

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Facultad de Medicina

**EFFECTOS DEL DÉFICIT ENERGÉTICO SOBRE LA
VULNERABILIDAD NEURONAL AL GLUTAMATO Y AL PÉPTIDO
B-AMILOIDE. IMPLICACIONES EN LA ISQUEMIA CEREBRAL Y
EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**Tesis que para obtener el título de:
Licenciada en Investigación Biomédica Básica presenta:
María de la Natividad Gómez Román**

**Directoras de tesis: Dra. Lourdes Massieu Trigo
y Dra. Clorinda Arias Álvarez**

México, D. F.

1999

271790

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
I.INTRODUCCIÓN.....	1
I.1.METABOLISMO ENERGÉTICO.....	3
I.1.1. <u>Glucólisis</u>	5
I.1.2. <u>Ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)</u>	7
I.2.ISQUEMIA CEREBRAL.....	9
I.2.1. <u>Modelos animales de isquemia cerebral</u>	10
I.2.2. <u>Daño isquémico cerebral</u>	11
I.2.3. <u>Receptores a AAE</u>	13
A. <u>Receptores AMPA/Kainato</u>	13
B. <u>Receptores NMDA</u>	14
I.2.4. <u>Transportadores de AAE</u>	15
I.2.5. <u>Excitotoxicidad</u>	18
I.2.6. <u>Isquemia cerebral <i>in vivo</i> y excitotoxicidad</u>	20
I.2.7. <u>Isquemia cerebral <i>in vitro</i> y excitotoxicidad</u>	20
I.3.ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	23
I.3.1. <u>Toxicidad del péptido β-amiloide</u>	24
I.3.2. <u>Inhibición del metabolismo energético en la EA</u>	27
I.3.3. <u>Inhibición de la succinato deshidrogenasa como modelo de muerte neuronal</u>	29
II.HIPÓTESIS.....	31
III.OBJETIVO.....	31
IV.MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
IV.1.MATERIALES.....	33
IV.2.CIRUGÍA.....	33
IV.3.HISTOLOGÍA.....	34

IV.4.PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....	35
<u>INHIBICIÓN DE LA GLUCÓLISIS CON IODOACETATO</u>	
IV.4.1.Tratamiento agudo.....	35
<i>A)Curso temporal.....</i>	<i>35</i>
<i>B)Protección con MK-801 ó vitamina E.....</i>	<i>35</i>
IV.4.2.Microdiálisis.....	35
IV.4.3.Tratamiento crónico.....	36
<i>A)Protección con MK-801.....</i>	<i>37</i>
<i>B)Protección con piruvato intraperitoneal.....</i>	<i>37</i>
<i>C)Protección con piruvato intravenoso.....</i>	<i>37</i>
IV.4.4.Iodoacetato crónico más β-amiloide	
<u>intrahipocampal.....</u>	38
<u>INHIBICIÓN DEL CICLO DE KREBS Y DE LA FOSFORILACIÓN</u>	
<u>OXIDATIVA CON 3-NITROPROPIÓNICO</u>	
IV.4.5.3-Nitropropiónico i.p. más β-amiloide	
<u>intrahipocampal.....</u>	38
V.RESULTADOS.....	40
V.1.INHIBICIÓN DE LA GLUCÓLISIS, MODELO DE	
ISQUEMIA CEREBRAL.....	40
V.1.1.Administración aguda.....	40
<i>A)Curso temporal de la lesión</i>	<i>40</i>
<i>B)Efecto protector de la vitamina E o el MK-801.....</i>	<i>42</i>
V.1.2.Microdiálisis.....	44
V.1.3.Administración crónica de IA.....	47
V.1.4.Administración aguda de PDC en ratas tratadas	
<u>crónicamente con IA.....</u>	47
V.1.5.Protección con MK-801.....	49
V.1.6.Protección con piruvato i.p.....	51
V.1.7.Protección con piruvato i.v.....	53
V.2.INHIBICIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO Y TOXICIDAD	
DEL PÉPTIDO β-AMILOIDE, MODELO DE EA.....	56

V.2.1. <u>Administración aguda del péptido β-amiloide</u> <u>25-35 en ratas tratadas crónicamente con IA.....</u>	56
V.2.2. <u>Administración aguda del péptido β-amiloide</u> <u>25-35 en ratas tratadas con 3-NP.....</u>	56
VI.DISCUSIÓN.....	61
VI.1.INHIBICIÓN DE LA GLUCÓLISIS.....	62
A)TOXICIDAD DEL GLUTAMATO	
VI.1.1. <u>Tratamiento agudo.....</u>	62
VI.1.2. <u>Microdiálisis.....</u>	63
VI.1.3. <u>Tratamiento crónico.....</u>	70
VI.1.4. <u>Neuroprotección.....</u>	72
B)TOXICIDAD DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE 25-35	
VI.1.5. <u>Tratamiento crónico.....</u>	74
VI.2.INHIBICIÓN DEL CICLO DE KREBS.....	75
VII.CONCLUSIONES.....	78
VIII.BIBLIOGRAFÍA.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NP	Ácido 3-nitropropiónico
A β	Péptido β -amiloide
AAE	Aminoácidos excitadores
AAET	Transportador de aminoácidos excitadores
AC	Adenilil ciclasas
AMC	Arteria media cerebral
AP5	2-amino-5-fosfonobutanoato/2-amino-4-fosfonobutirato
AP7	2-amino-7-fosfonoheptanoato
AMPA	Acido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
APP	Proteína precursora de amiloide
CNQX	6-ciano-7-nitro-quinoxalin-2,3-diona
CPP	Ácido 3-(2-carboxipiperazin-4-yl)-propil-1-fosfónico
DAG	Diacilglicerol
DNQX	6,7-dinitroquinoxalin-2,3-diona
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
EP	Enfermedad de Parkinson
KA	Ácido kaínico
MK-801	Dizocilpina-5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo(a,d) cicloheptano-5,10-imina
NaCN	Cianuro de sodio
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(F) quinoxalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCP	Fenciclidina/fenil-ciclohexil-piperidina
PDC	L-trans-pirrolidín-2,4-dicarboxílico
P _i	Fósforo inorgánico
PLC	Fosfolipasa C
SNC	Sistema nervioso central
β 25-35	Péptido β -amiloide 25-35
TCA	Ciclo del ácido cítrico
TTX	Tetrodotoxina
[X]	Concentración de la sustancia X

RESUMEN

El cerebro depende del suministro de la glucosa y el oxígeno para su funcionamiento. Al darse cambios agudos en la disponibilidad de la glucosa y del oxígeno, se desarrolla un compromiso metabólico que puede aumentar la susceptibilidad neuronal a la muerte.

En el caso de la isquemia cerebral, al disminuir el flujo sanguíneo a una zona del cerebro, se produce un déficit en el metabolismo energético de la misma, además de observarse un incremento considerable en la concentración extracelular de glutamato. Ésto da lugar a la muerte neuronal que se desarrolla de 24 a 72 horas después del período isquémico. El daño celular isquémico se puede proteger administrando antagonistas de los receptores a glutamato como el MK-801.

En el caso de la enfermedad de Alzheimer, se ha observado una variedad de anormalidades en el metabolismo energético, lo que hace suponer que las neuronas se encuentran en un estrés energético. Además, en esta enfermedad se ha observado la acumulación en el espacio extracelular del péptido β -amiloide. En vista de lo anterior, puede ser posible que las neuronas cuyo metabolismo energético está disminuído, se encuentren más susceptibles, y su exposición a este péptido produzca muerte neuronal.

En el presente trabajo, se estudió la participación de la glucólisis en la muerte neuronal producida por la inhibición de la recaptura de glutamato y en la toxicidad del péptido β -amiloide; y el papel del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria en la toxicidad del péptido β -amiloide, en la rata *in vivo*. Para ésto, se utilizó un inhibidor de la glucólisis, iodoacetato (IA) y un inhibidor del ciclo de Krebs y de la cadena transportadora de electrones, el ácido 3-nitropropiónico (3-NP).

El IA se utilizó tanto en forma aguda (inyección intrahipocampal) como crónica

(inyección intraperitoneal durante 4 días). En el grupo crónico, se administró al cuarto día del tratamiento, el pirrolidín-2,4-dicarboxilato (PDC), inhibidor de los transportadores de glutamato; ó el péptido β -amiloide 25-35, en el hipocampo de la rata. Se estudió también por microdiálisis, el efecto del IA sobre la acumulación de glutamato y aspartato extracelular en presencia y ausencia de PDC. El 3-NP se inyectó intraperitonealmente y cuatro horas después se inyectó en el hipocampo de la rata el péptido β -amiloide 25-35.

En base a lo anterior, se observó lo siguiente: (1)El IA produce daño desde la primera hora de inyección intrahipocampal de 50nmolas/ μ l, el cual no se protege con el antagonista del receptor NMDA (MK-801) o con el antioxidante α -tocoferol; (2)La administración del IA en el hipocampo de la rata produce una elevación en la concentración extracelular de glutamato y especialmente de aspartato; y al administrarlo junto con PDC, hay una elevación mucho mayor; (3)La inhibición del transporte de glutamato produce una elevación importante de los niveles extracelulares de glutamato y aspartato, mas no produce muerte neuronal; sin embargo, en ratas energéticamente deficientes (que recibieron tratamiento crónico de IA), sí la produce; (4)La inhibición crónica de la glucólisis, no incrementa la toxicidad del péptido β -amiloide inyectado en el hipocampo de la rata; (5)La inhibición sistémica del ciclo de Krebs y de la cadena transportadora de electrones por 3-NP exacerba la toxicidad del péptido β -amiloide inyectado en el hipocampo de la rata.

En conclusión el estado energético de las células incrementa la susceptibilidad neuronal a la muerte. La inhibición de la glucólisis incrementa la toxicidad del glutamato, mas no tiene ningún efecto sobre la toxicidad del péptido β -amiloide; mientras que la inhibición del ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones sí incrementa la toxicidad de este péptido.

I. INTRODUCCIÓN

Los tipos celulares que conforman al sistema nervioso central son las neuronas, las células gliales y las células del endotelio. Las neuronas son las células encargadas de la comunicación, procesamiento y mantenimiento de la información en el organismo. Estas células dependen del suministro de oxígeno y de la glucosa como fuente primaria de carbono para la obtención de energía, aunque también los cuerpos cetónicos pueden proveer una fuente limitada de energía principalmente en condiciones de desequilibrio metabólico crónico. El trabajo cerebral (la utilización de la energía) está perfectamente acoplado al metabolismo oxidativo (producción de la energía) siempre y cuando exista el suministro de glucosa y oxígeno, y de que la remoción de los productos metabólicos terminales sea continua. Cuando el suministro de glucosa o de oxígeno es interrumpido, se genera una falla energética causada por la falta de agentes reductores y del ATP. En este caso, el tejido utiliza reservas de unidades glucosídicas obtenidas del desdoblamiento de glucógeno existente en el tejido, sin embargo, este sustrato para el metabolismo oxidativo sólo se puede mantener aproximadamente 10 minutos. El cerebro también puede utilizar en estos casos cuerpos cetónicos, si se encuentran disponibles, como sustrato para el metabolismo oxidativo (Hawkins et. al., 1986). Cambios extremos agudos en la disponibilidad de la glucosa alteran la función neuronal, por alteraciones en el metabolismo energético (Bryan et. al., 1986, Duckrow and Bryan 1987). Por otro lado, la falta total de oxígeno rápidamente causa la falla energética del tejido al paralizar la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa. En este caso, en presencia de glucosa, la producción de ATP continuará por vías anaeróbicas, con la producción final de lactato, acidificando el medio (LaManna et. al., 1987). Sin embargo esta vía es insuficiente para mantener las demandas metabólicas del tejido

nervioso desarrollándose rápidamente una situación de compromiso metabólico.

En algunas enfermedades neurológicas se pueden observar déficits en el metabolismo energético. El más obvio es la isquemia cerebral, aunque también hay cambios notables en enfermedades neurodegenerativas crónicas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Huntington (EH) (Bowling y Beal, 1995; Greene y Greenamyre, 1996).

Durante la isquemia cerebral, la inhibición del metabolismo es dramática y profunda. En la hipoxia o la isquemia cerebral ocurre una deficiencia importante de glucosa y oxígeno. La ausencia de oxígeno remueve el aceptor final de electrones causando que la cadena respiratoria falle (Globus et. al., 1988). De igual manera cuando la glucosa no se encuentra disponible causa la misma secuela de eventos antes mencionados (Wieloch et. al., 1984). La inhibición del metabolismo asociada a enfermedades neurodegenerativas es más sutil, pero existe mucha evidencia que apoya su existencia (Green y Greenamyre, 1996; Bowling y Beal 1995). Además, la función metabólica disminuye con la edad (Bowling y Beal 1995), posiblemente debido al daño oxidativo del ADN mitocondrial asociado a ésta (Beal, 1995).

En la EA, se han observado una variedad de anormalidades metabólicas. En biopsias de pacientes con EA se ha encontrado un incremento en la producción de CO₂, sin un aumento de la carga energética celular, sugiriendo un desacoplamiento parcial del metabolismo (Sims et. al., 1983). Lo anterior se apoya por estudios como la tomografía de emisión de positrones en donde se demuestra una disminución en la utilización de la glucosa en varias zonas del cerebro en este padecimiento (Haxby et. al., 1986). Por otra parte se han reportado defectos en muchas enzimas específicas del metabolismo energético en cerebros de pacientes con EA. Ésto es, enzimas que participan en la glucólisis (Sorbi et. al., 1990; y Gibson et. al., 1988), en el ciclo de Krebs (Sorbi et. al., 1983; Sheu et. al., 1985; Gibson et. al., 1988; Mastrogiacomo et.

al., 1993) y en la cadena transportadora de electrones (Parker, et. al., 1994; Schapira, 1996; Beal et. al., 1994; Schägger y George, 1994). En estudios *in vitro*, la inhibición metabólica causa el incremento en la expresión de antígenos relacionados a la EA como el ALZ-50, el 5E2 y la ubiquitina (Blass et. al., 1990; Cheng y Mattson, 1992).

Los antecedentes anteriores demuestran que existe una estrecha relación entre la susceptibilidad a la muerte neuronal y la inhibición del metabolismo energético. En este contexto, el objetivo de la presente tesis es estudiar la participación de la inhibición del metabolismo energético en la susceptibilidad a la muerte neuronal producida por dos agentes tóxicos: el glutamato, implicado en la isquemia cerebral; y el péptido β -amiloide, implicado en la enfermedad de Alzheimer.

I.1.METABOLISMO ENERGÉTICO

Como se mencionó anteriormente, el cerebro depende directamente del metabolismo de la glucosa para realizar sus funciones. Se han definido dos categorías principales para la utilización de la energía en este tejido. La primera se refiere a las vías catabólicas y anabólicas para el mantenimiento homeostático celular, en donde se utiliza la energía para el mantenimiento de la integridad celular, morfológica y funcional como por ejemplo, en vías metabólicas de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleícos. En este trabajo se utiliza cerca de la mitad de la energía que se produce en el cerebro en reposo. La segunda categoría de utilización de energía en el cerebro es en la función especializada. Esta función se refiere a la recepción, transmisión y almacenamiento de la información en las neuronas; mientras que en las células gliales y endoteliales se refiere al mantenimiento del medio interno y externo permitiendo a las neuronas realizar sus funciones. Este trabajo especializado viene

siendo en buena medida, trabajo iónico que incluye el transporte axonal y mantenimiento de los gradientes iónicos siendo la función que más consume energía. El sistema de transporte iónico responsable de la mayor utilización de energía en el cerebro es la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Bazan et. al., 1992). La distribución asimétrica de ciertos iones depende tanto de bombas que utilizan ATP como de sistemas que utilizan la energía del gradiente de sodio. Otras funciones que consumen una cantidad importante de energía incluyen la síntesis y recaptura de transmisores y en la fosforilación, defosforilación y degradación de ciertas proteínas. La actividad neuronal está acoplada al metabolismo: la excitación neuronal causa el eflujo de K^+ ; el cual es transportado por la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, para restaurar su gradiente, y por lo tanto el potencial de membrana. El ATP es utilizado (hidrolizado) por la bomba al transportarse el potasio, y en esta reacción se produce ADP, lo que causa que la cadena oxidativa acelere su velocidad, promoviendo el consumo de oxígeno y de sustrato para la refosforilación del ADP (Fig. 1). Como

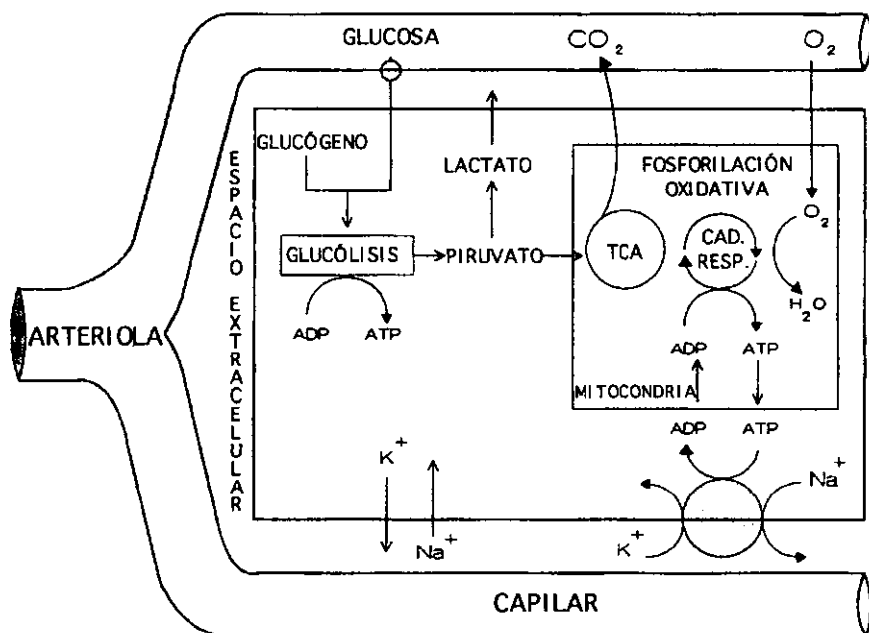


Fig. 1. Esquema de la homeostasis energética en el cerebro. El rectángulo mayor representa el compartimento intracelular compuesto de glía y neuronas, las cuales son suministradas por los capilares. Los dos compartimentos principales son el citoplasma y la mitocondria. Ver el texto para discusión de los procesos dinámicos del metabolismo, flujo sanguíneo y función. Tomado de Bazan et. al., 1992.

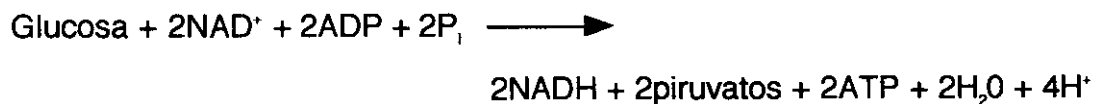
resultado de estas reacciones, la célula utiliza la energía resultante de la oxidación de coenzimas reducidas que se generan durante la oxidación de la glucosa en la glucólisis y en el ciclo de Krebs.

1.1.1. Glucólisis

Los animales dependen del metabolismo de la hexosa, glucosa, para obtener su energía. La glucosa se obtiene a partir de la descomposición de polisacáridos más grandes presentes en la dieta de los animales o de la degradación del glucógeno. El cerebro, depende esencialmente de la glucosa para poder generar su energía siendo el carbohidrato que se utiliza preferentemente y que fácilmente puede cruzar la barrera hematoencefálica por un mecanismo independiente de insulina. La glucosa es interiorizada al citosol de las células por un acarreador específico de la glucosa y es fosforilada inmediatamente por la hexocinasa a glucosa-6-fosfato. Las enzimas de la glucólisis se encuentran localizadas en el citosol, sin estar unidas a membranas, ni formando complejos entre ellas (Fig. 2).

- ◊ Etapa I (Reacciones 1-5). Es una etapa preparatoria en la que la glucosa es fosforilada utilizando dos moléculas de ATP y es desdoblada en dos moléculas de 3 carbonos cada una: gliceraldehído-3-fosfato.
- ◊ Etapa II (Reacciones 6-10). Las dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato son convertidas a piruvato con la generación de cuatro moléculas de ATP.

En si la reacción de la glucólisis se puede describir de la siguiente manera:



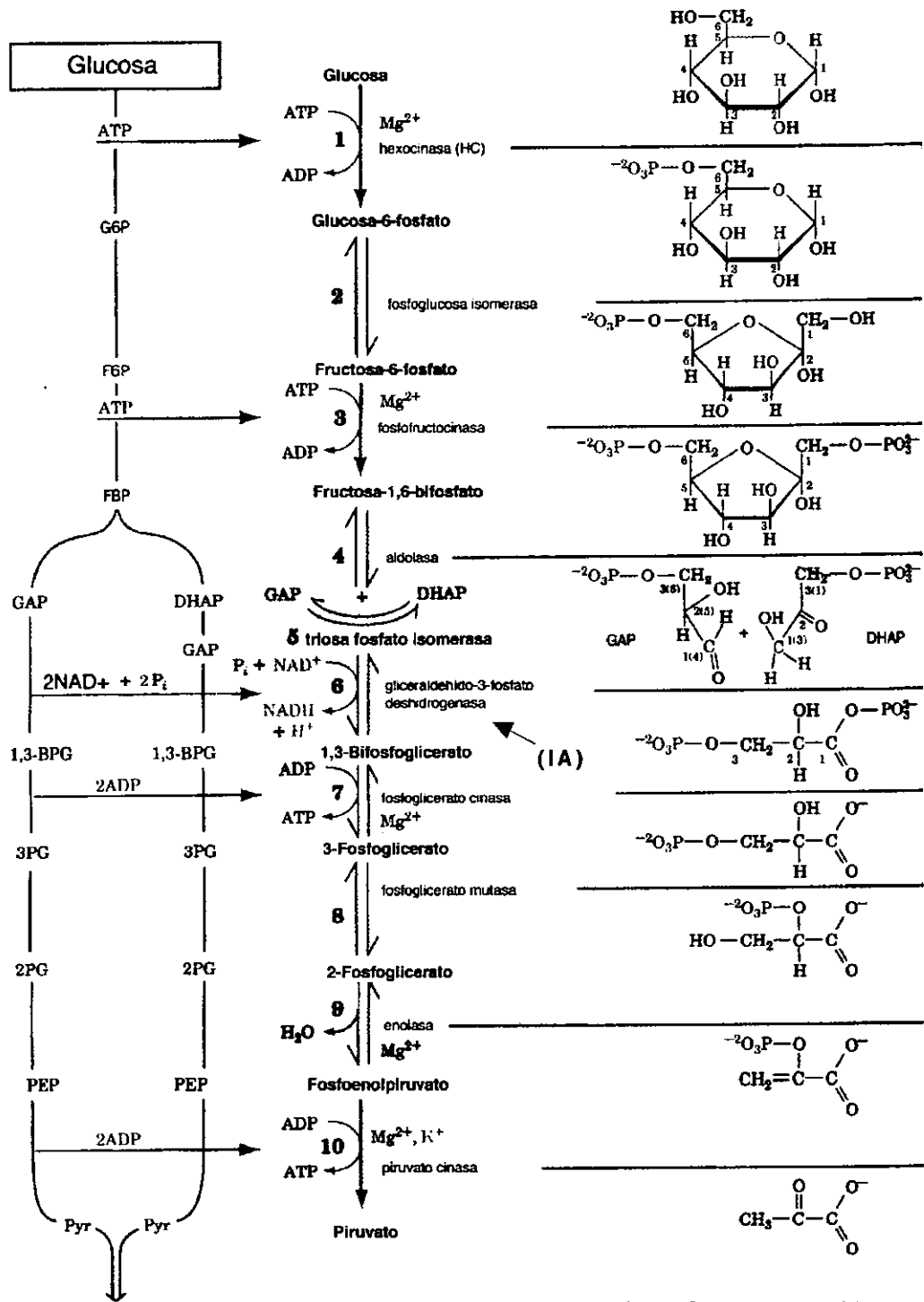
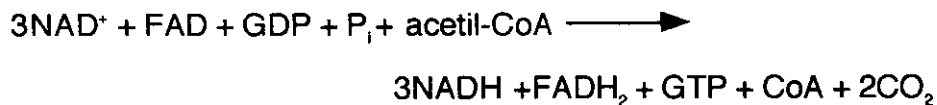


Fig. 2. Degradación de la glucosa por la vía glucolítica o glucólisis. Se puede considerar que ocurre en dos etapas. Etapa I consiste en la fosforilación y ruptura de la glucosa formando 2 moléculas de gliceraldehído-3-fosfato y utilizando 2 moléculas de ATP. Etapa II consiste en la conversión del gliceraldehído-3-fosfato a piruvato con la generación de 4 moléculas de ATP. El compuesto entre paréntesis es el iodoacetato, inhibidor irreversible de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Tomado del Voet/Voet, 1995, 1995.

