

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**MECANISMOS CELULARES IMPLICADOS EN LA MUERTE ASOCIADA A  
LA ISQUEMIA EN CULTIVOS DE NEURONAS GRANULARES DE  
CEREBELO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE :**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :**

**M. en C. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO**

**MÉXICO, D.F.**

**ABRIL, 2005**

m343317





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MEXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

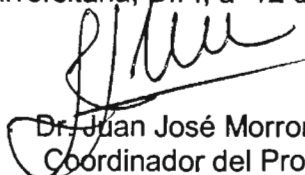
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de febrero del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno **GARCÍA GONZÁLEZ OCTAVIO CÉSAR** con número de cuenta **88170462** y número de expediente **3991044**, con la tesis titulada: **"Mecanismos celulares implicados en la muerte asociada a la isquemia en cultivos de neuronas granulares de cerebelo"**, bajo la dirección del **Dra. Lourdes Massieu Trigo**.

Presidente:	Dra. Annie Pardo Semo
Vocal:	Dr. José Pedraza Chaverri
Vocal:	Dra. Gabriela Morali de la Brena
Vocal:	Dr. Federico Martínez Montes
Secretario:	Dra. Lourdes Massieu Trigo
Suplente:	Dra. Clorinda Arias Álvarez
Suplente:	Dr. Diego González Halphen

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de abril del 2005.

  
Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Lourdes Massieu Trigo y con el apoyo de donativos otorgados por PAPIIT (IN-203400, IN-222503) y CONACYT 40306-M, así como una beca concedida por el CONACYT (163330) y la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP-UNAM) para realizar estudios de doctorado.

Durante el desarrollo de esta tesis se realizó una estancia de investigación en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca, España, bajo la supervisión del Dr. Juan P. Bolaños, gracias al apoyo de una beca otorgada por la Subdirección de Intercambio Académico (DGEP-UNAM).

Esta tesis fue asesorada por un Comité Tutorial conformado por:

Dra. Lourdes Massieu Trigo

Dr. Federico Martínez Montes

Dr. Julio Morán Andrade

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

NOMBRE: Octavio César  
García González

FECHA: 19 / Abril / 2005

FIRMA: 

## AGRADECIMIENTOS

La finalización de este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración y apoyo de un gran número de personas e instituciones que me permitieron llegar a buen puerto, por lo que esta tesis no es producto de una sola persona, sino de todas las personas que de una u otra forma me ayudaron. En este sentido quiero agradecer (y de alguna manera despedirme), de todos aquellos que navegaron conmigo en estos últimos cuatro años. A la señora Cecilia Escalona que siempre tenía todo el equipo y material listo para empezar a trabajar y buen café por la mañana gracias Ceci. A Tere Montiel, por su apoyo técnico y a sus mágicas manos de donde sacaba todas las cosas necesarias para resolver los problemas de laboratorio y los que no eran del laboratorio también. Por supuesto, a mis compañeros por estar conmigo en el mismo barco llamado AL-302, a Perla que en todo momento me brindo su ayuda para resolver todo tipo de problemas y por los cafés de la tarde, a Jana por las pláticas “del mas acá”, a Mari por compartir la música de J. Sabina y Aute, al camarada Alberto por las “chelas” vespertinas, a Karla por el amor a los pumas, a Ana por inyectar buena vibra al laboratorio y a Cuahutémoc por su excelente sentido del humor.

Un agradecimiento especial corresponde a la Dra. Lourdes Massieu, por su apoyo incondicional y sobre todo por la confianza depositada en mí en estos años trabajo, sin ellos, no me hubiera a prendido a navegar ni tener la seguridad para aventurarme a conocer a otros puertos, mil gracias Lourdes.

También quiero agradecer a mí a Comité Tutorial al Dr. Julio Morán por brindarme su tiempo y orientación y al Dr. Federico Martínez por su interés constante y crítica enriquecedora en esta tesis. Al Dr. Juan P. Bolaños por permitirme trabajar en su laboratorio, pero sobre todo, por transmitirme su visión para saber por donde van las cosas y su forma de trabajo y a la Dra. Ángeles Almeida por las sugerencias fundamentales para el trabajo 3 de esta tesis.

A los miembros de mi jurado Dr. José Pedraza, Dr. Diego González, Dra. Clorinda Arias, Dra. Gabriela Morali y Dra. Annie Pardo por ayudarme a concluir este trabajo lo más pronto posible.

Por su puesto al apoyo de mi familia a mi madre, mi padre, mis hermanos y cuñado por que siempre sabía que podría llegar a un puerto seguro cuando algo faltaba. A Silvana por anclar conmigo en un puerto llamado vida. A mis pequeñas sobrinas Sofía y Valeria por responderme con su visión infantil las preguntas más difíciles de la vida.

No podía faltar el agradecimiento a todos los amigos, camaradas y compañeros a quienes pude conocer y convivir en estos años, en México al Dr. Peña, Dr. Benito, Profesor Galicia, Dra. Bertha, los camaradas Dr. Casasola y Dr. Calixto, Dr. Ramiro alias el “Che”, Dra. Ale Figueroa, Ale y Pepe Blancas, Alette, Dr. Silver; a los vecinos Juan Carlos, Miguel, Xóchilt, las Gabis, allá abajo a Beto, Neto, Fatuel, Tamara, en el planeta de los simios Lemus, Rogelio, Victor y los que nos han ganado la carrera de la vida a Miguel “Micke” Hernández† y Carmen Vilchis†. En España a Romina, Pancho, Martha Nelly, Ivania, Nino, Ivón, Randy, Dra. Lili, Sandra, Karina, Tania por la “marcha” y los viajes que compartimos. En el laboratorio a la Dra Pili, Nacho, Seila, Mame (gracias por lo del citómetro), Paqui, José, Dra. Rosita, Vega, Silvia, Dra. María Delgado, Mónica y la Dra. Paula, por las escapadas a Farmacia y los cafés de la maquinita para quitarnos el estrés. En Argentina, a la escuela de la IBRO por habernos reunido y haber forjado esa amistad que logramos al calor de las discusiones científicas, políticas, sociales y descubrir el gran amor que sentimos por Latinoamérica; a los mates uruguayos de Andrea, Ana y Flor, a los camaradas chilenos Danny y Carolina, al pizco peruano de Mario, al Juliana, “Felipau”, Ana Cristina y la Dra. Glaucia que no perdieron la esperanza de que aprendiéramos a bailar samba, a los asados, el tinto y la milonga argentina a Vilú, Silvana, Lucas, Flavia, Mariano, Lore, Nico, Agustín, Romina, Cris, Dr. Li, Mariana, Itatí, Vanesa, Caro R, Mauricio, Gastón, Pablo y Verónica, a la expedición “Casa del Che Guevara” Martín, Eugenia, Helen (¡Viva Colombia!) y Rosa por descubrir conmigo las maravillas de Altigracia y a los de la casa, Belén y Jorge.

Finalmente quiero agradecer a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca por brindarme el ambiente académico y humano así como la infraestructura física y material para concluir esta tesis.

*A todos aquellos que no han perdido la esperanza  
de que este mundo puede ser mejor y más humano*

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	potencial de membrana mitocondrial
7-ADD	7-aminoactinomicina-D
ATP	trifosfato de adenosina
C-AM	calceína acetometil-ester
$[Ca^{2+}]_i$	concentración de calcio intracelular
CAT	catalasa
CTE	cadena de transporte de electrones
DIV	días <i>in vitro</i>
ERO	especies reactivas de oxígeno
GSH, GSSG	glutación y su forma oxidada
HE	homodímero de etidio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
JC-1	5,5',6,6',-tetracloro-1,1',3,3',tetraetilbenzemida- azolilcarbociamina yodo
MK-801	(+)-5metil-10,11-dihidro5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina maleato
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
3-NP	ácido 3-nitropropiónico
NAD <sup>+</sup> , NADH	nicotinamida adenina dinucleótido y su forma reducida
NAME	L-N <sup>ω</sup> -nitroargininmetil ester
NGC	neuronas granulares de cerebelo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetasa
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superóxido
OH <sup>-</sup>	radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	peroxinitrito
PBN	fenil- <i>tert</i> -butilnitrona
PDC	L- <i>trans</i> -pirrolidin-2,4-dicarboxilato
SDH	succinato deshidrogenasa
SOD	superóxido dismutasa



# ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1. Modelos de isquemia cerebral.....	8
1.1. Modelos <i>in vivo</i> .....	8
1.2. Modelos <i>in vitro</i> .....	9
2. Muerte celular por isquemia cerebral.....	10
2.1. Excitotoxicidad.....	12
2.2. Estrés oxidativo.....	14
2.3. Alteraciones metabólicas.....	16
3. Mecanismos de protección contra el daño isquémico.....	18
3.1. Trabajo 1, <i>Archivos de Neurociencias, 2004</i> .....	19
II. ANTECEDENTES.....	28
III. OBJETIVOS.....	31
IV. METODOLOGIA.....	32
V. RESULTADOS.....	43
5.1. Trabajo 2, <i>Journal of Neuroscience Research, 2003</i> .....	44
5.2. Trabajo 3, <i>Journal of Neurochemistry, 2005</i> .....	55
VI. DISCUSIÓN.....	64
VII. CONCLUSIONES.....	73
VIII. ANEXO I.....	76
IX. REFERENCIAS.....	88

## RESUMEN

Un incremento en la concentración extracelular de glutamato y una alteración en el metabolismo energético son dos eventos que ocurren durante la isquemia cerebral. Aunque no se conoce en su totalidad el mecanismo por el cual los niveles extracelulares de glutamato aumentan durante un proceso isquémico, se propone que una alteración en los sistemas encargados de remover este aminoácido del espacio sináptico puede generar este incremento. El glutamato a altas concentraciones induce la muerte de las neuronas a través de un mecanismo denominado excitotóxico, el cual podría estar asociado a la pérdida neuronal subsecuente a la isquemia cerebral. Usando cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC), se observó que la inhibición de los transportadores de glutamato con *L-trans*-pirrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC), incrementa la concentración extracelular de glutamato pero no produce muerte en las neuronas. Sin embargo, el PDC produce muerte neuronal cuando el metabolismo energético celular se encuentra alterado por la presencia del ácido 3-nitropropiónico (3-NP), un inhibidor de la succinato deshidrogenasa (SDH), enzima involucrada en el ciclo de Krebs y que forma parte del complejo II la cadena de transporte de electrones (CTE). En este trabajo se demostró que el PDC y el 3-NP activan dos mecanismos diferentes que en su conjunto pueden conducir a la muerte celular. Por una parte el PDC produce una rápida y sostenida despolarización parcial del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), que es dependiente de la activación del receptor glutamatérgico tipo NMDA. El colapso del  $\Delta\Psi_m$  es prevenido a través de la estimulación del consumo de oxígeno. Este mecanismo conlleva a un inevitable estrés oxidativo (incremento de especies reactivas de oxígeno y disminución de los niveles de GSH), que sin embargo, no está asociado con la muerte neuronal. Por otro lado, el 3-NP produce una despolarización progresiva del  $\Delta\Psi_m$  después de 2 horas de incubación,

asociada con una disminución en los niveles de NADH. Sin embargo, esta alteración del metabolismo energético no produce muerte celular. Solamente la coexposición de PDC y 3-NP produce muerte neuronal con fenotipo necrótico y apoptótico, la cual coincide con una pérdida de los niveles de ATP y de la actividad redox de la mitocondria. Estos resultados sugieren que la acumulación endógena de glutamato extracelular después de la inhibición de sus transportadores, induce una pérdida parcial del  $\Delta\Psi_m$  que es compensada por la estimulación de la respiración mitocondrial, que a su vez conduce a un estrés oxidativo dependiente de la activación del receptor NMDA. Este mecanismo previene la muerte neuronal mientras no exista una deficiencia mitocondrial asociada. Si esta ocurre, se induce el colapso del  $\Delta\Psi_m$ , un déficit energético y disfunción mitocondrial permanente que conlleva a la muerte neuronal. Adicionalmente, se observó que la presencia de sustratos energéticos como el piruvato y el acetoacetato pueden mantener la actividad mitocondrial, los niveles de ATP y prevenir la muerte. Los resultados presentados son relevantes para entender los mecanismos de muerte neuronal asociados con la isquemia cerebral, y para el diseño de estrategias para su prevención.

## ABSTRACT

An increased concentration of extracellular glutamate and failure of energy metabolism are two events associated with brain ischemia. Although the mechanism that induces the increase in glutamate extracellular levels during ischemia is not completely understood, alterations in transporter molecules removing this amino acid from the synaptic space might be involved. High glutamate concentrations induce neuronal death through a mechanism known as excitotoxicity. This type of the cell death is associated with the loss of neurons subsequent to cerebral ischemia. Using cultured cerebellar granule neurons, we demonstrated that glutamate uptake inhibition by *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC), increases the extracellular concentration of glutamate but does not induce neuronal death. However, glutamate becomes toxic when the energy metabolism of granule neurons is altered by the presence of 3-nitropropionic acid (3-NP), an inhibitor of succinate dehydrogenase (SDH), an enzymatic component of the Krebs cycle and complex II of the electron transport chain. The present work shows that PDC and 3-NP activate two different mechanisms that can lead to the cell death. When PDC is incubated a rapid and partial depolarization of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) occurs, which is mediated by activation of the NMDA glutamate receptor subtype. A total collapse of  $\Delta\Psi_m$  is prevented by oxygen consumption. This mechanism is accompanied by the generation of oxidative stress (production of reactive oxygen species and decrease of GSH levels), but does not induce death neuronal. On other hand, 3-NP produces a progressive depolarization of  $\Delta\Psi_m$  after 2 hours of incubation, that is associated with the loss of NADH levels. However, inhibition of energy metabolism by 3-NP does not lead to neuronal death. Only coexposure of PDC+3-NP produces neuronal death with both necrotic and apoptotic phenotypes, which is associated with a loss of ATP levels and mitochondrial redox activity. These results

suggest that accumulation of endogenous extracellular glutamate after inhibition of its transporters, induces a partial  $\Delta\Psi_m$  loss that is compensated by the stimulation of mitochondrial respiration, which leads to oxidative stress dependent on NMDA receptor activation. This mechanism prevents neuronal death unless failure of mitochondrial activity hampers such neuroprotective strategy. Additionally, we showed that the presence of energy substrates such as the pyruvate and acetoacetate prevents neuronal death. Results are relevant to the understanding of the mechanisms involved in neuronal death associated with brain ischemia, and the design of new therapies with clinical potentiality.

## ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La presente tesis ha sido estructurada en cinco partes que incluyen: introducción, antecedentes directos del proyecto, objetivos de la tesis, metodología, resultados, discusión y conclusión general.

En la introducción se abordan de manera general las características de la isquemia cerebral así como los diversos modelos que se han utilizado para tratar de entender los eventos involucrados en este desorden cerebro-vascular. También se describen algunos de los mecanismos involucrados en la pérdida neuronal que se observa después de un periodo isquémico, y las posibles alternativas de neuroprotección. En este apartado se incluye el artículo de revisión titulado "*Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal*" (*Arch. Neurosci.* 2004, 9: 39-46), donde se integran los conceptos y la información actualizada de los mecanismos celulares implicados en la pérdida neuronal durante un periodo isquémico. En los antecedentes se describen las características del modelo de estudio y su relación con la isquemia cerebral. La caracterización del modelo fue publicada con el título "*Strategies for neuroprotection against L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro*" (*J. Neurosci. Res.* 2001, 64: 418-428) y se incluye en la tesis en forma de un anexo ya que este trabajo se realizó antes de ingresar al doctorado. Seguido de este punto se mencionan los objetivos generales y particulares de la tesis. Posteriormente se presenta la sección de metodología donde se describen los fundamentos de las técnicas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis.

En la parte de resultados se incluyen dos trabajos, el primero de ellos titulado: "*Glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine 2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentration of mitochondrial toxin 3-nitropropionate: involvement of*

*mitochondrial reducing activity and ATP production” (J. Neurosci. Res. 2003, 74: 956-966) y el segundo titulado “Increased mitochondrial respiration maintains the mitochondrial membrana potencial and promotes survival of cerebellar neurons in an endogenous modelo of glutamate receptor activation” (J. Neurochem. 2005, 92: 183-190).* Finalmente se realiza una discusión a partir de estos resultados seguido por una conclusión general.

## I. INTRODUCCIÓN

La isquemia cerebral es un síndrome cerebro-vascular considerado como una de las primeras causas de muerte e incapacitación de adultos jóvenes y ancianos en todo el mundo. La isquemia cerebral ocurre cuando existe una disminución de la circulación sanguínea cerebral producida por trauma, hemorragia, paro cardíaco u oclusión arterial; provocando degeneración y muerte celular en la zona que ha dejado de ser irrigada. Algunos factores como la edad, el sexo, la historia familiar ó el grupo étnico predisponen a las personas a sufrir un daño cerebro-vascular. Sin embargo, factores adicionales como la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, la obesidad, la inactividad física, el abuso en el consumo de anticonceptivos, cigarrros y alcohol entre otros, incrementan la susceptibilidad de las personas a sufrir un accidente cerebro-vascular (Sacco, 1998). Los individuos que sobreviven a la isquemia cerebral sufren desórdenes neurológicos y físicos muchas veces irreversibles, por lo que los accidentes vasculares cerebrales son considerados como un problema de salud pública con altos costos económicos en países desarrollados (Sacco, 1998). En México, de acuerdo a los datos de la Secretaría de Salud (SSA) y del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), durante el año 2003 ocurrieron 26,849 defunciones asociadas a enfermedades cerebro-vasculares, cifra que la ubicó como la tercera causa de muerte en el país solo por debajo de la diabetes mellitus y las enfermedades cardiovasculares y por arriba de la cirrosis, que representan la primera, segunda y cuarta causa de muerte en el país respectivamente. En ese mismo año se registraron más de treinta mil nuevos casos en las instituciones del sistema nacional de salud. Sin embargo, es probable que el número de casos sea mayor debido a los altos índices de diabetes, enfermedades cardiovasculares, alcoholismo y obesidad que se presentan en México y que pueden predisponer a las



personas a sufrir una isquemia cerebral, por lo que este desorden cerebro-vascular se empieza a convertir en un problema potencial de salud lo que implicaría que gran parte del presupuesto de los sistemas de salud y de los familiares de la víctima, sean utilizados para atender y rehabilitar a las personas que sufrieron y sobrevivieron a una isquemia cerebral. Por estas razones es necesario conocer los posibles mecanismos que generan la muerte celular y proponer algunas alternativas terapéuticas que permitan contrarrestar el daño isquémico y sus secuelas.

## **1. MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL**

A pesar de que no se ha podido desarrollar un modelo que mimetice todas las condiciones clínicas de la isquemia cerebral, existen varios modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* de fácil acceso que nos permiten investigar algunas de las características y eventos que suceden durante y después de un periodo isquémico, así como los posibles tratamientos que se podrían aplicar para prevenir o disminuir las secuelas que se generan en este síndrome cerebro-vascular.

### ***1.1. Modelos in vivo***

El desarrollo de modelos de isquemia cerebral en animales ha permitido relacionar algunos aspectos como la duración del periodo isquémico y la severidad del daño neuronal; cambios a nivel metabólico y fisiológico en el animal durante y después de un periodo isquémico, y además han permitido probar diversos agentes con uso clínico potencial. Los modelos animales se han dividido en modelos de isquemia global y modelos de isquemia focal. El primero se caracteriza por disminuir el flujo sanguíneo a través de la oclusión de las arterias vertebrales y carótidas en los animales; mientras que el segundo consiste en la oclusión de

la arteria cerebral media. Estos modelos han sido ampliamente caracterizados en ratón, rata, gerbo y gato principalmente (Karpiak et al., 1989). Sin embargo, existen otros modelos de disminución del flujo sanguíneo que implican la inyección de microesferas o sustancias fotoquímicas, que son utilizados como modelos de trombosis (Karpiak et al., 1989; Dietrich, 1998). A pesar de que estos modelos nos permiten entender algunos de los mecanismos fisiológicos y deducir los posibles eventos celulares que se desarrollan durante la isquemia cerebral, no es posible conocer los mecanismos finos involucrados en la muerte, por lo que es necesario el uso de modelos *in vitro* para estudiar dichos eventos de forma más controlada y con mayor detalle.

## **1.2. Modelos *in vitro***

Las células neuronales y gliales que crecen y se mantienen *in vitro* nos permiten estudiar algunas propiedades *in situ* bajo condiciones relativamente simples y controladas. La información bioquímica y fisiológica que a nivel celular provee un cultivo neuronal se aproxima a lo que sucede en un cerebro intacto, por lo que hace a los cultivos celulares un modelo invaluable de estudio fisiológico y patológico de las células del sistema nervioso. Además, los cultivos celulares proveen las siguientes ventajas sobre los modelos animales: 1) control del ambiente físico y químico tales como concentración de sustratos, iones, nutrimentos, cofactores y composición de gases y temperatura, 2) acceso directo de las células a precursores marcados, inhibidores metabólicos y trazas sin la presencia de la barrera hematoencefálica o una difusión no uniforme, 3) observación visual continua y directa de las células vivas bajo un microscopio permitiendo el estudio morfológico y dinámica celular, 4) accesibilidad de células individuales a la exploración con microelectrodos y otros instrumentos de precisión, 5) recuperación del medio condicionado

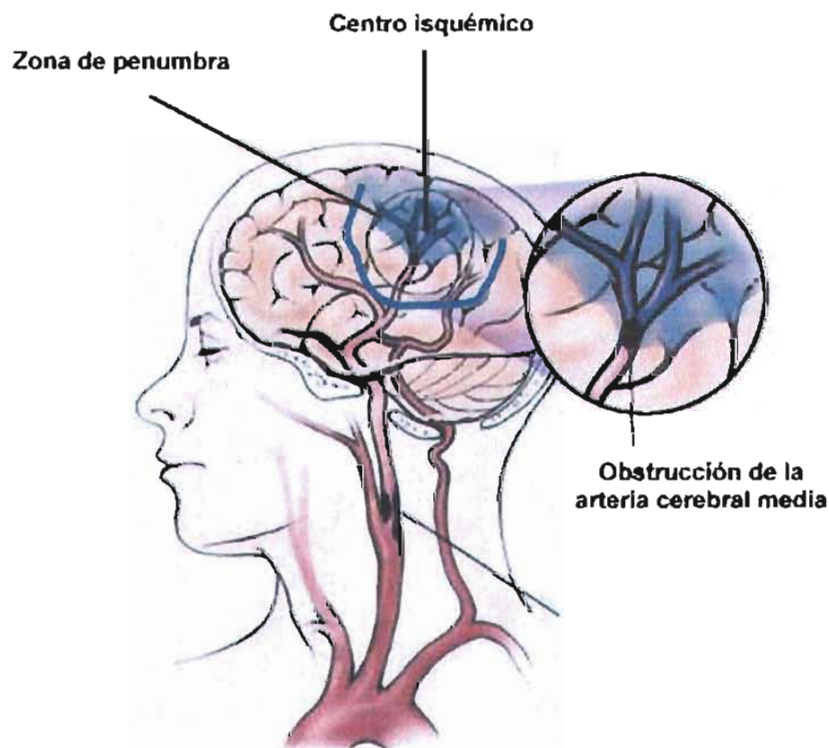
para el análisis bioquímico y bioensayos y 6) una preparación rápida y excelente para microscopía electrónica y otras técnicas morfológicas y para histoquímica, inmunohistoquímica y análisis bioquímico.

Todas estas características de los cultivos celulares hacen de los modelos *in vitro*, uno de los sistemas más eficientes y versátiles para el estudio de la fisiología y la patología de las células nerviosas. Además es posible reproducir algunos aspectos involucrados en la isquemia cerebral y en síndromes neurodegenerativos (Kim, 1994). Por ejemplo, la omisión de glucosa y oxígeno en cultivos celulares es utilizada como un modelo clásico isquemia *in vitro* (Goldberg et al., 1986; Goldberg y Choi, 1993). La exposición de azida de sodio es utilizada como un modelo de anoxia química (Varming et al., 1996; Jorgensen et al., 1999), al igual que el inhibidor de la glucólisis, el yodoacetato (Mackert et al., 1996). Sin embargo, este último también ha sido propuesto como un modelo de isquemia/hipoxia química (Uto et al., 1995). Por otro lado, diversas toxinas mitocondriales han sido utilizadas para mimetizar condiciones asociadas a enfermedades neurodegenerativas, como es el caso del 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>), en la enfermedad de Parkinson (Kotake y Onta, 2003; Coilier et al., 2003), el ácido 3-nitropropiónico en la enfermedad de Huntington (Fink et al., 1996; Pang y Geddes, 1997), y el malonato en la esclerosis aminotrófica lateral (Kaal et al., 2000).

## **2. MUERTE CELULAR POR ISQUEMIA CEREBRAL**

El cerebro requiere de un aporte continuo de glucosa y oxígeno para mantener su metabolismo energético en óptimas condiciones y con ello realizar de manera normal sus funciones (Erecinska y Silver, 1989). Sin embargo, como mencionamos anteriormente,

durante la isquemia cerebral existe una disminución de la circulación sanguínea cerebral y en consecuencia un agotamiento de las reservas de glucosa y oxígeno aportados por la sangre, lo que provoca un daño celular irreversible en la zona que ha dejado de ser irrigada. A la zona en donde las células mueren irremediablemente se le denomina centro isquémico. Sin embargo, existe una región que circunda al centro isquémico llamada zona de penumbra, donde hay irrigación colateral y es por tanto rescatable (Fig. 1). Se ha propuesto que las células que se localizan en la zona de penumbra pueden morir a través de diversos mecanismo como la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y alteraciones metabólicas, sin embargo, aún se desconoce la importancia y relación precisa entre cada uno de estos mecanismos (Hakim, 1998).



**Figura 1.** Áreas generadas después de un período isquémico. La obstrucción de la arteria carótida o de la arteria cerebral media impide el flujo sanguíneo y en consecuencia el aporte de glucosa y oxígeno al cerebro. La zona inmediata al sitio de obstrucción recibe el nombre de centro isquémico y las células en esta área mueren irremediablemente (mostradas en un círculo). La zona que circunda al centro isquémico recibe el nombre de zona de penumbra (marcada en azul) y al tener una irrigación colateral pueden ser rescatadas. Se propone que estas neuronas pueden morir por diversos mecanismos como son el daño excitotóxico, el estrés oxidativo o una alteración metabólica.

## **2.1. Excitotoxicidad**

El término excitotoxicidad se refiere a la capacidad del ácido glutámico o glutamato (el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central), de producir daño celular por la actividad prolongada de sus receptores (Olney, 1969). Las primeras evidencias que demostraron el potencial neurotóxico del glutamato fueron reportadas por Lucas y Newhouse (1957), quienes observaron que una administración subcutánea de glutamato en ratones inmaduros produce una degeneración rápida de las neuronas de la capa interna de la retina. Esta evidencia fue confirmada posteriormente en ratas, conejos, cobayos, hámsters, pollos y monos *rhesus*, tanto por la administración subcutánea como por la administración oral de glutamato (Olney, 1979). Posteriormente, en una serie de estudios independientes, se demostró que la administración de análogos del ácido glutámico como el ácido kaínico, el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido cisteín-S-sulfónico y el ácido homocisteíco también podían producir degeneración de las células nerviosas y otras manifestaciones como: incremento en la frecuencia de potenciales de acción en la médula de gato, inducción de convulsiones en ratas, gatos y monos; vómitos en perros y el síndrome del restaurante chino en humanos adultos (Olney, 1979).

El daño por excitotoxicidad tiene características citopatológicas bien definidas. Por ejemplo, después de 30 minutos de la inyección sistémica de glutamato en roedores jóvenes, las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo muestran un evidente hinchamiento de las dendritas y los somas celulares, el cual es seguido de la degeneración de los organelos intracelulares y pícnosis nuclear. Después de varias horas las células se necrosan y son fagocitadas. El daño es predominantemente postsináptico, ya que las terminales nerviosas y los axones no se afectan (revisado en Massieu, 1999). Los posibles mecanismos celulares involucrados en la excitotoxicidad han sido estudiados en neuronas cultivadas y

en rebanadas de tejido nervioso. En cultivos neuronales se han descrito dos fases principales de daño celular producido por la exposición a glutamato. Durante la primera, denominada fase aguda, hay un hinchamiento marcado del soma y las dendritas, el cual depende del  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  externos. Esto ocurre después de algunos minutos de exposición al ácido glutámico, es reversible y puede ser producido por agentes despolarizantes tales como la concentración elevada de potasio y la veratridina que promueve la entrada de  $\text{Na}^+$ . Este fenómeno se debe posiblemente a la entrada del  $\text{Na}^+$  seguida del flujo pasivo del  $\text{Cl}^-$  y agua. La mayoría de las células recuperan su volumen original después de algunas horas (Choi, 1987; Hasbani et al., 1998; Sakaguchi et al., 1999). La segunda fase se caracteriza por la desintegración retardada de las neuronas; ocurre algunas horas después de la exposición inicial del glutamato y depende del  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Choi, 1987; Hasbani et al., 1998).

La correlación cuantitativa entre la degeneración producida por glutamato y la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulada intracelularmente ha permitido postular que la participación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula en el proceso excitotóxico se puede producir a través de diversas vías como son: los receptores glutamatérgicos (en particular los receptores tipo NMDA), los canales de calcio dependientes de voltaje y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . El incremento de la concentración de calcio interno ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), es un factor importante para la muerte celular por excitotoxicidad; sin embargo, los pasos subsiguientes al incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no están bien dilucidados. Se piensa que la entrada de estos iones podría: 1) activar proteasas, las cuales contribuirían al daño celular al degradar proteínas estructurales; 2) activar fosfolipasas contribuyendo al rompimiento de la membrana celular; 3) incrementar la producción de radicales libres y por lo tanto producir daño por estrés oxidativo y 4) activar endonucleasas generando alteraciones en el ADN (Choi, 1988).

Las evidencias que sugieren que las células que se localizan en la zona de penumbra mueren a través de un mecanismo excitotóxico durante la isquemia cerebral, se basan en los siguientes datos experimentales: 1) las características citopatológicas subsecuentes a la isquemia son muy similares a las producidas por la exposición directa de las neuronas a altas concentraciones de glutamato (Simon et al., 1984); 2) estudios de microdiálisis *in vivo* indican que hay una gran acumulación de glutamato y aspartato en aquellas regiones que exhibirán daño celular como consecuencia de la isquemia (Benveniste et al., 1984; Graham et al., 1990); 3) los antagonistas de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y no-NMDA protegen contra la neurodegeneración inducida por isquemia (Simon et al., 1984; Sheardown et al., 1990) y 4) la interrupción de las vías glutamatérgicas evita el daño isquémico (Benveniste et al., 1989).

La excitotoxicidad producida por glutamato también ha sido vinculada a la pérdida neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas como la corea de Huntington, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson y a algunos desórdenes neurológicos como la epilepsia y la hipoglucemia (Obrenovitch y Urenjak, 1997).

## **2.2. Estrés oxidativo**

Los radicales libres son definidos como átomos o moléculas que presentan uno o más electrones desapareados en su último orbital molecular, esta inestabilidad los convierte en moléculas altamente reactivas. Los radicales libres más comunes son: el óxido nítrico (NO), el superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo (OH $\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Aunque el  $H_2O_2$  no es un radical por sí mismo, está involucrado en las reacciones que producen radicales libres. Además, el  $O_2^-$  puede interactuar con el NO y generar agentes oxidantes altamente reactivos como el anión peroxinitrito (ONOO $^-$ ) y el OH $\cdot$  (Halliwell, 1992). A los

radicales libres y a las especies reactivas que no son radicales se les conoce como especies reactivas de oxígeno (ERO).

La producción de los radicales libres es parte del metabolismo normal de las células y son generados principalmente en las reacciones de oxidación-reducción que se producen en la cadena de transporte de electrones (CTE) en la mitocondria, así como en diversas vías del metabolismo celular. Estos son eliminados de la célula por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, que permiten mantener al mínimo su concentración (Dröge, 2001). Un exceso en la producción de ERO puede ocasionar un daño a la célula a través de la oxidación de moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Cuando los radicales libres se producen en exceso pueden causar daño a las células a través de un “estrés oxidativo” que es un término utilizado para definir un proceso tóxico que es consecuencia de un desbalance entre la formación de ERO y la capacidad antioxidante de la célula (Dröge, 2001).

El radical  $\text{OH}^\cdot$  es la especie más reactiva, su capacidad de difusión es de pocos angstroms por lo que su reacción se limita al sitio de generación. El radical  $\text{O}_2^\cdot$  es menos reactivo pero puede fugarse de la membrana mitocondrial y actuar a distancia mientras que, el NO y el  $\text{ONOO}^-$  pueden llegar a difundirse a otras células (Halliwell, 1992). Los mecanismos de defensa antioxidante ocurren de manera natural pudiendo contrarrestar la producción excesiva de radicales libres en la célula. La superóxido dismutasa (SOD), cataliza la dismutación de  $\text{O}_2^\cdot$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que a su vez puede ser reducido a  $\text{H}_2\text{O}$  a expensas de glutatión en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  también puede ser reducido por la enzima antioxidante catalasa. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  que no es eliminado por glutatión puede descomponerse a  $\text{OH}^\cdot$ , y el hierro facilita esta reacción. Las vitaminas lipofílicas como el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), pueden bloquear la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica



y las vitaminas hidrofílicas como el ácido ascórbico, que son agentes reductores, pueden donar electrones directamente a los radicales libres (Dröge, 2001).

Las evidencias acumuladas a lo largo de las dos últimas décadas plantean que el estrés oxidativo está involucrado en el daño celular que se observa durante la isquemia cerebral y la reperusión son: 1) la administración de compuestos que evitan la formación de ERO también disminuyen las lesiones producidas en diversos modelos de isquemia cerebral (Chan, 1996); 2) la sobreexpresión de enzimas antioxidantes como la SOD evitan el daño isquémico (Yang et al., 1994; Chan, 1998); y 3) durante el proceso de reperusión isquémica se ha observado un incremento en la activación de la NOS, enzima encargada de la producción del NO y por tanto la formación de este radical además de un incremento en la formación del radical  $O_2^-$  (Love, 1999). Sin embargo, aún se desconoce el papel preciso del estrés oxidativo en la isquemia cerebral.

### ***2.3. Alteraciones metabólicas***

Como mencionamos anteriormente la función y sobrevivencia de las neuronas depende del aporte continuo de glucosa y oxígeno para generar ATP a través de la glucólisis y la fosforilación oxidativa (Erecinska y Silver, 1989; Murphy et al., 1999). La restricción de la generación de ATP, como sucede en la isquemia cerebral, podría causar un daño neuronal irreversible a través de un mecanismo denominado excitotoxicidad secundaria. En la excitotoxicidad secundaria, la deficiencia energética asociada a la isquemia disminuiría la concentración de ATP en las neuronas. Esto provocaría una reducción en la actividad de la ATPasa  $Na^+/K^+$  encargada de mantener el potencial de membrana produciendo su despolarización, y por lo tanto, la liberación del ión  $Mg^{2+}$  que normalmente se encuentra bloqueando el poro iónico del receptor al NMDA (Zeevalk & Nicklas, 1992; Massieu y

García, 1998). La presencia de glutamato, aún a bajas concentraciones, activaría el receptor NMDA y tendría lugar el daño excitotóxico por los mecanismos mencionados anteriormente. Adicionalmente a este mecanismo la disminución de ATP durante la isquemia podría afectar la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  alterando los gradientes iónicos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y esto traer como consecuencia una disminución en la actividad del transportador de glutamato, o un cambio de dirección de su funcionamiento ya que este transportador es dependiente de  $\text{Na}^+$  (Jabaudon et al., 2000; Rossi et al., 2000). Esto podría explicar porqué durante los periodos de isquemia se observa una acumulación extracelular de glutamato, y muerte excitotóxica, generando un círculo vicioso de daño neuronal.

Por otro lado, en los últimos años, diversos estudios han demostrado que una deficiencia en el metabolismo energético puede dar lugar a una degeneración nerviosa parecida a la excitotóxica; algunas de estas evidencias son: 1) la administración de toxinas mitocondriales producen degeneración de las células nerviosas. Este daño presenta características citológicas y neuroquímicas similares a las producidas por la administración de agonistas glutamatérgicos, y a las asociadas a algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, así como a la isquemia cerebral (Storey et al., 1992; Beal et al., 1993; Grenee et al., 1993; Brouillet et al., 1994; Schulz et al., 1994); 2) la neurodegeneración asociada a la inhibición del metabolismo energético puede ser disminuída por antagonistas del receptor NMDA (Beal et al., 1993; Grenee et al., 1993; Brouillet et al., 1994; Weller y Paul, 1993; Fink et al., 1996); y 3) el daño producido por glutamato *in vivo* e *in vitro* es exacerbado en presencia de venenos mitocondriales (Novelli et al., 1988; Greene y Greenamyre, 1995; Greene et al., 1998; Sánchez-Carbente y Massieu, 1999).

Recientemente, diversos laboratorios han reportado un gran número de evidencias que sugieren que la disfunción mitocondrial juega un papel fundamental en la activación de diversos eventos celulares que podrían estar involucrados en la muerte neuronal como son: la alteración del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) (Ankarcrona et al., 1995; White y Reynolds, 1996; Schinder et al., 1996), la pérdida del amortiguamiento del calcio intracelular por la mitocondria (Nicholls et al., 2003), la apertura del poro de permeabilidad de transición en la mitocondria (Crompton, 1999), y liberación del citocromo c (Green y Reed, 1998). Estos eventos pueden conducir a la muerte neuronal subsecuente a la isquemia; sin embargo, la relación entre cada uno de estos eventos es todavía incierta.

