



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**“GLUTAMATO EXTRACELULAR Y NEURODEGENERACIÓN
EN UN MODELO TRANSGÉNICO DE ESCLEROSIS
LATERAL AMIOTRÓFICA”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A:

LUIS BERNARDO TOVAR Y ROMO

DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F.

ABRIL 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

NOMBRE: LUIS BERNARDO
TOVAR Y ROMO

FECHA: ABRIL 5, 2004

FIRMA: 

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia con el apoyo de CONACYT (31750-N) y DGAPA (IN206100).

A mis padres

"...although there was a cloud hanging over my future, I found, to my surprise, that I was enjoying life in the present more than before. I began to make progress with my research..."

Stephen Hawking

Agradezco al Dr. Ricardo Tapia por la dirección de este trabajo de tesis, por la oportunidad tan afortunada que he tenido de estar en su laboratorio, por todo lo que he logrado aprender acerca de la ciencia y de la forma en la que ésta se hace observando su trabajo, por sus consejos que siempre fueron bien apreciados, por la confianza que puso en mí y por la que me hizo ganar con respecto a mi futuro profesional.

También quiero expresar mi agradecimiento a los doctores Herminia Pasantes, Clorinda Arias, Lourdes Massieu y Luis Covarrubias por la revisión del manuscrito de este trabajo.

Asimismo quiero agradecer la asistencia técnica para el desarrollo de este trabajo de tesis de:

El M.V.Z. Héctor Malagón, por su colaboración con el cuidado y reproducción de los animales.

Federico Jandete, por su ayuda con parte de los procedimientos histológicos.

Continuando con los agradecimientos...

A mis padres por todas las oportunidades que gracias a ellos he tenido, por todo su apoyo y confianza.

A mis hermanos por su compañía y amistad.

A mis amigos, especialmente a los biomédicos, por hacer el tiempo ameno y divertido, por tenerme paciencia y aguantarme, y por todo el apoyo que he recibido de ustedes siempre.

A la Dra. Alicia González por todo lo que he aprendido de ella y sobretodo por el apoyo que me ha brindado, especialmente cuando más lo he necesitado.

A Amaranta Avendaño por la paciencia y dedicación que me tuvo cuando apenas comenzaba en este negocio.

Al Dr. Alfonso León Del Río por su confianza en mi y por mostrarme a la ciencia desde una perspectiva diferente.

A la Dra. Elizabeth Langley por su apoyo, paciencia y confianza.

A los amigos y compañeros de los laboratorios de los doctores Ricardo Tapia, Alicia González y Alfonso León Del Río, por la convivencia, la cooperación en el trabajo, y por hacer muy agradable el tiempo en el laboratorio.

Y finalmente, pero nunca menos importante, a la Universidad Nacional Autónoma de México que como institución me ha brindado una oportunidad profesional grandiosa y única.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	4
▪ Esclerosis lateral amiotrófica.....	4
▪ Estrés oxidante y superóxido dismutasa 1	5
▪ Ratones transgénicos como modelo de la ALS.....	9
▪ Principales hipótesis sobre los mecanismos de neurodegeneración en la ALS.....	10
▪ El glutamato como neurotransmisor.....	11
▪ Excitotoxicidad glutamatérgica.....	12
▪ Corteza motora.....	14
▪ Neurodegeneración en el hipocampo.....	15
▪ La proteína de estrés térmico 70 como marcador de daño neuronal.....	16
ANTECEDENTES (La excitotoxicidad y la ALS).....	17
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO	20
DISEÑO EXPERIMENTAL	21
MATERIALES Y MÉTODOS	23
▪ Animales.....	23
▪ Caracterización genotípica de los ratones transgénicos.....	23
▪ Microdiálisis.....	25
▪ Cuantificación de aminoácidos.....	26
▪ Histología.....	26
▪ Inmunohistoquímica.....	27
RESULTADOS	28
▪ Efecto del PDC en el hipocampo.....	28
▪ Efecto de la 4-AP en el hipocampo.....	32
▪ Efecto del PDC en la corteza motora.....	38
▪ Efecto de la 4-AP en la corteza motora.....	42
DISCUSIÓN	46
COCLUSIÓN	53
REFERENCIAS	54

ABREVIATURAS

(Se ha preferido usar algunas abreviaturas en inglés, por haberse ya establecido así en la literatura).

4-AP	4-aminopiridina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ALS	amyotrophic lateral sclerosis (esclerosis lateral amiotrófica)
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ATP	adenosín trifosfato
BSA	bovine serum albumin (albúmina de suero de bovino)
CA	cuerno de Amón
CM	corteza motora
DAG	diacilglicerol
EAAC	excitatory amino acid carrier (acarreador de aminoácidos excitadores)
EAAT	excitatory amino acid transporter (transportador de aminoácidos excitadores)
FALS	familial ALS (esclerosis lateral amiotrófica familiar)
FITC	isotiocianato de fluoresceína
G93A	ratones transgénicos que expresan la SOD1 humana con la sustitución de la glicina 93 por alanina
GABA	ácido γ -aminobutírico
GLAST	glutamate/aspartate transporter (transportador de glutamato y aspartato)
GLT1	glutamate transporter 1 (transportador de glutamato 1)
HPLC	high performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)
HSP70	heat shock protein 70 kDa (proteína de estrés térmico de 70 kilodaltones)

i.p.	intraperitoneal
IgG	inmunoglobulina tipo G
IL-2	interleucina 2
IP ₃	inositol trifosfato
KA	kainato
LCR	líquido cefalorraquídeo
MK-801	maleato de (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo(a,d)-cicloheptan-5,10-imina
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(F)quinoxalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBND	PCR buffer with nonionic detergents (amortiguador de PCR con detergentes no iónicos)
PBS	phosphate buffered saline (amortiguador de fosfatos)
PCR	polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PDC	L-trans-2,4-pirrolidín-dicarboxilato
ROS	reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
SALS	sporadic ALS (esclerosis lateral amiotrófica esporádica)
SNC	sistema nervioso central
SOD1	superóxido dismutasa Cu ²⁺ /Zn ²⁺ citoplásmica
SOD1m	mutante de SOD1
TAE	Tris-acetate/EDTA electrophoresis buffer (amortiguador de electroforesis con acetato de Tris/EDTA)
WT	wild type (ratones de tipo silvestre)

INTRODUCCIÓN

Esclerosis lateral amiotrófica.

En 1869 el fisiólogo francés Jean-Martin Charcot describió por primera vez un padecimiento neurodegenerativo caracterizado por una atrofia muscular progresiva, al cual se llamó por algunos años la esclerosis de Charcot. Hoy en día esta enfermedad es conocida como esclerosis lateral amiotrófica (ALS), y se sabe que es causada por la muerte selectiva y progresiva de las neuronas motoras inferiores de la médula espinal y el tallo cerebral, y las superiores de la corteza motora. Tiene una prevalencia de 2 a 5 por cada 100,000 individuos, inicia en la etapa adulta, frecuentemente entre los 50 y 60 años de edad, y termina con la vida de los pacientes generalmente después de 2 a 5 años de padecerla. La pérdida de las motoneuronas provoca una debilidad muscular progresiva que resulta en la parálisis de los músculos esqueléticos y es generalmente ascendente, comenzando por las extremidades inferiores hasta llegar a los músculos faciales causando dificultad para el habla, y termina en la muerte del paciente por un fallo respiratorio debido a la incapacidad de contraer apropiadamente los músculos respiratorios y el diafragma (Julien 2001, Celveland et al. 2001). En esta condición patológica del sistema nervioso central (SNC) no se alteran las capacidades intelectuales de los pacientes, salvo en algunas excepciones que se dan dentro de poblaciones genéticamente aisladas y reducidas como en el caso de las islas de Guam y Nueva Guinea, donde la ALS se da en combinación con un tipo de demencia fronto-temporal, aunque estos casos se han asociado a la ingestión de toxinas presentes en algunas semillas (Cleveland et al. 2001).

Aproximadamente 10% de los casos de ALS son transmitidos entre generaciones con un patrón de herencia autosómico dominante. A esta

forma heredable se le conoce como ALS familiar (FALS) y el 90% restante son casos esporádicos (SALS). El factor genético es la única diferencia que existe entre ambos tipos, ya que clínicamente son indistinguibles.

Estrés oxidante y superóxido dismutasa 1.

En los procesos neurodegenerativos como en la ALS, existe la participación de factores como el estrés oxidante generado por la acción tóxica del oxígeno molecular, el cual es un elemento muy reactivo debido a su organización electrónica, que le confiere una gran capacidad para generar radicales libres o especies reactivas (ROS). Estas a su vez pueden ser muy tóxicas para todo tipo de células. Sin embargo la vida de la mayoría de los organismos depende de la utilización del oxígeno para solventar la gran demanda energética que tienen. Para contender con esta paradoja, los organismos han desarrollado sistemas antioxidantes encargados de prevenir o reparar los efectos de la oxidación en proteínas, membranas y ácidos nucleicos. Un desequilibrio entre los sistemas pro-oxidantes y los antioxidantes a favor de los primeros es lo que se conoce como estrés oxidante (Davies 2000).

Aunque el estrés oxidante es un factor que participa en la patogenia de muchos procesos neurodegenerativos y del envejecimiento natural (Calabrese et al. 2000), sigue siendo tema de controversia si es causa o consecuencia en la ALS. Algunas hipótesis sobre la neurodegeneración en esta enfermedad se basan en la presencia de proteínas alteradas, como los neurofilamentos o los transportadores de glutamato, dichas alteraciones pudieran tener su origen en la oxidación. Además, en la ALS se le ha dado un papel preponderante al estrés oxidante debido a las mutaciones encontradas en una de las enzimas antioxidantes más importantes, que mencionaré posteriormente.

Hay evidencia de este daño oxidante en pacientes con ambas: la FALS, y sobre todo la SALS, aunque en esta última no se han detectado alteraciones en los sistemas antioxidantes. La evidencia del daño oxidante se asienta en la presencia elevada de marcadores de este tipo de daño, como grupos carbonilo en las proteínas (Bowling et al. 1993, Ferrante et al. 1997) y 8-hidroxi-2-desoxiguanosinas en el ADN (Ferrante et al. 1997), encontrados en el tejido cerebral de pacientes estudiado *post mortem*.

Aproximadamente veinte por ciento de los pacientes con FALS presentan alteraciones genéticas en la superóxido dismutasa de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ citoplásmica (SOD1) (Rosen et al. 1993), una enzima importante para el mantenimiento del balance oxidante celular. Las alteraciones de esta enzima son producto de mutaciones puntuales de tipo "missense" o de sentido equivocado, ya que le confieren una función nueva que resulta ser muy tóxica para las células, sin la pérdida de su actividad catalítica normal, como se explica posteriormente. Actualmente se han identificado más de 90 diferentes mutaciones puntuales a lo largo de los 5 exones de la SOD1 en pacientes con FALS, entre las más frecuentes están las sustituciones A4V, G85R y G93A (Cleveland et al. 2001).

La actividad catalítica de la SOD1, al igual que la de las otras isoenzimas (Mn-SOD ó SOD2 y $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -SOD extracelular ó SOD3), es la dismutación del anión superóxido ($\cdot\text{O}_2\cdot$), un radical libre de oxígeno que se forma en la célula como producto secundario en la transferencia de electrones, convirtiéndolo en oxígeno molecular o peróxido de hidrógeno, el cual finalmente es convertido a agua por la acción de catalasas y del sistema de glutatión peroxidasa. (Maier et al. 2002,

Zelko et al. 2002). La SOD1 es un homodímero constituido por subunidades de 153 aminoácidos, que tiene un canal cargado positivamente que atrae de forma electrostática al superóxido y lo conduce a su sitio activo donde reacciona con átomos de cobre, utilizados por la enzima como grupos prostéticos, como se muestra en la figura 1.

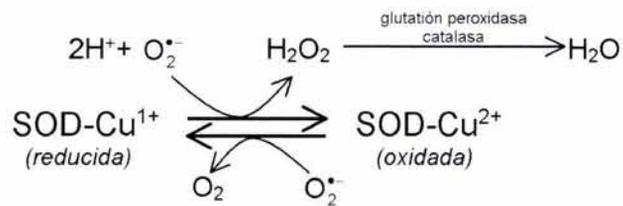


Figura 1. Reacciones catalíticas normales de la SOD1.

Dado que la función del sistema antioxidante enzimático celular es tan importante para la homeostasis en los procesos que involucran al oxígeno, se puede entender que las alteraciones en la SOD1 resulten altamente nocivas. Sin embargo, como ya se mencionó, esta toxicidad no es producto de la pérdida de la actividad enzimática. Evidencia de esto es que la actividad de la SOD1 medida en tejidos de pacientes con FALS se ha encontrado únicamente reducida, no eliminada (Deng et al. 1993, Bowling et al. 1993). Además, en experimentos en levadura, las cepas que carecen del gen *sod1* pueden ser rescatadas de la toxicidad del oxígeno con algunas formas mutantes de SOD1 (SOD1m) que conservan una actividad residual (Nishida et al. 1994.). Más importante aún es el hallazgo de que los ratones "knockout" de la SOD1 no presentan degeneración de las motoneuronas ni desarrollan la consecuente parálisis (Reaume et al. 1996). Además, el tipo de herencia de la enfermedad asociada con mutaciones en la SOD1 es dominante, por lo que los pacientes tienen al menos la mitad de la SOD1 funcionando de manera regular (Brown 1995).

Se ha llegado a la aceptación general de que la toxicidad debida a las alteraciones genéticas de la SOD1 resulta más bien de la adquisición de una función diferente. Entre las que se han postulado está un plegamiento incorrecto de la proteína, que permite la entrada al sitio catalítico a sustratos no naturales para esta enzima como el óxido nítrico, que en combinación con el superóxido forma peroxinitrito, una especie reactiva de oxígeno y nitrógeno que tiene la capacidad de nitrar residuos de tirosinas causando un daño oxidante severo en las proteínas (figura 2A, Cleveland 1999). Otra hipótesis es que la alteración en la estructura de la SOD1 genere una catálisis aberrante mediada por cobre, como puede ser la conversión del H₂O₂ en el radical OH· que es enormemente dañino para el entorno celular (figura 2B, Cleveland 1999).

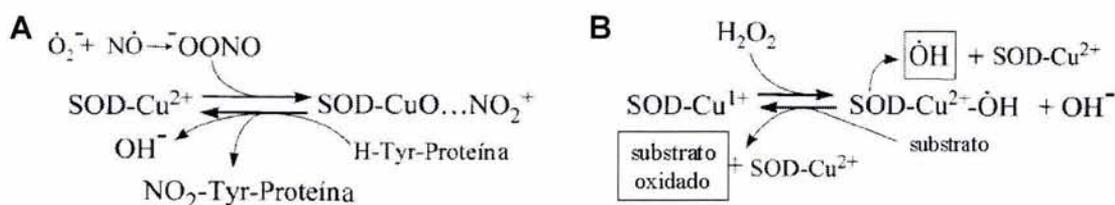


Figura 2: Posibles reacciones de catálisis aberrante mediada por la SOD1 mutada.

Además se ha demostrado que la SOD1/G93A tiene una K_m reducida por el H₂O₂, lo que incrementa su capacidad de generar radicales libres (Yim et al. 1996). Algunos han sugerido también que la toxicidad puede ser causada por la pérdida de la afinidad de la enzima por el zinc, lo que también convertiría a la SOD1 en un potente generador de radicales libres. Lo anterior se logra cuando la SOD1 deficiente de zinc utiliza electrones obtenidos de antioxidantes celulares para la formación de superóxido. (Beckman et al. 2001). Finalmente, uno más de los posibles mecanismos por los cuales la SOD1m puede ser tóxica es que su

alteración estructural facilite la formación de agregados de esta proteína que bloquean la función de las chaperonas y del proteasoma, la estructura celular encargada de eliminar a las proteínas mal plegadas (Brown 1995).

Sea cual sea el proceso que genera la toxicidad de la SOD1m, una cosa es cierta: la alteración genética de la SOD1 es la única causa que se ha encontrado de la ALS. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual esta alteración conduce a la muerte selectiva de las motoneuronas. Cabe reiterar también que en el ~98% de los pacientes con ALS la SOD1 no se encuentra modificada.

Ratones transgénicos como modelo de la ALS.