I.1.2.Ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)

El ciclo del ácido tricarboxílico, también conocido como ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico, es el encargado de la mayor parte de la degradación oxidativa de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, además de generar numerosos precursores biosintéticos, siendo por lo tanto anfibólico (opera tanto catabólicamente como anabólicamente). El compuesto de inicio del ciclo es la acetil-coenzima A (acetil-CoA), la cuál es un producto común del catabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. La coenzima A funciona como un acarreador de grupos acetilos y otros grupos acilos. El producto final de la glucólisis, el piruvato, es el precursor inmediato de la acetil-CoA. Este precursor es transportado al interior de la mitocondria en condiciones aeróbicas por un cotransportador de piruvato-H⁺ específico, donde es oxidado por un complejo multienzimático llamado piruvato deshidrogenasa, a acetil-CoA. Las enzimas del ciclo de Krebs se localizan en la mitocondria. Las ocho enzimas del ciclo del ácido cítrico, catalizan una serie de reacciones que oxidan el grupo acetil a dos moléculas de CO₂ con la concomitante generación de tres moléculas de NADH (dinucleótido de nicotina adenina reducido), una molécula de FADH₂ (dinucleótido de flavina adenina reducido) y una molécula de GTP (trifosfato de guanosina). El ciclo del ácido cítrico se puede observar en la figura 3. La reacción total del ciclo es la siguiente:



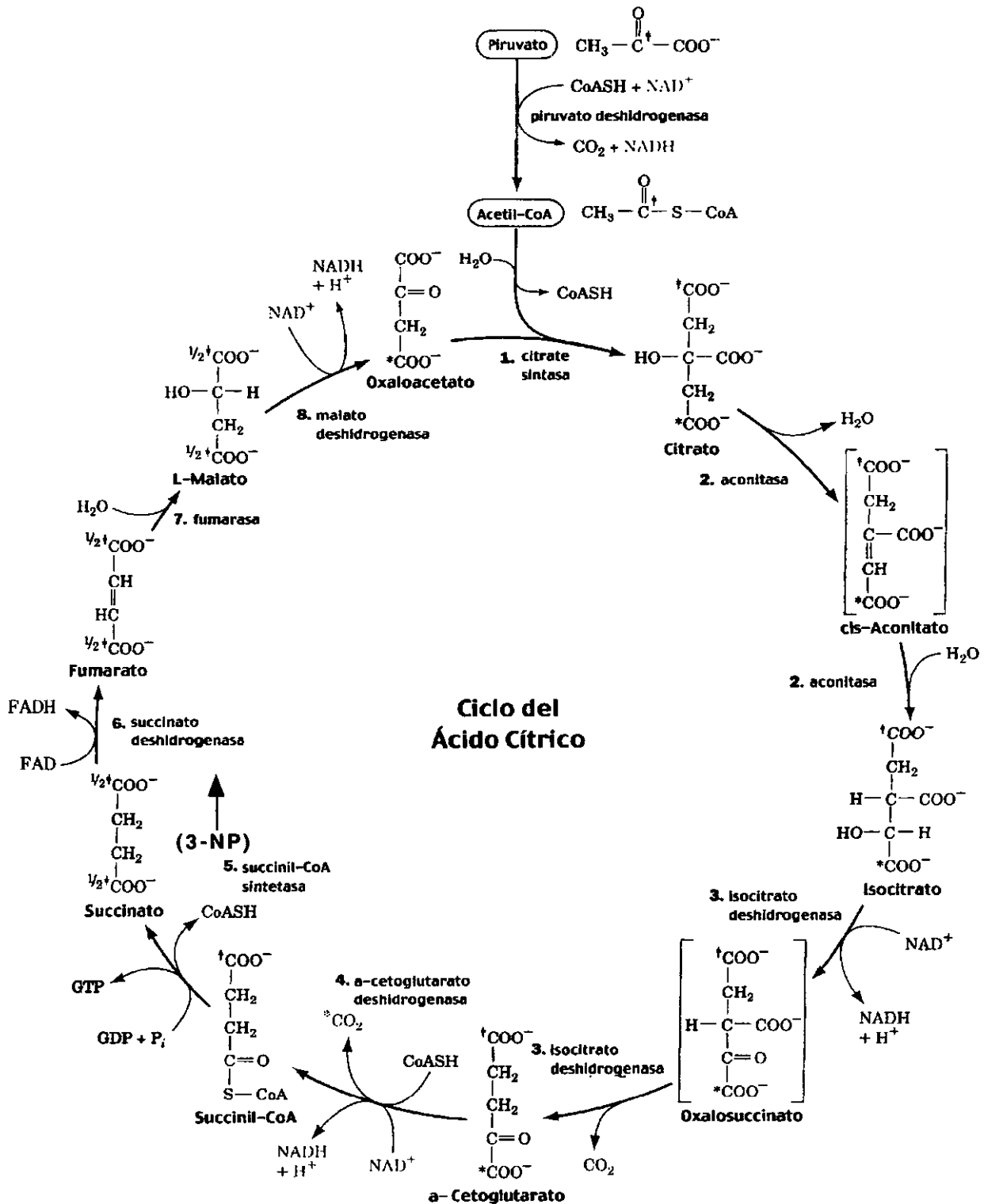


Fig. 3. Las reacciones del ciclo del ácido cítrico. La reacción de piruvato a acetil-CoA suplementa al ciclo de sustrato vía el metabolismo de carbohidratos, pero no es considerado como parte del ciclo. Los compuestos entre corchetes son intermediarios unidos a enzima. El asterisco indica el carbono que se libera en forma de CO₂. El compuesto entre paréntesis es el ácido 3-nitropropiónico, inhibidor irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa señalada con una flecha. Tomado de Voet/Voet.

I.2.ISQUEMIA CEREBRAL

El daño isquémico al sistema nervioso central ocurre como consecuencia de varias condiciones clínicas como el accidente cerebrovascular, el trauma cerebral, ataques epilépticos prolongados, paro cardíaco e hipoxia perinatal. El impacto de la isquemia cerebral puede ser claramente observado en la frecuencia del accidente cerebrovascular. El accidente cerebrovascular es considerado como el desorden neurológico que pone en mayor riesgo la vida del individuo, después del cáncer y las enfermedades cardiovasculares, siendo la tercera causa de muerte en Europa Occidental y en E.E.U.U. (Dietrich, 1998); además de ser la causa principal de incapacidad en la población adulta y representa una fuerte inversión anual en la recuperación de los sobrevivientes (Dietrich, 1998). La incidencia incrementa con la edad y es generalmente más alta entre los hombres que en las mujeres (Dietrich, 1998). El accidente cerebrovascular se describe como una pérdida rápida de la función cerebral causada por el bloqueo o la ruptura de un vaso sanguíneo y por tanto el decremento de la entrada de sangre al cerebro. Se caracteriza por la pérdida del control muscular, la disminución o pérdida de los sentidos y de la consciencia, y otros síntomas que varían según el tamaño, severidad y localización de la lesión.

El daño cerebral isquémico focal resulta de una reducción del flujo sanguíneo a un área discreta del cerebro. El origen del episodio isquémico puede ser oclusivo, causado por una trombosis arterial (e.g. arterioesclerosis), ó embólico, causado por un coágulo o agente extraño que viaja a través del vaso sanguíneo hasta taponarlo. También se puede dar una isquemia global al disminuir el flujo sanguíneo en todo el cerebro debido a un paro cardíaco. El origen más frecuente del episodio isquémico es el oclusivo, comprendiendo cerca del 80% de los casos de accidentes cerebrovasculares. Además, el 20% de los accidentes cerebrovasculares son

hemorrágicos, pudiendo presentarse hemorragia al espacio subaracnoideo o a la sustancia cerebral misma (Meldrum, 1991). No importando cuál sea la causa primaria, las consecuencias últimas de la reducción sostenida del flujo sanguíneo cerebral son las mismas: daño irreversible a las neuronas.

I.2.1. Modelos animales de isquemia cerebral

Para poder investigar la fisiopatología y el tratamiento de la isquemia cerebral, se han desarrollado varios modelos animales. Aunque estos modelos no simulan exactamente las condiciones clínicas de una isquemia cerebral, han resultado ser bastante útiles para el estudio de la isquemia y casi todo lo que se conoce hasta el momento es gracias a éstos. Además, en estos modelos se pueden estudiar agentes terapéuticos novedosos que pueden tener uso clínico.

Algunos modelos simulan el paro cardíaco o condiciones hemodinámicas que resultan de hipotensión sistémica, en donde el flujo sanguíneo es reducido severamente en muchas áreas del cerebro (modelo de isquemia global transitoria) produciéndose la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes (para revisión Dietrich, 1998). En este tipo de modelos, se observa un daño difuso, con muerte neuronal retrasada (se explicará posteriormente) en zonas selectivamente vulnerables que incluyen las neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo, neuronas de la corteza cerebral y las del estriado dorsolateral.

Otros modelos reducen el flujo sanguíneo tanto severamente como moderadamente, como ocurre en el accidente cerebrovascular (modelos de isquemia focal cerebral) y son los más indicados en relación al estudio de los accidentes cerebrovasculares. En éste se produce la oclusión permanente o transitoria de la arteria cerebral media (ACM). Han sido muy utilizados en el desarrollo de drogas anti-isquémicas ya que las lesiones que producen son muy constantes (para revisión Dietrich, 1998).

La isquemia cerebral a veces se asocia a procesos trombóticos por lo que se ha desarrollado un modelo que simula la isquemia trombótica conocido como modelo de trombosis cerebral fotoquímica (Watson, 1995). Además, se han desarrollado varios modelos en los que se produce una embolia cerebral para conocer los mecanismos tromboembólicos en un proceso isquémico (Dietrich, 1998).

Recientemente se han desarrollado modelos bioquímicos en los que se inhibe tanto la glucólisis como la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa. Sin embargo, la mayoría de estos modelos todavía no se han desarrollado *in vivo*, sólo en cultivos celulares o en rebanadas cerebrales de rata (Reiner et. al., 1990). Estos modelos son especialmente importantes ya que los modelos *in vivo*, aunque se acercan más a las condiciones fisiológicas de los pacientes, resulta difícil controlar todas las variables. Por lo tanto, los modelos bioquímicos son una herramienta útil para descifrar los mecanismos que llevan al daño neuronal isquémico.

1.2.2. Daño Isquémico cerebral

La fisiopatología de la isquemia cerebral incluye cambios en la actividad eléctrica, pH extracelular, temperatura, volumen celular, volumen del espacio intersticial, osmolaridad, metabolismo energético, liberación de neurotransmisores y composición iónica. En un daño isquémico existe daño primario y secundario, siendo ambos igual de importantes. Las manifestaciones más importantes del daño primario son:

1. Destrucción irremediable del tejido nervioso causando necrosis en el sitio de la isquemia focal. A este tejido se le conoce como centro isquémico.
2. Ruptura de los vasos sanguíneos causando el sangrado epidural, subdural o intracerebral.
3. Desgarramiento y rompimiento de las fibras nerviosas de la materia blanca.

Estas lesiones primarias producen un incremento en el contenido de agua del

cerebro (edema cerebral). Este edema se desarrolla alrededor del tejido isquémico necrótico (centro isquémico) y es considerado como la manifestación principal del daño secundario. Al tejido donde se desarrolla el edema, se le conoce como la zona de penumbra siendo el área que rodea al centro isquémico (Symon, 1986). Esta zona recibe flujo sanguíneo residual de vasos colaterales; y aunque el flujo es demasiado bajo para mantener la actividad funcional, está por encima del umbral que causa la muerte del tejido. Además, se ha observado que se incrementa la concentración de K^+ extracelular y que disminuye la de Na^+ (Bazan et. al., 1992) y se puede proteger con antagonistas del receptor de glutamato tipo NMDA (Duverger et. al., 1987, Park et. al., 1988).

Otro fenómeno secundario a la isquemia cerebral es la muerte neuronal retrasada en áreas selectivamente vulnerables del cerebro. Desde los años 40s hasta los 80s, la muerte inducida por isquemia era atribuída únicamente a la falla energética: al fallar el metabolismo energético los sistemas dependientes de energía que mantienen la homeostasis celular dejan de funcionar y causan una pérdida de la homeostasis y muerte celular (Hara et. al., 1993). Este tipo de muerte se conoce como "muerte por falla energética" y es la que se da en el centro isquémico. Sin embargo, en 1975, Ito observó que además de la muerte inmediata por falla energética, ocurría muerte neuronal horas o hasta días después de un episodio isquémico breve, llamándole "muerte neuronal retrasada". Este tipo de muerte se debe a un proceso lento progresivo en un grupo específico de neuronas, en presencia de flujo sanguíneo cerebral normal, metabolismo energético normal y homeostasis normal de Na^+ , K^+ y agua. Al parecer este daño secundario resulta, en parte, por la acción de factores endógenos bioquímicos que son activados, sintetizados o liberados en respuesta de la isquemia. Algunos de estos posibles factores incluyen a las fosfolipasas, productos de la hidrólisis de lípidos de membrana, eicosanoides, radicales de oxígeno, metales

catiónicos mono y divalentes, péptidos opioides, y aminoácidos excitadores (para revisión Bazan et. al., 1992 y Hara et. al., 1993). Al parecer, existen fuertes evidencias de que el daño en la isquemia es causado por mecanismos dependientes de la neurotoxicidad del glutamato (excitotoxicidad). Por lo anterior, es pertinente explicar como se puede dar este daño excitotóxico.

1.2.3.Receptores a AAE

Los aminoácidos acídicos L-glutamato y L-aspartato son considerados los neurotransmisores excitadores predominantes en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. Las vías glutamatérgicas principales incluyen a las vías hipocampales (intrínsecas, aferentes y eferentes), las aferentes cerebelares y las fibras paralelas (de las células granulares provenientes del cerebelo), las fibras corticocorticales de asociación que incluyen la fibras corticofugales que proyectan al estriado, bulbo raquídeo y espina dorsal (Greenamyre y Porter, 1994; Greene y Greenamyre, 1996).

Existen dos categorías principales de los receptores a AAE: los receptores formadores de canales catiónicos o ionotrópicos; y los receptores metabotrópicos, que están acoplados a proteínas G y causan la activación de la fosfolipasa C (PLC), la inhibición de adenil ciclasas (AC) o el metabolismo de ácido araquidónico. Dentro de los receptores ionotrópicos, existen tres subtipos: el receptor NMDA y los receptores AMPA/kainato. Existe un tercer tipo de receptor a glutamato, llamado L-AP4, que es el nombre del antagonista que actúa sobre el mismo. Este receptor al parecer bloquea la transmisión sináptica de una manera independiente a la de los receptores a AAE antes mencionados. Pueden ser tanto postsinápticos como presinápticos (Meldrum, 1991). A continuación se describirán los receptores ionotrópicos:

A.Receptores AMPA/Kainato

Los receptores para el ácido kaínico (KA) y el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) reciben el nombre de los agonistas que los activan y se cree que son mediadores principales de la neurotransmisión excitadora rápida en el SNC. Estos canales son dependientes del agonista, activándose al unirse el mismo, y se desensibilizan rápidamente. Los canales que forman son permeables a Na^+ y K^+ . Sin embargo, existen receptores AMPA que tienen canales permeables a Ca^{2+} , los cuales se han observado en cultivos primarios de neuronas hipocámpales, en células bipolares de la retina, en células no piramidales de la corteza cerebral y en células gliales de Bergman del cerebelo (Michaelis, 1997). Estos canales son bloqueados competitivamente por una serie de quinoxalin-2,3-dionas como la 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona (CNQX), la 6,7-dinitroquinoxalin-2,3-diona (DNQX) y la 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F) quinoxalina (NBQX) (Greene y Greenamyre, 1996). La CNQX y la DNQX también inhiben los receptores a NMDA de una manera no competitiva (Michaelis, 1997).

B. Receptores NMDA

Los receptores NMDA no son mediadores de la transmisión sináptica rápida, ya que responden mucho más lento que los receptores AMPA/KA y contribuyen principalmente al componente lento de las corrientes postsinápticas excitadoras (Michaelis, 1997). La farmacología y fisiología de este receptor es muy compleja. El canal iónico de estos receptores presenta una conductancia muy alta (50pS) y es muy permeable al ión Ca^{2+} ; al parecer, se desensibiliza muy lentamente. También es permeable a K^+ y Na^+ , y tiene mayor afinidad al glutamato que los otros receptores.

Presenta sitios de unión para glutamato y glicina que necesitan estar ocupados ambos al mismo tiempo para que el receptor pueda activarse; por tal razón, el glutamato y la glicina han recibido el nombre de co-agonistas. Además, presenta varios sitios de modulación. La unión de poliaminas, como la espermina o la

espermidina, pueden incrementar la respuesta de los receptores a NMDA (Williams et. al., 1991). El zinc también se une al receptor inhibiendo su actividad de una manera poco conocida. También los protones y el pH extracelular bajo son potentes inhibidores de este receptor (Greene y Greenamyre, 1996).

La respuesta lenta de estos receptores se cree que está dada por las propiedades intrínsecas del canal, ya que en condiciones de reposo, se encuentra bloqueado por Mg^{2+} presente en el ambiente extracelular de las neuronas y este bloqueo sólo se quita por despolarización membranar. Por lo anterior, el receptor a NMDA es dependiente de voltaje además de ser dependiente de la unión del agonista para su activación (Nowak et. al., 1984). Al parecer, en una sinapsis, el glutamato liberado al espacio sináptico causa la activación rápida de los receptores AMPA/KA, despolarizando la membrana postsináptica y permitiendo la liberación del bloqueo por Mg^{2+} del canal, activándose en presencia de glutamato (Michaelis, 1997).

Los antagonistas selectivos del receptor a NMDA caen dentro de cuatro categorías: los antagonistas fosfonoaminados que compiten por los sitios de reconocimiento de L-glutamato y NMDA (e.g. 2-AP5, 2-AP7 y CPP); los que bloquean los sitios de unión para glicina (e.g. ácido 5,7-diCl-kinurénico); los que inhiben el aumento alostérico de la activación por agonistas causado por las poliaminas (e.g. ifenprodil); y los que inhiben el canal iónico (MK-801, PCP y cetamina).

I.2.4. Transportadores de AAE

Como se ha explicado anteriormente, los aminoácidos excitadores (AAE), glutamato y aspartato, actúan en el SNC como neurotransmisores. El glutamato es liberado de pozas presinápticas de forma vesicular y no vesicular. La liberación vesicular se da por la entrada de calcio a la terminal presináptica causando la fusión de las vesículas que contienen neurotransmisor a la membrana plasmática, liberándose glutamato al

espacio sináptico. La liberación no vesicular está mediada por el cambio de dirección en el funcionamiento de los transportadores de glutamato, causado por despolarización de la membrana (Nicholls, 1989). Aparentemente, este tipo de liberación es la responsable del incremento en la [glutamato]_e que se observa durante la isquemia cerebral o durante la inhibición metabólica (Drejer et. al., 1985). El glutamato también puede ser liberado como osmolito por hinchamiento celular o como consecuencia de la ruptura de las membranas plasmáticas (Meldrum, 1991).

La transmisión glutamatérgica termina por la remoción del glutamato al ser recapturado por transportadores de alta afinidad a glutamato dependientes de sodio (AAET). Estos transportadores son capaces de translocar el neurotransmisor en contra de su gradiente de concentración manteniendo la concentración extracelular de glutamato a un nivel bajo ($<1\mu\text{M}$) (Gegelashvili y Schousboe, 1997).

Los transportadores de glutamato transportan L-glutamato, D-aspartato y L-aspartato y algunos otros aminoácidos acídicos como el treon- β -hidroxiaspartato y el cisteato. Se encuentran tanto en neuronas como en células gliales. Existen 5 tipos de transportadores de glutamato: AAET1 a AAET5. Cuando se expresan en ovocitos, el transportador AAET4 presenta la mayor afinidad a glutamato, con una K_m de $2-3\mu\text{M}$ para L-glutamato, D-aspartato y el análogo ácido L-trans-pirrolidín-2,4-dicarboxílico (PDC), el cual es inhibidor competitivo sustrato y provoca el heterointercambio por glutamato (Volterra et. al., 1996). Las otras isoformas tienen valores de K_m a glutamato en el rango entre 10 y $64\mu\text{M}$ (Palacín et. al., 1998). El AAET1 ó GLAST y el AAET2 ó GLT-1 están presentes en las células gliales; mientras que el AAET3 ó AAEC y el AAET4 ó AAET están en las neuronas. El AAET5 fue encontrado recientemente en células de la retina. Estos transportadores comparten 50-55% de identidad en su secuencia (Palacín et. al., 1998).

Para que se dé el transporte de glutamato en contra de su gradiente de

concentración, los transportadores utilizan la energía libre almacenada de los gradientes electroquímicos de los iones inorgánicos y es electrogénico. Se ha propuesto que el transporte de glutamato está acoplado al cotransporte de dos iones Na^+ y el contra-transporte de un ión K^+ y un OH^- . Sin embargo, evidencias recientes apuntan a un modelo en el que un H^+ es cotransportado en lugar del contra-transporte del OH^- ; además de ser tres y no dos iones de Na^+ los que son cotransportados por cada molécula de glutamato (Kanai, 1997). Como se mencionó antes, este transporte utiliza la energía del gradiente Na^+ y K^+ ; el cual es mantenido por la bomba Na^+/K^+ -ATPasa. Cuando disminuye la [ATP] al inhibirse el metabolismo energético, esta bomba deja de funcionar, eliminándose los gradientes de Na^+ y K^+ . Al no existir el gradiente, los transportadores de glutamato dejan de funcionar o cambian la dirección de su transporte, sacando glutamato en lugar de interiorizarlo a la célula, incrementándose así su concentración extracelular (Drejer et. al., 1985).

Por lo anterior, los transportadores de glutamato protegen a las neuronas de la excitotoxicidad del glutamato, manteniendo las concentraciones extracelulares de este aminoácido bajas. Rothstein et. al. (1994), observaron que al aplicar oligonucleótidos antisentido al ARNm de los transportadores gliales, las neuronas se mueren, mas la neurodegeneración no se observa al bloquear los transportadores neuronales. Experimentos posteriores demostraron que los transportadores que regulan la concentración extracelular de glutamato son los gliales (Kanai, 1997).

Estos transportadores son inhibidos por: radicales de oxígeno (el peroxinitrito y el peróxido de hidrógeno), ácido araquidónico, factor de necrosis tumoral α y péptido β -amiloide. Por otra parte, su expresión genética es regulada tanto espacialmente como temporalmente: el glutamato o sistemas glutamatérgicos funcionales estimulan la expresión de estos transportadores, ya que al deaferentar la entrada glutamatérgica o en ausencia de glutamato, se dejan de expresar (Kanai, 1997).

I.2.5.Excitotoxicidad

Desde 1957, Lucas y Newhouse demostraron que la exposición prolongada a glutamato causaba la muerte de las neuronas en la retina y de otras regiones del cerebro (Olney, 1988). Después en 1971, Olney demostró que esta neurotoxicidad del glutamato en el cerebro también se producía por la administración sistémica de glutamato o sus análogos (Meldrum, 1991) y esta toxicidad es postsináptica, dañándose membranas de las dendritas en donde los receptores de glutamato se encuentran localizados (Olney, 1988). Este daño puede ser bloqueado por antagonistas de los receptores a AAE. En base a la capacidad del glutamato y sus análogos de despolarizar a las neuronas y a la correlación entre las propiedades tóxicas y excitadoras de éstos, se propuso que la neurotoxicidad del glutamato es mediada por un mecanismo excitador, recibiendo el nombre de excitotoxicidad. La estimulación excesiva de los tres subtipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos y de los metabotrópicos pueden llevar a la muerte excitotóxica (Greene y Greenamyre, 1996). Estudios *in vitro* en cultivos primarios de neuronas o preparaciones de rebanadas cerebrales han generado hipótesis específicas que describen los mecanismos de la excitotoxicidad. Al parecer, existen por lo menos dos formas de muerte excitotóxica celular. Una forma se da por la exposición de altas concentraciones de excitotoxinas (mM) (glutamato, NMDA, kainato o quisqualato), induciendo la rápida entrada de Na^+ y Cl^- , acarreando agua al interior celular y provocando el hinchamiento y muerte neuronal a los 5-30 min. (Rothman, 1985; Choi, 1987). Otra se da por la exposición de bajas concentraciones de excitotoxinas (μM), produciéndose una entrada de Ca^{2+} , induciéndose una muerte neuronal lenta. El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tiene múltiples consecuencias que incluyen la activación de proteinasas y fosfolipasas A y C, la formación de óxido nítrico (NO) y el incremento en la peroxidación lipídica (Bazan et. al., 1992). Además, puede causar la disfunción

mitocondrial, resultando en la formación de radicales libres, la incapacidad de mantener la homeostasis del calcio y una disminución en la producción de energía (Garthwaite y Garthwaite, 1986; Choi, 1987). Al parecer, la muerte neuronal retrasada que se observa en la isquemia es dependiente del incremento en la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]$). Este incremento puede estar dado por la activación del receptor NMDA, por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje causada por la despolarización de la membrana al entrar Na^+ a través de los receptores AMPA/KA o por la liberación del Ca^{2+} de pozas intracelulares (Meldrum, 1991).

