2 KH₂PO₄, 4.7 KCl, 1.18 MgSO₄, 25 NaHCO₃, 10 glucose, 2.5 CaCl₂ (pH 7.4). After a 1-hr stabilization, fractions of 25 μ l (12.5 min) were consecutively collected. The first three fractions collected were used to determine the basal extracellular levels of amino acids; 4-AP was then perfused during the fourth fraction, and eight additional fractions with normal medium were collected. Previous experiments in halothane-anesthetized rats had shown that 4-AP concentrations higher than 17 mM were necessary to increase the release of glutamate and induce the excitotoxic effects (Peña and Tapia, 1999, 2000). However, in preliminary experiments using 3, 5, 7 and 17 mM 4-AP concentrations, we found that the awake rats were far more sensitive to 4-AP than the anesthetized animals, because 17 mM caused very intense seizures that made it difficult to manipulate the rats during the experiment, and 3 mM had only slight effects. Therefore, we chose a dose of 7 mM 4-AP for all the experiments. PDC was perfused by the same microdialysis procedure during 37 min (three fractions), 62 min (five fractions), or 112 min (nine fractions), alone or starting 25 min before 4-AP, as described in Results. A 50 mM PDC concentration was used on the basis of previous work (Massieu et al., 1995; Massieu and Tapia, 1997). To test the involvement of NMDA receptors in the excitotoxic effect of 4-AP in the awake animals, in some experiments the NMDA receptor antagonist MK-801 was injected *i.p.* (1 mg/kg) 30 min before 4-AP perfusion, or it was coperfused with 4-AP at 1 and 7 mM concentrations. To block group III mGluRs, we used two specific antagonists, (S)-2-amino-2-methyl-4-phosphonobutanoic acid (MAP₄) and (R,S)- α -methyl-serine-*o*-phosphate (MSOP), that have been shown to act in presynaptic mGluRs in the rat CNS, including the hippocampus (Salt and Eaton, 1995; Bushell et al., 1995, 1996; Sekiyama et al., 1996; Thomas et al., 1996). After some preliminary experiments with several concentrations, the antagonists were perfused at 0.5 mM and 1 mM concentrations, respectively, together with PDC for 112 min, because under these conditions the protection by PDC was maximal. Control experiments with MAP₄ and MSOP alone or in combination with PDC in the absence of 4-AP were also carried out. In all cases, NaCl concentration was proportionally reduced to maintain isosmolarity. The efficiency of the dialysis membrane is 10–12% (Massieu et al., 1995).

The content of glutamate was measured in the microdialysis perfusates by HPLC, after *o*-phthaldialdehyde derivatization, as previously described (Massieu et al., 1995). Amino acid quantification was made by comparison with a standard mixture of amino acids processed in the same manner.

EEG Recording

The cortical EEG was recorded continuously in all experimental groups, starting at the time of the collection of the basal microdialysis fractions, using a Grass polygraph, with a low-frequency filter at 3 Hz and high-frequency filter at 100 Hz. The data were quantitatively analyzed by calculating the mean number of epileptiform discharges as well as their duration (measured from the beginning of the hypersynchronous activity to the end of the high amplitude spike train) and their frequency of occurrence.

Histological Evaluation

Histological evaluation was carried out 24 hr after the experiment, because we have previously found that the 4-AP-induced neurodegeneration is maximal at this time (Ayala and Tapia, 2003). Rats were anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with 250 ml saline solution (0.9%), followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The brains were removed, postfixed for 24 hr at 4°C, and transferred successively to 10%, 20%, and 30% sucrose (24 hr each). Brain coronal sections (40 μ m thick) were obtained in a cryostat and stained with cresyl violet for assessing the correct location of the microdialysis probes and for histological observations. For quantitative analysis of the neuronal loss, the morphologically undamaged neurons in the CA1 hippocampal region were counted in a $\times 20$ microscopic field (30,000 μ m²), in both the perfused and the contralateral hippocampi, with the help of an image analyzer system (NIH Image 1.6). The healthy neurons (identified as cells of >15 μ m in diameter, with clear cytoplasm and an appearance similar to that of control rats and of the contralateral hippocampus) were considered undamaged. Six sections were counted in each brain, three anterior and three posterior to the cannula tract, from five different animals for each experimental protocol. ANOVA and Student's *t*-test were used for the statistical analysis of the changes in amino acid concentration and of neuronal loss.

RESULTS

Changes in Extracellular Glutamate

As shown in Figures 1–3, the basal concentration of extracellular glutamate varied from 9 to 15 pmoles/10 μ l but was similar to concentrations previously described for the hippocampus of awake rats (Ramírez-Munguía et al., 2003). Perfusion of 7 mM 4-AP during 12.5 min (one microdialysis fraction) induced a slight, transitory increase of extracellular glutamate, similar to that previously observed in anesthetized rats using low concentrations of 4-AP (3 and 7 mM; Peña and Tapia, 1999). Although the glutamate increase was not statistically significant, compared with the basal value, it was clearly significant compared with the value of control rats per-

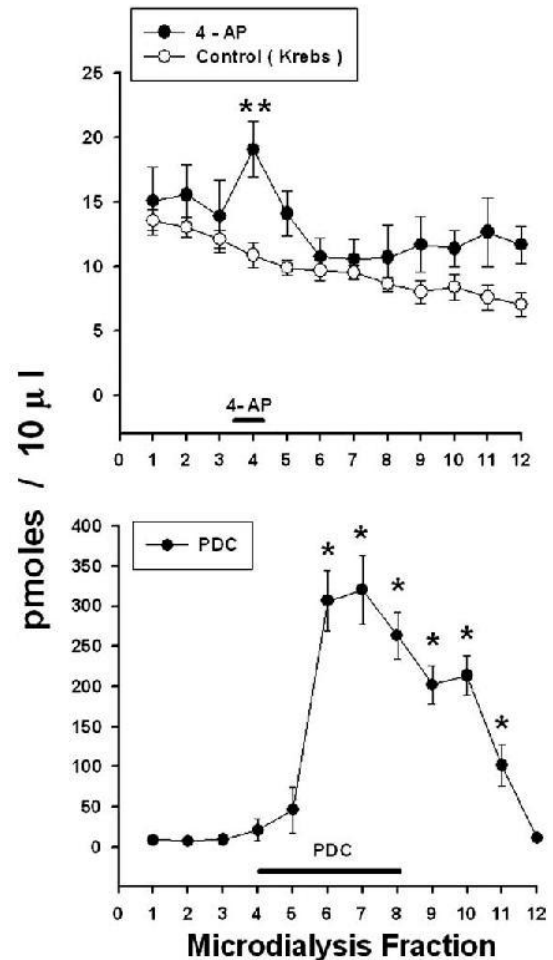


Fig. 1. Changes in extracellular concentration of glutamate induced by 7 mM 4-AP and 50 mM PDC in the hippocampus of freely moving rats. One microdialysis fraction represents 12.5 min, and the horizontal bars indicate the time of perfusion with each compound. Note the different scale on the ordinate axes. Each point is the mean value \pm SEM for seven rats in each group. The peak increase induced by 4-AP (fraction 4) was not significantly different from the corresponding basal value ($P > 0.1$), but it was highly significant (** $P < 0.01$) compared with the value for control rats perfused with Krebs medium, in which no change at all occurred. * $P < 0.001$ compared with the average of the three basal fractions.

fused with Krebs medium, in which no change at all occurred (Fig. 1, top).

When 50 mM PDC was perfused for 62 min (five microdialysis fractions), a remarkable >20 -fold increase in the extracellular levels of glutamate was observed, lasting for the duration of PDC perfusion and then decreasing rapidly to the basal levels (Fig. 1, bottom). As shown in Figure 2, similar changes were observed during perfusion with PDC for 37, 62, and 112 min (corresponding to three, five, and nine microdialysis fractions, respectively), combined with perfusion of 4-AP for 12.5 min starting 25 min after the beginning of PDC (indicated

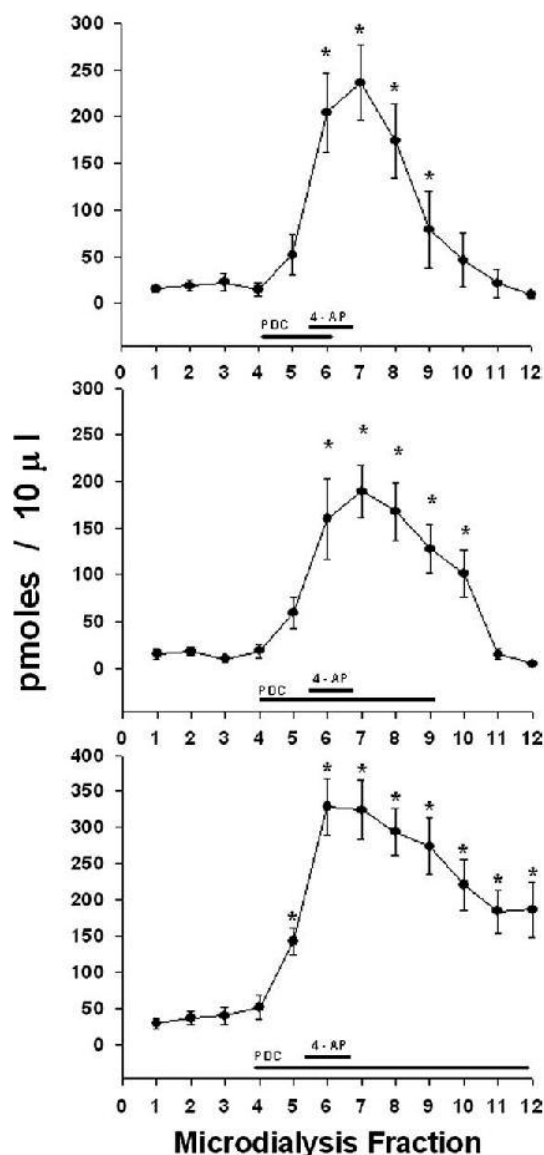


Fig. 2. Perfusion of PDC during different time periods combined with 4-AP perfusion induces a remarkable increase in glutamate that was dependent on the duration of the perfusion. One microdialysis fraction represents 12.5 min, and the horizontal bars indicate the time of perfusion with each compound. Each point is the mean value \pm SEM for seven rats. * $P < 0.001$ compared with the average of the three basal fractions.

by the horizontal bars in each panel of Fig. 2). The duration of the notable increment of glutamate induced by PDC was proportional to the time of PDC perfusion.

Perfusion of MAP₄ or MSOP alone for 112 min did not significantly modify the extracellular amino acid levels, and the slight transitory elevation of glutamate induced by 4-AP was not observed (Fig. 3) even when, as described below, these antagonists slightly potentiated the effect of 4-AP. When MAP₄ or MSOP was perfused

together with PDC for 112 min, the increase in glutamate concentration was similar to that observed with PDC alone (Fig. 3) or with PDC + 4-AP (not shown).

MK-801 and PDC Protect Against the Epileptogenic Action of 4-AP, and Group III mGluR Antagonists Prevent This Protection

Control rats perfused only with Krebs medium did not show any significant behavioral alteration, and their EEGs were characteristic of their awake state at all times, as shown in the basal trace in Fig. 4). Importantly, in agreement with our previous results in anesthetized rats (Massieu et al., 1995; Massieu and Tapia, 1997), the perfusion of PDC alone was completely innocuous, because it did not modify the EEG (Fig. 4, top trace) or the motor behavior at any time, even when, as described above, the concentration of extracellular glutamate was increased severalfold.

The EEG seizure discharges produced in anesthetized rats by intrahippocampal perfusion of 17–70 mM 4-AP have been amply described in our previous communications (Peña and Tapia, 1999, 2000; Ayala and Tapia, 2003, 2005). As exemplified in the third and fourth traces in Figure 4, in the awake animals 7 mM 4-AP was enough to induce intense epileptiform discharges, characterized by an initial hypersynchronous activity followed by trains of high-amplitude spikes. These discharges appeared with a latency of 18.2 ± 1.7 min after the beginning of 4-AP perfusion, and their duration and frequency during the next 20 min and in the following 20–40-min periods are shown in the graph in Figure 4 (mean duration 36.8 ± 3.7 sec). After 43 ± 3.7 min ($n = 7$), the discharge became continuous and of high amplitude, thus defining a status epilepticus, indicated by the horizontal bar in the graph. This state lasted until the end of the recording period (~ 60 min). The appearance of the EEG discharges coincided with several motor alterations, including tremor, grooming, masticatory movements, sniffing, head nodding, and frequent wet-rat shakes. During status epilepticus, the rats showed continuous hypersalivation, tonic-clonic movements of the forepaws, intense flexion–extension of the head accompanied by eyelids myoclonus, rigidity of the tail, and loss of posture.

To test whether the excitotoxic effect of 4-AP was due to overactivation of NMDA receptors by the excess extracellular endogenous glutamate, we administered the NMDA receptor antagonist MK-801 in two ways. Intraperitoneal injection of MK-801 (1 mg/kg 30 min before 4-AP perfusion) drastically reduced the epileptogenic discharges as well as the behavioral alterations and the 4-AP-induced hippocampal neurodegeneration described below (Fig. 4, fifth and sixth traces). Furthermore, microdialysis perfusion of 7 mM MK-801, starting 37 min before 4-AP, also exerted notable protection, similar to that shown in Figure 4 ($n = 7$, results not shown). This protective effect of MK-801 was very similar to that previously observed in anesthetized rats, indicating

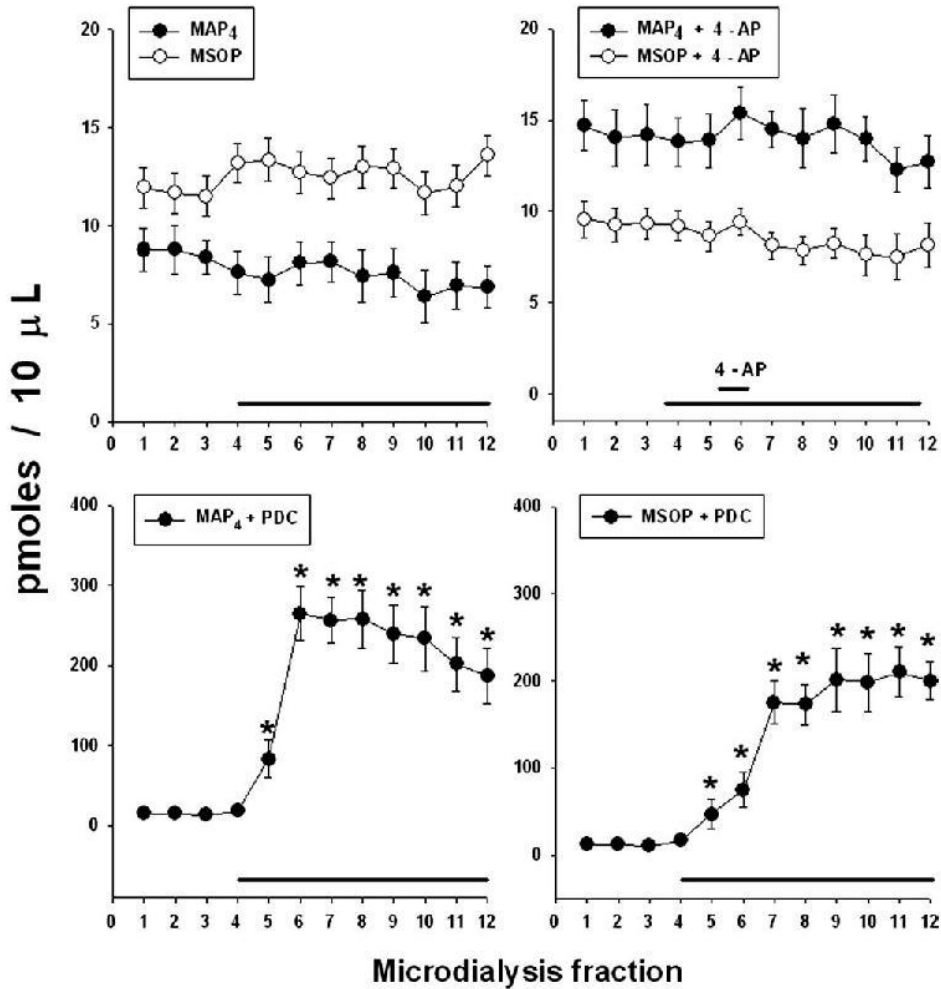


Fig. 3. MAP₄ (500 μM) or MSOP (1 mM) perfusion does not alter extracellular glutamate. One microdialysis fraction represents 12.5 min, and the horizontal bars indicate the time of perfusion with each compound. The differences in the basal values (fractions 1–4)

between groups occur frequently and are due to experimental variations. Note the different scales on the ordinate axes. Each point is the mean value ± SEM for seven rats in each group. **P* < 0.001.

that, in the awake animals, under the experimental conditions used, the excitotoxic effect of 4-AP is due also to overactivation of NMDA receptors by the enhanced release of endogenous glutamate from nerve endings (Peña and Tapia, 2000; Peña et al., 2002; Ayala and Tapia, 2003, 2005).

Perfusion with MAP₄ or MSOP alone for 112 min did not alter the EEG activity or the behavior of the animals (*n* = 5 in each group, results not shown). However, combined 4-AP + MAP₄ or 4-AP + MSOP perfusion resulted in a slight potentiation of the epileptogenic effect of 4-AP, because the amplitude of discharges was increased at 25 min (Fig. 5). The behavioral effects of 4-AP described above were also more intense, and some bleeding from nose, eyes, ears, and mouth occurred during status epilepticus.

As shown in Figure 6, perfusion of PDC for 112 min as described above and in Materials and Methods

resulted in a notable reduction of the 4-AP-induced EEG epileptiform activity. In these animals, the number of the discharges during the initial 40 min was much lower than in the other groups, and status epilepticus was abolished, although some infrequent discharges 80–130 sec in duration persisted until the end of the experiment (Fig. 6). In addition, these animals never showed the above-described motor behavior associated with status epilepticus. Perfusion of PDC for 37 and 62 min was also protective, because the amplitude of the discharges during status epilepticus decreased, even if it was not prevented (not shown). There was no significant difference from 4-AP alone in the latency to the first discharge (21.1 ± 1.7 min with 37 min PDC, 19.9 ± 1.3 min with 62 min PDC, and 18.1 ± 0.9 min with 112 min PDC). The rats perfused with 4-AP + PDC for 37 and 62 min showed behavioral alterations similar to those after 4-AP alone.