Uno de los trabajos más frecuentemente referidos en la literatura del campo de la ALS es el de la generación de ratones transgénicos que sobreexpresan la forma mutante G93A de la SOD1 humana (Tgn-SOD1/G93A) (Gurney et al. 1994). Estos ratones presentan parálisis en las extremidades posteriores como resultado de la muerte de las motoneuronas de la médula espinal de manera progresiva, en forma muy similar a los pacientes humanos. El tiempo de desarrollo de la parálisis y la duración de ésta, así como la de la vida del ratón, dependen principalmente del número de copias del transgen que cada animal tenga y de la cantidad de SOD1m que pueda ser expresada. Este fenotipo es también heredado en el ratón. Desde 1994 éste se ha convertido en uno de los modelos más confiables para conducir diferentes estudios sobre los mecanismos y posibles tratamientos de la ALS *in vivo*. Existe también un modelo transgénico con la sobreexpresión de la SOD1 murina que tiene una de las mutaciones que se han descrito en pacientes (G85R) (Ripps et al. 1996) y recientemente se generaron ratas transgénicas con las mutaciones G93A y H46R en la

SOD1 humana (Nagai et al. 2001). En estos dos modelos el déficit motor y la neurodegeneración característicos también ocurren.

Además de la parálisis, los ratones Tgn-SOD1/G93A tienen una tasa de generación de radicales hidroxilo mayor a la de los ratones no transgénicos o de los que sobreexpresan la SOD1 humana silvestre, confirmando que las alteraciones en la SOD1 tienen efectos directos sobre la producción de radicales libres (Bogdanov et al. 1998). En consecuencia, es de esperarse que en este modelo exista un daño oxidante incrementado en proteínas de la médula espinal (Andrus et al. 1998), el cual puede reducirse con moléculas sintéticas que semejan la función de las enzimas antioxidantes (Jung et al. 2001).

Principales hipótesis sobre los mecanismos de neurodegeneración en la ALS.

Como en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, los procesos celulares y moleculares que subyacen la muerte celular en la ALS aún son poco claros. Durante muchos años se han desarrollado diversas hipótesis, que se han probado en diferentes modelos tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre las principales están, además de las alteraciones en la SOD1 y la toxicidad mediada por ésta, las acumulaciones anormales de filamentos intermedios (como neurofilamentos de todos los tipos, periferina y α -internexina), que se han encontrado en el SNC de pacientes con ALS (revisado en Robertson et al. 2002). Por otro lado, se ha planteado la posibilidad de que la etiología de algunos casos de SALS sea autoinmune, ya que se encontraron en el suero de algunos pacientes autoinmunoglobulinas contra canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L, y contra Fas, un factor de necrosis tumoral involucrado en la señalización apoptótica (revisado en Julien 2001). Sin embargo, una de las hipótesis más

favorecidas es que las motoneuronas son blanco de la excitotoxicidad inducida por glutamato.

El glutamato como neurotransmisor.

Como se mencionó en la última parte, el glutamato, que es el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC de los mamíferos, puede estar involucrado en el proceso neurodegenerativo en la ALS. El glutamato es un aminoácido que activa receptores específicos ubicados en la pre y la postsinapsis, desencadenando diferentes respuestas fisiológicas. Se conocen distintos tipos de receptores de glutamato y se han dividido en dos grandes grupos: los ionotrópicos y los metabotrópicos. El primer grupo está integrado por proteínas que forman canales iónicos permeables a cationes como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , que se encuentran generalmente en las membranas postsinápticas y están clasificados dependiendo del agonista exógeno análogo al glutamato por el cual también pueden ser activados como N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) y kainato (KA). Los receptores metabotrópicos se encuentran generalmente acoplados a proteínas G y dirigen diferentes cascadas de señalización intracelular por medio de segundos mensajeros como inositol trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DAG) y adenosín monofosfato cíclico (AMPc); éstos se ubican con mayor frecuencia en la presinapsis (Meldrum 2000).

En la fisiología de la transmisión sináptica un fenómeno muy importante es la terminación de la señalización una vez que ésta se ha realizado en la postsinapsis. Para tal efecto existen diferentes mecanismos encargados de transformar o transportar hacia el interior celular a los neurotransmisores. Este último proceso es el que participa en el caso del glutamato, así como en otros aminoácidos, la dopamina y la

serotonina. A la fecha, se han clonado cinco diferentes proteínas transportadoras de glutamato: EAAC1, localizado en neuronas glutamatérgicas; GLT1 (EAAT2) y GLAST (EAAT1), ambos localizados en la glia, específicamente en astrocitos; EAAT4 en las dendritas de las células cerebelares de Purkinje; y EAAT5 ubicado en las células de Müller de la retina (revisado en Gadea et al. 2001). Estos transportadores son proteínas membranales que llevan al glutamato al interior de las células en contra de su gradiente de concentración, en un proceso acoplado al cotransporte de Na^+ , el cual a su vez se encuentra en una concentración mucho mayor en el espacio extracelular.

Excitotoxicidad glutamatérgica.

Aparte de su papel como neurotransmisor y componente de todas las proteínas, el glutamato puede jugar el rol de toxina, o dicho de una mejor forma, de endotoxina. Los primeros datos al respecto de esta toxicidad surgen de la administración sistémica de glutamato a ratones y primates infantiles en los que se encontró degeneración neuronal en la retina y áreas del cerebro que carecen de la protección de la barrera hematoencefálica (Olney et al. 1999). Desde hace algunos años es sabido que la estimulación excesiva de los receptores de glutamato resulta en la degeneración neuronal. Así, la administración exacerbada de glutamato o de sus agonistas, ya sea local o sistémica, induce la muerte neuronal, misma que se previene por antagonistas de los receptores glutamatérgicos. Este tipo de daño causado por la sobreexcitación de las células es lo que se conoce como excitotoxicidad (Choi et al. 1988, Bittigau e Ikonomidou 1997 y Olney et al. 1999).

La sobreestimulación de los receptores al glutamato puede resultar del exceso del aminoácido en el espacio sináptico, lo cual puede ocurrir por

una liberación excesiva desde las terminales nerviosas o por una disminución del sistema de recaptura del glutamato (Tapia et al. 1999).

La importancia de los transportadores gliales se hace evidente al eliminar específicamente por medio de oligonucleótidos antisentido la expresión de GLT1 y GLAST. Entre estos dos está la mayor proporción de recuperación de glutamato, y la administración crónica de los oligonucleótidos a ratones resulta en un déficit motor progresivo y un daño neuronal característico de la excitotoxicidad (Rothstein et al. 1996). Además el bloqueo farmacológico de la función de estos transportadores en células en cultivo induce la muerte celular, la cual correlaciona con la acumulación del glutamato extracelular (Velasco et al. 1996), Sin embargo, *in vivo* este bloqueo no es capaz de inducir neurodegeneración a pesar de la acumulación del glutamato extracelular (Massieu et al. 1995 y 1997).

Un posible vínculo entre la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos y la muerte celular involucra el amortiguamiento mitocondrial del calcio. La hiperactivación de los receptores NMDA y los AMPA permeables a Ca^{2+} resulta en la entrada masiva de este catión a la célula, y la activación de algunos receptores metabotrópicos induce por medio de IP_3 , la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. Una parte del mantenimiento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} se realiza por medio de ATPasas específicas e intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en las mitocondrias. Cuando estos sistemas se ven saturados, hay una sobrecarga en las mitocondrias que colapsa su potencial de membrana, incrementa la producción de ROS y altera definitivamente su función (Schinder et al. 1996, Stout et al. 1998, Urushitani et al. 2001). Además cuando hay una elevación en la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma se activan una serie de enzimas de degradación

dependientes de este catión como proteasas, lipasas y nucleasas, que aunado al déficit energético, a la pérdida del potencial de membrana y a la elevación en la tasa de generación de radicales libres, podrían terminar en la muerte celular (Bittigau e Ikonomidau 1997, Louvel et al. 1997 y Tapia et al. 1999).

Corteza motora

Como mencioné en el principio, las motoneuronas de la corteza motora (CM) también son blanco de la neurodegeneración en la ALS. En la coordinación del movimiento voluntario la CM tiene el nivel más alto de control. Participa en la planeación y ejecución de movimientos voluntarios, en la determinación de la dirección y la fuerza que se ejercerá y en la respuesta del sistema de locomoción ante los obstáculos. La CM está dividida en tres partes: la CM primaria que corresponde al área de Brodmann 4, la corteza premotora y el área motora suplementaria ó CM secundaria, estas dos últimas conocidas como áreas premotoras del área de Brodmann 6.

En general las motoneuronas de la CM tienen proyecciones directas hacia la médula espinal a través del tracto corticoespinal (figura 3), e indirectas a través del tallo cerebral y además al cerebelo y a los ganglios basales. La CM a su vez, recibe información de áreas corticales periféricas y del tálamo, donde también hay entradas del cerebelo, ganglios basales y la médula espinal, que participan en la integración de la información sensorial y que generan circuitos de retroalimentación con la información del movimiento (Kandel et al. 2000). Generalmente en la última etapa de la ALS es cuando mueren las células de la CM.

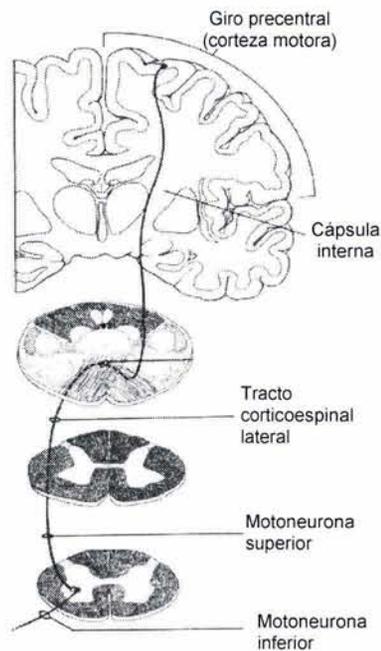


Figura 3: Proyección de la CM a la médula espinal a través del tracto corticoespinal.

Neurodegeneración en el hipocampo.

En este trabajo, además de los experimentos en la CM, como se verá más adelante, se realizaron experimentos en el hipocampo por ser un buen modelo para los estudios de neurodegeneración. El hipocampo es una estructura cerebral que pertenece al sistema límbico y participa primordialmente en el almacenamiento de la memoria. La formación hipocampal es adyacente a la corteza entorrinal de donde recibe la mayor entrada de estímulos a través de la vía perforante (Kandel et al. 2000). Los somas de las neuronas piramidales del hipocampo están alineados en una hilera con forma de C, denominada Cuerno de Amón, en la que se pueden distinguir las regiones CA1, CA2, CA3 e hilus.

El hipocampo es una estructura vulnerable al daño causado por la excitotoxicidad glutamatérgica. En experimentos con microdiálisis, la administración en el hipocampo de la rata *in vivo* del bloqueador no selectivo de canales de K^+ 4-aminopiridina (4-AP), potencia la liberación

de neurotransmisores directamente desde las terminales nerviosas y provoca la degeneración y muerte de las regiones CA1 y CA3 de forma dosis-dependiente. Esta degeneración puede ser prevenida o disminuida con la aplicación de antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato (Peña y Tapia 1999 y 2000). La susceptibilidad de esta estructura al daño inducido por glutamato la hace un buen modelo para realizar estudios de neurodegeneración *in vivo*.

La proteína de estrés térmico 70 como marcador de daño neuronal.

En los eventos de estrés celular como los anteriormente descritos participan moléculas como la proteína de estrés térmico de 70kDa (HSP70), que es parte de un conjunto de proteínas conocidas como chaperonas que están involucradas en diferentes procesos celulares, tanto en situaciones fisiológicas normales como en respuesta a diversos tipos de estrés. La HSP70 no se expresa constitutivamente en las neuronas, pero su síntesis se induce en respuesta a diferentes estímulos nocivos y en condiciones patológicas como hipertermia, isquemia y la administración de excitotoxinas (Planas et al. 1997, Ohtsuka et al. 2000).

En cuanto al daño excitotóxico, se ha detectado la inducción de HSP70 algunas horas después de la administración sistémica o intracerebral de KA en diferentes estructuras del cerebro, incluyendo al hipocampo (revisado en Planas et al. 1997). En nuestro laboratorio se ha observado la inducción de HSP70 después de la administración por microdiálisis en el hipocampo de 4-AP (Ayala y Tapia 2003). Se presume que la inducción de las chaperonas puede tener un efecto protector en las células sujetas a un estímulo tóxico. Por lo mismo, se ha planteado que la presencia de estas proteínas en las células es un marcador del daño neuronal (González et al 1989, Planas et al. 1997).

ANTECEDENTES

La excitotoxicidad y la ALS

Como se expuso en la introducción, la excitotoxicidad mediada por glutamato es una de las probables causas de la muerte neuronal en la ALS, y esta hipótesis se sustenta principalmente en que algunos pacientes, ~40% de acuerdo con los estudios más extensos (Shaw et al. 1995, Spreaux-Varoquaux et al. 2002), tienen un nivel de glutamato incrementado en el líquido cefalorraquídeo (LCR), aunque los niveles de diferentes aminoácidos en el plasma, incluyendo al glutamato, no están alterados (Shaw et al. 1995). Adicionalmente, en el tejido de pacientes analizado *post mortem*, se ha encontrado una reducción en la cantidad de la proteína GLT1 restringida a la CM y la médula espinal, salvo en un caso de FALS donde la pérdida era evidente en otras estructuras cerebrales. Sin embargo los niveles de GLAST y EAAC1 no se encontraron alterados (Rothstein et al. 1995).

En el modelo de ratón Tgn-SOD1/G93A hay datos controversiales. Se ha observado que en el líquido extracelular de la corteza hay un incremento significativo de glutamato y aspartato con respecto a ratones no transgénicos (Alexander et al. 2000), y que hay un aumento de glutamato y glutamina en la pozas metabólicas en la corteza, medido por resonancia magnética (Andreassen et al. 2001). Sin embargo, este aumento no se observó en el LCR del ratón transgénico, aunque sí una disminución progresiva en la concentración de glutamato en plasma (Bendotti et al. 2001). Además, en este mismo trabajo, Bendotti y colaboradores encontraron, mediante western blot e inmunohistoquímica, un decremento progresivo de GLT1, pero no en GLAST, en el asta ventral de la región lumbar de la médula espinal, que

inicia después de la etapa presintomática, lo que lo descarta como factor causal de la enfermedad. En contraste, otros grupos han reportado que no hay tal cambio en GLT1, GLAST ó EAAC1 en ninguna etapa de la vida del ratón, ni en la médula espinal (Sasaki et al. 2001, Deitch et al. 2002) ni en la corteza sensomotora (Alexander et al. 2000, Deitch et al. 2002). En experimentos hechos con sinaptosomas de médula espinal de ratas transgénicas SOD1/G93A, donde se describe una expresión de GLT1 disminuida, se encontró una reducción progresiva en la V_{max} de la recaptura de glutamato dependiente de Na^+ , con respecto a ratas no transgénicas, (Dunlop et al. 2003). Sin embargo la presencia de los transportadores en el tejido analizado no implica que éstos funcionen adecuadamente.

Los transportadores de glutamato son vulnerables al daño oxidante, como ha sido demostrado al exponer cultivos corticales de astrocitos al sistema generador de radicales libres xantina/xantina-oxidasa o a H_2O_2 lo que decremente rápidamente la capacidad de recaptura del glutamato. Este decremento en la recaptura de glutamato puede ser recuperado con la adición de SOD1 y catalasa, glutati6n ó DTT, un agente químico que al igual que el glutati6n reduce los enlaces tiol de cisteínas en las proteínas (Volterra et al. 1994). Por otro lado, se sabe que el peroxinitrito es capaz de inhibir a GLT1, GLAST y EAAC1 en cuesti6n de segundos (Trotti et al. 1996).

Los transportadores de glutamato tienen un mecanismo regulado por óxido-reducci6n conformado por cisteínas conservadas que forman uniones disulfuro cuando la proteína está oxidada y en este estado la V_{max} del transportador es mucho más baja que cuando está reducido, tal vez porque la estructura disulfuro mantiene más rígida a la proteína (Trotti et al. 1998).

