



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFFECTO DE SUSTRATOS ENERGÉTICOS
SOBRE LA DEGENERACIÓN DE
MOTONEURONAS ESPINALES *IN VIVO*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

Q.A. LUZ DIANA SANTA CRUZ DE ALBA



DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA

MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EFFECTO DE SUSTRATOS ENERGÉTICOS SOBRE LA DEGENERACIÓN DE MOTONEURONAS ESPINALES *IN VIVO*

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT (7306).

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM
VOCAL	Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
SECRETARIA	Dra. Rocío Salceda Sacanelles	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
SUPLENTE	Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
SUPLENTE	Dr. José Bargas Díaz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

DEDICATORIA

A mi padre Enrique Santa Cruz Castillo,
in memoriam

A mi madre Guadalupe de Alba y mis
hermanos Enrique, Fabiola, Martha y
Natalia

A mis abuelos Jesús de Alba, María de la
Luz Amador, Guadalupe Castillo y
Enrique Santa Cruz, *in memoriam*

A toda mi familia

AGRADECIMIENTOS

A Dios por el gran regalo de la vida y los dones recibidos, por el amor, la fortaleza y la paz que he recibido de Él.

Al Dr. Ricardo Tapia por darme la oportunidad de hacer investigación en su laboratorio, por todas sus enseñanzas y experiencia compartida, sus comentarios y por el apoyo que siempre me ha brindado.

A los doctores Julio Morán y Jorge Vázquez, miembros de mi comité tutorial de maestría, por todos sus comentarios, enseñanzas, apoyo y aportaciones hechas al presente trabajo.

A los miembros del jurado por la revisión, comentarios y aportaciones hechos a la presente tesis.

A todos con los que he compartido el trabajo y muchos momentos agradables en el laboratorio a Tere, a Luis, a Uri, a Marina, a Paty, a Xóchitl, a Layla, y muy especialmente a Carlos quien fue mi maestro a mi llegada al laboratorio, y a Gaby Vera quien ha sido una gran amiga, gracias por el apoyo y tantas pláticas. Gracias a todos por todo lo que hemos compartido y porque de cada uno he aprendido cosas muy valiosas.

A mi alumnito Rodrigo, gracias por la amistad, por todos los momentos compartidos y por hacer el trabajo del laboratorio mucho más agradable y divertido.

A mi papito por ser el mejor padre del mundo, por tus enseñanzas, sabiduría, ejemplo de vida y sobre todo por tu gran amor, porque aunque ya no estás físicamente con nosotros sí estás presente espiritualmente.

A mi mamá y mis hermanos Fabi, Martis, Naty y Quique, gracias por su gran amor, su apoyo incondicional, su amistad y enseñanzas. A mis sobrinitos Estebancito y Ana Regi por traer tanta alegría a nuestras vidas. También agradezco a mis cuñados Ceci y Witek por su apoyo y tantos momentos agradables.

A mis 4 abuelos por su gran sabiduría, amor, apoyo, ejemplo y enseñanzas.

A toda mi familia, primos, primas, tías y tíos por su amor y apoyo siempre, por tantos y tantos momentos tan agradables.

A todos mis amigos (Paco, Bruno, Enrique Mar, Yola y Luis Curiel, Lidia, Zaira, Gisela Valencia, Gaby Apáez, mis amigos de las misiones y todos los que me falten) por su apoyo y por hacer el caminar en esta vida mucho más bello, por tantos momentos compartidos y por el gran cariño.

A Lety García por su constante apoyo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
I. INTRODUCCIÓN	4
Neurotransmisión glutamatérgica.....	4
Neurodegeneración.....	12
Excitotoxicidad y neurodegeneración.....	13
Calcio, mitocondria, estrés oxidativo y su relación con la muerte neuronal.....	17
II. ANTECEDENTES	24
Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS).....	24
Las mutaciones en la SOD1 son la causa de un tipo de FALS.....	26
Hipótesis de la excitotoxicidad mediada por glutamato como causa de la ALS.....	28
Mitocondria y ALS.....	31
Estrés oxidativo en la ALS.....	32
Modelo <i>in vivo</i> de degeneración aguda de motoneuronas espinales por excitotoxicidad.....	34
Sustratos energéticos y antioxidantes como neuroprotectores.....	36

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
IV. HIPÓTESIS	39
V. OBJETIVOS	40
VI. METODOLOGÍA	40
Cirugía y microdiálisis en la médula espinal.....	40
Evaluación de la función motora.....	42
Evaluación histológica.....	42
Inmunohistoquímica.....	43
Análisis de aminoácidos extracelulares.....	43
Análisis estadístico.....	44
VII. RESULTADOS	45
Control.....	45
Lactato.....	46
α -cetobutirato.....	51
β -hidroxibutirato.....	54
Ascorbato.....	58

VIII. DISCUSIÓN.....	64
Participación de las deficiencias de la función mitocondrial y del metabolismo energético, y del estrés oxidativo en la muerte de motoneuronas espinales.....	64
- <i>Mecanismos de neuroprotección del lactato, del piruvato y del α-cetobutirato.....</i>	<i>64</i>
- <i>Mecanismos de neuroprotección del β-hidroxibutirato.....</i>	<i>69</i>
- <i>Mecanismos de neuroprotección del ascorbato.....</i>	<i>71</i>
- <i>Participación de las deficiencias energética y de la función mitocondrial en la muerte excitotóxica de las motoneuronas espinales.....</i>	<i>74</i>
- <i>Participación del estrés oxidativo en la muerte excitotóxica de las motoneuronas espinales.....</i>	<i>78</i>
Existe un umbral en el número de motoneuronas necesario para prevenir las alteraciones motoras y la parálisis en las ratas.....	80
IX. CONCLUSIONES.....	86
REFERENCIAS.....	88

RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS por sus iniciales en inglés) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la degeneración selectiva y progresiva de las motoneuronas, lo que causa una parálisis también progresiva que culmina con la muerte por paro respiratorio. Esta muerte de las motoneuronas ha sido asociada a la excitotoxicidad debida a una excesiva neurotransmisión glutamatérgica, particularmente por la sobreactivación de los receptores tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato). Previamente nuestro grupo desarrolló un modelo *in vivo* en rata de muerte excitotóxica de motoneuronas espinales en la región lumbar por medio de la perfusión de AMPA por microdiálisis. Este tratamiento produjo una parálisis ipsilateral permanente y la muerte de las motoneuronas por un mecanismo dependiente de la entrada de Ca^{2+} . La concentración intracelular excesiva de Ca^{2+} daña a las neuronas a través de varios mecanismos, entre ellos la deficiencia de la función mitocondrial y trastornos del metabolismo energético, y el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Con objeto de estudiar la posible participación de la deficiencia mitocondrial y del estrés oxidativo en la degeneración de las motoneuronas, probamos los posibles efectos neuroprotectores de varios sustratos que pueden actuar por medio de dos mecanismos, ya sea estimulando el metabolismo energético o como antioxidantes. Estudiamos el lactato, el α -cetobutirato, el β -hidroxibutirato y el ascorbato a diferentes concentraciones, co-perfundiéndonlos con el AMPA por microdiálisis en la médula espinal lumbar de la rata. Se realizaron evaluaciones de la función motora con la prueba del rotarod y los análisis histológicos del segmento lumbar perfundido, y se correlacionó el número de motoneuronas con el desempeño motor. Se observó muy buena protección con la perfusión del α -cetobutirato a una concentración de 20 mM, tanto histológicamente como en la conducta motora. La perfusión de β -hidroxibutirato y lactato también protegió de manera significativa pero a concentraciones mayores (50 mM y 100 mM respectivamente). Por otro lado, la perfusión de ascorbato ejerció solamente una protección parcial aun a concentraciones de hasta 50 mM. Nuestros resultados indican que las deficiencias mitocondriales y en el metabolismo energético están involucradas de manera significativa en la muerte de las motoneuronas espinales inducida por la sobreactivación de los receptores al glutamato tipo AMPA *in vivo*, y que el estrés oxidativo parece estar participando en menor proporción dada la protección parcial ejercida por el ascorbato y por el hecho de que los otros sustratos también tienen propiedades antioxidantes.

Concluimos asimismo que existe un umbral en el número de motoneuronas necesario para prevenir las alteraciones motoras y la parálisis, ya que el análisis de los resultados obtenidos con todas las condiciones probadas en este modelo en este y trabajos previos, muestran que existe una clara correlación entre la sobrevivencia de motoneuronas y la función motora. Así, mientras se preserve más del 50 % de las motoneuronas, se evitan tanto las alteraciones en el desempeño motor como la parálisis, mientras que cuando no se supera este umbral de protección ocurre un déficit parcial en el desempeño motor, y cuando hay una pérdida severa de motoneuronas se produce inevitablemente la parálisis.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by selective and progressive motoneuron degeneration leading to progressive paralysis and finally death due to respiratory failure. Motoneuron death has been associated to excitotoxicity caused by an excessive glutamatergic neurotransmission, particularly as a result of the AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate) receptor overactivation. Previously, our group developed an *in vivo* model of spinal motoneuron excitotoxic death by means of microdialysis perfusion of AMPA in the lumbar region of the rat spinal cord. This treatment produced a permanent paralysis of the ipsilateral hindlimb and death of motoneurons by a Ca^{2+} -entry dependent mechanism. Excessive intracellular calcium concentration causes neuronal injury through several mechanisms, including mitochondrial function deficiency and energy metabolism disorders, and increased reactive oxygen species (ROS) production. To study the possible participation of mitochondrial energetic deficiencies and of oxidative stress in motoneuron degeneration, we tested the neuroprotective effects of different substrates that can function via two different mechanisms: by energy metabolism stimulation or as antioxidants. Co-perfusions of different concentrations of lactate, α -ketobutyrate, β -hydroxybutyrate, or ascorbate with AMPA by microdialysis in the rat lumbar spinal cord were performed. We assessed motor function with the rotarod test and carried out histological analysis of the lumbar segment of the spinal cord, and correlated the number of motoneurons with motor performance. Perfusion of 20 mM α -ketobutyrate protected notably against motoneuron loss and paralysis or motor alterations. Perfusion of β -hydroxybutyrate and lactate protected significantly as well, but at higher concentrations (50 and 100 mM respectively). On the other hand, ascorbate perfusion protected only partially even at concentrations up to 50 mM. Our results indicate that mitochondrial energy metabolism deficits are importantly involved in spinal motoneuron death induced by overactivation of AMPA receptors *in vivo* and that oxidative stress seems to be participating to a lesser extent.