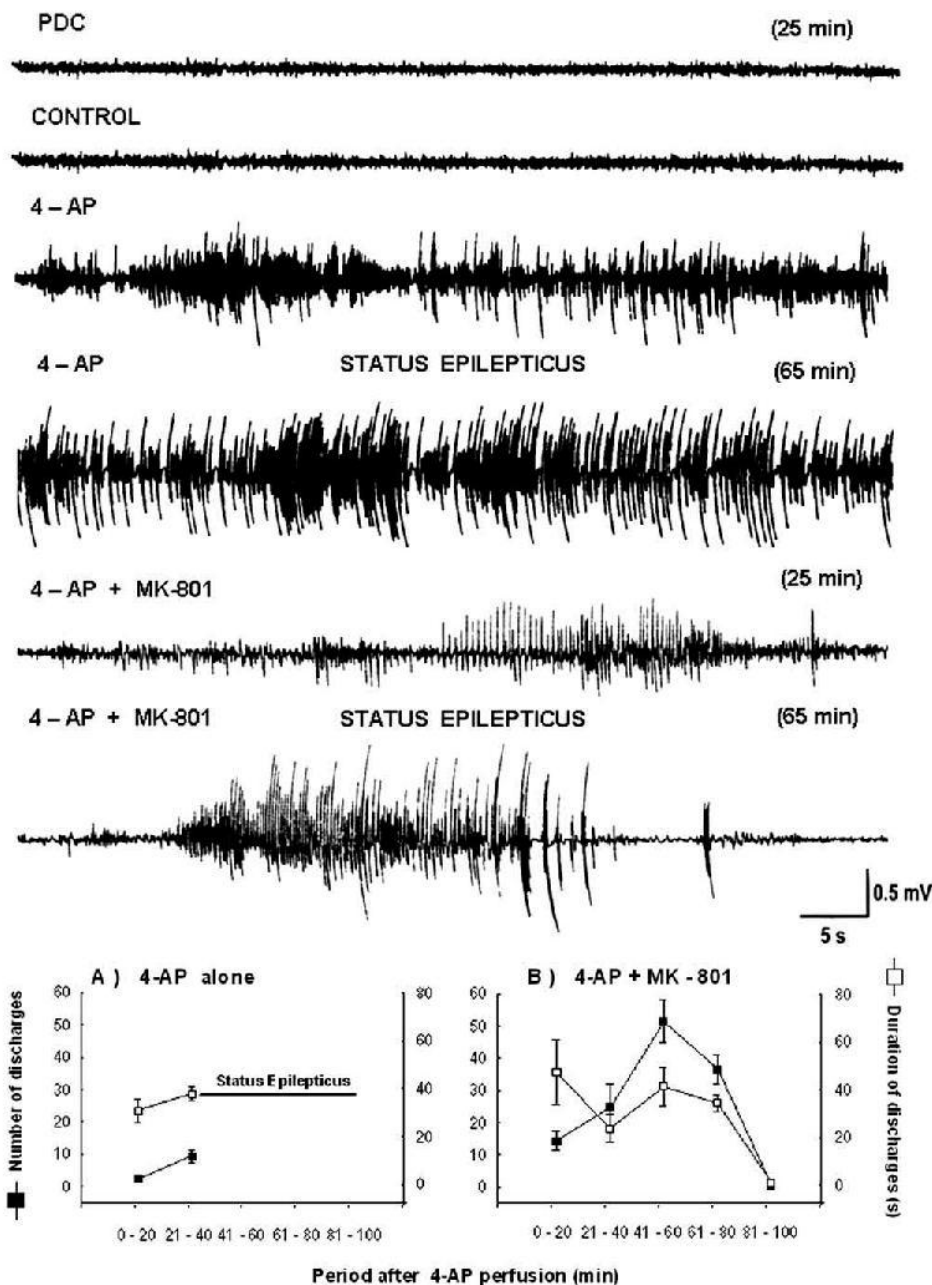


Fig. 4. PDC perfusion during 67 min, as indicated in Figure 1, does not alter the cortical EEG at any time, whereas 4-AP perfusion during 12.5 min (Fig. 1) induces EEG discharges and status epilepticus (top four traces and graph A). MK-801 (1 mg/kg i.p. 30 min before 4-AP) protects against this epileptogenic effect (fifth and sixth traces and graph B). The figures in parentheses indicate the time after the beginning of microdialysis perfusion with 4-AP. Representative recordings of one of seven rats in each group. The bottom graphs

show the quantitative data of the frequency of epileptiform discharges in 20-min periods, and the time of appearance of status epilepticus (horizontal bar) in the groups indicated. Note the decrease in amplitude and duration of EEG discharges and the absence of status epilepticus in the rats treated with MK-801. Similar results were obtained when MK-801 was coperfused with 4-AP in the hippocampus at a 7 mM concentration (n = 7). Values are means ± SEM for seven animals in each group.

Because perfusion with PDC for 112 min exerted the most protective action, we tested the effect of the group III mGluR antagonists MAP₄ and MSOP on this protection. As shown in Figure 6, perfusion of these antagonists together with 4-AP + PDC (during 112 min) prevented the protec-

tion, because the EEG activity, including the occurrence of status epilepticus, was similar to that after 4-AP alone. The motor behavior of these rats correlated with the EEG; these rats showed motor alterations similar to those described above for the animals perfused with 4-AP alone.

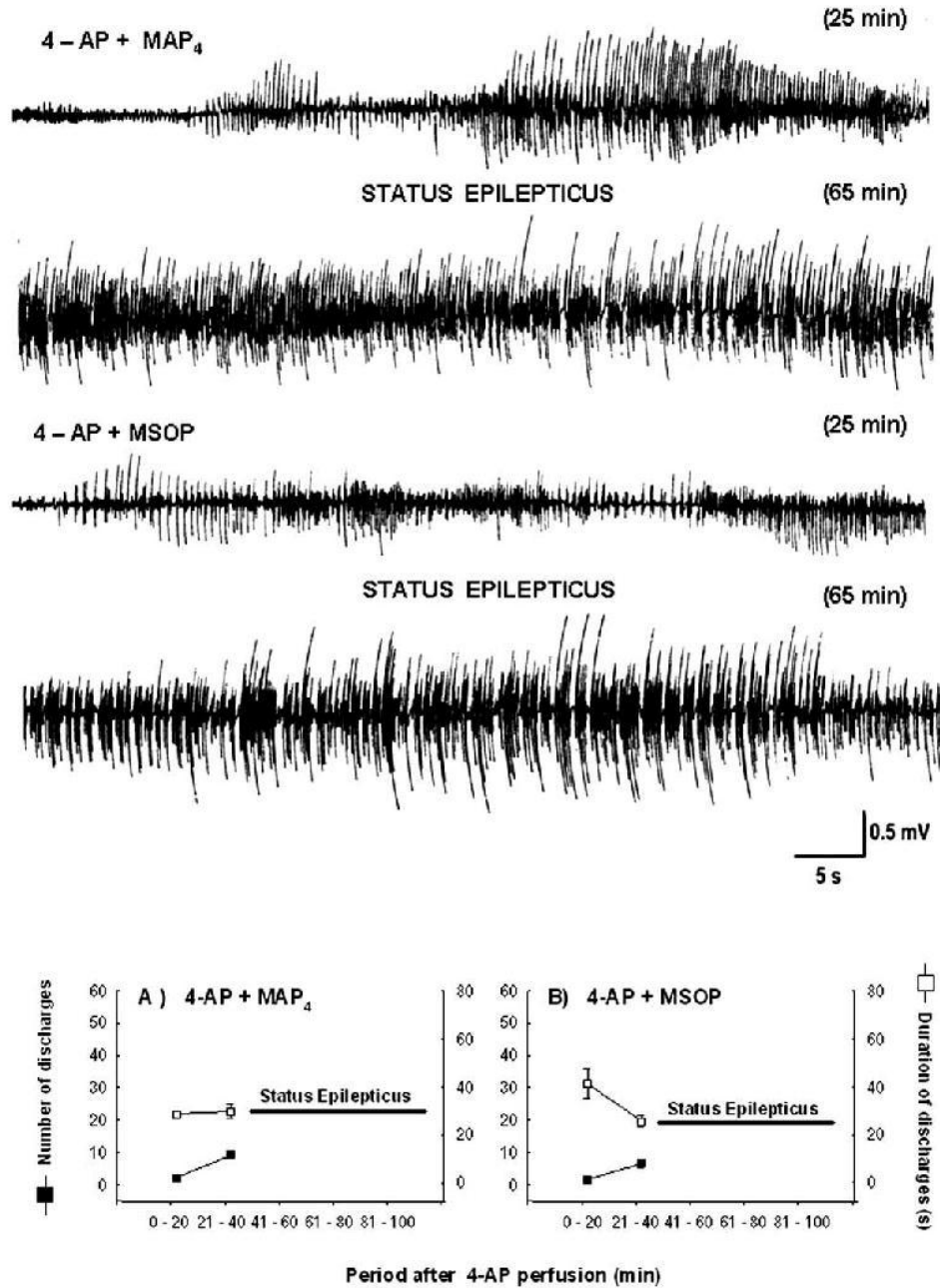


Fig. 5. MAP₄ and MSOP potentiate the epileptogenic effect of 4-AP. Representative recordings of the cortical EEG activity at the times indicated in parentheses after the beginning of microdialysis perfusion with 4-AP + MAP₄ or 4-AP + MSOP. These recordings correspond to one of the seven rats in each group perfused with 4-AP for 12.5 min and MAP₄ or MSOP for 112 min (nine microdialysis fractions), as indicated in the corresponding panels of Figure 3.

Note that the amplitude of discharges at 25 min was increased compared with that after 4-AP alone (Fig. 4), particularly with MAP₄. The bottom graphs (A,B) show the quantitative data of the frequency of epileptiform discharges in 20 min periods, and the time of appearance of status epilepticus (horizontal bars) in the two groups. Values are means ± SEM for seven animals.

MK-801 and PDC Protect Against the Neurodegeneration Induced by 4-AP, and Group III mGluR Antagonists Prevent This Protection

We have previously described for anesthetized rats how the epileptogenic effect of the intrahippocampal

perfusion of 4-AP is followed by a delayed neurodegeneration of CA1 and CA3 regions, sparing CA2 and dentate gyrus (Peña and Tapia, 1999, 2000; Ayala and Tapia, 2005). This effect was also observed in the present experiments in awake rats; a remarkable loss of neu-

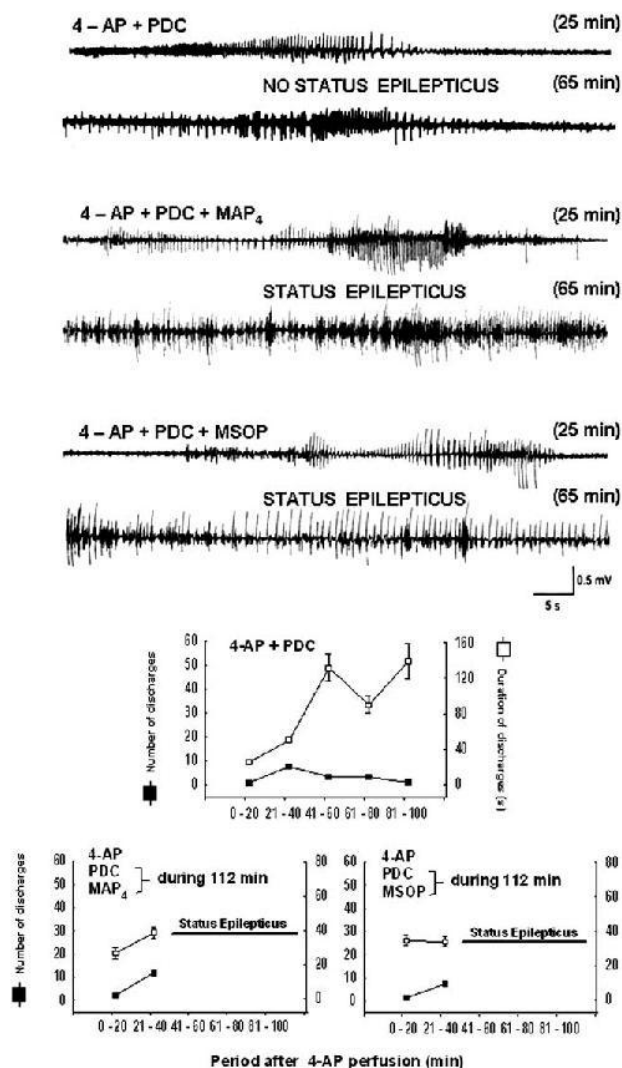


Fig. 6. PDC protects against the epileptogenic effect of 4-AP, and MAP₄ and MSOP partially prevent this protection. Representative recordings of the cortical EEG activity at the times indicated in parentheses after the beginning of microdialysis perfusion with the drugs indicated. These recordings correspond to one of the seven rats in each group. 4-AP was perfused for 12.5 min and PDC for 112 min, as indicated in the bottom panel of Figure 2, or with 4-AP during 12.5 min and both PDC and the group III mGluR antagonist during 112 min, as indicated in the bottom panels. Note the reduction in the intensity of the discharges and the prevention of status epilepticus by PDC, compared with 4-AP alone (Fig. 4) and that this protection was prevented by the coperfusion of MAP₄ and MSOP, because status epilepticus occurred, but with reduced amplitude compared with 4-AP alone. The bottom graphs show the quantitative data of the frequency of epileptiform discharges in 20-min periods and the time of appearance of status epilepticus (horizontal bars) in the three groups. Values are means ± SEM for seven animals.

rons in the ipsilateral CA1 and CA3 regions was observed 24 hr after the experiment in the animals perfused only with 7 mM 4-AP (90% loss compared with the contralateral or the control hippocampus; Figs. 7,

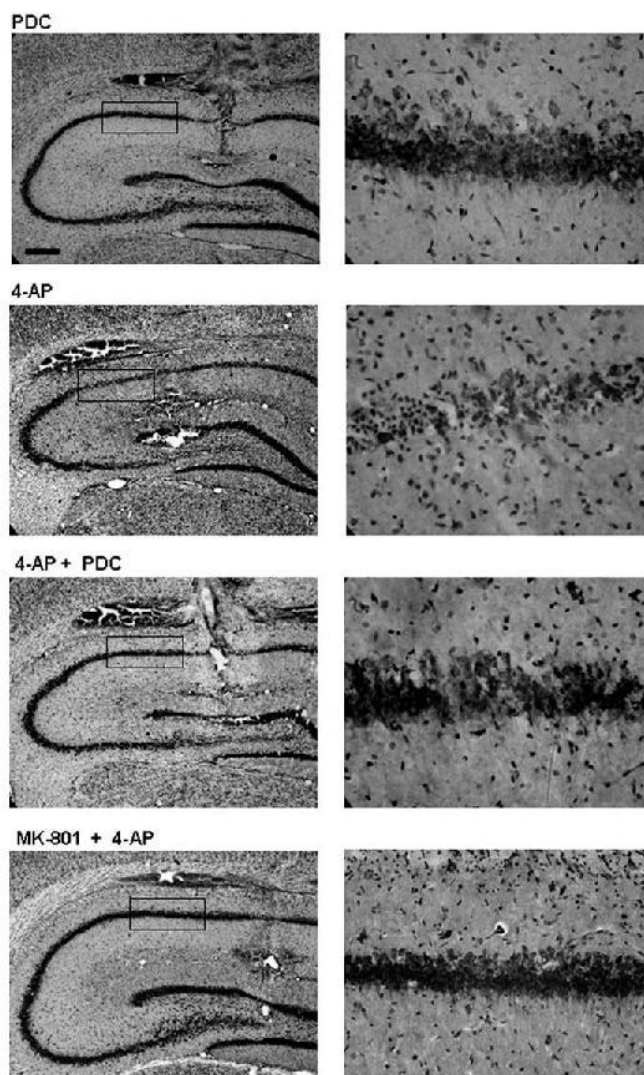


Fig. 7. Representative micrographs of the hippocampus perfused with PDC alone (top row), 4-AP alone (second row), 4-AP + PDC (third row), and MK-801 + 4-AP (fourth row), 24 hr after the experiment. Control rats perfused only with Krebs medium showed normal histological appearance, identical to that of PDC alone (see Fig. 9A). Note that 4-AP produced nearly complete neuronal loss in CA1 and CA3 regions, whereas, except for the mechanical damage from the cannula, no damage occurred in rats treated with PDC alone or with 4-AP + MK-801 or 4-AP + PDC; similar protection was observed when 7 mM MK-801 was coperfused with 4-AP (not shown). The right micrographs show magnifications of the boxed areas in the left micrographs. Quantitative data are shown in Figure 9A, which includes data of control rats and rats perfused with 4-AP + PDC during 37 and 62 min, whose histology is not shown. Scale bar = 500 μm in the left images; 200 μm for the right images.

9A). It is noteworthy that the i.p. or microdialysis administration of MK-801 completely prevented the neurodegeneration induced by 4-AP; in these animals, the number of healthy neurons in both CA1 and CA3

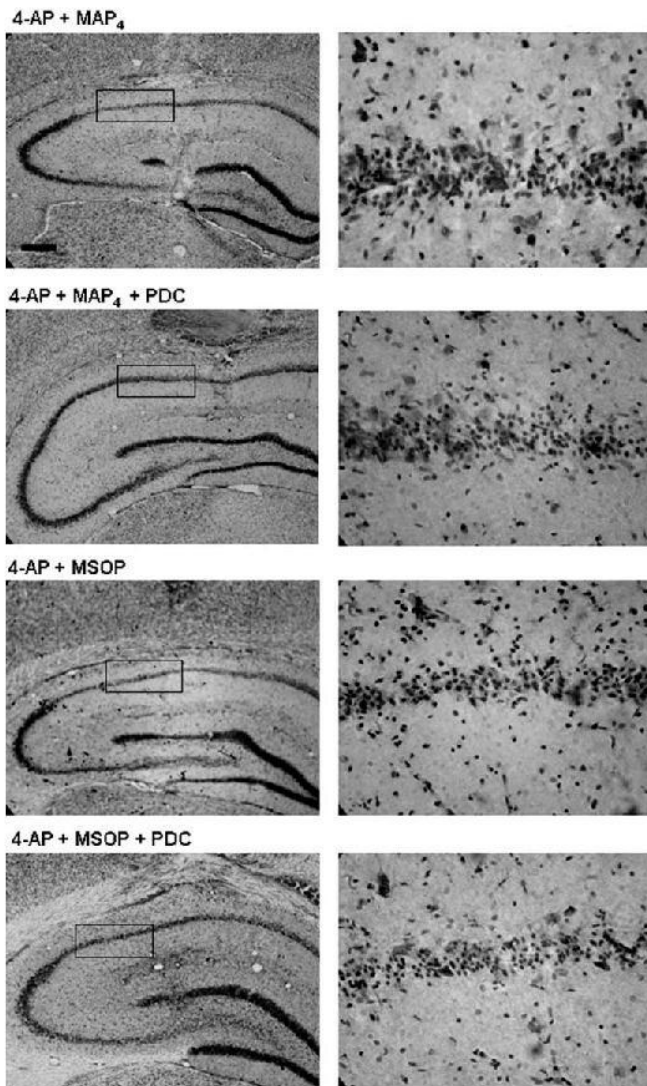


Fig. 8. Representative micrographs of the hippocampus perfused with 4-AP + MAP₄, 4-AP + MSOP, and 4-AP + PDC + the antagonists. Note that the antagonists did not affect the nearly complete loss of CA1 and CA3 neurons induced by 4-AP, but they totally prevented the protection exerted by PDC (compare with Fig. 7) against this neuronal loss. The right micrographs show magnifications of the boxed areas in the left micrographs. Quantitative data are shown in Figure 9B. Scale bar = 500 μm in the left images; 200 μm for the right images.

did not significantly differ from the contralateral or control hippocampus (Figs. 7, 9A).

In accordance with the lack of effect on the EEG and motor behavior, perfusion of PDC alone for 112 min did not produce any significant neuronal damage, in spite of the notable and lengthy increase in the extracellular concentration of glutamate observed under these conditions (Figs. 7, 9A). Interestingly, as shown also in Figures 7 and 9A, perfusion of PDC for 37, 62, and 112 min followed by 4-AP as described above and in Materi-

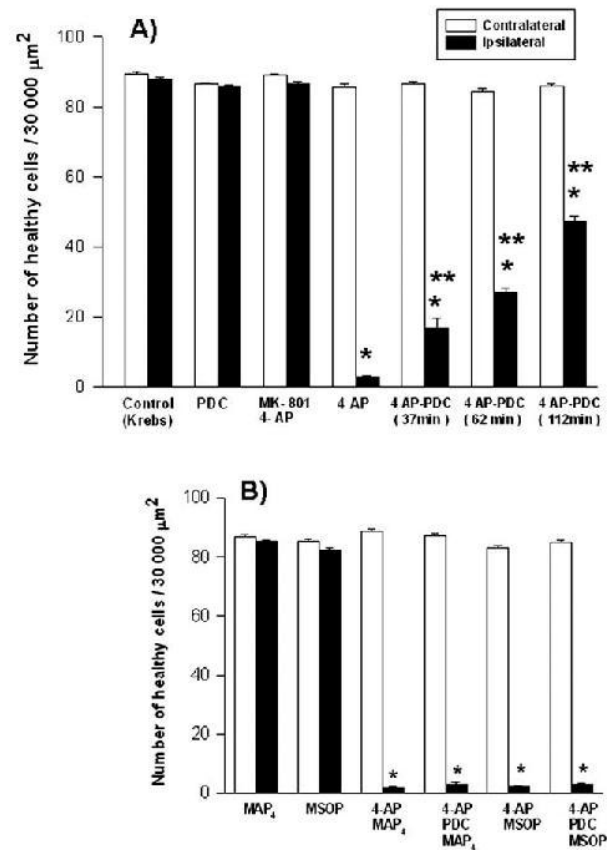


Fig. 9. Quantitative evaluation of the neuronal loss in the CA1 region of the perfused hippocampus, compared with the contralateral hippocampus, in all experimental groups. Control rats were perfused only with Krebs-Ringer medium. Note that MK-801 completely prevented neuronal loss and that PDC alone was innocuous and protected in a manner dependent on the duration of perfusion (37, 62, and 112 min) against the notable neuronal loss induced by 4-AP (A). MAP₄ and MSOP, perfused together with PDC for 112 min, clearly prevented its protective effect (B). Values are means ± SEM for five rats in each group. **P* < 0.001 with respect to control, ***P* < 0.001 with respect to 4-AP alone and to 4-AP + PDC + the antagonists.

als and Methods resulted in a striking protection against the neurodegeneration induced by 4-AP. Quantitative analysis of the neuronal loss in CA1 demonstrates that the protection is dependent on the duration of PDC perfusion, because the protection was 19%, 30%, and 53% with 37, 62, and 112 min of PDC perfusion, respectively (Fig. 9A).