### **3. MECANISMOS DE PROTECCIÓN CONTRA EL DAÑO ISQUÉMICO**

El desarrollo de la isquemia cerebral y su subsecuente reperfusión conduce a una muerte neuronal masiva. Esta pérdida celular puede ocasionar diversas alteraciones en el paciente como la pérdida motora e intelectual e incluso la muerte dependiendo de la región afectada y de la severidad de la isquemia. En los últimos años se han aplicado diversos fármacos que actúan en algunas de las vías involucradas en la muerte celular, en particular aquellas que involucran la activación de los receptores glutamatérgicos y de canales de calcio tipo L, han sido ampliamente usados en la terapéutica (Ginsberg, 1993). Sin embargo, muchos de estos fármacos han tenido efectos secundarios sobre los pacientes como la hipertensión, la sedación, la ataxia y las alucinaciones (Holt, 1997). Por esta razón es necesario seguir investigando los mecanismos involucrados en la muerte celular con el fin desarrollar estrategias alternativas de neuroprotección para evitar o retardar la pérdida neuronal sin afectar al paciente.

En el siguiente artículo de revisión se trató de establecer cual es la relación entre la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y el metabolismo energético en la muerte y sobrevivencia celular que se observa en la isquemia cerebral.

### 3.1. Trabajo 1

**García O, Massieu L.** 2004. Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal. *Arch. Neurosci (Mex)*. 9 (1): 39-46.

# Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal

Octavio García, Lourdes Massieu

## RESUMEN

El cerebro está conformado por neuronas y células gliales, la relación entre estos dos tipos de células es fundamental para mantener la homeostasis cerebral. La excitabilidad de las células nerviosas depende en gran medida del ácido glutámico, el principal neurotransmisor excitador en el cerebro de mamíferos. La síntesis y el metabolismo del ácido glutámico, involucra una estrecha relación entre las neuronas y las células gliales. Una alteración entre los sistemas neuro-gliales glutamatérgicos puede producir la muerte de las células nerviosas a través de un mecanismo denominado excitotóxico. La muerte excitotóxica se ha asociado a la pérdida neuronal que se observa después de un episodio isquémico y en algunas enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, las interacciones neurogliales pueden funcionar como sistemas de neuroprotección que se activan para contrarrestar el daño excitotóxico a través de una intensa interacción metabólica que involucra la estimulación de la glucólisis y la producción de sustratos metabólicos como el piruvato y el lactato, así como la síntesis de glutatión, entre otros. En el presente trabajo se revisará el papel de los sistemas neurogliales glutamatérgicos en el daño y sobrevivencia neuronal durante la isquemia cerebral.

**Palabras clave:** neuronas, glia, isquemia, glutamato.

## GLIAL-NEURONAL INTERACTION AND ITS ROLE IN NEURONAL DEATH AND SURVIVAL

### ABSTRACT

The brain is conformed by neurons and glial cells, and the relationship between these two types of cells is fundamental in maintaining cerebral homeostasis. The

excitability of nerve cells depends mainly on glutamic acid, the mayor excitatory neurotransmitter in mammalian brain. The synthesis and metabolism of glutamic acid, involves a close relationship between neurons and glial cells. An alteration of the glutamatergic neuro-glial systems can produce the death of neurons through a mechanism known as excitotoxicity. Excitotoxic death is associated with the loss of neurons observed after a cerebral ischemic episode and in some neurodegenerative diseases. On the other hand, neuro-glial systems might have a neuroprotective action to prevent excitotoxic damage through an intense metabolic interaction which involves the stimulation of glycolysis and the production metabolic substrates such as pyruvate and lactate, as well as glutathione synthesis, among others. The present work reviews the role of the glutamatergic neuro-glial system on neuronal damage and survival during cerebral ischemia.

**Key words:** neurons, glia, ischemia, glutamate.

**E**l cerebro de los mamíferos está constituido principalmente por dos clases de células: las neuronas y las células gliales. Se estima que el cerebro humano contiene más de 100 mil millones de neuronas mientras que el número de células gliales supera entre 5 y 10 veces a la población neuronal<sup>1</sup>. Durante mucho tiempo se pensó que el papel de las células gliales estaba limitado al mantenimiento de la citoarquitectura del cerebro. Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que las células

*Recibido: 3 octubre 2003. Aprobado: 23 octubre 2003.*

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Correspondencia: Octavio García, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, A.P. 70253, 04510 México, D.F., E-mail: ogarcia@ifc.unam.mx

gliales establecen una estrecha relación con las neuronas a través de sistemas denominados neuro-gliales, que se encargan de mantener la homeostasis cerebral.

Las neuronas son células altamente especializadas y morfológicamente pueden ser divididas en cuatro regiones: el cuerpo celular o soma que es el centro metabólico de la célula; las dendritas, estructuras ramificadas que reciben señales de otras células; el axón, que se extiende a partir del soma de la célula nerviosa y que conduce la información a otras neuronas, por último las terminales presinápticas que constituyen la región de la neurona que permite la comunicación con otras neuronas a través de estructuras especializadas llamadas sinápsis. Las células gliales a su vez se clasifican principalmente en tres categorías: los oligodendrocitos y las células de Schwann que forman la mielina, una membrana que sirve de barrera de aislamiento y que se encuentra involucrada en la conducción del impulso nervioso del sistema nervioso central y periférico, respectivamente; la microglia, formada por células que responden a un daño o enfermedad en el cerebro, activando una respuesta inflamatoria y fagocitando las bridas celulares o detritus, por último los astrocitos que se caracterizan por tener una forma estrellada. Los astrocitos están estrechamente vinculados con las neuronas en procesos como: la recaptura de neurotransmisores liberados durante la transmisión sináptica, el mantenimiento de la concentración de  $K^+$  y del pH, la transferencia de sustratos metabólicos y la liberación de factores tróficos que promueven el crecimiento, maduración y reparación de las células nerviosas<sup>2</sup>. Recientemente, diversos reportes sugieren que las células gliales pueden tener otras funciones además de las ya mencionadas como son: la regulación de la excitabilidad neuronal<sup>3,4,5</sup>, el control de la microcirculación cerebral<sup>6</sup> y la reconstitución de los contactos sinápticos<sup>5</sup>, lo que hace que la comunicación entre las células gliales y las neuronas sea esencial para el funcionamiento del cerebro. En este trabajo se revisará cuál es el papel de los sistemas neuro-gliales glutamatérgicos y su relación con la muerte y sobrevivencia celular asociadas con la isquemia cerebral.

#### *La sinapsis glutamatérgica como un modelo de interacción de los sistemas neuro-gliales*

La excitabilidad de las células nerviosas depende en gran medida de la acción del ácido glutámico o glutamato, que es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro de los mamíferos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones este aminoácido puede actuar

como una potente neurotoxina. El mecanismo fisiológico y patológico de la excitabilidad neuronal involucra una estrecha comunicación entre las células gliales y las neuronas<sup>7</sup>. La estimulación de las neuronas a través de la sinapsis glutamatérgica consiste básicamente en la despolarización de las terminales sinápticas y la

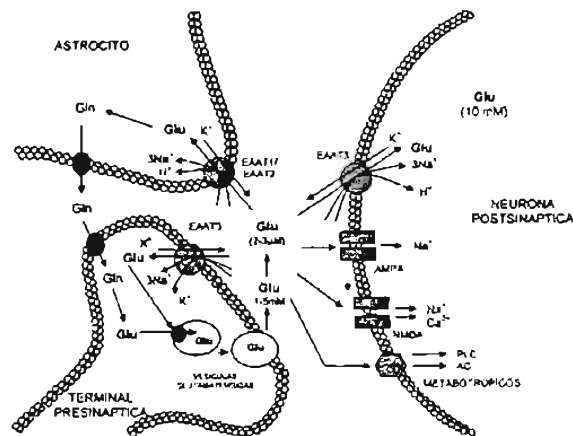


Figura 1. Sinápsis glutamatérgica. Un estímulo nervioso provoca la liberación de glutamato almacenado en vesículas sinápticas al espacio extracelular. El glutamato liberado actúa sobre sus receptores ionotrópicos (AMPA y NMDA) y metabotrópicos produciendo la excitación de la neurona postsináptica. Después de su acción sináptica el glutamato es capturado por transportadores localizados en las neuronas (EAAT3) y los astrocitos (EAAT1 y EAAT2), finalizando así la actividad de la sinapsis excitadora y manteniendo bajas las concentraciones de glutamato extracelular. Ver detalles en el texto

liberación vesicular del glutamato de la terminal presináptica al espacio sináptico (figura 1).

Se estima que la concentración de glutamato en las vesículas sinápticas puede alcanzar un rango de 60-210 mM y en el momento que se activa la sinapsis excitadora se pueden liberar entre 2 000 a 5 000 moléculas de glutamato alcanzando una concentración de entre 1-5 mM en el espacio sináptico<sup>8</sup>. Las moléculas de glutamato tienen que recorrer por difusión una distancia de entre 0.5-1  $\mu$ m para poder activar a receptores glutamatérgicos específicos en la membrana postsináptica (figura 1). Por último los receptores a glutamato pueden ser divididos en dos tipos: los receptores ionotrópicos y los receptores metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos contienen un canal iónico específico para cationes y en base a la especificidad del agonista son clasificados en receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropionato) y Kainato. La activación de los receptores glutamatérgicos en la membrana postsináptica produce un cambio en la permeabilidad iónica de la membrana y por lo tanto

excitación en la neurona. Los receptores AMPA median la transmisión sináptica excitadora rápida y son permeables principalmente a  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, el receptor a AMPA puede ser permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  si está conformado por determinadas subunidades<sup>9</sup>. Los receptores a NMDA son bloqueados fisiológicamente por  $\text{Mg}^{2+}$  y de manera dependiente de voltaje. Para que los receptores NMDA se activen requieren de la estimulación previa de los receptores AMPA, la despolarización producida por la activación de éstos libera el  $\text{Mg}^{2+}$  que se encuentra bloqueando el poro del receptor NMDA, y después la presencia de glutamato junto con la glicina hacen que el receptor entre en su estado activo lo que permite la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto la excitación de la neurona (figura 1). Por último los receptores metabotrópicos se encuentran acoplados a proteínas G y modulan la producción de mensajeros intracelulares por la activación de la fosfolipasa C (PLC) o de la adenilato ciclasa (AC) (figura 1). Por último la concentración intracelular del glutamato en el cerebro es de aproximadamente 10 mM mientras que la concentración extracelular es extremadamente baja cerca de 2-3  $\mu\text{M}$ . Como se presedente anteriormente cuando la sinapsis excitadora se activa la concentración de glutamato en el espacio sináptico puede alcanzar una concentración de 1-5  $\text{mM}$ , si la concentración de glutamato no disminuye después de ser liberado este neurotransmisor puede resultar tóxico a las neuronas incluso a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ , si permanece por un tiempo prolongado en el medio extracelular<sup>10</sup>. Las concentraciones extracelulares de glutamato se regulan por la acción de sistemas de captura de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$  localizados en neuronas y células gliales (figura 1). Después de actuar sobre sus receptores, el glutamato es eliminado rápidamente del espacio sináptico en un tiempo aproximado de 50-200  $\mu\text{s}$  finalizando así la actividad de la sinapsis excitadora. La captura de glutamato se lleva a cabo principalmente por los astrocitos, esta captura es mayor a la de las propias neuronas glutamatérgicas por lo que se considera que la activación de los transportadores localizados en los astrocitos, es el mecanismo predominante utilizado en los sistemas neuro-gliales para mantener bajas las concentraciones extracelulares de glutamato en el cerebro<sup>11</sup>.

En la actualidad se han clonado 5 tipos de transportadores a glutamato, los predominantemente gliales conocidos como GLAST y GLT-1 clonados originalmente del cerebro de rata, y sus homólogos humanos EAAT1 y EAAT2, respectivamente. El transportador EAAC1 y su homólogo en humanos

EAAT3 que se localiza principalmente en las células neuronales, el transportador EAAT4 expresado en células cerebelares de Purkinje, y finalmente el transportador EAAT5 expresado en retina. En los últimos años se ha demostrado que tanto en neuronas como en células gliales existe una expresión diferencial de los transportadores e incluso una colocalización de los diferentes subtipos de transportadores a glutamato en las células<sup>12</sup>.

#### *La captura de glutamato estimula la glucólisis*

La captura de glutamato por los transportadores requiere de energía. El costo energético de esta captura requiere de 1 molécula de ATP por molécula de glutamato transportada asociada a 3 iones de  $\text{Na}^+$ <sup>12</sup>. El ATP requerido para el transporte de glutamato es obtenido por medio de la oxidación de la glucosa capturada por transportadores específicos ubicados en los astrocitos. Durante el proceso glucolítico se producen dos ATP, un ATP es usado para la expulsión de los iones  $\text{Na}^+$  por la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y el otro ATP es utilizado para la síntesis de glutamina, además de producirse dos moléculas de lactato por cada molécula de glucosa. Se ha propuesto que la activación fisiológica de la sinapsis glutamatérgica podría estimular la glucólisis de los astrocitos<sup>13</sup> a través del siguiente mecanismo: una vez liberado el glutamato de las terminales presinápticas el neurotransmisor sería capturado principalmente por los transportadores localizados en los astrocitos. Como el glutamato es cotransportado con iones  $\text{Na}^+$  causaría un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  en los astrocitos lo que conduciría a la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (figura 2). La activación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  estimularía la glucólisis<sup>13</sup>. Adicionalmente el glutamato que es capturado por los astrocitos puede ser metabolizado por diversas vías y ser utilizado en la formación de glutamina o entrar en el ciclo del ácido tricarbóxico y servir como una fuente energética (figura 2). La formación de glutamina es catalizada por la glutamina sintetasa una enzima localizada en los astrocitos y en menor cantidad en los oligodendrocitos, pero ausente en las neuronas. El metabolismo oxidativo del glutamato es iniciado por su conversión a  $\gamma$ -cetoglutarato, mismo que es utilizado en el ciclo del ácido tricarbóxico; esto puede ser mediado por la glutamato deshidrogenasa o por transaminación<sup>11</sup>.

#### *Metabolismo del glutatión en los sistemas neuro-gliales*

Comparado con otros órganos del cuerpo, el cerebro es el órgano más susceptible al daño oxidativo

debido a diversos factores que incluyen la alta utilización del oxígeno, la presencia de un exceso de ácidos grasos insaturados que son blanco de la peroxidación lipídica, la baja o moderada actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, y la presencia de grandes concentraciones de hierro que favorecen la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO son especies químicas de oxígeno que presentan uno o más electrones desapareados en su último orbital, esta inestabilidad los vuelve reactivos pudiendo alterar la estructura molecular de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La generación de ERO es rápida y constante en el cerebro, ya que este órgano utiliza cerca del 20% del oxígeno consumido por el cuerpo, pero solo constituye un 2% de su peso, lo que indica que en el cerebro existe un gran metabolismo oxidativo. Por lo tanto, la detoxificación de las ERO es esencial en el cerebro para evitar el daño oxidativo.

El tripéptido glutatión (GSH,  $\gamma$ -L-glutamil-cisteinil-glicina), es un sistema muy importante para la defensa celular contra las ERO. En el cerebro la concentración de GSH tiene un rango de aproximadamente 1 a 3 mM. En particular, la concentración de GSH en los astrocitos es de 16-50 nmol/mg proteína y es mayor que en las células neuronales<sup>14</sup>. El GSH reacciona directamente contra los radicales libres a través de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. En las reacciones no enzimáticas el GSH reacciona con radicales tales como el anión superóxido, el óxido nítrico o el radical hidroxil, mientras que en las reacciones enzimáticas el GSH es el donador de electrones para la reducción de peróxidos en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx). El producto final de la oxidación del GSH es el glutatión disulfido (GSSG). El GSH es regenerado del GSSG por la reacción catalizada por la glutatión reductasa (GR)<sup>15</sup>.

El GSH es sintetizado por la acción consecutiva de dos enzimas, la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa que utiliza al glutamato y a la cisteína como sustratos formando el dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ GluCys). Posteriormente el  $\gamma$ GluCys es combinado con la glicina para generar GSH por medio de una reacción catalizada por la glutatión sintetasa (figura 2). El contenido de glutatión en las células nerviosas depende fuertemente de la disponibilidad de sus precursores. En el cerebro los astrocitos aportan a las neuronas precursores necesarios para la síntesis de GSH por lo que se establece una interacción metabólica en los sistemas neuro-gliales. Se propone que el GSH es previamente sintetizado en los astrocitos y liberado de estos e hidrolizado por una ectoenzima conocida como  $\gamma$ -

glutamiltranspeptidasa ( $\gamma$ GT), localizada en la membrana plasmática de los astrocitos. En esta reacción se produce el dipéptido cisteinilglicina (CysGly) y  $\gamma$ -Glu. El CysGly es disociado por una ectopeptidasa localizada en las neuronas generando cisteína y glicina que son capturados de manera independiente por las neuronas y utilizados para volver a sintetizar GSH (figura 2). La glutamina liberada de los astrocitos es usada por las neuronas como un precursor del glutamato necesario como neurotransmisor y para la síntesis de GSH<sup>14</sup> (figura 2). Sin embargo, en las neuronas la disponibilidad de la cisteína es el paso limitante para la formación de GSH. Recientemente algunos trabajos han reportado que la captura de cisteína necesaria para

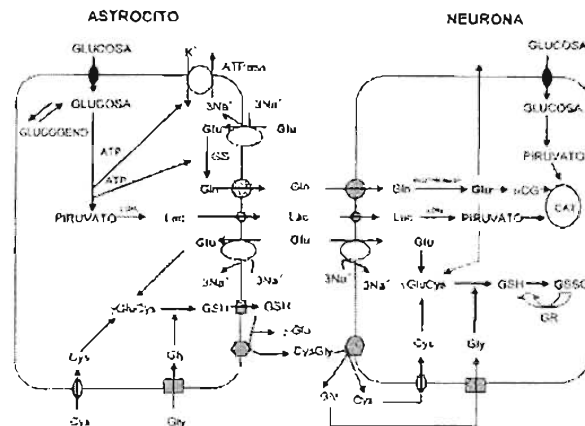


Figura 2. Interacción metabólica en los sistemas neuro-gliales. La captura de glucosa en astrocitos se realiza a través del transportador GLUT1, y en las neuronas del GLUT3. En los astrocitos el ATP sintetizado durante la glucólisis puede ser utilizado para mantener el funcionamiento de las ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y para la síntesis de glutamina (Gln). En los astrocitos la glucólisis puede ser estimulada durante la captura de glutamato (Glu). La glucólisis incrementaría la producción de lactato (Lac) en astrocitos que puede ser utilizado como un sustrato energético por las neuronas en condiciones de estrés metabólico, como la isquemia o la hipoglucemia. El Lac puede transformarse en piruvato a través de la lactato deshidrogenasa tipo 5 en astrocitos ( $\text{LDH}_5$ ) y tipo 1 en neuronas ( $\text{LDH}_1$ ). La liberación y captura de lactato se realizaría a través del transportador de monocarboxilatos tipo 1 para los astrocitos (TMC1) y tipo 2 para las neuronas (TMC2). El glutamato capturado por los transportadores gliales y neuronales también puede ser utilizado para la síntesis de Gln y glutatión (GSH) o incorporarse al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), a través de su conversión a  $\gamma$ -cetoglutarato ( $\alpha$ CG). En neuronas y en astrocitos el GSH se sintetiza por dos reacciones, la primera se forma el dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ GluCys), por una reacción catalizada por la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa a partir de Glu y cisteína (Cys), previamente capturados. Posteriormente el  $\gamma$ GluCys es combinado con glicina (Gly), formando GSH a través de la glutatión sintetasa. El GSH liberado por astrocitos se rompe en el dipéptido cisteinilglicina (CysGly) y  $\gamma$ Glu por una ectoenzima. En las neuronas la CysGly es disociada por una ectopeptidasa generando Cys y Gly que son capturados independientemente para sintetizar GSH neuronal. Los astrocitos mantienen la concentración de GSH en las neuronas por que les provee los precursores necesarios para su síntesis.



la síntesis de GSH, está asociada a la captura de glutamato a través de los transportadores neuronales<sup>16,17</sup>.

#### *La muerte excitotóxica y los sistemas neuro-gliales*

Como mencionamos anteriormente un incremento en la concentración extracelular de glutamato puede resultar tóxico para las células nerviosas. El efecto tóxico del glutamato se conoce desde finales de la década de los 50's del siglo pasado cuando Lucas y Newhouse<sup>18</sup>, demostraron que la administración del glutamato y análogos de este aminoácido producían degeneración en las células nerviosas de la retina. Posteriormente Olney<sup>19</sup>, propuso que la muerte neuronal inducida por este aminoácido se debía a una despolarización prolongada de las neuronas, acuñando el término excitotoxicidad para referirse al daño celular producido por la actividad prolongada de los receptores glutamatérgicos. En particular, la activación del receptor NMDA ha sido la vía mejor caracterizada de la muerte excitotóxica. Se propone que la excesiva estimulación del receptor NMDA, conduce a una entrada masiva de  $Ca^{2+}$  a la célula activando una variedad de enzimas celulares dependientes de este ión tales como proteasas, las cuales contribuirían al daño celular al degradar proteínas estructurales; fosfolipasas contribuyendo a la ruptura de la membrana celular; endonucleasas, generando alteraciones en el DNA y la activación de la sintasa de óxido nítrico (NOS), enzima involucrada en la generación de óxido nítrico (NO), y una subsecuente producción de ERO<sup>20</sup> (figura 3). Recientemente se ha propuesto que la mitocondria podría tener un papel preponderante en la muerte excitotóxica<sup>21</sup>. Diversas evidencias experimentales sugieren que la muerte excitotóxica es un evento común que se presenta en algunos desórdenes neurológicos como la isquemia cerebral, la hipoglicemia y la epilepsia, y en algunas enfermedades neurodegenerativas como la de Huntington, Alzheimer y la de Parkinson<sup>22</sup>.

Sin embargo, en todas estas condiciones se desconoce cuál es el origen del glutamato implicada en la muerte excitotóxica. Algunos estudios sugieren que una alteración de los transportadores encargados remover el glutamato del espacio sináptico podrían favorecer el incremento en la concentración extracelular de este neurotransmisor y con ello la muerte excitotóxica. Esta alteración ocurriría subsecuentemente a la deficiencia energética por ejemplo, durante la isquemia cerebral la drástica disminución en los niveles de ATP podría generar un mal funcionamiento de la ATPasa  $Na^+/K^+$ . Esto provocaría el colapso de los gradientes iónicos afectando directamente la actividad de los

transportadores de glutamato que son dependientes de  $Na^+$ , produciendo su funcionamiento inverso, o una deficiencia en la captura de este aminoácido, tanto en neuronas como en células gliales<sup>23</sup>. La presencia de NO también podría influir en la función inversa de los transportadores y producir un incremento de la concentración extracelular de glutamato durante la isquemia. Este mecanismo está relacionado con la respuesta inflamatoria que se observa después del daño cerebrovascular la cual estimularía la producción de NO en los astrocitos. El NO podría difundir a las neuronas e inhibir su respiración y disminuir los niveles de ATP, lo cual favorecería la liberación de glutamato al espacio extracelular a través de un funcionamiento inverso del transportador. Esto podría ocurrir también en los astrocitos. El glutamato liberado por la glia y las neuronas estimularía a los receptores glutamatérgicos de las neuronas vecinas y produciría una muerte excitotóxica<sup>24</sup>. Por otro lado, en experimentos con ratones *knock out* de los transportadores gliales GLAST y GLT-1, se observó un incremento en los niveles extracelulares de glutamato y la presencia de muerte excitotóxica, mientras que en los animales *knock out* del transportador neuronal EAAC1 no se presentaba neurodegeneración<sup>25</sup>. A su vez, la inhibición de la expresión de los transportadores gliales favorece la pérdida neuronal y la generación de crisis epilépticas<sup>26</sup>, y exacerba el daño neuronal isquémico<sup>27</sup>.

#### *La interacción neuro-glial durante la isquemia cerebral*

Durante un proceso patológico como la isquemia cerebral, los sistemas neuro-gliales pueden ser afectados provocando un desajuste en la homeostasis cerebral que puede conducir a la muerte celular. Sin embargo, la duración del periodo isquémico puede determinar si el daño celular ocurre en las neuronas o en los astrocitos. Por ejemplo, en la isquemia generada por la oclusión de 4 vasos cerebrales se ha observado que un periodo de 2 ó 3 minutos de isquemia es suficiente para producir daño neuronal mientras que los astrocitos sufren daño después un periodo isquémico de 30 a 60 minutos. Estos resultados son similares a los observados en la isquemia generada por la oclusión de arteria cerebral media. En este modelo se ha reportado que un periodo isquémico de 40 minutos es suficiente para producir muerte neuronal mientras que los astrocitos requieren un periodo isquémico de 360 minutos<sup>28</sup>. En cultivos celulares expuestos a privación de glucosa y oxígeno (DGO), condiciones utilizadas como modelo de isquemia *in vitro*, durante un periodo de 45-60 minutos puede ser letal para las neuronas pero no para los astrocitos. La pérdida neuronal y la

sobrevivencia de los astrocitos estarían asociadas con la capacidad de las células para mantener el potencial de membrana mitocondrial y los niveles de ATP, además de que se ha sugerido una producción diferencial de ERO, ya que en las neuronas se produce preferentemente superóxido ( $O_2^-$ ) y en los astrocitos se produce NO<sup>29</sup>. El hecho de que los astrocitos puedan tolerar con mayor eficiencia un periodo isquémico puede estar relacionado con su actividad metabólica<sup>2</sup>, con la eficacia para capturar glutamato<sup>11</sup> y con un menor número de receptores glutamatérgicos tipo NMDA<sup>25</sup>. Sin embargo, algunos trabajos han demostrado que las células gliales pueden sufrir daño excitotóxico cuando son expuestas a altas concentraciones de glutamato (1-10 mM) por periodos prolongados (de 16-24 horas)<sup>31</sup>.

Por otro lado, el glucógeno es una gran reserva de energía y en el cerebro se encuentra selectivamente localizado en los astrocitos. Bajo condiciones de privación energética es utilizado para mantener los niveles de ATP. Los astrocitos de corteza de rata expuestos a una DGO pueden metabolizar el glucógeno y utilizar la glucólisis anaerobia, lo que incrementa la producción de lactato<sup>32</sup>. Sin embargo, la captura de glucosa en astrocitos también se podría incrementar bajo condiciones isquémicas como un mecanismo que permitiría generar ATP y conservar la actividad de la ATPasa  $Na^+/K^+$ . Así se mantendría el funcionamiento normal del transportador de glutamato evitando la muerte excitotóxica en las neuronas, al ser éste removido<sup>13,33</sup>. El incremento en la actividad glucolítica en los astrocitos podría generar un incremento en la producción de lactato que sería utilizado como un sustrato metabólico por las neuronas en condiciones de deficiencia energética como el caso de la isquemia y la hipoglucemia<sup>33,34</sup>. Esta hipótesis es apoyada por diversas evidencias obtenidas de experimentos *in vivo* e *in vitro* que demuestran: 1. que existe un incremento en la concentración de lactato durante la isquemia cerebral<sup>35</sup>, 2. que el lactato es altamente oxidado por las neuronas<sup>36</sup> y 3. que el lactato mantiene los niveles de ATP y promueve la sobrevivencia y actividad neuronal cuando los niveles de glucosa son bajos<sup>32,35</sup>. En ausencia de un sustrato metabólico adecuado, las neuronas pueden transformar el lactato en piruvato y posteriormente incorporarlo al ciclo de los ácidos tricarboxílicos vía la formación de acetil CoA generando 18 ATP por molécula de lactato<sup>32</sup>. También se ha propuesto que algunos de los carbonos de la molécula de lactato puedan incorporarse a pozas de aminoácidos tales como los neurotransmisores glutamato, aspartato y GABA<sup>2</sup>. Además, la existencia de transpor-

tadores específicos para lactato en astrocitos y neuronas apoya la existencia un mecanismo coordinado en ambas células<sup>37</sup>. Sin embargo, es posible que los astrocitos no solo liberen lactato sino también piruvato<sup>38</sup>. El piruvato liberado por los astrocitos podría proteger a las neuronas de un daño tóxico no actuando sólo como un sustrato energético sino también como un atrapador de radicales libres<sup>38,39</sup>. Esta idea es apoyada en diversos trabajos que demuestran que el piruvato puede funcionar como un excelente compuesto neuroprotector<sup>38-44</sup>.

Durante la isquemia cerebral los sistemas neurogliales también pueden ser afectados por daño oxidativo subsecuente a la reperfusión posisquemia. Por otro lado, existen reportes donde se demuestra que animales que tienen disminuidos los niveles de GSH son más susceptibles al daño isquémico<sup>45</sup>, y que durante la isquemia cerebral existe una elevada concentración extracelular de GSH. Este último fenómeno puede ser el resultado de la capacidad de las células del cerebro, en particular de los astrocitos, para liberar este tripéptido<sup>46</sup>. El GSH es un antioxidante muy importante contra la toxicidad del peróxido de hidrógeno

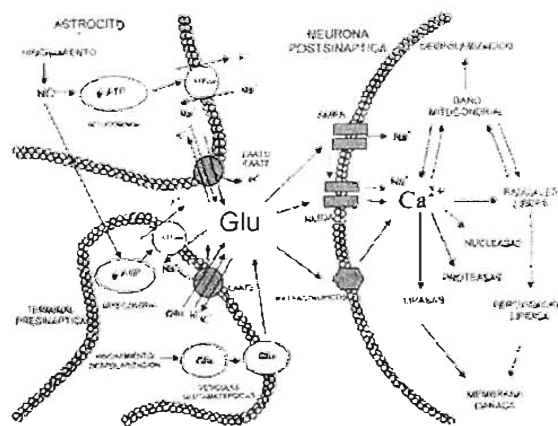


Figura 3. Mecanismos involucrados en la muerte excitotóxica. Durante la isquemia cerebral la disminución en los niveles de ATP produciría una falla en la ATPasa  $Na^+/K^+$  colapsando los gradientes iónicos y provocando un funcionamiento inverso del transportador de glutamato o una disminución en la captura de este aminoácido. El incremento en la concentración extracelular de glutamato induciría la excitotoxicidad por la sobreestimulación de los receptores glutamatérgicos. La entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los receptores tipo NMDA activaría enzimas dependientes de este ion como proteasas, lipasas y nucleasas provocando la muerte de las células nerviosas. La formación de radicales libres también podría contribuir al daño celular. Adicionalmente, la respuesta inflamatoria que se produce durante la isquemia cerebral estimularía la producción de NO que inhibiría la síntesis de ATP en neuronas y astrocitos afectando a la ATPasa  $Na^+/K^+$  y por lo tanto al transportador de glutamato (ver detalles en el texto).

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un peróxido que se genera en altas concentraciones en el cerebro y que podría estar involucrado en los procesos neurodegenerativos asociados con la enfermedad de Parkinson, o contribuir al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer<sup>47,48</sup>. La depleción de GSH es uno de los primeros indicadores de estrés oxidativo durante la progresión de la enfermedad de Parkinson y al parecer la depleción de GSH es paralela a la severidad de la enfermedad<sup>49</sup>. En algunos reportes se propone que un solo astrocito podría proteger a 20 neuronas contra la toxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>50</sup> y que la depleción en los niveles de GSH podría estar involucrada a la alteración del funcionamiento de los transportadores de glutamato, afectando directamente la captura y concentración de los sustratos necesarios para la síntesis de GSH<sup>51,52</sup>. Por otro lado, la producción de NAD(P)H necesaria para la formación de GSH se obtiene principalmente a través de la vía de las pentosas fosfato. Se ha demostrado que en astrocitos el flujo de la vía de las pentosas fosfato es mayor con respecto a las neuronas y se incrementa hasta tres veces durante una exposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>53,54</sup>. Como mencionamos anteriormente los astrocitos están involucrados en la síntesis de GSH neuronal ayudando a estas células a protegerse contra un daño oxidativo. Sin embargo, los astrocitos también podrían ser más tolerantes al daño oxidativo porque presentan una mayor actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, y una concentración 2.5 veces más alta de vitamina E que las neuronas, la cual es necesaria para evitar la peroxidación lipídica. La pérdida o alteración de las defensas antioxidantes en los sistemas neurogliales también podría contribuir a la disminución de los niveles de ATP que se observa durante la isquemia cerebral, pues algunas ERO pueden inhibir la actividad de diversos complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial. Por ejemplo durante la DGO la disminución de los niveles de ATP podría estar asociada a la inhibición del complejo I en las neuronas mientras que los astrocitos no muestran disminución de la actividad de la CTE mitocondrial, y tampoco una disminución en los niveles de ATP<sup>54</sup>. La inhibición de los complejos de la CTE mitocondriales en las neuronas correlaciona con una mayor daño celular mientras que los astrocitos al no presentar esta inhibición pueden tolerar la presencia de ERO<sup>55</sup>. Adicionalmente, el NO producido en la glia durante una respuesta inflamatoria, se podría difundir a otras neuronas y afectar sus mitocondrias produciendo una disminución en los niveles de ATP, ya sea directamente o a través de la formación de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)<sup>24,55</sup>.

## CONCLUSIÓN

Las interacciones entre neuronas y astrocitos son necesarias para mantener la homeostasis en el cerebro ya que existe una estrecha relación entre ambos tipos de células. La sobrevivencia y muerte celular que se presenta en algunas enfermedades neurodegenerativas o durante la isquemia cerebral podría estar vinculada no sólo a las características particulares de cada tipo celular, sino también a la interacción física, metabólica y fisiológica que existe entre estas células.

## AGRADECIMIENTOS

*Este trabajo fue realizado gracias al apoyo IN222503 (PAPIIT) a Lourdes Massieu y una beca de CONACYT 163330 y DGEP-UNAM a Octavio García.*

## REFERENCIAS

1. Kandel ER. The nervous system has two classes of cells. En Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editores. Principles of neuronal science. USA: McGraw-Hill, 2000;19-35.
2. Tsacopoulos M, Magistretti PJ. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 1996; 16:877-85.
3. Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science* 2002; 298:556-62.
4. Auld DS, Robitaille R. 2003. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 2003;40:389-400.
5. Newman EA. 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 2003; 26:536-42.
6. Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann K-A, Pozzan T, et al. Neuron-to-astrocyte signalling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 2003;6:43-50.
7. Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as neurotransmitter. *nat rev neurosci* 2002;3:748-55.
8. Clements JD. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci* 1996; 19:163-71.
9. Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MVL, Zukin SR. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA receptor in neurological disorders. *Trends Neurosci* 1997; 20:464-70.
10. Cheung NS, Pascoe CJ, Giardina SF, John CA, Beart PM. Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones. *Neuropharmacol* 1998;37: 1419-29.
11. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 1999; 57:417-28.
12. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001;65:1-105.
13. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:10625-9.
14. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 2000; 267:4912-6.
15. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000; 62:649-71.

16. Himi T, Ikeda M, Yasuhara T, Nishida M, Morita I. Role of neuronal glutamate transporter in the cysteine uptake and intracellular glutathione levels in cultured cortical neurons. *J Neural Trans* 2003; 110: 1337-48.
17. Chen Y, Swanson RA. The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *J Neurochem* 2003;84:1332-39.
18. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 1957; 58:193-201.
19. Olney JW. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 1969; 28:455-74.
20. Bittigau P, Ikonomidou C. Glutamate in neurological diseases. *J Child Neurol* 1997; 12:471-485.
21. Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:97-112.
22. Obrenovitch TP, Urenjak J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog Neurobiol* 1997; 51:39-87.
23. Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000; 403:316-21.
24. Bal-Price A, Brown GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 2001; 21:6480-91.
25. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kunel 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* 1996;16:675-86.
26. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 1997;276:1699-702.
27. Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ. Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *J Neurosci* 2001; 21:1876-83.
28. Fem R. Ischemia: astrocytes show their sensitive side. *Prog Brain Res* 2001;132:405-11.
29. Reichert SA, Kin-Han JS, Dugan LL. The mitochondrial permeability transition pore and nitric oxide synthase mediate early mitochondrial depolarization in astrocytes during oxygen-glucose deprivation. *J Neurosci* 2001;21:6608-16.
30. Seifert G, Steinhäuser C. Ionotropic glutamate receptors in astrocytes. *Prog Brain Res* 2001;132:287-99.
31. Chen C-J, Liao S-L, Kuo J-S. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocyte. *J Neurochem* 2000;75:1557-65.
32. Diemel GA, Hertz L. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J Neurosci Res* 2001;66:824-38.
33. Stanimirovic DB, Ball R, Durkin JP. Stimulation of glutamate uptake and Na, K-ATPase activity in rat astrocytes exposed to ischemia-like insults. *Glia* 1997;19:123-34.
34. Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Stelner P, Welker E, Chatton J-Y, Magistretti PJ, Pellerin L. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 2003;37:275-86.
35. Smith D, Pernet A, Hallett WA, Bingham E, Marsden PK, Amiel SA. Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:658-64.
36. Bouzier-Sore A-K, Merle M, Magistretti PJ, Pellerin L. Feeding active neurons: (re)emergence of a nursing role for astrocytes. *J Physiol (Paris)* 2002;96:273-82.
37. Pellerin L. Lactate as a pivotal element in neuro-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int* 2003;43:331-8.
38. Wang XF, Cynader MS. Pyruvate released by astrocytes protects neurons from copper-catalyzed cysteine neurotoxicity. *J Neurosci* 2001;21:3322-31.
39. Desagher S, Glowinski J, Premont J. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 1997; 17:9060-7.
40. Ruiz F, Alvarez G, Pereira R, Hernandez M, Villalba M, Cruz F, Cerdan S, Bogonez E, Satrustegui J. Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *Neuroreport* 1998;9:1277-82.
41. Maus M, Marin P, Israel M, Glowinsky J, Premont J. Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 1999;11:3215-24.
42. Lee JY, Kim YH, Koh JY. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci* 2001;21 (RC171):1-6.
43. Arias C, Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L.  $\beta$ -Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: Implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2002; 176:163-74.
44. Garcia O, Massieu L. Glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine 2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentrations of mitochondrial toxin 3-nitropropionate: involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. *J Neurosci Res* 2003;74:956-66.
45. Mizui T, Kinouchi H, Chan PH. Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats. *Am J Physiol* 1992;262:H313-7.
46. Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, Chan PH, Koistinaho J, Swanson RA. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanisms. *J Neurochem* 2001; 77:1601-10.
47. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid  $\beta$  protein toxicity. *Cell* 1994; 77:817-827.
48. Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1037-48.
49. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000; 267:4904-11.
50. Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 1996; 16:2553-2562.
51. Himi T, Ikeda M, Yasuhara T, Murota SI. Oxidative neuronal death caused by glutamate uptake inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 2003; 71:679-88.
52. Ré DB, Boucraut J, Samuel D, Bliman S, Kerkerian-Le Goff L, Had-Aissouni L. Glutamate transport alteration triggers differentiation-state selective oxidative death of cultured astrocytes: a mechanism different from excitotoxicity depending on intracellular GSH contents. *J Neurochem* 2003;85:1159-70.
53. Ben-Yoseph O, Boxer PA, Ross BD. Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J Neurochem* 1996;66:2329-37.
54. Almeida A, Delgado-Esteban M, Bolaños JP, Medina JM. Oxygen and glucose deprivation induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 2002;81:207-17.
55. Bolaños JP, Heales SJR, Land JM, Clark JB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 1995; 64:1965-72.