We also conclude that there is a threshold in the number of motoneurons necessary to prevent motor alterations and paralysis, since the analysis of the results obtained with all the conditions tested in this model, shows that there is a clear correlation between motoneuron survival and motor function. Thus, as long as more than 50 % of the motoneurons are preserved, motor function alterations and paralysis are avoided, whilst when this threshold is not attained, the protection is only partial and the rats present a partial deficit on motor performance. Finally, the severe loss of motoneurons induces paralysis inevitably.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	Esclerosis Lateral Amiotrófica (por Amyotrophic Lateral Sclerosis)
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
ATP	Adenosín trifosfato
BAPTA-AM	Ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético tetrakis(acetoximetil ester)
ChAT	Colina acetiltransferasa
Ciclo TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs
DCD	Alteración de la regulación retardada de Ca^{2+} (por Delayed Calcium Deregulation)
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
Δp	Fuerza protón-motriz
EAAT	Transportador de aminoácidos excitadores (por Excitatory Amino Acid Transporter)
FALS	Esclerosis Lateral Amiotrófica Familiar (por Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis)
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GLT1	Transportador de glutamato 1 (por Glutamate Transporter 1)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (por High Performance Liquid Chromatography)
KA	Kainato
MPT	Transición de permeabilidad mitocondrial (por Mitochondrial Permeability Transition)
NAS	1-Naftil acetil espermina
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo[f]quinoxalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO\cdot	Radical óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa (por Nitric Oxide Synthase)
O$_2^{\cdot-}$	Radical superóxido
\cdotOH	Radical hidroxilo
ONOO\cdot	Anión peroxinitrito
PSD	Densidad postsináptica (por Postsynaptic Density)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (por Reactive Oxygen Species)
SALS	Esclerosis Lateral Amiotrófica Esporádica (por Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis)
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
XDH	Xantina deshidrogenasa
XOD	Xantina oxidasa

I. INTRODUCCIÓN

Neurotransmisión glutamatérgica

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos y está involucrado en muchos aspectos de la función cerebral normal. Fue descubierto en 1908 por Kikunae Ikeda, pero el hallazgo de que esta sustancia puede excitar el tejido nervioso tomó aproximadamente 5 décadas (Chiosa y Gane, 1956; Curtis et al., 1960).

El glutamato es el principal mediador de la información sensorial, de la coordinación motora, de las emociones y de la cognición, incluyendo el aprendizaje, la formación y recuperación de la memoria (Hassel y Dingledine, 2006). Además, tiene un papel importante en la formación del SNC, ya que está involucrado en procesos ontogénicos como la proliferación, maduración, supervivencia y migración neuronal, formación, remodelación y eliminación de sinapsis, así como también en el establecimiento y refinamiento de las conexiones neuronales (Pasantes et al., 1991).

El L-glutamato es un aminoácido común que juega un papel central en el metabolismo celular del cerebro participando en muchas reacciones. Es el precursor del ácido γ -aminobutírico (GABA) en neuronas GABAérgicas, y de la glutamina en las células gliales; es un constituyente de proteínas y péptidos como el glutatión. El glutamato es un aminoácido no esencial que no cruza la barrera hematoencefálica, por lo que el SNC cuenta con enzimas para su síntesis. La síntesis de glutamato se realiza a partir de la glucosa y de los aminoácidos que cruzan la barrera hematoencefálica. La glucosa sanguínea es convertida a α -cetoglutarato después de su oxidación por medio de la glucólisis y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA, ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs). En este proceso el α -cetoglutarato recibe un grupo amino de otro aminoácido mediante una reacción de transaminación catalizada por aminotransferasas, enzimas dependientes de fosfato de piridoxal (coenzima que contiene la vitamina B₆ o piridoxina), y es convertido a glutamato. El glutamato se encuentra en equilibrio con y es continuamente reconvertido a α -cetoglutarato y metabolizado mediante el ciclo de Krebs (Hassel y Dingledine, 2006).

Después de su liberación de las terminales nerviosas, gran parte del glutamato es tomado de la hendidura sináptica tanto por las neuronas como por la glía que rodea las sinapsis. El glutamato captado por los astrocitos reacciona con el amoníaco para formar glutamina por medio de la glutamina

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

Por lo tanto, todas las células del cerebro, neuronales y gliales, contienen glutamato, que se encuentra en el citosol y la mitocondria, tanto en los cuerpos celulares como en sus prolongaciones. En las neuronas glutamatérgicas, el glutamato está concentrado en las vesículas sinápticas; esta acumulación depende de la actividad de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs), que son proteínas especializadas que se encuentran en las membranas vesiculares, son complejos multiméricos y son antiportadores protón/glutamato.

La sinapsis es la zona de contacto especializada en la que una neurona se comunica con otra. La sinapsis glutamatérgica clásica es un punto de comunicación entre una terminal nerviosa presináptica y una espina dendrítica postsináptica (sinapsis axo-dendríticas) u otra terminal nerviosa (sinapsis axo-axonal). Durante la transmisión sináptica se libera el neurotransmisor de las terminales presinápticas que contienen los grupos de vesículas sinápticas individuales, cada una las cuáles está ocupada por muchas moléculas (~1200) de glutamato que han sido transportadas por los VGLUTs al interior de las vesículas después de su síntesis. Las vesículas sinápticas se acumulan en regiones de la membrana especializadas para la liberación del transmisor que son conocidas como zonas activas. Lo que desencadena la liberación del neurotransmisor es la descarga de un potencial de acción que llega a la terminal del axón presináptico, ésto provoca que se abran los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje en la zona activa. El flujo del Ca^{2+} hacia adentro produce una elevada concentración intracelular de este ion cerca de la zona activa, que hace que las vesículas se fusionen con la membrana celular presináptica y liberen el glutamato a la hendidura sináptica por medio de exocitosis. Una vez liberado el neurotransmisor, se reciclan las membranas vesiculares en la terminal nerviosa por endocitosis. Las moléculas de glutamato liberadas difunden entonces a través de la hendidura sináptica y se unen a los receptores específicos de la membrana de la célula postsináptica. Esta unión provoca la activación de

los receptores, lo que da como respuesta la apertura de canales iónicos o la activación de vías intracelulares. El flujo iónico que resulta de ello altera la conductancia y el potencial de membrana de la célula postsináptica, dando lugar a la despolarización transitoria y a la generación de un potencial de acción cuando la despolarización es lo suficientemente intensa para llevar el potencial de membrana al umbral de generación de un potencial de acción (Kandel et al., 2000).