Perfusion of the group III mGluR antagonists MAP₄ or MSOP alone did not produce any histological alteration of the hippocampus (n = 5 in each group; not shown). However, the two antagonists remarkably prevented the protective effect of PDC against the neurodegeneration induced by 4-AP. As shown in Figures 8 and 9B, when MAP₄ or MSOP was perfused together with 4-AP or together with 4-AP + PDC, the neuronal loss in CA1 and CA3 areas was as striking as that occurring after 4-AP alone.

DISCUSSION

The main findings of this work, all obtained in awake rats, are the following. 1) The stimulation of glutamate release from nerve endings by 4-AP induces severe epilepsy and hippocampal neurodegeneration by overactivation of NMDA receptors, because MK-801 administered systemically or by perfusion in the hippocampus prevented such effects. 2) A remarkable increase in extracellular glutamate resulting from glutamate transport blockade is innocuous, because no signs of epilepsy or neurodegeneration occur at any time. 3) On the contrary, such an increase exerts a notable protection against both the epilepsy and the neurodegeneration induced by 4-AP. 4) This protective effect of extracellular glutamate accumulation is due to activation of group III mGluRs, because the two antagonists tested prevent the protection, probably because this activation inhibits the 4-AP-stimulated release of glutamate.

Compared with our previous results in halothane-anesthetized rats (Peña and Tapia, 1999, 2000; Ayala and Tapia, 2003, 2005), the results of the present work show that awake rats are far more sensitive to the excitotoxic effect of intrahippocampal 4-AP, because a 7 mM concentration produced similar or even more intense excitotoxic effects, in terms of both epileptiform EEG activity and neurodegeneration, than a fivefold higher 4-AP concentration in anesthetized animals. This is not surprising, because it is known that volatile anesthetics reduce excitatory synaptic transmission and NMDA receptor function (Martin et al., 1995; Wakasugi et al., 1999; Ramírez-Munguía et al., 2003; Rudolph and Antkowiak, 2004; Franks, 2008), and points out the relevance of using awake animals when studying excitotoxicity mechanisms in vivo.

In the awake animals used in the present work, the increase of extracellular glutamate induced by 4-AP was transitory and did not reach statistical significance compared with the basal value, although it was clearly significant compared with the control group. This probably is due to the limitations of the microdialysis procedure in freely moving rats, and it should be considered in concert with the remarkable protection against the excitotoxic effects of 4-AP by the i.p. or microdialysis administration of MK-801, which were similar to those previously demonstrated in anesthetized rats. We conclude that such excitotoxic effect can be attributed to the release of endogenous glutamate from nerve endings and overactivation of NMDA receptors. This has been also demonstrated in ex vivo experiments in hippocampal slices obtained from 4-AP-treated rats (Peña et al., 2002).

In contrast to these powerful glutamate-dependent effects of 4-AP, an up to 20-fold increase in extracellular glutamate during nearly 2 hr (Figs. 1, 2) did not cause any significant excitotoxic effect, as assessed by EEG recording, motor behavior, and histological observations. To our knowledge, this is the first demonstration in awake rats that an increase in extracellular glutamate concentration resulting from transport blockade in the

hippocampus is innocuous, confirming previous studies in anesthetized rats and mice (Massieu et al., 1995; Obrenovitch et al., 1996; Tovar-y-Romo and Tapia, 2006) and in the spinal cord of anesthetized (Corona and Tapia, 2004) and awake (Tovar-y-Romo et al., 2009) rats. Although it has been shown that PDC and the nontransportable transport inhibitor *threo*- β -benzylloxyaspartate cause neuronal damage in vivo, the neurotoxic effect of the former was observed only when combined with energy metabolic inhibitors such as 3-nitropropionic acid, and that of the latter probably is due to a direct action on NMDA receptors (Massieu et al., 2001; Montiel et al., 2005). Chronic infusion of PDC in vivo also induces glial alterations that can reduce the expression of glutamate transporters, but only after several days of infusion (Lievens et al., 2000). In cultures, long exposures to PDC can also cause neuronal and astrocyte damage, although the glial damage does not seem to be mediated by glutamate receptor stimulation (Velasco et al., 1996; Ré et al., 2003; Guiramand et al., 2005). Thus, we conclude that, unlike the excess glutamate released by 4-AP, the extracellular glutamate accumulated by its transport blockade under our experimental conditions does not overactivate ionotropic postsynaptic receptors.

Our initial hypothesis was that, in spite of this lack of effect of increased glutamate resulting from PDC, the delayed uptake of the transmitter could potentiate the excitotoxic effect of 4-AP. However, our results clearly demonstrate that, paradoxically, PDC protected significantly against 4-AP-induced excitotoxicity and that this protection was dependent on the time of perfusion with PDC. Thus, because the duration of the increased levels of extracellular glutamate was proportional to the duration of PDC perfusion, we conclude that such glutamate in excess, which does not overactivate postsynaptic receptors, as discussed above, diffuses to other adjacent sites to exert the protection. Among the possible sites, group III mGluRs seem to be good candidates, because these receptors are located mainly in presynaptic terminals (Ohishi et al., 1995; Bradley et al., 1996), close to the probable neurotransmitter-releasing sites (Shigemoto et al., 1996, 1997; Pinheiro and Mülle, 2008), and because its activation by agonists such as L-2-amino-4-phosphonobutanoate (L-AP4) results in an inhibition of excitatory transmission in Schaffer collateral-CA1 synapses (Gereau and Conn, 1995; Gereau et al., 1995) and in lateral perforant path synapses (Macek et al., 1996) as well as glutamatergic and GABAergic transmission in hypothalamus slices (Pاناتier et al., 2004). In addition, L-AP4 reduces the release of glutamate stimulated by K^+ depolarization in cerebral cortex synaptosomes (Vázquez and Sánchez-Prieto, 1997) as well as the electrically stimulated release of glutamate and GABA in globus pallidus slices (Matsui and Kita, 2003) and that of GABA in cerebellar (Mitchell and Silver, 2000) and hippocampal (Semyanov and Kullmann, 2000) slices. Furthermore, L-AP4 inhibits the release of GABA stimulated by K^+ depolarization in the globus pallidus in vivo (MacInnes and Duty, 2008).

Thus, the most probable explanation for the paradoxical protection by the accumulation of intracellular glutamate against the 4-AP-induced excitotoxicity is the inhibition of its own release from nerve endings, exerted through the activation of presynaptic group III mGluRs. Our present finding that group III mGluR antagonists prevent the protection exerted by PDC, against both the epileptogenic and the neurotoxic effect of 4-AP, strongly supports this conclusion. This is also in accordance with data *in vitro* showing that blockade of glutamate transport results in a spillover of the transmitter to neighboring synapses, leading to activation of presynaptic group III mGluRs and the consequent inhibition of its own release, as well as GABA release, in hippocampus (Scanziani et al., 1997; Semyanov and Kullmann, 2000; Selkirk et al., 2003) and hypothalamus (Oliet et al., 2001; Piet et al., 2003) slices.

In conclusion, the present study demonstrates that an excitotoxic effect of excessive presynaptic glutamate release *in vivo*, manifested by both epilepsy and neurodegeneration, was antagonized by activation of presynaptic group III mGluRs by endogenous glutamate accumulated from transport blockade. These findings indicate that the spatial relationships between glutamate release and uptake are important in the modulation of presynaptic mGluRs at hippocampal synapses and thus may contribute to synaptic plasticity through the regulation of excitatory neurotransmission under physiological conditions. Although such relationships have been postulated previously, mainly on the basis of experiments *in vitro* (for reviews see Semyanov and Kullmann, 2000; Tzingounis and Wadiche, 2007; Pinheiro and Mulle, 2008), this is the first time that they have been shown to occur *in vivo* and are relevant for both epilepsy and neurodegeneration. Therefore, these findings have therapeutic implications in epilepsy and pathological alterations involving glutamate-mediated excitotoxicity, through the use of mGluR agonists and antagonists, especially because, as already mentioned, mGluRs may modulate the release not only of glutamate but also of GABA and other neurotransmitters. For example, activation of group III mGluRs by L-AP4 reduced GABA-mediated inhibitory transmission in striatopallidal synapses *in vitro*, and *in vivo* intracerebral injection of this agonist was beneficial in two models of Parkinson disease (Valenti et al., 2003) and reduced the biochemical alterations induced in the substantia nigra by 6-hydroxydopamine (Vernon et al., 2005).

REFERENCES

- Ayala GX, 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.
- Ayala GX, Tapia R. 2005. Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Eur J Neurosci* 22:3067–3076.
- 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.
- Bushell TJ, Jane DE, Tse H-W, Watkins JC, Davies CH, Garthwaite J, Collingridge GL. 1995. Antagonism of the synaptic depressant actions of L-AP4 in the lateral perforant path by MAP4. *Neuropharmacology* 34:239–241.
- Bushell TJ, Jane DE, Tse H-W, Watkins JC, Garthwaite J, Collingridge GL. 1996. Pharmacological antagonism of the actions of group II and III mGluR agonists in the lateral perforant path of rat hippocampal slices. *Brit J Pharmacol* 117:1457–1462.
- Cartmell J, Schoepp DD. 2000. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* 75:889–907.
- Corona JC, 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.
- Franks NP. 2008. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 9:370–386.
- Gereau RW IV, 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.
- Guiramand J, Martin A, de Jesus M-C, Cohen-Solal C, Vignes M, Récaens M. 2005. Glutotoxicity in hippocampal cultures is induced by transportable, but not by nontransportable, glutamate uptake inhibitors. *J Neurosci Res* 81:199–207.
- Lievens J-C, Bernal F, Forni C, Mahy N, Kerkerian-Le Goff L. 2000. Characterization of striatal lesions produced by glutamate uptake alteration: cell death, reactive gliosis, and changes in GLT1 and GADD45 mRNA expression. *Glia* 29:222–232.
- Macek TA, Winde 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.
- MacInnes N, Duty S. 2008. Group III metabotropic receptors act as hetero-receptors modulating evoked GABA release in the globus pallidus *in vivo*. *Eur J Pharmacol* 580:95–99.
- Martin D, Plagenhoef M, Abraham J, Dennison R, Aronstam R. 1995. Volatile anesthetic and glutamate activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochem Pharmacol* 49:809–817.
- 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, Morales-Villagrán A, Tapia R. 1995. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an *in vivo* microdialysis study. *J Neurochem* 64:2262–2271.
- Massieu L, del Río P, Montiel T. 2001. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition *in vivo*: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience* 106:669–677.
- Matsui T, Kita H. 2003. Activation of group III metabotropic glutamate receptors presynaptically reduces both GABAergic and glutamatergic transmission in the rat globus pallidus. *Neuroscience* 122:727–737.
- Mitchell SJ, Silver RA. 2000. Glutamate spillover suppresses inhibition by activating presynaptic mGluRs. *Nature* 404:498–502.
- Montiel T, Camacho A, Estrada-Sánchez AM, Massieu L. 2005. Differential effects of the substrate inhibitor L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) and the non-substrate inhibitor DL-threo- β -benzyl-oxyaspartate (DL-TBOA) of glutamate transporters on neuronal damage and extracellular amino acid levels in rat brain *in vivo*. *Neuroscience* 133:667–678.
- Morales-Villagrán A, Ureña-Guerrero ME, Tapia R. 1996. Protection by NMDA receptor antagonist against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur J Pharmacol* 305:87–93.

- Obrenovitch TP, Urenjak J, 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.
- Oliet SHR, Piet R, Poulain DA. 2001. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292:923–925.
- Panatier A, Poulain DA, Oliet SHR. 2004. Regulation of transmitter release by high-affinity group III mGluRs in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *Neuropharmacology* 47:333–341.
- Paxinos G, Watson C. 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.
- 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, Bargas J, Tapia R. 2002. Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. *Neuropharmacology* 42:807–812.
- Piet R, Bonhomme R, Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SHR. 2003. Modulation of GABAergic transmission by endogenous glutamate in the rat supraoptic nucleus. *Eur J Neurosci* 17:1777–1785.
- Piet R, Vargova L, Sykova E, Poulain DA, Oliet SHR. 2004. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2151–2155.
- Pinheiro PS, Mulle C. 2008. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci* 9:423–436.
- 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* 20:1517–1524.
- Ré DB, Boucraut J, Samuel D, Bimman S, Kerkerian-Le Goff L, Had-Aissouni H. 2003. Glutamate transport alteration triggers differentiation-state selective oxidative death of cultured astrocytes: a mechanism different from excitotoxicity depending on intracellular GSH contents. *J Neurochem* 85:1159–1170.
- Rudolph U, Antkowiak B. 2004. Molecular and neuronal substrates for general anesthetics. *Nat Rev Neurosci* 5:709–720.
- Salt TE, Eaton SA. 1995. Distinct presynaptic metabotropic receptors for L-AP4 and CCG1 on GABAergic terminals: pharmacological evidence using novel α -methyl derivative mGluR antagonists, MAP₄ and MCCG, in the rat thalamus in vivo. *Neuroscience* 65:5–13.
- Scanziani M, Salin PA, Vogt KE, Malenka RC, Nicoll RA. 1997. Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* 385:630–634.
- Schoepp DD. 2001. Unveiling the functions of the presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 299:12–20.
- Sekiya N, Hayashi Y, Nakanishi S, Jane DE, Tse H-W, Brise EF, Watkins JC. 1996. Structure-activity relationships of new agonists and antagonists of different metabotropic glutamate receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 117:1493–1503.
- Selkirk JV, Naeve GS, Foster AC. 2003. Blockade of excitatory amino acid transporters in the rat hippocampus results in enhanced activation of group I and group III metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 45:885–894.
- Senyanov A, Kullmann DM. 2000. Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 25:663–672.
- Shigemoto R, Kulik A, Roberts JDB, Ohishi H, Nusser Z, Kaneko T, Somogyi P. 1996. Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381:523–525.
- 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.
- Thomas NK, Jane DE, Tse H-W, Watkins JC. 1996. α -Methyl derivatives of serine-O-phosphate as novel, selective competitive metabotropic glutamate receptor antagonists. *Neuropharmacology* 35:637–642.
- Tovar-y-Romo LB, Tapia R. 2006. Cerebral neurons of transgenic ALS mice are vulnerable to glutamate release stimulation but not to increased extracellular glutamate due to transport blockade. *Exp Neurol* 199:281–290.
- Tovar-y-Romo LB, Santa-Cruz LD, Zepeda A, Tapia R. 2009. Chronic elevation of extracellular glutamate due to transport blockade is innocuous for spinal motoneurons in vivo. *Neurochem Int* 54:186–191.
- Tzingounis AV, Wadiche JI. 2007. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 8:935–947.
- Valenti O, Marino MJ, Wittmann M, Lis E, DiLella AG, Kinney GG, Conn PJ. 2003. Group III metabotropic glutamate receptor-mediated modulation of the striatopallidal synapse. *J Neurosci* 23:7218–7226.
- Vázquez E, Sánchez-Prieto J. 1997. Presynaptic modulation of glutamate release targets different calcium channels in rat cerebrocortical nerve terminals. *Eur J Neurosci* 9:2009–2018.
- Velasco I, Tapia R, Massieu L. 1996. Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J Neurosci Res* 44:551–561.
- Vernon AC, Palmer S, Datla KP, Zbarsky V, Croucher MJ, Dexter DT. 2005. Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor ligands in a 6-hydroxydopamine rodent model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 22:1799–1806.
- 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.

- **Segunda parte:**

En esta sección se presentan los resultados de un artículo en preparación que presentamos como manuscrito, en el cual se muestra la evidencia de la protección contra la excitotoxicidad por la activación directa de los mGluR III con su agonista específico, LAP-4.

Activation of group III mGluRs is protective against epilepsy and excitotoxic neuronal death: An *in vivo* microdialysis study.

ABSTRACT

While it is well documented that the overactivation of ionotropic glutamate receptors leads to excitotoxic injury, little is known on the role of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in excitotoxicity, particularly those of group III which are located presynaptically and serve as autoreceptors that limit the release of glutamate in several brain regions, including the hippocampus. Because we have previously shown that activation of these receptors by endogenous glutamate protects against the seizures and hippocampal neurodegeneration induced by microdialysis perfusion of 4-aminopyridine (4-AP) in awake rats, in this work we have studied the effect of L(+)-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP₄), a specific agonist of group III mGluRs, on such excitotoxic action of 4-AP and on the release of glutamate, assessed by HPLC in microdialysis perfusates. Perfusion of L-AP₄ induced a 80% decrease in the extracellular glutamate levels in both control and 4-AP perfused rats, notably reduced the frequency, duration and intensity of the EEG seizure discharges induced by 4-AP, and also prevented by nearly 90% the neuronal loss produced by the drug. We conclude that the protection exerted by L-AP₄ is due to the blockade of the 4-AP-induced release of glutamate consequent to the activation of presynaptic group III mGluRs.

INTRODUCTION

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system, and it has been established that overactivation of its ionotropic receptors (iGluRs), induces neuronal hyperexcitation and neurodegeneration, in a process known as excitotoxicity. Whereas excitotoxicity can be produced by the administration of iGluR agonists *in vivo*, in our laboratory we have developed an experimental model based on the stimulation of endogenous glutamate release from nerve ending by means of the intrahippocampal administration of 4-aminopyridine (4-AP), a K⁺ channel blocker, through reverse microdialysis, in both anesthetized and awake rats. This treatment induces an increase in extracellular glutamate concentration, intense behavioral and electroencephalographic (EEG) seizure, and a remarkable neurodegeneration of regions CA1 and CA3 of the hippocampus, effects that seem to be due to overactivation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors by synaptically released glutamate, because all of them are prevented by the administration of NMDA

receptor antagonists (Peña and Tapia, 1999, 2000; Ayala and Tapia, 2003, 2005, Vera and Tapia, 2012).

In contrast to the effect of 4-AP, we have recently shown that the accumulation of endogenous extracellular glutamate by inhibition of its uptake in the hippocampus was not only innocuous but paradoxically protected against the excitotoxic action of 4-AP. When the glutamate transport inhibitor *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate was co-administered with 4-AP in the hippocampus, extracellular glutamate was elevated ~20-fold and the rats were remarkably protected against both the neurodegeneration and the status epilepticus induced by 4-AP. Because such protective effects were prevented by specific antagonists of group III mGluR, we concluded that such protection was due to an inhibition of the 4-AP-induced stimulation of glutamate release, mediated by activation of such receptors (Vera and Tapia, 2012). In fact, such activation results in inhibition of neurotransmitter release (Cartmell and Schoepp, 2000; Schoepp, 2001; Pinheiro and Mulle, 2008), including glutamate itself and of others transmitters such as γ -aminobutyric acid (GABA) (Scanziani et al., 1997, Oliet, et al., 2001, Piet et al. 2003). In agreement with these findings, group III mGluRs are located predominantly in presynaptic active zones (Ohishi et al., 1995; Bradley et al., 1996; Shigemoto et al., 1996, 1997).