## II. ANTECEDENTES

Uno de los eventos asociados a la isquemia cerebral es el incremento en la concentración extracelular de glutamato. Aunque se desconoce cual es el mecanismo responsable de este aumento, se propone que una disminución en la expresión de los transportadores encargados de remover a dicho aminoácido del espacio extracelular (Torp et al., 1995; Martin et al., 1997; Fujita et al., 1999; Raghavendra Rao et al., 2001), o una alteración de su funcionamiento, que da lugar a una disminución en la captura de glutamato o al funcionamiento inverso del transportador (Jabaudon et al., 2000; Rossi et al., 2000), podrían favorecer el incremento en la concentración extracelular de glutamato, y esto a su vez inducir la muerte excitotóxica.

Sin embargo, en los últimos años diversos estudios han demostrado que la inhibición prolongada de los transportadores de glutamato *in vivo* no produce daño neuronal *per se* a pesar de que incrementa notablemente la concentración de este aminoácido respecto a su nivel basal en el espacio extracelular (Massieu et al., 1995; Massieu y Tapia, 1997). El hecho de que el incremento en los niveles extracelulares de glutamato por inhibición de su transporte no sea suficiente para producir neurodegeneración *in vivo*, sugiere que factores adicionales, como la deficiencia energética asociada a la isquemia cerebral pueda ser un factor determinante para activar los mecanismos de muerte celular. En este sentido, diversos trabajos han demostrado la relación entre la toxicidad de glutamato y el estado energético de la célula; algunas de estas evidencias son: 1) el daño inducido por glutamato y sus análogos se exacerba en presencia de toxinas mitocondriales (Novelli et al., 1988; Greene y Greenamyre, 1995; Sánchez-Carbente y Massieu, 1999); y 2) el daño producido por el glutamato puede ser producto de una falla mitocondrial como la alteración del  $\Delta\Psi_m$ , la disminución en la síntesis de ATP, un incremento de  $Ca^{2+}$  en la matriz mitocondrial y la

producción de ERO (Ankarcrona et al., 1995; White y Reynolds, 1996; Schinder et al., 1996; Peng y Greenamyre, 1998; Nicholls et al., 2003).

Con base en estos antecedentes se desarrolló previamente un modelo experimental que nos permitió mimetizar dos eventos que suceden durante la isquemia: la liberación de glutamato extracelular y una alteración del metabolismo energético (ver anexo 1). Para desarrollar este modelo se utilizaron cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC), por ser células muy homogéneas y vulnerables al daño excitotóxico (Gallo et al, 1982; Dessi et al, 1994) y se demostró que la exposición a *L-trans*-pirrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC), un inhibidor sustrato competitivo del transporte de glutamato, incrementa la concentración de este aminoácido, pero no produce un daño a las NGC. Resultados similares han sido reportados por Cebere et al. (1999), en estas mismas células e *in vivo* en hipocampo y estriado (Massieu et al, 1995; Massieu y Tapia, 1997). Sin embargo, la elevación de la concentración de glutamato resulta tóxica a las células cuando su metabolismo energético se encuentra alterado por la presencia de toxinas mitocondriales como el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), un inhibidor de la succinato deshidrogenasa (SDH), y por lo tanto del ciclo de Krebs y del complejo II de la CTE, o por la azida de sodio, un inhibidor de la citocromo oxidasa o complejo IV de la CTE. Este efecto parece ser exclusivo de las células neuronales ya que cultivos puros de células gliales expuestas a las mismas condiciones experimentales no son afectados. Se observó que la actividad de la SDH es inhibida substancialmente desde los 30 minutos de exposición a 3-NP y permanece inhibida durante las siguientes 24 horas. La coexposición de 3-NP+PDC no produce una inhibición adicional de la SDH ni un mayor incremento en los niveles de glutamato extracelular (ver anexo 1). Estos resultados sugieren que las células nerviosas son vulnerables a la acumulación de glutamato extracelular cuando su metabolismo energético se encuentra disminuído. El daño

celular observado en este modelo experimental puede ser parcialmente prevenido por la administración de inhibidores del estrés oxidativo como el PBN, por antagonistas de los receptores glutamatérgicos como el MK-801 y por sustratos energéticos como el piruvato, mientras que inhibidores de canales de calcio dependientes de voltaje no tuvieron ningún efecto (ver anexo 1). Estos resultados sugerían que una posible disminución en los niveles de ATP, la producción de ERO y el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  a través del receptor glutamatérgico tipo NMDA, son eventos involucrados en la muerte neuronal. Sin embargo, se desconocía la participación y la interrelación de cada uno de estos eventos en el daño celular, así como el momento en que mueren las células en el modelo de estudio. La caracterización y la validación de este modelo fue publicada y se encuentra en forma de anexo en la parte final de esta tesis.

### III. OBJETIVO GENERAL

Con base en los antecedentes previos, el objetivo general de este trabajo fue determinar la participación de la deficiencia mitocondrial y el estrés oxidativo en un modelo experimental que mimetiza condiciones de isquemia. Así mismo se trató de conocer la relación y la secuencia temporal en la que presentan estos eventos y su relación con la muerte celular.

Para cumplir con este objetivo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1) Conocer si los niveles de ATP se ven afectados después de que los cultivos celulares son expuestos a la toxina mitocondrial (3-NP), al inhibidor del transporte de glutamato (PDC), y a la coexposición de 3-NP+PDC.
- 2) Monitorear la actividad mitocondrial de los cultivos neuronales a través del análisis de la actividad redox de la mitocondria y del  $\Delta\Psi_m$ , cuando las células son expuestas a 3-NP, PDC y 3-NP+PDC.
- 3) Establecer si existe una correlación entre la actividad mitocondrial, los niveles de ATP y la muerte celular con el fin de conocer si efectivamente los efectos tóxicos del PDC se deben a una alteración en la mitocondria.
- 4) Monitorear si se producen especies reactivas de oxígeno cuando las células se tratan con 3-NP ó PDC y si su producción aumenta cuando las células se incuban con 3-NP+PDC, y si esto correlaciona con la presencia de estrés oxidativo en el modelo.
- 5) Identificar si el fenotipo de muerte celular que se observa después de la exposición de 3-NP+PDC corresponde a apoptosis o necrosis, con base en la evaluación de algunas de sus características (presencia de núcleos condensados, translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular para apoptosis y ruptura de la membrana celular para necrosis).



#### IV. METODOLOGÍA

A continuación se describirán las principales técnicas utilizadas durante la realización de la tesis. Una descripción más detallada de los procedimientos experimentales se presenta en cada uno de los artículos que se encuentran en el apartado de resultados.

##### ***Cultivos celulares.***

Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC), se obtuvieron de ratas Wistar de 7-8 días de edad (Bioterio IFC/UNAM). Los cerebelos fueron disectados y cortados en cubos de 300  $\mu\text{m}$  por medio de un rebanador, incubados con una solución de tripsina al 0.25% y dispersados por trituración con una solución que contiene DNasa e inhibidor de tripsina (0.08% y 0.52% respectivamente), pH 8.2. Las células fueron suspendidas en medio basal mínimo Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina (2 mM), penicilina (50 U/ml), estreptomycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ), gentamicina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y KCl (25 mM) y cultivados a una densidad de  $1.5 \times 10^6$  células por pozo en cajas de plástico de 24, 12 y 6 multipozos previamente tratadas con poli-L-lisina (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células se cultivaron por 9 días a 37°C con una humedad del 5% y una atmósfera de 95%/CO<sub>2</sub>. Después de 1 día *in vitro* (DIV), se agregó a cada uno de los pozos citosina arabinosa (10  $\mu\text{M}$ ) para inhibir la proliferación de las células gliales y glucosa (5 mM) al 4 DIV. La proporción de células gliales en estos cultivos fue menor al 5% determinada por inmunocitoquímica usando anticuerpos contra MAP<sub>2</sub> y GFAP, marcadores de neuronas y células gliales respectivamente. El medio no fue cambiado hasta que los cultivos fueron usados para los experimentos. Todos los experimentos se realizaron con NGC de 9 DIV. La morfología de las células y el aspecto general del cultivo fueron monitoreados antes y después del tratamiento farmacológico a través de un microscopio invertido.

### ***Estudios farmacológicos.***

En todos los casos, antes de realizar el experimento se retiró la mitad del medio condicionado y se agregó el inhibidor de la captura de glutamato (PDC), el inhibidor del metabolismo energético mitocondrial (3-NP) y la combinación de PDC+3-NP durante 0.5, 2 y 4 horas en presencia o ausencia de los sustratos energéticos (piruvato y acetoacetato), el atrapador de radicales libres (PBN), el antagonista del receptor glutamatérgico (MK-801) y el inhibidor general de caspasas (Z-asp-DCB). Al final del periodo de incubación el medio que contenía los fármacos se sustituyó con el medio condicionado previamente recolectado y mantenido a 37°C. Este protocolo farmacológico fue utilizado para medir la actividad mitocondrial, la viabilidad celular, la detección de núcleos apoptóticos y los niveles de ATP (ver trabajo 1, sección de resultados). En otra serie de experimentos el 3-NP, PDC y 3-NP+PDC fue incubado por periodos de 5 minutos a 4 horas en presencia o ausencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NAME) y las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), para prevenir la producción del radical  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , respectivamente. Al final del periodo de incubación las células fueron lavadas con un amortiguador de fosfato sódico (PBS) y procesadas para determinar el potencial de membrana mitocondrial y la muerte celular por citometría de flujo, así como los niveles de GSH, NADPH y NADH y el consumo de oxígeno (ver trabajo 2, sección de resultados).

### ***Actividad mitocondrial.***

La actividad de las deshidrogenasas mitocondriales es considerada un reflejo de la funcionalidad mitocondrial y fue medida a través de la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium (MTT), usado como aceptor de electrones. El ensayo se basa en la capacidad de las mitocondrias vivas para transformar el MTT en una sal insoluble de

formazan. Una disminución en la producción de formazan es un índice de la pérdida de la actividad mitocondrial a tiempos cortos de incubación con los fármacos. Sin embargo, el ensayo de MTT puede ser utilizado como un índice de daño y/o viabilidad celular (Mosmann, 1993; Liu et al., 1997), ya que la pérdida de la actividad mitocondrial se considera como una pérdida de la viabilidad. Brevemente, después del tratamiento farmacológico el medio fue removido y sustituido por el medio previamente recolectado, y las células fueron incubadas con 30  $\mu$ l de MTT (150  $\mu$ M), durante una hora a 37°C, en una atmósfera que contiene 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>. El medio fue aspirado y el formazan precipitado se solubilizó con 0.8 ml de isopropanol y se cuantificó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. En algunos casos el ensayo se realizó 24 horas después del periodo de incubación de 4 horas con los fármacos, como un indicador de viabilidad celular.

#### ***Determinación de viabilidad celular.***

La evaluación del daño y de la viabilidad neuronal se realizó 4 horas después del tratamiento farmacológico por la observación directa de los cultivos a través de microscopio invertido y por el ensayo de muerte/vida. Este ensayo requiere de dos marcadores fluorescentes: la calceína-AM (C-AM) y el homodímero de etidio (HE). La C-AM es un compuesto no fluorescente que es permeable a través de la membrana y es retenido por las células vivas; en presencia de esterasas intracelulares produce fluorescencia verde indicando viabilidad celular. El HE es excluido de las células normales y solamente puede entrar a las células cuando la membrana está dañada, se intercala entre los pares de bases de los ácidos nucleicos produciendo fluorescencia roja lo cual es indicativo de células no viables (Haugland, 1996). El ensayo fue detectado a través de un microscopio de

fluorescencia con un objetivo de 60X de inmersión en aceite (AN 1.4). Para estos experimentos las células fueron sembradas sobre cubreobjetos en cajas Petri de 12 pozos. Cuatro después del ensayo farmacológico las células se lavaron dos veces con D-PBS y se expusieron a la C-AM (2  $\mu$ M) y HE (4  $\mu$ M) disueltos en D-PBS por 5 minutos, posteriormente se lavaron y se fijaron con paraformaldehído 30 minutos. Inmediatamente después fueron analizados por microscopía de fluorescencia y el número de células muertas se cuantificó con un sistema de análisis de imágenes (NIH Image 1.6 para Macintosh). Se contaron 10 campos de tres experimentos por duplicado. El total de células en cada campo se tomó como el 100%, los resultados se expresaron como el por ciento de células marcadas con HE (muertas), con respecto al número total de células (rojas y verdes) presentes en cada campo. El número promedio de células en cada campo fue de: 232 $\pm$ 9

#### ***Detección de núcleos condensados por el marcador Hoechst.***

Como otro marcador de muerte celular se utilizó el Hoechst 33258 (bis-benzimida; Sigma), que es permeable a la membrana y es utilizado para identificar a la cromatina nuclear. El Hoechst 33258 se une específicamente a pares de bases de A-T y fue usado para cuantificar la presencia de núcleos condensados o fragmentados característicos de la muerte apoptótica. Para estos ensayos las células se crecieron en cubreobjetos de vidrio en cajas de Petri de 12 pozos. Después de cuatro horas de los ensayos farmacológicos, las células se lavaron 2 veces con D-PBS y se incubaron con 0.01% de Hoeschst 33258 en D-PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con D-PBS y fijadas con paraformaldehído frío al 4% por 30 minutos. Las células fueron montadas con una solución glicerol-metanol (1:1 v/v). Los cultivos fueron observados con un microscopio de epifluorescencia a través de un objetivo 100X de inmersión en aceite

(AN 1.4). Algunos de los campos observados fueron fotografiados y cuantificados con un analizador de imágenes (NIH Image 1.6 para Macintosh). Solamente se cuantificaron las células que tienen la cromatina condensada o fragmentada. Las células con un núcleo homogéneo fueron consideradas como viables. Se contaron 10 campos de tres a seis experimentos independientes. El total de células en cada campo se tomó como el 100%, los resultados se expresan como por ciento de células con el núcleo condensado o fragmentado, con respecto al número total de células presentes en cada campo. El número promedio de células en cada campo es de  $125 \pm 4.7$

#### ***Determinación de los niveles de ATP.***

El ATP se determinó a través de un sistema comercial (ensayo luciferin-luciferasa, Molecular Probes). Brevemente, después del tiempo de incubación con los fármacos las células fueron lavadas dos veces con un medio Locke's que contiene (mM): 154 NaCl, 5.6 KCl, 3.6 NaHCO<sub>3</sub>, 2.3 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 5.6 glucosa a pH 7.4 y una temperatura de 37°C. Posteriormente 125 µl de un reactivo de lisis (reactivo liberador de ATP de células somáticas, Sigma), fue agregado por 5 minutos a temperatura ambiente, el lisado fue suspendido y transferido a un tubo eppendorf y agitado en un vortex. Se tomaron 15 µl del lisado y se diluyeron en 85 µl de agua. Los 100 µl del lisado diluido fueron transferidos a un tubo de poliestireno e introducidos en un luminómetro (Bio Orbit 1251). Posteriormente se inyectaron 400 µl de una solución que contiene una mezcla de luciferin-luciferasa preparada de acuerdo al instructivo del comerciante. Los valores de quimioluminiscencia obtenidos en el luminómetro son detectados en mV por una fotomultiplicadora. Los niveles de ATP fueron comparados con los valores obtenidos de una curva estándar realizada con

concentraciones conocidas de ATP y los resultados son expresados como nmoles/mg de proteína.

***Determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y de la muerte apoptótica.***

El  $\Delta\psi_m$  y la muerte celular apoptótica fueron determinados en la misma suspensión de NGC por citometría de flujo. Para estos experimentos los cultivos celulares fueron expuestos a una mezcla que contenía los marcadores fluorescente 5,5',6,6',-tetracloro-1,1',3,3',tetraetilbenzimidazolilcarbocianina yodo (JC-1) (Molecular Probes), anexina V-APC y 7-aminoactinomicina-D (7-ADD) diluídos en Binding Buffer (kit-BD PharMingen), para determinar el  $\Delta\psi_m$ , la apoptosis y la necrosis, respectivamente. El JC-1 es un marcador catiónico sensible a voltaje, existe como monómero y como agregados JC. La forma monomérica emite una fluorescencia verde a 525 nm y su acumulación en la mitocondria es dependiente del  $\Delta\psi_m$ . Las cargas positivas del JC-1 se acumulan en la membrana interna de la mitocondria que tiene un potencial negativo formando dímero o agregados JC que emiten una fluorescencia roja, a 590 nm. Cuando hay una despolarización existe una pérdida de los agregados JC y el espectro de emisión cambia de 590 a 530 nm que se manifiesta como una pérdida en la intensidad de la fluorescencia roja/verde. La anexina V es una proteína 35-36 KDa dependiente de  $Ca^{2+}$  que se une a la fosfatidil serina con alta afinidad (Bedner et al., 1999). Durante un proceso apoptótico el fosfolípido de la membrana plasmática fosfatidilserina es traslocado de la parte interna a la parte externa de la membrana plasmática, exponiendo la fosfatidil serina al ambiente extracelular. La anexina V es conjugada con el fluorocromo APC para ser detectada en los ensayos de citometría de flujo (Bedner et al., 1999). El 7-ADD es un fluorocromo de ADN. El 7-ADD es impermeable a la membrana plasmática, cuando la membrana sufre algún

daño el 7-ADD se introduce a la célula intercalándose entre el DNA, siendo un indicador de muerte necrótica (Bedner et al., 1999). La cuantificación de las células apoptóticas se realizó capturando las células positivas a anexina V y negativas a 7-ADD; las células positivas a 7-ADD fueron consideradas células necróticas. Brevemente, después del tratamiento farmacológico las células fueron lavadas con PBS y tratadas con PBS-tripsina (2 minutos, 37°C), recolectadas, centrifugadas (500 g, 5 minutos), y resuspendidas en 400  $\mu$ l de Binding Buffer. A la suspensión de células se les agregó 100  $\mu$ l de JC-1 (3  $\mu$ M), diluido en Binding Buffer por un periodo de 20 minutos de preincubación y posteriormente se agregó una mezcla de 100  $\mu$ l de anexina-V y 7-ADD por 10 minutos a temperatura ambiente como se describe en Almeida et al. (2001). La adquisición de datos fue realizada en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson), equipado con un láser de argón de 15 mW fijado a 488 nm, y el software CELLQUEST (Becton Dickinson), como se describe en el trabajo dos en la sección de resultados.

#### ***Determinación de los niveles de glutatión.***

Los niveles celulares de GSH se determinaron enzimáticamente como se describe en Almeida y Bolaños (2001). El método se fundamenta en la determinación de un producto cromofórico, el ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), resultado de la reacción del 5-5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzoico (DTNB), con GSH. En esta reacción el GSH es oxidado a GSSG que es reconvertido a GSH en presencia de GSH reductasa (GRx) y NADPH (Tietze, 1996). La velocidad de formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico fue seguida a 405 nm en un lector de placas (SLT LABINSTRUMET) y calibrados con estándares de GSSG de concentraciones de 0 a 50  $\mu$ M. La concentración de glutatión total (GSx), se calculó a partir de las pendientes obtenidas en las muestras extrapolándolas a las obtenidas

en la curva patrón. La concentración de GSH se calculó por la diferencia: GSx menos 2 veces la concentración de GSSG ( $GSH = GSx - 2GSSG$ ) y se expresó en nmol de GSH/mg de proteína. Brevemente, después del ensayo farmacológico las neuronas se lavaron dos veces con PBS frío y se rasparon con 5 ml de ácido sulfosalicílico al 1%. Los lisados celulares fueron centrifugados a 13,000 g por 5 minutos a 4°C para remover las proteínas desnaturalizadas y los sobrenadantes fueron usados para las determinaciones de glutatión el mismo día. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos en las que 10 µl del sobrenadante se le añadió 90 µl de agua y 100 µl de la mezcla de reacción compuesta por EDTA (0.2 M), DTNB (0.3 mM), NADPH (0.4 mM) y glutatión reductasa (1 U/ml) en PBS (0.1 mM, pH 7.5). Se siguió el incremento de absorbancia a 405 nm de longitud de onda, durante 2.5 minutos a intervalos de 15 segundos.

#### ***Determinación de NADH y NADPH.***

La concentración de NADH y NADPH fue medida como se describe en García-Nogales et al. (2003). Básicamente el método consiste en oxidar NADPH a expensas de la reducción del FMN por la FMN reductasa, produciendo FMNH<sub>2</sub>, el cual reduce al aldehído mirístico en presencia de oxígeno y luciferasa, liberando luz (Wulff, 1985). La intensidad de la luz liberada es proporcional a la concentración de NADPH presente en la muestra. Los niveles de NADPH de la muestra se obtienen de los valores obtenidos en una curva patrón con concentraciones conocidas de NADPH. En principio, este método no distingue entre NADH y NADPH, por lo que de esta manera mide la suma de los dos nucleótidos. Por lo tanto, para que la medida sea exclusivamente de NADPH, antes de proceder a las reacciones anteriores, el NADH se oxida cuantitativamente en presencia de LDH y piruvato, que al pH al que se encuentran la muestra y la curva patrón (pH 7.8), no afectan



en absoluto al NADPH. Esto es utilizado para medir la concentración de NADH la cual se calcula utilizando un curva patrón que contenga una mezcla conocida de NADPH/NADH. Brevemente, después del periodo de incubación las células se lavaron con PBS frío, inmediatamente después se agregaron 250  $\mu$ l de una solución de KOH (0.5 M) en 50% de etanol (vol/vol), para una extracción estable de las formas oxidada y reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido. Alícuotas de 200  $\mu$ l del lisado celular fueron transferidos a tubos Eppendorf y neutralizadas a pH 7.8 con 200  $\mu$ l trietanolamina (0.5 M) y fosfato de potasio (0.5 M), y centrifugadas a 13,000 g por 2 minutos a 4°C. Una alícuota de 50  $\mu$ l del sobrenadante se usó inmediatamente para determinar la concentración NADPH más NADH por quimioluminiscencia. Para las determinaciones de NADPH, el NADH fue oxidado previamente por la incubación de las muestras con 0.5 mU/ $\mu$ l de lactato deshidrogenasa y 1 mM piruvato. Las concentraciones de NADH y NADPH fueron calculadas por la extrapolación de los valores de las muestras respecto a sus respectivas curvas estándar obtenidas con reactivos puros.

#### ***Determinación del consumo de oxígeno.***

El consumo de oxígeno fue determinado con un electrodo tipo Clark como se describe en Almeida et al., (1998). Brevemente, después del periodo de incubación con los fármacos las células fueron recolectadas por tripsinización y resuspendidas en 1 ml de de buffer Hanks. La suspensión celular se incubó en una cámara con agitación magnética a 37°C y la velocidad del consumo de oxígeno se midió. La concentración de oxígeno se calculó a partir de una solución saturada de oxígeno. Los valores obtenidos fueron expresados como nanomoles de O<sub>2</sub> /minuto/0.5 X 10<sup>6</sup> células.

### ***Detección de Especies Reactivas de Oxígeno.***

La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), en las neuronas granulares del cerebelo se determinó a través del marcador fluorescente, carboxi-diclorofluoresceína diacetato (Carboxi-DCFDA). Este marcador pasa a través de la membrana y posteriormente las esterasas intracelulares deacetilan el compuesto reteniéndolo en la célula. El marcador es fácilmente oxidado formando un compuesto fluorescente la carboxi-diclorofluorescina (carboxi-DCF) (Hempel et al., 1999). Para estos experimentos las células fueron sembradas sobre cubreobjetos en cajas de 12 pozos. Después del tratamiento farmacológico las células se incubaron con 20  $\mu\text{M}$  de Carboxi-DCFDA (30 min, 37°C), posteriormente se lavaron con PBS a 37°C y se fijaron con 3% formaldehído diluido en PBS por 8 minutos. Inmediatamente después las células fueron montadas sobre un cubreobjetos con Fluoromount-G (Electron Microscopy Science, Washington, PA, USA) diluido en agua (2:1). El porcentaje de ROS se calculó contando las células positivas a carboxi-DCF de 10 campos independientes por condición por duplicado a través de un microscopio de fluorescencia conectado a un sistema de análisis de imágenes (NIH-Image 1.6). En otra serie de experimentos, los cultivos de NGC fueron tratados con el marcador fluorescente hidroetidina para detectar la formación específica del anión superóxido (Bindokas et al., 1996). Para estos experimentos los cultivos fueron tratados con 3.2  $\mu\text{M}$  de hidroetidina (20 min, 37°C), después del periodo de incubación los cultivos procesados y cuantificados como se describe arriba.

### ***Determinación de proteínas.***

Las proteínas fueron determinadas de cultivos celulares previamente tratados con una solución de NaOH (0.1 M), por el método de Lowry et al. (1951), usando albúmina de suero bovina como estándar.

### ***Análisis estadístico***

El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de una vía seguido por una prueba de Fisher de comparación múltiple utilizando el programa Stat View 4.5.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Trabajo 2

García O, Massieu L. 2003. Glutamate uptake inhibitor *L-trans*-pyrrolidine 2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentrations of mitochondrial toxin 3-nitropropionate: Involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. **J. Neurosci. Res.** 74: 956-966.

Los resultados que se obtuvieron en el primer trabajo demostraron que:

1. La coexposición de PDC+3-NP reduce drásticamente los niveles de ATP en las neuronas desde las 0.5 horas de incubación y estas se mantienen reducidas hasta las 4 horas.
2. El PDC+3-NP produce una disminución gradual de la actividad redox mitocondrial.
3. El PDC y el 3-NP *per se*, no producen ningún efecto sobre los niveles de ATP y la actividad mitocondrial.
4. Después de 4 horas de exposición con PDC+3-NP se observa un 40% de muerte celular
5. La pérdida de los niveles de ATP, la actividad mitocondrial y la muerte celular fue revertida por la presencia de sustratos energéticos (piruvato y acetoacetato), el atrapador de radicales libres (PBN) y el antagonista glutamatérgico (MK-801).
6. El efecto del piruvato y acetoacetato se debe a su papel como sustratos energéticos, ya que la administración de 4-CIN, un inhibidor del transportador de dichos sustratos previene su efecto. Los sustratos energéticos pueden ser utilizados como métodos alternativos de neuroprotección.

# Glutamate Uptake Inhibitor L-Trans-Pyrrolidine 2,4-Dicarboxylate Becomes Neurotoxic in the Presence of Subthreshold Concentrations of Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionate: Involvement of Mitochondrial Reducing Activity and ATP Production

Octavio García and Lourdes Massieu\*

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

An increased concentration of extracellular glutamate is associated with neuronal damage induced by cerebral ischemia. We have demonstrated previously that exposure of cultured cerebellar granule neurons to L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC), a glutamate uptake inhibitor, increases extracellular glutamate levels but does not induce neuronal damage. Coincubation of PDC, however, with a subthreshold concentration of the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid (3-NP), results in severe damage to these neurons. We have investigated the time course of changes in mitochondrial reducing capacity and ATP levels in cerebellar granule cells after simultaneous exposure to 3-NP and PDC, and its relation to cell viability and nuclear condensation. Although individually, 3-NP and PDC treatments are not harmful to neurons, the simultaneous exposure to both compounds results in a progressive decline in mitochondrial reducing capacity during the first 4 hr, and a rapid decrease in ATP levels. At 4 hr, cells lose plasma membrane integrity and show condensed nuclei. In the presence of the energy substrates pyruvate and acetoacetate, the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, MK-801, and the spin trapper  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN), the decline in mitochondrial activity and ATP levels is prevented, the number of condensed nuclei is reduced, and plasma membrane integrity is preserved. In contrast, the broad-spectrum caspase inhibitor Z-Asp-DCB (Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB) prevents nuclear condensation but has no effect on mitochondrial reducing capacity or cell survival. Our results show that glutamate uptake impairment rapidly induces neuronal death during inhibition of succinate dehydrogenase by a mechanism involving mitochondrial dysfunction that, if not prevented, leads to cell death. © 2003 Wiley-Liss, Inc.

Brain requires a continuous supply of glucose and oxygen from blood to satisfy its energy demands. Interruption of blood flow during cerebral ischemia impairs energy levels and induces neuronal death (Lipton, 1999). A role of glutamate in ischemic neuronal damage has been suggested due to the increase in extracellular glutamate levels during an ischemic episode (Benveniste et al., 1984), and the prevention of ischemic damage by glutamate receptor antagonists (Simon et al., 1984). Increased extracellular glutamate leads to overstimulation of glutamate receptors and cell death through an excitotoxic mechanism involving intracellular accumulation of Ca<sup>2+</sup> and activation of calcium-dependent enzymes such as proteases, lipases, and nucleases (Bitrigau and Ikonomidou, 1997). Increased production of free radicals and failure of mitochondrial activity are also associated with excitotoxicity and ischemic neuronal damage (Lafón-Cazal et al., 1993; Schinder et al., 1996; Nicholls and Budd, 1998; Vergun et al., 1999; Chan, 2001). The mechanism responsible for glutamate release during ischemia has not been elucidated; however, in vitro studies suggest that during ATP depletion, glutamate efflux can occur through the reverse action of glutamate transporters (Madl and Bur-

Contract grant sponsor: DGAPA; Contract grant number: IN203400; Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant number: 40306-M.

\*Correspondence to: Dr. L. Massieu, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, 04510, México, D.F., México.  
E-mail: lmassieu@ifc.unam.mx

Received 24 April 2003; Revised 7 August 2003; Accepted 19 August 2003

**Key words:** cell death; energy substrates; mitochondrial activity

gesser, 1993; Longuemare et al., 1999; Rossi et al., 2000). In vivo evidence supports this hypothesis because glutamate release during ischemia can be inhibited by glutamate transport inhibitors (Seki et al., 1999). In addition, a recent in vivo study has shown glutamate uptake impairment during ischemia leading to its accumulation in the extracellular space (Bruhn et al., 2001). The contribution of other mechanisms to glutamate release during in vivo ischemia, such as swelling and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis has not been discarded (Seki et al., 1999; Dawson et al., 2000).

Accumulation of extracellular glutamate can be induced by pharmacologic uptake inhibition. L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC), is a substrate inhibitor of glutamate transport (Bridges et al., 1991), which favors the release of glutamate through carrier-mediated heteroexchange (Blitzblau et al., 1996; Volterra et al., 1996). We have demonstrated previously that intracerebral administration of PDC induces elevation of extracellular glutamate levels but no neuronal damage (Massieu et al., 1995). In animals treated systemically with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid (3-NP), however, PDC severely damages neurons when injected into either the hippocampus or the striatum (Sánchez-Carbente and Massieu, 1999; Massieu et al., 2001). Likewise, simultaneous exposure of cultured cerebellar granule cells to PDC and 3-NP at subtoxic concentrations induces a 50% reduction in cell survival 24 hr after treatment (García and Massieu, 2001). This experimental condition reproduces two factors involved in ischemia, carrier-mediated glutamate extrusion and inhibition of mitochondrial function. Therefore, the study of the factors involved in cell death during these conditions will give valuable information about mechanisms underlying ischemic cell death, and might offer alternatives for its prevention. In previous studies, we observed that the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist MK-801, the antioxidant vitamin E, the spin trapper  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN), and energy substrates such as creatine, acetoacetate, and pyruvate prevent neuronal damage induced by PDC in the striatum of 3-NP-treated rats, and in cerebellar granule neurons exposed to 3-NP and PDC (García and Massieu, 2001; Massieu et al., 2001). To extend these observations, we have studied the time course of changes in mitochondrial reducing capacity and ATP levels after simultaneous exposure of cerebellar granule neurons to 3-NP and PDC, and its relation to nuclear condensation and plasma membrane disruption. We used a subthreshold concentration of 3-NP, not inducing cell death per se. We also studied the effect of pyruvate, acetoacetate, MK-801, and PBN on the parameters mentioned above. Results show that a prompt decline in ATP levels is a fundamental event associated with neuronal death and that the protective effect of energy substrates, PBN, and MK-801 is associated with the preservation of ATP levels and mitochondrial reducing activity.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Fetal bovine serum (FBS), soybean trypsin inhibitor, and penicillin/streptomycin were purchased from Gibco (Grand Island, NY). PDC and MK-801 were obtained from Tocris (Bristol, UK). Live/Dead and luciferin-luciferase assay kits were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB was purchased from Peptide Institute Inc. (Osaka), and all other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO).

### Cell Culture

Primary cultures of cerebellar granule neurons were obtained from dissociated cerebella of 7–8-day-old Wistar rats as described previously (García and Massieu, 2001). Briefly, 10 cerebella were dissected and chopped, tissue was incubated with 0.25% trypsin solution for 10 min at 37°C, and dissociated by trituration in a DNase and soybean trypsin inhibitor-containing solution (0.08% and 0.52%, respectively). Cells were suspended in basal medium Eagle (BME) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin, and 25 mM KCl. Cells were plated at a density of  $300\text{--}350 \times 10^3/\text{cm}^2$  in Costar 24-well plates (Cambridge, MA) precoated with poly-L-lysine (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Cytosine arabinose (10  $\mu\text{M}$ ) was added within 24 hr of plating to prevent nonneuronal cell growth. Neurons were used after 9 days of culturing at 37°C in a humidified 5%  $\text{CO}_2/95\%$  air atmosphere. The medium was not changed until the day of the experiment. All animals were handled and cared for according to the guidelines published in the NIH guide for care and use of laboratory animals, with approval of the local animal care committee. All efforts were made to minimize animal suffering.

### Drug Exposure

At 9 days in vitro (DIV) cell cultures were exposed to the different treatments. Glutamate uptake inhibitor, PDC (500  $\mu\text{M}$ ), or the mitochondrial toxin, 3-NP (500  $\mu\text{M}$ ) were added either alone or in combination to 0.5 ml of conditioned medium. When tested, pyruvate (2 mM), acetoacetate (5 mM), PBN (500  $\mu\text{M}$ ) or MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ) were added simultaneously with 3-NP + PDC. Cells were incubated during 0.5, 2, and 4 hr, and at the end of the incubation period cell morphology was monitored under microscopic observation, and cells were prepared for determination of cell viability, mitochondrial reducing activity, ATP levels, and detection of condensed nuclei (see below).

In a series of experiments cells were exposed during 4 hr to the different treatments and left to recover during the following 20 hr. For these experiments 0.5 ml of the conditioned medium was removed before the experiment, and PDC and 3-NP either alone or in combination were added to the remaining 0.5 ml medium in presence or absence of pyruvate (2 mM), acetoacetate (5 mM), PBN (500  $\mu\text{M}$ ), or MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ). At the end of the incubation period, the drug-containing medium was substituted with the conditioned medium withdrawn previously, filter-sterilized, and maintained at 37°C. Energy substrates, PBN, and MK-801 were incubated further during the recovery period, and 20 hr later cells were prepared for ATP determination.

### Mitochondrial Reducing Activity

Mitochondrial reducing activity was assessed by the conversion of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan salts. The assay is based on the ability of living mitochondria to convert MTT into insoluble formazan by active dehydrogenases (Mosmann, 1983). A decrease in MTT production correlates well with the loss of mitochondrial membrane potential and the decrease in energy levels observed after exposure to glutamate (Ankarcona et al., 1995). The MTT assay is used also as an index of cell viability (Mosmann, 1983; Liu, et al., 1997). In brief, 0.5, 2, and 4 hr after the experiment, cell cultures were incubated with MTT (150  $\mu$ M) for 1 hr at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>-containing atmosphere. The medium was aspirated, and the precipitated formazan was solubilized with 0.8 ml of isopropanol and quantified spectrophotometrically at a wavelength of 570 nm. Mitochondrial activity was expressed as percentage MTT reduction relative to control values.

### Cell Viability

Cell morphology was evaluated 0.5, 2, and 4 hr after onset of drug exposure by direct examination of cultures under an inverted light microscope. Cell viability was determined at 4 hr by the fluorescent markers calcein-AM and ethidium homodimer for live and dead cells, respectively (live/dead kit, Molecular Probes), as described previously (García and Massieu, 2001). For these experiments, cells were grown on coverslips and the number of dead neurons expressed as percentage of red-fluorescent dead cells relative to the total (red- and green-fluorescent). Around 150 cells were counted per coverslip in five different fields selected randomly. In every experiment, two coverslips were included for each experimental condition and data represent the mean from 3–6 independent experiments.