Las sinapsis glutamatérgicas (figura 1) son reconocidas como asimétricas, ya que la membrana postsináptica parece mas gruesa que la presináptica, esta densidad postsináptica (PSD) puede contener hasta 100 proteínas diferentes, entre ellas los receptores al glutamato. Existen 2 principales categorías de receptores al glutamato: los receptores ionotrópicos que son canales de cationes que se abren permitiendo el flujo de los iones cuando el glutamato se une a ellos; y los receptores metabotrópicos que activan enzimas intracelulares a través de proteínas G cuando se unen al glutamato. Se conocen 3 clases de receptores ionotrópicos: los receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) y KA (kainato), nombrados así por sus agonistas selectivos. Los receptores ionotrópicos son complejos tetraméricos de las diferentes subunidades individuales de cada tipo de receptor en distintas combinaciones. Existen un número considerable de variantes de las subunidades relacionadas con el empalme alternativo de los transcritos de RNA o con la edición del RNA, y diversos patrones de expresión de las subunidades a lo largo del SNC; ésto da lugar a múltiples subtipos de receptores funcionales tipo AMPA, kainato y NMDA, y establece una heterogeneidad de los receptores a glutamato en todo el SNC (Seeburg, 1993; Hollman y Heinemann, 1994).

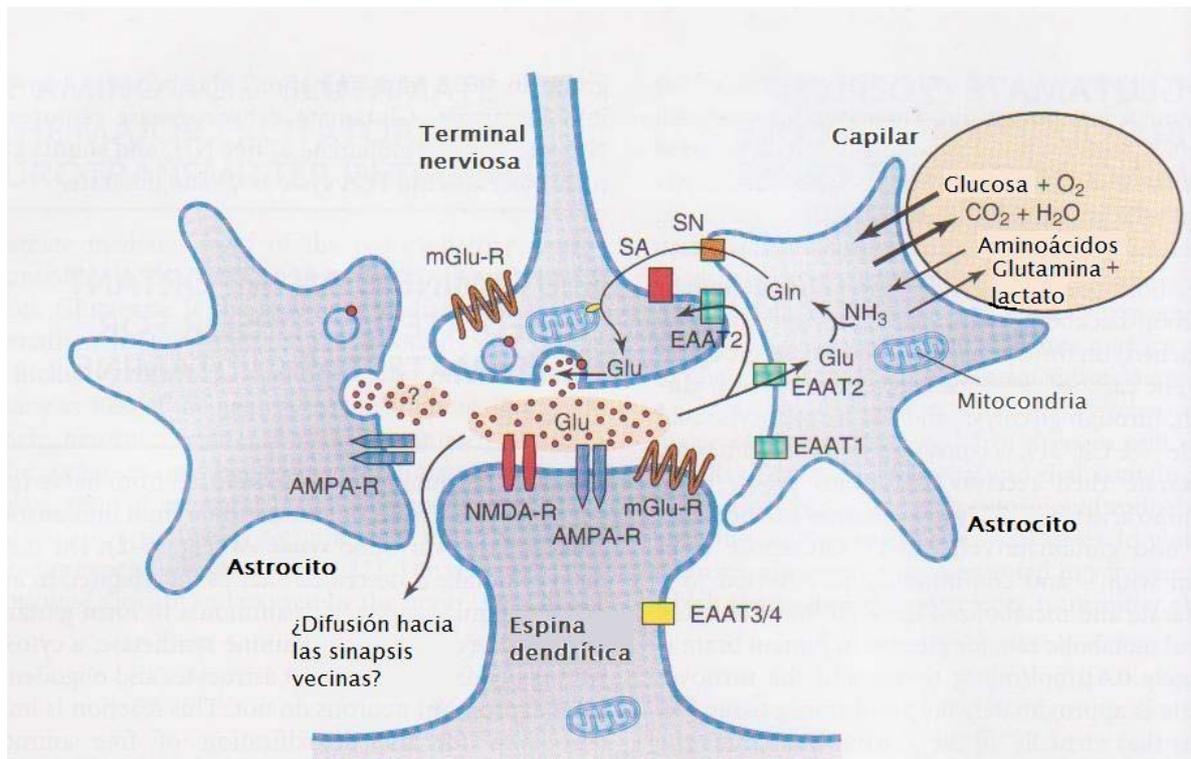


Figura 1. Representación esquemática de una sinapsis glutamatergica axodendrítica que consiste de una terminal nerviosa presináptica y una espina dendrítica postsináptica. La terminal nerviosa contiene vesículas sinápticas con transportadores vesiculares de glutamato (puntos rojos), mitocondrias (azules) con glutaminasa en la terminal nerviosa (punto amarillo), receptores al glutamato metabotrópicos, y transportadores de glutamato (EAAT2) y glutamina (transportadores SA). La espina dendrítica postsináptica contiene receptores al glutamato ionotrópicos (tipo AMPA y NMDA) y metabotrópicos, y transportadores de glutamato (EAAT3 y EAAT4). Alrededor de la sinapsis están los procesos de los astrocitos con transportadores de glutamato (EAAT1 y EAAT2) y de glutamina (transportadores SN), receptores al glutamato y hasta vesículas llenas de glutamato. El glutamato que se escapa de la sinapsis sin haber sido recapturado por los transportadores puede difundir hacia las sinapsis vecinas. AMPA-R: receptores tipo AMPA; NMDA-R: receptores tipo NMDA; EAAT1-4: transportadores de aminoácidos excitadores 1-4; Gln: glutamina; Glu: glutamato; mGlu-R: receptores al glutamato metabotrópicos; SA y SN: transportadores de glutamina sistema A y sistema N respectivamente (Modificada de Hassel y Dingledine, 2006).