Sin embargo, experimentos en el laboratorio han demostrado que la elevación *in vivo* del glutamato extracelular por si sola no es suficiente para causar daño neuronal, por lo que deben de existir otros factores que provocan la muerte neuronal del tejido (Massieu et. al., 1995) como podría ser la inhibición del metabolismo energético.

Novelli et. al. (1988), demostraron que al inhibir la fosforilación oxidativa o la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, concentraciones de glutamato o NMDA que *per se* no son neurotóxicas, en estas condiciones sí lo son. Zeevalk y Nicklas (1990) también demostraron en la retina de pollo que al inducir una despolarización parcial con inhibidores de la glucólisis (iodoacetato) o de la fosforilación oxidativa (cianuro), se producía la activación del receptor NMDA en la ausencia de un incremento de glutamato extracelular. Más aún, la despolarización de la membrana con K^+ simula la toxicidad producida por la inhibición del metabolismo energético. Esta excitotoxicidad ha recibido el nombre de excitotoxicidad débil o secundaria de acuerdo a Albin y Greenamyre (1992), para diferenciarla de la excitotoxicidad aguda en donde el incremento en la actividad de los receptores es causado simplemente por el incremento en la concentración de los agonistas. En conclusión, estos resultados sugieren que la alteración del potencial de membrana por la inhibición del metabolismo es importante para la excitotoxicidad mediada por el receptor a NMDA.

I.2.6. Isquemia cerebral *in vivo* y excitotoxicidad

En modelos de isquemia cerebral global, se ha observado que los grupos neuronales más susceptibles al daño neuronal retrasado son la capa piramidal de CA1 del hipocampo en ratas (Pulsinelli et. al., 1982) y en humanos (Petito et. al., 1987), y la capa de células de Purkinje en la corteza del cerebelo, entre otras. Estas regiones se les conoce como sensibles a la isquemia, y al parecer esta vulnerabilidad está dada por ser regiones ricas en terminales glutamatérgicas (Ginsberg et. al., 1985; Pulsinelli et. al., 1982). Se cree que el receptor a NMDA es el que juega un papel primordial en la muerte secundaria a la isquemia.

En estudios de microdiálisis *in vivo* en ratas y conejos, en modelos de isquemia global o focal se ha observado un incremento en la concentración extracelular de glutamato y aspartato (Benveniste et. al., 1984; Baker et. al., 1991), de glicina (Matsumoto et. al., 1993) y de taurina (Saransaari y Oja, 1998) durante el episodio isquémico. Se ha sugerido que el incremento en la [AAE]_e está dado por la liberación incrementada y la disminución en la recaptura y/o el cambio en la dirección en los transportadores de glutamato (Benveniste et. al., 1984; Drejer et. al., 1985).

Otra evidencia que señala a la excitotoxicidad como mecanismo de la muerte isquémica es la protección contra el daño isquémico en regiones que reciben aferentes glutamatérgicas después de la deaferentación (Johansen et. al., 1986) o la protección por la administración de antagonistas de los receptores a glutamato (Gill et. al., 1987; Swan y Meldrum 1990).

I.2.7. Isquemia cerebral *in vitro* y excitotoxicidad

Para estudiar los efectos de la inhibición del metabolismo energético durante la isquemia cerebral, se han utilizado modelos *in vitro* en los que se inhibe la glucólisis y la cadena transportadora de electrones, tanto en cultivo, como en rebanadas de

tejido nervioso. En el caso de la inhibición de la glucólisis, se ha utilizado el inhibidor irreversible de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, el iodoacetato (IA), el cual tiene diversos efectos sobre las células. En rebanadas de hipocampo de rata, al tratarlas con 10mM de IA, produce una depolarización de la membrana, siendo más rápida al coadministrar 1mM de NaCN y por tanto inhibiendo también la fosforilación oxidativa (Reiner, et. al., 1990). Este efecto despolarizante también se ha observado en el nervio óptico de la rata y está dado por corrientes de Na⁺ dependientes e independientes de tetrodotoxina (TTX) (bloqueador de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje). Al agregar ouabaina, inhibidor específico de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa, en estas condiciones, no se observa mayor despolarización, lo que implica que la bomba de Na⁺/K⁺-ATPasa ya se encuentra totalmente inhibida. Esta despolarización se puede bloquear al agregar piruvato como sustrato energético (Lees y Sandberg, 1991; Leppanen y Stys, 1997).

Por otro lado, al agregar 1mM de IA a preparaciones de retina de pollo se observa un daño similar al producido por agonistas del receptor de glutamato tipo NMDA, sin el incremento de glutamato o de aspartato extracelular. Este daño se protege con el antagonista no competitivo del receptor a NMDA, el MK-801 (Zeevalk y Nicklas, 1990) ó con Mg²⁺ extracelular (Zeevalk y Nicklas, 1992). En esta preparación, cuando se inhiben la glucólisis y la fosforilación oxidativa simultáneamente, sí se observa un incremento [AAE]_e, produciéndose una lesión mayor. Este daño se protege parcialmente al agregar MK-801 más TTX (Zeevalk y Nicklas, 1991). Sin embargo, en este experimento se demostró que la activación del receptor precede al incremento en los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores, sugiriendo que el receptor se activa sin el incremento de [AAE]_e, lo cual apoya la hipótesis de un daño excitotóxico secundario o débil. Sin embargo, existe un trabajo que sugiere que en cultivos neuronales del hipocampo, la muerte neuronal producida por IA no se da por

excitotoxicidad, ya que el daño no se pudo contrarrestar con MK-801, pero sí con el antioxidante vitamina E (Uto et. al., 1995).

En rebanadas de hipocampo de rata (Madl y Burgesser, 1993), en astrocitos de la corteza (Ninomiya et. al., 1994) y en astrocitos del hipocampo (Nakamura et. al., 1995), el IA causa un incremento en la $[AAE]_e$, que se observa también en condiciones de alto K^+_{ext} o al agregar ouabaina. Estos autores han sugerido que este incremento se da porque el transportador de glutamato deja de funcionar o invierte la dirección de su transporte al alterarse los gradientes iónicos de la membrana celular por la disminución en la [ATP], dejando de funcionar la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa.

Además, se ha propuesto que el daño neuronal producido por la hipoglicemia se da por un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, que lleva a la activación de fosfolipasas, nucleasas y proteasas. Bickler y Hansen (1994) observaron que al agregar IA más NaCN en rebanadas corticales de rata, se produce un incremento del $[Ca^{2+}]_i$, que proviene en el 15% de pozas intracelulares y el resto del espacio extracelular. Sin embargo, la membrana celular en estas condiciones se deteriora notablemente ya que al tratarse las células con un detergente, no se observa mayor entrada de Ca^{2+} .

Al aplicar $50\text{nmol}/\mu\text{l}$ IA directamente en el estriado de la rata *in vivo*, se produce una lesión evidente que se puede atenuar por la remoción de las fibras glutamatérgicas corticoestriatales. Esta lesión está acompañada de la producción de radicales libres (Matthiews et. al., 1997). En este mismo trabajo también inyectaron sistémicamente por cuatro días $20\text{mg}/\text{Kg}$ de IA, sin embargo no observaron ninguna lesión.

Además de tratar de proteger el daño producido por el IA con antagonistas de los receptores a NMDA o eliminando las entradas glutamatérgicas, se han intentado otras estrategias. La adición de sustratos, como el lactato o el piruvato, no ha producido resultados concretos. En el modelo de retina de pollo, el piruvato no logró proteger contra la lesión inducida por el IA (Zeevalk y Nicklas, 1990), sin embargo en retina de

rana se observó que se inhibe en un 50% la disminución de ATP producida por el IA (Fliesler et. al., 1997). En otro estudio, se observó en rebanadas de hipocampo de rata que los EPSP disminuían en presencia de IA, mas al agregar lactato o piruvato se lograban recuperar, protegiendo mejor el piruvato (Izumi et. al., 1994). Por otro lado, tanto la activación de receptores a AAE, como la inhibición de la glucólisis causan la liberación dependiente de Ca^{2+} de ácido araquidónico, el cual inhibe el transportador de glutamato. *In vitro*, al coadministrar IA más lactato o piruvato, esta liberación de ácido araquidónico se bloquea (Williams et. al., 1996), inhibiéndose también la muerte neuronal.

1.3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Del 40% al 60% de los adultos de edad avanzada que presentan demencia, padecen la enfermedad de Alzheimer (EA). Está estimado que del 3-5% de los individuos mayores de 65 años padecen de la EA. La manifestación clínica más evidente es el deterioro en la memoria reciente, con la preservación relativa de la memoria remota; sin embargo con la progresión de la enfermedad se observa un deterioro global de la memoria. En la etapas tempranas se presentan afasias (impedimento en la expresión verbal) que culminan en la pérdida total del lenguaje. También se presentan apraxias (incapacidad de realizar trabajos motores complejos), causando que el individuo sea incapaz de realizar tareas sencillas como vestirse o alimentarse; y en las etapas tardías de esta enfermedad se observa una pérdida de la consciencia (Coyle, 1987). Hay dos formas de la EA: la de oriden genético y la otra mucho más frecuente, la esporádica. La etiología de esta última se desconoce (Hoyer, 1994).

La histopatología en la EA incluye placas neuríticas, marañas neurofibrilares y degeneración granulovacuolar. Las placas neuríticas están compuestas de depósitos

insolubles y extracelulares de la proteína amiloide en conformación beta plegada, las cuales consisten de hojas beta plegadas de esta proteína. Alrededor de los centros amiloides, especialmente en “placas inmaduras”, se observan neuritas distróficas con terminación en forma de cubo pareciendo conos de crecimiento. Estas placas neuríticas también se presentan en el cerebro de adultos normales de edad avanzada, pero en una magnitud menor. Generalmente se encuentran localizadas en la corteza, el hipocampo y las regiones límbicas. La densidad de estas placas en la corteza cerebral correlaciona significativamente con el grado de impedimentos cognoscitivos observados en los pacientes antes de la muerte. Las marañas neurofibrilares son acumulaciones de proteínas del citoesqueleto neuronal particularmente de la proteína llamada tau. Estas marañas son muy insolubles y se encuentran concentradas en neuronas corticales, hipocampales y límbicas. La degeneración granulovacuolar representa vacuolas que causan el hinchamiento de los cuerpos celulares. Ésto se observa especialmente en la células piramidales del hipocampo (Mena y García, 1998).

1.3.1.Toxicidad del péptido β -amiloide

Se cree que la EA resulta de una cascada de eventos que involucran la pérdida de neuritas y dendritas terminales, lo que da lugar a la atrofia de cuerpos neuronales en neuronas de la corteza cerebral, del hipocampo y de la amígdala (Weinstock, 1995). La causa de esta enfermedad se desconoce, mas existen evidencias recientes que señalan al péptido β -amiloide como muy probablemente involucrado en la neurodegeneración. Individuos con la EA, adultos de edad avanzada con síndrome de Down y primates viejos, presentan una anormalidad cerebral característica: la presencia de β -amiloide depositado difusamente en el parénquima, en el centro de las placas seniles y alrededor de los vasos sanguíneos. El componente principal del

β -amiloide es un péptido hidrofóbico de 4kD llamado A β o beta A4, el cual se ensambla en fibrillas extracelulares de aproximadamente 8nm (Sisodia y Price, 1992; Schapira, 1996). El A β presente en las placas neuríticas proviene de una glicoproteína transmembranal (Schapira, 1996) llamada proteína precursora de amiloide (APP) de 600-700 aminoácidos, la cuál está codificada por un gen localizado en el cromosoma 21 (Sisodia y Price, 1992). El A β está compuesto por 11-15 aminoácidos del dominio transmembranal y 28 aminoácidos del dominio extracelular de la APP. Los ARNm de la APP presentan procesamiento alternativo produciéndose por lo menos cuatro ARNm que codifican proteínas que contienen A β (Sisodia y Price, 1992). El rompimiento normal de APP genera un derivado N-terminal y un derivado C-terminal los cuales no son amiloidogénicos. El papel funcional de la APP o sus derivados se desconoce, pero se han implicado en la regulación de la división celular, en la modulación de la adhesión celular, en el crecimiento celular y la protección celular (Hoyer, 1994). El procesamiento anormal de la APP genera derivados que contienen A β con potencia amiloidogénica; y al parecer este rompimiento anormal se da por una disminución en la disposición de ATP (se explicará posteriormente).

Hasta el momento, el efecto neurotóxico del A β es un tema muy controvertido. En cultivos celulares disociados de hipocampo, los fragmentos beta-amiloides (β 1-40, β 1-28 y β 25-35) tienen efectos neurotróficos en las neuronas en el primer día de cultivo, prolongando la sobrevivencia neuronal e incrementando la ramificación neurítica; sin embargo, cuando se aplican al cuarto día de cultivo, estos fragmentos tienen propiedades neurotóxicas (Malouf, 1992). En otro trabajo en cultivo de neuronas, se observó que el β -amiloide 1-40 sólo es tóxico cuando es incubado durante seis horas a temperatura ambiente en solución acuosa (Schapira, 1996). Según parece, la toxicidad radica en la preincubación del péptido ya que se forman

agregados tóxicos (Shcapira, 1996). En cultivos organotípicos de rebanadas de hipocampo, las cuales presentan la fisiología y anatomía del hipocampo intacto, se ha observado que el fragmento β 1-40 es neurotóxico; sin embargo, en este trabajo, los controles con albúmina sérica bovina o con el fragmento conteniendo la secuencia invertida de aminoácidos β 40-1 también tuvieron efecto neurotóxico en las rebanadas, por lo que no se puede concluir sobre la toxicidad del A β (Malouf, 1992). En experimentos *in vivo*, la inyección de 15 μ g/ μ l del péptido β 1-40 en la corteza parietal o en el hipocampo de ratas adultas (300-500 g) produce daño neuronal. Sin embargo, en este trabajo también se observó que el vehículo en el que se disolvió el péptido (35% acetonitrilo/0.1% ácido trifluoroacético) y el fragmento con la secuencia de aminoácidos invertida β 40-1 presentaron toxicidad, aunque fue menor (Geula et. al., 1992). McKee y sus colaboradores (1992), observaron que la inyección en la corteza cerebral de ratas o monos, tanto del péptido β 1-40 como el β 25-35 a una concentración de 3nmol/ μ l, produce una lesión con necrosis localizada en el sitio de inyección rodeada de una zona de pérdida neuronal y gliosis, además de ser inmunopositivas a Tau y Alz-50, anticuerpos marcadores de proteínas asociadas a microtúbulos normales e hiperfosforiladas. En este trabajo, se disolvieron los péptidos en agua y se utilizaron como control péptidos truncados con los mismos aminoácidos que el β 1-40 y el péptido β 40-1, los cuales también presentaron toxicidad, aunque la lesión fue menor. En contradicción con todos los experimentos anteriores, Sapolsky et. al. (1992), no lograron producir neurotoxicidad al inyectar en el hipocampo de la rata el péptido β 25-35; mas observaron que el 10% de las ratas presentaba daño en la hoja dorsal del giro dentado. Esta toxicidad puede estar dada por una variable desconocida presente en ese grupo de animales. Al parecer el fragmento 25-35 es 94% más tóxico que el fragmento 1-40 *in vitro*. Recientemente, se ha observado que la toxicidad de estos péptidos depende de su autoagregación. En

un experimento novedoso, los fragmentos β 1-40 y β 25-35 se disolvieron en agua bidestilada y se incubaron a 37°C durante una semana para lograr su autoagregación. Estos péptidos incubados por 7 días fueron inyectados en el núcleo basalis de la rata y se observó una lesión muy evidente con pérdida neuronal, lo que sugiere que se requiere de la autoagregación de los péptidos para incrementar su toxicidad (Giovanelli et. al., 1995).

Como se puede observar, todavía no está definido si el A β es capaz de ser neurotóxico por sí sólo o si participa aumentando la susceptibilidad neuronal ante otro tipo de agresiones.

1.3.2. Inhibición del metabolismo energético en la EA

La vejez conlleva a cambios inherentes en los principales procesos metabólicos, entre los cuales está el metabolismo de la glucosa. Estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) han revelado alteraciones en el metabolismo de la glucosa en la EA (Schapira, 1996; Pettegrew et. al., 1994). Un número considerable de estudios de PET han mostrado decrementos en la recaptura de 2-deoxiglucosa y en la velocidad metabólica cerebral de la glucosa. Estos resultados al parecer no pueden explicarse por la pérdida del tejido (Pettegrew et. al., 1994). En la etapa temprana de la EA esporádica se observa una reducción en la utilización de la glucosa mientras que el flujo sanguíneo cerebral disminuye en 17% y la velocidad del metabolismo del oxígeno en 18% (Hoyer, 1994). Esta disminución que se observa en el metabolismo de la glucólisis puede estar dada por varios factores. Uno de ellos al parecer es la disminución de enzimas glucolíticas claves y de la piruvato deshidrogenasa (Hoyer, 1994). También se ha demostrado una disminución al 50% en la densidad de sitios de transporte de glucosa en los microvasos (Hertz, 1989), además de un decremento en la fosforilación de la glucosa (Pettegrew et. al., 1994).

La disminución en el consumo de oxígeno cerebral se presenta en las etapas tempranas de la enfermedad en la corteza temporal y este defecto se extiende a la corteza parietal y frontal en los pacientes más dementes (Pettergrew et. al., 1994).

Como se mencionó anteriormente, la neurodegeneración que se presenta en la EA está localizada en las neuronas piramidales grandes como las de las capas neocorticales II, III y V, y en la región CA1 del hipocampo. Al provocar hipoglucemia arterial, se produce un daño neuronal irreversible principalmente en estas regiones del cerebro además de tener inmunorreactividad contra la proteína Tau y la ubiquitina, marcadores asociados a las lesiones presentes en la EA (Hoyer, 1994). Las placas neuríticas no presentan correlación con la muerte neuronal de estas áreas específicas. Por lo anterior, se puede asumir que la disminución en el metabolismo de la glucosa a las neuronas podría ser una anomalía clave para la neurodegeneración en la EA. El ciclo de Krebs también se encuentra afectado en la EA. Se ha observado una disminución en la actividad de la oxoglutarato deshidrogenasa y de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Shagger y Ohm, 1995).

Además de las alteraciones en el metabolismo de la glucosa y en el ciclo de Krebs, existen muchas evidencias que apoyan la disfunción mitocondrial de la cadena de transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa. Como antes se mencionó, esta vía consiste principalmente de la cadena respiratoria (complejo I-IV) y la sintasa de ATP (complejo V). Las cinco proteínas de membrana, localizadas en la membrana mitocondrial interna, están compuestas por varias subunidades proteicas cuyos genes están distribuidos en el ADN nuclear y en el ADN mitocondrial (Voet/Voet, 1995). Se ha sugerido que la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial a lo largo de la vida del individuo causa una disfunción mitocondrial pudiendo representar un factor etiológico importante en enfermedades neurodegenerativas de inicio tardío (Ingram et. al., 1993). En pacientes con EA se ha reportado una reducción del 25-30%

en la actividad de la citocromo oxidasa (complejo IV) tanto en plaquetas (Schagger y Ohm, 1995) como en cuatro regiones de la corteza cerebral. Además, en mitocondrias aisladas de cerebros con EA hay una reducción del 50% en esta enzima (Beal, 1995). Esta disminución en la actividad al parecer está dada por un decremento en la actividad catalítica y no por la disminución en la concentración de la proteína (Beal, 1995) lo que podría ser una consecuencia de mutaciones en la proteína; sin embargo la inmunorreactividad de esta proteína en el hipocampo de personas con EA se encuentra disminuída (Cooper y Schapira, 1997). Se ha encontrado una reducción en el ARNm de las subunidades I y III de la citocromo oxidasa en el giro medio temporal y en el hipocampo en la EA (Beal, 1995). Además, se identificó una mutación puntual en el gen mitocondrial ND2 para la subunidad 2 del complejo I en 10 de 19 pacientes con EA (Schagger y Ohm, 1995). En mitocondrias preparadas de cerebro de 9 pacientes se demostró una reducción en la actividad del 40% del complejo I, 35% del complejo II, 43% del complejo III y 53% para el complejo IV; siendo los decrementos del complejo II y el complejo IV estadísticamente significativos (Parker et. al., 1994). También la ATP sintasa presenta alteraciones en la EA. En hipocampos de pacientes se observa una reducción en la concentración de esta proteína (Schagger y Ohm, 1995).

El procesamiento post-traducciona l de la APP inmadura a la APP madura es dependiente de ATP. Por lo tanto en condiciones en que el ATP está disminuído, la maduración de esta proteína se bloquea lo que lleva a la degradación anormal de la misma, produciéndose fragmentos amiloidogénicos (Hoyer, 1994).

1.3.3. Inhibición de la succinato deshidrogenasa como modelo de muerte neuronal

El ácido 3-nitropropiónico es un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa

y del complejo II de la cadena del transporte de electrones (Voet/Voet, 1995). Ha sido utilizado como modelo para simular la enfermedad de Huntington (EH), pues al ser administrado sistémicamente produce lesiones específicamente en el estriado y en el hipocampo (Greene y Greenamyre, 1996; Brouillet et. al., 1998; Massieu y Sánchez, 1999) de la rata y del mono con la presencia de síntomas característicos de la EH. Además, las lesiones provocadas por este inhibidor son dependientes de la edad, siendo más alta la susceptibilidad a la muerte neuronal en individuos más viejos (Beal et. al., 1993). Este inhibidor causa el decremento de los niveles de ATP del tejido desde las dos horas de ser inyectado intraperitonealmente, manteniéndose de esta manera por varias horas (Greene et. al., 1998). La utilización de este inhibidor podría ser un buen modelo modelo para el estudio de la relación de la inhibición metabólica con la toxicidad del péptido β -amiloide y por tanto podría contribuir al entendimiento de los mecanismos de muerte celular asociados a la EA.

II.HIPÓTESIS

Se propone que la inhibición del metabolismo energético es un factor que determina la susceptibilidad de las neuronas a la muerte inducida por diferentes agentes tóxicos, tales como el glutamato y el péptido β -amiloide, los cuales se ha propuesto que intervienen en el daño neuronal asociado a la isquemia cerebral y a la enfermedad de Alzheimer, respectivamente.

III.OBJETIVO

El objetivo general de la presente tesis es observar, en el hipocampo de la rata *in vivo*, el papel que juega en la muerte neuronal:

a) la inhibición de la glucólisis inducida por el iodoacteto (IA), inhibidor irreversible de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en la susceptibilidad a la muerte neuronal producida por el incremento en la concentración extracelular de glutamato al inhibir su recaptura con el transpirrolidín dicarboxilato (PDC), mimetizando una condición isquémica *in vivo* y con el péptido β -amiloide;

b) la inhibición del ciclo de Krebs inducida por el inhibidor irreversible de la enzima succinato-deshidrogenasa, 3-NP, en la toxicidad neuronal producida por el péptido β -amiloide 25-35 *in vivo*, mimetizando así eventos asociados a la enfermedad de Alzheimer.

Objetivos particulares:

A. Efecto de la inhibición de la glucólisis en la muerte neuronal, como modelo bioquímico de isquemia cerebral:

1.- Estudiar si la inhibición *per se* de la glucólisis produce daño neuronal en el

II. HIPÓTESIS

Se propone que la inhibición del metabolismo energético es un factor que determina la susceptibilidad de las neuronas a la muerte inducida por diferentes agentes tóxicos, tales como el glutamato y el péptido β -amiloide, los cuales se ha propuesto que intervienen en el daño neuronal asociado a la isquemia cerebral y a la enfermedad de Alzheimer, respectivamente.