In view of these results, in the present work we have investigated whether the selective activation of the group III mGluRs with the specific agonist L(+)-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP₄) protects against the excitotoxic effects of 4-AP. For this purpose, L-AP₄ and 4-AP were perfused by reverse microdialysis in the hippocampus of awake rats, with simultaneous recording of the cortical EEG. The changes in the extracellular concentration of glutamate were determined by HPLC in the microdialysis perfusates, and the hippocampus was studied histologically 24 h later to assess the neuronal damage.

Our results show that L-AP₄ notably decreased the concentration endogenous extracellular glutamate, even when coperfused with 4-AP, and remarkably protected against the epilepsy and the hippocampal neuronal death induced by 4-AP.

MATERIALS AND METHODS

Microdialysis and Amino Acid Determination

Male Wistar rats (220-240 g) were used in all experiments and handled according to international standards of animal welfare (Assurance of the Office of Laboratory Animal Welfare number A5281-01) and the Rules for Research in Health Matters (México), with approval of the local Animal Care Committee. Rats were anesthetized with 0.5%-1.5% halothane in 95% O₂/5% CO₂, placed in a stereotaxic frame and implanted under with two cranial electrode-screws over the parietal cortex for EEG recording and with a cannula guide

in the left dorsal hippocampus (coordinates: AP -3.6, L 2.4 and V -4.0 from bregma (Paxinos and Watson, 1982). The electrodes and cannula guide were fixed to the skull with dental cement. After surgery, anesthesia was discontinued and rats were returned to individual cages and provided with food and water ad libitum. Five to seven days after surgery, microdialysis was carried out in awake, freely moving rats, to avoid the known effects of anesthesia on glutamate neurotransmission (Ramírez-Munguía et al., 2003). Previously water-flushed microdialysis cannulas (CMA/12, CMA Solna, Sweden) were inserted into the cannula guide, to reach the vertical coordinate mentioned above. The animals were then placed in the bowl-cage of a free movement microdialysis system (CMA 120) and the cannulas were continuously perfused using a microinjection pump (CMA 400/Carnegie Medicin) at a flow rate of 2 μ l/min with Krebs medium of the following composition (in mM): 118 NaCl, 1.2 KH_2PO_4 , 4.7 KCl, 1.18 MgSO_4 , 25 NaHCO_3 , 10 glucose, 2.5 CaCl_2 (pH 7.4). After 1-h stabilization, fractions of microdialysis of 25 μ l (12.5 min) were consecutively collected. The first three fractions collected were used to determine the basal extracellular levels of amino acids, then a potent agonist of group mGluR III (Johansen et al., 1995, Conn and Pin, 1997), L(+)-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP₄) was perfused during nine fractions (112min). Taking as base full dose response curves of Giocomo and Hasselmo (2006) and after some preliminary experiments with several concentrations (20,50 and 100 mM), the agonist was perfused at 100mM concentration, because under these conditions the protection against epilepsy was maximal. In other group of animals L-AP₄ was perfused during nine fractions (112 min) but in the sixth fraction 4-AP (7 mM) was perfused as described in Results and on the basis of previous work (Vera and Tapia, 2012). In all cases NaCl concentration was proportionally reduced to maintain isosmolarity. The efficiency of the dialysis membrane is 10-12% (Massieu et al.,1995). The content of glutamate and aspartate was measured in the microdialysis perfusates by HPLC, after *o*-phthalaldehyde derivatization, as previously described (Massieu et al. 1995). Amino acid quantification was made by comparison with a standard mixture of amino acids processed in the same manner.

EEG Recording

The cortical EEG was recorded continuously during all experiment, starting at the time of the collection of the basal microdialysis fractions, using a Grass polygraph, with a low-frequency filter at 3 Hz and high-frequency filter at 100 Hz. The data were quantitatively analyzed by calculating the mean number of epileptic discharges, as well as of their duration (measured from the beginning of the hypersynchronous activity to the end of the high amplitude spike train) and their frequency of occurrence.

Histological Evaluation

Histological evaluation was carried out 24 hr after the experiment, because we have previously found that the 4-AP-induced neurodegeneration maximal at this time (Ayala and Tapia, 2003). Rats were anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with 250 ml saline solution (0.9%), followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4. The brains were removed, postfixed for 24 h at 4°C and transferred successively to 10%, 20% and 30% sucrose (24 h each). Brain coronal sections (40 µm thick) were obtained in a cryostat and stained with cresyl violet for assessing the correct location of the microdialysis probes and for histological observations. For quantitative analysis of the neuronal loss, the morphologically undamaged neurons in the CA1 hippocampal region were counted in a X 20 microscopic field (30,000 µm²), in both the perfused and contralateral hippocampi, with the help of an image analyzer system (NIH Image 1.6). The healthy neurons (identified as cells of >15 µm in diameter, with clear cytoplasm and appearance similar to that of control rats and of the contralateral hippocampus), were considered undamaged. Six sections were counted in each brain, three anterior and three posterior to the cannula tract, from five different animals for each experimental protocol. ANOVA and Student's *t*-test was used for the statistical analysis of the changes in amino acid concentration and of the neuronal loss.

RESULTS

L-AP₄ diminishes the concentration endogenous of extracellular glutamate

As shown in Fig. 1 and as previously described in awake rats using the same 4-AP concentration (Vera and Tapia, 2012), 4-AP induced a transient small but significant increase in extracellular glutamate during the initial 15 min of perfusion. On the other hand, L-AP₄ induced a rapid remarkable decrease in the basal glutamate level, both in the control (Krebs medium-treated) rats and in those receiving 4-AP during the first 30 min of perfusion, indicating that the stimulation of glutamate release by the latter was blocked. The basal concentration of glutamate varied from 8-10 pmoles/10 µl, similarly to that previously described in the hippocampus of awake rats (Ramírez-Munguía et al., 2003; Vera and Tapia, 2012), and L-AP₄ diminished this concentration by >80% (Fig. 1).

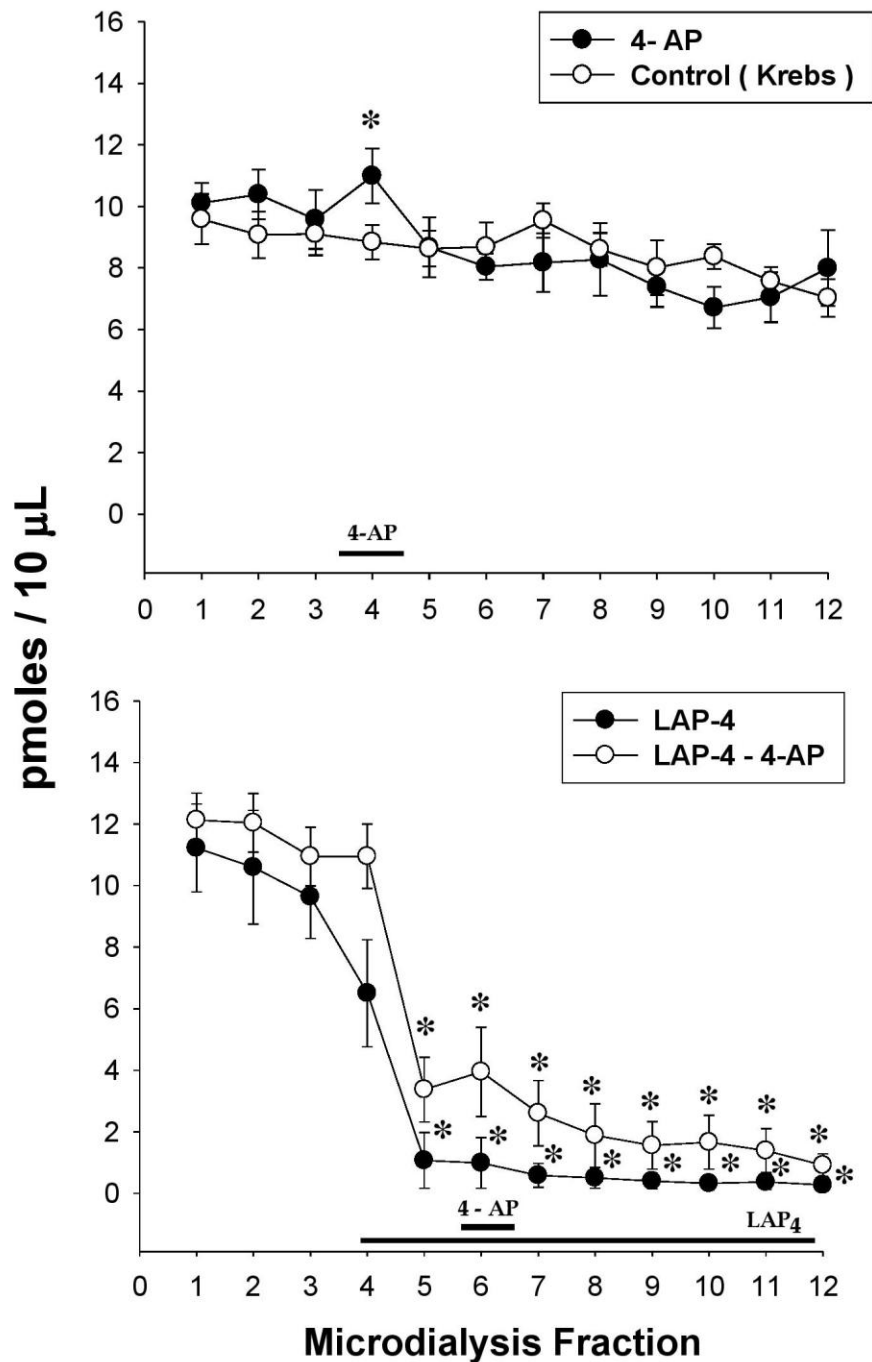


Fig. 1. Changes in extracellular concentration of glutamate induced by 7 mM 4-AP and 100 μ M L-AP₄ through microdialysis probes in the hippocampus of freely moving rats. The first three fractions correspond to the basal levels of amino acids and at the end of the third fraction, 4-AP, L-AP₄ or L-AP₄ + 4-AP was perfused. One microdialysis fraction represents 12.5 min, and the horizontal bars indicate the time of perfusion with each compound. Each point is the mean value \pm SEM for seven rats in each group except for control was four rats. The peak increase induced by 4-AP (fraction 4) was not significantly different from the average of the corresponding basal value ($p = 0.05742$), but it was highly significant (* $p < 0.05$) compared with the value for control krebs rats. The changes observed with respect to the average of the three basal values with L-AP₄ and L-AP₄ + 4-AP were statistical significant (** $p < 0.001$ Student's t -test).

L-AP₄ protects against the epileptogenic action of 4-AP

As shown in Fig. 2, perfusion with L-AP₄ alone had no significant effects on the characteristic EEG activity of awake rats during the 112.5 min of the experiment. In agreement, there was no significant changes in the behavior of the animals at any time.

The EEG seizures produced by 4-AP in anesthetized and awake rats have been amply described in our previous communications (Peña and Tapia, 1999, 2000; Vera and Tapia, 2012) and the present results are similar in all respects. Briefly, the perfusion of 7 mM 4-AP induced intense epileptiform discharges, characterized by an initial hypersynchronous activity, followed by trains of high-amplitude spikes (Fig. 2, trace 3). These discharges appeared with a latency of 17.5 ± 2 min after beginning of 4-AP perfusion; their duration and number increased during the first ~40 min and at that time (40 ± 2.5 min) status epilepticus was established and persisted until the end of the recording period (Fig 3A, see horizontal up thick bar). The EEG discharges coincided with several motor alterations, including frequent wet-rat shakes, masticatory movements, sniffing, head nodding, grooming and tremor. Afterwards, during status epilepticus, rats showed intense convulsive signs, such as hypersalivation, tonic-clonic movements of the forepaws, and intense flexion-extension of the head accompanied by eyelids myoclonus, rigidity of the tail and loss of posture.

As exemplified in Fig. 2 and quantitatively in Fig. 3, perfusion with L-AP₄ resulted in a notable protection against the epileptogenic action of 4-AP. Although 4 of the 8 rats treated showed discharges, with a latency of 28.6 ± 0.9 , and also presented status epilepticus, the amplitude and the frequency of the epileptic spikes were considerably diminished during the period in which normally the status appears (Fig. 2, trace 6). This EEG activity correlated with the behavior, since these rats showed less intense epileptic signs, such as occasional wet-rat shakes, masticatory movements, grooming and tremor. Two of the eight rats of these 4-AP + L-AP₄ group presented EEG discharges, with a latency of 48.6 ± 1.7 min and mean duration of 40.6 ± 3.8 min, but they never developed status epilepticus (Fig. 3 C); remarkably the other two rats of the group were completely protected, since they never showed EEG or behavioral alterations.

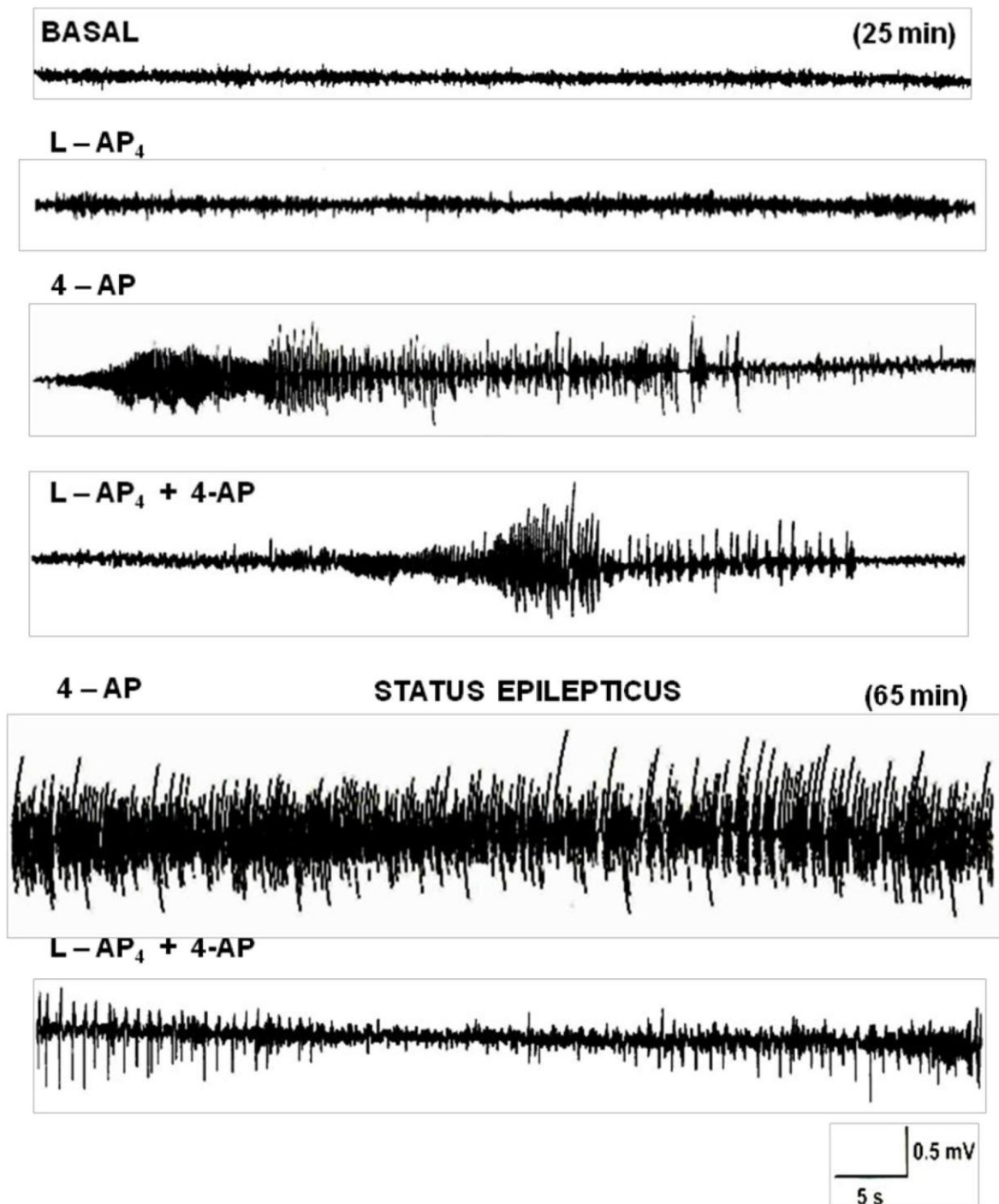


Fig. 2. Representative recording of the cortical EEG activity of the freely moving rats after perfusion of L-AP₄ alone (trace 2), 4 – AP alone (trace 3), L-AP₄ + 4 – AP (trace 4) and the appearance at 65 min afterward of establishment of the status epilepticus with 4-AP alone (trace 5) and L-AP₄ + 4– AP (trace 6) of one of seven rats in each group. Traces were taken at 25 min after L-AP₄ administration or at the equivalent times in the control rats. In this figure we can see the frequent spindles of low-amplitude waves characteristic of the basal EEG recording of the awake rats (recording basal, trace 1) and the similar trace when L-AP₄ alone was perfused, does not alter the cortical EEG at any time. On the other hand, L-AP₄ perfusion protects against the epileptogenic effect by 4-AP.

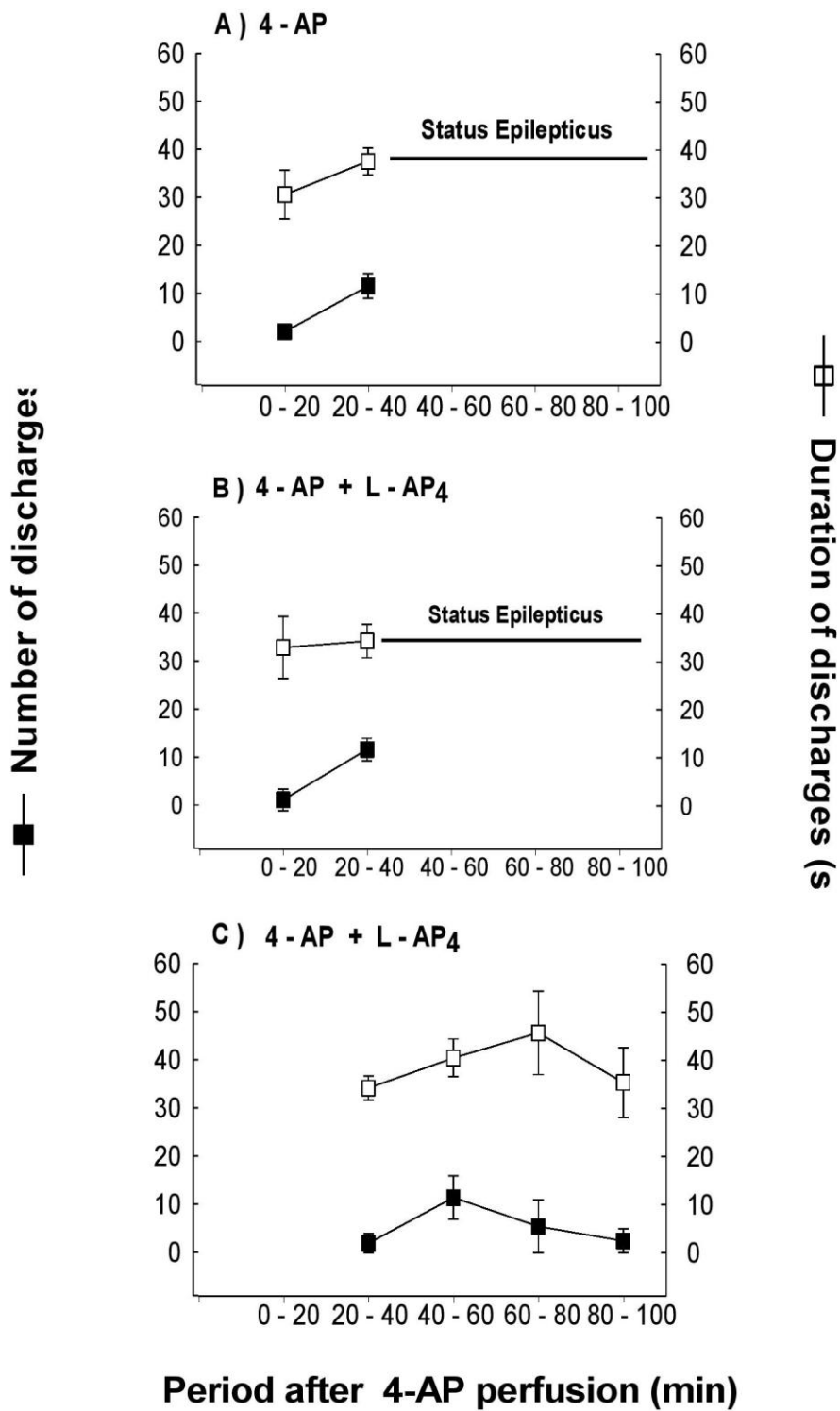


Fig. 3. Time course of the number and duration of the EEG seizure discharges induced by 4-AP and in combination of 4-AP + L-AP₄ in 20-min periods and the time of appearance of status epilepticus (horizontal bar) in the treatment with 4-AP (A) and 4-AP + L-AP₄ (B). In (C) we can see the absence of the status epilepticus in the rats treated with L-AP₄, therefore the horizontal bar does not appear. Values are means \pm SEM for 7 animals in (A), 4 animals in (B) and 2 animals in (C).