La mayoría, si no es que todos los receptores tipo NMDA en el cerebro son heteroméricos, como parece ser también el caso de los receptores tipo AMPA y kainato. Se han identificado 3 familias de subunidades de los receptores tipo NMDA, la primera representada por un único gen (NR1), la segunda por 4 genes (NR2A-NR2D), y la tercera por 2 genes conocidos (NR3A-NR3B). Estos receptores permiten el flujo de Ca^{2+} (hacia adentro), de Na^+ (hacia adentro) y de K^+ (hacia afuera), y la apertura del canal depende tanto del voltaje de membrana como del transmisor químico. La incorporación de una subunidad NR3 a estos receptores reduce la permeabilidad al Ca^{2+} del canal del receptor (Sasaki et al., 2002; Matsuda et al., 2002). El receptor tipo NMDA es único entre todos los receptores a neurotransmisores conocidos en su requerimiento de la unión simultánea de 2 diferentes

agonistas para su activación, ya que además del sitio de unión ocupado por el glutamato en la subunidad NR2, se requiere de la unión de la glicina a un sitio que se encuentra en la subunidad NR1 para la activación del receptor. El glutamato y la glicina son referidos como co-agonistas del receptor NMDA ya que ninguno de los 2 actuando solo puede abrir el canal iónico (Kleckner et al., 1988; Dingledine et al., 1999). Los receptores tipo NMDA son de los receptores a neurotransmisores más ampliamente regulados, ya que tienen varios sitios de regulación distintos que unen ligandos endógenos que influyen en la probabilidad de la apertura del canal iónico. Los que promueven la activación del receptor consisten en los 2 sitios de reconocimiento para los co-agonistas (glutamato y glicina), y uno ó más sitios reguladores que unen poliaminas (como la espermina y espermidina); y los que actúan inhibiendo el flujo iónico a través de los receptores aunque éstos ya tengan los agonistas unidos, son sitios de reconocimiento para Mg^{2+} , Zn^{2+} y H^+ . El Mg^{2+} extracelular se une a un sitio del poro del canal abierto y actúa como un tapón bloqueando el flujo de corriente. Ejerce un bloqueo del canal iónico abierto dependiente de voltaje porque a potenciales de membrana de reposo (-65 mV) ó más negativos (hiperpolarizado), la entrada de Mg^{2+} al poro del canal bloquea el movimiento de los iones a través de éste, aún cuando los 2 coagonistas estén unidos a sus sitios. Conforme el potencial de membrana va siendo menos negativo o hasta positivo, la afinidad del Mg^{2+} por su sitio de unión disminuye, el Mg^{2+} es expulsado del canal por repulsión electrostática y el bloqueo se vuelve inefectivo, por lo tanto, la despolarización libera al canal del bloqueo por el Mg^{2+} y por esta razón este receptor es dependiente de voltaje (Nowak et al., 1984). El estado redox del receptor también afecta las respuestas mediadas por él, ya que uno de los pares de residuos de cisteínas puede estar reducido (lo cual potencia las corrientes mediadas por el receptor NMDA) u oxidado y formar puentes disulfuro (lo cual reduce las corrientes). Los agonistas del receptor tipo NMDA son típicamente aminoácidos dicarboxílicos de cadena corta como el glutamato, aspartato y NMDA (Hassel y Dingledine, 2006).

Los receptores tipo AMPA están ampliamente distribuidos en el SNC, sirven como receptores para la neurotransmisión sináptica excitadora rápida mediada por glutamato y son independientes de voltaje. Estos receptores son complejos homo- o hetero-tetraméricos formados por 4 subunidades, GluR1-GluR4 en varias combinaciones, las cuáles están codificadas por genes separados y son expresadas abundantemente a lo largo del SNC (Hollmann y Heinemann, 1994). Los receptores que contienen la subunidad GluR2 en su estructura son permeables a Na^+ y K^+ . Esta subunidad GluR2 determina la

permeabilidad a Ca^{2+} de los receptores AMPA porque la presencia de al menos un GluR2 en su estructura los hace impermeables al catión, mientras que los receptores que carecen de esta subunidad son permeables a calcio, siendo 3 a 5 veces más permeables a Ca^{2+} que a Na^+ (Hollmann et al., 1991; Hume et al., 1991). Sin embargo, no solo la presencia de la subunidad determina esta permeabilidad, sino que también las modificaciones posttranscripcionales que editan el sitio Q/R de la subunidad GluR2 (figura 2) substituyendo la glutamina (Q) no cargada por una arginina (R) cargada positivamente que impide el flujo de calcio a través del poro (Burnashev et al., 1992a). Por lo tanto, un déficit en la edición posttranscripcional de la subunidad GluR2 da como resultado receptores permeables a Ca^{2+} también. Las subunidades de los receptores tipo NMDA tienen una asparagina (N, aminoácido polar y sin carga como la glutamina) en el sitio homólogo al Q/R, lo que les confiere su alta permeabilidad al Ca^{2+} (Burnashev et al., 1992b). Para algunas de las subunidades de los receptores tipo Kainato, también se ha demostrado la edición del RNA para el sitio Q/R y otros sitios, con los cambios asociados en su permeabilidad iónica.