III. OBJETIVO

El objetivo general de la presente tesis es observar, en el hipocampo de la rata *in vivo*, el papel que juega en la muerte neuronal:

a) la inhibición de la glucólisis inducida por el iodoacteto (IA), inhibidor irreversible de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en la susceptibilidad a la muerte neuronal producida por el incremento en la concentración extracelular de glutamato al inhibir su recaptura con el transpirrolidín dicarboxilato (PDC), mimetizando una condición isquémica *in vivo* y con el péptido β -amiloide;

b) la inhibición del ciclo de Krebs inducida por el inhibidor irreversible de la enzima succinato-deshidrogenasa, 3-NP, en la toxicidad neuronal producida por el péptido β -amiloide 25-35 *in vivo*, mimetizando así eventos asociados a la enfermedad de Alzheimer.

Objetivos particulares:

A. Efecto de la inhibición de la glucólisis en la muerte neuronal, como modelo bioquímico de isquemia cerebral:

1.- Estudiar si la inhibición *per se* de la glucólisis produce daño neuronal en el

hipocampo de la rata y a qué tiempo se puede observar esta lesión.

2.-Observar si el daño producido por la inhibición de la glucólisis se puede proteger con el antagonista no competitivo del receptor NMDA, la dizocilpina/(+)-5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo(a,d)ciclohepten-5,10-imina (MK-801), o con antioxidantes como el α -tocoferol (vitamina E).

3.-Medir la concentración extracelular de glutamato por la técnica de microdiálisis, después de agregar por separado y simultáneamente en el hipocampo inhibidores del transporte de glutamato y de la glucólisis, en presencia o ausencia de MK-801.

4.-Producir un modelo de daño isquémico neuronal al inhibir sistémicamente y localmente la glucólisis junto con la inhibición local de la recaptura de glutamato en el hipocampo de la rata.

5.-Observar en el modelo anterior la posible protección del daño neuronal administrando el antagonista del receptor NMDA, MK-801; o suplementando el ciclo de Krebs con piruvato.

6.-Observar el posible daño neuronal inducido por el péptido β -amiloide 25-35 en el hipocampo de ratas tratadas crónicamente con IA.

B.Estudiar el efecto de la inhibición del ciclo de Krebs en la susceptibilidad a la muerte neuronal inducida por el péptido β -amiloide 25-35 en el hipocampo de la rata *in vivo*.

IV.MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.MATERIALES

Se utilizaron los siguientes compuestos: el ácido pirúvico (sal de sodio), el ácido iodoacético (sal de sodio), la vitamina E, el ácido 3-nitropropiónico, el péptido β -amiloide 25-35, la diaminobencidina y la albúmina fueron obtenidos de SIGMA; el L-trans-2,4-pirrolidin dicarboxilato (PDC) fue obtenido de Tocris; el (+)-MK-801 maleato de hidrógeno fue obtenido de Research Biochemicals International (RBI). El ácido 3-nitropropiónico y el PDC fueron preparados disolviendo los compuestos en hidróxido de Na 1M y ajustando el pH a 7-7.5. El IA y el MK-801 fueron disueltos en solución salina 0.9%. El piruvato se disolvió en agua así como el péptido β -amiloide. La vitamina E fue disuelta en aceite de cártamo.

IV.2.CIRUGÍA

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 200 a 250 gramos en los grupos experimentales tratados con iodoacetato (IA); y de 300 a 350 gramos en los grupos tratados con 3-nitropropiónico (3-NP). Esto se eligió así porque los efectos tóxicos del 3-NP son dependientes de la edad y las ratas de 300-350 gramos son más susceptibles que las de 200-250 gramos (Simpson e Isacson, 1993). Las ratas se anestesiaron con 4% de halotano en una mezcla de O₂ 95%/CO₂ 5%. Ya anestesiadas se montaron en un estereotáxico con la barra dental en la posición -3.3 y se bajó la anestesia a 0.5% durante la cirugía. Se cortó la piel exponiendo el cráneo, se perforó el cráneo y se inyectó en el hipocampo izquierdo. Para las inyecciones agudas se utilizaron las coordenadas con referencia a bregma de

acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1982): para la región CA1: anteroposterior=-3.6, lateral=+2, vertical=-2.5 desde la dura madre; para la región del giro dentado se utilizó una coordenada vertical=-2.8 desde la dura madre, con las mismas coordenadas anteroposterior y lateral; para las microdiálisis se utilizaron las mismas coordenadas excepto la vertical que fue de -4.

En las inyecciones intrahipocampales se inyectó un volumen de 1 μ l a un flujo de 0.5 μ l/min con una jeringa Hamilton, conectada por medio de una tubería a una aguja de medida 27 y usando una bomba de microinyección (Carnegie modelo CMA/100). Al terminar de inyectar se esperó dos minutos antes de retirar la aguja. Por último se suturó la piel.

IV.3.HISTOLOGÍA

Al término del tiempo de cada experimento (mencionado posteriormente en cada protocolo) las ratas se sacrificaron con 2ml de pentobarbital intraperitoneal y se perfundieron intracardiamente con 250ml de solución salina (NaCl 0.9%) seguida de una solución de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1M a pH 7.4. Después los cerebros son extraídos del animal y mantenidos en paraformaldehído por 24 horas. Después se cambiaron a sacarosa 10%, 20% y 30% sucesivamente cada 24 horas. Estos cerebros se cortaron en rebanadas de 40 μ m en un criostato y se les hizo una tinción de Nissl. También se obtuvieron rebanadas por flotación en PBS para su utilización en inmunohistoquímica.

Con los tejidos teñidos con Nissl (excepto los experimentos de microdiálisis e inyección aguda), se midió el área de lesión con el sistema de análisis de imágenes Macintosh NIH Image 1.6 y se realizó un análisis estadístico con la prueba de ANOVA seguida de una prueba de Fischer.

IV.4.PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

INHIBICIÓN DE LA GLUCÓLISIS CON IODOACETATO

IV.4.1 Tratamiento agudo

A)Curso temporal

Se inyectó estereotáxicamente una solución de IA 50nmol/ μ l en el hipocampo de la rata utilizando las coordenadas antes mencionadas, y se sacrificaron los animales a distintos tiempos: 1, 2, 3, 6 y 24 horas después de la inyección estereotáxica.

B)Protección con MK-801 ó vitamina E

Media hora antes y media hora después de la inyección intrahipocampal de IA 50nmol/ μ l, se inyectó intraperitonealmente 2mg de MK-801, antagonista no competitivo del receptor NMDA; ó 60mg/Kg de α -tocoferol (vitamina E), atrapador de radicales libres; para investigar el posible efecto protector de estos dos compuestos sobre la lesión ocasionada por IA. A las 24 horas del tratamiento, las ratas se perfundieron.

IV.4.2. Microdiálisis

Se utilizaron cánulas de microdiálisis de 2mm de largo y 0.5mm de diámetro, las cuáles se lavaron por 20 minutos a un flujo de 10 μ l/min con agua destilada antes de la implantación. Las ratas se anestesiaron y montaron en un estereotáxico como se mencionó anteriormente y se implantó la cánula unilateralmente en el hipocampo izquierdo según las coordenadas antes mencionadas. Se perfundió la membrana a un flujo continuo de 2 μ l/min con una bomba de microinyección durante 45 minutos con una solución Ringer-Krebs (118mM NaCl, 4.5mM KCl, 2.5mM MgSO₄, 4mM NaH₂PO₄, 2.5mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃ y 10mM glucosa; a pH 7.4) para estabilizar el

tejido. Después se colectan tres fracciones basales y al inicio de la cuarta fracción se cambió a una solución Ringer-Krebs conteniendo uno de los siguientes compuestos: PDC 25mM, IA 5mM o PDC 25mM + IA 5mM; y se colectaron 7 fracciones más. La osmoralidad del medio se corrigió disminuyendo la concentración de NaCl. Cada fracción colectada fue de 25 μ l. En el protocolo con MK-801, se colectaron dos fracciones basales y al inicio de la tercera fracción basal se inyectó intraperitonealmente 2mg de MK-801 y se colectó una cuarta fracción basal. Al finalizar la onceava y última fracción, se retiró la cánula de microdiálisis y se suturó la piel del animal, el cuál se sacrificó una semana después para observar el sitio de la implantación de la cánula.

El contenido de aminoácidos (asp, glu, glutamina, glicina, taurina y alanina) de las fracciones colectadas se analizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se agregó 25 μ l de o-ftaldialdehído a cada fracción colectada para derivatizar los aminoácidos y 3 minutos después se inyectó esta solución al HPLC, utilizando una columna ODS (25cm x 4mm) con una fase móvil de metanol/acetato de potasio (0.1M pH 5.5). Los aminoácidos fueron separados con un gradiente lineal de 25 a 75% metanol/acetato a un flujo de 1.5ml/min según Geddes y Wood (1984). Después se calculó la concentración de aminoácidos de cada fracción a partir de un estándar de aminoácidos con molaridad conocida y estos datos se analizaron por una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Fischer.

IV.4.3.Tratamiento crónico

Las ratas recibieron durante 4 días una inyección intraperitoneal (i.p.) diaria de 25mg/Kg de IA. Al cuarto día, una hora después de la última inyección de IA, se inyectó estereotáxicamente en el hipocampo un inhibidor del acarreador de glu, PDC (500nmol/ μ l) o la proteína β -amiloide 25-35 (1 μ g/ μ l). Los animales control se

inyectaron estereotáxicamente con PDC 500nmol/ μ l, β -amiloide 1 μ g/ μ l ó solución salina 0.9% y no recibieron tratamiento crónico de IA. 24 horas después de la inyección intrahipocampal de cualquiera de los compuestos mencionados en los grupos control y experimentales, los animales se anestesiaron con pentobarbital y se sacrificaron por perfusión intracardiaca.

También se investigó la posible protección de la lesión inducida por la administración de IA+PDC con diferentes compuestos:

A) Protección con MK-801

Se inyectó IA 25mg/Kg i.p. durante cuatro días (una inyección diaria). Al cuarto día, 30 minutos después de la inyección intraperitoneal de IA 25mg/Kg, se inyectó 1mg/Kg de MK-801 i.p. y 30 minutos después (una hora después del IA), se inyectó PDC 500nmol/ μ l en el hipocampo. Se perfundió a los animales 24 horas después y se obtuvo el cerebro para histología y cuantificación del área lesionada.

B) Protección con piruvato intraperitoneal

Se realizó el mismo procedimiento de inyección crónica de IA antes mencionado. Al cuarto día, después de 30 minutos de la última inyección de IA, se inyectó piruvato i.p. 500mg/Kg y el animal se anestesió para la inyección estereotáxica de PDC 500nmol/ μ l, 15 minutos después de la administración de piruvato. Se inyectó una segunda dosis de piruvato i.p. 500mg/Kg simultánea a la inyección intrahipocampal de PDC 500nmol/ μ l, una hora después de la última inyección de IA. Después de 24 horas se sacrificó y perfundió a los animales y se utilizó el cerebro para histología y cuantificación del área lesionada.

C) Protección con piruvato intravenoso

Las ratas se inyectaron i.p. durante cuatro días con IA 25mg/Kg. Inmediatamente después de la última inyección de IA, se anestesiaron para inyectarlas intravenosamente con piruvato. Primero se montó el animal en el estereotáxico. Una

vez montado, se limpió la cola con peróxido de hidrógeno y se hizo una incisión en la cola, a un lado de la vena lateral derecha, para descubrirla. A los 15 minutos de la inyección i.p. de IA 25mg/Kg, se inyectó 250 μ l de una solución de piruvato 200mM en la vena lateral de la cola con una bomba de microinyección (Harvard Apparatus Pump 22) a un flujo de 0.09ml/min. Después se cerró la herida de la cola con vendotes y 30 minutos después se inyectó intrahipocampalmente PDC 500nmol/ μ l. 24 horas después los animales se anestesiaron y sacrificaron por perfusión intracardiaca. Se extrajo el cerebro para histología y cuantificación del área lesionada.

IV.4.4. Iodoacetato crónico más β -amiloide intrahipocampal

Al igual que con el tratamiento de IA+PDC, en este caso se inyectó en el giro dentado del hipocampo 1 μ g/ μ l del péptido β -amiloide 25-35 al cuarto día de tratamiento crónico con IA 25 mg/Kg i.p. (una inyección diaria). Las coordenadas que se utilizaron para inyectar en el giro dentado con referencia a la bregma de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1982) fueron las siguientes: AP=-3.6; L=+2,1; V=-2.8. Después de tres días de la inyección del péptido β 25-35, las ratas se perfundieron y se utilizó el cerebro para tinción de Nissl. Los animales control fueron inyectados solamente con el péptido β 25-35 en el giro dentado y se perfundieron tres días después, para el análisis histológico.

INHIBICIÓN DEL CICLO DE KREBS Y DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA CON 3-NITROPROPIÓNICO

IV.4.5.3-Nitropropiónico i.p. más β -amiloide intrahipocampal

Se utilizaron ratas de 300-350 gramos, quienes recibieron una inyección i.p. de 3-NP a una dosis de 20mg/Kg. Cuatro horas después se les inyectó en el giro dentado 1 μ g/ μ l del péptido β 25-35. El péptido β 25-35 se incubó a temperatura ambiente

disuelto en agua una hora antes de la inyección intracraneal. Al cuarto día de la inyección del péptido β 25-35, los animales se sacrificaron y perfundieron y se obtuvo el cerebro para histología y cuantificación del área lesionada.

V.RESULTADOS

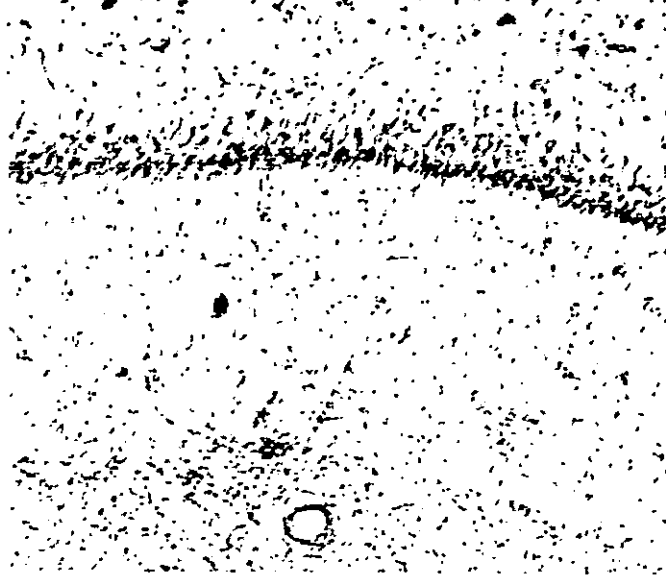
V.1.INHIBICIÓN DE LA GLUCÓLISIS, MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL

V.1.1.Administración aguda

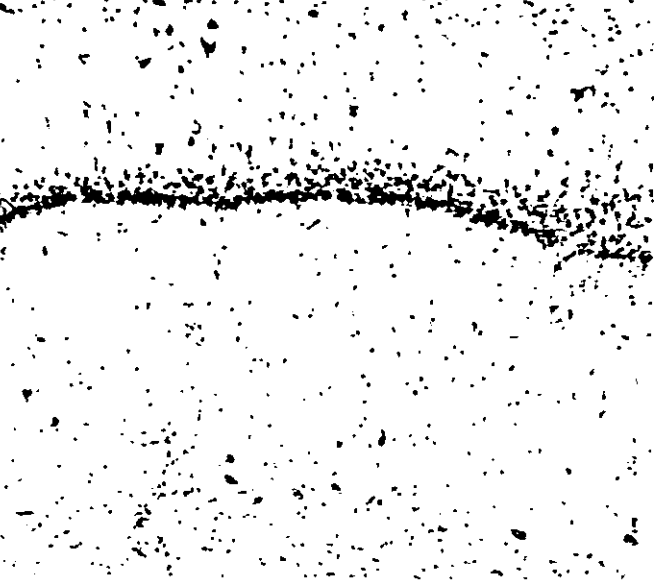
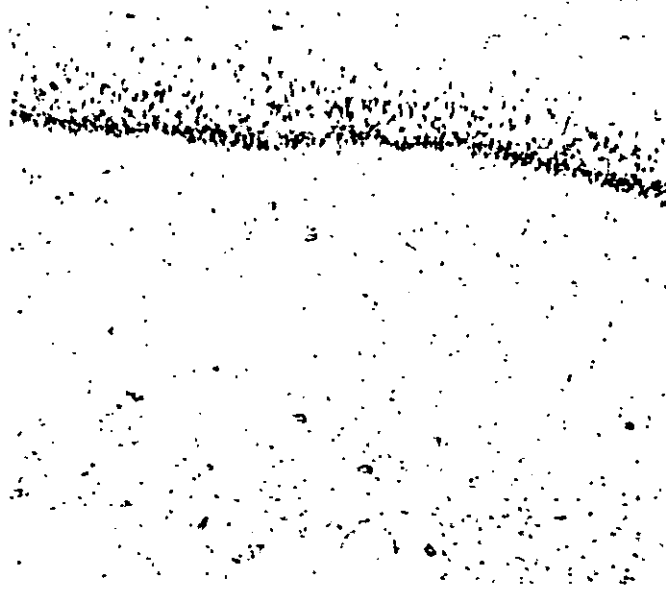
A)Curso temporal de la lesión con iodoacetato 50 nmolas/ μ l

La inyección de iodoacetato a una concentración de 50nmolas/ μ l (\approx 50mM) en la región CA1 del hipocampo produce daño celular que se observa desde la primera hora de la inyección. Una hora después de la inyección de iodoacetato (Fig. 1A), las neuronas piramidales de CA1 se observan encogidas y más teñidas y las prolongaciones se hacen más evidentes. En el transcurso de las siguientes horas (Fig.1), las neuronas presentan mayor tinción a violeta de cresilo, lo que señala que se encuentran encogidas. A las dos horas después de la inyección (Fig.1B), se observan tanto las prolongaciones como los somas muy teñidos. En la tercera hora después de la inyección, se siguen observando prolongaciones neuríticas intensamente teñidas y aparecen células picnóticas (Fig.1C). Después de seis horas (Fig.1D), se observan las células mucho más encogidas con una morfología estrellada y ya no son visibles las prolongaciones neuríticas, lo que probablemente indica que éstas fueron retraídas. A las 24 horas después de la inyección (Fig.1E) la lesión está muy bien definida en CA1 y se caracteriza por el adelgazamiento de la capa CA1 y la disminución en la densidad celular. Además las células se observan como puntos intensamente teñidos, lo que señala encogimiento del citoplasma, observándose sólo los núcleos intensamente teñidos, siendo éstas denominadas

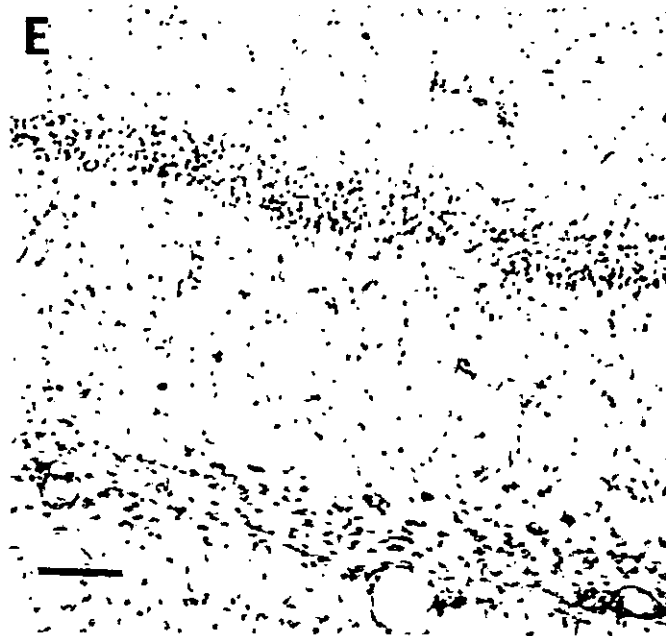
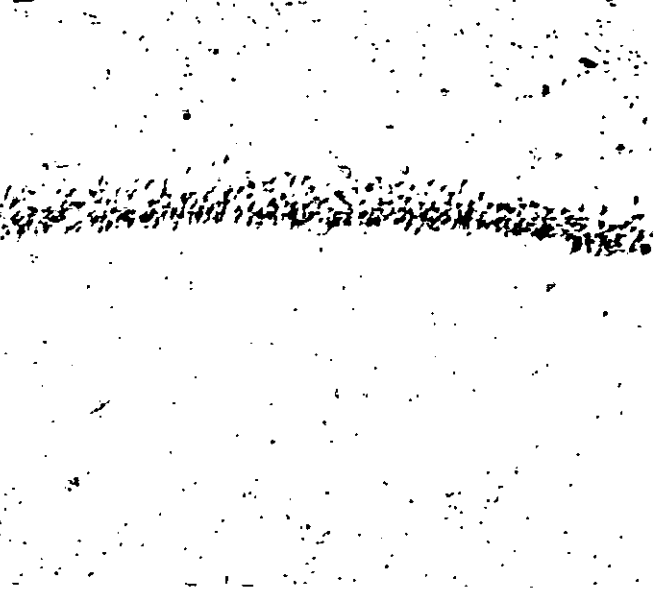
Fig. 1. Fotomicrografía de secciones de tejido cerebral teñidos con violeta de cresilo (40μ m de espesor) de ratas sacrificadas a diferentes tiempos después de la inyección intrahipocampal de iodoacetato 50nmolas/ μ l: **A)**1 hora (n=3); **B)**2 horas (n=3); **C)**3 horas (n=6); **D)**6 horas (n=4); **E)**24 horas (n=6); y **F)**hipocampo contralateral de rata mostrada en B, barra de 100μ m. Amplificación 10x.



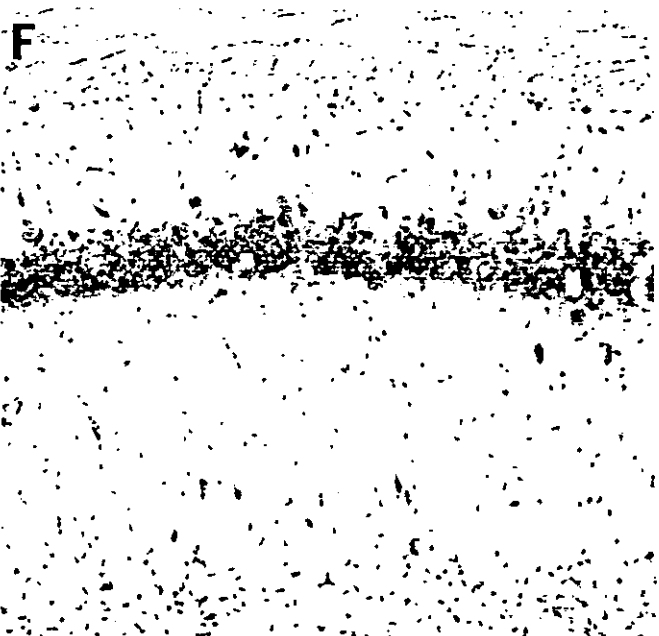
C



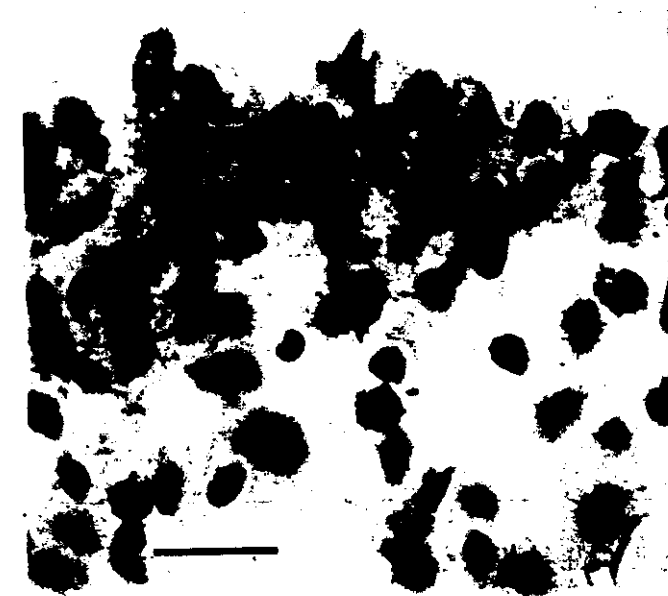
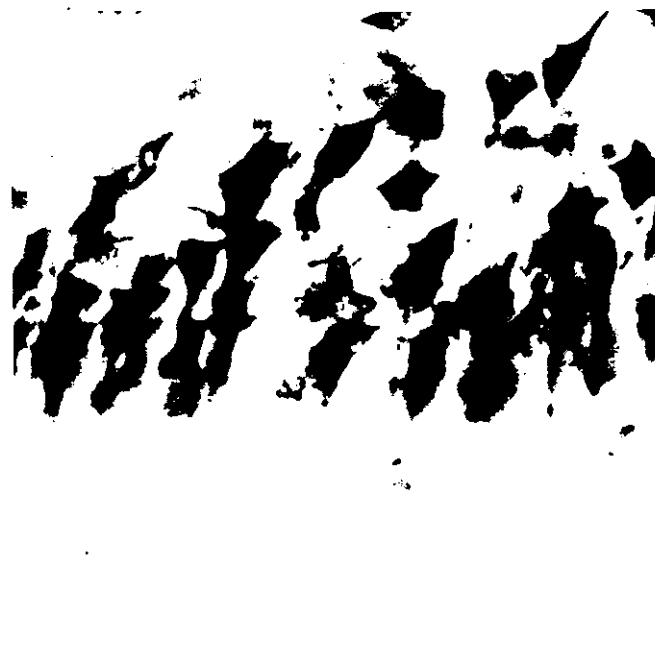
D



E



F



células picnóticas. Se utilizó el hipocampo contralateral como control (Fig.1F) y se puede observar que estos cambios sólo se presentan en el hipocampo inyectado.