### Detection of Condensed Nuclei by Hoechst Dye

Alterations in nuclear morphology such as chromatin condensation and nuclear fragmentation are used as markers of apoptotic cells. Hoechst 33258 (bis-benzimide, Sigma), is an A-T base pair-specific dye used to visualize nuclear morphology. For these experiments, cells were plated on coverslips and 4 hr after drug exposure were washed twice in D-PBS and labeled with 0.01% Hoechst 33258 in D-PBS for 10 min at room temperature in dim light. Cells were rinsed twice with D-PBS and fixed in 4% fresh paraformaldehyde at 4°C for 30 min, and cells were mounted immediately after on slides in 1:1 methanol:glycerol (v/v). Cells were observed and photographed under an epifluorescence microscope using an UV filter (330–380 nm wavelength) and a 100 $\times$  oil immersion objective. The number of condensed or fragmented nuclei was counted with the aid of an image analyzer (*NIH Image 1.6* for Macintosh). Cells showing large nuclei with light blue fluorescence were considered viable, whereas cells with condensed or fragmented nuclei with bright fluorescence were considered dead. The number of fragmented or condensed nuclei was quantified and expressed as percent of total nuclei. Five different fields per coverslip were counted in duplicate from 3–6 independent experiments. About 150 nuclei were counted per coverslip.

### Determination of ATP Levels

ATP level was determined 0.5, 2, and 4 hr after exposure to drugs using a commercially available luciferin-luciferase assay kit (Molecular Probes), according to methodology described previously and slightly modified (Marcaida et al., 1997). At the indicated time points, cells were washed twice with prewarmed Locke's solution without magnesium containing (in mM): 154 NaCl, 5.6 KCl, 3.6 NaHCO<sub>3</sub>, 2.3 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 5.6 glucose, pH 7.4, and lysed by 5 min incubation in somatic cell ATP-releasing reagent (Sigma) at room temperature. The lysate was resuspended with a micropipette, transferred to an Eppendorf tube, and vortexed. Lysate (15  $\mu$ l) was diluted in 85  $\mu$ l water and the 100- $\mu$ l aliquot was added to a polystyrene tube and placed in a Luminometer (Bio Orbit 1251). The luminometer injected a 400- $\mu$ l aliquot of luciferin-luciferase prepared according to the manufacturer's instruction and recorded the chemiluminescent signal in mV. For calculation of ATP levels, samples were compared to values obtained from standard solutions of known ATP concentrations. An aliquot of cell lysates was taken for protein determination by Bradford's method (Bradford, 1976). ATP levels were calculated as nmol ATP/mg protein.

### Statistical Analysis

All data were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's least significant difference multiple comparison test.

## RESULTS

### Alterations in ATP Levels and Mitochondrial Reducing Capacity Induced by Exposure to 3-NP + PDC

ATP levels were measured in cerebellar granule cell cultures 0.5, 2, and 4 hr after exposure to 3-NP (500  $\mu$ M) and PDC (500  $\mu$ M), either alone or in combination. As shown in Figure 1A, 3-NP and PDC treatment individually did not alter ATP levels during the different exposure times. In contrast, when cells were exposed simultaneously to 3-NP and PDC, ATP levels declined promptly to 45% of control levels 30 min after the exposure, and did not recover during the next 4 hr. In the presence of pyruvate or acetoacetate, the decline in ATP levels was prevented during the different times of 3-NP + PDC exposure (Fig. 1B). The effect of acetoacetate was more delayed and statistically significant only at 2 and 4 hr. The NMDA receptor antagonist MK-801 maintained ATP at levels significantly higher than those in intact cells at 4 hr (Fig. 1C), whereas in the presence of the free radical spin trapper PBN, ATP concentration remained close to control values (Fig. 1C).

Mitochondrial reducing capacity, as assessed by the MTT assay, declined progressively during exposure to 3-NP + PDC, reaching values close to 50% of control cultures at 4 hr (Fig. 2A). PDC or 3-NP alone did not alter significantly the mitochondrial reducing activity at any times studied (Fig. 2A). The presence of pyruvate and acetoacetate completely prevented the decline in mito-

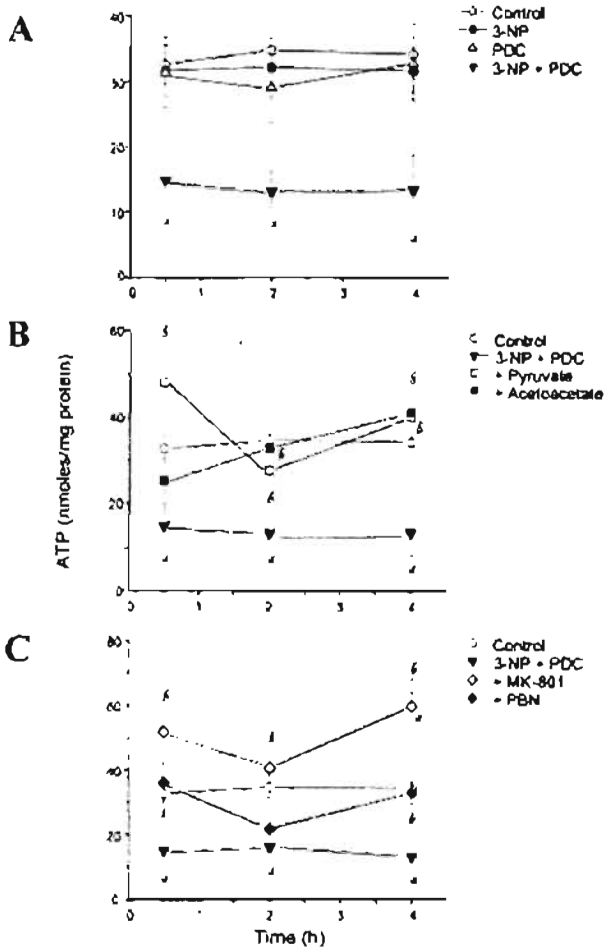


Fig. 1. Time course of the changes in ATP levels (as determined by the luciferin-luciferase assay) after different times of exposure of cerebellar granular neurons to 3-NP (500  $\mu$ M) or PDC (500  $\mu$ M) alone or in combination. A: Effect of 3-NP and PDC (500  $\mu$ M) individually and simultaneously on ATP levels. B: Effect of pyruvate (2 mM) and acetoacetate (5 mM) incubation during treatment with PDC + 3-NP. C: Effect of presence of MK-801 (10  $\mu$ M) or PBN (500  $\mu$ M) during treatment with PDC + 3-NP on ATP concentration. Data are means  $\pm$  SEM from 10 (control and 3-NP + PDC conditions) and 5–6 (3-NP, PDC, pyruvate, MK-801, and PBN conditions) independent experiments. All data were pooled and analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's least significant multiple comparison test. a,  $P < 0.05$  relative to control. b,  $P < 0.05$  relative to 3-NP + PDC.

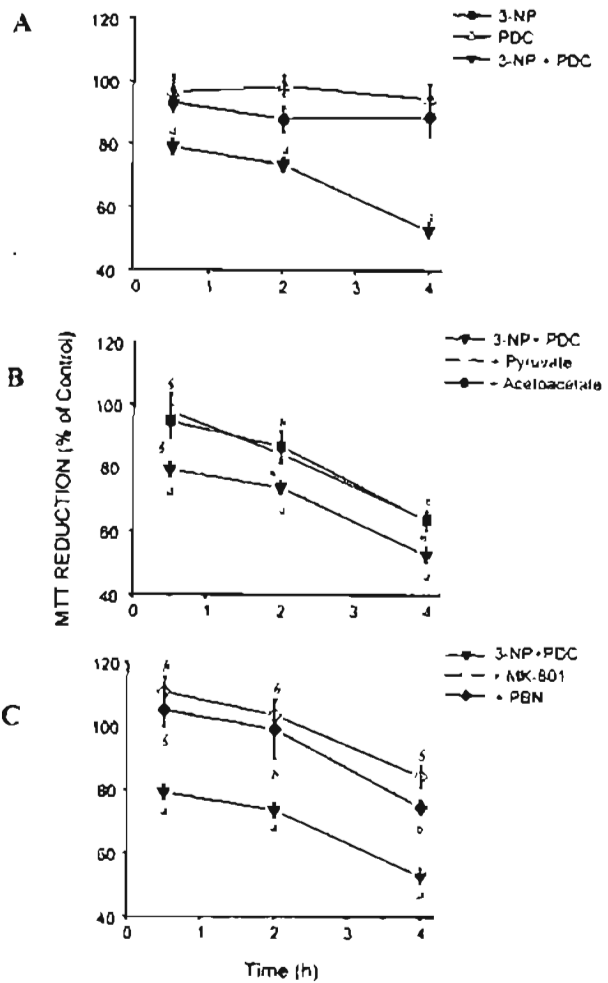


Fig. 2. Time course of change in mitochondrial reducing activity (as determined by the MTT assay) after different times of exposure to 3-NP (500  $\mu$ M) or PDC (500  $\mu$ M) alone or in combination. A: Effect of 3-NP and PDC (500  $\mu$ M) individually and simultaneously on MTT reduction. B: Effect of the presence of pyruvate (2 mM) and acetoacetate (5 mM) incubation during treatment with 3-NP + PDC. C: Effect of the presence of MK-801 (10  $\mu$ M) and PBN (500  $\mu$ M) during treatment with 3-NP + PDC. Data are means  $\pm$  SEM from 6–8 independent experiments and were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's least significant multiple comparison test. a,  $P < 0.05$  relative to control; b,  $P < 0.05$  relative to 3-NP + PDC.

chondrial reducing capacity 30 min after the exposure to 3-NP + PDC. These compounds delayed the loss of cell viability during longer exposure times. To confirm that the effect of pyruvate and acetoacetate was due to their role as energy substrates, we used an inhibitor of the monocarboxylic acid transporter,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-CIN, 0.5 mM) (Halestrap, 1975). The presence of 4-CIN during the exposure to 3-NP + PDC completely blocked the effect of pyruvate and acetoacetate on both

MTT reduction and ATP concentration at all times studied (Fig. 3 depicts data for the 4 hr time point). The presence of 4-CIN in control cultures did not alter mitochondrial reducing capacity or ATP concentration at any times studied (Fig. 3 depicts data for the 4 hr time point).

Cell cultures preserved the capacity to reduce MTT in the presence of MK-801 and PBN during the first 2 hr of exposure to 3-NP + PDC, and declined only slightly to 80% of control levels after 4 hr (Fig. 2C).

According to these results, 4-hr exposure to 3-NP + PDC substantially decreases mitochondrial reducing ca-



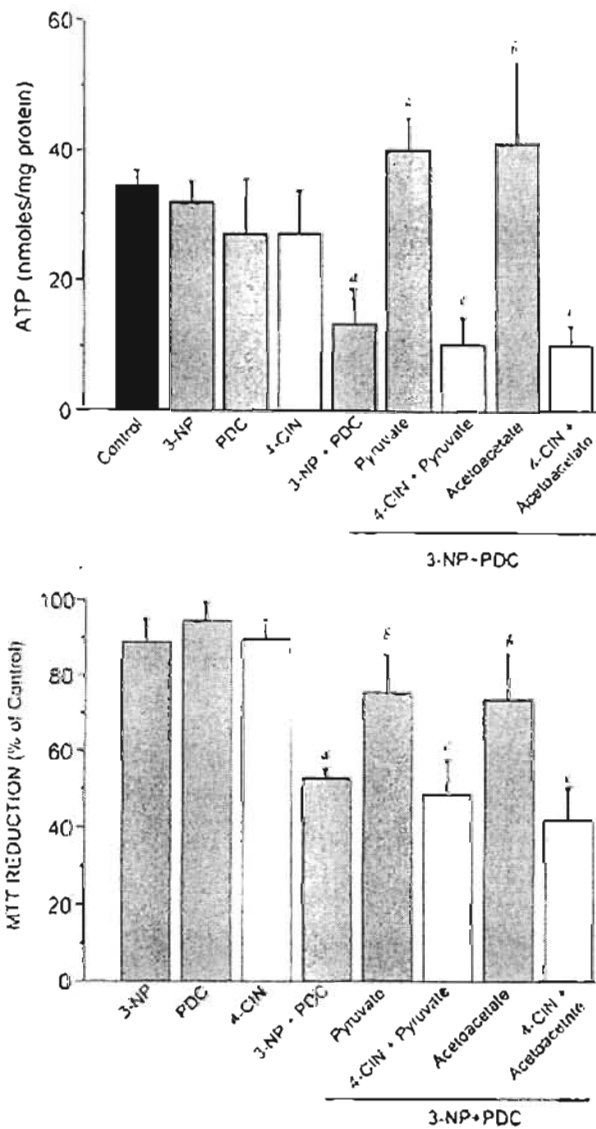


Fig. 3. Effect of 4-CIN on the preservation of ATP levels (A) and mitochondrial reducing capacity (B) induced by pyruvate and acetoacetate. All compounds were incubated for 4 hr and ATP levels and MTT reduction were evaluated immediately after. The effects of pyruvate (2 mM) and acetoacetate (5 mM) were abolished completely by 4-CIN (500  $\mu$ M). 4-CIN alone had no effect on ATP levels or mitochondrial reducing activity in control cultures. A: Data are means  $\pm$  SEM from 8–10 (controls and 3-NP + PDC conditions), 5–6 (3-NP, PDC, pyruvate, and acetoacetate conditions), and 4 (4-CIN treatment) independent experiments. B: Data are means  $\pm$  SEM from 6–8 (all experimental conditions) and 4 (4-CIN treatment) independent experiments. Data were pooled and analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's least significant multiple comparison test. a,  $P < 0.05$  relative to control; b,  $P < 0.05$  relative to 3-NP + PDC; c,  $P < 0.05$  relative to pyruvate or acetoacetate.

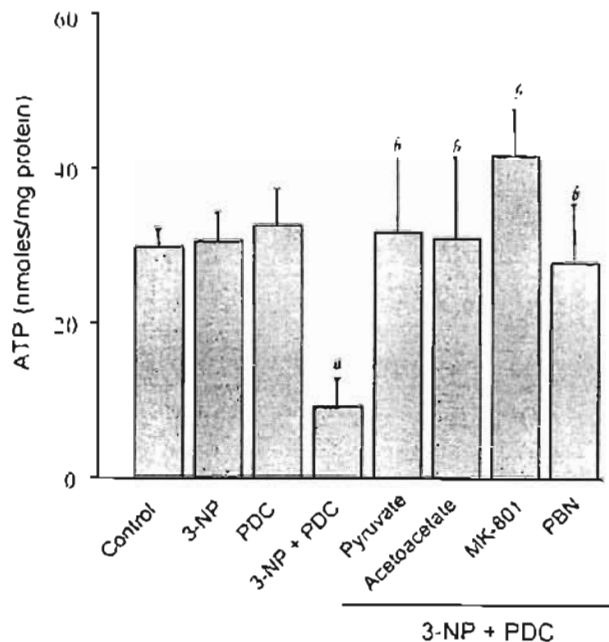


Fig. 4. Effect of a 20-hr recovery period on ATP concentration after 4-hr coincubation with 3-NP + PDC. Cells were exposed to 3-NP, PDC, or 3-NP + PDC for 4 hr, and immediately after medium was withdrawn and substituted by conditioned medium. Cultures were left to recover for 20 hr and ATP levels determined. No recovery of ATP levels was observed after 20 hr and ATP levels declined further (compare to data in Fig. 3). In the presence of pyruvate (2 mM), acetoacetate (5 mM), MK-801 (10  $\mu$ M), and PBN (500  $\mu$ M) in exposure and recovery periods, ATP levels remained close to control values. Data are means  $\pm$  SEM from 10 (control and 3-NP + PDC conditions) and 4–6 (all other conditions) independent experiments. Data were pooled and analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's least significant multiple comparison test. a,  $P < 0.05$  relative to control; b,  $P < 0.05$  relative to 3-NP + PDC.

capacity and ATP levels. To test if this effect was permanent or temporary, cells were exposed for 4 hr to 3-NP + PDC and left to recover during the next 20 hr, after which ATP levels were determined. As shown in Figure 4, ATP did not recover during the 20 hr after exposure to 3-NP + PDC, and even declined slightly further (to 31% of control values) relative to levels present at 4 hr (compare to Fig. 1A). ATP concentration was not altered during the 20-hr recovery period after incubation with 3-NP or PDC alone (Fig. 4). For these experiments, parallel culture wells were exposed to pyruvate, acetoacetate, MK-801, and PBN, during both the exposure time to PDC + 3-NP and the recovery period. As observed in Figure 4, ATP levels were maintained close to control values when incubated in the presence of pyruvate, acetoacetate, PBN, and MK-801 (Fig. 4). These data agree with those reported previously showing protection of these compounds against 3-NP + PDC-induced neuronal death during the same experimental conditions (García and Massieu, 2001).

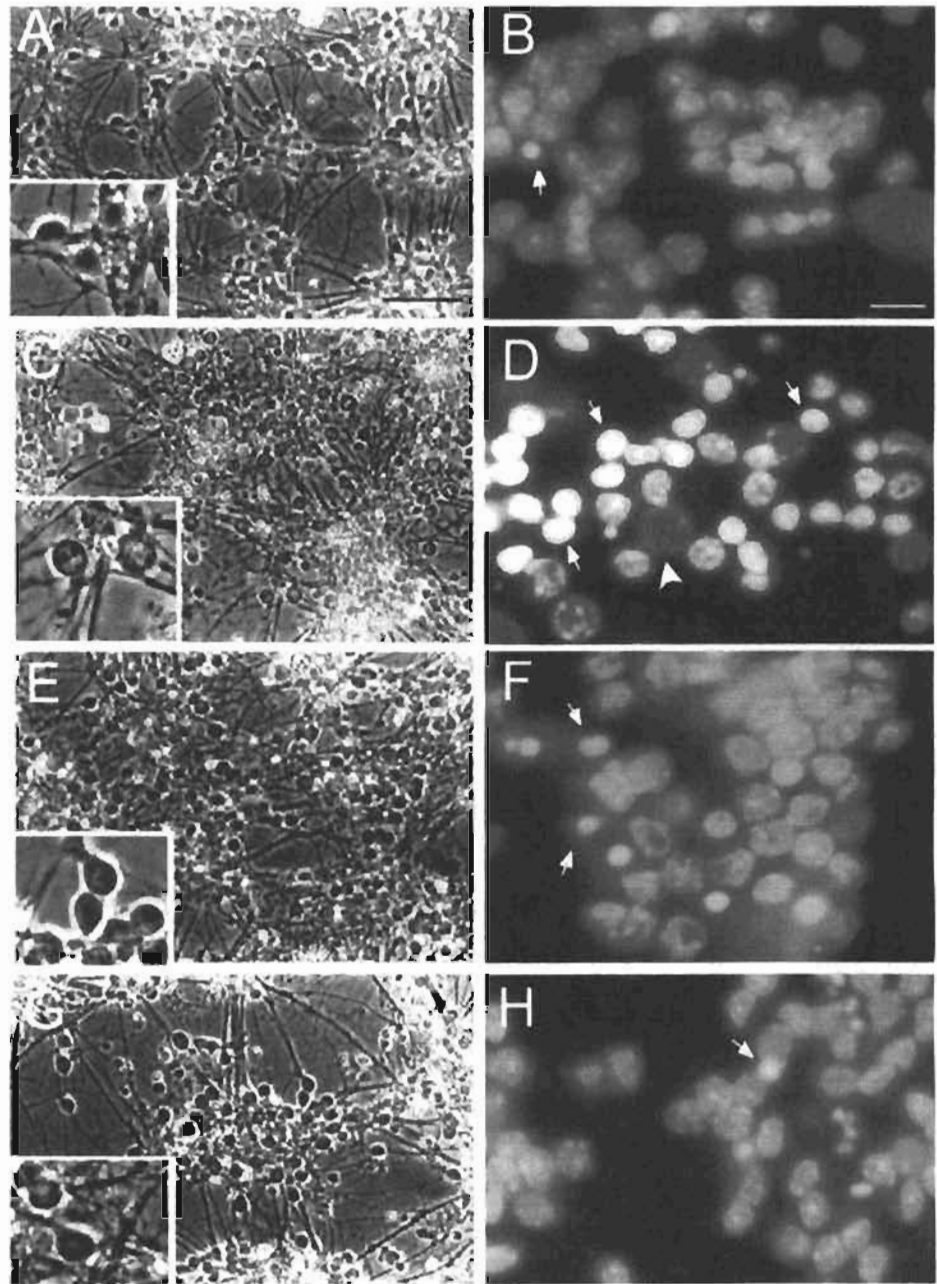


Fig. 5. Morphological alterations observed after exposure to 3-NP + PDC for 4 hr in the absence and presence of neuroprotective compounds. Phase-contrast photographs of cell cultures observed directly under an optic microscope (A,C,E,G). Hoechst-stained cell nuclei were observed by fluorescence microscopy (B,D,F,H). Control cultures are shown in (A) and (B). Cell swelling (inset in C) and increased number of condensed nuclei (arrows in D) were observed after incubation with 3-NP + PDC. Some non-condensed nuclei seemed swollen (arrowhead in D). In the presence of pyruvate (E,F) and MK-801 (G,H), cell cultures were better preserved and seemed similar to control cultures. Less nuclei were condensed and brightly fluorescent in the presence of pyruvate and MK-801. Micrographs are representative of 3-6 independent experiments.

### Nuclear Condensation Is Involved in Cell Death Induced by 3-NP + PDC

The experiments described above indicate that energy metabolism is compromised substantially after 4-hr exposure to 3-NP + PDC and does not recover unless energy substrates are present. To test cell viability after the 4-hr exposure to 3-NP + PDC, culture morphology was monitored by direct examination under an inverted light microscope, plasma membrane integrity was assessed using the fluorescent markers calcein-AM and ethidium ho-

modimer, and nuclear morphology was studied by Hoechst staining. As shown in Figure 5A, control cultures of cerebellar granule neurons observed under phase-contrast microscopy showed dark and oval somata and an intricate neurite network. As indicated by Hoechst staining, 12% of cells with condensed nuclei were present in control cultures (Figs. 5B, 6A). After 4 hr of 3-NP + PDC treatment, cells swelled and gained a round shape with clear cytoplasm (Fig. 5C, insert). According to Hoechst staining, 34.7% of cells contained condensed or frag-

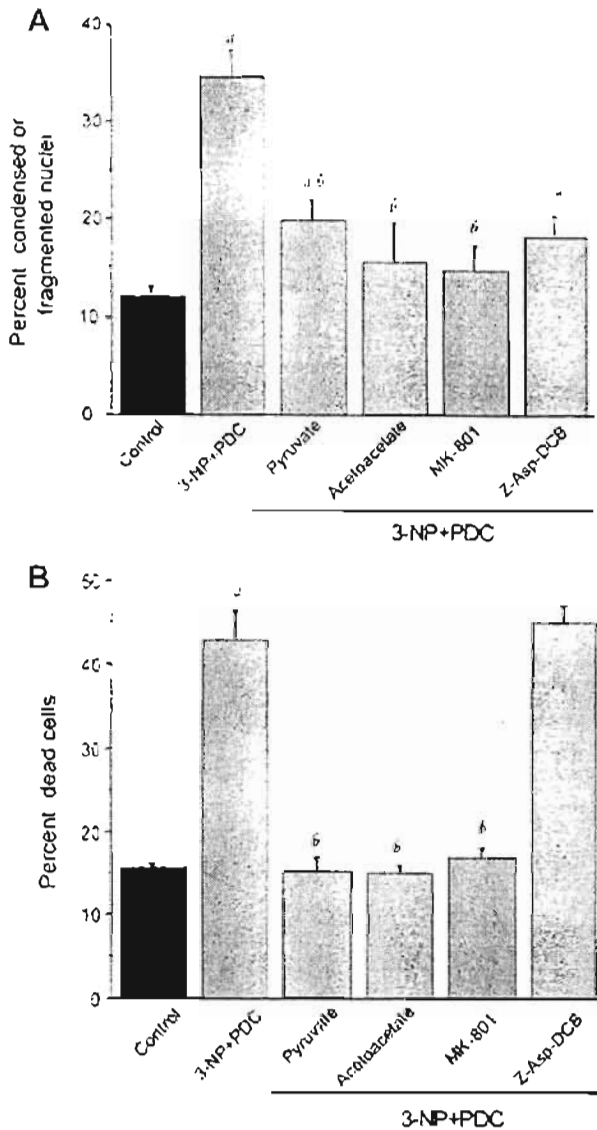


Fig. 6. Effect of pyruvate (2 mM), MK-801 (10  $\mu$ M), and the broad-spectrum caspase inhibitor Z-Asp-DCB (100  $\mu$ M) on nuclear condensation (evaluated as Hoechst staining) (A) and cell survival (B) (monitored by ethidium homodimer and calcein fluorescence for dead and live cells, respectively), after 4-hr exposure to 3-NP + PDC. Data are means  $\pm$  SEM from 6 (control, 3-NP + PDC, and Z-Asp-DCB conditions) and three (pyruvate, acetoacetate, and MK-801 conditions) independent experiments. Data were pooled and analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's least significant multiple comparison test. a,  $P < 0.05$  relative to control; b,  $P < 0.05$  relative to 3-NP + PDC.

mented nuclei after the treatment (arrows in Fig. 5D and 6A). Many non-condensed nuclei looked swollen (arrowhead in Fig. 5D). In the presence of pyruvate, acetoacetate, and MK-801, cell cultures were better preserved. Many cells seemed swollen but showed oval-shaped dark somata like those in control cultures (insets in Fig. 5E,G).

In addition, both energy substrates and MK-801 reduced the number of condensed nuclei (Figs. 5F,H, 6). Pyruvate protection was not complete and the number of cells with condensed nuclei was significantly higher than that in control cultures (Fig. 6A).

Similar results were obtained when cell viability was analyzed by calcein/ethidium homodimer fluorescent markers. Cell death was expressed as percentage of red-fluorescent cells relative to total cells (red and green-fluorescent). In this case, some of the red-fluorescent cells exhibited bright, condensed nuclei and some others showed large fluorescent nuclei. Both were counted as ethidium homodimer-positive cells. As indicated in Figure 6B, control cultures showed 15.7% nonviable cells. The presence of 3-NP or PDC individually did not increase significantly the percentage of dead cells observed in control cultures (3-NP,  $19.4 \pm 1.45\%$ ; PDC,  $19.2 \pm 0.24\%$ ;  $n = 3$ ). In contrast, coincubation with 3-NP + PDC increased to 42.8% the number of dead cells (Fig. 6B). This percentage is similar to that observed when cells are incubated for 4 hr and left to recover for the 20 hr (García and Massieu, 2001), suggesting that most cells sensitive to the treatment are already dead after the 4-hr exposure. Pyruvate, acetoacetate, and MK-801 completely prevented plasma membrane disruption (Fig. 6B). The broad-spectrum caspase inhibitor Z-Asp-DCB (100  $\mu$ M), prevented nuclear condensation but did not reduce the number of cells permeable to ethidium homodimer (Fig. 6), and did not prevent the loss in mitochondrial reducing activity (Fig. 7). This result suggests that nuclear condensation in the present experimental conditions is not a primary event in cell death and it is independent of mitochondrial reducing capacity and plasma membrane disruption.

According to the results described above, 4 hr incubation with 3-NP + PDC leads to mitochondrial dysfunction, decreases in ATP concentration, and cell death by a mechanism involving nuclear condensation.

## DISCUSSION

In previous studies, we and others have demonstrated that cerebellar granule neurons can tolerate well the increase in glutamate extracellular levels resulting from transient uptake inhibition by PDC (Cebers et al., 1999; García and Massieu, 2001). These cells become vulnerable to elevated extracellular glutamate, however, when energy metabolism is impaired by mitochondrial toxins (García and Massieu, 2001). Similar results have been reported in vivo using 3-NP or the glycolysis inhibitor iodoacetate (Sánchez-Carbente and Massieu, 1999; Massieu et al., 2000). Increased extracellular glutamate, impaired or reversed transport of excitatory amino acids, and inhibition of energy metabolism are events involved in ischemia-induced neuronal damage (Benveniste et al., 1984; Fiskum et al., 1999; Lipton, 1999; Rossi et al., 2000). In addition, impaired mitochondrial metabolism and excitotoxicity have been implicated in neurodegenerative disorders such as Huntington's and Alzheimer's diseases (Beal, 1992, 2000; Fiskum et al., 1999). Therefore, the simultaneous

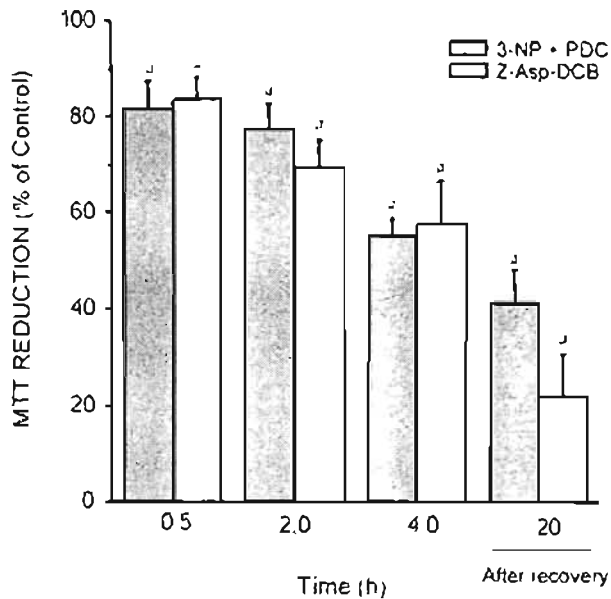


Fig. 7. Lack of effect of the broad-spectrum caspase inhibitor Z-Asp-DCB on MTT reduction activity after exposure of cell cultures to 3-NP + PDC for different times. Cultures were incubated simultaneously with Z-Asp-DCB (100  $\mu$ M) and 3-NP + PDC. The two bars on the right indicate MTT reduction activity of cell cultures after 20-hr recovery from a 4-hr period of exposure to 3-NP + PDC. The presence of Z-Asp-DCB during treatment and recovery did not improve mitochondrial reducing activity. Data are means  $\pm$  SEM from four independent experiments and were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's least significant multiple comparison test. a,  $P < 0.05$  relative to control.

inhibition of glutamate uptake and mitochondrial metabolism can be an experimental paradigm of great utility in the study of events involved in neuronal death associated with ischemia and neurodegenerative disorders.

PDC is a substrate inhibitor of excitatory amino acid transporters that causes glutamate release by heteroexchange (Blitzblau et al., 1996; Volterra et al., 1996). Accordingly, we have observed a twofold increase in extracellular glutamate and aspartate concentration after a 4-hr exposure of cerebellar granule neurons to 500  $\mu$ M PDC (García and Massieu, 2001). The present study shows that PDC or 3-NP treatment alone did not disturb cellular homeostasis or alter cell survival. Previous studies have shown that high concentrations and prolonged exposure to 3-NP induces neuronal death by a mechanism involving ATP depletion, NMDA receptor activation, and disruption of intracellular calcium homeostasis (Pang and Geddes, 1997; Lee et al., 2002a). In our experimental conditions, a subtoxic concentration of 3-NP was used, which by itself did not alter either mitochondrial reducing capacity or ATP synthesis. When cells are challenged by the presence of PDC, however, a progressive decline in mitochondrial reducing activity and a sudden decrease in ATP content was observed. Consequently, cell death oc-

curred after 4 hr if mitochondrial substrates were not supplied. Cell death in the present conditions might also involve disruption of intracellular calcium homeostasis after activation of NMDA receptors. According to this hypothesis, MK-801 completely prevented the decrease in ATP levels and the decline in mitochondrial reducing activity. It is possible that some disruption of calcium homeostasis occurred in the presence of 3-NP or PDC alone. Previous data show that 3-NP (although at millimolar concentrations) causes an increase in intracellular calcium concentration (Lee et al., 2000b). On the other hand, glutamate release through heteroexchange induced by PDC would activate NMDA receptors and cause calcium entry. In any case, if intracellular calcium concentration was altered in the presence of 3-NP or PDC alone at the concentrations tested, neuronal survival remained uncompromised. Coincubation of PDC and 3-NP, however, might alter intracellular calcium levels and mitochondrial activity to an extent that overcomes cell homeostasis and compromises their viability. According to this hypothesis, it has been reported recently that a low (10  $\mu$ M) glutamate concentration induces an increase in cytosolic and mitochondrial calcium that is exacerbated in the presence of 3-NP, leading to depolarization of the mitochondrial membrane and neuronal death (Nasr et al., 2003).

According to the present study, during the combined exposure to PDC and 3-NP, ATP levels declined to 45% of control values at 30 min, whereas MTT activity was inhibited partially (up to 79 and 73% of control activity) during the first 2 hr, and decreased to 50% of control values only after 4 hr, when a large population of cells (42%) had died. The lack of correlation between mitochondrial MTT reduction and ATP levels might be explained by an additional decrease in glycolytic ATP. Sodium and calcium influx would stimulate  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, contributing to glycolytic ATP consumption. It is known that during collapse of the mitochondrial proton gradient, ATP synthase can be activated reversibly and degrade ATP derived from glycolysis (Budd and Nicholls, 1996). Such a scenario would be plausible in our experimental conditions if the mitochondrial proton gradient collapsed in the presence of PDC + 3-NP. This possibility is under current investigation and according to preliminary observations, exposure to PDC + 3-NP induces a progressive depolarization of mitochondrial membrane (unpublished results). The lack of correlation between MTT reduction and ATP levels might be also due to extramitochondrial MTT reduction (Berridge and Tan, 1993; Bernas and Dobrucki, 2002).

According to the results, a 4-hr blockade of glutamate transport during inhibition of complex II of the electron transport chain lead to permanent mitochondrial damage and in turn to neuronal death. Even if cultures were left to recover for 20 hr after exposure to 3-NP + PDC, ATP levels were not regained but declined further. In a previous study, we observed protection of cerebellar granule neurons against damage induced by 3-NP +

PDC, by pyruvate and acetoacetate (García and Massieu, 2001). Results suggest that the protective effect of these compounds was related to their role as mitochondrial metabolic substrates, because both were able to support mitochondrial reducing capacity and ATP synthesis. In addition, protection was abolished completely when the monocarboxylate transporter was blocked by 4-CIN. Accordingly, pyruvate and acetoacetate effectively protected against plasma membrane disruption and nuclear condensation. Acetoacetate prevented only partially the initial decrease in ATP levels during the first 30 min of exposure to 3-NP + PDC but sustained ATP levels during the next 3.5 hr. This result suggests that a partial decline in ATP concentration does not lead to permanent neuronal damage, provided the decline is temporary and restored after a short time. These results favor the use of compounds that can sustain mitochondrial reducing activity and energy levels to prevent or delay ischemic cell death. Recent *in vivo* experiments have shown neuroprotection by pyruvate against cell death of hippocampal neurons during global ischemia (Lee et al., 2001). Similarly, treatment with the ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate reduces brain edema and the area of infarction after focal ischemia (Suzuki et al., 2001). We have also shown protection by pyruvate and acetoacetate against PDC- and  $\beta$ -amyloid-induced neuronal damage in rats treated chronically with the glycolysis inhibitor iodoacetate, or the mitochondrial toxin 3-NP (Massieu et al., 2000, 2001, Arias et al., 2002). The protective effect of acetoacetate *in vivo* might be related to the preservation of ATP levels (Massieu et al., 2003). In addition, several *in vitro* studies support the protective effect of pyruvate against cell death induced by excitotoxicity and glycolysis inhibition (Izumi et al., 1997; Ruiz et al., 1998; Maus et al., 1999).

The spin trapper PBN (Craig, 1997) has been shown to reduce striatal lesions induced by excitotoxins and mitochondrial poisons (Schulz et al., 1995). In the present study, incubation with PBN efficiently prevented the decline in MTT reduction and preserved ATP levels close to control values. This result suggests that oxidative stress might influence mitochondrial activity in our experimental conditions and thus contribute to its dysfunction. It has been shown that free radicals can induce mitochondrial membrane depolarization (Brorson et al., 1999) and inhibit the activity of different electron transport chain components (Bolaños et al., 1995), or enzymes involved in the tricarboxylic acid cycle, such as aconitase,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase (Tretter and Adam-Vizi, 2000). Increased production of free radicals after activation of NMDA receptors is well documented (Lafón-Cazal et al., 1993), and it has been shown that oxidative stress during glutamate-induced neuronal damage impairs activity of electron transport chain complexes (Bolaños, et al., 1995). In addition, inhibition of glutamate transport by PDC might decrease intracellular glutathione concentrations, favoring oxidative stress (Hirui et al., 2003). The role of oxidative stress in the present experimental conditions is being studied currently.

According to the present results, after 4-hr exposure to 3-NP + PDC 42% of the cells exhibited disruption of their plasma membrane as they were positive with the ethidium homodimer stain. Many of these cells, however, also showed condensed nuclei. Plasma membrane disruption has been associated with a necrotic type of cell death, whereas nuclear condensation and fragmentation has been considered a hallmark for apoptosis (Kerr and Harmon, 1991). It is possible that at the time studied (4 hr after drug exposure) cells that initiated an early apoptotic cascade were at a final stage of cell death and exhibited disruption of the plasma membrane. Alternatively, a mixed type of cell death showing common features to both necrosis and apoptosis might have occurred. In favor of the latter hypothesis, Bezvenyuk et al. (2003) reported recently that glutamate-induced neuronal death in cerebellar granule neurons shows chromatin condensation independent of caspase activation. These researches showed also that during early stages of cell death, most cells show condensed nuclei without disruption of plasma membranes, whereas at 24 hr, most cells exhibited condensed nuclei and plasma membrane disruption. In our experimental conditions, caspase activation occurred, because Z-Asp-DCB prevented nuclear condensation, but this might not be associated with cell death, as there was a lack of protection of Z-Asp-DCB.