Receptor tipo AMPA	Permeabilidad al Ca^{2+}	Bloqueo externo por la NAS
Sin GluR2	si	+
+ GluR2 (R)	no	-
+ GluR2 (Q)	si	+

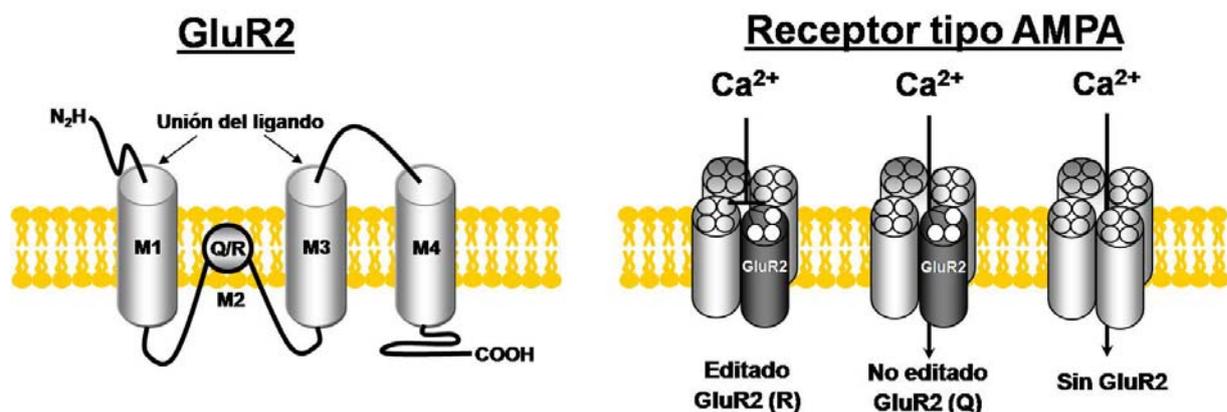


Figura 2. Estructura de las subunidades GluR del receptor tipo AMPA mostrando sus dominios funcionales. La figura de la derecha y la tabla muestran cómo la presencia de la subunidad GluR2 y su sitio de edición Q/R determinan la permeabilidad al Ca^{2+} del receptor. La NAS bloquea específicamente los receptores tipo AMPA permeables a Ca^{2+} . AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato; GluR: Subunidad del receptor al glutamato; M1-M4: Dominio membranar 1-4; NAS: 1-naftil acetil espermina; Q/R: Glutamina/arginina (Modificada de Corona et al., 2007).

Los receptores tipo AMPA en general pueden ser bloqueados específicamente por ciertas quinoxalinedionas, notablemente por la 6-nitro 7-sulfamobenzofuro[2,3-d] quinoxalina-2,3-diona (NBQX), que es un antagonista competitivo potente y selectivo de estos receptores.

Los receptores tipo kainato funcionales están también ampliamente distribuidos y se forman por las subunidades de la familia GluR5-GluR7, que se asocian a la subunidad KA1 ó a la KA2. Se han identificado receptores de este tipo de baja y alta afinidad. Así como los receptores tipo AMPA se desensibilizan en milisegundos tras la exposición a AMPA, los receptores tipo kainato lo hacen de la misma manera tras la exposición a kainato (Dingledine et al., 1999).

Los receptores metabotrópicos al glutamato están unidos a las enzimas citoplásmicas asociadas con las vías de transducción de señales por medio de proteínas G triméricas. Se han clonado 8 mGluRs, nombrados mGluR1-mGluR8, y han sido agrupados en 3 clases funcionales basadas en la homología de su secuencia de aminoácidos, en la farmacología de sus agonistas y en la vía de transducción de señales a la que están acoplados. Los mGluRs que pertenecen al grupo I (mGluR1 y mGluR5) estimulan la actividad de la fosfolipasa C y la liberación de Ca^{2+} de los almacenamientos intracelulares; la activación de la fosfolipasa C da lugar a la formación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), quien activa a la proteína cinasa C (PKC). La activación de los mGluRs que pertenecen al grupo II (mGluR2 y mGluR3) y al grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) resulta en la inhibición de la adenilato ciclasa, reduciendo la cantidad intracelular de AMPc (Hollmann y Heinemann, 1994).

La activación de los mGluRs localizados en la membrana postsináptica modulan la actividad de una amplia variedad de canales iónicos regulados por ligando y por voltaje expresados en las neuronas. Estudios inmunohistoquímicos han revelado que hay mGluRs en las terminales presinápticas de las neuronas centrales. La activación de los mGluRs presinápticos bloquea tanto la transmisión sináptica excitadora glutamatérgica como la transmisión sináptica inhibitoria GABAérgica en varias estructuras centrales (Hassel y Dingledine, 2006). En la figura 3 se muestran todas las clases de los receptores al glutamato y sus subunidades.