L-AP₄ protects against the neurodegeneration induced by 4-AP

As described in Experimental Procedures, neuronal damage was assessed by analysis of cresyl violet-stained sections 24 h after the experiment. As can be seen in Fig. 4 and quantitatively in Fig. 5, 4-AP induced the previously described almost total loss of pyramidal neurons in CA1 region, as well as damage in CA3 but sparing CA2 and the dentate gyrus (Peña and Tapia, 1999 and 2000; Ayala and Tapia, 2003; Mora and Tapia, 2005, Vera and Tapia, 2012). Perfusion of L-AP₄ alone did not produce any significant neuronal damage, and the rats treated with L-AP₄ + 4-AP showed a remarkable protection as compared to 4-AP alone. CA1 neurons showed a normal morphology, similar to the control rats, and the number of healthy cells was nearly 90% of the control value the perfused hippocampus (Figs. 4 and 5).

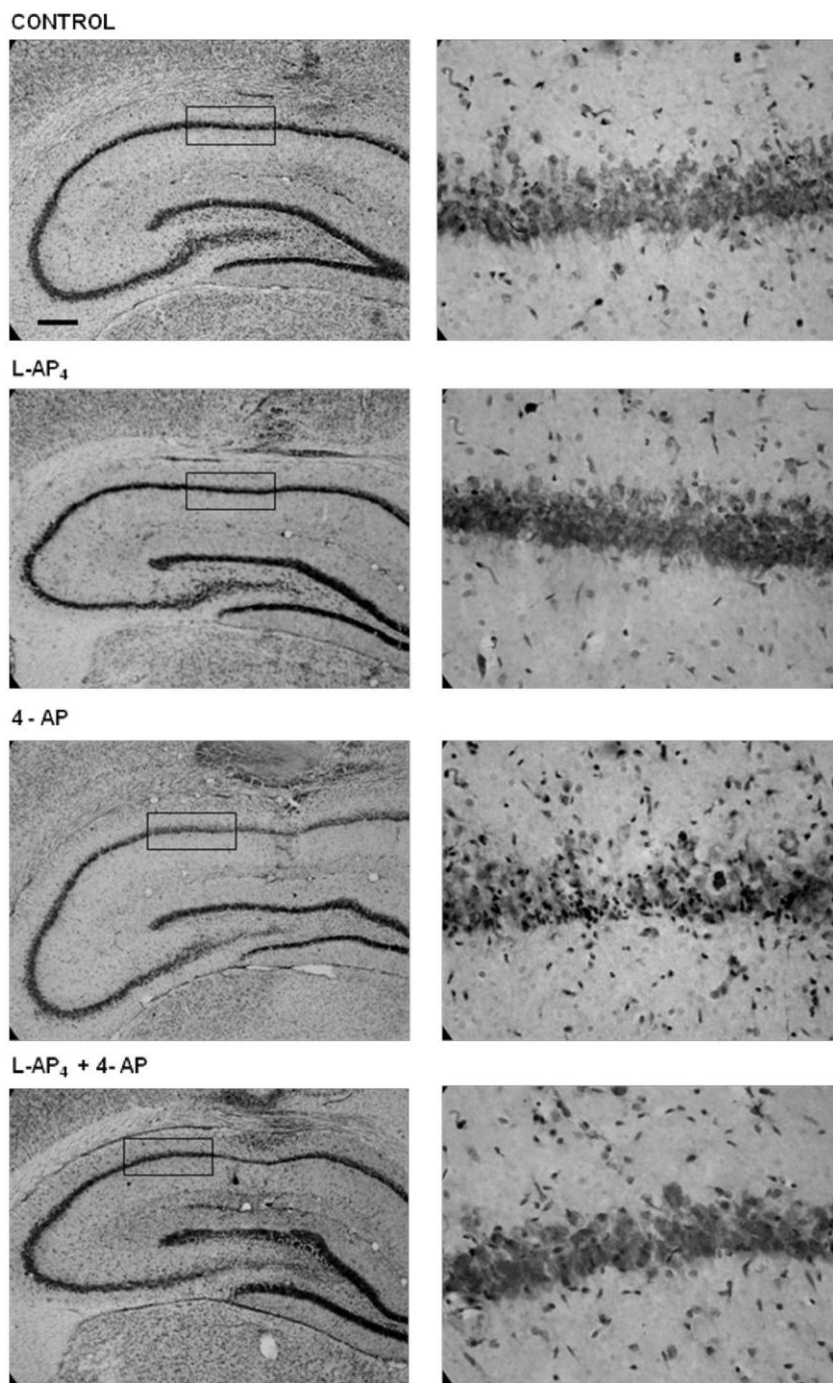


Fig. 4. Representative micrographs illustrate the effect of microdialysis perfusion with Krebs-Ringer medium (top row), L-AP₄ alone (second row), 4-AP alone (third row) and L-AP₄ + 4-AP (fourth row) on the morphological appearance of hippocampus 24 h after the experiment. Cresyl violet staining, showing that no damage occurred in CA1, even in the cells located in close vicinity to the cannule track with perfusion Krebs-Ringer medium or perfusion with L-AP₄. The 4-AP produced nearly complete neuronal loss in CA1 and CA3 regions, whereas, no damage occurred, except for the mechanical damage from cannula, with perfusion of L-AP₄ + 4-AP. The right micrographs are magnifications of the boxed areas in the left micrographs. Quantitative data are show in Figure 5. Scale bar = 500 μ m in the left images; 200 μ m for the right images.

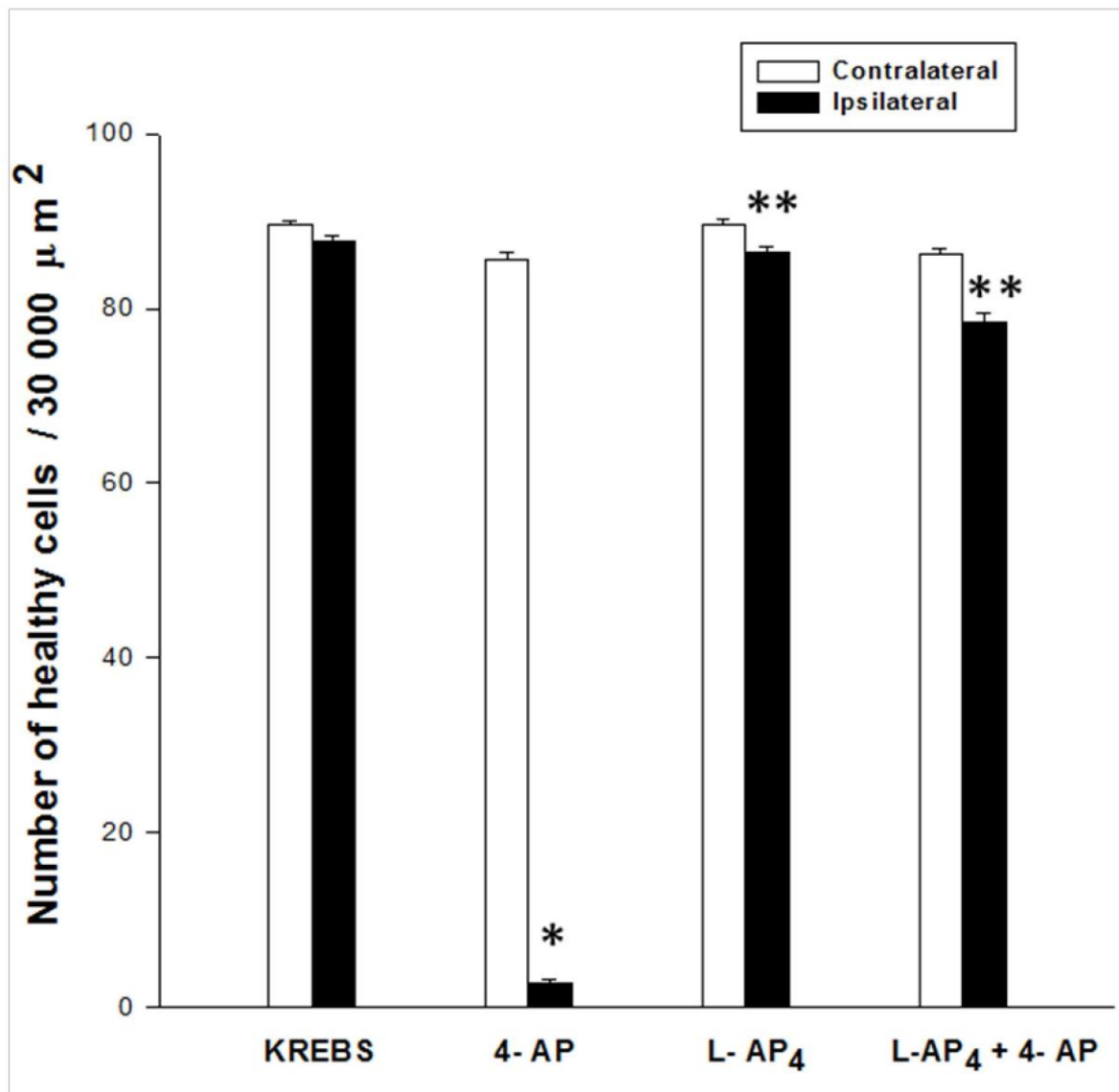


Fig. 5. Quantitative evaluation of the neuronal loss in the CA1 region of the hippocampus in the ipsilateral and contralateral side of control rats perfused only with Krebs-Ringer medium, with 4-AP or L-AP₄ and combination of L-AP₄ + 4-AP 24h after to the experiment. Note that the L-AP₄ alone was innocuous and protected effectively against the notable neuronal death induced by 4-AP. Values are means \pm SEM for 5 animals by each group experimental *P < 0.001 with respect the control and **P < 0.001 with respect to 4-AP.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first report of a notable decrease of the endogenous extracellular glutamate by the specific activation of the presynaptic group III mGluRs *in vivo*. This decrease occurs very rapidly and probably reflects a steady state equilibrium between the release and the transport of glutamate. If the release is reduced and transport is not affected, the overall concentration readily diminishes. The same situation but in the opposite direction seems to occur when glutamate transport is blocked, as we have shown in the hippocampus and the spinal cord (Massieu et al., 1995; Tovar-y-Romo et al., 2009). Because we did not stop the L-AP₄ perfusion during the experiment, it is not possible to know if glutamate levels return to normal values afterwards, but in any case it is reasonable to conclude that the blockade of the release occurs also in the presence of 4-AP because a similar glutamate decrease occurred in both experimental conditions. So, in view of our previous findings reviewed in the Introduction regarding the mechanism of the excitotoxic action of 4-AP by stimulating the release of glutamate (Tapia et al., 1999, Peña and Tapia, 2000; Ayala and Tapia, 2003, 2005) we conclude that such blockade determines the protection from seizures and neurodegeneration. In agreement with its conclusion, L-AP₄ reduces glutamate release stimulated by high K⁺ in cerebral cortex synaptosomes (Vázquez and Sánchez-Prieto, 1997), and by electrical stimulation in hippocampal (Semyanov and Kullman, 2000) and the globus pallidus (Matsui and Kita, 2003) slices.

It is well known that several antagonists for the different ionotropic glutamate receptors, both of NMDA and non-NMDA types, efficiently prevent epileptiform seizures induced by 4-AP, both *in vivo* (Fragoso-Veloz and Tapia, 1992; Morales-Villagran et al., 1996) and *in vitro* (Perrault and Avoli, 1991). However, their therapeutic use in the clinic has been very limited because the general inhibition of the fast excitatory synaptic transmission in several brain regions after their systemic administration produces numerous side effects like sedation and ataxia (Rogawski y Loscher, 2004; Luján, 2005). Therefore, modifications with agonists of the mGluRs are emerging as novel molecular targets that can be used in the future for the development of new antiepileptic drugs. In this respect, advances in animal models seem promising. While mGluR I antagonists are effective anti-convulsant (Tizzano, et al., 1995), the agonists of mGluR II and III receptors have anti-convulsant activity (Moldrich et al., 2001; Gasparini et al., 1999). Particularly, mGluR III direct activation with L-AP₄ inhibits the excitatory synaptic transmission in the Schaffer Collateral pathway (Gereau and Conn, 1995; Gereau et al., 1995) and in the perforant path synapses (Macek et al., 1996) and also induces inhibition of glutamatergic transmission in the hypothalamus (Panatier et al., 2004).

mGluR III agonists have been shown to have anticonvulsant activity in both focal and generalized seizures (Gasparini et al., 1999; Moldrich et al., 2003). Focal injection of -L-AP_4 agonist tonsil, blocks the crisis induced by kindling (Abdul-Ghani et al., 1997). The agonist (R, S) - PPG is a potent anticonvulsant against seizures induced by electroshock and sound in DBA/2 mice (Chapman et al., 1999b). This same compound administered by intracerebroventricular injection in normal mice protects against pentylenetetrazole-induced seizures (Sansig et al., 2001; Watanabe et al., 2011) and also protects against the seizures induced by DL-homocysteic acid in immature rats (Folbergrova et al., 2003). The (S) - 3-4-DCP, another mGluR III agonist, as the same as (R, S) - PPG, is a potent anti-convulsant against seizures induced by sound in DBA/2 mice (Moldrich et al., 2001a). Another synthesized agonist, ACPT-1, also presents anticonvulsant action in vivo animal models and its effects are reversed by antagonists moderate doses (Chapman et al., 2001). Particularly the mGluR III, MSOP and MPPG antagonists, are being convulsants when administrated by intracerebroventricular injection in mice (Ghauri et al., 1996; Chapman et al., 2001). The CPPG antagonist protects against absence seizures induced by pentylenetetrazole focal infusion (Snead et al., 2000). In patients with chronic temporal lobe epilepsy show decreased expression of mGluR II and III located on presynaptic terminals in the hippocampal molecular layer (Tang and Lee, 2001), as well as an increase mGluR I expression, which may facilitate the increase of glutamatergic excitability (Tang et al., 2001c). Thus, knock-out mice for mGluR7 receptors shows a predisposition to develop seizures and animals with null mutations, for the mGluR4 and 8 receptor do not have this predisposition (Sansig et al., 2001; Pekhletski et al., 1996). All these evidences indicate that mGluRs might be new molecular targets for diseases involving glutamatergic neurotransmission increase or decrease in pathological conditions and have therapeutic relevance in diseases such as epilepsy.

Regarding neurodegeneration, it has been showed that activating the mGluR III protects against death by glutamatergic excitotoxicity. Few studies have focused on investigating the correlation between mGluRs ligands and neuroprotection. Tizzano and his group (1995) have emphasized the neurodegeneration seen after intracerebral injection of convulsive doses of Group I agonists. Likewise Camón et al (1998) showed that a pro-convulsant dose of DHPG agonist induces severe neuronal loss in CA1 and CA3 hippocampal regions, eliciting a toxic effect comparable that of to kainate (Camón, et al 2001). However, they do not test Group II or III antagonists to prevent epileptic seizures and neuronal loss. Other studies, meanwhile, have reported in vivo and in vitro neuroprotection using group I antagonists and Group II and III agonists (Movsesyan et al., 2001; Gasparini et al., 1999; D'Onofrio et al., 2001), but never

making a clear relationship between glutamate, epilepsy and neuronal death, as reported in this paper.

In conclusion, the findings of the present work, using a combination of neurochemical, electroencephalographic and histological studies in awake rats, indicate that the spatial relationship between glutamate release and its uptake is important and that mGluR III play an important role in the modulation of glutamatergic excitatory transmission under both physiological and pathological conditions. We show for the first time that a decreased release of glutamate by activation of this mGluR type and that such decrease leads to a negative modulation of excitatory transmission glutamate-mediated in the hippocampus in awake animals, with the consequent protection against both behavioral and EEG epileptiform seizures and neurodegeneration. Clearly, these findings suggest new treatments of temporal lobe epilepsy by agonists of mGluR III, provided that they do not have deleterious side effects, as appears to be the case with L-AP₄, since this agonist by itself did not affect any of the parameters studied here, under our experimental conditions.

References

- Abdul-Ghani MA, Valiante TA, Carlen PL, Pennefather PS, (1997) Tyrosine kinase inhibitors enhance a Ca-activated K current (I_{ahp}) and reduce I_{ahp} suppression by a metabotropic glutamate receptor agonist in rat dentate granule neurons. *J Physiol.* 496:139-144.
- Ayala, G.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.
- Ayala, G.X., Tapia, R., 2005. Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Eur J Neurosci.* 22, 3067-3076.
- 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.
- Camón L, De Vera N and Martínez E (2001) Polyamine metabolism and glutamate receptor agonist-mediated excitotoxicity in the rat brain. *J Neurosci Res.* 66:1101-111.
- 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.
- Cartmell J, Schoepp DD. 2000. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem.* 75,889-907.
- Chapman AG, Nanan K, Yip P, Meldrum BS (1999b) Anticonvulsant activity of a metabotropic glutamate receptor 8 preferential agonist, (R,S)-4-phosphonophenyl glycine. *Eur J Pharmacol.* 383: 23-27.
- Chapman AG, Talebi A, Yip PK, Meldrum BS (2001) Anticonvulsant activity of a mGluR4a receptor selective agonist (1S,3R,4S)-1-aminocyclopentane-1,2,4tricarboxylic acid. *Eur J Pharmacol.* 424: 107-113.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:205-237.
- 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.
- 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.
- Folbergrova J, Haugvicova R, Mares P (2003) Seizures induced by homocysteic acid in immature rats are prevented group III metabotropic glutamate Receptor agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine. *Exp Neurol.* 180:46-54.
- 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.
- 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, Conn PJ (1995) Roles of specific metabotropic glutamate receptor subtypes in regulation of hippocampal CA1 pyramidal cell excitability. *J Neurophysiol.* 74:122-129.
- Ghuri M, Chapman AG, Meldrum BS (1996) convulsivant and anticonvulsivant actions of agonist and antagonist of group III mGluRs. *Neuroreport.* 7: 1469-1474.
- Giocomo LM, Hasselmo ME. 2006. Difference in time course of modulation of synaptic transmission by group II versus group III metabotropic glutamate receptors in region CA1 of the hippocampus. *Hippocampus.* 16,1004-1016.
- Johansen PA, Chase LA, Sinor AD, Koerner JF, Johnson RL, Robinson B. 1995. Type 4a metabotropic glutamate receptor: Identification of new potent agonists and differentiation from the L-(+)-2-amino-4-phosphonobutanoic acid sensitive receptor in the lateral perforant pathway in the rats. *Mol Pharmacol.* 48,140-149.
- 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.
- Massieu, L., Morales-Villagrán, A., Tapia, R., 1995. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem.* 64, 2262-2271.
- Matsui T, Kita H (2003) Activation of group III metabotropic glutamate receptors presynaptically reduces both GABAergic and glutamatergic transmission in the rat globus pallidus. *Neuroscience.* 12:727-737.
- Moldrich RX, Chapman AG, De Sarro G, Meldrum BS (2003) Glutamate metabotropic receptors as target for drug therapy in epilepsy. *Eur J Pharmacol.* 476: 3-16.
- Moldrich RX, Griffey KI, Talebi A, Beart PM, Chapman AG and Meldrum BS (2001) Antiepileptic activity of group II metabotropic glutamate receptor agonist (-)-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.
- Moldrich RX, Griffey KI, Talebi A, Beart PM, Chapman AG and Meldrum BS (2001a) 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.
- Mora, G., Tapia, R., 2005. Effects of retigabine on the neurodegeneration and extracellular glutamate changes induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo. *Neurochem Res.* 30, 1557-1565.
- 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.
- 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.
- Ohishi H, Nomura S, Ding Y, Sigemoto 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.
- Oliet, S.H.R., Piet, R., Poulain, D.A., 2001. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science.* 292, 923-925.