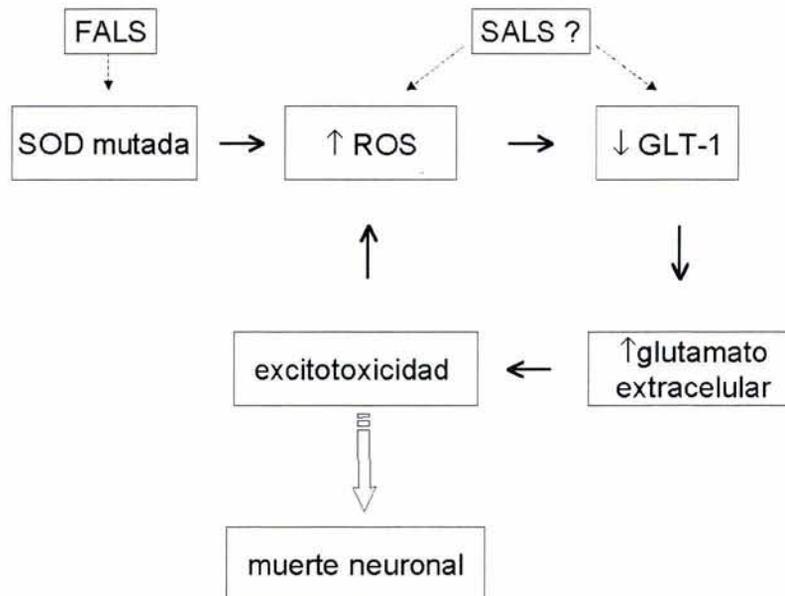
Una conexión muy interesante entre la generación de radicales libres mediada por la SOD1 y la inhibición de los transportadores de glutamato causada por la oxidación surge de experimentos en donde se coexpresaron en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* la SOD1 humana silvestre o con las mutaciones A4V ó I113T encontradas en pacientes, y el GLT1 humano. En esta preparación se determinó, mediante métodos bioquímicos y electrofisiológicos, que la actividad de GLT1 se inhibe en presencia de H₂O₂ en los ovocitos que expresan alguna forma mutante de la SOD1, mas no en los que expresan la enzima silvestre. La actividad del EAAC1 también se evaluó pero no se encontró alterada. Al parecer, GLT1 es susceptible al daño oxidante en el lado intracelular de la proteína, probablemente por la oxidación de los anillos aromáticos de los residuos de histidina, triptofano o tirosina (Trotti et al. 1999).

Por último, adicionalmente al daño excitotóxico, se ha observado en estudios *in vitro* que el glutamato y el KA inducen la generación de ROS con mayor facilidad en las motoneuronas, y que estas especies pueden ser liberadas y oxidar a los transportadores vecinos en la glía. De manera similar, hay un mayor índice de alteraciones oxidativas en las áreas circundantes a las motoneuronas en la médula espinal de los ratones G93A. (Rao et al. 2003).

HIPÓTESIS

Con las evidencias presentadas anteriormente, se ha sugerido un modelo de neurodegeneración que involucra la pérdida de la función de los transportadores de glutamato a causa de la elevación en la producción de ROS, lo cual resultaría en un incremento en la concentración de glutamato extracelular y éste a su vez produciría la

degeneración de las motoneuronas por excitotoxicidad, según el siguiente esquema.



De ser así, en la etapa final del proceso patológico los ratones transgénicos con la SOD1 humana mutada tendrán una mayor susceptibilidad a la neurodegeneración inducida por glutamato en el cerebro, comparada con ratones silvestres.

OBJETIVO

El objetivo central de este trabajo es determinar el efecto que tiene un incremento del nivel de glutamato extracelular endógeno en la viabilidad neuronal en el cerebro de los ratones Tgn-SOD1/G93A, utilizados como modelo de la ALS, con el fin de esclarecer la participación del glutamato en el proceso neurodegenerativo que subyace la muerte celular en la ALS.

DISEÑO EXPERIMENTAL

De acuerdo con lo anteriormente discutido, la elevación del glutamato extracelular endógeno podría resultar en la degeneración de las neuronas expuestas a este aminoácido excitador, preferentemente en ratones con la SOD1/G93A, modelo de la ALS (G93A), en comparación con ratones silvestres (WT). En una aproximación experimental al fenómeno de la disfunción de los transportadores, utilizamos el bloqueador no específico de los transportadores de glutamato dependientes de sodio L-trans-2,4,pirrolidín dicarboxilato (PDC). Este compuesto funciona como sustrato para los transportadores de tal forma que es acarreado al interior celular en lugar del glutamato (Sarantis et al. 1993). En trabajos anteriores en el laboratorio, la administración intracerebral de PDC, ha logrado incrementar la concentración extracelular de glutamato además de aspartato, glutamina y taurina (Massieu et al. 1995 y 1997). El bloqueo del sistema de transporte de glutamato con PDC, es dosis-dependiente y en este trabajo utilizamos una concentración de 25 mM PDC durante 5 fracciones de microdiálisis (ver materiales y métodos), que es suficiente para inhibir el transporte e inducir la elevación del glutamato extracelular *in vivo* (Massieu et al. 1995).

Adicionalmente al bloqueo de la recaptura del glutamato, utilizamos 4-AP, que como ya se mencionó, es una droga que induce la liberación de los neurotransmisores desde las terminales nerviosas, mediante el bloqueo de canales de potasio, lo que mantiene a la neurona despolarizada por un mayor tiempo durante el potencial de acción. De la misma forma que con el PDC el efecto de la 4-AP es dosis-dependiente y de acuerdo con estudios previos en el laboratorio una dosis de 17.5 mM 4-AP administrada intracerebralmente (1 fracción de microdiálisis) es

suficiente para generar una conducta convulsiva epileptiforme causada por la liberación excesiva de glutamato, misma que puede ser bloqueada con antagonistas de los receptores de glutamato como el MK-801 (Peña et al. 1999, Tapia et al. 1999).

La administración intracerebral de las drogas mencionadas se llevó a cabo mediante microdiálisis, que es un método empleado en diversos estudios en el SNC para valorar la liberación de diferentes neurotransmisores bajo distintas condiciones experimentales. La microdiálisis funciona a través del implante en el tejido de una doble cánula concéntrica (figura 4) que tiene en su extremo una membrana de copolímero de policarbonato-poliéter semipermeable, que permite la difusión pasiva de agua, solutos y moléculas de relativamente bajo peso molecular, los cuales fluyen a través de su gradiente de concentración. La cánula se conecta a un sistema de bombeo que permite perfundir líquidos a un flujo constante y recuperar un volumen en un tiempo determinado. El porcentaje de recuperación es inversamente proporcional a la velocidad de perfusión.

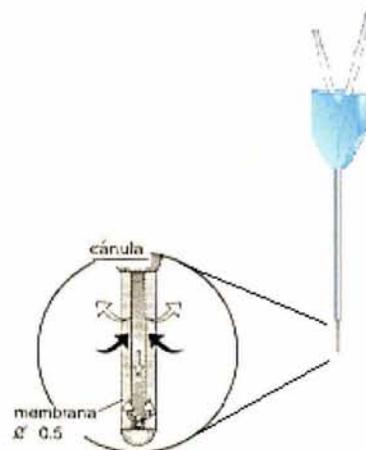


Figura 4. Cánula de microdiálisis. Las flechas blancas indican el flujo de perfusión y las negras el flujo de recuperación en la membrana.

Para evaluar los efectos que tienen tanto el PDC como la 4-AP sobre el hipocampo y la CM de los ratones G93A y WT, se realizó la cuantificación de aminoácidos en cada fracción de microdiálisis, la evaluación histológica del tejido teñido con violeta de cresilo y la expresión de la chaperona inducible HSP70 por inmunohistoquímica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este trabajo se utilizaron ratones transgénicos B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur, que sobreexpresan la forma mutante de la SOD1 humana que tiene la sustitución de la glicina 93 por una alanina (G93A) con un alto número de copias del transgen (15-20), y ratones no transgénicos (WT) de la misma cepa (B6SJL) utilizados como controles, originalmente adquiridos de los Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME. USA).

Todos los animales fueron mantenidos en un cuarto con temperatura regulada y un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, con comida y agua *ad libitum*.

Como ha sido descrito (Gurney et al. 1994), los animales G93A con mayor número de copias mostraron parálisis del tren posterior que inició aproximadamente a las 18 semanas de vida, mostrando un deterioro significativo a las 20 semanas caracterizado por la incapacidad de mover las patas traseras, en esta etapa se realizaron los experimentos de microdiálisis. Los ratones WT fueron utilizados después de las 18 semanas de vida.

Caracterización genotípica de los ratones transgénicos.

La reproducción de los ratones se llevó a cabo mediante el apareamiento de un ratón G93A en la etapa presintomática con otro WT, de modo que las camadas resultantes estaban compuestas aproximadamente por 50% G93A y 50% WT.

La caracterización genotípica de todos los ratones se realizó mediante PCR a partir de ADN extraído de sangre. Se realizó un sangrado retro-orbital del animal, ligeramente anestesiado con halotano, utilizando un tubo microcapilar heparinizado. Aproximadamente 25 μ l de sangre se lisaron con 1 ml de buffer de lisis (sacarosa 320 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM y Tritón X-100 1% v/v), y se centrifugaron en una microfuga. El sedimento se resuspendió y se incubó en un buffer de PCR con detergentes no iónicos PBND (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8.3 10 mM, MgCl₂ 2.5 mM, gelatina 0.1 mg/ml, Nonidet P40 0.45% v/v, Tween 20 0.45 % v/v y proteinasa K 60 mg/ml) a 55 °C por 1 h, al finalizar se inactivó la proteinasa K incubando la mezcla a 97 °C por 10 min. Como molde para la reacción de PCR se tomó 1 μ l de una dilución 1:100 del ADN en PBND. Se utilizaron los oligonucleótidos 5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA-3' y 5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA-3' que amplifican un producto de 236 pares de bases del exón 4 del gen humano de la SOD1 y 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3' y 5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3' que amplifican un producto de 324 pares de bases del gen endógeno de la interleucina-2 del ratón utilizado como control positivo para descartar falsos negativos, según el protocolo de los Jackson Laboratories.

La reacción de PCR se realizó en una mezcla [buffer PCR 1X (Invitrogen), MgSO₄ 1.5 mM, desoxi-trifosfo-nucleótidos A, T, C y G (0.2 mM cada uno), oligonucleótidos (0.4 mM cada uno), Platinum *Taq* ADN polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen, 0.5 U) y 1 μ l de molde] en un

volumen de 50 μ l, con las siguientes condiciones: inicio 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C-30 seg, 60 °C-30 seg, 72 °C-45 seg, y finalmente 72 °C por 2 min. La temperatura de fusión (60 °C) es la adecuada para amplificar en la misma reacción los productos de SOD1 e IL-2, los cuales fueron separados por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE (Tris-acetate/EDTA electrophoresis buffer).

Microdiálisis.

Los experimentos de microdiálisis se llevaron a cabo con los ratones anestesiados, por lo que para el implante de la cánula y durante todo el experimento, los animales fueron puestos en un sistema estereotáxico con un aditamento de inhalación por el cual fluyó una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ con 0.8-1.5% de halotano. Se hizo un corte en la piel de la cabeza y un orificio en el cráneo para la entrada de la cánula, que tiene una membrana de diálisis de 1 mm de largo y 0.5 mm de diámetro externo y una permeabilidad para moléculas de hasta 20 kDa (CMA/12). El implante se realizó de forma unilateral ya sea en el hipocampo o en la CM del ratón con las siguientes coordenadas (mm): hipocampo: anteroposterior -1.9 de Bregma, lateral +1.3 de la línea media, vertical -2.0 de la superficie del cráneo; CM: anteroposterior +1.0, lateral +1.3, vertical -1.0 (Franklin y Paxinos, 1997). Se perfundió el medio Ringer Krebs (NaCl 118 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.18 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 10 mM y CaCl₂ 2.5 mM, pH 7.4) solo o con PDC 25 mM o 4-AP 17.5 mM; a un flujo de 2 μ l/min utilizando una bomba de microinyección (CMA/100 Microinjection Pump, BAS). Después de 1 h de estabilización se colectaron continuamente 8 fracciones de 25 μ l en 12.5 min cada una, usando un colector automático (CMA/140 Microfraction Collector, BAS). Al final del experimento después de retirar la cánula se suturó la piel. La cánula tiene un porcentaje de eficiencia de ~10% (Morales-Villagrán et al. 1996).

Cuantificación de aminoácidos

El análisis cuantitativo de los aminoácidos recuperados en las fracciones de microdiálisis se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como se describe en el trabajo de Salazar et al. (1994). Los 25 μ l de cada fracción se derivatizaron con un volumen igual de o-ftaldialdehído (Sigma) en una reacción de 3 min, inmediatamente después se inyectaron 20 μ l en el cromatógrafo (Beckman).

La cromatografía se realizó usando columnas de fase reversa de 25 cm de largo y 4 mm de diámetro interno (Beckman Coulter). Se utilizó como fase móvil metanol / acetato de potasio 0.1 M, pH 5.5, a un flujo de 1.5 ml/min en un gradiente lineal de 15 min que fue desde 25 hasta 75% de metanol. Se utilizó un detector de fluorescencia para la cuantificación de los derivados.

Los resultados obtenidos de cada muestra fueron comparados con los de una mezcla estándar de 7 aminoácidos (asp, glu, gln, gly, tau, ala y GABA) procesada de la misma forma. Los valores finales no fueron corregidos con respecto al porcentaje de eficiencia de la membrana de microdiálisis el cual como ya se mencionó es de \sim 10%.

Histología

Veinticuatro horas después del experimento de microdiálisis los ratones fueron sacrificados. Después de ser anestesiados con 0.3 ml de pentobarbital sódico (inyectado i.p.) fueron perfundidos intracardialmente con 50 ml de solución salina (0.9 %) fría, seguidos de 250 ml de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.4 frío. Los cerebros fueron removidos y postfijados durante 24 h en paraformaldehído a 4 °C, posteriormente fueron transferidos a

soluciones de sacarosa al 10, 20 y 30% y mantenidos durante 24 h en cada una para deshidratarlos. El tejido fue cortado en un crióstato en secciones coronales de 50 μm de grosor en el sitio donde la cánula fue colocada. Las secciones se emplearon alternativamente para la evaluación histológica mediante la tinción con violeta de cresilo y para la inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica de HSP70 se llevó a cabo en los cortes en flotación, que fueron tratados en PBS 0.1 M con Tritón al 0.3% durante 1 h, inmediatamente después se dejaron por 2 h en bloqueo con albúmina bovina (BSA) al 5% disuelta en PBS 0.1 M, para evitar la unión del anticuerpo a sitios no específicos y se incubaron en frío por 48 h con el anticuerpo monoclonal primario de ratón IgG α -HSP70 (Santa Cruz Biotechnology), 15 $\mu\text{l/ml}$ en BSA; posteriormente se lavaron por 10 min 2 veces con PBS/Tritón, y se incubaron por 2 h con un anticuerpo secundario de cabra α -IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC : ZYMED Lab.) en una dilución 1:250 en PBS/Tritón. Al terminar, se lavaron nuevamente de la misma forma, se colocaron en portaobjetos previamente tratados con silano (Sigma), y se cubrieron con Vecta-shield (Vector). Los cortes se observaron en un microscopio con aditamento de epifluorescencia.

Para cada cerebro se incluyó una sección tisular tratada de la misma manera con excepción de la incubación con el anticuerpo primario, para descartar falsos positivos.

RESULTADOS

Efecto del PDC en el hipocampo.

La perfusión en el hipocampo de PDC 25 mM mediante microdiálisis incrementó en gran medida las concentraciones extracelulares de glutamato y aspartato por más de una hora en ambos grupos (figura 5). La cantidad liberada de glutamina y taurina también se elevó pero en menor medida, mientras que la glicina y la alanina no cambiaron (datos no mostrados). Durante las fracciones donde el glutamato se encontró más elevado (5 a 8), los niveles del neurotransmisor alcanzaron entre 8 y 10 veces el nivel basal. Este efecto fue muy similar en los ratones G93A y en los WT y no hubo diferencias significativas entre los dos grupos comparando cada fracción, ni siquiera en las fracciones basales (3 primeras).

A pesar del elevado nivel extracelular alcanzado por el glutamato durante el bloqueo de su transporte, no hubo neurodegeneración en el tejido del hipocampo en ninguno de los dos grupos (figura 6). El único daño que puede apreciarse claramente en el tejido es el producido por la inserción de la cánula, pero inclusive las zonas más próximas al sitio lesionado por ésta se encuentran bien preservadas.

El tratamiento con PDC en el hipocampo tampoco indujo la expresión de la chaperona HSP70. Como se puede ver en la figura 7, esta proteína no fue detectable ni en los WT ni en los G93A.