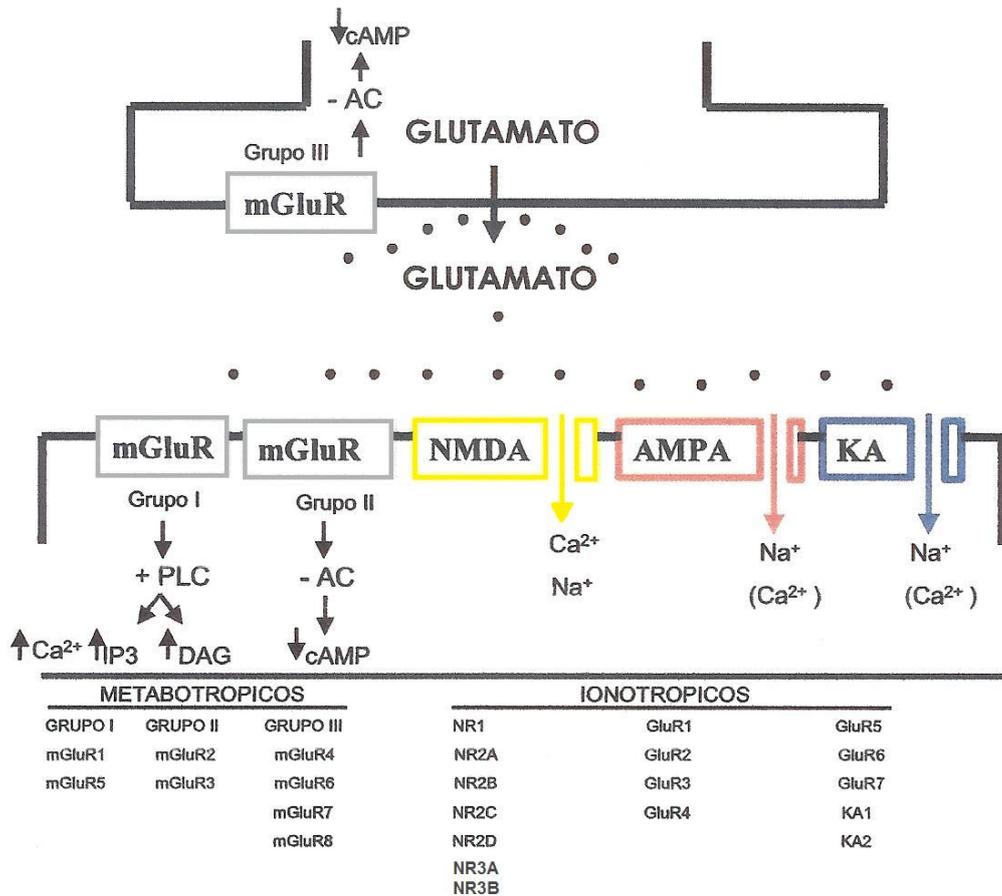


Figura 3. Familia de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato. Los receptores ionotrópicos forman canales permeables a los iones señalados, mientras que los metabotrópicos están acoplados a proteínas G produciendo (+) o inhibiendo (-) las enzimas o segundos mensajeros que se indican. Los receptores están formados por varias subunidades protéicas, cada una codificada por un diferente gen, que se señalan en la parte de abajo de cada tipo de receptor. NMDA: N-metil-D-aspartato; AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; KA: Kainato; mGluR: Receptor al glutamato metabotrópico; PLC: Fosfolipasa C; IP₃: Inositol-1,4,5-trifosfato; DAG: Diacilglicerol; AC: Adenilato ciclasa; cAMP: Adenosín monofosfato cíclico (Modificada de Corona y Tapia, 2005).

La transmisión sináptica glutamatergica es rápidamente terminada por medio de la remoción del glutamato del espacio extracelular, esto es importante para mantener su concentración por debajo de los niveles neurotóxicos, y evitar así la sobreactivación de la célula postsináptica. El glutamato es principalmente removido por medio de la recaptura del neurotransmisor del espacio sináptico hacia las neuronas y células gliales. La remoción activa del neurotransmisor es llevada a cabo por los transportadores de glutamato de alta y baja afinidad y se da en 2 pasos: unión del glutamato a los transportadores y translocación al interior de las células. La recaptura de glutamato se da en contra de su gradiente de concentración, por lo que necesita de una fuerza motriz, la cual es dada principalmente por el gradiente electroquímico de Na⁺ a través de la membrana plasmática. El glutamato entra a la

célula con 3 iones Na^+ y un H^+ , mientras que un ion K^+ es contra-transportado, resultando en la reorientación del transportador de tal manera que el sitio de unión al glutamato es accesible de nuevo al espacio extracelular (Zerangue y Kavanaugh, 1996; Levy et al., 1998; Danbolt, 2001).

Cinco de los transportadores de glutamato de alta afinidad han sido identificados, clonados y localizados en el SNC. Se han nombrado EAAT 1-5, por transportador de aminoácidos excitadores: EAAT1, también conocido como transportador de glutamato/aspartato (GLAST) en tejidos de mamíferos no humanos; EAAT2, también llamado transportador de glutamato 1 (GLT1) en roedores; EAAT3 o acarreador de aminoácidos excitadores 1 (EAAC1); EAAT4 y EAAT5. EAAT2 es el transportador de glutamato más abundante en el SNC y está localizado casi exclusivamente en astrocitos, aunque también existe evidencia de que puede ser expresado por las neuronas durante el desarrollo, en el sistema nervioso adulto, y al menos una parte de esta proteína se encuentra en las terminales nerviosas presinápticas (Rothstein et al., 1994; Furuta et al., 1997; Schmitt et al., 1996; Schmitt et al., 2002); acarrea probablemente ~90% del glutamato liberado, como sugiere el hecho de que los ratones que carecen de esta proteína sufren descargas, presentan lesiones corticales y mueren prematuramente (Tanaka et al., 1997). Este transportador está distribuido principalmente en astrocitos en todo el SNC, con una alta concentración en el hipocampo, corteza cerebral y médula espinal (Rothstein et al., 1994). El hecho de que exista una alta densidad de transportadores de glutamato, significa que pueden competir con los receptores al glutamato para unir al neurotransmisor, y por lo tanto modular su señal.