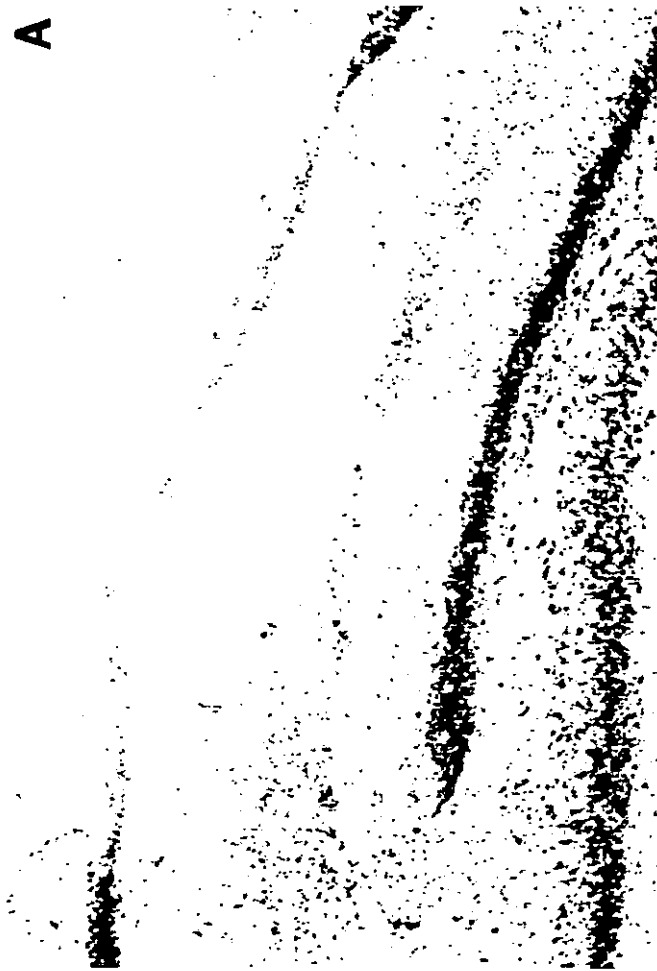
B)Efecto protector de la vitamina E o el MK-801

Para estudiar la etiología de la lesión producida por la inyección de 50nmolas/ μ l (50mM) de iodoacetato en el hipocampo, se investigó la posible protección del daño inducido por IA con el antagonista no competitivo del receptor NMDA, MK-801, o con el antioxidante α -tocoferol comúnmente llamado vitamina E. Ambos compuestos se inyectaron intraperitonealmente media hora antes y media hora después de la inyección intrahipocampal de iodoacetato (IA). El MK-801 se utilizó a una concentración de 2mg/Kg (n=5), mientras que la vitamina E a una dosis de 60mg/Kg(n=5). Los animales se sacrificaron a las 24 horas ya que por los estudios antes mencionados, a este tiempo la lesión está completamente desarrollada.

Como se puede observar en la figura 2, ni el MK-801(Fig.2B) ni la vitamina E (Fig.2C) protegieron contra la lesión producida por el IA (Fig.2A). De acuerdo a la evaluación histológica, se observan células picnóticas con los núcleos intensamente teñidos y el citoplasma encogido en los tres casos. Datos preliminares fueron presentados en la tesis de Sánchez, 1998.

Fig. 2. Fotomicrográficas de secciones de tejido (40 μ m de espesor) teñido con violeta de cresilo. Efecto protector del MK-801 ó vitamina E sobre la lesión producida 24 horas después de la inyección de IA 50nmolas/ μ l en la región CA1: A)Región CA1 del hipocampo inyectado con IA en una rata que recibió dos inyecciones de MK-801 2mg/Kg media hora antes y media hora después de la inyección de IA; B)Región CA1 de hipocampo inyectado con IA en una rata que recibió dos inyecciones de vitamina E 60mg/Kg media hora antes y media hora después de la inyección con IA; C)Región CA1 del hipocampo inyectado con IA 50nmolas/ μ l. Barra= 210 μ m, amplificación 4x.

A



B



C



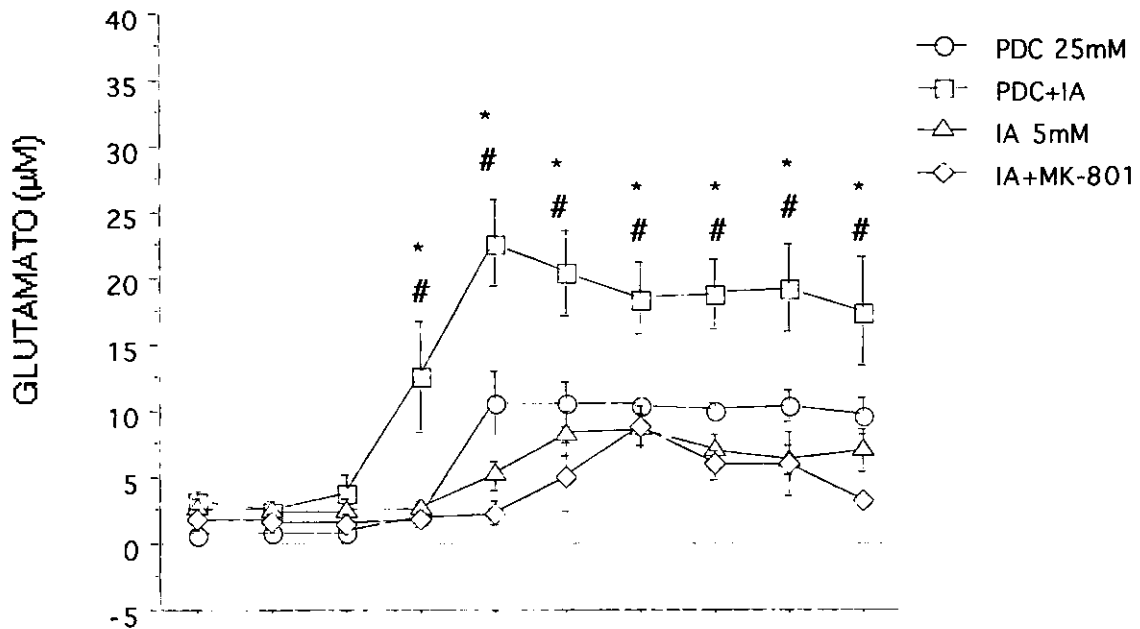
V.1.2.Microdiálisis

Para estudiar si la inhibición de la glucólisis puede aumentar la concentración extracelular de los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato, se administró en el hipocampo de la rata IA 5mM a través de una cánula de microdiálisis. Como se puede observar en la figura 3, tanto la concentración extracelular de glutamato (Fig.3A) como la de aspartato (Fig.3B) se elevan significativamente respecto a sus basales. En este experimento se observó un incremento mucho mayor en la concentración extracelular de aspartato (20 veces respecto a su basal) que la de glutamato (6.6 respecto a su basal). Para conocer si el incremento en la concentración de estos aminoácidos está mediado por la activación del receptor NMDA, se probó el efecto del MK-801 sobre el efecto del IA. Cuando se inyecta intraperitonealmente MK-801 2mg/Kg antes de la administración de IA 5mM, se observa un retraso de 10-15 minutos en la elevación de glutamato, pero no en la de aspartato; y este retraso no es estadísticamente significativo respecto a la liberación inducida por el IA sólo. El MK-801 no modificó el efecto del IA sobre los niveles extracelulares de glutamato y aspartato ya que la diferencia no es estadísticamente significativa.

Al inhibir el transporte de glutamato con 25mM de PDC, inhibidor específico de los transportadores de glutamato, también se observa un incremento significativo en las concentraciones extracelulares de glutamato y de aspartato respecto a sus basales (Fig.3). La elevación en la concentración extracelular de aspartato no es tan evidente como en el caso de la inhibición glucolítica (10 veces respecto a su basal); mientras que la elevación en la concentración de glutamato inducida por el PDC es muy similar a la producida por el IA (8.3 veces respecto a su basal). Al administrar ambos compuestos a través de la cánula de microdiálisis, se observa un incremento aún mayor en la concentración de ambos aminoácidos siendo significativo respecto a la

Microdiálisis en el hipocampo de la rata *in vivo*

A.



B.

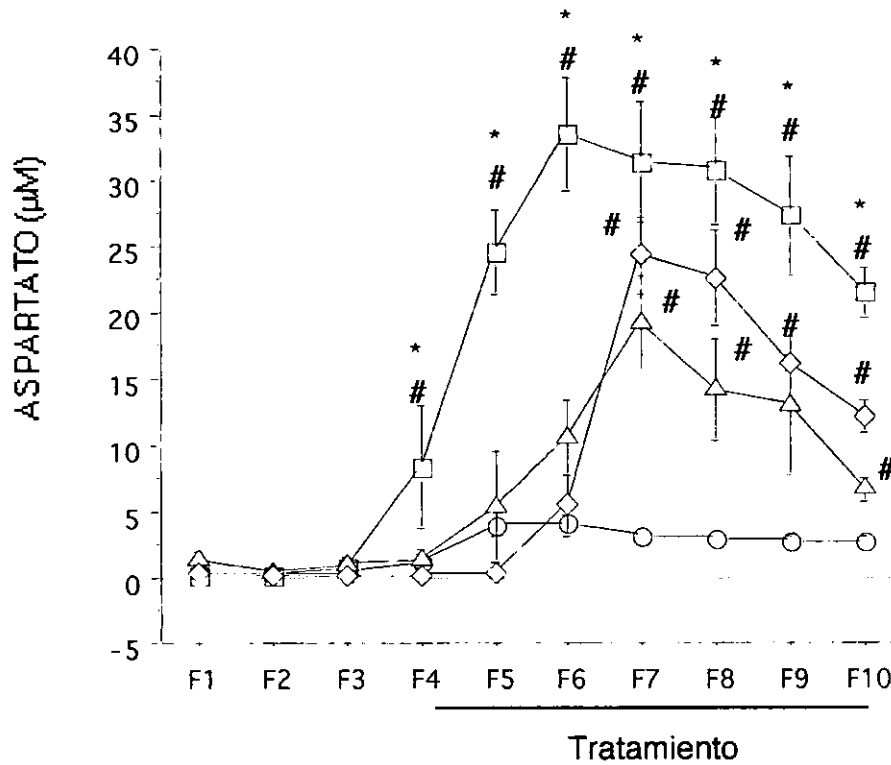
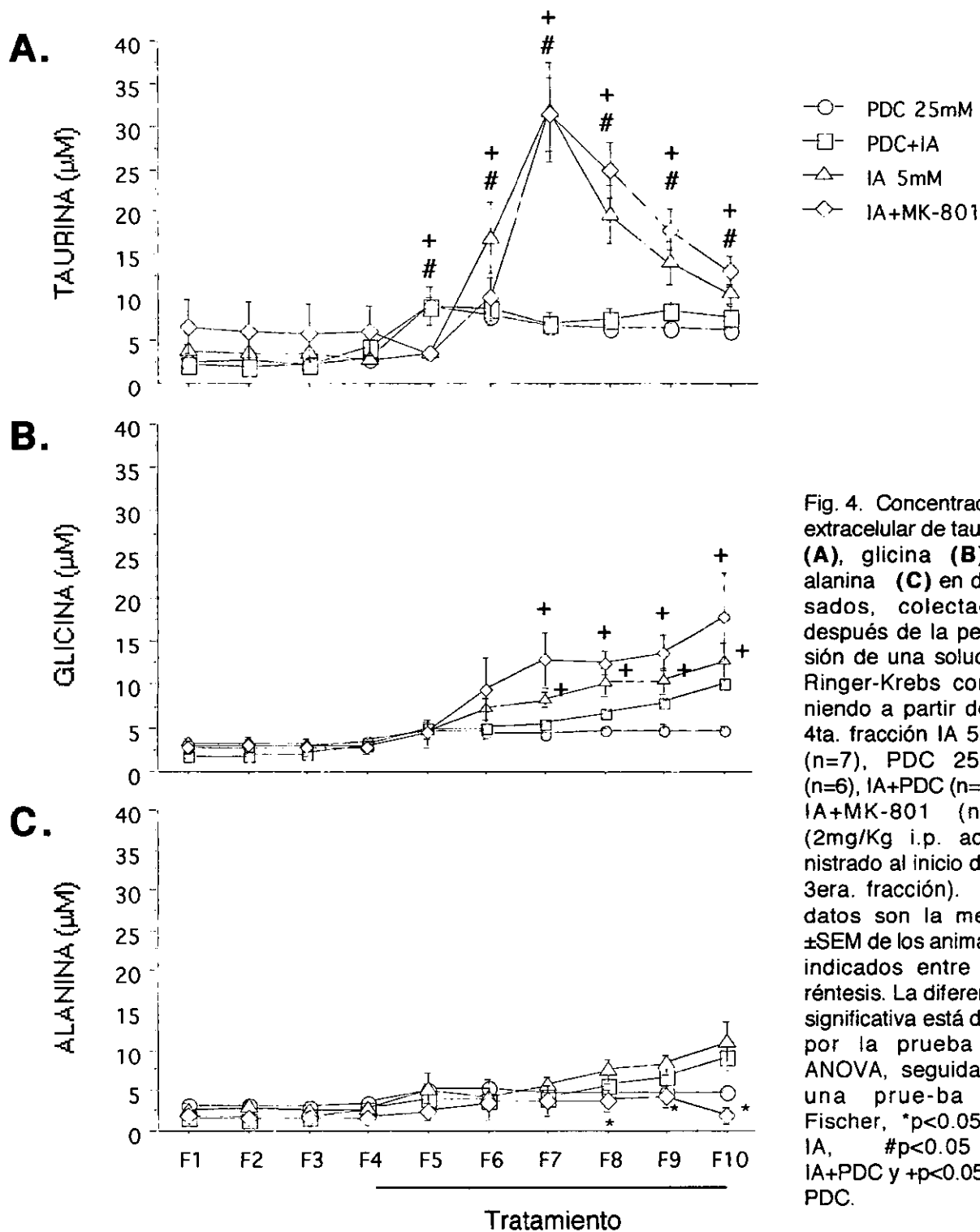


Fig. 3. Concentración extracelular de glutamato (A) y aspartato (B) en dialisados, colectados después de la perfusión de una solución Ringer-Krebs conteniendo a partir de la 4ta. fracción: IA 5mM (n=7), PDC 25mM (n=6), IA+PDC (n=6) o IA+MK-801 (n=5) (2mg/Kg i.p. administrado al inicio de la 3era. fracción). Los datos son la media \pm SEM de los animales indicados entre paréntesis. La diferencia significativa está dada por la prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Fischer, * $p < 0.05$ vs. IA y # $p < 0.05$ vs. PDC.

Microdiálisis en el hipocampo de la rata *in vivo*



administración por separado de cada compuesto.

Además del incremento en la concentración de glutamato y aspartato por la inhibición de la glucólisis, también se observa un incremento en la concentración extracelular de los aminoácidos taurina (8.19 veces) (Fig.4A), glicina (4 veces) (Fig.4B) y alanina (4.18 veces) (Fig.4C) respecto a sus basales. La administración intraperitoneal de MK-801 no modificó el efecto del IA sobre los niveles extracelulares de estos aminoácidos salvo en el caso de la alanina sobre el cual tuvo un efecto inhibitorio. El PDC tuvo un efecto mucho más discreto sobre la concentración extracelular de estos aminoácidos (alanina: 2 veces; glicina: 1.2 veces; y taurina:2.2 veces respecto a sus basales).

La administración de PDC junto con IA produjo una disminución en el efecto del IA sobre los niveles extracelulares de estos aminoácidos (Fig. 4).

V.1.3.Administración crónica con IA

La administración intraperitoneal de IA 25mg/Kg durante cuatro días no produce lesión per se en el hipocampo (Fig. 5A) ni en otra región del cerebro. Sin embargo, algunos animales presentan rigidez en la parte superior de las extremidades posteriores, que se observa en el estiramiento de las patas posteriores cuando camina el animal.

V.1.4.Administración aguda de PDC en ratas tratadas crónicamente con

IA

La inyección intrahipocampal de 500nmolas/ μ l (\approx 500mM) de PDC en ratas tratadas por cuatro días con IA 25mg/Kg (n=13) , causa una lesión mucho mayor que la

Fig.5. Fotomicrografías de secciones de tejido (40 μ m) teñido con violeta de cresilo. Efecto de la inyección intrahipocampal de PDC (500nmolas/ μ l) en ratas tratadas crónicamente por cuatro días con 25mg/Kg de IA por 4 días (la inyección de PDC se realizó al cuarto día, una hora después de la última inyección de IA). **A**)Hipocampo contralateral de la rata tratada con IA más PDC (D). **B**)Hipocampo inyectado con PDC (500nmolas/ μ l) de una rata intacta (n=6). **C**)Hipocampo inyectado con sol. salina 0.9% de una rata tratada con IA (25 mg/Kg por 4 días) (n=3). **D**)Hipocampo inyectado con PDC (500 nmolas/ μ l) de una rata tratada con IA (25 mg/Kg por 4 días) (n=13). Barra=210 μ m. Amplificación 4x.

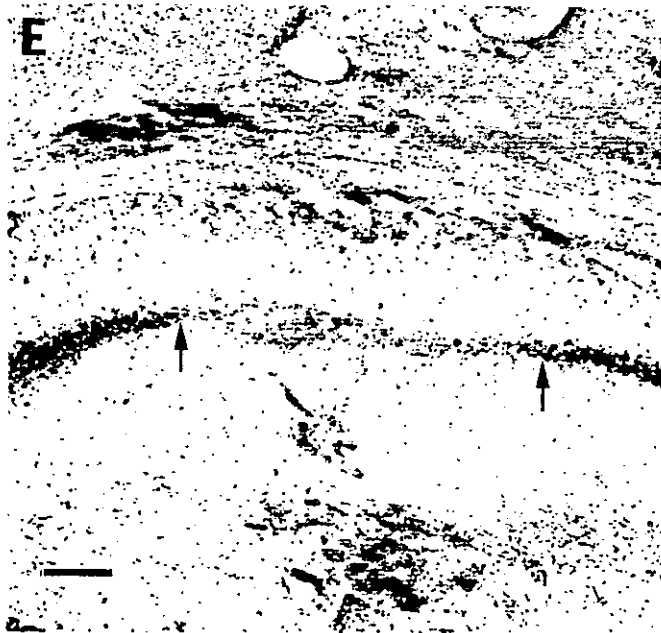
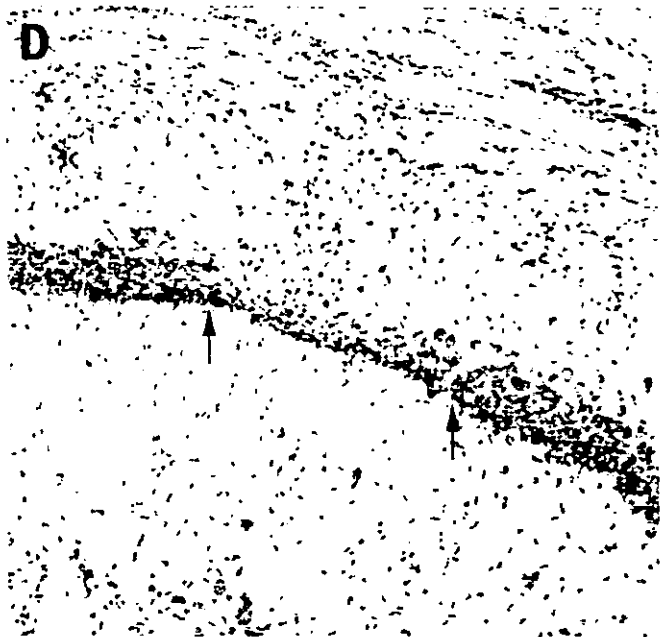
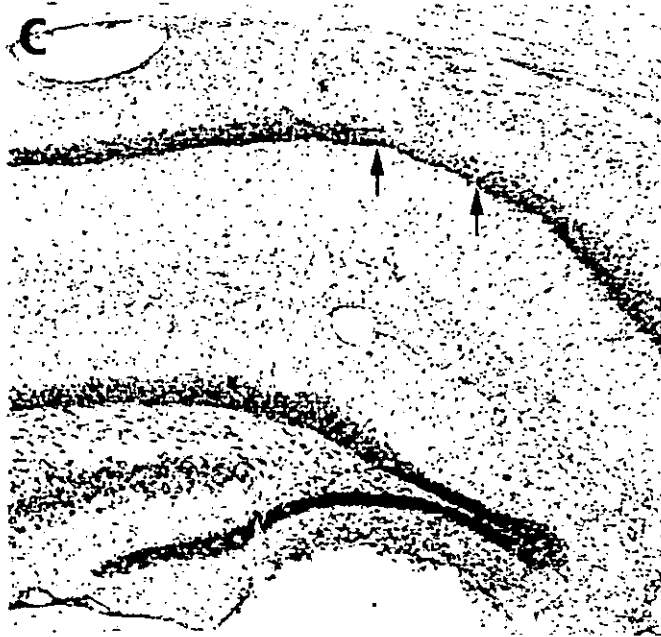
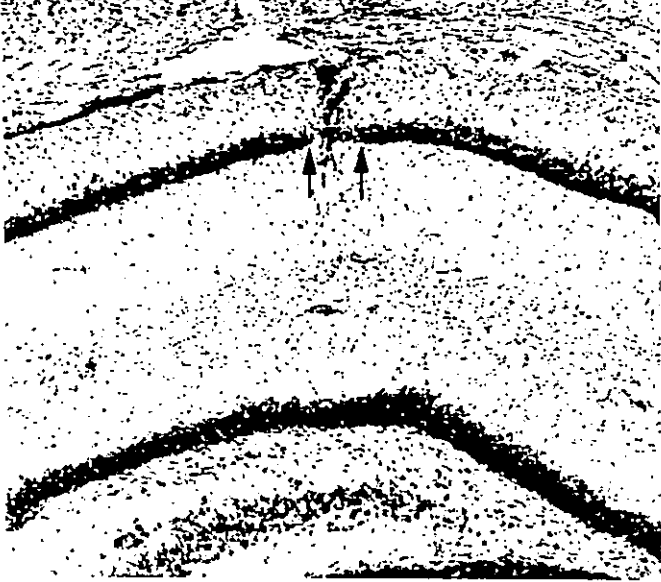


observada por la inyección de PDC en ratas intactas (Fig. 5B) o de solución salina 0.9% en ratas tratadas crónicamente con IA (Fig.5C) en la región CA1 del hipocampo. El daño observado por la inyección de PDC 500nmolas/ μ l en ratas intactas ó de solución salina 0.9% en ratas tratadas con IA se restringe sólo al producido por el tracto de la aguja (Fig.5B y C). Sin embargo, la lesión inducida por el PDC en ratas energéticamente deficientes es mucho mayor que la producida en las ratas intactas siendo estadísticamente significativa (Fig. 9). El estudio histológico del área de lesión muestra la pérdida de las neuronas y células picnóticas en las ratas tratadas con IA+PDC (Fig. 5D). La administración crónica de IA por sí misma no produjo daño neuronal en el hipocampo de la rata (Fig. 5A).