Hipocampo

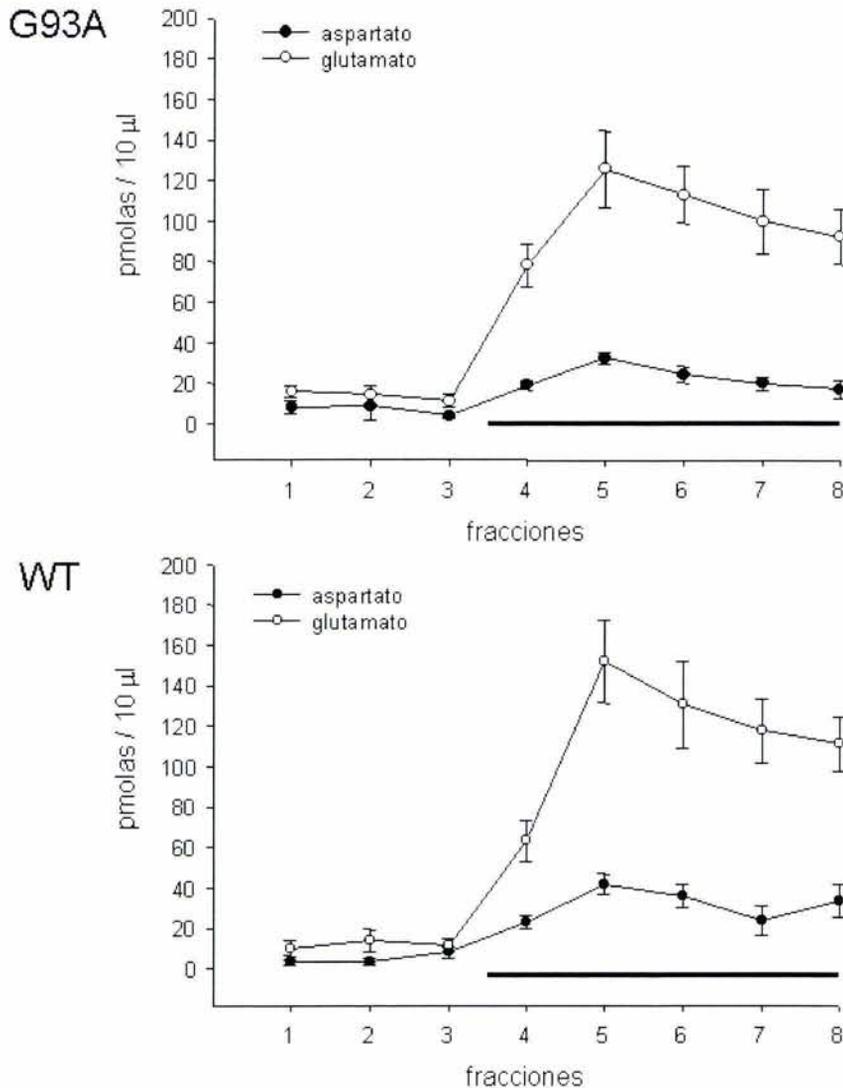


Figura 5: Efecto del PDC sobre la concentración de glutamato y aspartato extracelulares en el hipocampo de los ratones G93A y WT. Las gráficas muestran los niveles extracelulares de glutamato y aspartato en cada uno de los grupos, durante las fracciones basales (1 a 3) y durante la perfusión de PDC 25 mM (barra: fracciones 4-8, 62.5 min). No hay diferencias significativas en los niveles de glutamato y aspartato entre los G93A y los WT en el valor basal, ni en el valor incrementado por el PDC. n=5 en cada grupo.

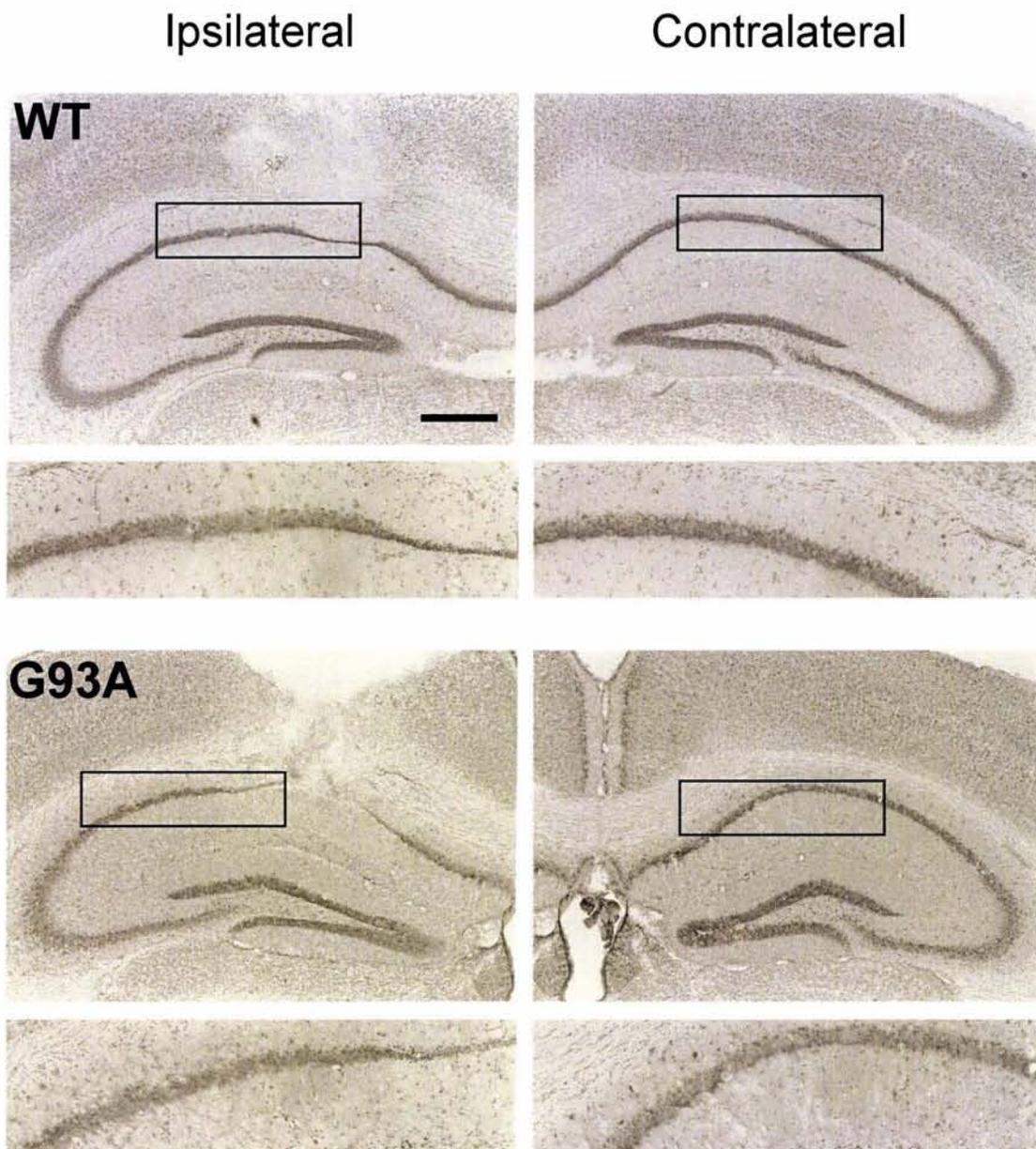


Figura 6: Micrografías representativas (5 ratones por grupo) del efecto del PDC sobre el tejido del hipocampo. En la región CA1 del hipocampo ipsilateral se observa solamente el daño causado por la inserción de la cánula. En un aumento mayor, el área de CA1 en la región perfundida en el hipocampo ipsilateral y la región correspondiente del hipocampo contralateral. La barra corresponde a 500 μm en las fotografías superiores y a 200 μm en los aumentos.

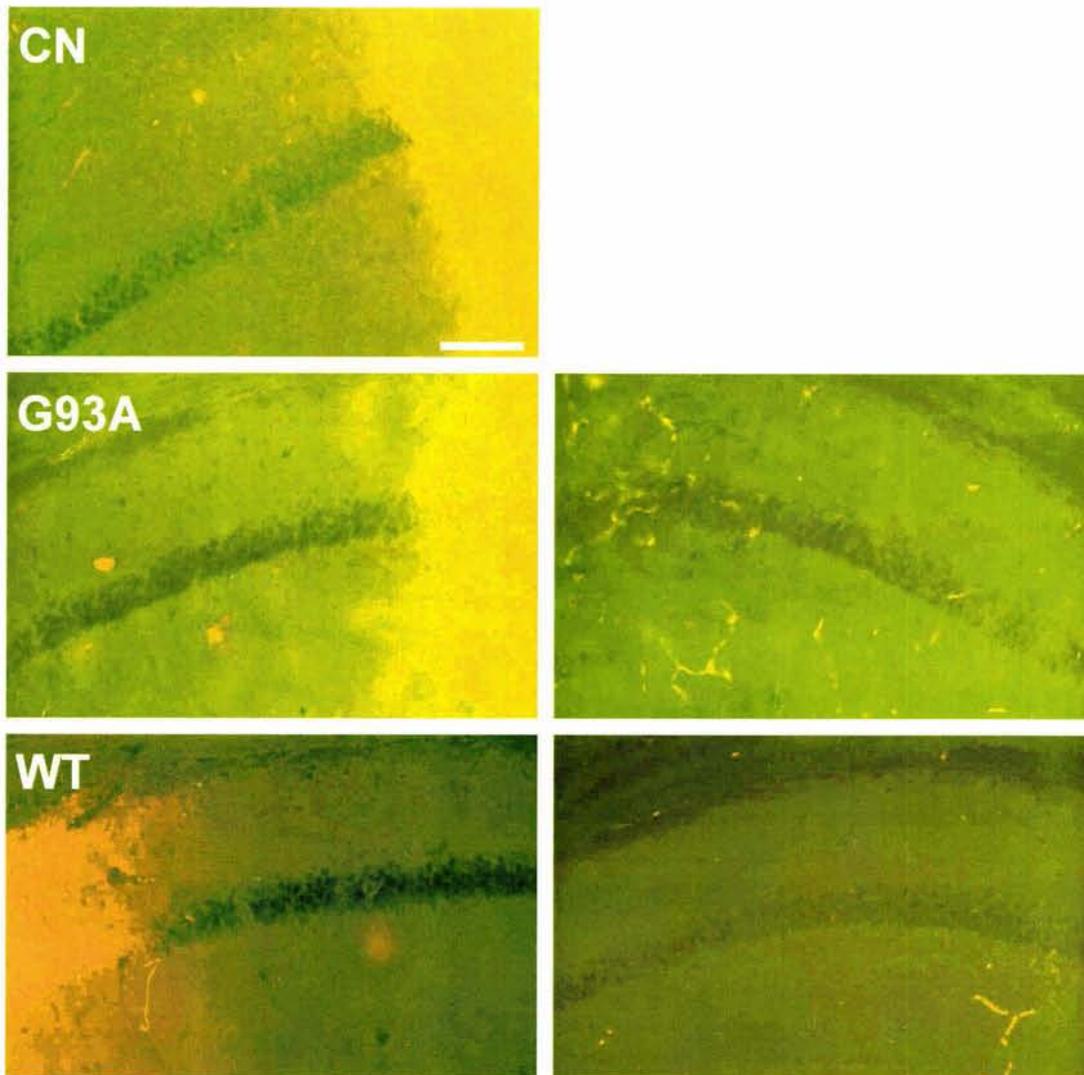


Figura 7: Micrografías representativas (5 ratones por grupo) de la inmunohistoquímica contra HSP70 en el hipocampo de G93A y WT perfundidos con PDC 25 mM. Las fotografías muestran el área de CA1 en los G93A y WT, en la zona perfundida del lado ipsilateral (tracto de la cánula en el extremo “amarillo”) y la zona correspondiente del hipocampo contralateral. La fotografía del control negativo (CN) muestra el área CA1 del lado ipsilateral en un corte tratado sin anticuerpo primario. En ningún caso se observa la expresión de la chaperona en el tejido tratado con PDC. La barra es igual a 100 μ m.

Efecto de la 4-AP en el hipocampo.

Con nuestro sistema, en el hipocampo no pudimos detectar cambios en la concentración extracelular de glutamato después de la administración de 4-AP 17.5 mM por microdiálisis. Sin embargo hubo una reducción de casi la mitad del valor basal en la glutamina extracelular en ambos grupos (figura 8). Esta respuesta de la glutamina a la 4-AP ha sido muy reproducible en diversos experimentos en el laboratorio, con lo que podemos confirmar el efecto de la 4-AP sobre los aminoácidos extracelulares. En estos experimentos tampoco hubo diferencias significativas en los niveles de glutamato y glutamina entre los G93A y los WT. No hubo cambios en las concentraciones de aspartato, glicina y alanina, y en la taurina hubo una reducción con respecto al valor basal (datos no mostrados).

Al terminar el experimento de microdiálisis, cuando los ratones WT despertaron de la anestesia presentaron crisis epileptiformes caracterizadas por convulsiones tónico-clónicas generalizadas que tuvieron una duración aproximada de 2.5 horas, después de las cuales desapareció esta conducta y todos los animales sobrevivieron. En contraste, los ratones G93A tuvieron crisis epileptiformes de mayor intensidad y duración (más de 5 horas) con respecto a los WT. Además, no todos los animales que recibieron este tratamiento lograron sobrevivir 24 h, y los que lo hicieron (6 de 9) presentaron un severo deterioro al día siguiente. Para confirmar si la generación de las convulsiones epilépticas es resultado de la hiperactivación de los receptores glutamatérgicos como respuesta a la liberación excesiva de glutamato causada por la 4-AP, se administró i.p. previamente (30 min) 1 mg/kg de peso de MK-801, un antagonista de los receptores NMDA. Con este tratamiento las crisis epileptiformes fueron prevenidas; estos

ratones sólo mostraron una pérdida del equilibrio al caminar, similar a la que presentaron ratones tratados con MK-801 únicamente (n=5).

La neurodegeneración causada por la 4-AP, caracterizada por el adelgazamiento de la capa de neuronas piramidales del hipocampo, es claramente apreciable en el hipocampo de los ratones WT, donde el estrato piramidal está completamente destruido en toda el área de CA1 hasta su límite bien definido con CA2, en el hipocampo perfundido (figura 9), este daño fue también prevenido con la aplicación de MK-801 (datos no mostrados). En los ratones G93A el daño causado por la 4-AP no es tan severo, aunque si se pueden distinguir núcleos picnóticos a lo largo de la región de CA1 (figura 9).

En contraste con el PDC, la 4-AP indujo una notable expresión de la HSP70 en diversas regiones del cerebro a las 24 h, la cual fue muy intensa en ambos grupos, especialmente en los G93A (figura 10). Sin embargo, sorpresivamente tal expresión no fue tan intensa en el hipocampo, donde puede distinguirse en la región de CA3 e hilus en los dos lados (A y B), como a lo largo de las capas corticales correspondientes a la cortezas somatosensorial y parietal posterior que están sobre el hipocampo (C y D); en regiones más laterales de la corteza (somatosensorial secundaria, auditiva y entorrinal), aproximadamente a la mitad del corte (E) y en el núcleo de la amígdala (F). La marca más intensa se observó en el lado contralateral (A, C, E y F). La expresión de la HSP70 también fue muy intensa en el hipocampo y la corteza en los ratones WT, sobre todo en el lado contralateral (figura 11). Al igual que con las crisis epilépticas y la neurodegeneración, el MK-801 evitó la inducción de la HSP70 (datos no mostrados).