The cell death phenotype associated with an ischemic process remains controversial. Some studies suggest an apoptotic mechanism (Rosebaum et al., 1994; Choi, 1996; Graham and Chen, 2001), whereas others favor the coexistence of necrotic and apoptotic processes (Martin et al., 1998). Both glutamate and 3-NP can induce necrotic and apoptotic cell death, depending on the intensity and duration of the challenge (Ankarcrona et al., 1995; Pang and Geddes, 1997; Cheung et al., 1998). Additionally, ATP plays a determinant role in the type of cell death induced by mitochondrial toxins, oxidative stress, and glutamate (Pang and Geddes, 1997; Leist et al., 1999; Almeida and Bolaños, 2001). In our experimental conditions, the decrease in ATP concentration is seemingly a fundamental factor leading to cell death, because preservation of ATP levels and cell survival are favored by the presence of energy substrates. To discriminate between the type or types of cell death involved under these circumstances, further morphologic and biochemical studies are required.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mrs. T. Montiel for technical assistance. This work was supported in part by CONACYT and DGEP-UNAM (fellowships to O.G.).

#### REFERENCES

- Almeida A, Bolaños JP. 2001. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem* 77:676–690.

- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15:961-973.
- Arias C, Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L. 2002.  $\beta$ -Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus *in vivo* and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 176:163-174.
- Beal MF. 1992. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J* 6:3338-3344.
- Beal MF. 2000. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23:298-304.
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43:1369-1374.
- Bernas T, Dobrucki J. 2002. Mitochondrial and non-mitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1 and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 47:236-242.
- Bernidge MV, Tan AS. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303:474-482.
- Bezvenyuk Z, Miettinen R, Solovyan V. 2003. Chromatin condensation during glutamate-induced excitotoxicity of cerebellar granule neurons precedes disintegration of nuclear DNA into high molecular weight DNA fragments. *Brain Res Mol Brain Res* 110:140-146.
- Bittinger P, Ikonomidou C. 1997. Glutamate in neurologic diseases. *J Child Neurol* 12:471-485.
- Blitzblau R, Gupta S, Djali S, Robinson MB, Rosenberg PA. 1996. The glutamate transport inhibitor *L-trans*-pyrrolidine-2, 4-dicarboxylate indirectly evokes NMDA receptor mediated neurotoxicity in rat cortical cultures. *Eur J Neurosci* 8:1840-1852.
- Bolaños JP, Heales SP, Land JM, Clark JB. 1995. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 64:1965-1972.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bridges RJ, Stanley MS, Anderson MW, Cotman CW, Chamberlin AR. 1991. Conformationally defined neurotransmitter analogs. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer. *J Med Chem* 34:717-725.
- Bronson JR, Schumacker PT, Zhang H. 1999. Nitric oxide acutely inhibits neuronal energy production. *J Neurosci* 19:147-158.
- Bruhn T, Christensen T, Diemer NH. 2001. *In vivo* cellular uptake of glutamate is impaired in the rat hippocampus during and after transient cerebral ischemia: a microdialysis extraction study. *J Neurosci Res* 66:1118-1126.
- Budd SL, Nicholls DG. 1996. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 67:2282-2291.
- Cebers G, Cebere A, Wagner A, Liljequist S. 1999. Prolonged inhibition of glutamate reuptake down-regulates NMDA receptor functions in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 72:2181-2190.
- Chan PH. 2001. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:2-14.
- Cheung NS, Pascoe CJ, Giardino SF, John CA, Beart PM. 1998. Micromolar *L*-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurons. *Neuropharmacology* 37:1419-1429.
- Choi DW. 1996. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:667-672.
- Craig ET. 1997. Nitron spin traps as protectants against oxidative damage. In: Bär PR, Beal MF, editors. *Neuroprotection in CNS diseases*. New York: Marcel Dekker, Inc. p 183-204.
- Dawson LA, Djali S, Gonzales C, Vinegra MA, Zaleska MM. 2000. Characterization of transient focal ischemia-induced increases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Bull* 53:767-776.
- Fiskum G, Murphy AN, Beal MF. 1999. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:351-369.
- García O, Massieu L. 2001. Strategies for neuroprotection against *L-trans*-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment *in vitro*. *J Neurosci Res* 64:418-428.
- Graham SH, Chen J. 2001. Programmed cell death in cerebellar ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:99-109.
- Halestrap AP. 1975. The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J* 148:85-96.
- Himi T, Ikeda M, Yasuhara T, Murota S. 2003. Oxidative neuronal death caused by glutamate uptake inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 71:679-688.
- Izumi Y, Benz AM, Katsuki H, Zorumski CF. 1997. Endogenous mono-carboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. *J Neurosci* 17:9448-9457.
- Kerr JFR, Harmon BV. 1991. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: Tomei LD, Cope FO, editors. *Apoptosis: the molecular basis of cell death*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 5-29.
- Lafón-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. 1993. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364:535-537.
- Lee JY, Kim YH, Koh JY. 2001. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci* 21:1-6.
- Lee WT, Yin HS, Shen YZ. 2002a. The mechanisms of neuronal death produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: the roles of *N*-methyl-D-aspartate glutamate receptors and mitochondrial calcium overload. *Neuroscience* 112:707-716.
- Lee WT, Itoh T, Pleasure D. 2002b. Acute and chronic alterations in calcium homeostasis in 3-nitropropionic acid-treated human NT2-N neurons. *Neuroscience* 113:699-708.
- Leist M, Single B, Nauman H, Fava E, Simon B, Kühnle S, Nicotera P. 1999. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res* 249:396-403.
- Lipton P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-1568.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69:581-593.
- Longuemare MC, Rose CR, Farrell K, Ransom BR, Waxman SG, Swanson RA. 1999.  $K^+$ -induced reversal of astrocyte glutamate uptake is limited by compensatory changes in intracellular  $Na^+$ . *Neuroscience* 93:285-292.
- Madi JE, Burgesser K. 1993. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 13:4429-4444.
- Marcaida G, Miñana MD, Grisolia S, Felipe V. 1997. Determination of intracellular ATP in primary cultures of neurons. *Brain Res Protoc* 1:75-78.
- Marin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46:281-309.
- Massieu L, Del Rijo P, Montiel T. 2001. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition *in vivo*: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience* 106:669-677.

- Massieu L, Gómez-Román N, Montiel T. 2000. In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp Neurol* 165:257–267.
- Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernández-Fonseca R. 2003. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120:365–378.
- Massieu L, Morales-Villagrán A, Tapia R. 1995. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 64:2262–2272.
- Maus M, Marin P, Israel M, Glowinski J, Prémont J. 1999. Pyruvate and lactate protect striatal neurons against *N*-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11:3215–3224.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63.
- Nasr P, Gursahani HI, Pang Z, Bondada V, Lee J, Hadley RW, Geddes JW. 2003. Influence of cytosolic and mitochondrial  $Ca^{2+}$ , ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem Int* 43:89–99.
- Nicholls DG, Budd SL. 1998. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochem Biophys Acta* 1366:97–112.
- Pang Z, Geddes JW. 1997. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J Neurosci* 17:3064–3073.
- Rosenbaum DM, Michaelson M, Batter DK, Doshi P, Kessler JA. 1994. Evidence for hypoxia-induced, programmed cell death of cultured neurons. *Ann Neurol* 36:864–870.
- Rossi DJ, Oshima T, Atwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316–321.
- Ruiz F, Alvarez G, Pereira R, Hernández M, Villalba M, Cruz F, Cerdán S, Bogónez E, Sarrástegui J. 1998. Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *NeuroReport* 9:1277–1282.
- Sánchez-Carbente MR, Massieu L. 1999. Transient inhibition of glutamate uptake in vivo induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J Neurochem* 72:129–138.
- Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 16:6125–6133.
- Schulz JB, Henshaw DR, Siwek D, Jenkins BG, Ferrante RJ, Cipolletti PB, Kowall NW, Rosen BR, Beal MF. 1995. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* 64:2239–2247.
- Seki Y, Feustel PJ, Keller RW Jr, Tranmer BI, Kumelberg HK. 1999. Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokainate and an anion channel blocker. *Stroke* 30:433–440.
- Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS. 1984. Blockade of *N*-methyl-D-aspartate receptor may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226:850–852.
- Suzuki M, Suzuki M, Sato K, Dohi S, Sato T, Matsuura A, Hiraide A. 2001. Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Jpn J Pharmacol* 87:143–150.
- Tretter L, Adam-Vizi V. 2000. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci* 20:8972–8979.
- Vergun O, Keelan J, Khodorov BI, Duchon MR. 1999. Glutamate-induced mitochondrial depolarization and perturbation of calcium homeostasis in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 519:451–466.
- Volterra A, Bezzi P, Rizzini BL, Trotti D, Ullensvang K, Danbolt NC, Racagni G. 1996. The competitive transport inhibitor *L*-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur J Neurosci* 8:2019–2028.

## 5.2. Trabajo 3

García O, Almeida A, Massieu L, Bolaños JP. 2005. Increased mitochondrial respiration maintains the mitochondrial membrane potential and promotes survival of cerebellar neurons in an endogenous model of glutamate receptor activation. *J. Neurochem.* 92: 183-190.

Los resultados obtenidos del segundo trabajo de investigación demostraron que:

- 1) El PDC produce una pequeña despolarización del potencial de membrana mitocondrial que se observa desde los 10 minutos de administración y que mantiene incluso después de 4 horas, mientras que el 3-NP produce una fuerte despolarización pero requiere de un tiempo 2 horas de incubación.
- 2) La despolarización del  $\Delta\psi_m$  inducida por el PDC esta asociada a la activación del receptor NMDA.
- 3) La despolarización inducida por el 3-NP se debe a la pérdida de los niveles de NADH
- 4) La administración del 3-NP+PDC induce la muerte celular desde los 30 minutos de incubación. Sin embargo, el 3-NP y el PDC por si solos no producen daño a las neuronas.
- 5) El PDC incrementa el consumo de oxígeno en neuronas granulares de cerebelo. Este efecto podría estar asociado al mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial parcialmente reducido, que se observa desde los 15 minutos hasta las 4 horas. Este efecto es revertido por el antagonista de los receptores a glutamato de tipo NMDA el MK-801.
- 6) El incremento en la respiración mitocondrial produce inevitablemente la formación de ERO y una disminución en los niveles de GSH. Este efecto es dependiente de la estimulación del receptor NMDA. A pesar de que las células se encuentran en estrés oxidativo, éstas no mueren a menos que tengan una alteración en la mitocondrial como la inducida por el 3-NP.



## Increased mitochondrial respiration maintains the mitochondrial membrane potential and promotes survival of cerebellar neurons in an endogenous model of glutamate receptor activation

Octavio García,\*† Angeles Almeida,† Lourdes Massieu‡ and Juan P. Bolaños\*<sup>1</sup>

\*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain

†Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

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

### Abstract

It is thought that the combination of extracellular glutamate accumulation and mitochondrial damage is involved in neuronal death associated with brain ischemia and hypoglycemia, and some neurodegenerative diseases such as Huntington's disease. However, the mechanism whereby those two factors interact together to trigger neurodegeneration in this and other neurodegenerative disorders is still elusive. Here, we have addressed this issue using a model of mild and sustained accumulation of extracellular glutamate in cerebellar cultured neurons, which are mostly glutamatergic and commonly used to study glutamate neurotoxicity. The resulting stimulation of glutamate receptors triggered a ~ 50% persistent increase in mitochondrial respiration that was associated with free radicals formation, and which was found to be necessary to prevent the collapse of the mitochondrial membrane potential

( $\Delta\psi_m$ ) and apoptotic cell death. In fact, hampering the glutamate-mediated increase in mitochondrial respiration with an inhibitor of the mitochondrial respiratory chain stopped neurons from producing free radicals, but led them to undergo rapid and profound  $\Delta\psi_m$  collapse and apoptotic cell death. Thus, we suggest that the formation of reactive oxygen species by glutamate receptor activation is the unavoidable consequence of an increase in the mitochondrial respiration aimed to prevent  $\Delta\psi_m$  collapse and neurodegeneration. These results may be relevant to understand the pathophysiology of those neurodegenerative diseases associated with both mitochondrial respiratory chain and glutamate transporter defects.

**Keywords:** free radicals, glutamate, glutathione, mitochondria, neurodegeneration, neuroprotection.

*J. Neurochem.* (2005) 92, 183–190.

Glutamate receptor over-stimulation following extracellular accumulation of the amino acid has been involved in the pathophysiology associated with brain ischemia, hypoglycemia, and certain neurodegenerative disorders, such as Huntington's disease (Bittigau and Ikonomidou 1997). It is well known that glutamate neurotoxicity is exacerbated by mitochondrial failure, and that even low concentrations not sufficient to induce neuronal death become neurotoxic in the presence of mitochondrial toxins. During the ischemic episode there is a prompt decline in energy levels and a large increase in the extracellular concentration of glutamate and aspartate (Benveniste *et al.* 1984). In addition, prolonged decreases in mitochondrial activity after brain ischemia have been described (Anderson and Sims 1999). Diminished activity of the different components of the mitochondrial electron transport chain has also been linked to Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases, suggesting that

mitochondrial damage is involved in the pathogenesis of these disorders. The regulation of the extracellular concentrations of glutamate depends on its removal by transporter proteins. As glutamate transporters are energy and sodium

Received July 5, 2004; revised manuscript received August 29, 2004; accepted September 7, 2004.

Address correspondence and reprint requests to Octavio García, MSc, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70–253, 04510 México D.F., México. E-mail: ogarcia@ifc.unam.mx

<sup>1</sup>The present address of Juan P. Bolaños is Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain.

**Abbreviations used:** 7-AAD, 7-amino-actinomycin D; DCF, dichlorofluorescein;  $\Delta\psi_m$ , mitochondrial membrane potential; JC-1, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide; L-NAME, L-N<sup>ω</sup>-nitroargininemethyl ester; 3-NP, 3-nitropropionic acid; PDC, L-trans-pyrrolydine 2,4-dicarboxylate; ROS, reactive oxygen species.

dependent carriers that can operate in the reverse direction during neuronal energy failure, mitochondrial damage would potentiate the excitotoxic neuronal death during extracellular glutamate accumulation (Benveniste *et al.* 1984; Rossi *et al.* 2000). In fact, *in vivo* administration of L-trans-pyrrolydine 2,4-dicarboxylate (PDC) – an inhibitor of glutamate uptake seen to increase extracellular concentration of glutamate in the striatum and the hippocampus – does not cause neuronal damage in rats (Massieu *et al.* 1995). Similar results have been found in cultured cerebellar granule neurons (Cebers *et al.* 1999; García and Massieu 2001). However, the administration of PDC to rats previously treated with subtoxic concentrations of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid (3-NP) or the glycolysis inhibitor, iodoacetate induces large lesions into those brain areas (Sánchez-Carbente and Massieu 1999; Massieu *et al.* 2000), in good agreement with previous *in vivo* and *in vitro* studies showing that metabolic inhibition potentiates glutamate neurotoxicity (Novelli *et al.* 1988; Greene and Greenamyre 1995). These results suggest that, whereas glutamate, at the concentration reached in the extracellular space during these conditions, or mitochondrial impairment *per se* are insufficient factors to cause neurodegeneration, the combination of both trigger neuronal death. However, the underlying mechanism responsible for such synergistic effect is yet unknown.

In order to address this issue, we have used a well-established model of glutamate receptor activation based on the inhibition of glutamate uptake, which leads to a mild and sustained increase in the extracellular concentration of glutamate (García and Massieu 2001). We have found evidence consistent with the notion that glutamate receptor activation triggers an enhancement in mitochondrial oxygen consumption focused to prevent the loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ), and the apoptotic neuronal death. We believe that these results may be of relevance to understand the mechanism of neurotoxicity in certain pathophysiological conditions, such as ischemia, hypoglycemia, or Huntington's disease, in which, in addition to mutated Huntingtin, decreased activity of complexes II, III and IV of the electron transport chain (Gu *et al.* 1996; Browne *et al.* 1997; Panov *et al.* 2002) and decreased glutamate transporter (Arzberger *et al.* 1997) has been described.

## Experimental procedures

### Culture of cerebellar neurons

Cerebellar granule neurons in primary culture were obtained from 7–8-day-old Wistar rats as described (García and Massieu 2001). Cells were seeded at  $1.5 \times 10^6$  cells/well in 6-wells Nunc (Roskilde, Denmark) plastic Petri dishes previously coated with poly D-lysine (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and incubated for 9 days *in vitro* in Basal Eagle's Medium, supplemented with 10% fetal bovine

serum, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), amphotericin B (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and KCl (25 mM). Glucose (5 mM) and cytosine arabinoside (10  $\mu\text{M}$ ) were added 24 h after plating to inhibit the proliferation of non-neuronal cells.

### Cell treatments

After 9 days *in vitro*, neurons were incubated in the presence of the glutamate uptake inhibitor PDC (500  $\mu\text{M}$ ) or the succinate dehydrogenase inhibitor 3-NP (500  $\mu\text{M}$ ), either alone or in combination, as previously described (García and Massieu 2003), for different time periods (5 min to 4 h). In some experiments, cells were incubated in the presence of MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ), superoxide dismutase (100 U/mL), catalase (100 U/mL) and *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine monomethyl ester (L-NAME, 1 mM), which were added 5 min prior to PDC addition.

### Flow-cytometric analyses of mitochondrial membrane potential and apoptotic death

$\Delta\psi_m$  and apoptotic death were determined in the same cellular suspension by flow cytometry, essentially as previously described (Almeida *et al.* 2001; García-Nogales *et al.* 2003). Briefly, cells were first smoothly scraped off the plates in order to minimize cellular disruption, and then they were incubated with 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, 3  $\mu\text{M}$ ), followed by incubation with APC-conjugated annexin-V and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) (Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Data acquisition was performed using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences), equipped with a 15 mW argon ion laser tuned at 488 nm, using the CellQuest software (Becton-Dickinson Biosciences). Photomultiplier settings were adjusted to detect JC-1 monomer fluorescence signals on the FL1 detector (green fluorescence, centered around 525 nm), and JC-1 aggregate fluorescence signals on the FL2 detector (red fluorescence, centered around 590 nm). Data analysis was performed using the Paint-A-Gate PRO software (Becton-Dickinson Biosciences). Mean fluorescence intensity values for FL1 and FL2, expressed as relative linear fluorescence channels (arbitrary units scaled from channel 0–10 000) were obtained for all experiments. The relative aggregate/monomer (red/green) fluorescence intensity values were used for  $\Delta\psi_m$  data presentation. Preliminary experiments focused to validate this protocol were performed using the mitochondrial permeability pore inhibitor, cyclosporin A (10  $\mu\text{M}$  for 15 min), which showed no effect on FL2/FL1 ratio ( $\sim 1.3$  a.u., not shown) when compared to untreated cells. Furthermore, the FL2/FL1 ratio values ( $\sim 0.2$  a.u., not shown) obtained after adding FCCP (5  $\mu\text{M}$ ) to the cell suspensions were similar to those obtained with antimycin A (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Annexin V-APC and 7-AAD signals were acquired on the FL4 and FL3 channels, respectively, to quantitatively determine the percentage of apoptotic cells. In all cases, the analyzer threshold was adjusted on the FSC channel to exclude most of the subcellular debris in order to reduce the background noise due to the cellular disruption during scrapping. To exclusively quantify cells showing the early apoptotic feature phosphatidylserine translocation, we determined those annexin V positive cells that were 7-AAD negative. As 7-AAD only binds DNA to those cells having a non-intact plasma membrane (due to both disruption during scrapping

and necrosis by the treatments), we considered to be apoptotic those cells that were annexin V<sup>+</sup>-7-AAD<sup>-</sup>.

#### GSH, NADPH and NADH determinations

GSH concentrations were measured by the enzymatic method described by Tietze (1996) with the modifications described by Dringen and Hamprecht (1996) (see also García-Nogales *et al.* 2003). NADH and NADPH concentrations were measured in the cells exactly as described by García-Nogales *et al.* (2003).

#### Determination of oxygen consumption

Oxygen consumption was determined with a Clark-type electrode (Rank Brothers, Cambridge, UK) in the intact, resuspended cells at 37°C in buffered Hanks' solution. The rates of oxygen consumption were calculated from the slopes (monitored for at least 15 min per trace), and expressed as nmol of oxygen consumed per minute per  $0.5 \times 10^6$  cells.

#### Measurement of reactive oxygen species

The formation of intracellular reactive oxygen species (ROS) was assessed using the dye carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA (20  $\mu$ M) (Hempel *et al.* 1999). Its desterification product, carboxy-dichlorofluorescein (carboxy-H<sub>2</sub>DCF), is cleaved by esterases and remains entrapped within the cells, hence being prone to ROS-mediated oxidation to fluorogenic carboxy-DCF (Hempel *et al.* 1999). To evaluate the formation of superoxide anion, we used hydroethidine, which is specifically oxidized by superoxide as previously reported (Bindokas *et al.* 1996). Thus, after the incubation periods, cells were washed and further incubated in the presence of hydroethidine (3.2  $\mu$ M) for 20 min at 37°C. After fixing and mounting the cells in coverslips, the number of fluorescent neurons was counted in 10 different fields per coverslip from three independent experiments with the aid an image analyzer (NIH Image 1.6 for Macintosh) and expressed as percentages.

#### Determination of complex I activity

For the determination of enzyme activity, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and collected, centrifuged and resuspended in 300  $\mu$ L of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). Cell suspensions (containing approximately 3–4 mg of protein/mL) were frozen and thawed three times to ensure cell lysis. Complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) activity was measured by determining the rotenone-sensitive NADH oxidation using ubiquinone-5 (coenzyme Q1, Sigma, St Louis, MO, USA) as the electron acceptor (Ragan *et al.* 1987) in a Hitachi U2000 spectrophotometer (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan). Enzyme activity is expressed as nanomoles per minute per milligram of protein.

#### Protein determinations

Protein concentrations were determined in cells solubilized with 0.1 M NaOH as Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as standard.

#### Statistical analysis

Data are expressed as means  $\pm$  SEM values. Statistical analysis was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Fisher's least significant difference multiple comparison test.

## Results

### L-*trans*-Pirrolidine 2,4-dicarboxylate and 3-nitropropionic acid depolarize mitochondrial membrane potential but do not induce neuronal death

In our previous study, we have shown that incubation of cerebellar neurons with PDC (500  $\mu$ M) increases extracellular glutamate concentrations to values ranging from 18 to 35  $\mu$ M (García and Massieu 2001) without inducing neuronal death at least up to 4 h of incubation (García and Massieu 2003). However, in the presence of subtoxic concentrations of the mitochondrial toxin 3-NP, PDC triggers cell death (García and Massieu 2001, 2003). Now, we have investigated the mechanisms involved, and we first focused on mitochondrial membrane potential. Here, we show that inhibition of glutamate uptake with PDC induced a rapid, but moderate (by  $\sim$  30%) decrease of  $\Delta\psi_m$  that was sustained for, at least, the following 4 h of incubation (Fig. 1a). Such a PDC-dependent loss of  $\Delta\psi_m$  was NMDA receptor-mediated, as it was fully prevented by MK-801 (JC-1 fluorescence values,  $1.21 \pm 0.11$ ,  $0.80 \pm 0.09$ ,  $1.11 \pm 0.10$ , arbitrary units, for

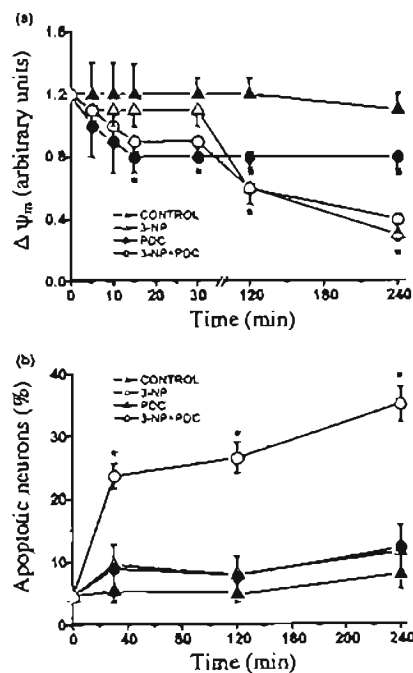
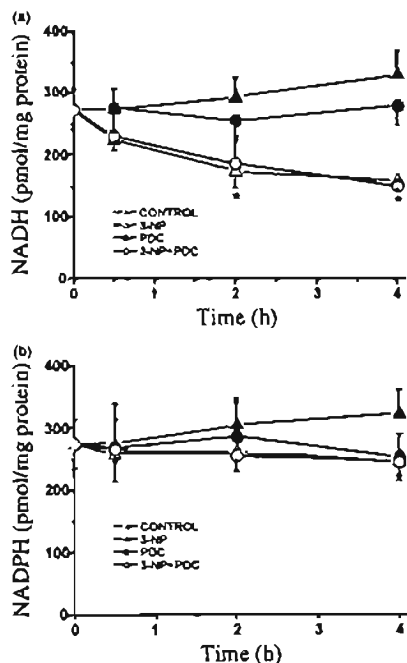


Fig. 1 Time course changes in (a) mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) and (b) apoptotic death as measured in cerebellar neurons after inhibition of glutamate uptake (PDC, 500  $\mu$ M), inhibition of succinate dehydrogenase (3-NP, 500  $\mu$ M) or a combination of both.  $\Delta\psi_m$  and apoptosis (annexin V<sup>+</sup>-7-AAD<sup>-</sup> cells) were measured by flow cytometry as described in Experimental Procedures. Results are mean  $\pm$  SEM values from four to six independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. control. 3-NP, 3-nitropropionic acid; PDC, L-*trans*-pirrolidine 2,4-dicarboxylate.

control, PDC and PDC + MK-801, respectively). On the other hand, the inhibition of succinate dehydrogenase activity with 3-NP (500  $\mu\text{M}$ ) did not alter  $\Delta\psi_m$  during the first 30 min of exposure, but induced a large depolarization after 2 h that declined further at 4 h (Fig. 1a). Co-incubation of PDC with 3-NP did not result in additional decay of  $\Delta\psi_m$  as compared with 3-NP alone (Fig. 1a), but enhanced apoptotic cell death from as soon as 30 min (Fig. 1b). In contrast, PDC or 3-NP treatments, alone, did not increase the percentage of apoptotic cells, at least up to 4 h of incubation (Fig. 1b).

#### Mitochondrial membrane depolarization induced by 3-nitropropionic acid is dependent on NADH concentrations.

As shown in Fig. 1(a), treatment with 3-NP led neuronal  $\Delta\psi_m$  to collapse after 2 h. In view that 3-NP inhibits both succinate dehydrogenase and complex II of the mitochondrial respiratory chain, we next investigated whether 3-NP-induced mitochondrial depolarization was associated with the loss of reducing equivalents (NADH and NADPH), which are involved in the maintenance of  $\Delta\psi_m$ . As shown in Fig. 2(a), NADH concentrations diminished



**Fig. 2** Time course changes in (a) NADH and (b) NADPH, as measured in cerebellar neurons after inhibition of glutamate uptake (PDC, 500  $\mu\text{M}$ ), inhibition of succinate dehydrogenase (3-NP, 500  $\mu\text{M}$ ) or a combination of both. NADH and NADPH concentrations were measured by chemiluminescence, as described in Experimental Procedures. Results are mean  $\pm$  SEM values from four to six independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. control. 3-NP, 3-nitropropionic acid; PDC, *L-trans*-pirrolydine 2,4-dicarboxylate.

significantly 2 and 4 h after 3-NP exposure, well correlating with the observed depolarization of the mitochondrial membrane (Fig. 1a). In contrast, exposure of neurons to PDC did not alter NADH concentrations at any of the time periods studied (Fig. 2a), and the co-incubation of 3-NP with PDC had no additive effect on NADH concentrations when compared to those induced by 3-NP alone. NADPH concentrations were not altered by any of these treatments (Fig. 2b).

#### Inhibition of glutamate uptake by *L-trans*-pirrolydine 2,4-dicarboxylate increases oxygen consumption in cerebellar granule neurons

As shown in Fig. 1(a), PDC produced a brief and rapid  $\Delta\psi_m$  decrease that was sustained for the following 4 h. In order to elucidate whether any further  $\Delta\psi_m$  collapse could have been prevented through the stimulation of the respiratory chain, the rate of oxygen consumption was monitored after 2 h of PDC exposure. Control neurons consumed oxygen at a rate of 0.31 nmol  $\text{O}_2$  per min per  $0.5 \times 10^6$  cells (Table 1). However, incubation of cells with PDC triggered an increase in the rate of oxygen consumption by 1.4-fold, whereas 3-NP had no effect (Table 1). To elucidate whether PDC-induced increase in oxygen consumption was associated to the activation of NMDA receptors, a group of cells were also incubated in the presence of the NMDA receptor antagonist, MK-801. As shown in Table 1, MK-801 prevented the increase in oxygen consumption induced by PDC. To ascertain whether such an increase in oxygen consumption was due to mitochondrial function, 3-NP was added to PDC-treated respiring cells, and we observed a 95% blockade of oxygen consumption (not shown). In addition, we have previously reported that another mitochondrial toxin, sodium azide, potentiates PDC-mediated cellular death in a similar experimental paradigm (García and Massieu 2001). In view that an increase in oxidative stress up-regulates complex I activity, at least in glial cells (Vásquez *et al.* 2001), we sought to determine whether such a putative increase would

**Table 1** Inhibition of glutamate uptake with *L-trans*-pirrolydine 2,4-dicarboxylate (PDC) increases the rate of oxygen consumption in cerebellar neurons

	Rate of oxygen consumption (nmol $\text{O}_2$ /min/ $0.5 \times 10^6$ cells)
Control	0.31 $\pm$ 0.01
3-NP	0.29 $\pm$ 0.02
PDC	0.44 $\pm$ 0.04*
PDC + MK-801	0.21 $\pm$ 0.07†

Oxygen consumption was determined after 2 h exposure of neurons to PDC (500  $\mu\text{M}$ ) or 3-nitropropionic acid (3-NP; 500  $\mu\text{M}$ ). MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ) was incubated with PDC. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. control values; † $p < 0.05$  vs. PDC.

account for the observed increased respiration rate. However, treatment of cells with PDC (500  $\mu\text{M}$ , 2 h) resulted in no change in the activity of complex I (control,  $4.4 \pm 0.1$ ; PDC,  $4.2 \pm 0.7$  nmol/min/mg of protein;  $n = 3$ ).

#### Inhibition of glutamate uptake with *L-trans*-pyrrolydine 2,4-dicarboxylate induces reactive oxygen species production and decreases GSH concentrations

As an increase in the rate of oxygen consumption would enhance oxidative metabolism, we sought to investigate whether PDC treatment led to an increase in ROS production. Approximately 22% of control neurons showed carboxy-DCF fluorescence, indicating basal ROS production (Fig. 3a). However, the presence of PDC significantly increased the number of fluorescent cells as from 30 min of treatment, and remained elevated after 2 and 4 h (Fig. 3a). This effect was inhibited by catalase (100 U/mL) and by MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 3b). In contrast, 3-NP alone did not increase the number of fluorescent cells at any of the times investigated (Fig. 3a). Furthermore, the exposure of neurons to PDC plus 3-NP did not increase the number of fluorescent cells when compared

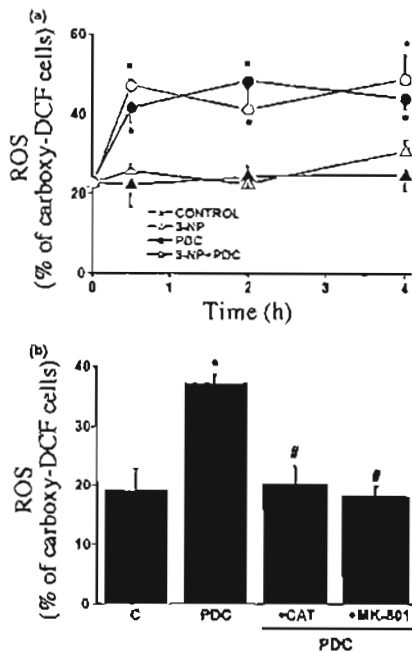


Fig. 3 Inhibition of glutamate uptake by PDC induces ROS production in cultured cerebellar granule cells. (a) ROS production were determined after exposure of cells to PDC (500  $\mu\text{M}$ ) or 3-NP (500  $\mu\text{M}$ ), either alone or in combination. (b) ROS production were also measured at 2 h after PDC (500  $\mu\text{M}$ ) treatment, either in the absence or in the presence of catalase (100 U/mL) or MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ). ROS production was assessed by determination of oxidation products of carboxy-DCF. Data are mean  $\pm$  SEM values from three (carboxy-DCF) independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. control; # $p < 0.05$  vs. PDC. CAT, catalase; DCF, dichlorofluorescein; 3-NP, 3-nitropropionic acid; PDC, *L-trans*-pyrrolydine 2,4-dicarboxylate; ROS, reactive oxygen species.

Table 2 Effect of *L-trans*-pyrrolydine 2,4-dicarboxylate (PDC) and 3-nitropropionic acid (3-NP) on superoxide anion production by cerebellar neurons, as assessed by hydroethidine fluorescence

	Hydroethidine fluorescence (% of positive cells per field)
Control	$2.3 \pm 0.9$
PDC	$5.2 \pm 1.2$
3-NP	$5.6 \pm 0.3$
PDC + 3-NP	$10.3 \pm 1.5^*$

Cells were treated with PDC (500  $\mu\text{M}$ ), 3-NP (500  $\mu\text{M}$ ) or a combination of both for 2 h, washed and further incubated in the presence of hydroethidine. After washing and fixing, cells were mounted and analyzed by fluorescence microscopy. Each value represent the mean  $\pm$  SEM values from four to six different cell culture preparations. \* $p < 0.05$  vs. control values.

with PDC alone (Fig. 3a). In order to ascertain whether superoxide anion was a major ROS component under our conditions, we next used hydroethidine, i.e. a fluorescent probe previously shown to specifically detect superoxide anion in cultured neurons (Bindokas *et al.* 1996). As shown in Table 2, 2 h after treatment, neither PDC nor 3-NP alone were sufficient to generate detectable superoxide, whereas the combination of PDC with 3-NP significantly increased the number of fluorescent cells. To investigate whether ROS production was associated with impairment of GSH status, GSH concentrations were determined in the same experimental conditions. As shown in Fig. 4(a), PDC treatment progressively decreased GSH concentrations, reaching the statistical significance after 2 and 4 h of exposure. In contrast, 3-NP treatment, alone, did not alter GSH concentrations (Fig. 4a). When 3-NP was combined with PDC, GSH was not further decreased when compared with PDC treatment alone (Fig. 4a). The decrease in GSH concentrations observed 2 h after PDC treatment was not prevented by superoxide dismutase (100 U/mL) or L-NAME (1 mM) (results not shown). However, it was partially prevented by catalase (100 U/mL) and MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 4b).

## Discussion

Glutamate uptake inhibition with PDC induced a rapid and modest  $\Delta\psi_m$  fall that was sustained further, whereas the inhibition of mitochondrial respiratory chain with 3-NP largely depolarized mitochondria in a delayed (2 h) manner. In contrast to 3-NP, PDC-mediated loss of  $\Delta\psi_m$  was not related to the loss of reducing equivalents and therefore to the impairment of mitochondrial electron flow, but rather to calcium influx into the mitochondria after activation of NMDA receptors. This result is in good agreement with the well-known role of calcium influx to the mitochondria in the  $\Delta\psi_m$  loss and excitotoxicity (Schinder *et al.* 1996; White and Reynolds 1996; Peng and Greenamyre 1998; Fiskum *et al.*

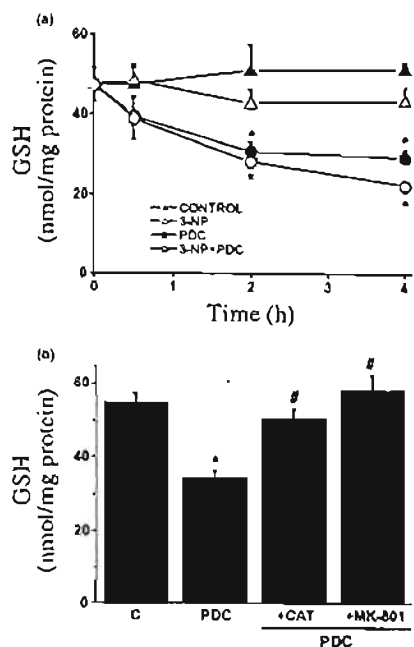


Fig. 4 Inhibition of glutamate uptake by PDC depletes GSH in cultured cerebellar granule cells. (a) GSH concentrations were determined after exposure of cells to PDC (500  $\mu$ M) or 3-NP (500  $\mu$ M), either alone or in combination. (b) GSH concentrations were also measured at 2 h after PDC (500  $\mu$ M) treatment, either in the absence or in the presence of catalase (100 U/mL) or MK-801 (10  $\mu$ M). GSH concentrations were determined enzymatically as described in Materials and Methods. Data are mean  $\pm$  SEM values from six (GSH) independent experiments. \* $p$  < 0.05 vs. control; # $p$  < 0.05 vs. PDC. CAT, catalase; 3-NP, 3-nitropropionic acid; PDC, *L-trans*-pyrrolydine 2,4-dicarboxylate.