V.1.5. Protección con MK-801

Para estudiar la etiología de la lesión provocada por la inhibición sistémica de la glucólisis más la inhibición local del transporte de glutamato, se investigó la posible participación del receptor NMDA en la muerte neuronal. De esta manera, se bloqueó la activación del receptor NMDA con un antagonista para tratar de proteger contra la muerte neuronal. Para ésto, se inyectó MK-801, antagonista no competitivo del receptor NMDA, a una dosis de 1mg/Kg media hora antes de la inyección intrahipocampal de PDC 500 nmolas/ μ l y media hora después de la última inyección de IA. Como se puede observar en la figura 6, la administración de MK-801 en ratas

Fig. 6. Fotomicrografías de secciones de tejido (40 μ m de espesor) teñido con violeta de cresilo. Efecto de la protección de MK-801 (1 mg/Kg i.p. media hora antes y media hora después de la inyección con PDC) de la lesión producida por la inyección intrahipocampal de PDC (500 nmolas/ μ l) en ratas tratadas crónicamente con 25 mg/Kg de IA durante cuatro días (la inyección intrahipocampal se realizó al cuarto día, una hora después de la última inyección i.p. de IA) . A) Hipocampo de una rata que presenta protección de la lesión producida por IA+PDC al administrarse MK-801. Amplificación de 4x. B) El mismo hipocampo anterior a una amplificación de 10x. C) Hipocampo de una rata parcialmente protegida por MK-801, que presenta una lesión del 45% de la lesión producida por IA+PDC. Amplificación de 4x. D) El mismo hipocampo anterior a una amplificación de 10x. E) Hipocampo de una rata tratada con IA+PDC. F) Hipocampo de una rata intacta inyectado con 500 nmolas/ μ l de PDC. Amplificación de 10x. Barras de: 4x=200 μ m; 10x=100 μ m.

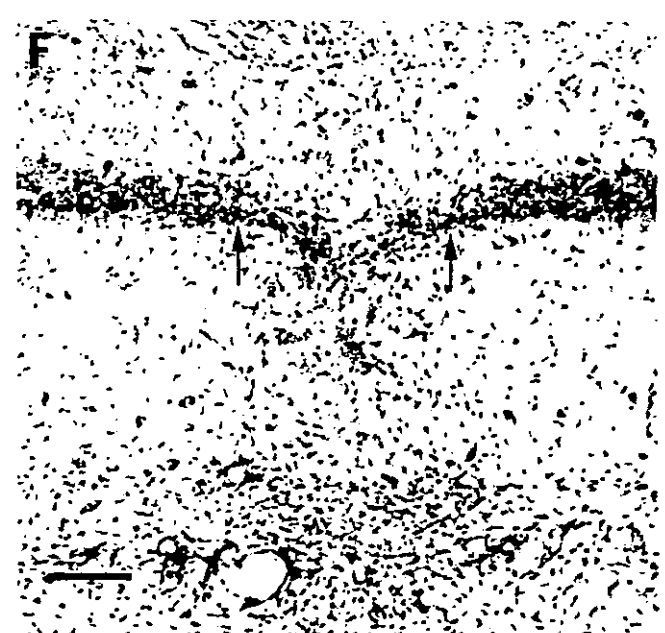
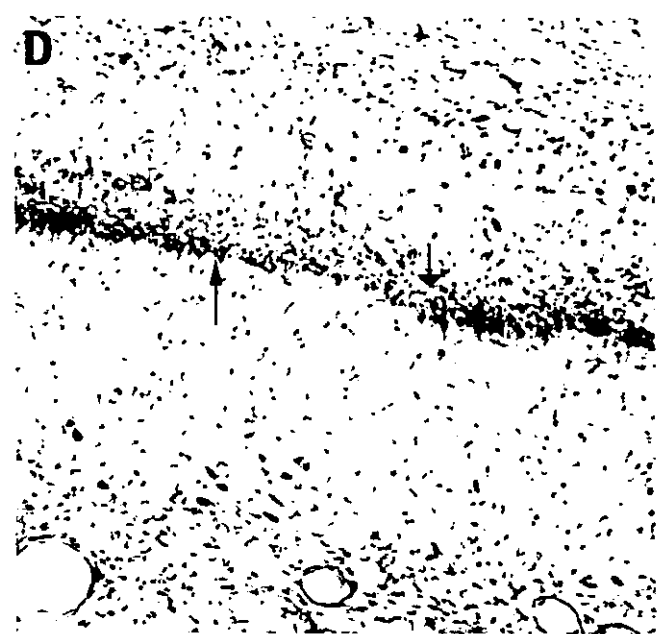
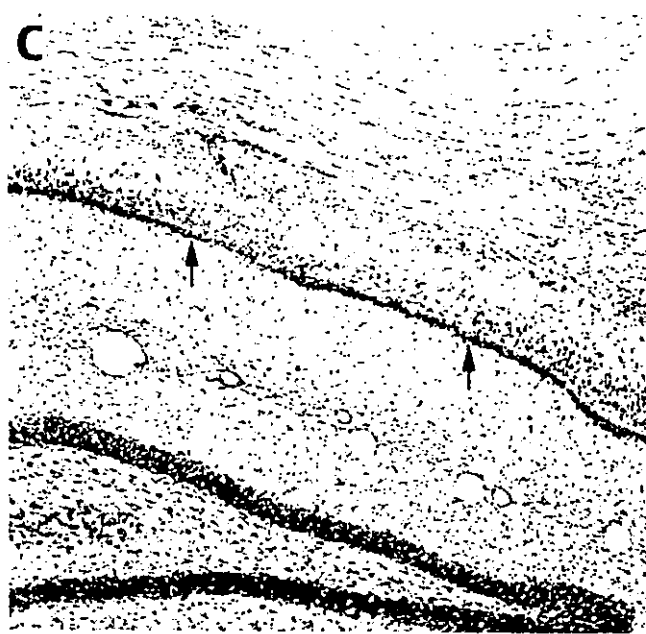
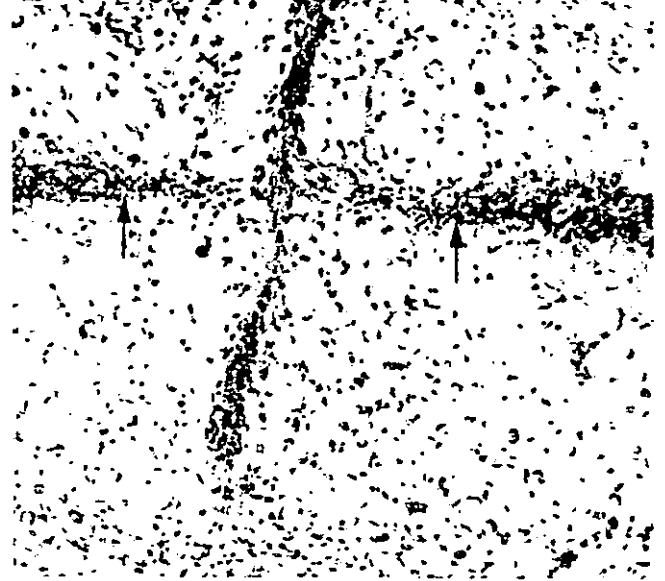


con tratamiento crónico de IA más tratamiento agudo de PDC (n=8), muestra una protección evidente del área de lesión. El área lesionada en estos animales es muy similar a la producida en animales control (Fig. 6A y B): inyectados con PDC en ratas intactas (Fig. 6F) o con solución salina 0.9% en ratas tratadas con IA intraperitoneal. Sin embargo, en las ratas tratadas con MK-801, la lesión presenta características muy particulares, ya que se observan grupos de células picnóticas intercalados con grupos de células normales alejados del sitio de inyección (datos no mostrados). No obstante, en dos ratas de un total de siete, se observó sólo una protección parcial (Fig. 6C y D), la cual corresponde a aproximadamente el 45% del área de lesión producida con IA+PDC (Fig. 6E). Al hacer el promedio del total de los animales, resultó que el tratamiento con MK-801 tiene un efecto protector que es estadísticamente significativo con respecto a los controles (Fig. 9). En estos tejidos más lesionados, la lesión está compuesta por células picnóticas y células con una morfología diferente a la observada en tejidos normales que da la apariencia tanto de hinchamiento como de encogimiento.

V.1.6. Protección con piruvato i.p.

La inhibición de la glucólisis evita la formación de su producto final, el piruvato. Este compuesto es necesario para mantener el ciclo de Krebs en funcionamiento, creando poder reductor para su utilización en la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa. Para estudiar si la muerte neuronal producida por la inhibición

Fig. 7. Fotomicrografías de secciones de tejido (40µm de espesor) teñido con violeta de cresilo. Efecto de la protección por dos inyecciones intraperitoneales de 500 mg/Kg de piruvato (15 min. antes y en el momento de la inyección con PDC) de la lesión producida por el tratamiento con IA+PDC (método mencionado en la fig. 6). A) Hipocampo de una rata que presenta protección de la lesión producida por IA+PDC al administrarse piruvato. Amplificación de 4x. B) El mismo hipocampo anterior a una amplificación de 10x. C) Hipocampo de una rata tratada con IA+PDC e inyectada con piruvato, que no presenta protección. Amplificación de 4x. D) El mismo hipocampo anterior a una amplificación de 10x. E) Hipocampo de una rata tratada con IA+PDC. F) Hipocampo de una rata intacta inyectado con 500 nmolas/µl de PDC. Amplificación de 10x. Barras de: 4x=200µm; 10x=100µm.

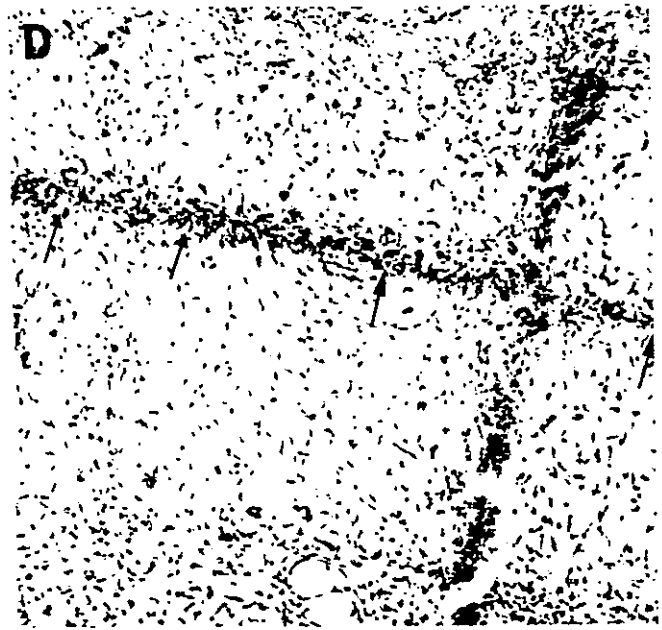


de la glucólisis y del transporte de glutamato se puede evitar por el suministro del producto final de esta vía metabólica, se inyectó 500mg/Kg de piruvato i.p., 15 minutos antes y 15 minutos después de la inyección de PDC en el hipocampo en ratas tratadas crónicamente con IA. La administración de piruvato i.p. protegió de la lesión producida en el hipocampo por el IA+PDC en cinco ratas de siete (Fig. 7A y B), y este efecto es estadísticamente significativo (Fig. 9). La lesión observada en las cinco ratas protegidas es un poco mayor que la lesión que se produce en los controles, sin alcanzar significancia estadística (Fig 9). En las ratas que no se protegieron con piruvato i.p. se observa una lesión del mismo tamaño que en las ratas con IA+PDC. El análisis histológico de la región lesionada en estas dos ratas reveló que no todas las neuronas se encuentran picnóticas, sino que se observa un adelgazamiento de la capa CA1, con neuronas picnóticas y neuronas encogidas cuyos procesos son muy aparentes (Fig.7C y D).

V.1.7. Protección con piruvato i.v.

En vista de la aparente protección observada con la inyección intraperitoneal de piruvato, se trató de observar protección a través de otra ruta de administración. El piruvato (50mM) se inyectó intravenosamente (i.v.) 15 minutos antes de la inyección de PDC 500nmolas/ μ l (\approx 500mM) en animales crónicamente tratados con IA. En este tratamiento, se observó una protección total de la lesión inducida por IA+PDC en cinco ratas de un total de siete (Fig.8A y B). La lesión observada es del mismo

Fig. 8. Fotomicrograffas de secciones de tejido (40 μ m de espesor) teñido con violeta de cresilo. Efecto de la protección por la inyección intravenosa de piruvato (250 μ l de una sol. 200mM) (15 min. antes de la inyección con PDC) de la lesión producida por el tratamiento con IA+PDC (método mencionado en la fig. 6). A) Hipocampo de una rata que presenta protección de la lesión producida por IA+PDC al administrarse piruvato. Amplificación de 4x. B) El mismo hipocampo anterior a una amplificación de 10x. C) Hipocampo de una rata tratada con IA+PDC e inyectada con piruvato, que no presenta protección. Amplificación de 4x. D) El mismo hipocampo anterior a una amplificación de 10x. E) Hipocampo de una rata tratada con IA+PDC. F) Hipocampo de una rata intacta inyectado con 500 nmolas/ μ l de PDC. Amplificación de 10x. Barras de: 4x=200 μ m ; 10x=100 μ m .



Lesión producida en el hipocampo de la rata por IA+PDC y su protección con MK-801 y piruvato

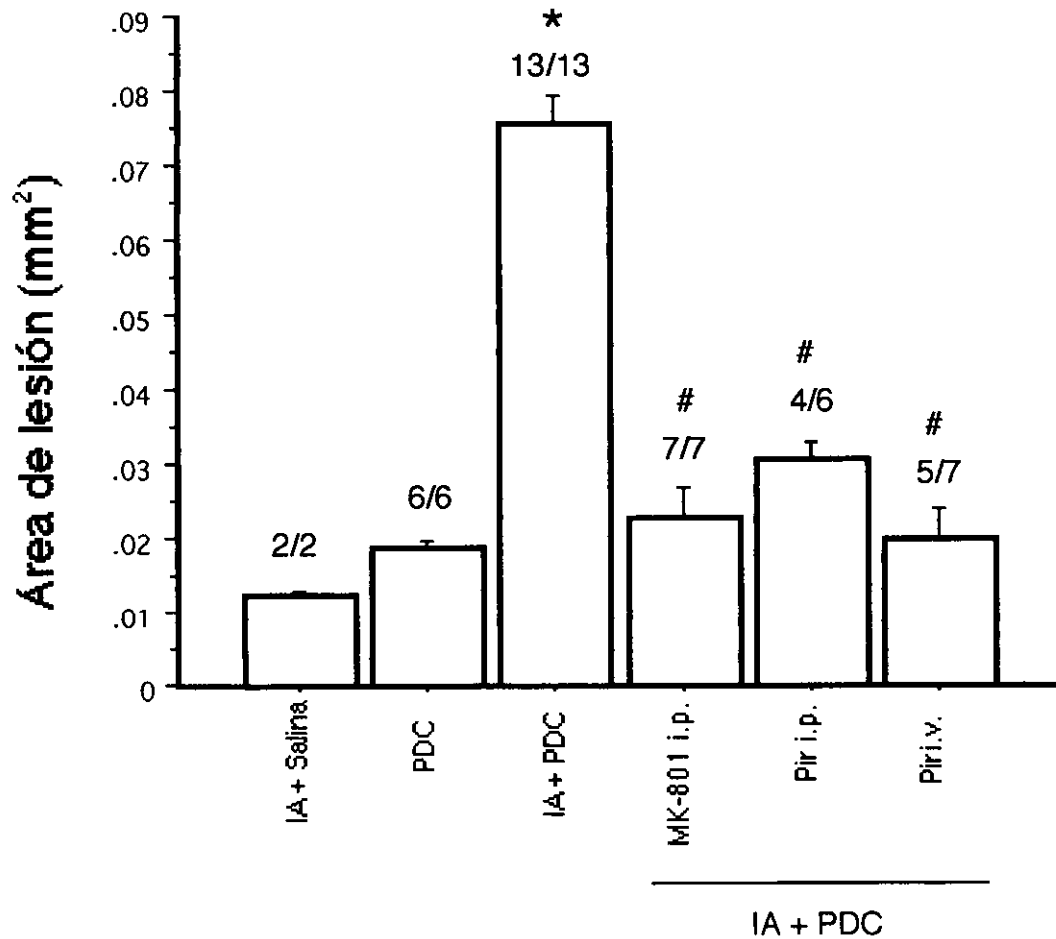


Fig.9. Efecto del tratamiento crónico con IA 25mg/Kg por 4 días (una inyección diaria) sobre la lesión inducida por 500 nmol/ μ l de PDC ó 1 μ l de solución salina 0.9% y efectos protectores contra la lesión producida por IA+PDC de: MK-801 (1mg/Kg i.p.) y piruvato (500 mg/Kg i.p. y 50mmol/250 μ l i.v.) de piruvato. Los animales inyectados con IA+sol. salina o con PDC muestran una lesión discreta que se limita al tracto de la aguja. En los animales tratados con IA+PDC se observa una lesión mucho mayor la cual se puede proteger con MK-801 i.p. o con piruvato i.p. e i.v. Los datos representan la media de los valores \pm SEM para el número de animales indicados sobre las barras. La diferencia significativa esta comparada contra sus respectivos controles por el análisis estadístico de ANOVA seguido de una prueba de Fischer y está indicada como * $p < 0.05$ para el PDC y # $p < 0.05$ para el IA+PDC. El número sobre las barras indica el número de animales incluidos en el análisis con respecto al número total de animales tratados.

tamaño que la de los animales control (Fig. 8F). En las dos ratas que se encuentran lesionadas, se observa una lesión discontinua en la región CA1, con grupos de neuronas picnóticas entre grupos de neuronas normales (Fig 8C y D), mas toda la región en donde se encuentran estos grupos neuronales se encuentra adelgazada (Fig. 8C).

V.2.INHIBICIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO Y TOXICIDAD DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE, MODELO DE EA

V.2.1.Administración aguda del péptido β -amiloide 25-35 en ratas tratadas crónicamente con IA

En vista del aumento en la susceptibilidad neuronal a la muerte inducida por glutamato en el hipocampo al inhibirse la glucólisis con IA, se investigó en este modelo los efectos neurotóxicos del fragmento β 25-35. En este caso se inyectó localmente $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del fragmento β 25-35 a una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en el giro dentado y se observó la lesión producida cuatro días después de esta inyección. Contrario a lo que se esperaba, la inyección de β -amiloide 25-35 en ratas con inhibición glucolítica crónica no incrementó el daño inducido por la inyección de β -amiloide 25-35 en el hipocampo (datos no mostrados). El daño que se observa está restringido al tracto de la aguja.

V.2.2.Administración aguda del péptido β -amiloide 25-35 en ratas tratadas con 3-NP

Se investigó el papel de la inhibición del ciclo de Krebs en la toxicidad del fragmento β 25-35. Se inyectó intraperitonealmente 3-NP 20mg/Kg a ratas adultas de 300-350 y

4 horas después, se inyectó en el giro dentado $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ el fragmento $\beta 25-35$ y se observó la lesión después de cuatro días de inyectado el péptido. En todas las ratas analizadas ($n=7$), se encontró muy lesionada la hoja dorsal del giro dentado, aunque en algunos animales también se observa lesión en la hoja ventral (Fig. 10). El área lesionada es significativamente mayor a la lesión producida por la inyección local del fragmento $\beta 25-35$ (Fig. 10B; Fig. 11) o a la lesión producida por la inyección de solución salina 0.9% en ratas tratadas con 3-NP (Fig. 10C; Fig. 11). Sin embargo, dos ratas de las seis ratas inyectadas con el péptido $\beta 25-35$ mostraron una lesión de un área igual a 0.037 mm^2 , siendo un poco más pequeña que la observada en las ratas tratadas con 3-NP. La lesión producida en los animales tratados con 3-NP más el fragmento $\beta 25-35$ está compuesta por una disminución en el número celular, además de observarse células picnóticas a lo largo de la misma (Fig. 10D). La inyección intraperitoneal de 20 mg/Kg de 3-NP no produjo por si misma lesión en el hipocampo de la rata (Fig. 10A).

Con la finalidad de resumir todo lo realizado en la presente tesis y para que sea más sencilla su comprensión, se encuentran expresados los resultados en la tabla de resumen de resultados (Fig. 12).

Fig.10. Fotomicrografías de secciones de tejido ($40\mu\text{m}$) teñido con violeta de cresilo. Efecto de la inyección intrahipocampal del péptido β -amiloide 25-35 ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en ratas con una inyección de 20mg/Kg i.p. de 3-NP, cuatro horas después del 3-NP. **A)** Hipocampo contralateral de la rata inyectada con 3-NP i.p. más (D). **B)** Hipocampo inyectado con $\beta 25-35$ ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de una rata intacta ($n=6$). **C)** Hipocampo de una rata inyectado con sol. salina 0.9% cuatro horas después de la inyección con 3-NP i.p. ($n=3$). **D)** Hipocampo de una rata inyectado con $\beta 25-35$ ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) inyectada con, cuatro horas después de la inyección con 20 mg/Kg de 3-NP i.p. ($n=7$). Barra= $210\mu\text{m}$. Amplificación 4x.



Lesión producida en el hipocampo de la rata *in vivo* por 3-NP i.p. + el péptido β -amiloide 25-35

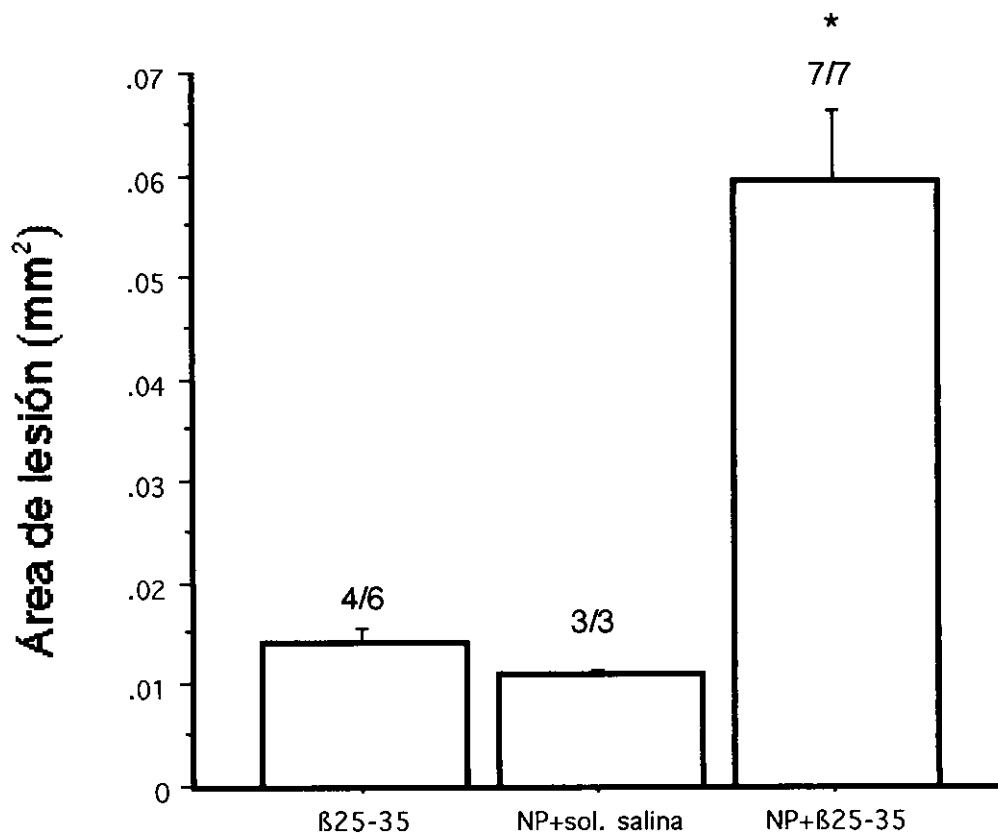


Fig.11. Efecto de la inyección i.p. de 20 mg/Kg de 3-NP sobre la lesión inducida por 1 μ g/ μ l del péptido β -amiloide 25-35 (β A25-35) ó 1 μ l de solución salina 0.9% (cuatro horas después de la inyección de 3-NP). Los animales inyectados con 3-NP+sol. salina o con β A25-35 muestran una lesión discreta que se limita al tracto de la aguja. En los animales tratados con 3-NP+ β A25-35 se observa una lesión mucho mayor. Los datos representan la media de los valores \pm SEM para el número de animales indicados sobre las barras. La diferencia significativa esta comparada contra sus respectivos controles por el análisis estadístico de ANOVA seguido de una prueba de Fischer y está indicada como * p <0.05 para el β A25-35 y para 3-NP+sol. salina. El número sobre las barras indica el número de animales incluidos en el análisis con respecto al número total de animales tratados.