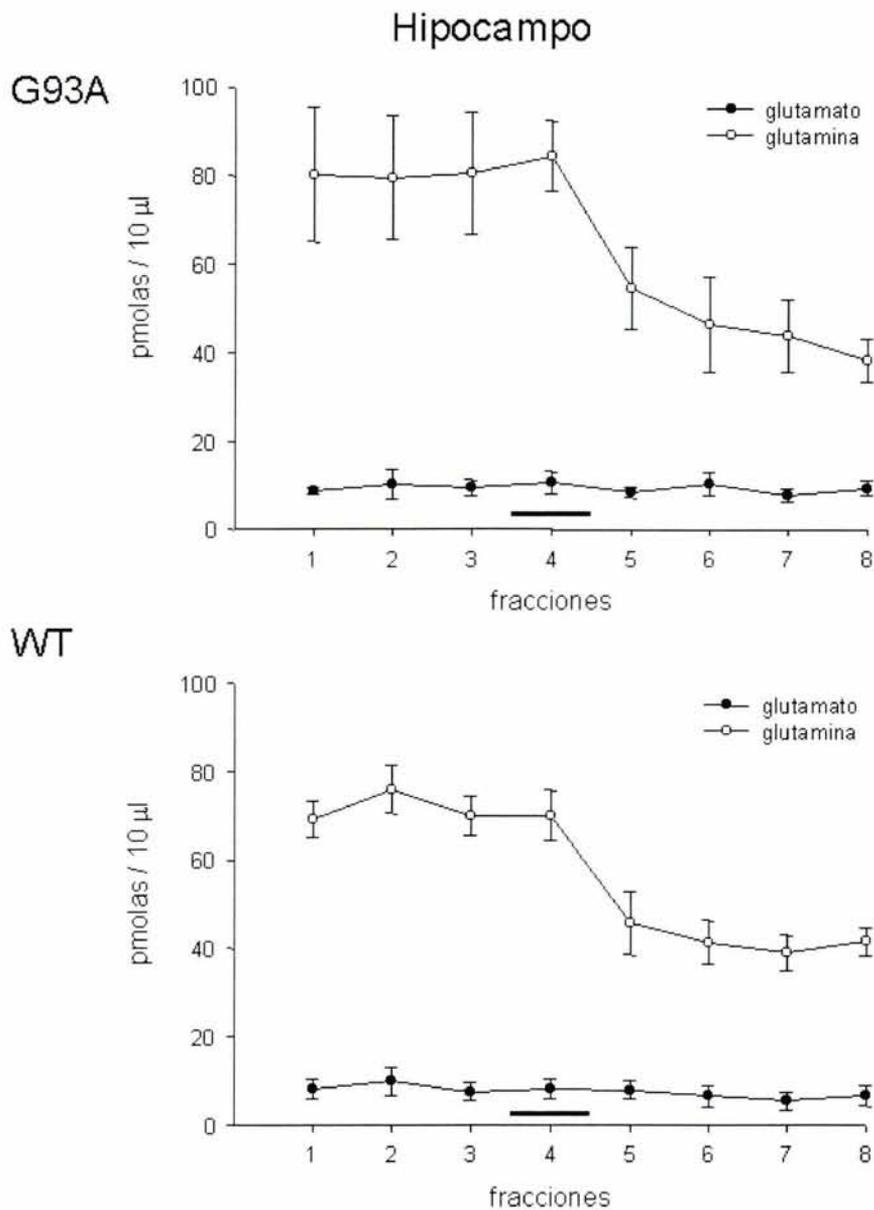


Figura 8: Efecto de la 4-AP sobre la concentración de glutamato y glutamina extracelulares en el hipocampo de los ratones G93A y WT. Las gráficas muestran los niveles extracelulares de glutamato y glutamina en cada uno de los grupos, durante las fracciones basales (1 a 3), durante la perfusión de 4-AP 17.5 mM (barra: fracción 4, 12.5 min) y en las fracciones de recuperación (5 a 8). No hay diferencias significativas en los valores obtenidos para cada fracción entre los G93A y los WT. n=5 en cada grupo.

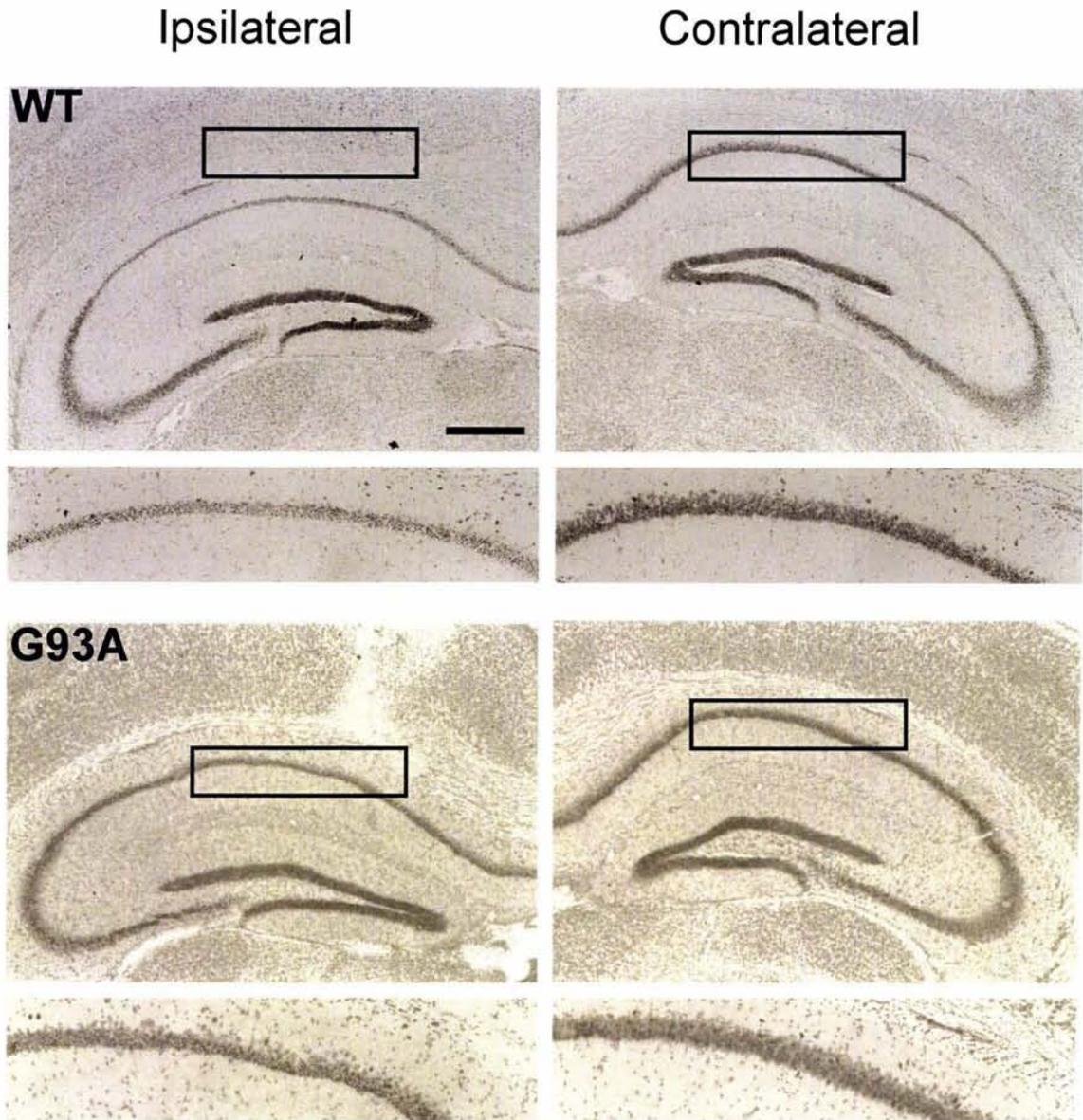


Figura 9: Micrografías representativas del efecto sobre el tejido en el hipocampo de la 4-AP. En la región CA1 del hipocampo del lado ipsilateral se aprecia una severa neurodegeneración en el ratón WT (n=10), mientras que en el G93A, aunque hay picnosis, la capa celular de CA1 no se encuentra tan deteriorada (n=6 de 9). En un aumento mayor, el área de CA1 en la región perfundida en el hipocampo ipsilateral y la región correspondiente del hipocampo contralateral. La barra corresponde a 500 μm en las fotografías superiores y a 200 μm en los aumentos.

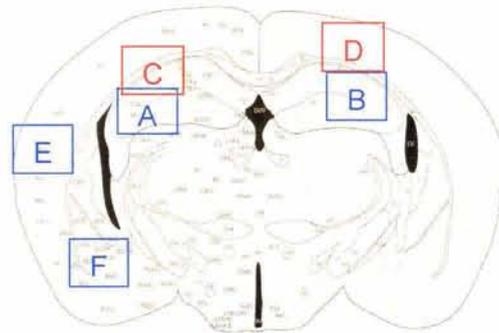
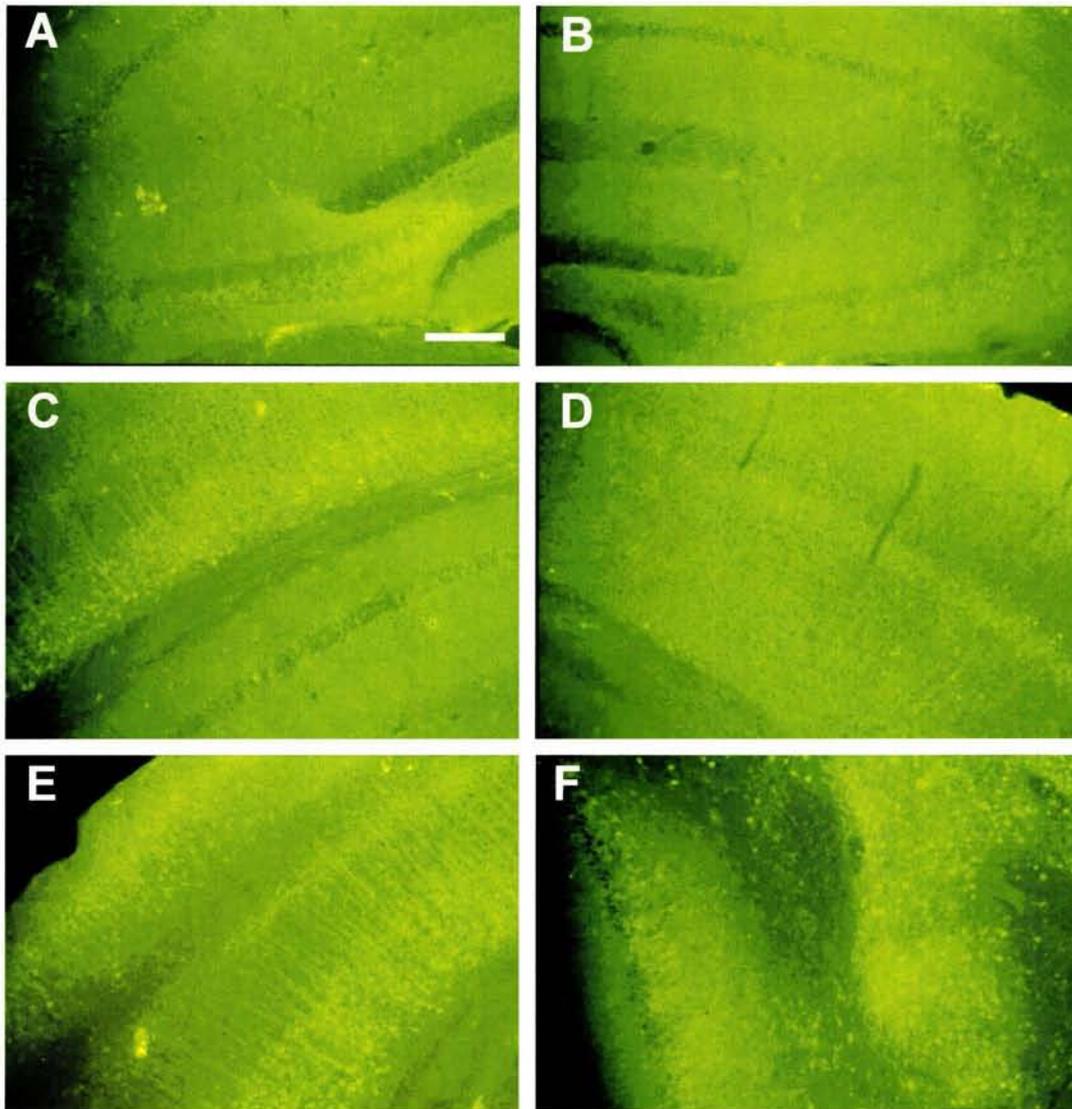


Figura 10: Micrografías representativas de la inmunohistoquímica para HSP70 en el hipocampo de ratones G93A (n=6) perfundido con 4-AP 17.5 mM. Las fotografías muestran en A: hipocampo contralateral; B: hipocampo ipsilateral; C: corteza y CA1 del lado contralateral; D: corteza ipsilateral; E: corteza contralateral en la región media (corteza somatosensitiva secundaria y entorrinal) y F: corteza contralateral y el núcleo de la amígdala. La expresión de la HSP70 es intensa y abarca casi toda la corteza sobre todo del lado contralateral. La barra es igual a 200 μm .

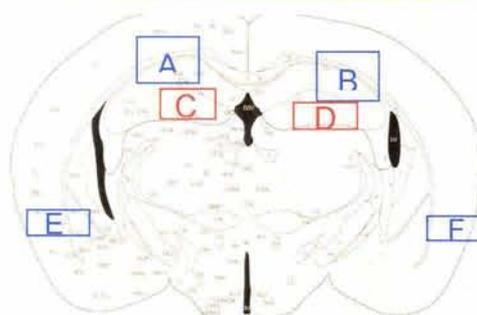
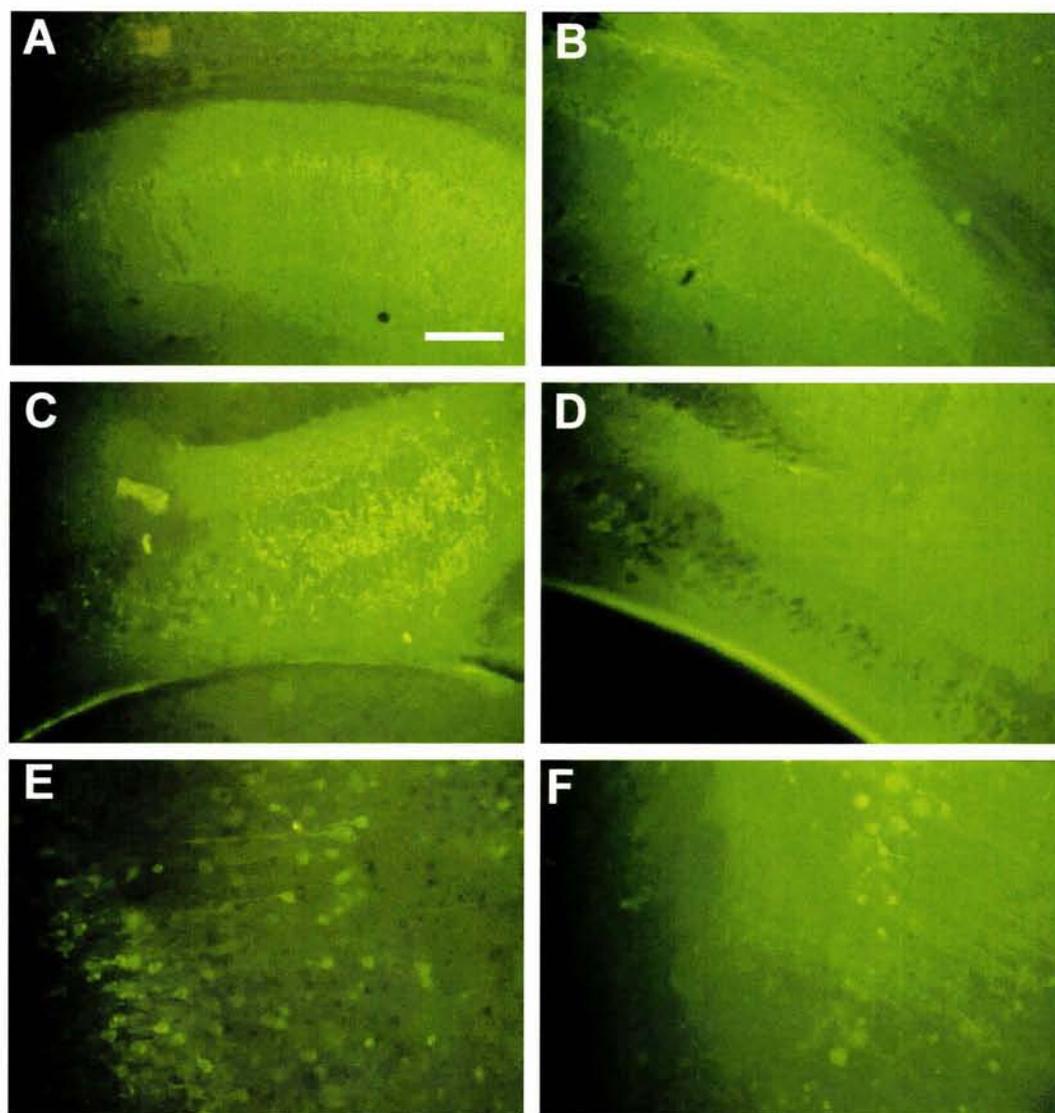


Figura 11: Micrografías representativas de la inmunohistoquímica de la HSP70 en el hipocampo de WT perfundido con 4-AP 17.5 mM (n=5). Las fotografías muestran en A: la región CA1 del hipocampo contralateral; B: CA1 del hipocampo ipsilateral; C: hilus y giro dentado del hipocampo contralateral; D: hilus y giro dentado del hipocampo ipsilateral; E: corteza contralateral (cerca del núcleo de la amígdala) y F: la región correspondiente de la corteza en E del lado ipsilateral. Se puede apreciar la expresión de la proteína en varias neuronas en el hipocampo, sobre todo en el área del hilus (C) y en distintas regiones de la corteza. La barra es igual a 200 μ m en A y B y a 100 μ m en C, D, E y F.