1999; Duchen 2000; Nicholls *et al.* 2003). However, none of these treatments affected cell survival, at least during the 4 h investigated. Interestingly, apoptotic cell death was triggered only when both PDC and 3-NP were simultaneously present, despite no further decline in  $\Delta\psi_m$  was observed when compared to 3-NP treatment alone. Such a  $\Delta\psi_m$  loss would hence be associated with the widely held notion that excitotoxicity occurs through mitochondrial dysfunction leading to ATP depletion (Ankarcona *et al.* 1995; Pang and Geddes 1997; Almeida and Bolaños 2001; Garcia and Massieu 2003).

Interestingly, the dual inhibition of succinate dehydrogenase and complex II of the mitochondrial respiratory chain occurring in the cerebellar neurons exposed to 3-NP (Garcia and Massieu 2001) was insufficient to trigger immediate  $\Delta\psi_m$  loss. Such  $\Delta\psi_m$  loss occurred only after 2 h of 3-NP treatment, and was well correlated with NADH, but not NADPH depletion, strongly suggesting that, during this time,  $\Delta\psi_m$  would be maintained at the expense of complex I-mediated NADH oxidation. Only when endogenous NADH content is exhausted, due to the inhibition of succinate

dehydrogenase activity, the subsequent complex I dysfunction will fail to properly maintain  $\Delta\psi_m$ . In any case,  $\Delta\psi_m$  loss induced under this condition does not appear to compromise neuronal survival, suggesting that mitochondrial depolarization, *per se*, would be insufficient to cause neuronal death.

Non-toxic glutamate receptor activation during PDC exposure partially decreased but did not disrupt completely  $\Delta\psi_m$ . To understand the mechanism whereby  $\Delta\psi_m$  was not collapsed and cells survived to such mild glutamate receptor activation, we next investigated the rate of mitochondrial oxygen consumption. Cells responded to PDC treatment by increasing the rate of mitochondrial oxygen consumption. Such an increase in oxygen consumption would be associated with  $\Delta\psi_m$  maintenance, because  $\Delta\psi_m$  in PDC-treated cells was lost only when mitochondrial respiratory chain was inhibited. Furthermore, the stimulation of mitochondrial respiration was accompanied by enhanced ROS production and GSH depletion, in good agreement with previous studies reporting that superoxide anion would be formed during glutamate excitotoxicity (Lafón-Caza *et al.* 1993; Dugan *et al.* 1995). However, no detectable superoxide was observed after 2 h with PDC alone, whereas it did increase ROS production, suggesting that superoxide may be rapidly transformed into hydrogen peroxide. In fact, catalase, but not superoxide dismutase, prevented PDC-mediated dichlorofluorescein fluorescence and GSH depletion. Moreover, the decrease in GSH might be associated with the recently described impaired GSH biosynthesis – a consequence of the lack of the GSH precursor, glutamate – in a similar model of excitotoxicity (Chen and Swanson 2003; Himi *et al.* 2003; Ré *et al.* 2003). However, this is not the case under our circumstances, because both GSH depletion and ROS production induced by PDC were prevented by MK-801. These results strongly suggest that ROS production and GSH depletion are the consequence of NMDA receptors activation by the glutamate accumulated in the extracellular medium.

In conclusion, our results suggest that the accumulation of endogenous extracellular glutamate after inhibition of its transporters induces a partial  $\Delta\psi_m$  loss that is compensated by the stimulation of mitochondrial respiratory chain activity, which leads to ROS production and GSH deficiency in a manner dependent on NMDA receptor activation. Such a compensative mechanism appears to support neuronal survival, unless there is concomitant mitochondrial respiratory chain deficiency hampering such a neuroprotective strategy. Prolonged inhibition of mitochondrial respiratory chain activity has been observed after cerebral ischemia (Anderson and Sims 1999) and in postmortem brain tissue samples obtained from Huntington's disease subjects (Gu *et al.* 1996; Browne *et al.* 1997). Moreover, the excitotoxicity associated with these pathologies has been suggested to be a consequence of decreased glutamate transport (Arzberger *et al.* 1997; Mitani and Tanaka 2003). These observations suggest that in addition to the expansion of the CAG codon in

Huntingtin protein associated with Huntington's disease patients, an excitotoxic mechanism, probably precipitated by a progressive decline in mitochondrial function, might be involved in the pathogenesis of this disease (Zeron *et al.* 2001; Panov *et al.* 2002). Thus, our results may contribute to understanding the mechanisms involved in neuronal death associated with cerebral ischemia and certain neurodegenerative disorders, such as Huntington's disease.

## Acknowledgements

This work was supported by M.C.Y.T. (SAF2001-1961/SAF2004-2038) and J.C. y L. (SA081/04) to JPB; FIS (03/1055) and J.C. y L. (SA020/02) to AA; IN203400 and IN222503 PAPIIT, UNAM to LM; and DGEP-UNAM and CONACYT 163330 fellowships to OG. We are grateful to Dr M. Delgado-Esteban and T. Montiel for excellent technical assistance.

## References

- Almeida A. and Bolaños J. P. (2001) A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J. Neurochem.* 77, 676–690.
- Almeida A., Almeida J., Bolaños J. P. and Moncada S. (2001) Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide, the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 15 294–15 299.
- Anderson M. F. and Siras N. R. (1999) Mitochondrial respiratory function and cell death in focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 73, 1189–1199.
- Ankarcrona M., Dypbukt J. M., Bonfoco E., Zhivotovovsky B., Orrenius S., Lipton S. A. and Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961–973.
- Arzberger T., Krampfl K., Leimgruber S. and Weindl A. (1997) Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease. An *in situ* hybridization study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 440–454.
- Benveniste H., Drejer J., Schousboe A. and Diemer N. H. (1984) Evaluation of extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43, 1369–1374.
- Bindokas V. P., Jordan J., Lee C. C. and Miller R. J. (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.* 16, 1324–1336.
- Bitting P. and Ikonomidou C. (1997) Glutamate in neurological diseases. *J. Child Neurol.* 12, 471–485.
- Browne S., Bowling A., MacGarvey U., Baik M., Berger S., Muqit M. and Bird E. (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 41, 646–653.
- Cebers G., Cebere A., Wagner A. and Liljequist S. (1999) Prolonged inhibition of glutamate reuptake down-regulates NMDA receptor functions in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 72, 2181–2190.
- Chen Y. and Swanson R. A. (2003) The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *J. Neurochem.* 84, 1332–1339.
- Dringen R. and Hamprecht B. (1996) Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures. *J. Neurochem.* 67, 1375–1382.
- Duchen M. R. (2000) Mitochondrial and calcium: from cell signalling to cell death. *J. Physiol.* 529, 57–68.
- Dugan L. L., Sensi S. L., Canzoniero L. M. T., Handran S. D., Rothman S. M., Liu T. S., Goldberg M. P. and Choi D. W. (1995) Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to *N*-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.* 15, 6377–6388.
- Fiskum G., Murphy A. N. and Beal M. F. (1999) Mitochondria in neurodegeneration, acute ischemia and chronic neurodegenerative disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 351–369.
- García O. and Massieu L. (2001) Strategies for neuroprotection against *L-trans*-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment *in vitro*. *J. Neurosci. Res.* 64, 418–428.
- García O. and Massieu L. (2003) Glutamate uptake inhibitor *L-trans*-pyrrolidine 2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentrations of mitochondrial toxin 3-nitropropionate, involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. *J. Neurosci. Res.* 74, 956–966.
- García-Nogales P., Almeida A. and Bolaños J. P. (2003) Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 864–874.
- Greene J. and Greenamyre J. (1995) Exacerbation of NMDA, AMPA, and *L*-glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J. Neurochem.* 64, 2332–2338.
- Gu M., Gash M. T., Mann V. M., Javoy-Agid F., Cooper J. M. and Schapira A. H. V. (1996) Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* 39, 389–399.
- Hempel S. L., Buetner G. R., O'Malley Y. Q., Wessels D. A. and Flaherty D. M. (1999) Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants, comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 146–159.
- Himi T., Ikeda M., Yasuhara T., Nishida M. and Morita I. (2003) Role of neuronal glutamate transporter in the cysteine uptake and intracellular glutathione levels in cultured cortical neurons. *J. Neural Transm.* 110, 1337–1348.
- Lafón-Cazal M., Pietri S., Culcasi M. and Bockaert J. (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364, 535–537.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Lewis-Farr A. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Massieu L., Morales-Villagrán A. and Tapia R. (1995) Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage, an *in vivo* microdialysis study. *J. Neurochem.* 64, 2262–2272.
- Massieu L., Gómez-Román N. and Montiel T. (2000) *In vivo* potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp. Neurol.* 165, 257–267.
- Mitani A. and Tanaka K. (2003) Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia, an *in vivo* study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1. *J. Neurosci.* 23, 7176–7182.
- Nicholls D. G., Vesce S., Kira L. and Chalmers S. (2003) Interactions between mitochondrial bioenergetics and cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. *Cell Calcium* 34, 407–424.
- Novelli A., Reilly J. A., Lysko P. G. and Henneberry R. C. (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the *N*-methyl-D-aspartate

- receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* 451, 205–212.
- Pang Z. and Geddes J. W. (1997) Mechanism of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid, acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J. Neurosci.* 17, 3064–3073.
- Panov A. V., Gutekunst C.-A., Leavitt B. R., Hayden M. R., Burke J. R., Strittmatter W. J. and Greenamyre J. T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* 5, 731–736.
- Peng T. I. and Greenamyre T. (1998) Privileged access to mitochondria of calcium influx through *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.* 53, 974–980.
- Ragan C. I., Wilson M. T., Darley-Usmar V. M. and Lowe P. N. (1987) Subfractionation of mitochondria and isolation of the proteins of oxidative phosphorylation, in *Mitochondria. A Practical Approach* (Darley-Usmar, V. M., Rickwood, D. and Wilson, M. T., eds), pp. 79–112. IRL Press, London.
- Ré D. B., Boucraï J., Samuel D., Birman S., Kerkerian-Le Goff L. and Had-Aissouni L. (2003) Glutamate transport alteration triggers differentiation-state selective oxidative death of cultured astrocytes: a mechanism different from excitotoxicity depending on intracellular GSH contents. *J. Neurochem.* 85, 1159–1170.
- Rossi D. J., Oshima T. and Atwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316–321.
- Sánchez-Carbente M. R. and Massieu L. (1999) Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J. Neurochem.* 72, 129–138.
- Schinder A. F., Olson E. C., Spitzer N. C. and Montal M. (1996) Mitochondrial dysfunction is a primary even in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16, 6125–6133.
- Tietze F. (1996) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione, applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502–522.
- Vásquez O. L., Almeida A. and Bolaños J. P. (2001) Depletion of glutathione up-regulates mitochondrial complex I expression in glial cells. *J. Neurochem.* 76, 1593–1596.
- White R. J. and Reynolds I. J. (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons, an early signal specific to excitotoxin exposure. *J. Neurosci.* 16, 5688–5697.
- Zeron M. M., Chen N., Moshaver A., Ting-Chun Lee A., Wellington C. L., Hayden M. R. and Raymond L. A. (2001) Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 41–53.



## VI. DISCUSION

El daño excitotóxico inducido por glutamato ha sido vinculado a la pérdida neuronal que se observa en algunas enfermedades neurodegenerativas y en la isquemia cerebral. En este trabajo se ha demostrado que: 1) las neuronas granulares de cerebelo pueden tolerar el incremento de los niveles extracelulares de glutamato producido por la inhibición de sus transportadores con el *L-trans*-pirrolidín-2,4-dicarboxilato (PDC) y 2) el glutamato acumulado extracelularmente es tóxico cuando el metabolismo energético celular se encuentra afectado por la presencia de la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3-NP). El incremento en la concentración extracelular de glutamato, un funcionamiento deficiente de los transportadores encargados de remover a este aminoácido del espacio sináptico, y una alteración en el metabolismo energético de las célula son eventos asociados con la isquemia cerebral (Lipton, 1999). Por lo tanto, cuando los cultivos de NGC son tratados con PDC+3-NP, se mimetizan estos tres eventos convirtiendo este paradigma experimental en un modelo útil para estudiar los mecanismos celulares involucrados en la muerte neuronal isquémica, así como posibles estrategias de neuroprotección. Los resultados en este modelo sugieren que la disminución en los niveles de ATP, la producción de estrés oxidativo, y la entrada de  $Ca^{2+}$  a través del receptor NMDA pueden ser eventos involucrados en la muerte celular ya que los sustratos energéticos, como el piruvato y el acetoacetato; compuestos que evitan el estrés oxidativo como el PBN, así como el antagonista del receptor glutamatérgico, MK-801, pueden evitar el daño producido por el 3-NP+PDC (ver anexo 1 y trabajo 1 en la sección de resultados). Durante el desarrollo de esta tesis se trató de establecer cual es la relación que tienen cada uno de estos eventos y su contribución en la muerte celular.

Una alteración en el funcionamiento de la mitocondria ha sido propuesta como un evento

clave en la muerte excitotóxica y en la isquemia cerebral (Nicholls y Budd, 1998; Fiskum et al., 1999). Nuestros resultados indican que el PDC y el 3-NP *per se* no producen ningún efecto sobre la actividad mitocondrial (ensayo de MTT), y los niveles de ATP, pero ambos tratamientos producen una despolarización del  $\Delta\Psi_m$  determinada por el marcador fluorescente JC-1 (Fig. 1A del trabajo 2). La producida por el PDC es muy rápida y parcial, y la del 3-NP más severa y tardía. Esta discrepancia entre la actividad mitocondrial y la despolarización del  $\Delta\Psi_m$ , puede ser debida a que el MTT y el JC-1 tienen diferente localización y función en la mitocondria. Algunos reportes sugieren que mientras el MTT se estaría reduciendo dentro y fuera de la mitocondria por deshidrogenasas citoplasmáticas, el JC-1 se acumula específicamente en la membrana interna mitocondrial debido a sus cargas negativas. Por lo tanto, el MTT sería un indicador de la actividad redox de la célula y el JC-1 un indicador del  $\Delta\Psi_m$  (Bernas y Dobrucki, 2002).

La despolarización del  $\Delta\Psi_m$  ha sido propuesta como un evento fundamental en la muerte celular inducida por glutamato (Ankarcrona et al., 1995; Schinder et al., 1996; White y Reynolds, 1996). En este trabajo se observó que la inhibición del transporte de glutamato con PDC induce una rápida pero modesta despolarización del  $\Delta\Psi_m$ , mientras que, la toxina mitocondrial produce una despolarización sostenida, pero que se presenta dos horas después de la incubación con 3-NP. A pesar de que las células se mantienen despolarizadas no presentan muerte celular (Fig. 1B, trabajo 2). La despolarización producida por el 3-NP coincide con la pérdida de los niveles de NADH pero no de NADPH en los cultivos (Fig. 2 A, trabajo 2). Esto sugiere que el  $\Delta\Psi_m$  se mantiene durante este tiempo a expensas de la oxidación del NADH a través del complejo I de la CTE, y solamente cuando el NADH que proviene del ciclo de Krebs se agota debido a la inhibición de la SDH, entonces se produce la despolarización mitocondrial, ya que el complejo I de la CTE carece de sustratos para

mantener el  $\Delta\Psi_m$ . En otros estudios se ha demostrado que altas concentraciones y una exposición prolongada de 3-NP pueden producir muerte celular a través de un mecanismo que involucra la pérdida de ATP, la activación del receptor NMDA y una alteración en la homeostasis del  $Ca^{2+}$  intracelular (Pang y Geddes, 1997; Lee et al., 2002). Nosotros no observamos estos efectos ya que en nuestras condiciones experimentales se utilizó una concentración subtóxica de 3-NP. Adicionalmente, las NGC pueden conservar sus niveles de ATP aún en presencia de toxinas mitocondriales exclusivamente por su actividad glucolítica por un tiempo determinado (Budd y Nicholls, 1996; Nicholls et al., 2003).

El inhibidor del transporte de glutamato produce una rápida pero modesta despolarización del  $\Delta\Psi_m$  (Fig. 1A, trabajo 2). La despolarización producida por el PDC no se relacionó con la pérdida de equivalentes reductores ya que los niveles de NADH y NADPH no disminuyen (Fig. 2, trabajo 2), y tampoco se ve afectada la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales (Fig. 2A, trabajo 1). Sin embargo, la despolarización mitocondrial, aparentemente se relaciona con la entrada de calcio a la célula y posiblemente a la mitocondria después de la activación de los receptores NMDA ya que la presencia del antagonista de este receptor el MK-801 (ver resultados, trabajo 2), y el quelante de calcio EGTA (datos no mostrados) bloquean la despolarización mitocondrial. Estos datos concuerdan con el papel bien establecido que tiene la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria, y la consecuente despolarización del  $\Delta\Psi_m$ , y la excitotoxicidad en células nerviosas (Ankarcrona et al., 1995; Schinder et al., 1996; White y Reynolds, 1996; Nicholls y Budd, 1998; Vergun et al., 1999). Adicionalmente a estos resultados, se observó que el PDC no produce una pérdida en los niveles de ATP (Fig. 1A, trabajo 1), a pesar de tener una despolarización parcial del  $\Delta\Psi_m$ . Sin embargo, esta despolarización solamente se da durante los primeros 15 minutos y después permanece sin cambio. Nuestros resultados

sugieren que en estas condiciones el  $\Delta\Psi_m$  no se colapsa por que la activación del receptor NMDA por el glutamato acumulado, estimula el consumo de oxígeno (tabla 1, trabajo 2). El incremento en la respiración mitocondrial podría servir como un mecanismo de defensa para evitar la pérdida del potencial del  $\Delta\Psi_m$ . En este sentido diversos trabajos sugieren que la entrada de glutamato a través de sus transportadores aumenta la captura de glucosa estimulando la producción de ATP glucolítico para mantener la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Pellerin y Magistretti, 1994; Minervini et al., 1997; Voutsino-Porche et al., 2003; ver artículo de revisión en la introducción). Adicionalmente Lu et al. (1997), han observado que la exposición de glutamato *in vivo* en corteza de ratas, incrementa el consumo de oxígeno. El incremento en el consumo de oxígeno asociado a un incremento en la captura de glucosa, podría estimular la fosforilación oxidativa y por lo tanto mantener el  $\Delta\Psi_m$  y los niveles de ATP en las células granulares.

Uno de los principales eventos que pueden conducir a la muerte neuronal durante un proceso isquémico es la disminución en los niveles de ATP y la disfunción mitocondrial (Almeida et al., 1995; Fiskum et al., 1999; Lipton., 1999). Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados el daño neuronal no parece estar asociado únicamente a la despolarización del  $\Delta\Psi_m$ , ya que la coincubación de PDC+3-NP no produce una despolarización adicional a la que se presenta el tratamiento individual con cada uno de los compuestos (Fig. 1A, trabajo 2). Sin embargo, bajo esta situación si ocurre muerte neuronal desde los 15 minutos hasta las 4 horas (Fig. 1B, trabajo 2; Fig. 5 y 6, trabajo 1). El daño neuronal podría estar asociado a la pérdida de los niveles de ATP y de la actividad redox celular observada cuando se coincuba el PDC+3-NP (Fig. 1A, trabajo 1). En este sentido algunos reportes sugieren que los niveles de ATP pueden ser fundamentales para determinar la muerte celular necrótica o apoptótica inducida por glutamato, venenos

mitocondriales y por estrés oxidativo (Anckarcrona et al., 1995; Pang y Geddes, 1997; Leist et al., 1999; Almeida y Bolaños, 2001). De acuerdo a nuestros resultados después de la exposición durante 4 horas a PDC+3-NP, las NGC presentan un rompimiento de la membrana plasmática, característica asociada a la muerte celular necrótica (Fig. 6A, trabajo 1). Sin embargo, también se observa la presencia de células con cromatina condensada y de células positivas a anexina-V, lo que sugiere una translocación de la fosfatidilserina, características comúnmente asociadas con la muerte celular apoptótica (Fig. 5 y 6, trabajo 1 y Fig. 1B, trabajo 2). El fenotipo de muerte celular subsecuente a un proceso isquémico es aún controversial. Algunos trabajos han propuesto que en un proceso isquémico las células pueden morir a través de un mecanismo apoptótico (Choi, 1996, Rosebaum et al., 1994; Graham y Chen, 2001). Sin embargo, otros reportes han demostrado la coexistencia de muerte celular necrótica y apoptótica (Yue et al., 1997; Martin et al., 1998; Kalda et al., 1998). El glutamato y el 3-NP pueden producir necrosis y apoptosis dependiendo de la intensidad y duración de la exposición (Anckarcrona et al., 1995, Pang y Geddes, 1997; Cheung et al., 1998). Anckarcrona et al. (1995), han propuesto que la muerte necrótica en las neuronas granulares de cerebelo producida por una exposición a glutamato coincide con la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, la disminución de los niveles de ATP y la presencia de hinchamiento celular. Sin embargo, las células que sobreviven a este estímulo y que recuperan su potencial de membrana mitocondrial y los niveles de ATP, mueren posteriormente por apoptosis. El glutamato podría inducir la apoptosis a través de la activación de la caspasa 3 (Budd et al., 2000; Zhao et al., 2000), por una vía diferente a la de los inductores clásicos de la apoptosis como la estaurosporina, que involucraría la despolarización de la membrana mitocondrial, la disminución en los niveles de ATP y la liberación del citocromo *c* (Budd et al., 2000). Los resultados permiten sugerir que además

de la despolarización mitocondrial hay una activación de caspasas ya que el Z-Asp-DCB disminuye las células apoptóticas o la fragmentación nuclear (Fig. 1, trabajo 2; Fig. 6A, trabajo 1). Sin embargo, la activación de las caspasas es independiente de la actividad reductora de las células (Fig. 7, trabajo 1). Un resultado similar fue reportado por Hamara y Sugimoto (1998), quienes observaron que la apoptosis inducida por bajo potasio en las NGC, podía ser prevenida por diversos inhibidores de caspasas como el Z-asp-DCB, el Boc-asp-FMK y el z-VAD-FMK, pero la actividad redox de la mitocondria no era inhibida por estos compuestos. En este sentido, el ensayo de MTT, puede tener un valor limitado para asegurar la eficiencia de estrategias de neuroprotección (Lobner, 2000), ya que podría darnos una información errónea si el agente apoptótico actúa una vez que ocurre la disfunción mitocondrial o en diferentes puntos de la muerte neuronal.

En este trabajo se demostró que el atrapador de radicales libres, PBN, puede evitar la pérdida de los niveles de ATP y mantener la actividad redox de la mitocondria producida por la presencia de 3-NP+PDC (Fig. 1C, y 2C, trabajo 1). Esto sugería la generación de un estrés oxidativo en nuestro modelo que a su vez estaría involucrado en la muerte neuronal. Como mencionamos anteriormente la activación del receptor NMDA por el glutamato endógeno estimula el consumo de oxígeno (tabla 1, trabajo 2), y este mecanismo aparentemente previene la pérdida del potencial del  $\Delta\Psi_m$ . Sin embargo, la estimulación de la respiración mitocondrial genera inevitablemente un incremento en la producción de ROS y por lo tanto una disminución en los niveles de GSH (Fig. 3, 4; trabajo 2). Se tiene bien establecido que la estimulación del receptor NMDA produce el radical  $O_2^{\cdot-}$  (Lafón-Cazal et al., 1993), el cual es eliminado de la célula por la SOD generando  $H_2O_2$ . A su vez, el  $H_2O_2$  puede ser eliminado por la catalasa ó por el GSH (Schult et al., 2000). La estimulación del receptor NMDA por el glutamato acumulado podría estar estimulando la producción  $O_2^{\cdot-}$  y

este transformarse a  $\text{H}_2\text{O}_2$  rápidamente lo cual explicaría por que no se detectó  $\text{O}_2^-$  (tabla 2, trabajo 2) en presencia de PDC. La producción de ROS y la disminución de GSH si se evidenciaron en presencia de PDC así como protección por catalasa y MK-801. El efecto del PDC sobre el GSH ha sido observado en neuronas corticales y astrocitos. Sin embargo, en estas preparaciones se propone que la disminución de los niveles de GSH se debe a una inhibición de su síntesis (al disminuir la captura de glutamato y cisteína) o a la inducción de estrés oxidativo (Chen y Swanson, 2003; Himi et al., 2003; Re et al., 2003). En nuestro caso la disminución de los niveles de GSH se debe directamente a la estimulación del receptor NMDA lo que sugiere que esto es consecuencia de un proceso excitotóxico. Recientemente se ha demostrado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede tener un efecto directo sobre la mitocondria ya que inhibe a enzimas del ciclo de Krebs como la aconitasa y la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, por lo que podría contribuir a la reducción de los niveles de ATP (Mailly et al., 1999; Tretter y Adam-Vizi, 2000, 2004; Starkov et al., 2004). Finalmente, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede producir muerte celular apoptótica y necrótica por la activación de la Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (Mailly et al, 1999; Cole y Pérez-Polo, 2002), por lo que podría tener un papel fundamental en la muerte celular observada en este trabajo. En la condición de 3-NP+PDC se produce tanto  $\text{O}_2^-$  como  $\text{H}_2\text{O}_2$  sugiriendo que la disfunción mitocondrial exacerba la producción de ERO. En esta condición el estado de estrés oxidativo contribuiría a la muerte ya que ésta es prevenida por el PBN.

En la figura 2, se esquematizan los eventos que de acuerdo a esta tesis están involucrados en la muerte neuronal excitotóxica, cuando existe una deficiencia en el metabolismo mitocondrial.

En esta tesis se demostró que la administración de sustratos energéticos como el acetoacetato y el piruvato pueden revertir los efectos producidos por el 3-NP+PDC sobre

los niveles de ATP, la actividad mitocondrial y la muerte celular (ver resultados trabajo 2). En los últimos años se ha demostrado el efecto neuroprotector del piruvato en modelos de inhibición glicolítica (Massieu et al., 2000), y de inhibición del metabolismo energético mitocondrial (resultados en este trabajo y Massieu et al., 2001) así como de isquemia cerebral (Lee et al., 2001), y de toxicidad inducida por glutamato (Ruiz et al., 1998), por NMDA en ausencia de glucosa (Maus et al., 1999), por zinc (Sheline et al., 2000) y por cobre (Feng Wang y Cynader, 2001). El efecto protector del piruvato puede ser atribuido a su papel como precursor de acetil-CoA y por lo tanto en la producción de ATP, ya que la presencia del inhibidor de su transporte, el ácido 4-hidroxicinamato (4-CIN), revierte su efecto (Fig. 3 y 4, trabajo 1). Resultados similares han sido reportados en células de estriado expuestas a un estímulo tóxico de NMDA en ausencia de glucosa, en donde el piruvato puede restablecer los niveles de ATP (Maus et al., 1999). En este sentido, Hassel (2001), ha propuesto que en condiciones de estrés metabólico el piruvato puede ser carboxilado a través de la enzima málica estimulando la actividad el ciclo de Krebs y la producción de ATP. Adicionalmente, el mecanismo protector del piruvato puede estar asociado al incremento de la velocidad de la respiración mitocondrial y a la disminución de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Villalba et al., 1994; Eimerl y Schramm, 1995; Maus et al., 1999). A pesar de que el efecto del piruvato se debe a su papel de sustrato energético (Fig. 3 y 4, trabajo 1), no se descarta la posibilidad de que en nuestras condiciones el efecto protector del piruvato se deba a su acción antioxidante. El piruvato puede reaccionar con el  $H_2O_2$  para que por medio de una descarboxilación oxidativa genere acetato, bióxido de carbono y agua evitando el estrés oxidativo (Desagher et al., 1997).

Los cuerpos cetónicos como el acetoacetato pueden reemplazar a la glucosa como la principal fuente de energía cuando hay una alteración del metabolismo energético, como es



el caso de la isquemia y la hipoglicemia introduciéndose directamente al ciclo de Krebs a través de su formación a Acetil-CoA para producir ATP (Nehlig y Pereira de Vasconcelos, 1993). El efecto protector de los cuerpos cetónicos se ha demostrado en modelos *in vitro* de la enfermedad de Parkinson y de la enfermedad de Alzheimer (Kashiwaya et al., 2000) y en modelos *in vivo* ante el daño excitotóxico observado durante una inhibición glicolítica (Massieu et al., 2003). Sin embargo, el efecto protector de acetoacetato se puede deber a otros mecanismos adicionales como son: 1) que aumente la concentración local de piruvato al inhibir la piruvato deshidrogenasa por el exceso de acetil-CoA, y por lo tanto favorezca la síntesis del ácido kinurénico, un antagonista endógeno del receptor NMDA (Hodgkins y Schwarcz, 1998) y 2) que el exceso de acetil-CoA no solo estimule el ciclo de Krebs y por lo tanto la síntesis de ATP, sino que también favorezca la síntesis de GABA, el cual es un neurotransmisor inhibitorio que podría evitar el daño excitotóxico (Daikhin y Yudkoff, 1998; Veech et al., 2001). Recientemente algunos autores sugieren que el efecto protector de los cuerpos cetónicos está relacionado con la oxidación de la co-enzima Q y con la reducción de  $\text{NAD}^+$  disminuyendo el daño por estrés oxidativo o restableciendo los niveles de NADH (Veech et al., 2001; Almeida y Bolaños, 2001). En este trabajo sugerimos que el acetoacetato al igual que el piruvato, ejercen su efecto protector a través de su papel como sustratos energéticos ya que la presencia del 4-CIN previene su efecto.

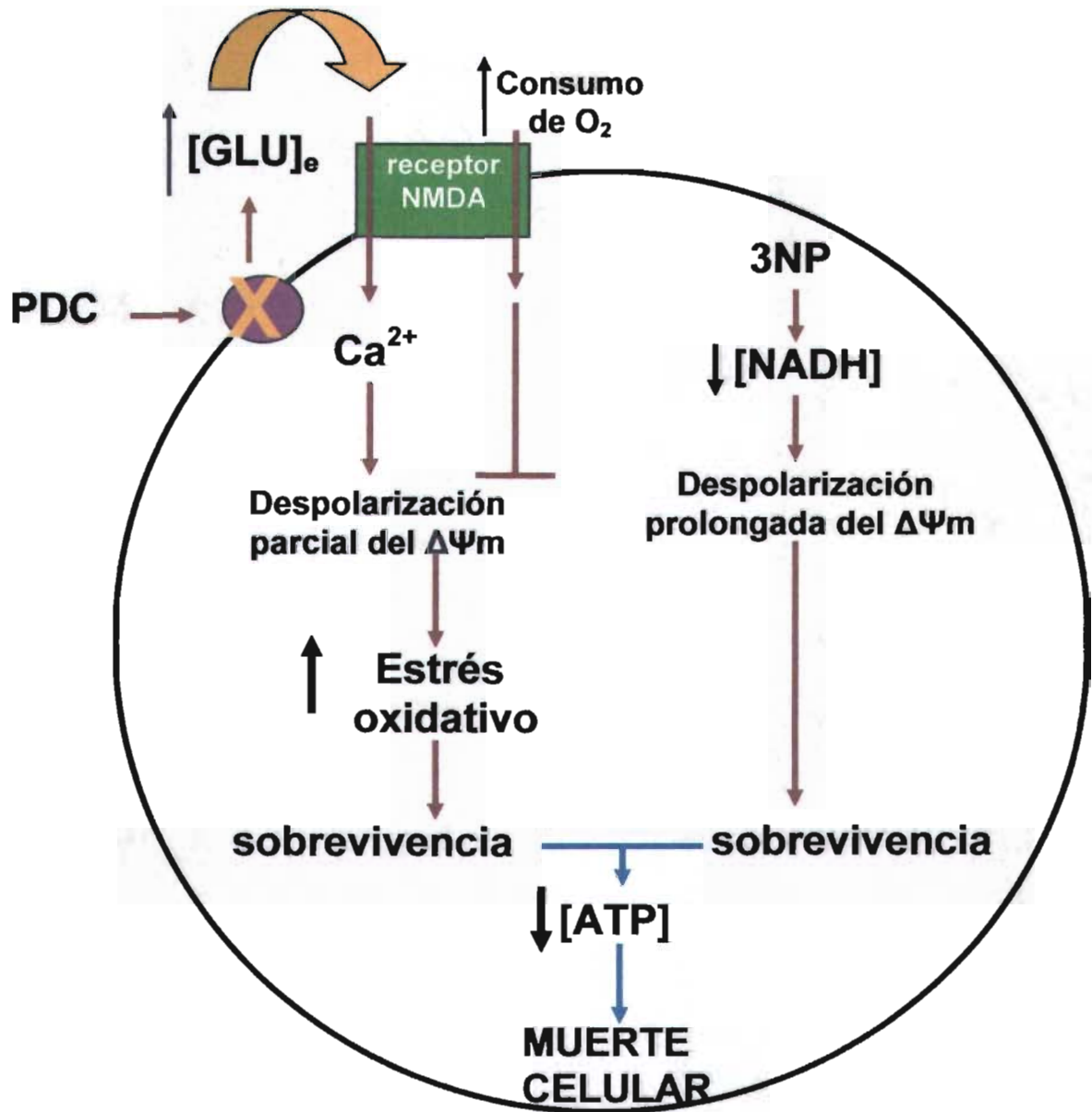
De todos los fármacos probados en esta tesis, el MK-801 es el compuesto que presenta mayor eficiencia para mantener los niveles de ATP, la actividad mitocondrial y evitar la muerte neuronal (Fig. 1C, 2C, 5 y 6 trabajo 1), además de evitar la despolarización del  $\Delta\Psi_m$  y el estrés oxidativo inducido por el PDC (Fig. 3 y 4, trabajo 2). El MK-801 podría evitar la entrada específica de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor NMDA (Sattler et al., 1998; Peng y Greenamyre, 1998), evitando el colapso del  $\Delta\Psi_m$  (Isaev et al., 1996; Shinder et al., 1996;

Vergun et al., 1999) y la activación de las vías excitotóxicas involucradas en la muerte neuronal. Dados los efectos secundarios de este compuesto como la hipertensión, la sedición, la ataxia y las alucinaciones en los pacientes, otras alternativas terapéuticas son necesarias. Los resultados de este trabajo sugieren que sustratos energéticos como el piruvato y el acetoacetato, y antioxidantes podrían tener potencial terapéutico.

## VII. CONCLUSIONES

- 1) Las NGC pueden tolerar el incremento de la concentración extracelular de glutamato inducido por la inhibición de sus transportadores con PDC. Sin embargo, este neurotransmisor puede ser tóxico cuando las células presentan una alteración del metabolismo por la presencia de la toxina mitocondrial, el 3-NP.
- 2) El PDC y el 3-NP activan dos mecanismos independientes que conllevan a la muerte celular (Fig. 2). Por un lado el PDC produce una pequeña despolarización rápida pero permanente en las NGC. La despolarización se mantiene por que las neuronas incrementan el consumo de oxígeno, posiblemente como un mecanismo que evite el colapso del  $\Delta\Psi_m$ . Sin embargo, este efecto estimula inevitablemente el estrés oxidativo. Por otro lado, el 3-NP produce una despolarización progresiva la cual coincide con la pérdida de los niveles de NADH.
- 3) El estrés oxidativo, la despolarización mitocondrial y la inhibición metabólica ocasionada por el tratamiento individual con PDC y 3-NP, no producen muerte neuronal.
- 4) La muerte neuronal solamente se expresa por la presencia de PDC+3-NP, y coincide con la pérdida de ATP y de la actividad redox de la mitocondria.

- 5) El daño celular observado en nuestras condiciones experimentales presenta características fenotípicas de muerte necrótica y apoptótica.
- 6) La administración de sustratos energéticos como el piruvato y el acetoacetato pueden servir como potenciales neuroprotectores contra el daño isquémico.
- 7) Las NGC expuestas a PDC+3-NP pueden ser utilizadas como un modelo que mimetiza la isquemia cerebral.



**Figura 2.** Mecanismos involucrados en la muerte celular ocasionada por la inhibición del transporte de glutamato con PDC y la toxina mitocondrial 3-NP. El 3-NP produce una despolarización mitocondrial cuando los niveles de NADH disminuyen. La inhibición del transporte de glutamato incrementa la concentración extracelular de este aminoácido en el medio de cultivo. Esto provoca la estimulación del receptor NMDA y la despolarización mitocondrial. El  $\Delta\Psi_m$  se mantiene por que las células incrementan el consumo de oxígeno lo que provoca un estrés oxidativo. Este puede ser un mecanismo de defensa que sin embargo al ser obstruido por una inhibición mitocondrial da lugar a una disminución en los niveles de ATP y la muerte celular.

## VIII. ANEXO 1

García O, Massieu L. 2001. "Strategies for neuroprotection against L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro" *J. Neurosci. Res.* 64: 418-428

# Strategies for Neuroprotection Against L-Trans-2,4-Pyrrolidine Dicarboxylate-Induced Neuronal Damage During Energy Impairment In Vitro

Octavio García and Lourdes Massieu\*

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

Increased levels of extracellular excitatory amino acids and failure of energy metabolism are two conditions associated with brain ischemia. In the present study we have combined the simultaneous inhibition of glutamate uptake and mitochondrial electron transport chain to simulate neuronal damage associated with brain ischemia. Results show that cerebellar granule neurons are not vulnerable to transient glutamate uptake inhibition by L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) despite the increase in the extracellular concentration of glutamate, unless they are simultaneously exposed to the mitochondrial toxins 3-nitropropionic acid (3-NP) or sodium azide. Cell damage was assessed by light microscopy observation, by reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and by the fluorescent markers for live and dead cells, calcein and ethidium homodimer, respectively. The protective effect of alternative energy substrates, such as pyruvate, acetoacetate, and  $\beta$ -hydroxybutyrate against PDC-induced neuronal death during 3-NP exposure was studied and compared to the effects of the antioxidant vitamin E, the spin trapper  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitrone (PBN), voltage-dependent calcium channel antagonists, and glutamate receptor antagonists. Results show that neuronal damage can be efficiently prevented in the presence of pyruvate and the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist MK-801, whereas the non-NMDA receptor antagonist NBQX, acetoacetate, vitamin E, and PBN showed partial protection. In contrast,  $\beta$ -hydroxybutyrate and voltage-dependent calcium channels blockers did not show any protective effect at the concentrations tested. *J. Neurosci. Res.* 64:418–428, 2001. © 2001 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** energy substrates; glutamate uptake; 3-nitropropionic acid; cerebellar granule neurons

## INTRODUCTION

It is accepted that the high-energy brain demands depend mainly on blood supply of external glucose and that ATP production through glycolysis and oxidative phosphorylation is the major source of energy used by brain (Erecinska and Silver, 1989, 1994). When glucose requirements are not satisfied owing to severe hypoglycemia or brain ischemia, neuronal damage occurs probably as a result of the combination of energy depletion and increased levels of excitatory amino acids in the extracellular space (Benveniste et al., 1984; Sandberg et al., 1986).