RESUMEN DE RESULTADOS

	DAÑO NEURONAL	CONCENTRACION EXTRACELULAR					PROTECCION
		Glu	Asp	Gly	Tau	Ala	
LOCAL							
IA 50 nmolas/ μ l	+++						
IA + MK-801 i.p.							-
IA + a-tocoferol i.p.							-
IA 25 mM (microdiálisis)	++++	++	+++	+	++	+	
PDC 500nmolas/ μ l	-						
PDC 5mM (microdiálisis)	-	+++	++	-	-	-	
IA + PDC (microdiálisis)	++++	+++	++++	-	-	-	-
IA+MK-801 (microdiálisis)	++++	++	+++	+	++	-	
BA25-35 1 μ g- μ l	\pm (28%)						
SISTÉMICO							
IA 25 mg/Kg (4 dosis)	-						
IA + sol. salina local	-						
IA + PDC local	+++						
IA + PDC local + MK-801 i.p.	-						+++
IA + PDC local + piruvato i.p.	\pm						++ (71%)
IA + PDC local + piruvato i.v.	\pm						++ (71%)
IA + BA25-35 local	-						
3-NP 20 mg/Kg (1 dosis)	-						
3-NP + sol. salina local	-						
3-NP + BA25-35 local	+++						

Fig. 12. Resumen de resultados. En la tabla se muestra todos los experimentos realizados en la presente tesis. El máximo está representado por cuatro +. Si el resultado fue negativo, está expresado por un -. Los experimentos que no se realizaron se encuentran en blanco. La expresión local, representa los experimentos en los que se realizó la inyección aguda en el hipocampo; mientras que la expresión sistémico, se refiere a los experimentos en los que se inyectó intraperitonealmente el compuesto.

VI. DISCUSIÓN

En la presente tesis, se investigó si la inhibición del metabolismo energético incrementa la susceptibilidad de las neuronas a la muerte inducida por la exposición a glutamato o al péptido β -amiloide 25-35, factores que se han relacionado con la muerte isquémica y con la enfermedad de Alzheimer, respectivamente. De esta manera, se utilizaron diversas estrategias experimentales, a través de las cuales se pudo comprobar que un déficit metabólico *in vivo* compromete a las neuronas a los efectos tóxicos del glutamato o del péptido β -amiloide 25-35. Para ésto, se estudió el papel de la glucólisis en la toxicidad del glutamato y del péptido β -amiloide y el papel de la respiración mitocondrial en la toxicidad del péptido β -amiloide.

En el caso de la inhibición de la glucólisis *in vivo*, se observó que ésta juega un papel determinante en la susceptibilidad de las neuronas de la región CA1 del hipocampo a la toxicidad del glutamato, volviéndose tóxico a concentraciones que per se no son tóxicas. La toxicidad del glutamato en estas condiciones, se puede proteger con MK-801, antagonista del receptor NMDA, o con piruvato administrado tanto intraperitoneal como intravenosamente; lo cual indica que posiblemente el mecanismo involucrado en el daño neuronal es la excitotoxicidad secundaria. Sin embargo, la inhibición de la glucólisis no tiene ningún efecto sobre la vulnerabilidad de las neuronas a la toxicidad del péptido β -amiloide.

En el caso de la inhibición del ciclo de Krebs y de la respiración mitocondrial *in vivo*, los resultados indican que las neuronas del giro dentado del hipocampo, se vuelven más susceptibles a la muerte inducida por la exposición del péptido β -amiloide 25-35, en estas condiciones.

VI.1.INHIBICIÓN DE LA GLUCÓLISIS

A)TOXICIDAD DEL GLUTAMATO

VI.1.1.Tratamiento agudo

La inyección aguda de IA en el hipocampo produce una lesión visible desde la primera hora después de la inyección, observándose las células picnóticas a las 24 horas de la misma. Esta lesión no se puede proteger con MK-801 ó con vitamina E. Matthews y colaboradores (1997), encontraron que la administración de IA en el estriado de la rata *in vivo*, produce una lesión muy grande, la cual puede ser parcialmente protegida por decorticación previa, es decir por deafferentación glutamatérgica corticoestriatal. En el presente trabajo no se decorticoó previamente, pero tratamos de proteger inyectando intraperitonealmente el MK-801 para estudiar la participación del receptor NMDA en la muerte neuronal producida por el IA. Como se puede observar en los resultados, no se protegió de la lesión con el MK-801, lo que llevaría a pensar que no se trata de una muerte excitotóxica ya que este compuesto a dosis similares, protege contra lesiones excitotóxicas (Massieu et. al., 1993).

Por otro lado, Uto et al. (1995) observaron que el daño producido por la administración de IA en cultivos neuronales de hipocampo, no se protege con el MK-801 mas sí con el antioxidante vitamina E. A su vez, en el mismo trabajo de Matthews et al. (1997) antes mencionado, observaron la generación de radicales libres como los iones hidroxilo y peroxinitrito en el estriado inyectado con 50nM de IA. Al parecer, el IA además de inhibir a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, inactiva enzimas que contienen grupos tioles. Estos grupos tioles tienen la característica de atrapar radicales libres, sugiriéndose que el efecto del IA sobre las neuronas es el aumento de radicales libres y por esto se puede proteger con atrapadores de radicales libres como la vitamina E. También se ha reportado que la vitamina E

protege contra el daño excitotóxico en cultivos neuronales del cerebelo (Ciani et. al., 1996). Sin embargo, en el presente trabajo, la lesión producida con IA inyectado en el hipocampo tampoco se pudo proteger con vitamina E a la dosis utilizada.

Aparentemente, la inyección de 50nmolas de IA en el hipocampo es sumamente tóxica y puede ser esta la razón por la cual no se pudo proteger ni con MK-801 ni con vitamina E. Posiblemente utilizando una concentración menor de IA, se habría podido discernir el mecanismo del daño. Sin embargo, para poder investigar los efectos del IA en el hipocampo se decidió utilizar otras estrategias experimentales.

VI.1.2. Microdiálisis

Para estudiar si la inhibición de la glucólisis causa el incremento de aminoácidos en el espacio extracelular, se investigó el efecto del IA administrado a través de cánulas de microdiálisis en el hipocampo.

Como se puede observar en los resultados, el IA provoca el incremento de glutamato extracelular, casi de la misma manera que lo hace el PDC, inhibidor del cotransportador de Na^+ /glutamato (6.7 veces y 8.3 veces más respecto a la concentración basal, respectivamente). Cuando se administran simultáneamente el PDC y el IA, se observa una mayor salida que la inducida por cada compuesto por separado, siendo éste un efecto sumatorio. Ésto posiblemente indica que el incremento en la concentración extracelular de glutamato puede ocurrir por el mismo mecanismo, esto es, por la inhibición de la recaptura o cambio de dirección del cotransportador de Na^+ /glutamato. Se ha reportado en varios artículos que el IA causa una disminución en la concentración de ATP (Madl y Burgesser, 1993; 13; Nakamura et al., 1995). Como se mencionó en la introducción, la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, responsable de mantener el potencial de membrana en reposo, depende del ATP para su funcionamiento. Al inhibirse la glucólisis con IA, la disminución de

ATP causa que la bomba Na^+/K^+ -ATPasa funcione deficientemente, disminuyendo el gradiente de Na^+/K^+ . Ésto provoca que el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{glutamato}$, el cual depende del gradiente de Na^+ para su funcionamiento, deje de funcionar o cambie la dirección de su funcionamiento, liberando glutamato al espacio extracelular. Se ha demostrado que la inhibición de la glucólisis por IA en el nervio óptico de la rata, causa la inhibición completa de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, ya que al agregar ouabaina, inhibidor específico de esta bomba, no se observa mayor despolarización (Leppanen y Stys, 1997). También se ha observado que al agregar IA a astrocitos de rata, se inhibe en un 90% la recaptura de glutamato (Ninomiya et. al., 1994). Madl y Burgesser (1993), utilizando rebanadas de hipocampo de la rata, demostraron que la liberación de AAE causada por el IA se debe al mecanismo antes explicado, ya que al agregar simultáneamente IA y ouabaina, no se ve potenciación de la liberación. Además, se ha demostrado en el axón de rata, que la despolarización con alto potasio extracelular, lo que altera el gradiente de este ión, causa la liberación de glutamato, sugiriendo que el buen funcionamiento del cotransportador requiere del mantenimiento del gradiente de Na^+/K^+ (Nakamura et al., 1995) En el presente trabajo no cuantificamos la concentración de ATP ni agregamos inhibidores de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, sin embargo los resultados apoyan la hipótesis de que el incremento en la concentración extracelular de glutamato se debe al cambio en la dirección del funcionamiento del cotransportador de $\text{Na}^+/\text{glutamato}$, ya que al agregar el inhibidor específico del transportador junto con IA, no se observó ningún efecto de potenciación. Al parecer, lo que puede estar sucediendo es que con el IA, no se logran inhibir todos los transportadores presentes en la zona de microdiálisis o los que son sensibles a PDC, y por esta razón, al coadministrar este inhibidor, se abarca un número mayor de transportadores, lo que causa una mayor salida de glutamato. Por lo anterior, el incremento en la concentración extracelular de este aminoácido

durante un evento isquémico puede ser debido al compromiso metabólico en el que se encuentran las células, provocando que el cotransportador de Na^+ /glutamato tenga un funcionamiento deficiente o cambie su dirección, sacando glutamato al espacio extracelular en lugar de capturarlo. También existe la posibilidad de que el glutamato salga por un proceso de hinchamiento celular y sea utilizado como osmolito.

En los resultados también se observa que el IA tiene un efecto mucho más evidente en la salida de aspartato (20 veces más respecto a la concentración basal) que con el PDC (10 veces más respecto a la concentración basal). El cotransportador puede transportar tanto glutamato como aspartato; sin embargo, en condiciones normales, el glutamato se encuentra más disponible que el aspartato (el contenido endógeno de estos aminoácidos es de 6 glutamato por cada aspartato), por lo que se observa una mayor concentración extracelular de glutamato que de aspartato en condiciones basales (proporción de 2.5:1 respectivamente). Existen varios trabajos que demuestran que la inhibición de la glucólisis con IA tiene como consecuencia la liberación de glutamato y especialmente de aspartato (Sandberg et. al., 1986; Madl y Burgesser, 1993; Ninomiya et. al., 1994 ; Nakamura et al., 1995). En estos trabajos se observa que la inhibición del metabolismo energético se acompaña con un incremento en el catabolismo de glutamato y de un incremento en la concentración intracelular de aspartato, lo que representa posiblemente la conversión de glutamato a aspartato. Además, en estudios de microdiálisis utilizando modelos de isquemia global en el cerebro del conejo (Baker et al., 1991) o de isquemia focal en el cerebro de la rata (Matsumoto et al., 1993), se ha demostrado el incremento en la concentración extracelular de glutamato y en mayor medida, de aspartato. En el presente trabajo, al inhibir solamente el cotransportador de Na^+ /glutamato, se observa una salida menor de aspartato que de glutamato (proporción de 1:2.6 respectivamente), indicando que este último se encuentra más disponible. Sin

embargo, en condiciones de déficit metabólico, se libera mucho más aspartato que glutamato, en una proporción de 2.1:1, respectivamente. Lo anterior puede indicar que el glutamato está siendo utilizado como sustrato metabólico y por lo tanto no se encuentra disponible, mientras que el aspartato sí lo está, por lo tanto, el cotransportador extruye al aspartato.

Por otra parte, en cultivos de astrocitos y de algunos tipos neuronales, el glutamato puede ser utilizado como fuente principal metabólica (Hertz et al., 1988). Si la glucólisis es inhibida con IA, los niveles de citrato pueden disminuir por la deficiencia de acetil-CoA proveniente del piruvato, mientras que la concentración de oxaloacetato se puede incrementar. Estos cambios metabólicos pueden provocar la disminución de α -cetoglutarato, provocando la inhibición de la producción de ATP del ciclo de Krebs. En esta condición, se puede acelerar la conversión de oxaloacetato a α -cetoglutarato por la enzima aspartato aminotransferasa. Esta reacción consume glutamato, el cual existe en grandes concentraciones en la célula y produce aspartato. En el presente trabajo no se midió la concentración restante de los aminoácidos en el tejido después del tratamiento con IA, sin embargo, si se encontrara en el tejido una disminución mayor de glutamato que de aspartato, sería indicativo de que el glutamato efectivamente se está usando como sustrato metabólico, mientras que el aspartato queda disponible para extruirse por el transportador. Ésta podría ser la explicación por la que se ve un incremento muy importante en la liberación de aspartato extracelular por el IA. En un futuro sería pertinente realizar esta cuantificación para poder concluir si realmente ésto es lo que está sucediendo.

Otra hipótesis que explica la salida de glutamato y aspartato se refiere a la activación del receptor a NMDA como causante de esta liberación. Zeevalk y Nicklas (1990) demostraron en la retina de pollo que al inhibir con IA más cianuro de sodio, ocurre

una liberación de glutamato y aspartato; y si a ésto se le agrega MK-801 simultáneamente, la liberación de glutamato tiene un retraso de 10 minutos y una disminución del 30%. Estos resultados señalan que la activación del receptor a NMDA está implicada en la liberación de glutamato en un 30%. En los resultados obtenidos en este trabajo, al agregar MK-801 junto con IA, se observó un retraso de 10 minutos en la elevación del glutamato y una inhibición en la salida del 27%, siendo muy similar a lo obtenido por Zeevalk y Nicklas, lo que señala que el receptor a NMDA está implicado en una fracción de la liberación.

A su vez, la concentración de glicina incrementa 4 veces respecto a su basal con el tratamiento de IA. Ésto concuerda con estudios de microdiálisis en un modelo de isquemia global en el cerebro del conejo, donde se ha observado que la concentración extracelular de la glicina incrementa 4 veces y se mantiene después del período isquémico (Baker et al., 1991). Este incremento también se ha encontrado en modelos de isquemia focal en el cerebro de la rata, específicamente en el hipocampo (Matsumoto et al., 1993).

Como se mencionó en la introducción, la glicina es un coagonista del receptor a NMDA. Los resultados presentes y estudios en modelos de isquemia, demuestran que la concentración de este aminoácido se eleva, en esas condiciones. El incremento en la concentración extracelular de glicina conllevaría a la facilitación de la activación del receptor NMDA, y a su vez contribuiría a la muerte excitotóxica. Ya que este incremento se mantiene después del período isquémico, podría ser el responsable de la muerte excitotóxica retrasada. Además, se ha observado que al bloquear el sitio de unión de la glicina al receptor se protege contra el daño isquémico (Palet et al., 1989). Por lo tanto, ésta podría ser otra estrategia para proteger contra el daño isquémico.

En nuestro estudio de microdiálisis también se observó que hay una salida

considerable de taurina al administrar IA (8.2 veces respecto a su basal) siendo mucho menor la inducida con PDC (2.2 veces respecto a su basal).

La salida de taurina y glicina puede deberse a varios factores: por hinchamiento celular, y su utilización como osmolitos; por despolarización; o por el cambio de dirección en el funcionamiento de sus transportadores.

Es muy probable que la salida de estos aminoácidos por el tratamiento con IA no se dé por despolarización, ya que el PDC (el cual causa el incremento de [glutamato]_e, activando éste sus receptores y a su vez causando una despolarización) provoca un incremento muy pequeño en la concentración extracelular de los mismos, que no es significativo (la glicina se incrementa en 1.2 veces respecto a su basal; mientras que la taurina se incrementa 2.2 veces respecto a su basal). Otra evidencia que apoya lo anterior son los resultados obtenidos en el tratamiento con IA más MK-801 (que evita la despolarización provocada por la activación del receptor NMDA), que no mostraron disminución en la salida de estos aminoácidos.

Lo anterior indica que la salida de taurina y de glicina por IA se puede estar dando por hinchamiento celular y/o por el cambio de dirección en el funcionamiento de sus cotransportadores quienes también dependen del gradiente de Na⁺; mas no por despolarización. Saransaari y Oja (1998) encontraron que la liberación de taurina producida en un modelo bioquímico de isquemia (en el que se perfunde en rebanadas de hipocampo de ratón, un medio libre de glucosa y se burbujea N₂ en lugar de O₂), es un proceso dependiente de sodio . En el estudio de Saransaari, también se observó que la taurina puede ser liberada a través de un canal de cloro ya que antagonistas del mismo disminuyen ligeramente su salida. Por lo anterior, es probable que la liberación de la taurina y también de la glicina observada en el presente trabajo, sea por los transportadores, aunque no se puede excluir la posibilidad de la salida por hinchamiento celular a través de algún canal aniónico.

Ésto último se tendría que investigar utilizando bloqueadores de canales aniónicos, para discernir si en el presente modelo también intervienen.

El incremento en la salida de la alanina inducida por IA, es más pequeño que el de los demás aminoácidos (3 veces respecto a su basal). Sin embargo, esta salida se inhibe con el MK-801, lo que produjo solamente un aumento de 1.6 veces respecto a su basal. Estos resultados hacen suponer que de alguna manera el receptor a NMDA está involucrado en la salida de este aminoácido. Zeevalk y Nicklas (1990) en la retina de pollo, también observaron la salida de alanina en presencia de IA dependiente de la activación del receptor a NMDA. En el estudio anterior, la salida de alanina se da después de que la lesión histológica en el tejido es evidente, y esta lesión está mediada por la activación del receptor NMDA.

Como se puede observar, el IA provoca la salida especialmente de glutamato y aspartato, pero también de glicina, taurina y alanina (4.2 veces; 8.2 veces; y 3 veces sobre la basal, respectivamente). Cuando se perfunden IA y PDC simultáneamente, se ve una disminución en la salida de estos tres últimos aminoácidos (3.5 veces; 2.2 veces; y 2.7 veces respectivamente). Una posible explicación de esta salida puede ser la siguiente. Durante el tratamiento con IA, las células se pueden estar hinchando lo que causaría el movimiento de iones y osmolitos para evitar el hinchamiento. Los aminoácidos pueden estar actuando como osmolitos, dándose una salida masiva de todos. Sin embargo, cuando se agrega además del IA, el PDC, se da un incremento mucho mayor en la salida de glutamato y aspartato. Esta salida podría estar acompañada por la salida de moléculas de agua acompañando al Na^+ , ya que el PDC es un inhibidor sustrato, ésto es, entra y bloquea el transportador causando el movimiento de iones, evitándose así el hinchamiento. Ésto provocaría que ya no se requiera el movimiento de otros osmolitos como la glicina, la taurina y la alanina; y tal vez por esta es la razón por la cual se observa una disminución en su liberación.

Alternativamente, la salida de todos los aminoácidos inducida por el IA puede deberse al deterioro de las membranas celulares causada por los efectos tóxicos del IA. Para estudiar esta posibilidad es necesario examinar el tejido perfundido sacrificando a las ratas inmediatamente después del experimento de diálisis. En el presente estudio los animales se sacrificaron una semana después del experimento y el análisis histológico reveló una lesión muy evidente en la región perfundida del hipocampo.

VI.1.3.Tratamiento crónico

Ya que la inyección aguda de IA en el hipocampo demostró ser muy tóxica, se decidió montar un modelo en el que la glucólisis estuviera crónicamente inhibida y en esta condición, incrementar los niveles de glutamato extracelular a una concentración que por si sólo no fuera tóxica. Ésto se realizó para tener las dos condiciones observadas durante un evento isquémico: inhibición del metabolismo energético e incremento de los AAE. Como se puede observar en los resultados, la inhibición crónica de la glucólisis por 25 mg/Kg de IA inyectado intraperitonealmente durante cuatro días, no causó lesión por si misma. Ésto concuerda con lo reportado por Matthews et al., quienes observaron que la inyección intraperitoneal de 20mg/Kg de IA por 5 días, no produce lesión. En el presente trabajo, también se observó que la inyección en el hipocampo de la rata de 500 nmolas/ μ l de PDC, inhibidor del transportador de glutamato, produce una lesión que sólo se suscribe al tracto de la aguja. Sin embargo, cuando se presentan las dos condiciones simultáneamente, la inhibición de la glucólisis y la inhibición del transportador de glutamato, se observa una potenciación de la lesión. Estos resultados señalan que las neuronas con un déficit metabólico, se vuelven vulnerables a una concentración de glutamato que per se no es neurotóxica, en condiciones energéticas normales. Lo anterior se puede explicar

de la siguiente manera. Es predecible que con la administración crónica de IA, los niveles de ATP descieran. En estas condiciones, las células pueden mantener su homeostasis en el umbral, obteniendo la energía por vías alternas (e.g. cetogénesis y utilización de aminoácidos para suplementar el ciclo de Krebs). Al administrarse PDC, las células se ven expuestas a un incremento en la concentración de glutamato, lo que provoca la activación de receptores a glutamato, causando la despolarización de la membrana. En condiciones normales, el potencial de membrana se recupera rápidamente por la actividad de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa; sin embargo, cuando las células se encuentran energéticamente deficientes, el potencial de membrana no se recupera ya que esta bomba requiere de ATP. Como consecuencia, se puede dar la activación continua de los receptores a glutamato, especialmente del receptor a NMDA. Este receptor depende del potencial de membrana para su inactivación y se encuentra bloqueado por un ión Mg^{2+} cuando la membrana celular está en reposo. Por lo tanto, al estar continuamente despolarizada la membrana por la inhibición glucolítica, el receptor NMDA puede estar continuamente abierto, lo que a su vez genera la entrada masiva de iones de Ca^{2+} . La mitocondria es el organelo encargado de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} , capturándolo cuando se eleva su concentración intracelular. Sin embargo, si el potencial de la membrana mitocondrial se colapsa, la capacidad de amortiguamiento de los iones de Ca^{2+} disminuye. El incremento en la concentración intracelular de calcio provoca la activación de una cascada de enzimas que participan en el proceso de muerte celular, como las proteasas, fosfolipasas y nucleasas; observándose finalmente la muerte de las neuronas.

El mecanismo antes descrito, difiere aunque no se contrapone al propuesto por Zeevalk y Nicklas (1991), quienes no encontraron un incremento en la concentración extracelular de glutamato en presencia de IA, pero sí muerte neuronal. Sin embargo,

en el presente trabajo, la administración sistémica de IA por si sólo no produjo muerte neuronal. Una posible explicación de esta diferencia es que ellos trabajaron en un tejido *in vitro*, mientras que en este trabajo se utilizó el animal completo. Además, como no se midió la concentración de ATP en los animales tratados con IA, no se sabe qué tanto disminuye la concentración de este fosfato de alta energía, aunque podría suponerse que este tratamiento disminuye parcialmente la concentración de ATP en el cerebro. Sin embargo, nuestros resultados apoyan la hipótesis de una muerte excitotóxica secundaria, ya que la elevación de glutamato en animales energéticamente normales, no produce lesión. No obstante, este modelo presenta una diferencia con la muerte excitotóxica secundaria descrita por estos autores, ya que señala que se requiere de un pequeño incremento en la concentración extracelular de glutamato para que se observe muerte celular después de la inhibición de la glucólisis.

VI.1.4. Neuroprotección

En la literatura se encuentra reportado que la lesión producida *in vitro* por el IA en diferentes modelos se puede bloquear con antagonistas del receptor a NMDA y/o suministrando ácidos monocarboxílicos como el lactato o el piruvato durante la inhibición glucolítica. Sin embargo, ésto ha sido sujeto a gran debate ya que no en todos los modelos se protege de la lesión con estos compuestos.

Para poder identificar si la muerte observada en el presente trabajo depende de la activación del receptor a NMDA, se inhibió su activación con el antagonista no competitivo, MK-801. Como se muestra en los resultados, en este modelo el MK-801 sí protege de la lesión producida por la administración conjunta de IA+PDC. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zeevalk y Nicklas (1990), quienes también lograron proteger de la lesión producida por 1mM de IA en la retina de pollo,

al agregar MK-801; y contradicen lo obtenido por Uto et. al. (1995), quienes no pudieron proteger con este antagonista en cultivos neuronales. La diferencia en los resultados obtenidos por Uto y sus colaboradores es que utilizaron cultivos de neuronas, mientras que en el trabajo de Zeevalk y Nicklas, y en el presente trabajo, se utilizó preparaciones mucho más complejas como la retina de pollo o el animal completo, respectivamente. Por lo anterior, la muerte neuronal observada en el presente trabajo aparentemente está mediada por un mecanismo dependiente de la activación de los receptores a NMDA, ya que el MK-801 protegió eficientemente la lesión producida en nuestras condiciones experimentales.