Efecto del PDC en la corteza motora.

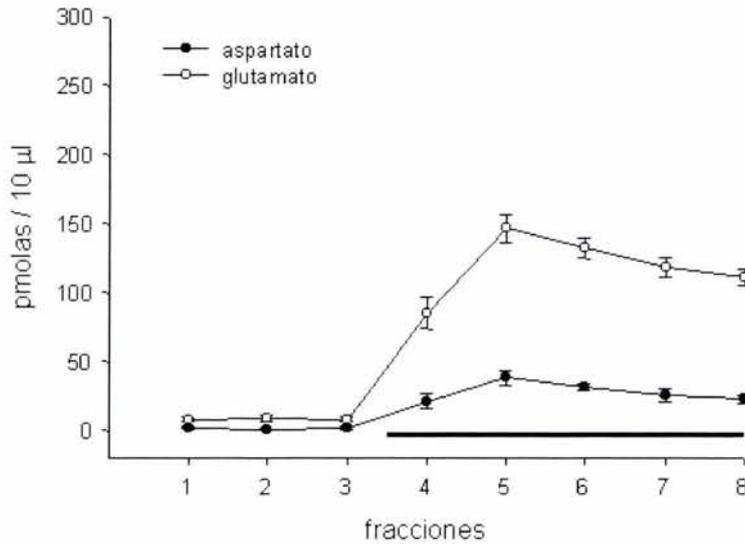
De manera similar al efecto que tuvo la perfusión de PDC 25 mM en el hipocampo, este tratamiento en la CM incrementó la concentración extracelular de glutamato y aspartato en los dos grupos (figura 12). La concentración extracelular de glutamato durante las fracciones 5 a 8 alcanzó entre 12 y 16 veces el nivel basal. En estos experimentos el nivel extracelular de glutamato incrementado por el PDC fue más elevado en los ratones WT con respecto a los G93A ($p < 0.05$), pero no hubo diferencias significativas en las fracciones basales. La concentración extracelular de glutamina se incrementó ligeramente, mientras que en las concentraciones de glicina, taurina y alanina, casi no hubo cambios (datos no mostrados).

También de manera similar a lo observado en el hipocampo, a pesar del gran incremento en el glutamato extracelular, el tejido de la CM no presenta alteraciones claramente visibles, en comparación con el tejido tratado exclusivamente con Krebs (figura 13). El único daño que se detecta a las 24 h del experimento es el de la lesión causada por el implante de la cánula.

Con el tratamiento de PDC en la CM tampoco se indujo la expresión de la HSP70. En la figura 14, se pueden apreciar como "puntos negros", los somas de las neuronas en el tejido perfundido, indicando la ausencia de la chaperona.

Corteza motora

G93A



WT

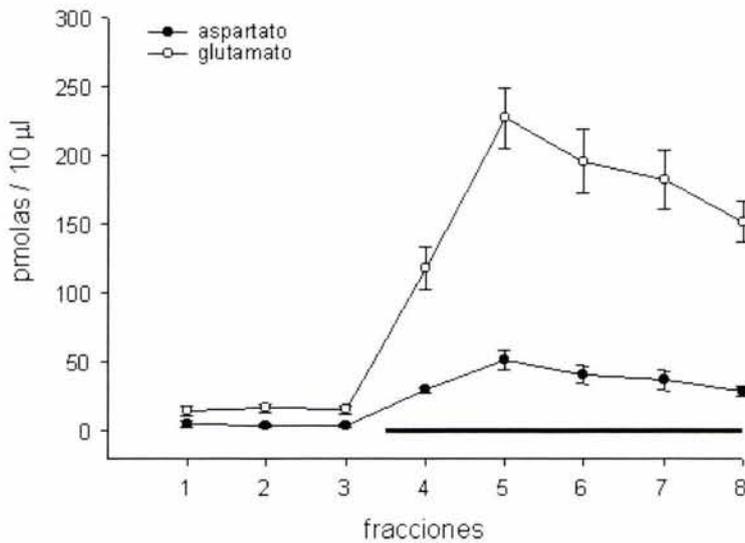


Figura 12: Efecto del PDC sobre la concentración de glutamato y aspartato extracelulares en la corteza motora de los ratones G93A y WT. Las gráficas muestran los niveles extracelulares de glutamato y aspartato en cada uno de los grupos, durante las fracciones basales (1 a 3) y durante la perfusión de PDC 25 mM (barra: fracciones 4-8, 62.5 min). En las 4 últimas fracciones (durante la perfusión de PDC) la cantidad de glutamato extracelular es más elevada en los WT que en los G93A ($p < 0.05$). $n = 5$ en cada grupo.

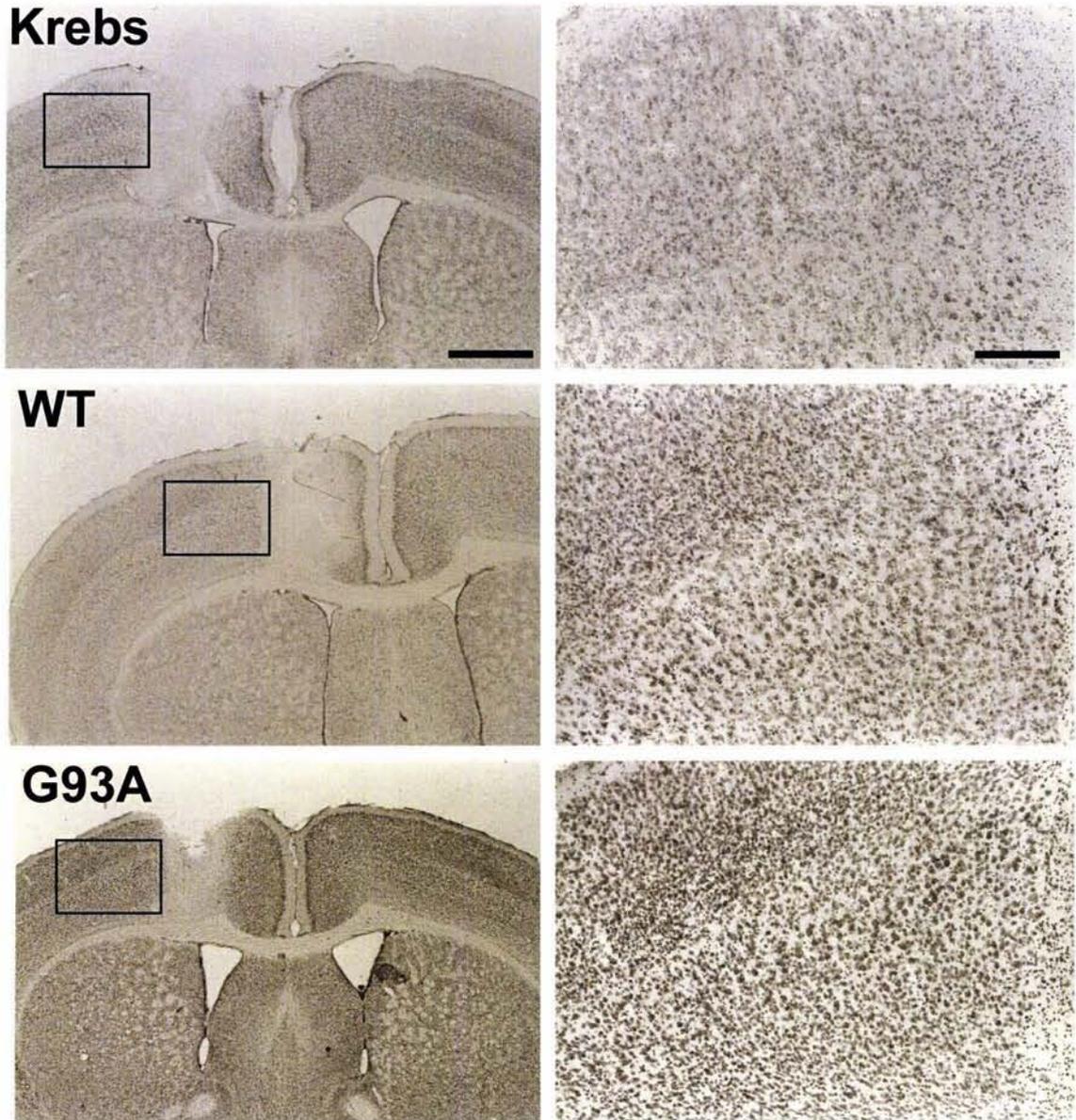


Figura 13: Micrografías representativas del efecto del PDC sobre el tejido de la corteza motora (n=5 en cada grupo). Se observa únicamente el daño causado por la inserción de la cánula (región clara a la derecha del recuadro). Las fotografías de la derecha muestran a mayor magnificación (barra igual a 200 μm) las áreas marcadas en los recuadros de las fotografías de la izquierda (barra igual a 1 mm). No hay diferencia entre la morfología del tejido perfundido con Krebs únicamente y los tejidos de G93A y WT perfundidos con PDC 25 mM.

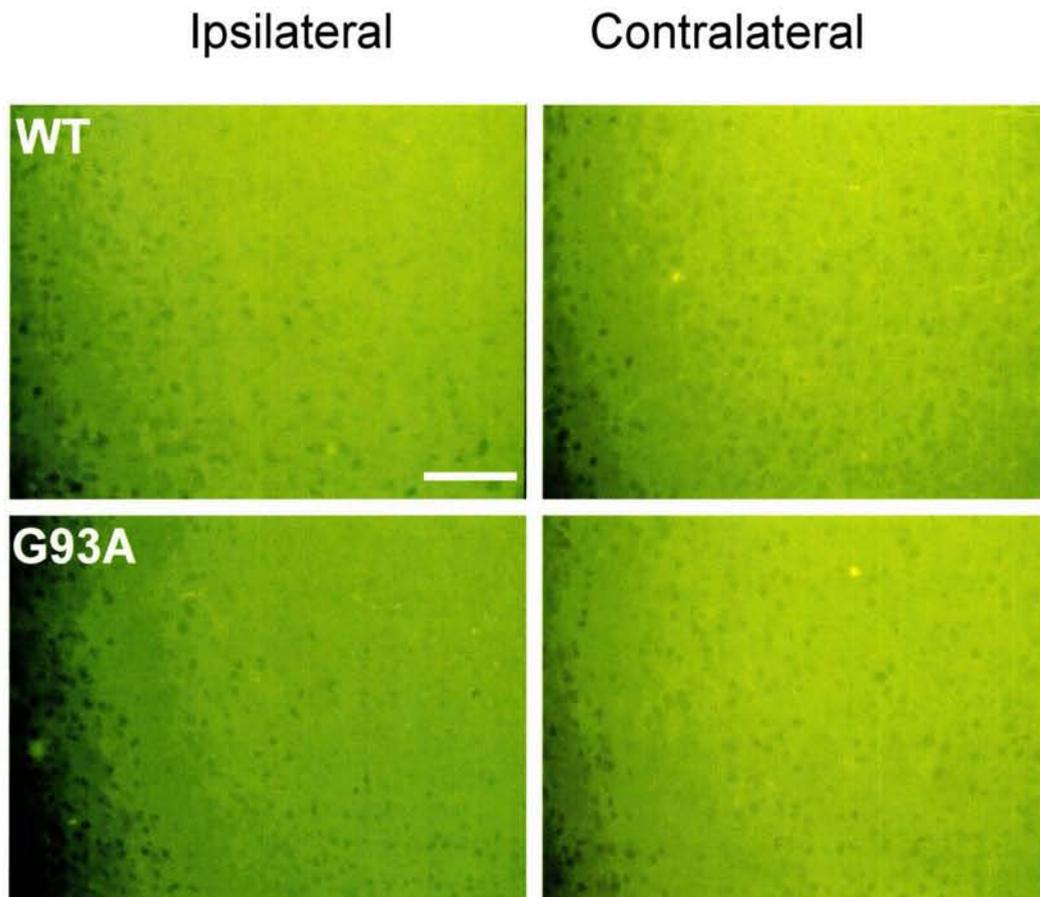


Figura 14: Micrografías representativas de la inmunohistoquímica contra HSP70 en la corteza motora de los ratones G93A y WT perfundidos con PDC 25 mM (n=5 en cada grupo). Las fotografías muestran el área cercana a la cánula perfundida por el PDC en el lado ipsilateral (misma de la figura 12) y el área correspondiente en el lado contralateral. No se observa inducción de la chaperona y pueden distinguirse como “puntos negros” los somas de las neuronas. La barra es igual a 100 μ m.

Efecto de la 4-AP en la corteza motora.

Al igual que en el hipocampo, la perfusión de 4-AP 17.5 mM en la CM tampoco tuvo un efecto evidente sobre el contenido de glutamato extracelular, al menos medido con nuestro sistema, pero el efecto en la reducción de la glutamina extracelular fue muy evidente en ambos grupos (figura 15). No hubo diferencias significativas en los valores de glutamato y glutamina extracelulares entre los dos grupos. Y de manera similar a lo visto en el hipocampo, no hubo cambios en las concentraciones de aspartato, glicina y alanina, y en la taurina hubo una reducción con respecto al valor basal (datos no mostrados).

Cuando los animales de ambos grupos despertaron de la anestesia presentaron crisis epileptiformes caracterizadas por convulsiones tónico-clónicas generalizadas que duraron aproximadamente 2.5 h, conducta que puede ser prevenida con la administración previa de MK-801; todos los animales lograron sobrevivir a las convulsiones. Al día siguiente del experimento, los G93A mostraron un incremento muy ligero en la parálisis característica de este modelo transgénico.

La 4-AP no produjo neurodegeneración en el tejido perfundido en los G93A ni en los WT (figura 16), el único daño que se observa es el de la lesión causada por la cánula, de manera similar que en el tejido perfundido exclusivamente con Krebs.

La expresión de la HSP70 24 h después de la microdiálisis se indujo por el tratamiento con 4-AP en áreas pequeñas de la corteza contralateral (figura 17), pero no fue tan intensa como la observada cuando la 4-AP se perfundió en el hipocampo, y aparentemente fue ligeramente mayor en los G93A en comparación con los WT.