- Panatier A, Poulain DA, Oliet SHR (2004) Regulation of transmitter release by high-affinity Group III mGluRs in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *Neuropharmacology*. 47:333-341.
- Paxinos, G., Watson, C., 1982. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney.
- Pekhletski R, Gerlai R, Overstreet LS, Huang XP, Agopyan N, Slater NT, Abramow-Newerly W, Roder JC, Hampson DR (1996) Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic receptor. *J Neurosci*. 16:6364-6373.
- 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.
- 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.
- Perroy J, Prezeau L, De Waard M, Shigemoto R, Bockaert J, Fagni L (2000) Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J Neurosci*. 20: 7896-7904.
- Piet R, Bonhomme R, Theodosis DT, Poulani DA, Oliet SH. (2003). Modulation of GABAergic transmission by endogenous glutamate in the rat supraoptic nucleus. *Eur J Neurosci*. 17, 1777-1785.
- Pinheiro PS, Mulle C (2008) Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci*. 9:423-436.
- 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*. 20, 1517-1524.
- Rogawski MA, Loscher W (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci*. 5:553-564.
- Sansig G, Bushell TJ, Clarke VR, Rozov A, Burnashev N, Portet C, Gasparini F, Schmutz M, Klebs K, Shigemoto R, Flor PJ, Kuhn R, Knoepfel T, Schroeder M, Hampson DR, Collett VJ, Zhang C, Duvoisin RM, Collingridge GL, Van Der Putten H (2001) Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J Neurosci*. 21: 8734-8745.
- Scanziani, M., Salin, P.A., Vogt, K.E., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., (1997). Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature*. 385, 630-634.
- Schoepp DD, Johnson BG (1993) Pharmacology of metabotropic glutamate receptor inhibition of cyclic AMP formation in the adult rat hippocampus. *Neurochem Int*. 22:277-283.
- Schoepp DD. 2001. Unveiling the functions of the presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*. 299, 12-20.
- Semyanov A, Kullmann DM (2000) Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron*. 25:663-672.
- 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, et al. (1996) Target-cell-specific concentration of metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature*. 381:523-525.
- Snead OC, Banerjee PK, Burnham M, Hampson D (2000) Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J Neurosci*. 20: 6218-6224.
- 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.
- 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.
- Tovar-y-Romo LB, Santa-Cruz LD, Zepeda A, Tapia R (2009) Chronic elevation of extracellular glutamate due to transport blockade is innocuous for spinal motoneurons in vivo. *Neurochem Int*. 54:186-191.
- 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, Tapia R (2012) Activation of group III metabotropic glutamate receptors by endogenous glutamate protects against glutamate-mediated excitotoxicity in the hippocampus in vivo. *J Neurosci Res.* 90:1055-1066.
- Watanabe Y, Kaida Y, Fukuhara S, Takechi k, Uehara T, Kamei C (2011) Participation of metabotropic glutamate receptors in pentetrazol-induced kindled seizures. *Epilepsia* 52:140-150
- Folbergrova J, Haugvicova R, Mares P (2003) Seizures induced by homocysteic acid in immature rats are prevented group III metabotropic glutamate Receptor agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine. *Exp Neurol.* 180:46-54.

VIII. DISCUSIÓN

Mediante la combinación de estudios neuroquímicos, electroencefalográficos e histológicos pudimos observar los siguientes hallazgos y es importante resaltar que todos fueron obtenidos en ratas en libre movimiento, lo que elimina los efectos de la anestesia y permite correlacionar los resultados con los cambios conductuales. A continuación se enlistan.

1) La estimulación de la liberación de glutamato desde la terminal sináptica con 4-AP provoca intensas crisis epileptiformes y muerte neuronal en la región del hipocampo por sobreactivación de los receptores NMDA y la administración del antagonista MK-801 previene dichos efectos neurotóxicos.

Comparando nuestros resultados con trabajos previos en los cuales se ha utilizado la técnica de microdiálisis con ratas que se encuentran bajo anestesia (Peña and Tapia, 1999, 2000, Ayala and Tapia, 2003, 2005) se muestra una notable diferencia en el efecto neurotóxico de la 4-AP. Los resultados de nuestro trabajo indican que la neurotoxicidad en las ratas despiertas es mucho más potente a dosis cinco veces menores que las reportadas en los trabajos antes citados (17.5 mM o mayores), porque a 7 mM se produce muerte neuronal más severa y crisis epileptiformes más intensas, reflejadas tanto en la actividad del EEG como en la conducta del animal. Esta notable diferencia en el efecto de las dosis indica que el anestésico reduce la transmisión sináptica excitadora, lo cual no es sorprendente. Diversos trabajos realizados sobre el mecanismo de acción de varios anestésicos como la ketamina, isoflurano y el propio halotano (Rudolph and Antkowiak, 2004, Franks, 2008) 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 excitadora 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, aún cuando muy probablemente el receptor se encuentra hiperfosforilado por la acción de esta droga, que es un inhibidor de

fosfatasa de proteínas; en las ratas despiertas se observó un notable efecto epileptogénico del ácido okadaico.

Por otro lado, en el presente trabajo, mostramos que el aumento extracelular de glutamato inducido con 4-AP fue transitorio y no se encontró diferencia estadísticamente significativa comparada con sus niveles basales, aunque si se encontró diferencia con respecto al grupo control. Esto puede deberse a las limitaciones de la técnica de microdiálisis y detección en el HPLC, sin embargo, los resultados claramente demuestran que el efecto excitotóxico es atribuido a la liberación endógena de glutamato desde la terminal sináptica y sobreactivación de los receptores NMDA. Una evidencia de ello se ha descrito en un trabajo previo realizado por Ayala y Tapia (2005) en el cual también usando la técnica de microdiálisis en el hipocampo demuestran que la administración sistémica de MK-801, 30 ó 60 minutos después de la perfusión de 4-AP previene contra la neurodegeneración y no así contra las crisis epilépticas. Lo anterior indica que una vez desencadenada la hiperexcitabilidad neuronal por sobreactivación de los receptores NMDA debido a la persistente liberación de glutamato, ya no es posible prevenirla con la administración tardía del antagonista, sin embargo la muerte neuronal requiere de un mecanismo intracelular mediado por Ca^{2+} a través de estos receptores. Esto ha sido ampliamente demostrado en trabajos tanto *in vitro* como *in vivo* (Nicholls y Budd, 2000; Corona y Tapia, 2005) y se ha reafirmado con la administración de un quelante de calcio intracelular como lo es el BAPTA-AM, el cual protege significativamente contra la muerte neuronal. Por lo anterior no hay duda de que la neurodegeneración no es consecuencia de las crisis epilépticas, esto concuerda con los resultados del artículo presentado en este trabajo, cuando al administrar MK-801, pero 30 minutos antes de la 4-AP, ya sea por vía sistémica o mediante perfusión directa en el hipocampo, se previenen tanto las crisis epileptiformes como la muerte neuronal. Otra evidencia de lo anterior ha sido demostrado en experimentos *ex-vivo* en rebanadas de hipocampo obtenidas de ratas tratadas previamente con 4-AP (Peña et al., 2002).

2) El incremento tan notable en la concentración extracelular de glutamato por bloqueo de su transporte, resultó ser inocuo, porque no se observan signos ni de epilepsia ni de neurodegeneración.

En trabajos previos se ha demostrado que para producir neurotoxicidad, no es suficiente con provocar la acumulación extracelular de glutamato. Por ejemplo, Obrenovitch y colaboradores (1996), demostraron que el incremento en los niveles extracelulares, *in*

vivo, por inhibición de su recaptura no es suficiente para la inducción de epilepsia y lo mismo en el caso de la neurodegeneración, tanto en el hipocampo y el estriado (Massieu et al., 1995; Massieu y Tapia, 1997; como en la médula espinal (Corona y Tapia, 2004; Tovar-y-Romo et al., 2009). 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 TTX, toxina que bloquea canales de sodio sensibles a voltaje (Peña y Tapia, 2000). La apertura de los canales de sodio, es esencial para inducir la liberación de los neurotransmisores en las terminales nerviosas, por lo cual toda aquella liberación bloqueada por antagonistas de estos canales es de origen neuronal y proviene principalmente de terminales nerviosas (Lada et al., 1998). El boqueo con TTX, protege 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 las terminales sinápticas es la causa de la excitotoxicidad de la 4-AP. A diferencia de otros estudios en los cuales 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 producen 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 (Peña y Tapia, 1999). En este sentido, el incremento de casi 20 veces más por arriba de sus niveles basales de la concentración extracelular de glutamato por cerca de 2 horas, mediante el bloqueo de su recaptura, no causa ningún efecto neurotóxico evaluado tanto en el EEG, como en la observación histológica y el comportamiento motor. Y a pesar de que se ha visto en un trabajo previo que el PDC y otro inhibidor del transporte de glutamato no transportable, el DL-TBOA, causan daño neuronal in vivo, el efecto solo fue observado cuando es combinado con inhibidores del metabolismo energético como lo es el ácido 3-nitropropiónico (Massieu et al., 2001; Montiel et al., 2005). Por otro lado, la infusión crónica de PDC, in vivo, produce alteraciones gliales que pueden reducir la expresión de los transportadores de glutamato, pero esto solo después de varios días de infusión (Lievens et al., 2000). Finalmente en cultivos se ha visto que la prolongada exposición al PDC, puede causar daño en neuronas y en astrocitos, aunque no está muy claro que el daño en los astrocitos sea por estimulación de receptores a glutamato (Velasco et al., 1996; Ré et al., 2003; Guiramand et al., 2005). Así pues, a

diferencia de la liberación transitoria de glutamato por la 4-AP, la acumulación de glutamato extracelular por bloqueo de su transporte, bajo nuestras condiciones experimentales no sobreactiva receptores postsinápticos ionotrópicos, sino que, paradójicamente, el PDC protege significativamente contra la excitotoxicidad inducida por la 4-AP. A nuestro conocimiento, esta es la primera demostración en ratas despiertas, que el incremento extracelular de glutamato no solo es inocuo, sino que también ejerce protección neurotóxica.

3) La protección del PDC es dependiente del tiempo de perfusión del bloqueador. Como se demuestra en los resultados, mientras más tiempo se mantuvo el bloqueador en perfusión, mayor fue la concentración extracelular de glutamato encontrada y observamos mayor neuroprotección. La explicación de que tal exceso de glutamato no resulte neurotóxico, es porque este neurotransmisor puede difundir a sitios adyacentes de la sinapsis y ejercer la protección. Entre estos posibles sitios están los mGluR III, los cuales parecen ser buenos candidatos debido a que, como se mencionó en la introducción, se encuentran en las terminales presinápticas muy cerca de los sitios de liberación de neurotransmisores (Shigemoto et al, 1996, 1997; Pinheiro and Mulle, 2008) y porque funcionan como autorreceptores y su activación puede inhibir la propia liberación del glutamato endógeno.

Hoy se sabe que no sólo los iGluRs pueden modular la transmisión glutamatérgica, los mGluRs también inducen 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. Por ejemplo, la activación directa de estos receptores con su agonista L-AP₄ genera inhibición de la transmisión sináptica excitadora en la vía colateral de Schaffer (Gereau and Conn, 1995; Gereau et al., 1995) y en la vía perforante (Macek et al., 1996) y también induce inhibición en la transmisión glutamatérgica en rebanadas de hipocampo (Panatier et al., 2004). Así mismo, el L-AP₄ reduce la liberación de glutamato al estimular con alto potasio en sinaptosomas de corteza cerebral (Vázquez y Sánchez- Prieto, 1997), así como también por estimulación

eléctrica en rebanadas de hipocampo (Semyanov and Kullman, 2000) y del globo pálido (Matsui and Kita, 2003).

4) El efecto protector de la acumulación de glutamato extracelular es debido a la activación de los mGluR III, porque los dos antagonistas utilizados previenen la protección ejercida por el PDC y el agonista protege contra la neurotoxicidad glutamatérgica.

La perfusión de los antagonistas MAP₄ y MSOP, en presencia de 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. De lo anterior podemos concluir que el bloqueo de los mGluR 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-AP₄, el cual al activar directamente a estos receptores fue capaz de disminuir la concentración de glutamato extracelular muy por debajo de sus niveles basales. 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 mGluRs y esto podría tener relevancia terapéutica en patologías como la epilepsia.

Como se mencionó en los antecedentes, la aplicación de antagonistas para los diferentes receptores ionotrópicos tanto del tipo NMDA como del tipo no-NMDA previenen eficientemente 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) y hoy por hoy han sido utilizados en la clínica, sin embargo, su uso frecuente no resulta ser del todo satisfactorio, 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). En cambio los mGluRs que presentan la particularidad de activar vías de segundos mensajeros se perfilan como nuevos blancos moleculares que pueden ser utilizados en el futuro para el desarrollo de nuevas drogas antiepilépticas. En relación con este tema, los avances con modelos animales parecen alentadores, por ejemplo 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). Concretamente, los agonistas mGluR III han demostrado tener una actividad anticonvulsivante en estudios *in vivo* tanto en crisis focales como en crisis generalizadas (Gasparini et al., 1999; Moldrich et al., 2003). La inyección focal en la amígdala del agonista L-AP₄, bloquea las crisis inducidas por kindling (Abdul-Ghani et al., 1997). El agonista (R,S)-PPG es un potente anticonvulsivante contra las crisis inducidas por electroshock e inducidas por sonido en ratones DBA/2 (Chapman et al., 1999b). Este mismo compuesto administrado por inyección intracerebroventricular en ratones normales protege contra las crisis inducidas por pentilentetrazol (Sansig et al., 2001; Watanabe et al., 2011) así como también protege contra las crisis inducidas por ácido homocisteico en ratas inmaduras (Folbergrova et al., 2003). El (S)-3-4-DCP, otro agonista mGluR III, al igual que el (R,S)-PPG, es un potente anticonvulsivante contra las crisis inducidas por sonido en ratones DBA/2 (Moldrich et al., 2001a). El último agonista sintetizado, ACPT-1, también presenta acción anticonvulsivante en modelos animales *in vivo* y sus efectos son revertidos por dosis moderadas de antagonistas (Chapman et al., 2001). Particularmente los antagonistas de los mGluR III, MSOP, MPPG y MAP₄, resultan ser convulsivantes al administrarlos por inyección intracerebroventricular en ratones (Ghauri et al., 1996; Chapman et al., 2001). El antagonista CPPG protege contra las crisis de ausencia inducidas por infusión focal de pentilentetrazol (Snead et al., 2000). 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). En este sentido animales knock out para el receptor mGluR7 muestran una predisposición para desarrollar crisis epilépticas y animales con mutaciones nulas para los receptores mGluR4 y 8 no presentan dicha predisposición (Sansig et al., 2001; Pekhletski et al., 1996). Todas estas evidencias indican que los mGluRs podrían ser los nuevos blancos moleculares para las enfermedades que involucran aumento o disminución de la neurotransmisión glutamatérgica en condiciones patológicas.

Con respecto a la neurodegeneración, en este 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 inverso, lo cual confirma 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

Como se mencionó en la sección de antecedentes, todos los mGluR III se encuentran acoplados negativamente a la vía de la adenilato ciclasa, inhibiendo la formación de AMPc tanto en sistemas de expresión heteróloga (Okamoto et al., 1994; Duvoisin et al., 1995; Wu et al., 1998a) como en preparaciones neuronales (Schoepp y Jonson, 1993; Schaffhauser et al., 1997). Esta respuesta es abolida por la administración de la toxina pertusis (PTx), lo que indica la participación de una proteína G de tipo G_i/G_o . Sin embargo, a pesar de que en la actualidad se conoce mucha información acerca de los mecanismos de señalización de estos receptores, aún no se sabe el mecanismo exacto por el cual los mGluR III reducen la transmisión sináptica excitatoria.

Hay evidencias que sugieren que se debe a la reducción de la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo N y P/Q por medio de la inhibición de la vía adenilato ciclasa/AMPc (Millán et al., 2002; Rusacov et al., 2004), ya que se ha demostrado que los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q se expresan principalmente en el sistema nervioso y se sabe que desempeñan un papel fundamental en el proceso de exocitosis de neurotransmisores debido a que se localizan en la zona activa de terminales sinápticas (Wheeler et al., 1994; Leveque et al., 1994). También se ha demostrado que los canales de Ca^{2+} tipo N pueden ser bloqueados por agonistas selectivos de los mGluR III, inhibiendo la entrada de Ca^{2+} en varias regiones del cerebro,

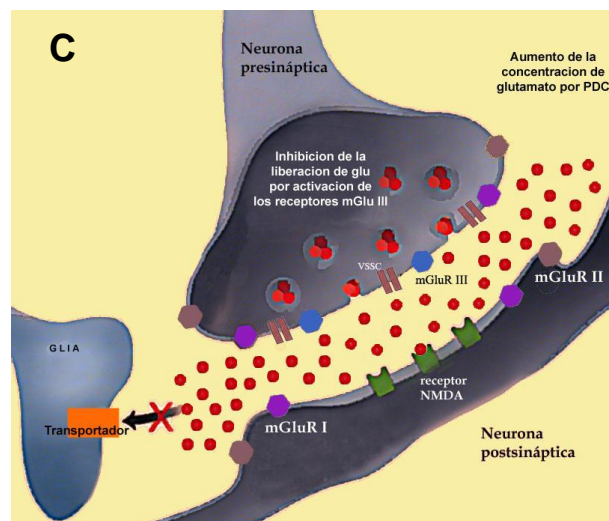
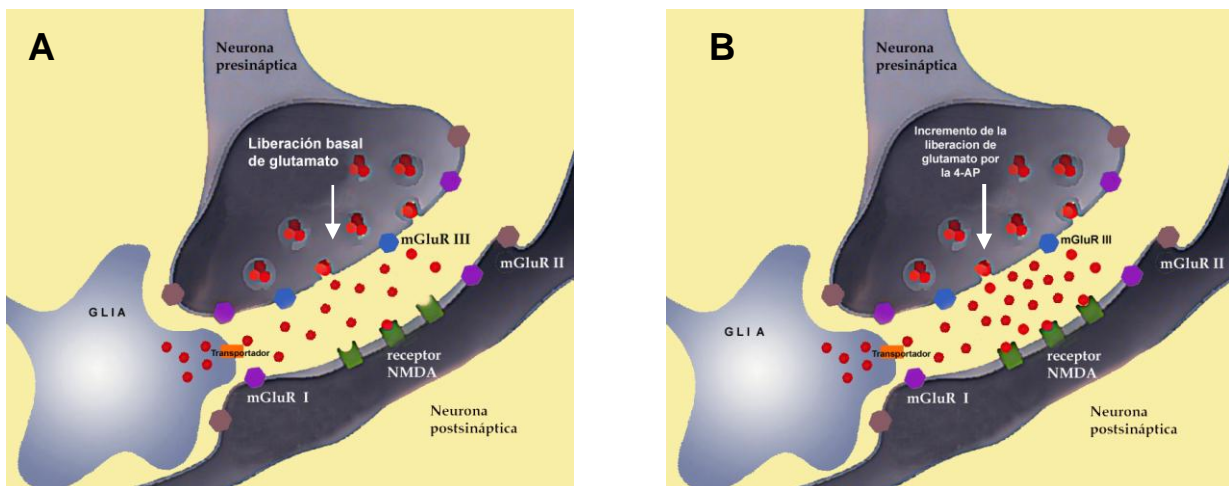
(Anwyl, 1999; Caponga, 2004) y los canales de Ca^{2+} tipo P/Q también pueden ser bloqueados por activación de mGluR III (Takahashi et al., 1996; Perroy et al., 2000; Millán et al., 2002). Otra posibilidad es por medio del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G, siendo estos algunos de los posibles mecanismos responsables de la inhibición de la liberación de glutamato (Sahara y Westbrook, 1993; Hay y Kunze, 1994; Tyler y Lovinger, 1995; Glaum y Millar, 1995; Takahashi et al., 1996; Herrero et al., 1996a; Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997; Stefani et al., 1996, 1998a, Perroy et al., 2000). También se ha visto que la co-expresión de mGluR,4,6 y 7 con las subunidades de Kir3.1 y Kir 3.4 de los canales de K^+ tipo GIRK en ovocitos de *Xenopus*, activan al canal por unión de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G, después de la estimulación con el agonista de los mGluR III (Saugstad et al., 1996; Sharon et al., 1997). Y finalmente, los mGluR III, también pueden activar canales de K^+ rectificantes dando como resultado corrientes entrantes de K^+ en las terminales sinápticas que provocan el retraso en el umbral de los potenciales de acción (Cochilla y Alford, 1998).