Por otro lado, el piruvato también ha sido utilizado como agente protector de la lesión producida por el IA. Se ha observado que el piruvato puede ser utilizado como fuente de carbono por las neuronas durante la privación de glucosa (Williams et. al., 1996). Al parecer, el piruvato puede ser capturado por las neuronas a través de un transportador de ácidos monocarboxílicos presente en la membrana celular (Williams et. al., 1996). Mientras que Zeevalk y Nicklas (1990) no lograron proteger de la lesión producida por la aplicación de IA 1mM en la retina de pollo con piruvato, otros autores sí han observado protección y mantenimiento de funciones celulares, al administrar piruvato en modelos de inhibición glucolítica por IA (Izumi et al., 1994; Fliesler et al., 1997); además de que se ha demostrado en cultivos neuronales de hipocampo que el piruvato protege de la muerte neuronal retrasada después de la exposición a glutamato, al incrementar la capacidad de amortiguamiento mitocondrial del Ca^{2+} (Ruiz, et. al., 1998). En el presente trabajo, se trató de proteger con la administración de piruvato por diferentes rutas. La primer ruta utilizada fue la inyección intraperitoneal de piruvato, la cual protegió de la lesión en cinco ratas de siete. Las desventajas de esta ruta de administración es que se tiene que administrar una concentración mucho más elevada para asegurar el suministro de este compuesto al

cerebro. Por lo anterior, se investigó una segunda ruta de administración, la inyección intravenosa. En esta ruta, se utilizó una concentración menor pero más prolongada de piruvato y se inyectó en la vena lateral de la cola de la rata. Como se puede observar en los resultados, cinco ratas de siete fueron totalmente protegidas de la lesión producida por IA+PDC por la administración intravenosa de piruvato. Existe la posibilidad que las ratas lesionadas que recibieron este tratamiento, no estuvieron bien inyectadas, debido a problemas experimentales, siendo ésta posiblemente la razón por la que no se protegieron. Otra posibilidad es la susceptibilidad individual de los animales.

B)TOXICIDAD DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE 25-35

El 28% (2 de 7) de los animales inyectados con el péptido β -amiloide en el giro dentado del hipocampo a una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ presentó lesión. Sapolsky y colaboradores (1992), observaron que la inyección del péptido β -amiloide en el giro dentado del hipocampo de la rata produce una lesión en el 10% de los animales inyectados; sin embargo en este trabajo se utilizaron dosis más pequeñas (5-1000pg/ μl). En el presente trabajo el porcentaje de animales lesionados fue mayor, pero se inyectó el péptido más concentrado ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$). La baja toxicidad del fragmento 25-35 de la A β nos llevó a explorar condiciones que pudieran exacerbar esta toxicidad y que pudieran darse en la EA.

VI.1.5.Tratamiento crónico

Contrario a lo que se esperaba, la inhibición crónica de la glucólisis por IA, no incrementa la toxicidad del péptido β -amiloide 25-35 en el hipocampo de la rata *in vivo*. Aunque se ha reportado en pacientes con EA la disminución en la utilización de glucosa en el cerebro (Schapira, 1996; Pettegrew et al., 1994), estos resultados

indican que en el modelo utilizado en este trabajo, la inhibición de la glucólisis no tiene una contribución importante en efecto tóxico del péptido β -amiloide.

VI.2. INHIBICIÓN DEL CICLO DE KREBS

En la enfermedad de Alzheimer también se han observado defectos en el ciclo de Krebs (Greene y Greenamyre, 1996), además de existir muchos estudios que demuestran la toxicidad del 3-NP, inhibidor de la succinato deshidrogenasa (3-NP) (Greene y Greenamyre, 1996). Por otra parte, se ha demostrado que la toxicidad de este inhibidor es dependiente de la edad, siendo más tóxico mientras mayor edad tiene el animal (Beal et al., 1993). En el presente trabajo, se observó que la inhibición del ciclo de Krebs y de la respiración mitocondrial por el 3-NP incrementa la vulnerabilidad neuronal a la muerte por el péptido β -amiloide 25-35. En la literatura existe una gran cantidad de datos que demuestran como en los adultos de edad avanzada hay un incremento en la formación de radicales libres. Este incremento puede provocar mutaciones en el ADN nuclear y especialmente en el ADN mitocondrial. Los genes de la mitocondria codifican enzimas del ciclo de Krebs, de la cadena transportadora de electrones y de la fosforilación oxidativa; y al mutarse estos genes se puede desencadenar un déficit metabólico. Como se mencionó en la introducción, se ha observado un gran número de mutaciones en el ADN mitocondrial de cerebros de pacientes con EA (Greene y Greenamyre, 1996, entre otros). Por lo anterior, los resultados aquí presentados demuestran que la inhibición del ciclo de Krebs y de la respiración oxidativa provoca que el péptido β -amiloide 25-35 sea tóxico en todos los animales a una concentración que por sí sola lo es sólo en el 28% de los casos, sugiriendo la participación de la inhibición del metabolismo energético como posible condicionante de la muerte neuronal observada en la EA. La proteína

A β y su péptido activo 25-35 puede desestabilizar la homeostasis del Ca $^{2+}$. Durante el compromiso energético, la entrada de Ca $^{2+}$ se incrementa al disminuir la energía y bajar la capacidad para mantener los gradientes iónicos. En estas condiciones la potenciación de la toxicidad del β 25-35 puede ser explicada. Por otro lado, parte de los efectos tóxicos *in vitro* de la A β se deben a la generación de radicales libres y éste también podría ser el mecanismo del incremento en la muerte neuronal en el hipocampo.

En este trabajo se puede observar que la inhibición de la glucólisis por IA no tuvo ningún efecto en la toxicidad al péptido β 25-35, mientras que la inhibición del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria por 3-NP incrementó la toxicidad de este péptido. Este incremento en la susceptibilidad neuronal provocada por el 3-NP se puede explicar por lo siguiente. El 3-NP administrado intraperitonealmente durante cuatro días, lesiona algunas regiones del cerebro como el estriado y el hipocampo (25% de los animales) (Massieu y Sánchez, 1999); sin embargo, el presente trabajo y otros estudios (Matthiews et. al., 1997) no han reportado que el IA administrado intraperitonealmente sea capaz de lesionar alguna región del cerebro. Además, la administración intrahipocampal de PDC produce una lesión mucho mayor en los animales tratados sistémicamente con 3-NP que con IA (Massieu y Sánchez, 1999; y el presente trabajo). Ésto indica que el 3-NP incrementa más la vulnerabilidad neuronal a la muerte que el IA. Es probable que el 3-NP disminuya más los niveles de ATP que el IA; y por lo tanto las neuronas sean más susceptibles; sin embargo, en el presente trabajo no se midió la concentración de ATP en ambas condiciones de inhibición del metabolismo energético. No obstante, estudios preliminares de inmunohistoquímica con los cerebros de los animales utilizados en estos experimentos han demostrado que los cerebros de animales tratados con 3-NP son inmunopositivos para la proteína Heat-shock, mientras que los cerebros de animales

tratados con IA no expresan esta proteína. Ésto podría ser indicativo de que el 3-NP compromete más a las neuronas y las mantiene en un estado anormal que el IA, por lo que al administrarse el péptido β -amiloide, se observa muerte neuronal.

VII. CONCLUSIONES

La inhibición crónica de la glucólisis incrementa la vulnerabilidad a la muerte neuronal por el incremento en la concentración extracelular de glutamato al inhibir su recaptura. Los resultados sugieren que la muerte observada en estas condiciones, es un mecanismo excitotóxico, mediado por la activación del receptor a NMDA, ya que se puede proteger por el antagonista no competitivo, el MK-801. Este tipo de lesiones también puede ser protegida al suplementar el ciclo de Krebs directamente con piruvato, el producto final de la glucólisis, lo que señala que una posible disminución en la concentración de ATP es determinante para los efectos tóxicos del glutamato *in vivo*. Esta protección con piruvato sugiere que ésta puede ser otra estrategia para el tratamiento de la isquemia cerebral.

La inhibición de la glucólisis no afecta la susceptibilidad neuronal a la muerte por la exposición al péptido β -amiloide 25-35; sin embargo, la inhibición del ciclo de Krebs incrementa la vulnerabilidad neuronal a la muerte por la exposición a este péptido.

Como se puede observar, un déficit en el metabolismo energético, debido a la inhibición de la glucólisis o a la inhibición del ciclo de Krebs, incrementa la vulnerabilidad a la muerte neuronal por el incremento del glutamato y del péptido β -amiloide, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

Albin, R. L. & Greenamyre, J.T. (1992), Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurol.* **42**, 733-738.

Baker, A. J., Zornow, M.H., Scheller, M.S., Yaksh, T.L., Skilling, S.R., Smullin, D.H., Larson, A.A. & Kuczenski, R. (1991), Changes in extracellular concentrations of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin, and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain. *J. Neurochem.* **57**, 1370-1379.

Bazan, N. G., Braquet, P. & Ginsberg, M.D. (1992) *Neurochemical Correlates of Cerebral Ischemia (Advances in Neurochemistry)* (ed. B.W.y.A. Agranoff, M.H.) Pages. Plenum Press, New York. .

Beal, M. D. (1995), Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* **38**, 357-366.

Beal, M. F., Jenkins, B.G., Hyman, B.T., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Srivastava, R., Roy, D.S., Rosen, B.R. & Broulliet, E. (1993), Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neuroch.* **60**, 356-359.

Beal, M. F. (1995), Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* **38**, 357-366.

Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. & Diemer, N.H. (1984), Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* **43**, 1369-1374.

Bickler, P. E. & Hansen, B.M. (1994), Causes of calcium accumulation in rat cortical brain slices during hypoxia and ischemia: role of ion channels and membrane damage. *Brain Res.* **665**, 269-276.

Blass, J. P., Baker, A.D., Ko, L. & Black, R.S. (1990), Induction of Alzheimer's disease antigens by an uncoupler of oxidative phosphorylation. *Arch. Neurol.* **47**, 864-869.

Bowling, A. C. & Beal, M.F. (1995), Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci.* **56**, 1151-1171.

Broulliet, E., Guyot, M.-C., Mittoux, V., Altairac, S., Condé, F., Palfi, S. & Hantraye, P. (1998), Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* **70**, 794-805.

Cheng, B. & Mattson, M.P. (1992), Glucose deprivation elicits neurofibrillary tangle-like antigenic changes in hippocampal neurons: prevention by NGF y bFGF. *Exp. Neurol.* **117**, 114-123.

Choi, D. W. (1987), Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* **7**, 396-379.

Ciani, E., Groneng, L., Voltattorni, M., Rolseth, V., Contestabile, A. & Paulsen, RE. (1996), Inhibition of free radical production or free radical scavenging protects from the excitotoxic cell death mediated by glutamate in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res.* **728**, 1-6.

Cooper, J. M. & Schapira, H.V. (1997), Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration. *J. Bioenerg. Biomemb.* **29**, 175-183.

Coyle, J. T. (1987) Alzheimer's Disease. In *Encyclopedia of Neuroscience* (eds G. Adelman), pp. 29-31. Birkhäuser, Boston.

Dickrow, R. B. & Bryan, R.M. (1987), Regional cerebral glucose utilization during hyperglycemia. *J. Neurochem.* **48**, 989-993.

Dietrich, W. D. (1998), Neurobiology of stroke. *Int. Rev. Neurob.* **42**, 55-101.

Drejer, J., Benveniste, H., Diemer, N.H. & Schousboe, A. (1985), Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurochem.* **45**, 145-151.

Duchen, M. R. (1990), Effects of metabolic inhibition on the membrane properties of isolated mouse primary sensory neurons. *J. Physiol.* **424**, 387-409.

Duverger, D., Benavides, J., Cudennec, A., MacKenzie, E.T., Scatton, B., Seylaz, J. & Verecchia, C. (1987), A glutamate antagonist reduces infarction size following focal cerebral ischaemia independently of vascular and metabolic changes. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **7 (Suppl. 1)**, S144.

Fliesler, S. J., Richards, M.J., Miller, C-Y., McKay, S. & Winkler, B.S. (1997), *In vitro* metabolic competence of the frog retina: effects of glucose and oxygen deprivation. *Exp. Eye Res.* **64**, 683-692.

Garhtwaite G. & Garthwaite, J. (1986), Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices: dependence on calcium concentration. *Neurosci. Lett.* **66**, 193-198.

Garthwaite, G. & Garthwaite V J. (1989), Quisqualate neurotoxicity: a delayed,

CNQX-sensitive process triggered by a CNQX-insensitive mechanism in young rat hippocampal slices. *Neurosc. Lett.* **99**, 113-118.

Gegelashvili, G. & Schousboe (1997), High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.* **52**, 6-15.

Geula, C., Emre, M., Ransil, B.J. & Mesulam, M.-M. (1992), The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected β -amyloid in the rat brain. *Neurobiol. Aging* **13**, 553-559.

Gibson, G. E., Sheu, K.-F. R., Blass, J.P., Baker, A., Carlson, K.D., Harding, B. & Perrino, P. (1988), Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **45**, 836-840.

Gill, R., Foster, A.C. & Woodruff, G.N. (1987), Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *J. Neurosc.* **7**, 3343-3349.

Ginsberg, M. D., Graham, D.I. & Busto R. (1985), Regional glucose utilization and blood flow following graded forebrain ischemia in the rat: Correlation with neuropathology. *Ann. Neurol.* **18**, 470-481.

Giovanelli, L., Casamenti, F., Scali, C., Bartolini, L. & Pepeu, G. (1995), Differential effects of amyloid peptides β -(1-40) and β -(25-35) injections into the rat nucleus basalis. *Neurosc.* **66**, 781-792.

Globus, M. Y.-T., Busto, R., Dietrich, W.D. & Ginsberg, M.D. (1988), Effect of ischemia on the *in vivo* release of striatal dopamine, glutamate and γ -aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* **51**, 1455-1464.

Greenamyre, J. T. & Porter, R.H.P. (1994), Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology* **44**, S7-S13.

Greene, J. G., Sheu, S.S., Gross, R.A. & Greenamyre, J.T. (1998), 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neurosc.* **84**, 503-510.

Greene, J. G. & Greenamyre, J.T. (1996), Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog. in Neurobiol.* **48**, 613-634.

Hara, H., Sukamoto, T. & Kogure, K. (1993), Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Prog. Neurobiol.* **40**, 645-670.

Hawkins, R. A., Branston, N.M., Symon, L. & Davis, D.W., (1986), Regional

ketone body utilization by rat brain in starvation and diabetes. *Am. J. Physiol.* **253**, E169-E178.

Haxby, F. V., Grady, C.L., Duara, R., Schlageter, N., Berg, G. & Rapoport, S.I. (1986), Neocortical metabolic abnormalities precede non-memory cognitive deficits in early Alzheimer-type dementia. *Arch. Neurol.* **43**, 882-885.

Hertz, L. (1989), Is Alzheimer's disease an anterograde degeneration, originating in the brainstem, and disrupting metabolic and functional interactions between neurons and glial cells? *Brain Res. Rev.* **14**, 335-353.

Hoyer, S. (1994), Neurodegeneration, Alzheimer's disease, and beta-amyloid toxicity. *Life Sci.* **55**, 1977-1983.

Ingram, V. M., Bush, M.L. & Miyashiro, J.S. (1995), Activation of a neurofilament kinase, a tau kinase, and a tau phosphatase by decreased ATP levels in nerve growth factor-differentiated PC-12 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1861-1865.

Izumi, Y., Benz, A.M., Zorumski, C.F. & Olney, J.W. (1994), Effects of lactate and pyruvate on glucose deprivation in rat hippocampal slices. *Neuroreport* **5**, 617-620.

Johansen, F. F., Jorgensen, M.B. & Diemer, N.H. (1986), Ischemic CA1 pyramidal cell loss is prevented by pre-ischemic colchicine destruction of dentate gyrus granule cells. *Brain Res.* **377**, 344-377.

Kanai, Y. (1997), Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr. Biol.* **9**, 565-572.

LaManna, J. C. (1987), Intracellular pH determination by absorption spectrophotometry of neutral red. *Metab. Brain Dis.* **2**, 167-182.

Lees, G. J. & S., M. (1991), Evoked field potential changes in the rat hippocampus produced by toxic doses of glutamate agonists and metabolic inhibitors: correlation with subsequent neuronal death. *Exp. Brain Res.* **85**, 625-630.

Leppanen, L. & Stys, P.K. (1997), Ion transport and membrane potential in CNS myelinated axons. I. Normoxic conditions. *J. Neurophysiol.* **78**, 2086-2094.

Madl, J. E. & Burgesser, K. (1993), Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* **13**, 4429-4444.

Malouf, A. T. (1992), Effect of beta amyloid peptides on neurons in hippocampal slice cultures. *Neurobiol. Aging* **13**, 543-551.

Massieu, L., Morales-Villagran, A. & Tapia, R. (1995), Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an *in vivo* microdialysis study. *J. Neurochem.* **64**, 2262-2272.

Massieu, L. & Sánchez, M.R. (1999), Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J. Neurochem.* **72**, 129-138.

Mastrogiacomo, F., Bergeron, C. & Kish, J.J. (1993), Brain alpha-ketoglutarate complex activity in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **61**, 2007-2014.

Matsumoto, K., Graf, R., Rosner, G., Taguchi, J. & Heiss, W-D. (1993), Elevation of neuroactive substances in the cortex of cats during prolonged focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Met.* **13**, 586-594.

Mathiews, R. T., Ferrante, R.J., Jenkins, B.G., Browne, S.E., Goetz, K., Berger, S., Chen, I. Y.-C. & Beal, M.F. (1997), Iodoacetate produces striatal excitotoxic lesions. *J. Neurochem.* **69**, 285-289.

McKee, A. C., Kowall, N.W., Yankner, B.A. & Beal, M.F. (1992), *In vivo* neurotoxicity of beta-amyloid [β (1-40)] and the β (25-35) fragment. *Neurobiol. Aging* **13**, 537-542.

Meldrum, B. S. (1991) *Excitatory Amino Acid Antagonists (Frontiers in Pharmacology & Therapeutics)* (ed. R.J. Flower, George, C.G. y Hill, R.G.) Pages. Blackwell Scientific Publications, London. .

Mena, R. y García (1998),

Michaelis, E. K. (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.

Mutisya, E. M., Bowling, A.C. & Beal, M.F. (1994), Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **63**, 2179-1284.

Nakamura (1995), A possible mechanism for the hypoxia-hypoglycemia-induced release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes.

Nicholls, D. G. (1989), Release of glutamate, aspartate and g-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* **52**, 331-341.

Ninomiya, M., Gemba, T. & Oshima, T. (1994), Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. *Neurosci.* **63**, 789-795.

Novelli, A., Reilly, J.A., Lysko, P.G. & Henneberry, R.C. (1988), Glutamate becomes neurotoxic via the NMDA receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* **451**, 205-212.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. & Prochiantz, A. (1984), Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462-465.

Olney, J. W. (1988) Revelations in excitotoxicity: What next? In *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research* (eds pp. 589-596. Alan R. Liss, Inc.,

66 Palacín, M., Estévez, R., Beltran, J. & Zorzano, A. (1998), Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* **78**, 969-1054.

Park, C. K., Nehls, D.G., Graham, D.I., Teasdale, G.M. & McCulloch, J. (1988), Focal cerebral ischaemia in the cat: Treatment with the glutamate antagonist MK-801 after induction of ischaemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **8**,

Parker, W. D., Mahr, N.J., Filley, X.M., Parks, J.K., Hughes, D., Young, D.A. & Cullum, C.M. (1994), Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease. *Neurol.* **44**, 1086-1089.

Parker, W. D., Mahr, N.J., Filley, C.M., Parks, J.K., Huches, D., Young, D.A. & Cullum, C.M. (1994), Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease. *Neurol.* **44**, 1086-1090.

Paxinos, G. & Watson, C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates* 2nd (ed. Pages. Academic Press, San Diego. .

Petito, C. K., Feldmann, E., Pulsinelli, W.A. & Plum, F. (1987), Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurol.* **37**, 1281-1286.

Pettegrew, W., Kanagasabai, P., Klunk, W.E., McClure, R.J. & Muenz, L.R. (1994), Alterations of cerebral metabolism in probable Alzheimer's disease: a preliminary study. *Neurobiol. Aging* **15**, 117-132.

Pulsinelli, W. A., Brierly, J.B. & Plum F. (1982), Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* **11**, 491-498.

Reiner, P. B., Laycock, A.G. & Doll, C.J. (1990), A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice. *Neurosci. Lett.* **119**, 175-178.

Rothman, S. M. (1985), The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* **5**, 1483-1489.

Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P. & Welty, D.F. (1996), Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675-686.

Ruiz, F., Alvarez, G., Pereira, R., Hernandez, M., Villalba, M., Cruz, F., Cerdan, S., Bogóñez, E & Satrustegui, J. (1998), Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *Neuroreport* **9**, 1277-1282.

Sánchez, M-R., (1998),

Sapolsky, R., Stein-Behrens, B., Adams, K. & Yeh, M. (1992), Failure of beta-amyloid protein fragment 25-35 to cause hippocampal damage in the rat. *Neurobiol. Aging* **13**, 577-579.

Saransaari, P. & Oja, S.S. (1998), Mechanisms of ischemia-induced taurine release in mouse hippocampal slices. *Brain Res.* **807**, 118-124.

Schägger, H. & Ohm, T.G. (1995), Human diseases with defects in oxidative phosphorylation. 2. F1F0 ATP-synthase defects in Alzheimer disease revealed by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* **227**, 916-921.

Schapira, A. H. V. (1996), Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurol.* **9**, 260-264.

Sheu, K. F., Kim, Y.T., Blass, J.P. & Wesler, M.E. (1985), An immunohistochemical study of the pyruvate dehydrogenase deficit in Alzheimer's disease brain. *Ann. Neurol.* **17**,

Sims, N. R., Bowen, D.V., Neary, D. & Davison, A.N. (1983), Metabolic processes in Alzheimer's disease: adenine nucleotide content and production of [¹⁴C]CO₂ from [U-¹⁴C] glucose *in vitro* in human neocortex. *J. Neurochem.* **41**, 1329-1334.

Sisodia, S. S. & Price, D.L. (1992), Amyloidogenesis in Alzheimer's disease: basic biology and animal models. *Curr. Op. Neurobiol.* **2**, 648-652.

Sorbi, S., Bird, E.D. & Blass, J.P. (1983), Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Ann. Neurol.* **13**, 72-78.

Sorbi S., M., M., Piacentini, S., Tonini, S. & Amaducci, L. (1990), Altered hexokinase activity in skin cultured fibroblasts and leukocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* **117**, 165-168.

Swan, J. H. & M., B.S. (1990), Protection by NMDA antagonists against selective cell loss following transient ischaemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **10**, 343-351.

Symon, R. P. (1986), Progression and irreversibility in brain ischaemia. *Life Sci.* **115**, 221-237.

89 Uto, A., Dux, E., Kusumoto, M. & Hossman, K.-A. (1995), Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia *in vitro*. *J. Neurochem.* **64**, 2185-2192.

Voet, D. & Voet, J.G. (1995) *Biochemistry* 2nd (ed. Pages. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey. .

Weinstock, M. (1995), The pharmacotherapy of Alzheimer's disease based on the cholinergic hypothesis: an update. *Neurodeg.* **4**, 349-356.

Wieloch, T., Harris, R.F., Symon, L. & Siesjö, B.K. (1984), Influence of severe hypoglycemia on brain extracellular calcium and potassium activities, energy, and phospholipid metabolism. *J. Neurochem.* **43**, 160-168.

Williams, K., Romano, C., Dichter, M.A. & Molinoff, P.B. (1991), Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci.* **48**, 496-498.

Williams, R. J., Maus, M., Stella, N., Glowinski, J. & Premont, J. (1996), Reduced glucose metabolism enhances the glutamate-evoked release of arachidonic acid from striatal neurons. *Neurosc.* **74**, 461-468.

Zeevalk, G. D. & Nicklas, W.J. (1990), Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 1285-1292.

Zeevalk, G. D. & Nicklas, W.J. (1991), Mechanisms underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition. *J. Pharmac. Exp. Ther.* **257**, 870-878.

Zeevalk, G. D. & Nicklas, W.J. (1992), Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg^{2+} Block at the *N*-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J. Neurochem.* **59**, 1211-1220.

Zeevalk, G. D. & Nicklas, W.J. (1997), Contribution of lglial metabolism to neuronal damage caused by partial inhibition of energy metabolism in retina. *Exp. Eye Res.* 397-405.