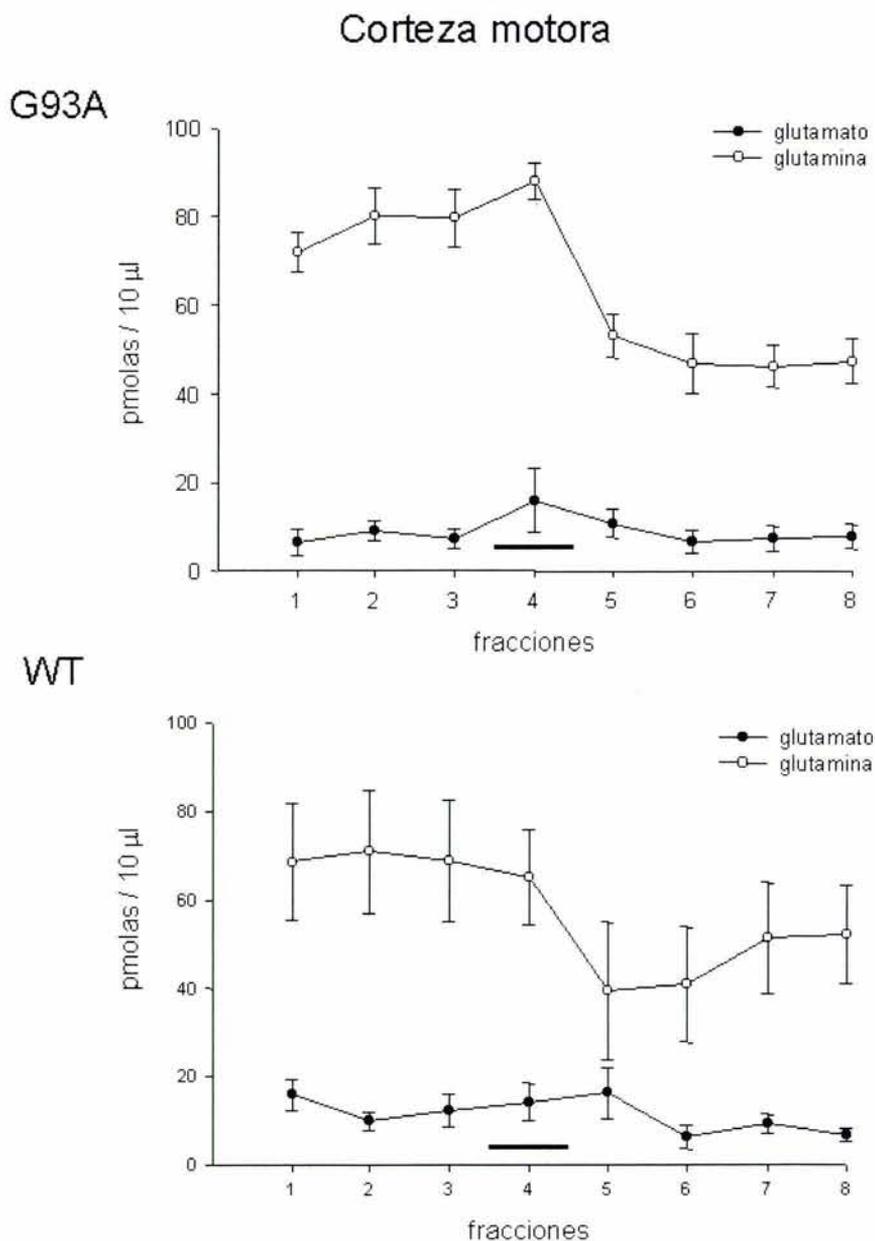


Figura 15: Efecto de la 4-AP sobre glutamato y glutamina extracelulares en la corteza motora de los ratones G93A y WT. Las gráficas muestran los niveles extracelulares de glutamato y glutamina en cada uno de los grupos, durante las fracciones basales (1 a 3), durante la perfusión de 4-AP 17.5 mM (barra: fracción 5, 12.5 min) y en las fracciones de recuperación (5 a 8). No hay diferencias significativas en los valores obtenidos para cada fracción entre los G93A y los WT. n=5 en cada grupo.

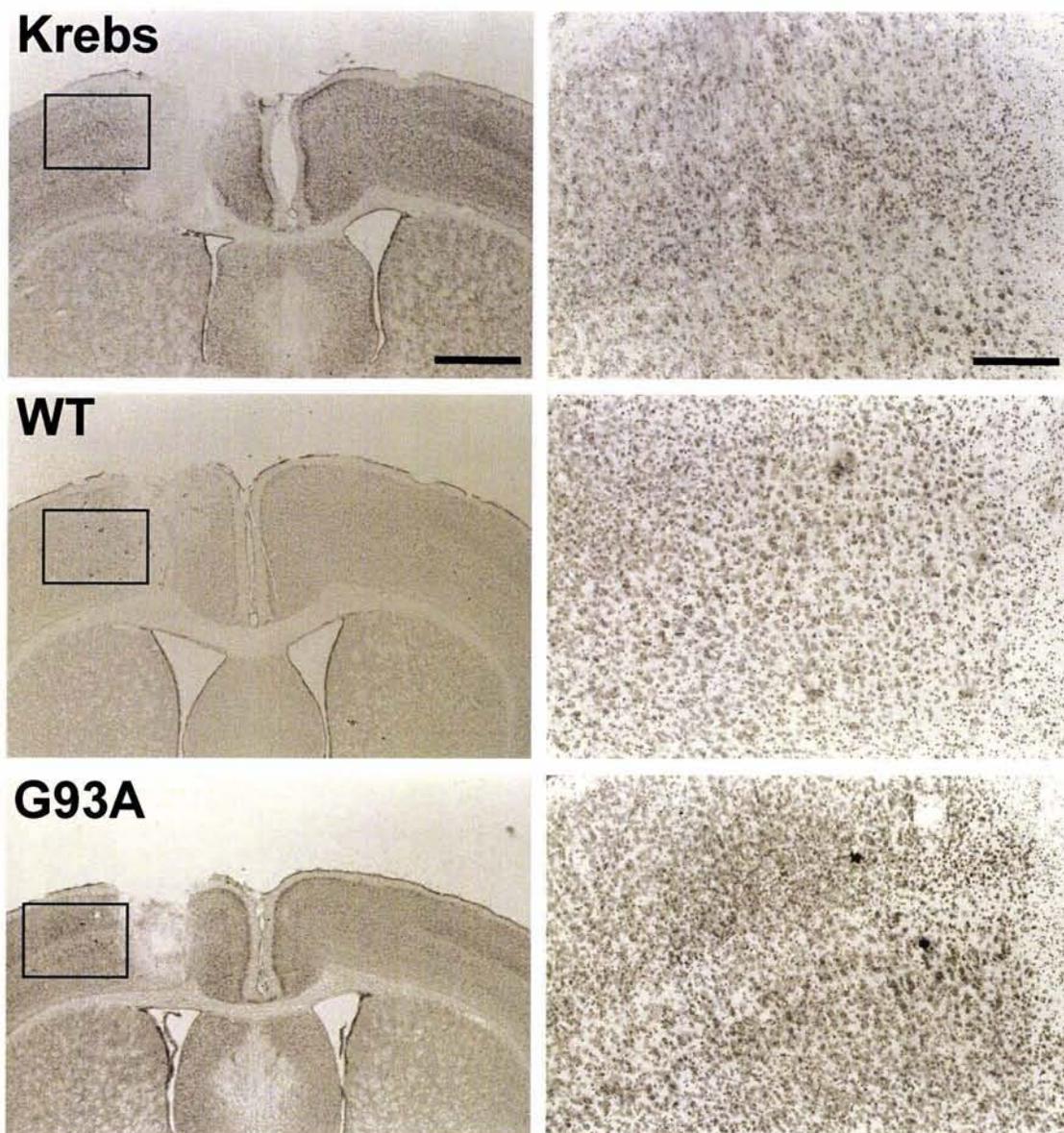


Figura 16: Micrografías representativas del efecto de la 4-AP sobre el tejido de la corteza motora (n=5 en cada grupo). Se observa únicamente el daño causado por la inserción de la cánula (región clara a la derecha del recuadro). Las fotografías de la derecha muestran a mayor magnificación (barra igual a 200 μm) las áreas marcadas en los recuadros de las fotografías de la izquierda (barra igual a 1 mm). No hay diferencia entre la morfología del tejido perfundido con Krebs únicamente y los tejidos de G93A y WT perfundidos con 4-AP 17.5 mM.

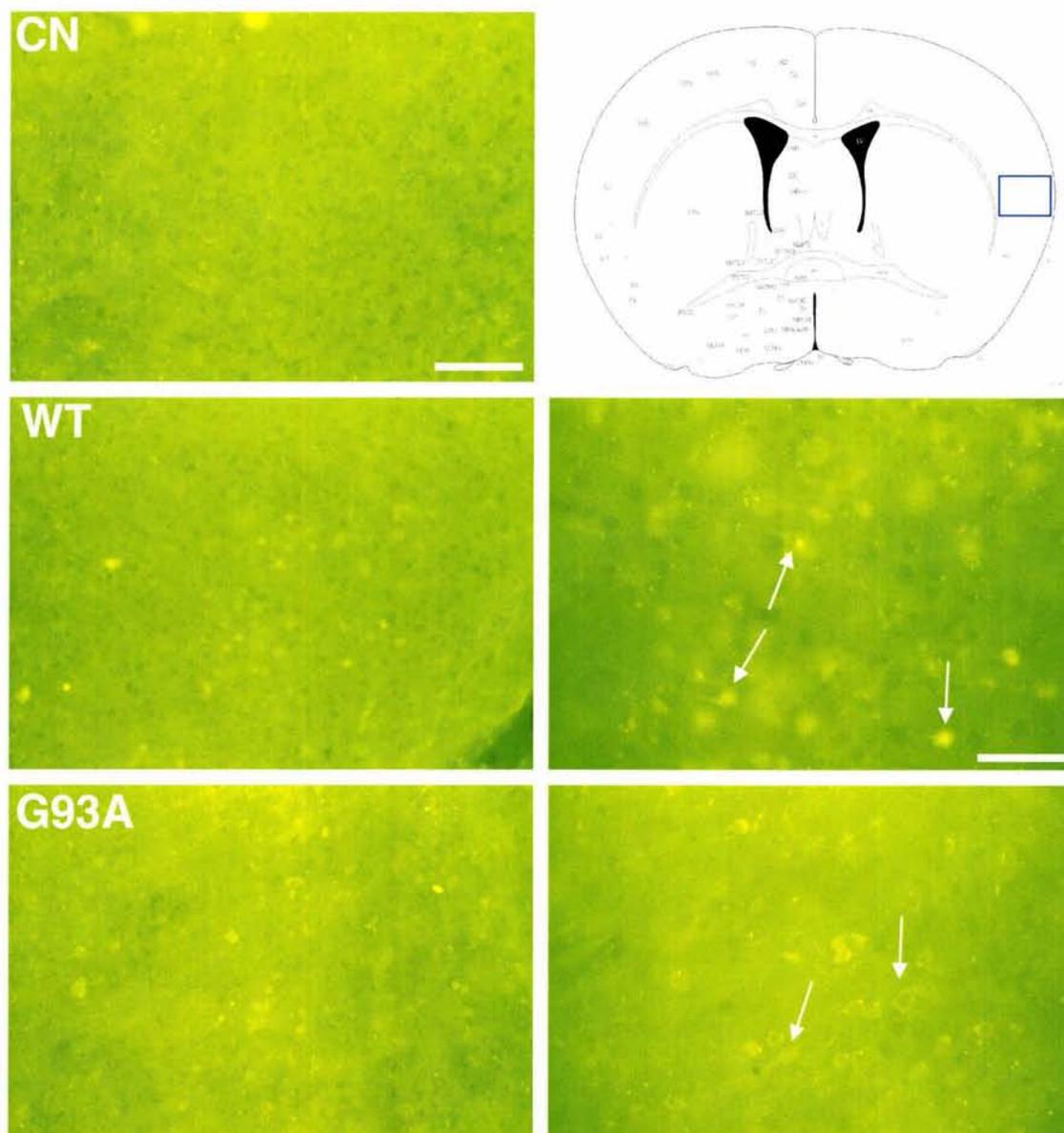


Figura 17: Micrografías representativas de la inmunohistoquímica para la HSP70 en la corteza motora de G93A y WT perfundidos con 4-AP 17.5 mM. Las fotografías muestran una región de la corteza lateral del lado no perfundido correspondiente a la corteza somatosensorial. Las figuras de la derecha en G93A y WT (barra igual a 50 mm) son aumentos de la misma área en las figuras de la izquierda (barra igual a 100 mm). En el control negativo (CN) tratado sin anticuerpo primario, la barra es igual a 100 mm. Después del tratamiento con 4-AP se observa únicamente una ligera expresión de la HSP70, pero lejana al área perfundida. Las flechas señalan algunas neuronas que expresan la HSP70.

DISCUSIÓN

Como se mencionó en la introducción, la ALS se caracteriza por la muerte selectiva de las motoneuronas en la médula espinal, el tallo cerebral y la CM. El modelo ideal para el estudio sobre los mecanismos de la ALS es la médula espinal. Sin embargo, debido al tamaño tan pequeño del ratón es técnicamente imposible ubicar una cánula de microdiálisis en esta región, la cual tiene alrededor de 1 mm de diámetro en la porción lumbar. Por lo mismo, los experimentos se llevaron a cabo en las estructuras cerebrales del hipocampo y la CM, donde el primero fue elegido debido a su relativa vulnerabilidad a la muerte excitotóxica (Tapia et al. 1999, Peña y Tapia 2000) y la segunda debido a que está involucrada en la patología de la ALS.

La parálisis que presentan los ratones G93A como resultado de la expresión de la SOD1 humana mutada es progresiva; comienza desde las extremidades posteriores y va ascendiendo, en paralelo a como se mueren las motoneuronas en la médula espinal. Los experimentos con estos ratones se realizaron en la etapa de parálisis en las dos patas traseras, cuando hay un déficit motor bastante notable, pero los animales son aun capaces de deambular por sus cajas utilizando las patas delanteras y pueden alimentarse normalmente. Esto significa que la neurodegeneración que han sufrido a este tiempo no llega más allá de la médula espinal. Sin embargo, tanto el hipocampo como la CM de estos animales han estado expuestos durante toda la vida del ratón a los efectos nocivos de la SOD1m, lo que implica que las neuronas en esta etapa, podrían ser más vulnerables a la neurodegeneración inducida por excitotoxicidad en los ratones G93A en comparación con los WT, aun con estímulos pequeños.

Adicionalmente, en la ALS como en otras enfermedades neurodegenerativas, existe un déficit energético, el cual es potenciado por el daño oxidante al que están expuestas las mitocondrias (Beal 2000). En apoyo a lo anterior, se ha visto que al suplementar la dieta de los G93A con creatina, una molécula que participa como reserva energética intracelular, se logra retrasar el progreso de la enfermedad (Klivenyi et al. 1999, Andreassen et al. 2001). Cuando hay un déficit energético severo, el potencial de membrana, mantenido por las ATPasas Na^+/K^+ , puede perderse con mayor facilidad y esto puede llevar a que una elevación, aunque pequeña, de glutamato logre mantener despolarizada más fácilmente a la neurona postsináptica, inclusive activando a los receptores NMDA más rápidamente, y generando un daño excitotóxico mayor. Así, las motoneuronas en condiciones de deficiencia energética deberían también ser más susceptibles a una estimulación glutamatérgica incrementada, en comparación con las neuronas de los ratones WT.

Inhibición del transporte de glutamato.

Como se discutió anteriormente, una de las principales hipótesis que se han considerado como parte de los mecanismos de neurodegeneración en la ALS, es el funcionamiento deficiente de los transportadores glutamatérgicos, probablemente a causa del daño oxidante al que están expuestos, principalmente en un medio donde la SOD1 se encuentra alterada. El bloqueo de los transportadores resultaría en la muerte de las neuronas expuestas al incremento del glutamato extracelular que pueda hiperactivar sus receptores, un proceso que se facilitaría en las condiciones celulares que se acaban de mencionar.

La perfusión de PDC, con el consecuente y muy evidente incremento en el glutamato extracelular, no resultó en la muerte neuronal en las áreas

perfundidas del hipocampo ni de la CM en los ratones WT. Estos resultados concuerdan con datos anteriores donde el PDC perfundido por microdiálisis en el estriado y en el hipocampo de la rata, e inyectado agudamente en el estriado, tampoco tuvo un efecto sobre la muerte neuronal en ratas a diferentes edades (Massieu et al. 1995 y 1997). Una posible explicación de la falta de daño después de un incremento tan notable en el nivel de glutamato extracelular es que los transportadores inhibidos estén lejos del sitio donde se encuentran los receptores glutamatérgicos y el glutamato tal vez no alcance concentraciones tan altas en el espacio sináptico.

En los ratones G93A el PDC tampoco provocó la muerte de las neuronas en el hipocampo ni en la CM. El resultado más interesante puede ser el de esta última estructura, ya que según la selectividad de la muerte neuronal en la ALS, esta región debería ser aún más vulnerable.

Más aún, el PDC no logró inducir la expresión de la HSP70, que se induce en las células que fueron sometidas a un estrés fuerte y potencialmente letal, pero que lograron sobrevivir al menos al tiempo en el que el animal fue sacrificado (Ohtsuka et al 2000, Sloviter et al. 1992). La falta de detección inmunohistoquímica de la HSP70 puede indicar que estas neuronas no estuvieron sujetas a tales condiciones de estrés, ni siquiera en los ratones G93A.

A diferencia de datos publicados anteriormente (Alexander et al. 2000, Andreassen et al. 2001), nosotros no encontramos cambios en los niveles basales de aspartato y glutamato extracelulares entre los WT y los G93A, ni tampoco que el incremento del glutamato extracelular debido a la perfusión del PDC fuera más elevado en los G93A que en los WT, como reportan Andreassen y colaboradores (2000). Esto podría ser

debido a que se utilizaron diferentes parámetros en los modelos experimentales: en el trabajo mencionado, la cantidad del inhibidor utilizado es casi 40 veces menor y la microdiálisis se realizó en animales en libre movimiento, con una cánula con una membrana de 2 mm de largo colocada en la corteza prefrontal.