CONCLUSIONES

El acoplamiento negativo de mGluR III a la vía adenilato ciclasa/AMPC concuerda con el efecto inhibitorio de la transmisión sináptica, dado que la activación de esta vía con forskolina, induce el incremento de la liberación espontánea de glutamato dependiente de la elevación de los niveles intracelulares de AMPc (Herrero y Sánchez-Prieto,1996b). Por lo que es posible pensar que los mGluR III puedan modular, a través de la inhibición de esta vía, la transmisión glutamatérgica y reducir el daño causado por la epilepsia. Cerca del 75-80% de los pacientes epilépticos pueden ser controlados con los fármacos convencionales, tales como la fenitoína, carbamazepina y el ácido valproíco, pero del 20-25% de los pacientes la terapia no resulta ser efectiva, por lo tanto, la utilización de los mGluRs podría desempeñar un papel central en el control de la epilepsia y aunque todavía no existe ningún agonista o antagonista de los mGluRs en uso clínico para la disminución de ataques epilépticos; los resultados con modelos animales de epilepsia parecen ser muy prometedores y resaltan su gran potencial. Particularmente el agonista $L-AP_4$ administrado intrahipocampalmente en ratas despiertas provoca la disminución de la liberación de glutamato de forma muy significativa, que lleva a la protección de la hiperexcitabilidad neuronal, este hallazgo indica que la relación espacial entre el glutamato y su recaptura es de suma importancia en la modulación de los mGluR presinápticos, lo cual puede contribuir a la plasticidad sináptica a través de la regulación

de la transmisión excitadora bajo condiciones fisiológicas y patológicas y aunque esto ya ha sido sugerido en una gran variedad de trabajos previos en su mayoría en experimentos in vitro (Semyanov y Kullman, 2000; Tzingounis y Wadiche, 2007; Pinheiro y Mulle, 2008; Alexander y Godwin, 2006), esta es la primera vez que se demuestra que ocurre in vivo y que tiene efectos tanto para inhibir las crisis como para proteger contra la muerte neuronal. Esto es de gran relevancia y sirve como pauta para futuras investigaciones, como por ejemplo para pacientes que padecen epilepsia del lóbulo temporal.

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



En el esquema **A**, se representa la liberación basal de glutamato endógeno en condiciones fisiológicas. El glutamato después de ser liberado, activa los receptores NMDA y posteriormente es removido de la hendidura sináptica por sus transportadores.

En **B** se esquematiza la sobreactivación de los receptores NMDA en la neurona postsináptica, por el aumento transitorio del glutamato endógeno, liberado de la presinapsis al estimular con 4-AP. El resultado de esta activación es la generación de crisis epileptiformes y muerte neuronal.

En **C** vemos la representación del incremento del glutamato extracelular, producido por la inhibición de su recaptura. El glutamato viaja a sitios adyacentes de la sinapsis y puede activar receptores presinápticos metabotrópicos del grupo III, los cuales se encuentran localizados en sitios muy cercanos a la liberación del neurotransmisor. El resultado de la activación de los mGluR III, es la inhibición de la liberación de glutamato; lo que ayuda a contrarrestar la excitotoxicidad glutamatérgica.

REFERENCIAS

- Abdul-Ghani MA, Valiante TA, Carlen PL, Pennefather PS, (1997) Tyrosine kinase inhibitors enhance a Ca-activated K current (I_{ahp}) and reduce I_{ahp} suppression by a metabotropic glutamate receptor agonist in rat dentate granule neurons. *J Physiol.* 496:139-144.
- 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.
- Allen JW, Vicini S, Faden AI (2001) Exacerbation of neuronal cell death by activation of group I metabotropic glutamate receptors: role of NMDA receptors and arachidonic acid release. *Exp Neurol.* 169: 449-460.
- Alexander GM, Godwin DW (2006) Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Res* 71:1-22.
- Anderson CM, Bridges RJ, Chamberlin AR, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Swanson RA (2001) Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J Neurochem.* 79:1207-1216.
- Anneser JM, Horstmann S, Weydt P, Borasio GD (1998) Activation of metabotropic receptors delays apoptosis of chick embryonic motor neurons in vivo. *Neuroreport* 9:2039-2043.
- Anovadiya AP, Sanmukhani JJ, Tripathi CB (2012) Epilepsy: Novel therapeutic targets. *J Pharmacol Pharmacother* 3:112-117.
- Anwyl R (1999) Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Rev.* 29:83-120.
- Arias C (1991) Padecimientos degenerativos crónicos del SNC. Hipótesis excitotóxica. *Ciencia* 42:69-80.
- Arias C, Arrieta I, Massieu L, Tapia R (1997) Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transport inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus in vivo. *Exp Brain Res* 116:467-476.
- Arias C, Becerra-García F, Arrieta I, Tapia R (1998) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus in vivo. *Exp Neurol* 153:242-254.
- 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.
- Arias C, Sharma N, Davies P, Shafiti-Zagardo B. (1993) Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 61:673-682.
- Arundine, M., Tymianski, M., 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell calcium* 34: 325-337.
- 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 GX, 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.
- Ayala GX, Tapia R (2005) Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Eur J Neurosci* 22:3067-3076.
- Balázs R, Dahl D, Harwood JR (1966) Subcellular distribution of enzymes of glutamate metabolism in rat brain. *J Neurochem* 13: 897-905.

-
- Balázs R, Jorgensen OS, Hack N (1988) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27:437-451.
- Balcar JV, Johnston GAR (1972) The structural specificity of the affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J Neurochem* 19:2657-2666.
- Balschun D, Wetzel W (1998). Inhibition of group I metabotropic glutamate receptors blocks spatial learning in rats. *Neurosci. Lett.* 249, 41-44.
- Bano D, Nicotera P (2007) Ca²⁺ signals and neuronal death in the brain ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 38:674-676.
- Barford D (1995) Protein phosphatases. *Curr Struct Biology* 5:728-734.
- Baskys A, Malenka R.C (1991) Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibits EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 444:687-701.
- Batchelor AM, Garthwaite J (1993) Novel synaptic potentials in cerebellar Purkinje cells: probable mediation by metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 32:11-20.
- Beal MF (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23:298-304.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.
- Bellen JH (1999) Neurotransmitter release. Oxford University Press Inc. New York. Capítulo 5.
- Bialojan C, Takai A (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256:283-290.
- 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.
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18:1723-1729.
- Bordi F y Ugolini A (1999) Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Prog Neurobiol* 59:55-79.
- Brackenham P, Lanahan A, O'Brien R, Roche K, Barnes C, Huganir RY, Worley P (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:284-288.
- 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.
- Bridges JR, Esslinger CS (2005) The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacol & Ther.* 107:271-285.
- Broman J., Hassel B., Rinvik E., et al. (2000) Biochemistry and anatomy of neurotransmitter glutamate, in *Handbook of chemical neuroanatomy: Glutamate*, Vol. 18 (Ottersen O.P. y Strom-Mathisen J., eds), pp 1-44. Elsevier, Amsterdam.

-
- Bruno V, Copani A, Knopfel T, Kuhn R, Casabona G, Dell'Albani P, Condorelli DF, Nicoletti F (1995) Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacol.* 34: 1089-1098.
- Bruno V, Sureda FX, Storto M, Casabona G, Caruso A, Knofel T, Kuhn R, Nicoletti F (1997) The neuroprotective activity of group-II metabotropic glutamate receptors requires new protein syntesis and involves a glial-neuronal signaling. *J Neurisci* 17:1891-1897.
- 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.
- Cai Z, Saugstad JA, Sorensen SD, Ciombor KJ, Zhang C, Schaffhauser H, Hubalek F, Pohl J, Duvoisin RM, Conn PJ (2001) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates group III metabotropic glutamate receptors and inhibits their function as presynaptic receptors. *J Neurochem* 78:756-766.
- Camón L, De Vera N and Martínez E (2001) Polyamine metabolism and glutamate receptor agonist-mediated excitotoxicity in the rat brain. *J Neurosci Res* 66:1101-111.
- 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.
- Caponga M (2004) Distinct properties of presynaptic group II and III metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of perforant pathway-CA1 EPSCs. *Eur J Neurosci.* 19:2847-58.
- 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, Elwes RD, Millan MH, Polkey CE, Meldrum BS (1996) Role of glutamate and aspartate in epileptogenesis: contribution of microdialysis studies in animal and man. *Epilepsy Res Suppl.* 12:239-246.
- 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.
- Chapman AG, Nanan K, Yip P, Meldrum BS (1999b) Anticonvulsant activity of a metabotropic glutamate receptor 8 preferential agonist, (R,S)-4-phosphonophenyl glycine. *Eur J Pharmacol* 383: 23-27.
- Chapman AG, Talebi A, Yip PK, Meldrum BS (2001) Anticonvulsant activity of a mGluR4a receptor selective agonist (1S,3R,4S)-1-aminocyclopentane-1,2,4-tricarboxylic acid. *Eur J Pharmacol* 424: 107-113.
- Chavis P., Fagni L., Bockaert J. y Lansman J.B. (1995). Modulation of calcium channels by metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells. *Neuropharmacol.* 34, 929-937.
- Chiosa, L., Gane, P., 1956. Action of glutamic acid on the higher nervous activity of small laboratory animals (rats); considerations on the relations between the biochemical substratum and the higher nervous activity. *Rev. Sci. Med.* 1, 165-171.
- 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.
- Choi DW. (1988b) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.

-
- Cochilla AJ, Alford S (1998) Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release. *Neuron*. 20: 1007-1016
- Congar P, Leinekugel X, Ben-Ari Y, Crepel V (1997) A long-lasting calcium activated nonselective cationic current is generated by synaptic stimulation or exogenous activation of group I metabotropic glutamate receptors in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 17:5366-5379.
- 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.
- Conquet F, Bashir ZI, Davies CH, Daniel H, Ferraguti F, Bordi F, Franz-Bacon K, Reggiani A, Matarese V, Conde F (1994) Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature*. 372:237-243.
- Copani A, Bruno V, Battaglia G, Leanza G, Pellitteri R, Russo A (1995) Activation of metabotropic glutamate receptor protects cultured neurons against apoptosis induced by beta-amyloid peptide. *Mol Pharmacol* 47: 890-897.
- Corona JC, Tapia R (2007) Ca²⁺ permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord *in vivo*. *Neuropharmacology* 52:1219-1228.
- Corona JC, Tapia R (2005) Mecanismos de neurodegeneración. *Mensaje Bioquímico* Vol. XXIX, 17-27.
- 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, Monaghan DT, Ganong AH (1988) Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Ann Rev Neurosci* 11:61-80.
- 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.
- Coutler DA y Mathern GR. (2001) AES Proceedings. Annual Meeting of the American Epilepsy Society. *Epilepsia* 42:1-304.
- Coyle JT and 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, Johnson G (1974) Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergeb Physiologi* 69:97-188.
- Curtis DR, Phillis JW and Watkins JC (1959) Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* 183:611-612.
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC (1960) The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J Physiol* 150:656-682.
- Curtis DR, Watkins JC (1963) Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurons. *J Physiol* 166:1-14.

-
- D'Onforio 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.
- Darbolt NC (2000) Handbook of chemical neuroanatomy. Elsevier Vol 18. Glutamate Cap. 8
- Denis W (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379.
- Dev KK, Nakanishi S, Henley JM (2001) Regulation of mGluR7 receptors by proteins that interact with the intracellular C-terminus. *Trends Pharmacol Sci* 22:355-361.
- 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.
- Duvoisin RM, Zhang C, Ramonell K (1995) A novel metabotropic receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J Neurosci* 15: 3075-3083.
- Evans RH, Francis AA, Hunt K, Oakes DJ, Watkins JC (1979) Antagonism of excitatory amino acid-induced responses and of synaptic excitation in the isolated spinal cord of the frog. *Br J Pharmacol* 67:591-603.
- Fanjul M, Hiriart M, Fernández de Miguel F (1998) *Biología funcional de los animales*. 1ª edición. Siglo XXI editores. Cap 4.
- 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.
- Fernández-Sánchez M, García-Rodríguez A, Díaz-Trelles R, Novelli A (1996) Inhibition of protein phosphatases induces IGF-1-blocked neurotrophin-insensitive neuronal apoptosis. *FEBS Lett* 398:106-112.
- 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.
- Flor P.J., Lindauer K., Puttner I., Ruegg D., Lukic S., Knopfel T. y Kuhn R. (1995). Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of the human metabotropic glutamate receptor type 2. *Eur. J. Neurosci.* 7, 622-629
- Folbergrova J, Haugvicova R, Mares P (2003) Seizures induced by homocysteic acid in immature rats are prevented group III metabotropic glutamate Receptor agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine. *Exp Neurol* 180:46-54.
- Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42:1-11.
- Fonnum F, Fykse EM, Roseth S (1998) Uptake of glutamate into synaptic vesicles. *Prog Brain Res* 116:87-101.
- Fotuhi M, Sharp AH, Glatt CE, Hwang PM, Krosigk M, Snyder SH and Dawson TM (1993) Differential localization of phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptor (mGluR 1) and the inositol 1,4,5-triphosphate receptor in rat brain. *J Neurosci* 13:2001-2012.
- 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.
- Franks NP (2008) General anaesthesia : from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 9 :370-386.
- Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E et al. (2003) Mutations of sodium channel α subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 126:531-546.
- 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, Conn PJ (1995) Roles of specific metabotropic glutamate receptor subtypes in regulation of hippocampal CA1 pyramidal cell excitability. *J Neurophysiol* 74:122-129.
- Ghuri M, Chapman AG, Maldrum BS (1996) convulsivant and anticonvulsivant actions of agonist and antagonist of group III mGluRs. *Neuroreport* 7: 1469-1474.
- 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.
- Glaum SR, Miller RJ (1995) Presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate omega-conotoxin-GVIA-insensitive calcium channels in the rat medulla. *J Neurophysiol.* 88: 512-522.
- Guiramand J, Martin A, de Jesus M-C, Cohen-solal c, Vignes , Récasens (2005) Gliotoxicity in hippocampal cultures is induced by transportable, but not by nontransportable, glutamate uptake inhibitors. *J Neurosci Res* 81:199-207.
- 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.
- Hamberger A, Hedquist B, Nystrom B (1979) Ammonium ion inhibition of evoked release of endogenous glutamate from hippocampal slices. *J Neurochem* 33:1295-1302.
- Hay M, Kunze DL (1994) Glutamate metabotropic receptor inhibition of voltage-gated calcium currents in visceral sensory neurons. *J Neurophysiol.* 72: 421-430.
- 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.
- He J, Yamada K, Zou L, Nabeshima T (2001) Spatial memory deficit and neurodegeneration induced by the direct injection of okadaic acid into the hippocampus in rats. *J Neural Transm* 108:1435-1443.
- 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.
- Herrero I, Sánchez-Prieto J (1996b) cAMP-dependent facilitation of glutamate release by β -adrenergic receptors in cerebrocortical nerve terminals. *J Biol Chem* 271: 30554-30560.
- Herrero I, Vazquez E, Miras-Portugal MT, Sánchez-Prieto J (1996a) Decrease in $[Ca^{2+}]_c$ but not in cAMP mediate s L-AP4 inhibition of glutamate release: PKC-mediated suppression of this inhibitory pathway. *Eur J Neurosci.* 8: 700-709.
- Hoffman D, Magee J, Colbert C, Johnston D (1997) K^+ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387:869-875.

-
- Hollman M, Hartley M and Heinemann S (1991) Ca²⁺ 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.
- Houamed K.M., Kuijper J.L., Gilbert T.L., Haldeman B.A., O'Hara P.J., Mulvihill E.R., Almers W. y Hagen F. (1991). Cloning, expression and gene structure of a G-protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* 252, 1318-1321.
- Hunter T (1995) Protein Kinases and Phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236.
- Inoue K, Morimoto K, Sato K, Ishizu H, Kawai K, Yamada N, Otsuki S (1992) A model of status epilepticus induced by intermittent electrical stimulation of the deep prepyriform cortex in rat. *Jpn J Psychiatry Neurol* 46:361-367.
- Ito M (1989) Long-term depression. *Ann Rev Neurosci* 12:85-102.
- Jacob CP, Koutsilieris E, Bartl J, Neuen-Jacob E, Arzberger T, Zander N, Ravid R, Roggendorf W, Riederer P, Grünblatt E. (2007) Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 11: 97-116.
- 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.
- Javanovic J, Sihra T, Nairn A, Hemmings H, Greengard P, Czernik A (2001) Opposing Changes in phosphorylation of specific sites synapsin I during Ca²⁺ -dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J Neurosci* 15:7944-7953.
- 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 Ca²⁺ -dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J Neurosci* 15:7944-7953.
- Kanai Y, Trotti D, Berger UV, Hediger MA (2002) The high-affinity glutamate and neural amino-acid transporter family. In Reith MEA, ed. Neurotransmitter transporters. Structure, function, and regulation. Totowa, NJ:Humana Press. 255-311 pp.
- Kandel, ER, Schwartz, JH, Jessell, TM (2000) Principles of neural science. 4^a edición McGraw-Hill. Cap 15.
- Kickler N, Krack P, Fraix V, Lebas JF, Lamalle L, Durif F, Krainik A, Rémy C, Segebarth C, Pollak P. (2007) Glutamate measurement in Parkinson's disease using MRS at 3 T field strength. *NMR Biomed* 20:757-762.
- Kingston AE, Ornstein PL, Wright RA, Johnson BG, Mayne NG, Burnett JP, Belagaje R, Wu S, Schoepp DD (1998a) LY341495 is a nanomolar potent and selective antagonist of group II metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacol.* 37, 1-12.
- Kirson E, Yaari Y, Perouansky M (1998) Presynaptic and postsynaptic actions of halothane at glutamatergic synapses in the mouse hippocampus. *Br J Pharmacol* 124:1607-1614.
- Koh, J.Y., Goldberg, M.P., Hartley, D.M., Choi, D.W., 1990. Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. *J. Neurosci.* 10: 693-705.
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260:95-97.