In vitro studies have shown that, during ATP-limiting conditions such as glycolysis inhibition and mitochondrial dysfunction, changes in the intracellular concentrations of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  occur, resulting in cell membrane depolarization and increased intracellular calcium levels (Silver et al., 1997). Similar changes occur during in vivo cerebral ischemia (Kristián and Siesjö, 1997), leading to the release of excitatory amino acids either by exocytosis or by reverse transport (Longuemare et al., 1999; Rossi et al., 2000) as well as to the activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors through the relief of the voltage-dependent  $\text{Mg}^{2+}$  blockade (Zeevalk and Nicklas, 1992).

Recent evidence suggests that mitochondrial function is critical for glutamate-mediated neuronal death. Calcium dysregulation associated with the collapse of the mitochondrial membrane gradient and ATP depletion after prolonged exposure to excitotoxic concentrations of glutamate will lead to irreversible neuronal death (Ankarcrona et al., 1995; Budd and Nicholls, 1996; Schinder et al., 1996; Sattler et al., 1998). In addition, mitochondrial dysfunction will enhance the production of reactive oxygen species (ROS), which will also contribute to neuronal damage (Murphy et al., 1999). Substantial evidence indicates that mitochondrial toxins induce neuronal damage through an excitotoxic-mediated mechanism (Storey et al., 1992; Beal et al., 1993; Grenee et al., 1993; Brouillet et al., 1994; Schulz et al., 1994) and potentiate glutamate neurotoxicity both in vivo and in vitro (Novelli et al.,

Contract grant sponsor: DGAPA; Contract grant number: IN219798; Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant number: 27970N.  
\*Correspondence to: Dr. L. Massieu, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-253, 04510, México, D.F., México.  
E-mail: lmassieu@fisiol.unam.mx

Received 12 October 2000; Revised 9 January 2001; Accepted 17 January 2001

1988; Greene and Greenamyre, 1995; Cebers et al., 1998; Greene et al., 1998; Sánchez-Carbente and Massieu, 1999). All these studies favor the hypothesis of a close and complex interrelation between mitochondrial energy metabolism and glutamate excitotoxicity (Henneberry, 1989).

In the present study we show that cultured cerebellar granule cells are not vulnerable to the toxic effects of transient glutamate uptake inhibition by L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) despite the increase in glutamate extracellular levels. However, when cultured cells are simultaneously exposed to PDC and the mitochondrial toxins 3-nitropropionic acid (3-NP) or sodium azide, inhibitors of complexes II and IV of the electron transport chain, respectively, substantial neuronal damage is observed. We have previously reported similar *in vivo* results (Sánchez-Carbente and Massieu, 1999).

Several *in vitro* studies have shown the neuroprotective potentiality of energy substrates alternative to glucose, such as pyruvate, lactate, and creatine, against neuronal damage associated with hypoglycemia (Schurtz et al., 1988; Izumi et al., 1994, 1997), excitotoxicity (Ruiz et al., 1998; Maus et al., 1999; Brewer and Walliman, 2000), zinc neurotoxicity (Sheline et al., 2000), and oxidative stress (Desagher et al., 1997). Similarly, *in vivo* experiments have shown neuroprotective effects of creatine, CoQ<sub>10</sub>, and nicotinamide against striatal lesions induced by mitochondrial toxins (Schulz et al., 1996; Matthews et al., 1998) and excitotoxins (Malcon et al., 2000), and pyruvate can protect against PDC-induced lesions in an *in vivo* model of hypoglycemia (Massieu et al., 2000).

In the present study we have extended these observations to an *in vitro* model of acute neuronal damage that combines two events associated with brain ischemia, glutamate uptake inhibition and mitochondrial failure. The neuroprotective potentiality of pyruvate and the ketone bodies, acetoacetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate, was tested and compared to that of vitamin E, the free radical scavenger  $\alpha$ -phenyl-N-*tert*-butyl-nitron (PBN), glutamate receptor antagonists, and voltage-dependent calcium channel blockers.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Fetal bovine serum, soybean trypsin inhibitor, and penicillin/streptomycin were purchased from Gibco (Grand Island, NY). PDC, DL-threo- $\beta$ -hydroxyaspartate (THA), and dihydrokainate (DHK) were obtained from Tocris (Bristol, United Kingdom). MK-801, NBQX, nitrendipine, and nimodipine were purchased from RBI (Natick, MA), and all other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO). Calcein/ethidium homodimer reagents (LIVE/DEAD kit) were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR).

### Cell Cultures

Primary cultures of cerebellar granule neurons were prepared from 7- or 8-day-old Wistar rats as described by Moran and Patel (1989), with slight modifications. Briefly, after dissec-

tion, seven cerebelli were chopped into 300  $\mu$ m cubes, incubated in 0.25% trypsin solution, and dispersed by trituration in a DNAase and soybean trypsin inhibitor containing solution (0.08% and 0.52%, respectively). Cells were suspended in basal Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, 50  $\mu$ g/ml gentamicin, and 25 mM KCl and plated at a density of  $260\text{--}290 \times 10^3/\text{cm}^2$  ( $1.5 \times 10^6$  cells/ml/well) in Costar 24-well plates (Cambridge, MA) precoated with poly-L-lysine (5  $\mu$ g/ml). Cells were cultured for 9 days *in vitro* (DIV) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. Glucose (5 mM) and cytosine arabinoside (10  $\mu$ M) were added to cultures 4 days after plating. Neuronal population in these cultures was 93% as determined by immunocytochemistry using antibodies against microtubule-associated protein (MAP)-2 and glial fibrillary acidic protein (GFAP), neuronal and glial cells markers, respectively (not shown). All animals were handled according to the Rules for Research in Health Matters (Mexico) with approval of the local animal care committee.

### Drug Exposure

To test the differential effects of glutamate uptake inhibitors on cell survival and extracellular amino acids levels, cerebellar neuronal cultures were exposed during 4 or 6 hr to 500  $\mu$ M of either one of three inhibitors of glutamate uptake: PDC, THA, and DHK. Before the experiment, 0.5 ml of the conditioned medium was removed, and inhibitors dissolved in 10 mM phosphate buffer were added to the remaining 0.5 ml medium. At the end of the incubation period, the drug-containing medium was substituted by the conditioned medium filter-sterilized and maintained at 37°C, and cultures were kept for additional 24 hr, when cell viability was assessed. Control cultures were identically treated with the exception that vehicle solution (phosphate buffer) was added to the remaining 0.5 ml medium instead of drugs. Because similar results were obtained after 4 or 6 hr of incubation with PDC and THA, only PDC was used in the following series of experiments, and a 4 hr incubation period was chosen.

The effect of PDC (500  $\mu$ M during 4 hr) on cell survival was tested in the presence of the mitochondrial toxin 3-NP (500  $\mu$ M), and putative neuroprotective drugs were added simultaneously (at concentration indicated in the figures), except for pyruvate, which was also incubated during 24 hr in some experiments. To corroborate that inhibition of mitochondrial metabolism was indeed the trigger of PDC toxicity, another mitochondrial toxin was used. In this case PDC was coincubated during 4 hr with sodium azide (0.1, 0.3, and 0.5 mM), an inhibitor of complex IV of the electron transport chain. In all the experiments, cell viability was assessed 24 hr after the onset of drug exposure. All of the neuroprotective agents tested were dissolved in 10 mM phosphate buffer, except for vitamin E, which was diluted in ethanol (final concentration of ethanol in the medium 0.5%).

Pure cultures of cerebellar astrocytes were obtained from the dissociated cell suspension plated at the same density in the same culture medium in Costar 24-well plates without added poly-L-lysine as previously described (Velasco et al., 1995). All experiments were performed in duplicate or tetraplicate. Control cultures were included in each experiment and were han-

dled in parallel. Cell morphology and general appearance of the cultures were monitored before treatment. Inadequately preserved cultures were discarded.

#### Assessment of Cell Viability

Cell viability was evaluated 24 hr after the onset of drug exposure by direct examination of cultures under an inverted light microscope and by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. The MTT assay is based on the findings that the mitochondrial enzymes are able to transform MTT salt into formazan and thus indicate the integrity of mitochondrial enzymes in viable neurons (Mosmann, 1983; Berridge and Tan, 1993). Although it has been reported that MTT reduction does not exclusively occur in mitochondria, it is still considered a measure of cell viability because it is incorporated into cells by endocytosis, an ATP-dependent process characteristic of living cells, owing to its lack of permeability through plasma membrane (Liu et al., 1997). In brief, 24 hr after the experiment, cell cultures were incubated with MTT (150  $\mu$ M) during 1 hr at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>-containing atmosphere. The medium was aspirated, and the precipitated formazan was solubilized with 0.8 ml isopropanol and quantified spectrophotometrically at a wavelength of 570 nm. Cell viability is expressed as percentage MTT reduction relative to control cultures.

Cell survival was also monitored by the fluorescent markers calcein (C-AM; green-fluorescent viable cells) and ethidium homodimer (HE; red-fluorescent dead cells) according to the live/dead viability assay kit (Molecular Probes). The assay was performed according to the instructions of the supplier. For these experiments, cells were grown on coverslips, and 24 hr after the experiment they were washed twice in D-PBS for 5 min and exposed to C-AM (2  $\mu$ M) and HE (4  $\mu$ M) in D-PBS for an additional 5 min. They were washed in D-PBS and fixed during 30 min in cold paraformaldehyde. Immediately afterward, they were observed under an epifluorescent microscope, and the number of live and dead neurons was counted with the aid of an image analyzer (NIH Image 1.6 for Macintosh). The number of dead neurons is expressed as percentage of red-fluorescent dead cells relative to the total (red- and green-fluorescent) number of neurons counted in 10 different fields/coverslip from three independent experiments. The approximate number of cells present per field was 213.

#### Determination of Amino Acid Concentration

Amino acid concentrations present in the media were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC). In brief, at the end of the incubation with the drugs (4 or 6 hr), an aliquot was taken from the medium, deproteinized, and processed for amino acid analysis after derivatization with  $\alpha$ -phthalaldehyde as previously described (Velasco et al., 1996).

#### Succinic Dehydrogenase Assay

Succinate dehydrogenase (SDH) activity was determined immediately after and 24 hr after 30 min of incubation of cell cultures in the presence of 3-NP (0.01, 0.1, and 0.5 mM) as described by Olsen et al. (1999). SDH activity was also determined in the presence of 3-NP (0.01, 0.1, and 0.5 mM) + PDC

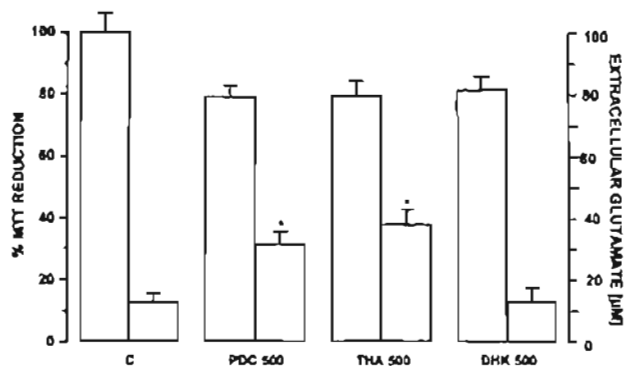


Fig. 1. Effects of 6 hr of incubation with PDC, THA, and DHK (500  $\mu$ M) on cell viability and glutamate extracellular levels in cultured cerebellar granule cells. Cell survival was monitored 24 hr after the experiment by the MTT assay. The absolute value of optical density in control cultures was  $0.38 \pm 0.024$  which was taken as  $100\% \pm 6.2\%$  of MTT reduction. Optical density values for the different treatments were calculated as percentage of control value. Glutamate levels were determined by HPLC in aliquots taken from the medium immediately after the end of the incubation period, as described in Materials and Methods. Data are mean  $\pm$  SEM from four to seven independent experiments. \* $P < 0.05$  relative to control values. No statistical difference was found in MTT reduction between control cultures and those treated with glutamate uptake inhibitors.

(500  $\mu$ M). Enzyme activity is expressed as percentage SDH activity relative to control cultures.

#### Statistical Analysis

All data are expressed as means  $\pm$  SEM values. Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA, followed by a Fisher's least significant difference multiple comparison test.

## RESULTS

### Neuronal Vulnerability to Glutamate Transport Inhibition Is Enhanced During Impairment of Energy Metabolism

Cerebellar granule cell cultures were exposed during 6 hr to PDC, THA, and DHK (500  $\mu$ M), and 24 hr later cell viability was assessed by the MTT reduction assay. None of the three inhibitors induced statistically significant decreases in MTT reduction relative to control cultures, despite the increase in the extracellular concentration of glutamate induced by PDC and THA (Fig. 1). In control cultures, basal concentration of glutamate was  $12.90 \pm 2.68$   $\mu$ M, and incubation with PDC and THA (500  $\mu$ M) significantly increased this concentration to  $31.68 \pm 3.87$   $\mu$ M and  $38.22 \pm 4.82$   $\mu$ M, respectively. In contrast, incubation with DHK did not alter basal glutamate extracellular levels (Fig. 1). Because similar effects of PDC and THA were found on both glutamate levels and MTT reduction, only PDC was used for the rest of the experiments. In addition, a 4 hr incubation was chosen for all the following experiments, because the changes induced by PDC on both MTT reduction and glutamate



**TABLE I. Assessment of Cell Viability by the Calcein/Ethidium Homodimer Fluorescent Markers and MTT Reduction<sup>1</sup>**

	Control	3-NP + PDC	+MK 801	+ Pyruvate
Neuronal death (% dead cells)	12.12 ± 1.5	47.16 ± 2.0*	20.14 ± 1.6**	16.7 ± 2.6**
MTT reduction (% of control)	100	44.16 ± 2.9*	88.79 ± 4.9**	79.0 ± 4.1**

<sup>1</sup>Granule neuron cultures were incubated with 3-NP + PDC (500 μM, 4 hr) in the absence or presence of MK-801 (10 μM, 4 hr) and pyruvate (2 mM, 24 hr); 24 hr after drug exposure, cell viability was assessed by MTT reduction and by the fluorescent markers ethidium homodimer (4 μM) and calcein-AM (2 μM) as described in Materials and Methods. Cell death is expressed as percentage of red-fluorescent dead cells relative to the total cells present in cultures (red- and green-fluorescent) and as percentage of MTT reduction relative to control cultures. Similar results are obtained by both methods. Values are mean ± SEM of four to six independent experiments.

\**P* < 0.05 relative to control values.

\*\**P* < 0.05 relative to 3-NP + PDC.

extracellular levels were very similar to those observed after 6 hr (cf. Figs. 1 and 4 and Table II).

In contrast to transient treatments (4–6 hr), prolonged incubation with PDC (500 μM) during 24 hr induced a significant decrease in MTT reduction to 64.7% ± 5.7% control (*n* = 5, *P* < 0.05, data not shown), whereas PDC at 100 μM had no effect on cell survival when incubated during 24 hr (MTT reduction = 99.8% ± 9.34% control, *n* = 5).

To test the vulnerability of cerebellar granule cells to glutamate uptake inhibition during impairment of energy metabolism, culture wells were simultaneously exposed to PDC and the mitochondrial toxin 3-NP during 4 hr. When cultures were exposed to 500 μM 3-NP during 4 hr, a significant 21.5% decrease in MTT reduction capacity was observed after 24 hr. When 3-NP was simultaneously incubated with PDC (500 μM), neuronal damage induced by 3-NP was enhanced as evidenced by a 55.8% decrease in MTT reduction capacity relative to control cultures (see Fig. 4). Neuronal death induced by coinubation with PDC + 3-NP was corroborated by the calcein/ethidium homodimer fluorescent method. In control cultures 12.0% red-fluorescent dead neurons were counted, whereas in cultures coinubated with 3-NP + PDC (500 μM during 4 hr) this number increased to 47.0% (Table I).

Results similar to those observed with 3-NP were obtained when PDC 500 μM was coinubated with different concentrations of sodium azide during 4 hr (see Fig. 3). At low concentrations (100 and 300 μM) sodium azide had no effect on cell survival, whereas 500 μM decreased MTT reduction to 50%. Coinubation of PDC (500 μM) and low concentrations of sodium azide (100 and 300 μM) clearly potentiated neuronal damage, whereas PDC did not cause damage additional to that induced by 500 μM sodium azide (see Fig. 3). The addition of MK-801 (10 μM) abolished neuronal death induced by PDC + sodium azide at all concentrations tested. Cultured cells were also vulnerable to glutamate toxicity when added at 500 μM during 45 min as evidenced by a decrease in MTT reduction to 55.7% ± 7.2% of control value (*n* = 7, data not shown). Exposure to 3-NP either alone (0.5, 1.0, and

2.0 mM) or in combination with PDC (500 μM) during 4 hr had no effect on cell survival in pure astrocytic cultures, as monitored 24 hr after the experiment (data not shown).

### Morphological Observations

Control cultured cells observed under the microscope show dark and round somata, with an intricate neurite network (Fig. 2A). Neither 3-NP nor PDC (500 μM, 4 hr) individual treatments altered the general morphology of cell cultures (Fig. 2B,C). However, 24 hr after coinubation with PDC + 3-NP, most of the cells looked bright and small, and the neurite network had either disappeared or become thinner and fragmented, with numerous varicosities (Fig. 2D). These changes were very similar to those induced by 4 hr of incubation with PDC + sodium azide and those observed after 45 min of exposure to 500 μM glutamate (not shown). In some experiments pure astrocytic cultures were treated identically to granule neuron cultures. In agreement with MTT determinations, there were no evident morphological alterations in astrocytic cultures in the presence of 3-NP, PDC, or 3-NP + PDC (not shown). This experiment shows that cell death induced under our experimental conditions is specific to neuronal cells.

### Potentiation of PDC-Induced Neuronal Damage by 3-NP Is Not Related to a Further Increase in the Extracellular Levels of Excitatory Amino Acids

To elucidate whether potentiation of PDC-induced neuronal damage by 3-NP was due to an additional accumulation of excitatory amino acids in the culture medium, amino acid concentrations were determined in the medium after 4 hr incubation either with PDC alone or in the presence of 3-NP. As is shown in Table II, 4 hr of incubation with PDC caused substantial elevation in the extracellular concentrations of glutamate and aspartate; however, in the presence of 3-NP no further increases in the extracellular levels of these amino acids were observed. No changes were observed in the extracellular levels of glutamine, glycine, taurine, or alanine with any of the treatments (Table II).

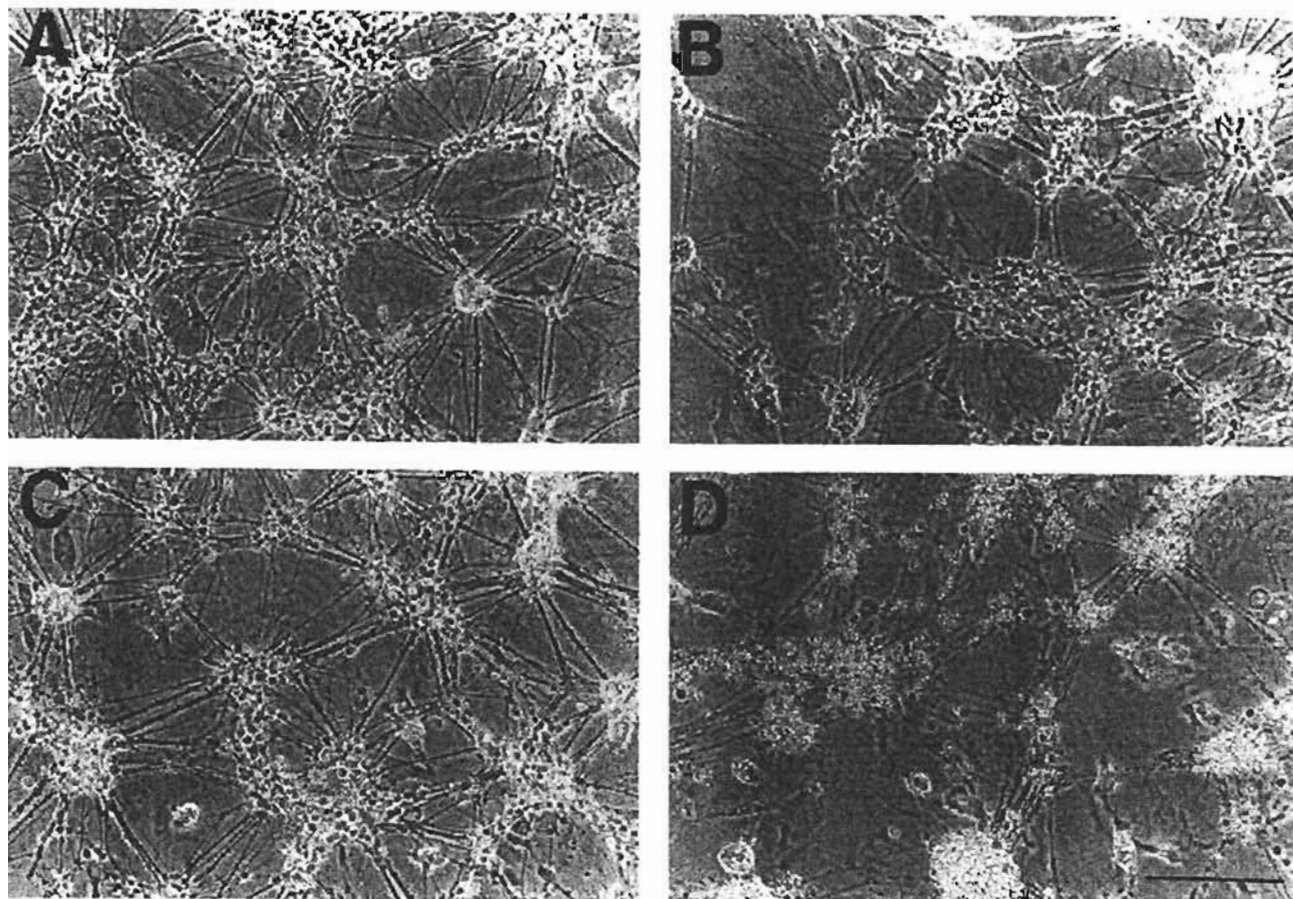


Fig. 2. Phase-contrast micrographs showing the effect of PDC (500  $\mu$ M), 3-NP (500  $\mu$ M), and PDC + 3-NP on cell survival of cerebellar granule cell cultures. Cell cultures were exposed during 4 hr to the different treatments and observed 24 hr later for morphological evaluation. Cultures were well-preserved after 3-NP (B) or PDC (C)

individual treatments and showed a general morphology similar to that of control cultures (A). In contrast, cultures simultaneously exposed to PDC + 3-NP were badly preserved. As can be observed, most of the neurons looked shrunken and bright, with thin and fragmented processes (D). Scale bar = 140  $\mu$ m.

### SDH Activity

The effect of 3-NP on SDH activity was measured immediately after or 24 hr after 30 min of incubation of cell cultures with 3-NP at different concentrations. 3-NP reduced the activity of SDH to 71.30%  $\pm$  5.3%, 40.02%  $\pm$  7.2%, and 13.87%  $\pm$  3.8% of control values when determined immediately after a 30 min incubation period with 3-NP at 0.01, 0.1, and 0.5 mM, respectively (mean  $\pm$  SEM,  $n$  = 4). Enzyme activity remained inhibited to the same extent during the following 24 hr, except in the presence of 0.01 mM 3-NP, which decreased further enzyme activity after 24 hr (53.46%  $\pm$  6.07%, 30.28%  $\pm$  4.25%, and 10.83%  $\pm$  1.60%, respectively, for 3-NP at 0.01, 0.1, and 0.5 mM, mean  $\pm$  SEM,  $n$  = 3). The presence of PDC did not alter 3-NP inhibition of enzyme activity when measured either immediately after (70.19%  $\pm$  7.09%, 43.44%  $\pm$  9.26%, and 10.93%  $\pm$  0.82%, mean  $\pm$  SEM,  $n$  = 4) or 24 hr after 3-NP addition (49.60%  $\pm$  6.52%, 30.38%  $\pm$  5.59%, and 9.89%  $\pm$  1.81%, mean  $\pm$  SEM,  $n$  = 3). Changes in SDH activity induced by 3-NP

are very similar to those recently reported by Olsen et al. (1999).

### Protection of Neuronal Damage Induced by 3-NP + PDC

To evaluate the neuroprotective potentiality of some energy substrates alternative to glucose in our experimental model, pyruvate (2 mM), acetoacetate (5 mM), or  $\beta$ -hydroxybutyrate (5 mM) was simultaneously added to 3-NP + PDC and incubated during 4 hr. Neuronal survival was assessed 24 hr later. As is shown in Figure 4, pyruvate and acetoacetate improved neuronal survival in the presence of 3-NP + PDC when present during the 4 hr incubation period. The protective effect of these compounds was partial restoring MTT reduction capacity to 59.9%  $\pm$  4.0% and 64.4%  $\pm$  7.5% of control, respectively. However, notable protection was achieved when pyruvate was present during the 4 hr incubation period and the following 24 hr. Under this condition, MTT reduction capacity was restored to 79.0%  $\pm$  4.1% of control. In

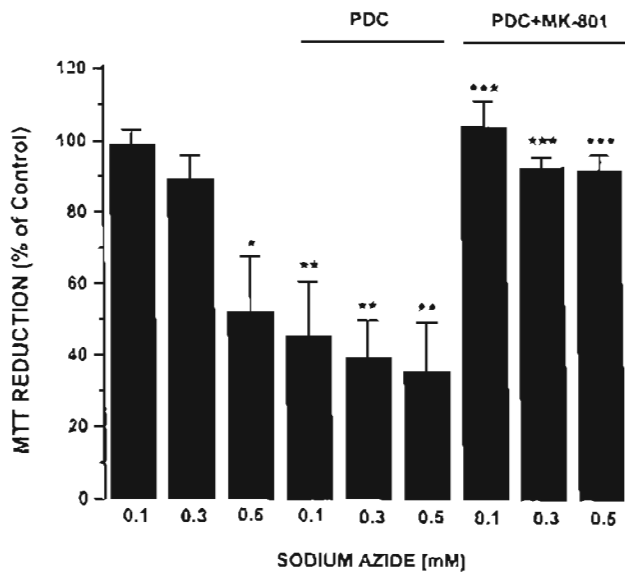


Fig. 3 Effect of 4 hr of coinubation with PDC (500  $\mu$ M) + sodium azide (0.1, 0.3, and 0.5 mM) on cell survival of cerebellar granule cells as monitored by the MTT assay 24 hr after the experiment. Low concentrations of sodium azide induced no damage, but it was potentiated in the presence of PDC. MK-801 (10  $\mu$ M) prevented neuronal damage induced by PDC + sodium azide at all concentrations tested. Data are mean  $\pm$  SEM from six independent experiments. \* $P < 0.05$  relative to nontreated control cultures; \*\* $P < 0.05$  relative to cultures treated with sodium azide; \*\*\* $P < 0.05$  relative to cultures treated with PDC + sodium azide.

contrast to pyruvate and acetoacetate,  $\beta$ -hydroxybutyrate did not show any protective effect.

The effects on cell survival of energy substrates were compared to those of the antioxidant vitamin E (250  $\mu$ M) and the free radical scavenger PBN (500  $\mu$ M), which showed identical partial protective effects, restoring MTT reduction capacity to 61.55%  $\pm$  7.7% and 61.04%  $\pm$  8.6% of control, respectively. The NMDA receptor antagonist MK-801 (10  $\mu$ M) induced almost complete protection (88.79%  $\pm$  4.9% of control MTT reduction), whereas the non-NMDA antagonist NBQX (100  $\mu$ M), showed only partial protective effects (57.39%  $\pm$  7.7% of control MTT reduction). In contrast to these compounds, the calcium channel blockers nitrendipine (2  $\mu$ M) and nimodipine (2  $\mu$ M) were not neuroprotective at all. None of the drugs tested increased MTT reduction in control cultures or in cultures treated with 3-NP alone, except for pyruvate and MK-801 (4 hr incubation), which restored MTT reduction capacity to 95.11%  $\pm$  7.1% and 93.41%  $\pm$  3.5% of control, respectively, when added simultaneously with 3-NP (Table III).

The protective effect of MK-801 (4 hr incubation) and pyruvate (24 hr treatment) was corroborated by counting the percentage of red-fluorescent dead cells relative to the total of cells present in the cultures (Table I). Morphological observations corroborated as well the neuroprotective effect of the different drugs tested. As can be

seen in Figure 5 cultures were better preserved in the presence of pyruvate (24 hr incubation), acetoacetate, vitamin E, or MK-801.

## DISCUSSION

In a previous study we have shown that glutamate uptake inhibition leads to neuronal death in cortical cultured neurons, which is directly correlated to increases in the extracellular levels of glutamate from 8.0  $\mu$ M to up to 24  $\mu$ M (Velasco et al., 1996). In the present study we show that extracellular glutamate concentration increased from 18.1 to 35.0  $\mu$ M after 4 hr of exposure to PDC. Insofar as PDC is a substrate inhibitor of glutamate transporters (Bridges et al., 1991), glutamate elevation induced by PDC might result from carrier-mediated heteroexchange as has been suggested for cortical cultures (Blitzblau et al., 1996; Volterra et al., 1996). Previous studies have shown that low glutamate concentrations in the range of 10–30  $\mu$ M are partially toxic to cerebellar granule cultures when exposed for short (15 min) periods in ionic  $Mg^{2+}$ -free medium, a condition that favors the activation of NMDA receptors, whereas larger concentrations, up to 100–500  $\mu$ M, incubated for 15 min or longer periods dramatically reduce cell survival (Manev et al., 1991; Milani et al., 1991). In the present study we show that transient (4 hr) PDC-induced increases in glutamate concentrations up to 35  $\mu$ M are not toxic to cerebellar granule neurons. This is probably because PDC was not incubated in ionic medium but was directly added to the culture medium. Furthermore, prolonged exposure to PDC during 24 hr under the same conditions did induce a 35% decrease in MTT reduction relative to control cultures. Nonetheless, transient increases in glutamate extracellular levels are neurotoxic when mitochondrial metabolism is compromised. These observations are in agreement with previous *in vivo* studies (Massieu et al., 1995; Sánchez-Carbente and Massieu, 1999).

According to our results, 3-NP rapidly and severely inhibited SDH activity. After 30 min of incubation with 500  $\mu$ M 3-NP, SDH activity was reduced to close to 10.0% of control activity and had not recovered 24 hr after toxin withdrawal. Despite this dramatic reduction in SDH activity, 3-NP caused only a 20% decrease in cell survival. Similarly, sodium azide at low concentrations did not induce cell death. This result suggests that granule neurons can tolerate well mild mitochondrial failure and that electron transfer through the active mitochondrial complexes as well as glycolytic activity can fulfill cell energy demands at least for 24 hr. However, increases in excitatory amino acids levels up to 35  $\mu$ M were highly toxic to these partially metabolically inhibited neurons. PDC toxicity in the presence of 3-NP might not be explained by a further increase in excitatory amino acid concentrations, in that 3-NP did not increase glutamate or aspartate extracellular levels either in the presence or in the absence of PDC.

In the present study we tested the protective effect of different agents against cell death of cerebellar granule neurons under experimental conditions that may mimic ischemia. Pyruvate and acetoacetate showed partial pro-

TABLE II. Extracellular Levels of Amino Acids ( $\mu\text{M}$ ) and Their Changes Induced by Exposure to 3-NP, PDC, and 3-NP + PDC in Cerebellar Granule Neuron Cultures<sup>†</sup>

	Glutamate	Aspartate	Glutamine	Glycine	Taurine	Alanine
Control	18.10 $\pm$ 4.2	2.54 $\pm$ 0.71	648.0 $\pm$ 79.1	147.9 $\pm$ 6.3	30.62 $\pm$ 4.2	218.0 $\pm$ 18.3
3-NP	23.76 $\pm$ 4.9	2.40 $\pm$ 0.62	605.1 $\pm$ 75.2	145.7 $\pm$ 9.3	30.80 $\pm$ 3.3	211.7 $\pm$ 11.7
PDC	35.09 $\pm$ 9.9*	4.80 $\pm$ 1.0*	521.1 $\pm$ 72.6	160.8 $\pm$ 12.0	32.02 $\pm$ 3.9	212.6 $\pm$ 14.5
3-NP + PDC	29.57 $\pm$ 6.4	3.70 $\pm$ 0.88	526.6 $\pm$ 50.0	140.9 $\pm$ 6.7	39.92 $\pm$ 2.9	184.1 $\pm$ 10.1

<sup>†</sup>Cerebellar neuron cultures were exposed during 4 hr to 3-NP (500  $\mu\text{M}$ ), PDC (500  $\mu\text{M}$ ), and 3-NP + PDC. Amino acid levels were determined by HPLC as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of six independent experiments.

\* $P < 0.05$  relative to control values.

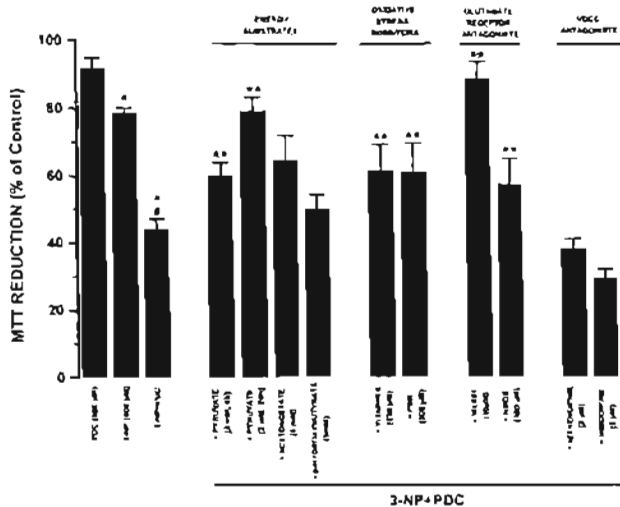


Fig. 4. Protective effects of the different compounds tested against neuronal damage induced by 4 hr of exposure to PDC (500  $\mu\text{M}$ ) + 3-NP (500  $\mu\text{M}$ ), as evaluated 24 hr later by the MTT reduction assay. All compounds were present during the 4 hr incubation period, except for pyruvate, which was also incubated during 24 hr. Note the protective effect of MK-801 and pyruvate. Data are mean  $\pm$  SEM;  $n = 6-8$  for neuroprotective agents;  $n = 30$  for 3-NP + PDC;  $n = 27$  for 3-NP alone; and  $n = 20$  for PDC alone. \* $P < 0.05$  relative to control nontreated cultures; # $P < 0.05$  relative to cultures exposed to 3-NP alone; and \*\* $P < 0.05$  relative to 3-NP + PDC.

tection when incubated during 4 hr with 3-NP and PDC. The protective effect of these compounds may be related to their capacity to restore the energy deficit induced by 3-NP by acting as substrates of the tricarboxylic acid cycle through their conversion to acetyl-CoA. This hypothesis is consistent with the observation that pyruvate can prevent the decrease in MTT reduction induced by 3-NP (Table III). In contrast, acetoacetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate did not restore mitochondrial activity in the presence of 3-NP. However, acetoacetate did improve neuronal survival in the presence of 3-NP + PDC. These results may indicate that acetoacetate might be used as a putative substrate of energy metabolism during severe injury, whereas pyruvate can also be utilized during mild energy depletion. No protective effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate was observed in the present study. As a precursor of acetoacetate,  $\beta$ -hydroxybutyrate has to be me-

TABLE III. Effects of 3-NP on Cell Survival and Protection by Different Compounds in Cerebellar Granule Cell Cultures<sup>†</sup>

Condition	MTT reduction (% of control)
3-NP (500 $\mu\text{M}$ )	78.5 $\pm$ 1.6*
+ Pyruvate (2 mM)	95.11 $\pm$ 7.1**
+ Acetoacetate (5 mM)	72.0 $\pm$ 10.0
+ $\beta$ -Hydroxybutyrate (5 mM)	70.72 $\pm$ 8.7
+ Vitamin E (250 $\mu\text{M}$ )	85.12 $\pm$ 8.1
+ PBN (500 $\mu\text{M}$ )	85.61 $\pm$ 4.0
+ MK801 (10 $\mu\text{M}$ )	93.41 $\pm$ 3.5**
+ NBQX (100 $\mu\text{M}$ )	78.23 $\pm$ 6.2

<sup>†</sup>Cultured cells were exposed during 4 hr to 3-NP in the absence or presence of several drugs used as putative neuroprotectants at concentrations indicated in parentheses. Cell survival was evaluated by MTT reduction 24 hr after drug exposure as described in Material and Methods. Data are mean  $\pm$  SEM for six to nine independent experiments for neuroprotectants;  $n = 27$  for 3-NP alone.