Liberación de glutamato

Para observar el efecto del exceso de glutamato directamente sobre sus receptores, utilizamos la 4-AP que induce su liberación mediante el bloqueo de canales de potasio. Con nuestras condiciones experimentales no fue posible detectar ningún incremento en la concentración del glutamato extracelular como resultado de la perfusión de 4-AP ni en el hipocampo ni en la CM, aunque la generación de crisis epileptiformes en respuesta a ésta sugieren que si hubo una liberación de glutamato excesiva desde las terminales sinápticas, lo cual fue confirmado al abatir la presentación de dichas crisis con la administración previa del antagonista de receptores tipo NMDA MK-801, de manera similar a lo anteriormente reportado en el hipocampo de la rata (Tapia et al. 1999, Peña y Tapia 1999 y 2000). La disminución en la concentración de glutamina es otro indicador de los efectos que tiene la 4-AP sobre los aminoácidos extracelulares y es coincidente con datos que reportan que en el tejido de hipocampo epiléptico humano la concentración de glutamina es menor (Petroff et al. 2002).

En los ratones WT la neurodegeneración del área entera de CA1 en el hipocampo también ocurrió de manera similar a lo anteriormente visto en la rata (Tapia et al. 1999, Peña et al. 1999 y 2000). Sin embargo y contra lo esperado, este no fue el caso en los ratones G93A, a pesar de que sufrieron convulsiones más intensas y más prolongadas que los WT. Aunque se puede percibir daño en el área CA1 en la mayoría de estos

animales tratados con 4-AP, este no es tan severo como en los controles WT. En una publicación reciente se encontró que existen diferencias en la conducta convulsiva y la patología en el hipocampo entre distintas cepas de ratón tratadas con KA (McKhann et al. 2003): los animales de las cepas que sufren convulsiones más intensas tienen un menor daño en el tejido del hipocampo que los animales que no padecen crisis tan fuertes. La diferencia en cuanto a la susceptibilidad al KA en las cepas probadas se asienta en el fondo genético de las mismas, según los autores de dicho trabajo. Si bien en este trabajo se utilizaron ratones con el mismo fondo genético, pudiera pensarse que la presencia de una enzima mutante haga que existan diferentes interacciones de factores intracelulares en este ambiente con respecto a los que hay en los WT.

La inducción de la síntesis de la HSP70 luego del tratamiento de 4-AP en el hipocampo en ambos grupos fue muy pronunciada y se dio también en regiones distantes del sitio de la perfusión, de manera similar a lo visto en el hipocampo de la rata (Ayala y Tapia, 2003), y puede ser en alguna forma equiparable a datos previos, donde la inyección de KA en el hipocampo induce la expresión de la HSP70 en la corteza y otras estructuras subcorticales como el tálamo y la amígdala (González et al. 1989). La inmunoreactividad de la HSP70 en zonas distantes al sitio de perfusión puede ser debida al efecto de la estimulación transináptica en la corteza a través de las proyecciones de CA1, y a regiones homólogas del hipocampo contralateral a través de las fibras comisurales. Estas regiones son sensibles a la propagación de la excitación generada por la 4-AP y esta señal puede ser suficiente para generar estrés celular, como se discute en el trabajo de Ayala y Tapia (2003). Según Sloviter y colaboradores (1992), después de la estimulación eléctrica de la vía perforante con una dosis subumbral para generar muerte neuronal, la expresión de la chaperona se da en neuronas que están muy cerca de

sufrir un daño severo, que son vulnerables a una excitación excesiva y que de haber recibido un estímulo mayor habrían muerto. Este podría ser el caso en nuestro modelo con la estimulación con 4-AP.

En la CM la 4-AP no causó neurodegeneración en el tejido perfundido, al menos hasta donde se puede apreciar morfológicamente, en ninguno de los dos grupos. La conducta epileptiforme que presentaron los animales es resultado de la liberación de glutamato desde las terminales sinápticas, como lo demuestra la protección por la aplicación de MK-801, aunque tampoco se pudieron detectar cambios en la concentración extracelular de este neurotransmisor medido por microdiálisis. Y finalmente, la expresión de la HSP70, aunque reducida en comparación al tratamiento en el hipocampo, es evidencia del efecto excitador de la 4-AP.

La falta de daño en el tejido de la CM después del tratamiento con 4-AP tiene implicaciones interesantes. Primero, esta estructura es mucho menos vulnerable al daño excitotóxico en comparación con el hipocampo; segundo, la SOD1m y el consecuente daño oxidante tampoco hacen a esta región más susceptible a la muerte excitotóxica, ya que en las condiciones en las que se encontraba el tejido de los ratones G93A al momento del experimento, una estimulación excesiva como la recibida por el efecto de la 4-AP, habría resultado en la neurodegeneración del tejido perfundido.

Si bien este modelo no es crónico como lo es el progreso natural de la enfermedad, la estimulación tan persistente lograda por la 4-AP y el prolongado (> 1 h) periodo en el que el glutamato se encontró elevado más de 8 veces a causa del PDC, se dieron en la etapa sintomática de la enfermedad en la que las neuronas de los G93A pudieran ser más

vulnerables, y estímulos de esta naturaleza podrían desencadenar la muerte celular. Además la dosis y el tiempo usados en la perfusión de 4-AP fueron suficientes para inducir la neurodegeneración en el hipocampo de los ratones WT en este trabajo, así como en trabajos previos en la rata (Ayala y Tapia 2003, Peña y Tapia, 1999 y 2000), por lo que aunque este modelo no es crónico, sabemos que no es necesaria una estimulación mucho más prolongada, al menos en el caso de la 4-AP, para inducir la muerte neuronal.

Los resultados obtenidos en este trabajo con 4-AP y PDC están en concordancia con experimentos similares que se han realizado en la médula espinal de la rata (Corona y Tapia, 2004), donde ninguno de los dos tratamientos logró matar a las motoneuronas inferiores en el asta ventral de la médula espinal, aunque de manera similar hubo un notable incremento en el glutamato extracelular con PDC. Sólo la perfusión de AMPA 6 y 12 mM logró causar la muerte de las motoneuronas y lograr la parálisis de la pata ipsilateral en la rata, de manera muy semejante a lo visto en los ratones G93A, este efecto pudo ser prevenido con la coadministración del antagonista de receptores AMPA NBQX.

Finalmente, con nuestros resultados podemos concluir que el hecho de que el glutamato esté incrementado en algunos pacientes no es causa suficiente para inducir la neurodegeneración de las motoneuronas en la ALS, aunque no se puede descartar que éste sea un factor aditivo al proceso neurodegenerativo. Esto podría explicar en parte por qué el riluzol, que es hasta ahora el único tratamiento utilizado para la ALS, que actúa mediante la inhibición de la liberación de glutamato desde las terminales nerviosas, probablemente mediante la estabilización del estado inactivo de los canales de Na^+ dependientes de voltaje y como una antagonista no competitivo de los receptores NMDA, tiene un efecto

tan limitado en el tratamiento de la enfermedad (Gurney et al 1996, Dib et al. 2003).

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo no apoyan la hipótesis excitotóxica de la neurodegeneración en la ALS, ya que al menos en este modelo, un incremento considerable en la concentración de glutamato extracelular y la potenciación de su liberación desde las terminales sinápticas en el cerebro, no tuvieron los efectos degenerativos que se esperarían, en los ratones transgénicos modelo de esta enfermedad, en la etapa sintomática cuando las células debieran ser más susceptibles a un daño excitotóxico. Nuestros resultados indican que, al menos con los parámetros utilizados en este trabajo, no hay una relación clara entre el daño oxidante al que los transportadores de glutamato puedan estar sujetos debido a la SOD1m, con el supuesto incremento de la concentración de glutamato extracelular y la muerte excitotóxica de las motoneuronas en la ALS.

REFERENCIAS

- Alexander GM, Deitch JS, Seeburger JL, Del Valle L, Heiman-Patterson TD. Elevated cortical extracellular fluid glutamate in transgenic mice expressing human mutant (G93A) Cu/Zn superoxide dismutase. *J. Neurochem.* 74:1666-1673 (2000).
- Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Ferrante KL, Bogdanov MB, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. Increases in cortical glutamate concentrations in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice are attenuated by creatine supplementation. *J. Neurochem.* 77:383-390 (2001).
- Andrus PK, Fleck TJ, Gurney ME, Hall ED. Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 71:2041-2048 (1998).
- Ayala GX, Tapia R. Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus in vivo. *Neuropharmacol.* 45:649-660 (2003).
- Beal MF. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 23:298-304 (2000).
- Beckman JS, Estévez AG, Crow JP, Barbieto L. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *TINS* 24:S15-S20 (2001).
- Bendotti C, Tortarolo M, Suchak S.K, Calvaresi N, Carvelli L, Bastone A, Rizzi M, Rattray M, Mennini T. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J. Neurochem.* 79:737-746 (2001).
- Bittigau P, Ikonomidou C. Glutamate in neurological diseases. *J. Child. Neurol.* 12:471-485 (1997).
- Bogdanov MB, Ramos LE, Xu Z, Beal MF. Elevated "hydroxyl radical" generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 71:1321-1324 (1998).
- Bowling AC, Schulz JB, Brown RH, Beal MF. Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy

metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 61:2322-2325 (1993).

Brown RH. Superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis: models for gain of function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5:841-846 (1995).

Calabrese V, Bates TE, Giuffrida Stella AM. NO synthase and NO-dependent signal pathway in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem. Res.* 25:1315-1341 (2000).

Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antero-latéraux de la moelle épinière. *Arch. Physiol. Neurol. Pathol.* 2:744-754 (1869).

Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634 (1988).

Cleveland DW. From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron* 24:515-520 (1999).

Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature Rev. Neurosci.* 2:806-819 (2001).

Corona C, Tapia R. AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in spinal cord *in vivo*. En prensa (2004).

Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair and replacement systems. *IUBMB Life* 50:279-289 (2000).

Deitch JS, Alexander GM, Del Valle L, Heiman-Patterson TD. GLT-1 glutamate transporter levels are unchanged in mice expressing G93A human mutant SOD1. *J. Neurol. Sci.* 193:117-126 (2002).

Deng H-X, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung W-Y, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Ross RP, Warner C, Deng G, Soriano E, Smyth C, Parge HE, Ahmed A, Roses AD, Hallewell RA, Pericak-Vance MA, Siddique T. Amyotrophic lateral sclerosis

- and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261:1047-1051 (1993).
- Dib M. Amyotrophic lateral sclerosis progress and prospects for treatment. *Drugs* 63:289-310 (2003).
- Dunlop J, McIlvain HB, She Y, Howland DS. Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 23:1688-1696 (2003).
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH, Beal MF. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 69:2064-2074 (1997).
- Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press (1997).
- Gadea A, López-Colomé AM. Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *J. Neurosci. Res.* 63:453-460 (2001).
- Gonzalez M F, Shiraishi K, Hisanaga K, Sagar S M, Mandabach M, Sharp F R. Heat shock proteins as markers of neuronal injury. *Mol. Brain Res.* 6:93-100 (1989).
- Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hall ED. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapeptin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 39:147-157 (1996).
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng H-X, ChenW, Zhai P, Sufit RL, Siddique T. Motor neuron degeneration in mice that express an human mutant Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775 (1994).
- Julien J-P. Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104:581-591 (2001).
- Jung C, Rong Y, Doctrow S, Baudry M, Malfroy B, Xu Z. Synthetic superoxide dismutase/catalase mimetics reduce oxidative stress

and prolongs survival in a mouse amyotrophic lateral sclerosis model. *Neurosci. Lett.* 304:157-160 (2001).

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science. 4th edition. McGraw-Hill. 2000.

Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA, Mueller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Med.* 5:347-350 (1999).

Louvel E, Hugon J, Doble A. Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis. *TIPS* 18:196-203 (1997).

Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8:323-334 (2002).

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

Massieu L, Tapia R. Glutamate uptake and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J. Neurochem.* 69:1151-1160 (1997).

McKhann II GM, Wenzel HJ, Robbins CA, Sosunov AA, Schwartzkroin PA. Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. *Neuroscience* 122:551-561 (2003).

Meldrum BS. Glutamate as neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130:1007S-1015S (2000).

Morales-Villagrán A, Tapia R. Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem. Int.* 28:35-40 (1996).

Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH, Itoyama Y. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci.* 21:9246-9254 (2001).

- Nishida CR, Butler Gralla E, Selverstone Valentine J. Characterization of three yeast copper-zinc superoxide dismutase mutants analogous to those coded for in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:9906-9910 (1994).
- Ohtsuka K, Suzuki T. Roles of molecular chaperones in the nervous system. *Brain Res. Bull.* 53:141-146 (2000).
- Olney JW, Ishimaru MJ. Excitotoxic cell death. de "Cell death and diseases of the nervous system" (10:197-219) editado por Koliatsos y Ratan: Humana Press (1999).
- Peña F, Tapia R. Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J. Neurochem.* 72:2006-2014 (1999).
- Peña F, Tapia R. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate and GABA mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* 101:547-561 (2000).
- Petroff OAC, Errante LD, Rothman DL, Kim JH, Spencer DD. Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. *Epilepsia* 43: 703-710 (2002).
- Planas AM, Soriano MA, Estrada A, Sanz O, Martin F, Ferrer I. The heat shock stress response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition. *Prog. Neurobiol.* 51:607-636 (1997).
- Rao SD, Yin HZ, Weiss JH. Disruption of glial transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. *J. Neurosci.* 23:2627-2633 (2003).
- Reaume AG, Elliot JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Scott RW, Snider WD. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Gen.* 13:43-47 (1996).

- Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:689-693 (1995).
- Robertson J, Kriz J, Nguyen MD, Jullien J-P. Pathways to motor neuron degeneration in transgenic mouse models. *Biochimie* 84:1151-1160 (2002).
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X, Rhmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung W-Y, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62 (1993).
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncu RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686 (1996).
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncu RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38:73-84 (1995).
- Salazar P, Montiel T, Brailowsky S, Tapia R. Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of γ -aminobutyric acid. *Neurochem. Int.* 24:363-368 (1994).
- Sarantis M, Ballerini L, Miller B, Silver RA, Edwards M, Attwell D. Glutamate uptake from the synaptic cleft does not shape the decay of the non-NMDA component of the synaptic current. *Neuron* 11:541-549 (1993).
- Sasaki S, Warita H, Abe K, Komori T, Iwata M. EAAT1 and EAAT2 immunoreactivity in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Neuroreport* 12:1359-1362 (2001).

- Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16:6125-6133 (1996).
- Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4:209-216 (1995).
- Sloviter RS, Lowenstein DH. Heat shock protein expression in vulnerable cells of the rat hippocampus as an indicator of excitation-induced neuronal stress. *J. Neurosci.* 12:3004-3009 (1992).
- Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le Forestier N, Marouan A, Dib M, Meininger V. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J. Neurol. Sci.* 193:73-78 (2002).
- Stout A K, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds I. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nature Neurosci.* 1:366-373 (1998).
- Tapia R, Medina-Ceja L, Peña F. On the relationship between extracellular glutamate hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem. Int.* 34:23-31 (1999).
- Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative damage and excitotoxic neurodegeneration?. *TIPS* 19:328-334 (1998).
- Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Hediger MA. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nature Neurosci.* 2:427-433 (1999).
- Trotti D, Rossi D, Gjesgal O, Levy LM, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J. Biol. Chem.* 271:5976-5979 (1996).
- Urushitani M, Nakamizo T, Inoue R, Sawada H, Kihara T, Honda K, Akaike A, Shimohama S. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca^{2+} overload in acute excitotoxic motor

neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca^{2+} influx. *J. Neurosci. Res.* 63:377-387 (2001).

Velasco I, Tapia R, Massieu L. Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J. Neurosci. Res.* 44:551-561 (1996).

Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S, Racagni G. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 14:2924-2932 (1994).

Yim MB, Kang J-H, Yim H-S, Kwak H-S, Chock PB, Stadtman ER. A gain of function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: an enhancement of free radical formation due to a decrease in K_m for hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:5709-5714 (1996).

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad. Biol. Med.* 33:337-349 (2002).

“Por mi raza hablará el espíritu”

Ciudad Universitaria, México D.F. 2004