-
- Konieczny J, Wardas J, Kuter K, Pilc A, Ossowska K (2007) The influence of group III metabotropic glutamate receptors stimulation by (1S,3R,4S)-1-aminocyclopentane-1,3,4-tricarboxylic acid on the parkinsonian-like akinesia and striatal proenkephalin and prodynorphin mRNA expression in rats. *Neuroscience* 145:611-620.
- 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 O, Lee CJ, Choi S (2002) Induction mechanisms for L-LTP at thalamic input synapses to the lateral amygdala: requirement of mGluR5 activation. *Neuroreport*. 13: 685-691.
- 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.
- Leonard A, Hell J (1997) Cyclic AMP-dependent C phosphorylate N-metil-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem* 272:12107-12115.
- Leveque C, El Far O, Martin-Moutot N, Sato K, Kato R, Takahashi M, Seagar MJ (1994) Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin. A complex implicated in synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem*. 269: 6306-6312.
- Liao G, Wagner D, Hsu M, Leonard J (2001) Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Mol Pharmacol* 59:960-964.
- Liberman D, Mody I (1994) Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca²⁺-dependent phosphatase. *Nature* 369:235-239.
- Lievens J-C, Bernal F, Forni C, Mahy N, Kerkerian-Le Goff L (2000) Characterization of striatal lesions produced by glutamate uptake alteration: cell death, reactive gliosis, and changes in GLT1 and GADD45 mRNA expression. *Glia* 29:222-232.
- Logan WJ, Snyder SH (1972) High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. *Brain Res* 42:413-431.
- Lopez S, Turle-Lorenzo N, Acher F, De Leonibus E, Mele A, Amalric M (2007) Targeting group III metabotropic glutamate receptors produces complex behavioral effects in rodent models of parkinson's diseases. *Neuroscience* 27:6701-6711.
- 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-Miras R (2005) Receptores metabotrópicos de glutamato: nuevas dianas moleculares en la terapia de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. *Rev Neurol* 40:43-53.

-
- Luján-Miras 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.
- MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ and Baker JL (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature* 321:519-522.
- 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.
- Marabese I, Novellis V, Palazzo E, Mariani L, Siniscalco D, Rodella L, Rossi F, Maione S (2005) Differential roles of mGlu8 receptors in the regulation of glutamate and γ -aminobutyric acid release at periaqueductal grey level. *Neuropharmacology*. 49:157-166.
- Maragos WF, Greenamyre JT, Penny JB, Young AB (1987) Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: a hypothesis. *TINS* 10:65-68.
- Martin D, Plagenhoef M, Abraham J, Dennison R, Aronstam R. (1995) Volatile anesthetic and glutamate activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochem Pharmacol* 49:809-817.
- Massieu L, del Río P, Montiel T (2001) Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience* 106:669-677.
- 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-Villagrán A, Tapia R (1995) Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 64:2262-2271.
- 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.
- Masu M., Tanabe Y., Tsuchida K., Shigemoto R. y Nakanishi S. (1991). Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349, 760-765.
- Matsui T, Kita H (2003) Activation of group III metabotropic glutamate receptors presynaptically reduces both GABAergic and glutamatergic transmission in the rat globus pallidus. *Neuroscience* 12:727-737.
- Mattson MP, Guthrie PB, Kater SB (1988) Intracellular messengers in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J Neurosci Res* 21:447-464.
- Maycotte P, Morán J (2007) Oxidative stress and energy: Determinants in the shape of neuronal death?, in *The neurochemistry of neuronal death* (Massieu L, Arias C y Morán J., eds), pp 95-119. Research Signpost, Kerala, India.
- Medina-Ceja L, Guerrero-Cazares H, Canales-Aguirre A, Morales-Villagrán A, Feria-Velasco A (2007) Características estructurales y funcionales de los transportadores de glutamato: su relación con la epilepsia y el estrés oxidativo. *Rev Neurol*. 45:341-352.

-
- McCool BA, Pin JP, Burst PF, Harpold MM, Lovinger DM (1996) Functional coupling of rat group II metabotropic glutamate receptors to an ω -conotoxin GVIA-sensitive calcium channel in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 50:912-922.
- 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 B. (1991) Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res* 10:55-61.
- Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130: 1007 S-1015 S.
- Michaelis MK (1998) Molecular Biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54:369-415.
- 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.
- Millan MH, Chapman AG and Meldrum BS (1993) Extracellular amino acids levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res* 14:139-148.
- Moldrich RX, Chapman AG, De Sarro G, Meldrum BS (2003) Glutamate metabotropic receptors as target for drug therapy in epilepsy. *Eur J Pharmacol* 476: 3-16.
- Moldrich RX, Griffey KI, Talebi A, Beart PM, Chapman AG and Meldrum BS (2001) Antiepileptic activity of group II metabotropic glutamate receptor agonist (-)-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.
- Moldrich RX, Griffey KI, Talebi A, Beart PM, Chapman AG and Meldrum BS (2001a) 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.
- Montiel T, Camacho A, Estrada-Sánchez AM, Massieu L (2005) Differential effects of the substrate inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) and the non-substrate inhibitor DL-threo- β -benzyloxyaspartate (DL-TBOA) of glutamate transporters on neuronal damage and extracellular amino acid levels in rat brain in vivo. *Neuroscience* 133:667-678.
- Mora G, Tapia R (2005) Effects of retigabine on the neurodegeneration and extracellular glutamate changes induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo. *Neurochemical Res* 30:1557-1565.
- 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-(phenylethynyl)-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.
- Naito S, Ueda T (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem* 44:99-109.
- Nakajima Y, Yamamoto T, Nakayama T, Nakanishi S (1999) A relationship between protein kinase C phosphorylation and calmodulin binding to the metabotropic glutamate receptor subtype 7. *J Biol Chem* 274:27573-27577.
- Nakajima Y., Iwakabe H., Akazawa C., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. (1993). Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* 268, 11868-11873.
- 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. *Nature Reviews Neuroscience* 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.
- Nestler EJ, Greengard P (1998) Basic neurochemistry. Lippincott-Raven Publishers. Cap 3.
- Netzeband JG, Parison KL, Sweeney DD, Gruol DL (1997) Metabotropic glutamate receptor agonists alter neuronal excitability and Ca²⁺ levels via the phospholipase C transduction pathway in cultured Purkinje neurons. *J Neurophysiol.* 78:63-75.
- Nicholls, DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80:315-360.
- Nicoletti F, Ladarola 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, Ladarola MJ, Chang DM, Roth BL and Costa E (1986) Coupling of inositol phospholipids metabolism with excitatory amino acids recognition sites in rat hippocampus. *J Neurochem* 46:40-46.
- Nicoletti F., Meek J.L., Ladarola M.J., Chuang D.M., Roth D.L. y Costa E. (1986a). Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory amino acid recognition sites in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 46, 40-46.
- Nicoletti F., Wroblewski J.T., Ladarola M.J. y Costa E. (1986b). Serine-O-phosphate, an endogenous metabolite, inhibits the stimulation of inositol phospholipid hydrolysis elicited by ibotenic acid in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 25, 335-338.
- Nicoletti F., Wroblewski J.T., Novelli A., Alho H., Guidotti A. y Costa E. (1986c). The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 6, 1905-1911.
- O'Connor V, Bofill-Cardona E, Nanoff C, Freissmuth M, Karschin A, Arias JM, Betz H, Boehm S (1999) Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science* 286:1180-1184.
- 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, Neki A, Mizuno N (1998) Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci Res.* 30: 65-82.
- Ohishi H, Nomura S, Ding Y, Sigemoto 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.
- Okamoto N, Hori S, Akazawa C, Hayashi Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1994) Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J Biol Chem* 269:1231-1236.
- 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 tool in neurobiology (McGreer EG, Olney JW, McGreer PL, eds) New York: Raven Press. 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, Ho OL, Rhee V (1971) Cytotoxic effects of acid and sulfur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* 14:61-70.
- Olney JW, Sharpe LG, Feigin RD (1972) Glutamate-induced brain damage in infantile primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 31:464-488.
- Orrego F, Villanueva S (1993) The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience.* 56:539-555.
- Ossowska K, Konieczny J, Wardas J, Pietraszek M, Kuter K, Wolfarth S, Pilc A (2007) An influence of ligands of metabotropic glutamate receptors subtypes on parkinsonian-like symptoms and the striapallidal pathway in rats. *Amino Acids* 32:165-167.
- Panatier A, Poulain DA, Oliet SHR (2004) Regulation of transmitter release by high-affinity Group III mGluRs in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *Neuropharmacology.* 47:333-341.
- Pasantes H, Sánchez J y Tapia R (1991) *Neurobiología celular.* Fondo de cultura económica, S.A. de C.V. México. Capítulo VIII.
- Paxinos G, Watson C. (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, Sydney.
- Pearce B., Albrecht J., Morrow C. y Murphy S. (1986). Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium influx. *Neurosci. Lett.* 72, 335-340.
- Pekhletski R, Gerlai R, Overstreet LS, Huang XP, Agopyan N, Slater NT, Abramow-Newerly W, Roder JC, Hampson DR (1996) Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic receptor. *J Neurosci* 16:6364-6373.
- 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.
- Peña F, Bargas J, Tapia R (2002) Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine, in vivo. *Neuropharmacology* 42:807-812.

-
- 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.
- Perouansky M, Kirson E, Yaari Y (1998) Mechanism of action of volatile anesthetics: effects of halothane of glutamate receptors in vitro. *Toxicol Lett.* 100-101:65-69.
- 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.
- Perroy J, Prezeau L, De Waard M, Shigemoto R, Bockaert J, Fagni L (2000) Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J Neurosci.* 20: 7896-7904.
- 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.
- Petralia RS, Wang YX, Singh S, Wu C, Shi L, Wei J, Wenthold RJ (1997) A monoclonal antibody shows discrete cellular and subcellular localizations of mGluR1 α metabotropic glutamate receptors. *J Chem Neuroanat.* 13:77-93.
- 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.
- Pin JP, Joly C, Heinemann SF, Bockaert J (1994) Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C coupled metabotropic glutamate receptors. *EMBO J* 13:342-348.
- Pinheiro PS, Mulle C (2008) Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci* 9:423-436.
- Pizzi M, Benarese M, Boroni F, Goffi F, Valerio A, Spano PF (2000) Neuroprotection by metabotropic glutamate receptor agonist on kainite-induced degeneration of motor neurons in spinal cord slices from adult rat. *Neuropharmacology* 39:903-910.
- Prehn, J.H., Lippert, K., Kriegstein, J., 1995. Are NMDA or AMPA/kainate receptor antagonists more efficacious in the delayed treatment of excitotoxic neuronal injury? *Eur. J. Pharmacol.* 292:179-189.
- 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* 20:1517-1524.
- Ré DB, Boucraut J, Samuel D, Bieman S, Kerkerian-Le, Goff L, Had-Aissouni H (2003) Glutamate transport alteration triggers differentiation-state selective oxidative death of cultured astrocytes: a mechanism different from excitotoxicity depending on intracellular GSH contents. *J Neurochem* 85:1159-1170.
- Robbins MJ, Ciruela F, Rhodes A, McIlhinney RA (1999) Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1 α . *J Neurochem* 72:2539-2547.
- Robinson M, Hunter-Ensor M, Sinor J (1991) Pharmacologically distinct sodium-dependent L-[3 H]glutamate transport processes in rat brain. *Brain Res* 544:196-202.
- Rodriguez-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, et al. (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 (ADC1): comparison with the structural analogs dizocipine (MK-801) y carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* 259:30-37.
- Romano C, Sesma MA, McDonald CT, O'Malley K, Van den Pol AN, Olney JW (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol.* 355: 455-469.
- Rossi DJ, Slater NT (1993) The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology* 32:1239-1248.
- Rossini PM, Filippi MM, Vernieri F (1998) Neurophysiology of sensorimotor integration in Parkinson's disease. *Clin Neurosci* 5:121-130.
- Rothman S (1984) Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci* 4:1884-1891.
- Rothman S (1985) The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* 5:1483-1489.
- Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105-111.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT (1990) Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28:18-25.
- Rudolph U, Antkowiak B (2004) Molecular and neuronal substrates for general anesthetics. *Nat Rev Neurosci* 5:709-720.
- Rusakov DA, Wuerz A and Kullman DM (2004) Heterogeneity and specificity of presynaptic Ca²⁺ current modulation by mGluRs at individual hippocampal synapses. *Cerebral Cortex* 14:748-758.
- Sacher MG, Athlan ES, Mushynski WE (1993) Okadaic acid induces the rapid and reversible disruption of the neurofilament network in rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 186:524-530.
- Sahara Y, Westbrook GL (1993) α -BTPA blocks high threshold calcium currents on cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 13: 3040-3047.
- Salazar P, Montiel T, Brailowsky S and Tapia R (1994) Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of γ -aminobutyric acid. *Neurochem Int* 24:363-368.
- Sansig G, Bushell TJ, Clarke VR, Rozov A, Burnashev N, Portet C, Gasparini F, Schmutz M, Klebs K, Shigemoto R, Flor PJ, Kuhn R, Knoepfel T, Schroeder M, Hampson DR, Collett VJ, Zhang C, Duvoisin RM, Collingridge GL, Van Der Putten H (2001) Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J Neurosci* 21: 8734-8745.
- Saugstad J.A., Kinzie J.M., Mulvihill E.R., Segerson T.P. y Westbrook G.L. (1994). Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* 45, 367-372.
- Saugstad JA, Segerson TP, Westbrook GL (1996) Metabotropic glutamate receptors activate G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Neurosci* 16:5979-5985.
- 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.
- Schaffhauser H., Cartmell J., Jakob-Rotne R. y Mutel V. (1997). Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors linked to the inhibition of adenylate cyclase activity in rat striatal slices. *Neuropharmacol.* 36, 933-940.
- Schenzer A, Friederich T, Pusch M. (2005) Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J Neuroscience* 25:5051-5060.

-
- Scheyer RD (1978) Involvement of glutamate in human epileptic activities. *Prog Brain Res* 116:359-369.
- Schinder 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 (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38:1431-1476.
- Schoepp DD, Johnson BG (1993) Pharmacology of metabotropic glutamate receptor inhibition of cyclic AMP formation in the adult rat hippocampus. *Neurochem Int* 22:277-283.
- Schrader LA, Tasker JG (1997) Presynaptic modulation by metabotropic glutamate receptors of excitatory and inhibitory synaptic inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *J Neurophysiol.* 77:527-536.
- Schulman H (1995) Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. *Curr Opin in Neurobiol* 5:375-381.
- Semyanov A, Kullmann DM (2000) Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 25:663-672.
- Sharon D, Vorobiev D, Dascal N (1997) Positive and negative coupling of the metabotropic glutamate receptors to a G-protein-activated K channel, GIRK, in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol.* 109:447-490.
- 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, et al. (1996) Target-cell-specific concentration of metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381:523-525.
- Shigemoto R, Nomura S, Ohishi H, et al. (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. Chapter Two.
- Sierra-Paredes G, Sierra-Marcuño G. (2007) Extrasynaptic GABA and glutamate receptors in epilepsy. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6:288-300.
- Siesjo BK, Katsura K, Kristian T (1995) The biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J Neurosurg Anesthesiol* 7:47-52.
- Sim A, Lloyd HGE, Jarvie PE, Morrisom M, Rostas JAP, Dunkley PR (1993) Synaptosomal amino acid release: effect of inhibiting protein phosphatases with okadaic acid. *Neurosci Lett* 160:181-184.
- 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.
- Snead OC, Banerjee PK, Burnham M, Hampson D (2000) Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J Neurosci.* 20: 6218-6224.
- Snead OC, Banerjee PK, Burnham M, Hampson D (2000) Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J Neurosci* 20: 6218-6224.
- Spyker DA, Lynch C, Shabanowitz J, Sinn JA (1980) Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clin Toxicol* 16:487-497.

-
- Stefani A, Spadoni F, Bernardi G (1996) L-AP4 inhibits high voltage-activated Ca²⁺ currents in pyramidal cortical neurones. *Neuroreport*. 7:421-424.
- Stefani A, Spadoni F, Bernardi G (1998a) Group III metabotropic glutamate receptor agonists modulate high voltage-activated Ca²⁺ currents in pyramidal neurons of the adult rat. *Exp Brain Res*. 119: 237-244.
- 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, et al. (1997) The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J Exp Biol* 200:401-409.
- Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science*. 274: 594-597
- Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N, Shigemoto R (2001) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience*. 106: 481-503.
- Tanabe Y., Masu M., Ishii T., Shigemoto R. y Nakanishi S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8, 169-179.
- 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.
- Tovar-y-Romo L, Tapia R. (2007) Excitotoxicity as a mechanism of motoneuron death in amyotrophic lateral sclerosis. *The neurochemistry of neuronal death*. Capit. 11. *Research Signpost*. pp 223-234. Kerala, India.
- Tovar-y-Romo LB, Tapia R (2006) Cerebral neurons of transgenic ALS mice are vulnerable to glutamate release stimulation but not to increased extracellular glutamate due to transport blockade. *Exp Neurology* 199:281-290.
- Tovar-y-Romo LB, Santa-Cruz LD, Zepeda A, Tapia R (2009) Chronic elevation of extracellular glutamate due to transport blockade is innocuous for spinal motoneurons *in vivo*. *Neurochem Int* 54:186-191.
- Tyler EC, Lovinger DM (1995) Metabotropic glutamate receptor modulation of synaptic transmission in corticostriatal co-cultures: role of calcium influx. *Neuropharmacol*. 34: 939-952.
- Tzingounis AV, Wadiche JI (2007) Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 8:935-947.
- Vanoye CG, Lossin C, Rhodes TH, Georges Jr. AL. (2006) Single-channel properties of human Nav1.1 and mechanism of channel dysfunction in SCN1A-associated epilepsy. *J Gen Physiol* 127:1-14.

-
- 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.
- Velasco A, Martinez D, Rubio F (1997) *Epilepsia, aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. Ediciones del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Departamento de Publicaciones Científicas 426 pp.
- Velasco I, Tapia R, Massieu L (1996) Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J Neurosci Res* 44:551-561.
- 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.
- Vicktory TW, Malphurus WL, Carriger ML (1995) Regulation of stimulus-dependent hippocampal acetylcholine release by okadaic acid-sensitive phosphoprotein phosphatases. *Neurosci Lett* 191:200-204.
- 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, et al. (1995) Ascorbate and glutamate release in the rat hippocampus after perforant path stimulation: a "dialysis electrode" study. *J Neurochem* 65:725-731.
- Wang L, Orser B, Brautigan D, MacDonald J (1994) Regulation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons by protein phosphatases 1 and 2A. *Nature* 369:230-232.
- Watanabe Y, Kaida Y, Fukuhara S, Takechi k, Uehara T, Kamei C (2011) Participation of metabotropic glutamate receptors in pentetrazol-induced kindled seizures. *Epilepsia* 52:140-150.
- Watkins JC (1962) The synthesis of some acidic amino acids possessing neuropharmacological activity. *J Med Pharm Chem* 91: 1187-1199.
- 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.
- Weiergräber M, Mikamp MA, Radhakrishnan K, et al. (2006) The Cav2.3 voltage-gated calcium channel in epileptogenesis-shedding new light on an enigmatic channel. *Neurosci Biobehavioral Rev* 30:1122-1144.
- Weil-Malherbe H, Krebs HA (1935) Metabolism of amino-acids: The conversion of proline into glutamic acid in kidney. *Biochem J* 29:2077-2081.
- Wenthold RJ, Roche KW (1998) The organization and regulation of non-NMDA receptors in neurons. *Prog Brain Res* 116:133-152.
- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW (1994) Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science*. 264: 107-111.
- 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.
- Winder D., Sweatt O (2001) Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2:461-474.

-
- Wittmann M, Hubert GW, Smith Y, Conn PJ (2001b) Activation of metabotropic glutamate receptor 1 inhibits glutamatergic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*. 105:881-889.
- Wu S, Wright RA, Rockey PK, Burgett SG, Arnold JS, Rosteck PR, Johnson BG, Schoepp DD, Belagaje RM (1998a) Group III human metabotropic glutamate receptors 4, 7 and 8: molecular cloning, functional expression, and comparison of pharmacological properties in RGT cells. *Mol Brain Res* 53: 88-97.
- 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.
- Yoshikatsu K, Trotti D, Nussberegger S, Hedinger MA (1997) Neurotransmitter Transporters: Structure, Function and Regulation. Ed Reith Humana press Inc. Cap 6.
- Zang WQ, Hudson PM, Sobotka TJ, Hong JS and Tilson HA (1991) Extracellular concentrations of amino acids transmitters in ventral hippocampus during and after the development of kindling. *Brain Res* 540:315-318.