\* $P < 0.05$  relative to control values with no treatment.

\*\* $P < 0.05$  relative to 3-NP.

tabolized to acetoacetate before entering the TCA. Therefore, higher concentrations or prolonged exposure to this ketone body might be needed to achieve neuroprotection. Consistently with this suggestion, it was recently reported that  $\beta$ -hydroxybutyrate can protect dopaminergic cultured neurons against MPP<sup>+</sup> neurotoxicity after chronic exposure to a concentration of this ketone body higher than that used in the present study (Kashiwaya et al., 2000).

Substantial evidence supports the protective role of pyruvate in different experimental paradigms. Pyruvate can preserve synaptic function and morphological cell integrity of hippocampal slices in the absence of glucose and during glycolysis inhibition (Izumi et al., 1997) and protects against glutamate (Ruiz et al., 1998) and NMDA neurotoxicity in the absence of glucose, by a mechanism probably involving ATP production, increased mitochondrial respiration rate, and decreased free cytosolic calcium concentration (Villalba et al., 1994; Eimerl and Schramm 1995; Maus et al., 1999). Additionally, pyruvate protective effects might derive from its nonenzymatic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging capacity (Desagher et al., 1997). The improved protective efficacy of pyruvate when incubated during 24 hr may be related to this effect. Alternatively, it has recently been shown that pyruvate significantly increases the formation of kynurenic acid, an endogenous antagonist of NMDA recep-

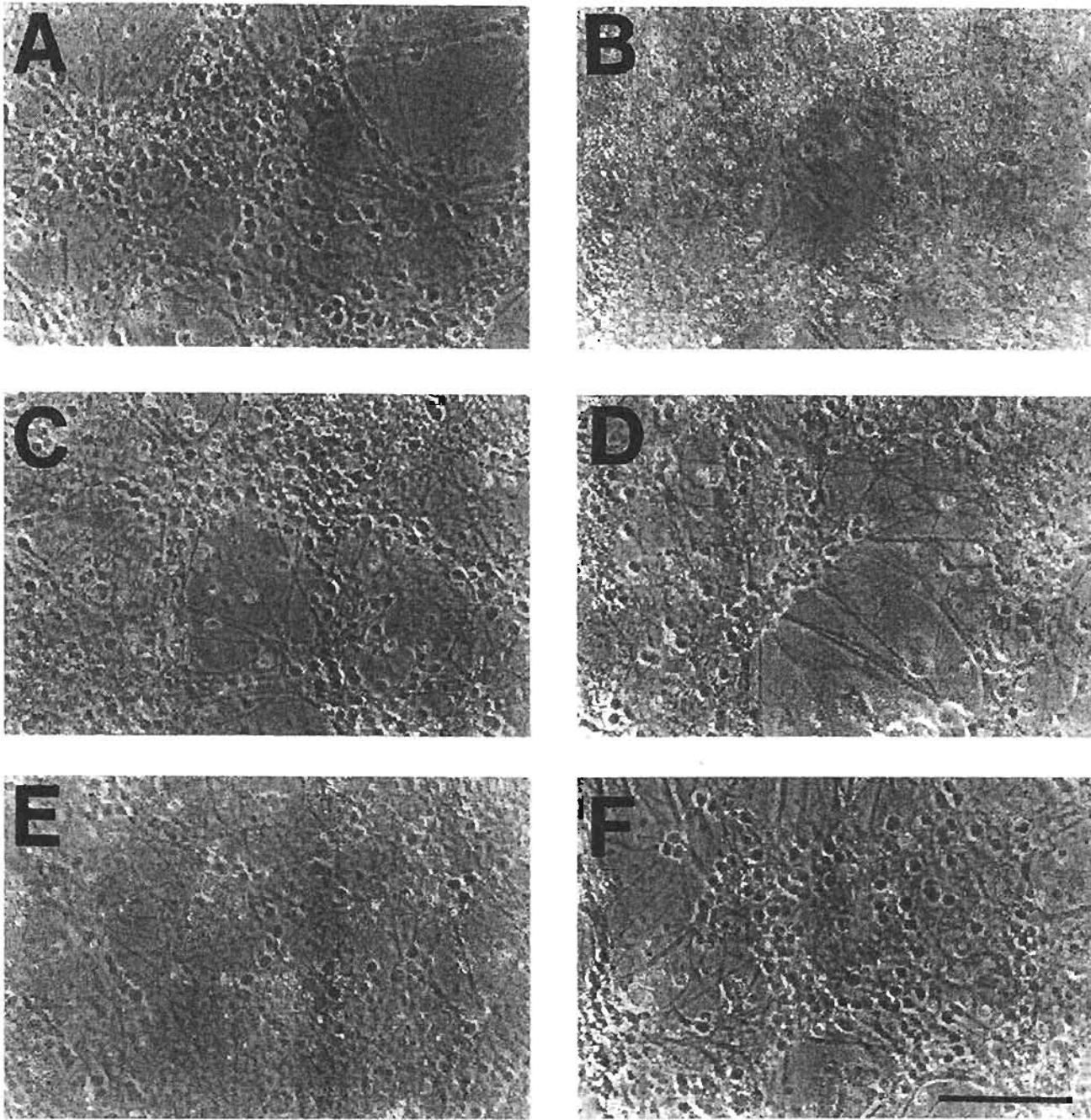


Fig. 5. Protective effects of some of the different compounds tested against neuronal damage induced by 4 hr of exposure to PDC (500  $\mu$ M) + 3-NP (500  $\mu$ M) evaluated morphologically 24 hr after the experiment. A: Control nontreated cultures. B: Cultures treated with PDC + 3-NP. C-F: Cultures treated with acetoacetate (C), pyruvate (D), vitamin E (E), and MK-801 (F). Scale bar = 100  $\mu$ m.

rors (Hodgkins and Schwarcz, 1998a). A similar effect has been found for the ketone bodies acetoacetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate (Hodgkins and Schwarcz, 1998b). In addition, acetoacetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate can also increase brain  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) levels after intraperitoneal injection (Daikhin and Yudkoff, 1998).

Notable protection was observed in the presence of the NMDA receptor antagonist MK-801. This result favors the proposed secondary excitotoxic hypothesis, suggesting that energy-limiting conditions owing to partial mitochondrial impairment or glycolysis inhibition lead to excitotoxically mediated neuronal death. According to this

hypothesis,  $Mg^{2+}$  ions that block the NMDA receptor channel during resting conditions may be extruded during impaired energy production owing to depolarization resulting from the loss of membrane ionic gradients as a consequence of  $Na^+/K^+$  ATPase inactivation. This would lead to  $Ca^{2+}$  influx and excitotoxicity even in the absence of substantial release of excitatory amino acids (Novelli et al., 1988; Zeevalk and Nicklas, 1990, 1992). This hypothesis is supported by the observation that MK-801 restored mitochondrial MTT reduction capacity after exposure of cultured neurons to 3-NP alone, a condition that did not enhance the extracellular levels of excitatory amino acids.

NBQX, a non-NMDA antagonist, showed partial protective effects against 3-NP + PDC-induced neuronal death and had no effect on 3-NP toxicity. This result is interesting in that it suggests the participation of AMPA receptors in ischemic neuronal death. Previous experiments have shown that cultured cerebellar granule neurons are not sensitive to AMPA neurotoxicity unless AMPA receptors desensitization is blocked by cyclothiazide (Hack and Balázs, 1995; Cebers et al., 1997). Interestingly, it has been recently found that AMPA neurotoxicity is highly potentiated during ATP-limiting conditions induced by sodium cyanide in cerebellar granule neurons by a  $Ca^{2+}$ -mediated mechanism, suggesting that regulation of AMPA receptor desensitization might be influenced by the energy state of the cell (Cebers et al., 1998). Alternatively, the NBQX protective effect might reflect the contribution of kainate receptors to PDC-mediated neurotoxicity: at the concentration used in this study (100  $\mu$ M), it can also block kainate receptors (Sheardown et al., 1990). In contrast, antagonists of the voltage-sensitive calcium channels did not protect at all against neuronal damage induced under our experimental conditions. This result suggests that  $Ca^{2+}$  influx through these channels might not be involved in excitotoxic calcium entry in our model.

Numerous studies favor the role of free radicals or oxidative stress in glutamate-induced neuronal death (Lafon-Cazal et al., 1993; Dugan et al., 1995; Gunasekar et al., 1995), and it was recently reported that mitochondrial toxins such as 3-NP and malonate increase reactive oxygen species both in vitro and in vivo (Kim et al., 2000; Zeevalk et al., 2000). Therefore, important increases in reactive oxygen species might be predicted in the presence of 3-NP + PDC. Results suggest that this is indeed the case; vitamin E and PBN partially protected neurons against the toxic effects of 3-NP + PDC coincubation. Interestingly, neither vitamin E nor PBN prevented decreases in MTT reduction induced by exposure to 3-NP alone probably, indicating that these compounds may be more efficient during severe rather than mild oxidative stress. These results are in accordance with previous studies showing the protective potentiality of PBN and the related spin trapper S-PBN against cell death induced by mitochondrial toxins both in vitro and in vivo (Schulz et al., 1996; Olsen et al., 1999).

In the present report we show the relevance of the use of energy substrates such as pyruvate and acetoacetate as neuroprotective agents in a model that may mimic ischemic damage. Experiments are now in progress to clarify the cellular events leading to neurotoxicity in this model and to help in understanding the protective mechanisms of the compounds tested.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Teresa Montiel for her technical assistance and Dr. Ricardo Tapia for providing us with the HPLC facilities for amino acid determinations.

## REFERENCES

- Ankarcrona M, Dybukt J, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15:961-973.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT. 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-aminopropionic acid. *J Neurosci* 13:4181-4192.
- Benveniste H, Drejer J, Schouboe A, Diemer NH. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43:1369-1374.
- Bemdge MV, Tan AS. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303:474-482.
- Blitzblau R, Gupta S, Djali S, Robinson MB, Rosenberg PA. 1996. The glutamate transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate indirectly evokes NMDA receptor mediated neurotoxicity in rat cortical cultures. *Eur J Neurosci* 8:1840-1852.
- Brewer GJ, Wallmann TW. 2000. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and  $\beta$ -amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 74:1968-1978.
- Bridges RJ, Stanley MS, Anderson MW, Cotman CW, Chamberlin AR. 1991. Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer. *J Med Chem* 34:717-725.
- Brouillet E, Hyman BT, Jenkins BG, Henshaw DR, Schulz JB, Sodhi P, Rosen BR, Beal MF. 1994. Systemic or local administration of azide produces striatal lesions by an energy impairment-induced excitotoxic mechanism. *Exp Neurol* 129:175-182.
- Budd SL, Nicholls DG. 1996. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 67:2282-2291.
- Cebers G, Zhivotovsky B, Ankarcrona M, Liljequist S. 1997. AMPA neurotoxicity in cultured cerebellar granule neurons: mode of cell death. *Brain Res Bull* 43:393-403.
- Cebers G, Ceber A, Liljequist S. 1998. Metabolic inhibition potentiates AMPA-induced  $Ca^{2+}$  fluxes and neurotoxicity in rat cerebellar granule cells. *Brain Res* 779:194-204.
- Daikhin Y, Yudkoff M. 1998. Ketone bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Dev Neurosci* 20:358-364.
- Desagher S, Glowinski J, Prémont J. 1997. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 17:9060-9067.
- Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LMT, Handran SD, Rothman SM, Lin T-S, Goldberg MP, Choi DW. 1995. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15:6377-6388.

- Eimerl S, Schramm M. 1995. Resuscitation of brain neurons in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  after toxic NMDA-receptor activity. *J Neurochem* 65:739-743.
- Erecinska M, Silver IA. 1989. ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:2-19.
- Erecinska M, Silver IA. 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Progr Neurobiol* 43:37-71.
- Greene JG, Greenamyre JT. 1995. Exacerbation of NMDA, AMPA and L-glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* 64:2332-2338.
- Greene JG, Porter RHP, Eller RV, Greenamyre JT. 1993. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *J Neurochem* 61:1151-1154.
- Greene JG, Sheu SS, Gross RA, Greenamyre JT. 1998. 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience* 84:503-510.
- Gunasekar PG, Kanthasamy AG, Borowitz JL, Isom GE. 1995. NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J Neurochem* 65:2016-2021.
- Hack N, Balázs R. 1995. Properties of AMPA receptors expressed in rat cerebellar granule cell cultures:  $\text{Ca}^{2+}$  influx studies. *J Neurochem* 65:1077-1084.
- Henneberry RC. 1989. The role of neuronal energy in the neurotoxicity of excitatory amino acids. *Neurobiol Aging* 10:611-613.
- Hodgkins PS, Schwarz R. 1998a. Interference with cellular energy metabolism reduces kynurenic acid formation in rat brain slices: reversal by lactate and pyruvate. *Eur J Neurosci* 10:1986-1994.
- Hodgkins PS, Schwarz R. 1998b. Metabolic control of kynurenic acid formation in the rat brain. *Dev Neurosci* 20:408-416.
- Izumiyama Y, Benz AM, Zorumski CF, Olney JW. 1994. Effects of lactate and pyruvate on glucose deprivation in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 5:617-620.
- Izumiyama Y, Benz AM, Kasuki H, Zorumski CF. 1997. Endogenous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. *J Neurosci* 17:9448-9457.
- Kashiwaya Y, Takashima T, Mori N, Nakashima K, Clarke K, Vecch RL. 2000. D-β-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5440-5444.
- Kim GW, Copin J-C, Kawase M, Chen S, Sato S, Gobbel GT, Chan PH. 2000. Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:119-129.
- Kristján T, Siesjö BK. 1997. Changes in ionic fluxes during cerebral ischaemia. *Int Rev Neurobiol* 40:27-45.
- Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. 1993. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364:535-537.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69:581-593.
- Longuemare MC, Rose CR, Farrell K, Ransom BR, Waxman SG, Swanson RA. 1999.  $\text{K}^{+}$ -induced reversal of astrocyte glutamate uptake is limited by compensatory changes in intracellular  $\text{Na}^{+}$ . *Neuroscience* 93:285-292.
- Malcon C, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. 2000. Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. *Brain Res* 860:195-198.
- Manev H, Favaron M, Siman R, Guidotti A, Costa E. 1991. Glutamate neurotoxicity is independent of calpain I inhibition in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 57:1288-1295.
- Massieu L, Morales-Villagran A, Tapia R. 1995. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 64:2262-2272.
- Massieu L, Gómez-Román N, Montiel T. 2000. In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp Neurol* 165:257-267.
- Matthews RL, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. 1998. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. 18:156-163.
- Maus M, Mann P, Israël M, Glowinski J, Prémont J. 1999. Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11:3215-3224.
- Milani D, Guidolin D, Facci L, Pozzan T, Buso M, Leon A, Skaper SD. 1991. Excitatory amino acid-induced alterations of cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  in individual cerebellar granule neurons: role in neurotoxicity. *J Neurosci Res* 28:434-441.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Murphy AN, Fiskum G, Beal MF. 1999. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:231-245.
- Novelli A, Reilly J, Lysko PG, Henneberry RC. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 451:205-212.
- Olson C, Rustad A, Fonnun F, Paulsen RE, Hassel B. 1999. 3-Nitropropionic acid: an astrocyte-sparing neurotoxin in vitro. *Brain Res* 850:144-149.
- Rossi DJ, Oshima T, Arsvell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
- Ruiz F, Alvarez G, Pereira R, Hernández M, Villalba M, Cruz F, Cerlán S, Bogónez E, Sarrástegui J. 1998. Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *NeuroReport* 9:1277-1282.
- Sánchez-Carbente MR, Massieu L. 1999. Transient inhibition of glutamate uptake in vivo induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J Neurochem* 72:129-138.
- Sandberg M, Butcher SP, Hagberg H. 1986. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem* 47:178-184.
- Satler R, Charlton MP, Hafner M, Tyminski M. 1998. Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem* 71:2349-2364.
- Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 16:6125-6133.
- Schulz JB, Henshaw DR, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Rosen BR, Beal MF. 1994. 3-Acetylpyridine produces age-dependent excitotoxic lesions in rat striatum. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:1024-1029.
- Schulz J, Matthews RT, Henshaw DR, Beal MF. 1996. Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins: implications for neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 71:1043-1048.
- Schurr A, West CA, Rigor BM. 1988. Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science* 240:1326-1328.
- Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honoré T. 1990. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 247:571-574.
- Sheline CT, Behrens M, Choi DW. 2000. Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of  $\text{NAD}^{+}$  and inhibition of glycolysis. *J Neurosci* 20:3139-3146.
- Silver IA, Deas J, Erecinska M. 1997. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cell. *Neuroscience* 78:589-601.
- Storey E, Hyman BT, Jenkins B, Brouillet E, Miller JM, Rosen BR, Beal MF. 1992. 1-Methyl-4-phenylpyridinium produces excitotoxic lesions in rat striatum as a result of impairment of oxidative metabolism. *J Neurochem* 58:1975-1978.

- Velasco I, Morán J, Tapia R. 1995. Selective neurotoxicity of ruthenium red in primary cultures. *Neurochem Res* 20:599–604.
- Velasco I, Tapia R, Massieu L. 1996. Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J Neurosci Res* 44:551–561.
- Villalba M, Martínez-Serrano A, Gómez-Puertas P, Blanco P, Börner C, Villa A, Casado M, Giménez C, Pereira R, Bogonez E, Pozzan T, Sarrústegui J. 1994. The role of pyruvate in neuronal calcium homeostasis. *J Biol Chem* 269:2468–2476.
- Volterra A, Bezzi P, Lodi Rizzini B, Trotti D, Ullensvang K, Danbolt NC, Racagni G. 1996. The competitive transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur J Neurosci* 8:2019–2028.
- Zeevalk GD, Nicklas WJ. 1990. Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Ther* 253:1285–1292.
- Zeevalk GD, Nicklas WJ. 1992. Evidence that the loss of the voltage-dependent  $Mg^{2+}$  block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlines receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem* 59:1211–1220.
- Zeevalk GD, Bernard LP, Nicklas WJ. 2000. Oxidative stress during energy impairment in mesencephalic cultures is not a downstream consequence of a secondary excitotoxicity. *Neuroscience* 96:309–316.



## IX. REFERENCIAS

- Almeida A, Allen KL, Bates TE, Clark JB. 1995. Effects of reperfusion following cerebral ischaemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain. **J. Neurochem.** 65: 1698-1703.
- Almeida A, Heales SJR, Bolaños JP, Medina JM. 1998. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. **Brain Res.** 790: 209-216.
- Almeida A, Bolaños JP. 2001. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. **J. Neurochem.** 77: 676-690.
- Almeida A, Almeida J, Bolaños JP, Moncada S. 2001. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. **Proc Natl. Acad. Sci. USA.** 98: 15294-15299.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicoretta P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron.** 15: 961-973.
- Beal FM, Brouillet E, Jenkins BG, et al., 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. **J. Neurosci.** 13: 4181-4192.
- Bedner E, Li X, Gorczyza W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. 1999. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. **Cytometry.** 35: 181-195.
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. **J. Neurochem.** 43: 1369-1374.
- Benveniste H, Jorgensen MB, Sanberg M, et al. 1989. Ischemic damage in hippocampal CA1 is dependent on glutamate release and intact innervation from CA3. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 9: 629-693.
- Bernas T, Dobrucki J. 2002. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1 and NAO mitochondrial fluorescent probes. **Cytometry.** 47: 236-242.
- Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. 1996. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. **J. Neurosci.** 16: 1324-1336.
- Bittigau P, Ikonomidou C. 1997. Glutamate in neurological diseases. **J. Child. Neurol.** 12: 471-485.
- Brouillet E, Hyman BT, Jenkins BG, Henshaw DR, Schulz JB, Sodhi P, Rosen BR, Beal MF. 1994. Systemic or local administration of azide produces striatal lesions by energy impairment-induced excitotoxic mechanism. **Exp. Neurol.** 129: 175-82.
- Budd SL, Nicholls DG. 1996. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **J. Neurochem.** 67: 2282-2291.
- Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA. 2000. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97: 6161-6166.
- Cebers G, Cebere A, Wagner A, Liljequist S. 1999. Prolonged inhibition of glutamate reuptake down-regulates NMDA receptor functions in cultured cerebellar granule cells. **J. Neurochem.** 72: 2181-2190.
- Chan PH. 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke.** 27: 1124-1129.

- Chan PH, Kawase M, Murakami K, Chen SF, Li Y, Calaguin B, Reola L, Carlson E, Epstein C. 1998. Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebellar ischemia and reperfusion. *J. Neurosci.* 18: 8292-8299.
- Chen Y, Swanson RA. 2003. The glutamate transporter EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neurons culture. *J. Neurochem.* 84: 1332-1339.
- Cheung NS, Pascoe CJ, Giardina SF, John CA, Beart PM. 1998. Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurons. *Neuropharmacology.* 37: 1419-1429.
- Choi DW. 1987. Ionic dependence of glutamate of glutamate neurotoxicity in cortical cell cultures. *J. Neurosci.* 7: 369-379.
- Choi, DW. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1: 623-634.
- Choi DW. 1996. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 667-672.
- Coilier TJ, Steece-Coilier K, McGuine S, Sortwell CE. 2003. Cellular models to study dopaminergic injury responses. *Ann. NY Acad. Sci.* 991: 140-151.
- Cole KK, Pérez-Polo JR. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury. *J. Neurochem.* 82: 19-29.
- Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore its role in cell death. *Biochem. J.* 341: 233-249.
- Daikhin Y, Yudkoff M. 1998. Ketonic bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Dev. Neurosci.* 20: 358-364.
- Desagher S, Glowinski J, Premont, J. 1997. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J. Neurosci.* 17: 9060-9067.
- Dessi F, Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. 1994. Glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture is mediated by two distinct components: a sodium-chloride component and a calcium component. *Brain Res.* 650: 49-55.
- Dietrich DW. 1998. Neurobiology of stroke. *Int. Rev. Neurobiol.* 42: 55-101.
- Dröge W. 2001. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.
- Eimerl S, Schramm M. 1995. Resuscitation of brain neurons in the presence of Ca<sup>2+</sup> after toxic NMDA-receptor activity. *J. Neurochem.* 65: 739-743.
- Erecinska M, Silver I. 1989. ATP and brain function. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9: 2-19.
- Feng Wang X, Cynader MS. 2001. Pyruvate release by astrocytes protects neurons from copper-catalyzed cysteine neurotoxicity. *J. Neurosci.* 21: 3322-3331.
- Fink S, Do DY, Sapolsky R. 1996. Energy and glutamate dependency of 3-nitropropionic acid neurotoxicity in culture. *Exp. Neurol.* 138: 298-304.
- Fiskum G, Murphy AN, Beal MF. 1999. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19: 351-369.

- Fujita H, Sato K., Wen T-C, Peng Y, Sakanaka M. 1999. Differential expressions of glycine transporter 1 and three glutamate transporter mRNA in the hippocampus of gerbils with transient forebrain ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 19: 604-615.
- García-Nogales P, Almeida A, Bolaños JP. 2003. Peroxynitrate protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. **J. Biol. Chem.** 278: 864-874.
- Ginsberg MD. 1993. Emerging strategies for the treatment of ischemic brain injury. En Molecular and cellular approaches to the treatment of neurological disease. (Waxman SG, Ed). Raven-Press, New York. Pp. 207-237.
- Goldberg WJ, Kadingo RM, Barrett JN. 1986. Effects of ischemia-like conditions on cultured neurons: protection by low Na<sup>+</sup>, low Ca<sup>2+</sup> solution. **J. Neurosci.** 11: 3144-3155.
- Goldberg MP, Choi DW. 1993. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanism of neuronal injury. **J. Neurosci.** 13: 3510-3524.
- Graham SH, Chen J. 2001. Programmed cell death in cerebellar ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 21: 99-109.
- Graham SH, Shiraishi K, Panter SS, et al, 1990. Changes in extracellular amino acid neurotransmitters produced by focal cerebral ischemia. **Neurosci. Lett.** 110: 124-130.
- Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. **Science.** 281: 1309-1312.
- Greene JG, Porter, RH, Eller RV, Greenamyre T. 1993. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. **J. Neurochem.** 61: 1151-1154.
- Greene JG, Greenamyre JT. 1995. Exacerbation of NMDA, AMPA and L-glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate. **J. Neurochem.** 64: 2332-2338.
- Greene JG, Sheu S-S, Gross, RA, Greenamyre, JT. 1998. 3-nitropropionic acid exacerbates N-Methyl-D-Aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. **Neuroscience.** 84: 503-510.
- Hakim AM. 1998. Ischemic penumbra. The therapeutic window. **Neurology.** 51: S44-S46.
- Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and central nervous system. **J. Neurochem.** 59 1609-1623.
- Harada J, Sugimoto M. 1998. Inhibitors of interleukin-1 beta-converting enzyme-family proteases (caspases) prevent apoptosis without affecting decreased cellular ability to reduce 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide in cerebellar granule neurons. **Brain Res.** 793: 231-243.
- Hasbani MJ, Hyrc KL, Faddis BT, Romano C, Goldberg C, 1998. Distinct role for sodium, chloride, and calcium in excitotoxic dendritic injury and recovery. **Exp. Neurol.** 154 : 241-258.
- Hassel B. 2001. Pyruvate carboxylation in neurons. **J. Neurosci. Res.** 66: 755-762.
- Haugland, R. 1996. Handbook of fluorescent probes and research chemical. 6<sup>th</sup> ed. Molecular Probes. USA.
- Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants, comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Rad. Biol. Med.** 27: 146-159.

- Himi T, Ikeda M, Yasuharara T, Nishida M, Morita I. 2003. Role of neuronal glutamate transporter in the cysteine uptake and intracellular glutathione levels in cultured cortical neurons. **J. Neural. Transm.** 110: 1337-1348.
- Hodgkins P, Schwarcz R. 1998. Interference with cellular energy metabolism reduces kynurenic acid formation in rat brain slices: reversal by lactate and pyruvate. **Eur. J. Neurosci.** 10: 1986-1994.
- Holt, W.F. 1997. Glutamate in Health and disease: the role of inhibitors. En Neuroprotection in CNS diseases (Bar PR, Beal MF, Ed.). Marcel Dekker, USA. pp.87-120.
- Isaev NK, Zorov DB, Stelmashook EV, Uzbekov RE, Kozhemyakin MB, Victorov IV. 1996. Neurotoxic glutamate treatment of cultured cerebellar granule cells induces  $Ca^{2+}$ -dependent collapse of mitochondrial membrane potential and ultrastructural alterations of mitochondria. **FEBS Lett.** 392: 143-147.
- Jabaudon D, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U. 2000. Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 97: 5610-5615.
- Jorgensen NK, Petersen SF, Damgaard I, Schousboe A, Hoffmann EK. 1999. Increase in  $[Ca^{2+}]_i$  and changes in intracellular pH during chemical anoxia in mouse neocortical neurons in primary cultures. **J. Neurosci. Res.** 56: 358-370.
- Kaal ECA, Vlug AS, Versleijen MWJ, Kuilman M, Joosten EAJ, Dop Bar PR. 2000. Chronic mitochondrial inhibition induces selective motoneuron death in vitro: a new model for amyotrophic lateral sclerosis. **J. Neurochem.** 1158-1165.
- Karpiak SE, Tagliavia A, Wakade CG. 1989. Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 29: 403-414.
- Kashiwaya Y, Takeshima T, Mori N, Nakashima K, Clarke K, Veech RL. 2000. D-β-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson disease. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 97: 5440-5444.
- Kim SU. 1994. Tissue culture models on neurodegeneration. En Neurodegenerative Diseases. (Calne DB, Ed). W.B. Saunder Company. Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 127-138.
- Kotake Y, Onta S. 2003. MPP<sup>+</sup> analogs acting on mitochondrial and inducing neurodegeneration. **Curr. Med. Chem.** 10: 2507-2516.
- Lafón-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. 1993. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. **Nature.** 364: 535-537.
- Lee J-Y, Kim Y-H, Koh J-Y. 2001. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. **J. Neurosci.** 21: RC171 (1-6).
- Lee WT, Yin HS, Shen YZ. 2002. The mechanism of neuronal death produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: the roles of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and mitochondrial calcium overload. **Neuroscience.** 112: 707-716.
- Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kuhnle S, Nicotera P. 1999. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis and necrosis. **Exp. Cell Res.** 249: 396-403.
- Lipton P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol. Rev.** 79: 1431-1568.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J. Neurochem.** 69: 581-593.

- Lobner D. 2000. Comparison of the LDH and MTT assay for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **J. Neurosci. Meth.** 96: 147-152.
- Love S. 1999. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain Pathol.** 9: 119-131.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis-Farr A, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Lu X, Sinha AK, Weiss HR. 1997. Effects of excitatory amino acids on cerebral oxygen consumption and blood flow in rat. **Neurochem Res.** 22: 705-711.
- Lucas DR, Newhouse JP. 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **Arch. Ophthal.** 58: 193-201.
- Mackert BM, Staub F, Peters J, Baethmann A, Kempfski O. 1996. Anoxia in vitro does not induce neuronal swelling or death. **J. Neurol. Sci.** 139: 39-47.
- Mailly F, Marin P, Israel M, Glowinsky J, Prémont J. 1999. Increase in external glutamate and NMDA receptor activation contribute to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neuronal apoptosis. **J. Neurochem.** 73: 1181-1188.
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsc J, Sieber F, Portera-Cailliau C. 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia and traquet deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **Brain Res. Bull.** 46: 281-309.
- Massieu L, Morales-Villagran A, Tapia R. 1995. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake in not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. **J. Neurochem.** 64: 2262-2272.
- Massieu L, Tapia R. 1997. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rat in vivo. **J. Neurochem.** 69: 1151-1160.
- Massieu L, García O. 1998. The role of excitotoxicity and metabolic failure in the pathogenesis of neurological disorders. **Neurobiology.** 6: 99-108.
- Massieu L. 1999. Muerte por excitotoxicidad. En Enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares. (Pasantes H, et al., Ed). Fondo de Cultura Económica, México. pp. 64-79.
- Massieu L, Gómez-Román N, Montiel T. 2000. In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. **Exp. Neurol.** 165: 257-267.
- Massieu L, Del Rio P, Montiel T. 2001. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinato dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. **Neuroscience.** 106: 669-677.
- Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernández-Fonseca K. 2003. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage. **Neuroscience.** 120: 365-378.
- Maus M, Marin P, Israël M, Glowinski J, Prémont J. 1999. Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. **Eur. J. Neurosci.** 11: 3215-3224.
- Minervini M, Atlante A, Gagliardi S, Ciotti MT, Marra E, Calissano P. 1997. Glutamate stimulates 2-deoxyglucose uptake in rat cerebellar granule cells. **Brain Res.** 768: 57-62.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **J. Immunol. Methods.** 65: 55-63.

- Murphy AN, Fiskum G, Beal MF. 1999. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. **J. Cereb. Flow Metab.** 19: 231-245.
- Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. 1993. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. **Prog. Neurobiol.** 40: 163-221.
- Nicholls DG, Budd SL. 1998. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. **Biochim. Biophys. Acta.** 1366: 97-112.
- Nicholls DG, Vesce S, Kirk L, Chalmers S. 2003. Interactions between mitochondrial bioenergetics and cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. **Cell Calcium.** 34: 407-424.
- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry, RC. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. **Brain Res.** 451: 205-212.
- Obrenovitch TP, Urenjak J. 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. **Prog. Neurobiol.** 51: 39-87.
- Olney JW. 1969. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science.** 164: 719-721.
- Olney JW. 1979. Excitotoxic amino acids: researchs applications and safety implications. En *Glutamic acid advances in biochemistry.* (Filder LJ, Ed). Raven Press, New York. pp. 287-319.
- Pang Z, Geddes JW. 1997. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and deleyed apoptosis. **J. Neurosci.** 17: 3064-3073.
- Peng TI, Greenamyre T. 1998. Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. **Mol. Pharmacol.** 53: 974-980.
- Pellerin L, Magistretti PJ. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91: 10625-10629.
- Raghavendra Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim B-T, Rothstein JD, Dempsey RJ. 2001. Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuroanl damage in rat brain. **J. Neurosci.** 21: 1876-1883.
- Ré DB, Boucrat J, Samuel D, Birman S, Kerkerian-Le Goff L, Had-Aissouni L. 2003. Glutamate transport alteration triggers differentiation-state selective oxidative death of cultured astrocytes: a mechanism different from excitotoxicity depending on intracellular GSH contents. **J. Neurochem.** 85: 1159-1170.
- Rosenbaum DM, Michaelson M, Batter DK, Doshi P, Kessler JA. 1994. Evidence for hypoxia-induced, programmed cell death of cultured neurons. **Ann. Neurol.** 36: 864-870.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. **Nature.** 403: 316-321.
- Ruiz F, Alvarez G, Pereira R, Hernández M, Villalba M, Cruz F, Cerdán S, Bogónez E, Satriústegui J. 1998. Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. **Neuroreport.** 9: 1277-1282.
- Sacco, RL. 1998. Identifying patient populations at highh risk for stroke. **Neurology.** 51: S27-S30.
- Sakaguachi T, Kuno M, Kawasaki K. 1999. Disparity of cell swelling and rapid neuronal death by excitotoxic insults in rat hippocampal slices cultures. **Neurosci Lett.** 274: 135-138.

- Sanchez-Carbente MR, Massieu L. 1999. Transient inhibition of glutamate uptake in vivo induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired. *J. Neurochem.* 72: 129-138.
- Sattler R, Charlton MP, Hafner M, Tymianski M. 1998. Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J. Neurochem.* 71: 2349-2364.
- Schinder AF, Olson ER, Spitzer NC, Montal M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary even in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16: 6125-6133.
- Schulz JB, Henshaw DR, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Rosen BR, Beal MF. 1994. 3-Acetylpyridine produces age-dependent excitotoxic lesions in rat striatum. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 1024-1029.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 267: 4904-4911.
- Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, et al., 1990. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science.* 247: 571-574.
- Sheline CT, Behrens MM, Choi DW. 2000. Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD<sup>+</sup> and inhibition of glycolysis. *J. Neurosci.* 20: 3139-3146.
- Simon PR, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS. 1984. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptor may protect against ischemic damage in the brain. *Science.* 226: 850-852.
- Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. 2004. Mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J. Neurosci.* 24: 7779-7788.
- Storey E, Hyman BT, Jenkis B, Brouillet E, Miller JM, Rosen BR, Beal MF. 1992. L-Methyl-4-phenylpyridinium produces excitotoxic lesions in rat striatum as a result of impairment of oxidative metabolism. *J. Neurochem.* 58: 1975-1978.
- Tietze F. 1996. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione, applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.
- Torp R, Lekieffre D, Levi LM, Haug FM, Danbolt NC, Meldrum BS, Ottersen OP. 1995. Reduced postischemic expression of glial glutamate transporter, GLT1, in the rat hippocampus. *Exp. Brain Res.* 103: 51-58.
- Tretter L, Adam-Vizi V. 2000. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J. Neurosci.* 20: 8972-8979.
- Tretter L, Adam-Vizi V. 2004. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase. *J. Neurosci.* 24: 7771-7778.
- Uto A, Dux E, Kusumoto M, Hossman KA. 1995. Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *J. Neurochem.* 64: 2185-2192.
- Varming T, Drejer J, Frandsen A, Schousboe A. 1996. Characterization of a chemical anoxia model in cerebellar granule neurons using sodium azide: protection by nifedipine and MK-801. *J. Neurosci. Res.* 44: 40-46.
- Veech RL, Chanche B, Kashiwaya Y, Lardy HA, Cahill GF. 2001. Ketone bodies potential therapeutic uses. *IUBMB Life.* 51: 241-247.

Vergun O, Keelan J, Khodorov BI, Duchon MR. 1999. Glutamate-induced mitochondrial depolarization and perturbation of calcium homeostasis in cultured rat hippocampal neurons. **J. Physiol.** 519: 451-466.

Villalba M, Martínez-Serrano A, Gómez-Puertas P, Blanco P, Börner C, Villa A, Casado M, Giménez C, Pereira R, Bogonez E., Pozzan T, Satrustegui J. 1994. The role of pyruvate in neuronal calcium homeostasis. **J. Biol. Chem.** 269: 2468-2476.

Voutsinos-Porche B, Bonveo G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton J-Y, Magistretti PJ and Pellerin L. 2003. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. **Neuron.** 37: 275-286.

Weller M, Paul S. 1993. 3-Nitropropionic acid is an indirect excitotoxin to cultured cerebellar granule neurons. **Eur. J. Pharmacology.** 248: 223-228.

White R, Reynolds IJ. 1996. Mitochondrial depolarizations in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. **J. Neurosci.** 16: 5688-5697.

Wulff K. 1985. NADH/NADPH, luminometric method. En *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer), vol VII, 280-284.

[www.ssa.gob.mx](http://www.ssa.gob.mx)

Yang G, Chan PH, Chen J, Carlson E, Chen SF, Weinstein P, Epstein CJ and Kamii H. 1994. Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. **Stroke.** 25: 165-170.

Yue X, Mehmet H, Penrice J, Cooper C, Cady E, Wyatt JS, Reynolds EO. 1997. Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia. **Neurosci. Lett.** 240: 21-24.

Zeevalk G, Nicklas W. 1992. Evidence that the loss of the voltage-dependent  $Mg^{2+}$  block at the N-Methyl-D-Aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neural metabolism. **J. Neurochem.** 59: 1211-1220.

Zhao X, Newcomb JK, Pike BR, Wang K-KW, D'Avella D, Hayes RL. 2000. Novel characteristics of glutamate-induced cell death in primary septohippocampal cultures: relationship to calpain and caspase-3 protease activation. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 20: 550-562.