Neurodegeneración

La neurodegeneración es un fenómeno que ocurre durante los padecimientos agudos y crónicos del SNC, como son los accidentes vasculares cerebrales (isquemia), hipoxia, hipoglicemia, traumatismos craneoencefálicos y de la médula espinal, epilepsia y en numerosas enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), las enfermedades de Parkinson, de Alzheimer y de Huntington. Muchos de estos padecimientos comparten características patológicas de una pérdida neuronal gradual y selectiva, siendo que los grupos neuronales primordialmente afectados varían según la enfermedad. Para poder encontrar tratamientos efectivos para estos padecimientos es importante entender las causas y los mecanismos celulares y moleculares que participan en el daño y

muerte neuronal. Si bien no se ha tenido éxito en conocer las causas, sí se tiene un gran avance en el conocimiento de los procesos celulares que muy probablemente juegan un papel importante en los mecanismos de la neurodegeneración. Éstos incluyen la excitotoxicidad por sobreactivación de los receptores glutamatérgicos, el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} libre, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Tapia, 1998; Tapia et al., 1999, Coyle y Puttfarcken, 1993). Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, están estrechamente relacionados entre sí, y pueden interactuar y cooperar en el establecimiento de un círculo vicioso que resulta en muerte neuronal. Este círculo vicioso de daño a las neuronas podría ser iniciado alternativamente en sitios diferentes (comenzado por excitotoxicidad o desencadenado por estrés oxidativo o falla energética), pero una vez desencadenado, un proceso puede conducir a o potenciar los otros, dando lugar a mecanismos multifactoriales e interdependientes de muerte celular.

Excitotoxicidad y neurodegeneración

El glutamato y sus agonistas (como el NMDA, Kainato y AMPA), además de tener efectos excitadores potentes sobre sus receptores, pueden ser potentes neurotoxinas, ya que una transmisión sináptica glutamatérgica excesiva puede resultar en neurodegeneración.

Se encontró por primera vez que el glutamato y otros aminoácidos pueden actuar como neurotoxinas cuando éstos fueron administrados a animales inmaduros, en los cuáles se observó neurodegeneración aguda en las áreas que no están bien protegidas por la barrera hematoencefálica. Así, los primeros experimentos que sugirieron que el glutamato podría ser una neurotoxina fueron los realizados en 1957 por Lucas y Newhouse, quienes mostraron que inyecciones intraperitoneales de L-glutamato a ratones inmaduros podían producir degeneración de las células de la retina destruyendo las capas internas de ésta (Lucas y Newhouse, 1957). Estas observaciones fueron replicadas y extendidas por Olney, quien confirmó la toxicidad a la retina provocada por el glutamato, reportando además que esta retinotoxicidad está acompañada por un rápido hinchamiento celular que es más pronunciado cerca de los componentes dendrosomales. Este aspecto histológico de la excitotoxicidad aguda comprende un edema masivo de los cuerpos celulares neuronales y las dendritas, congruente con la localización predominantemente somatodendrítica de los receptores de glutamato en las sinapsis excitadoras. También comprobó que el glutamato induce necrosis neuronal aguda en varias regiones del cerebro en

desarrollo, incluyendo el hipotálamo, y también encontró lesiones agudas en cerebros de ratones adultos a los que se les administraron dosis más altas. Así, Olney introdujo el término excitotoxicidad para describir la neurodegeneración mediada por aminoácidos excitadores, cuyas propiedades tóxicas están relacionadas a las propiedades excitadoras que tienen sobre sus receptores (Olney, 1969; Olney, 1978). Se han realizado numerosos estudios después de estos, tanto *in vivo* como *in vitro*, demostrando que se produce neurodegeneración cuando las células nerviosas son expuestas a glutamato y a los agonistas de sus receptores. Los factores que contribuyen a la neurodegeneración son muchos y se ha implicado la activación de toda clase de los receptores al glutamato como mediadores de la toxicidad, siendo reconocido que los receptores ionotrópicos juegan un papel central (Choi, 1988a; Tymianski, 1996).

La activación masiva de los receptores al glutamato provoca cambios en las concentraciones intracelulares de iones, especialmente de Ca^{2+} y Na^+ . La entrada de Na^+ provoca la entrada secundaria de Cl^- y H_2O , lo que puede causar edema intracelular, ruptura de la membrana celular y por lo tanto lisis de la célula. Se ha comprobado en cultivos de hipocampo y retina que esta entrada de Na^+ puede causar cierto daño por sí sola, ya que estas células exhiben hinchamiento irreversible mediado por Na^+ aún en la ausencia de Ca^{2+} extracelular (Rothman, 1985; Olney et al., 1986). Sin embargo, Choi enfatizó el papel importante de la entrada de Ca^{2+} en la neurotoxicidad mediada por glutamato, como había sido propuesto inicialmente por Berdichevsky y colaboradores (Berdichevsky et al., 1983). Así, Choi propuso la hipótesis de que la sobrecarga de Ca^{2+} neuronal conduce a subsiguiente neurodegeneración, al demostrar que la entrada de este catión a las neuronas es un factor determinante para la muerte excitotóxica (Choi, 1985; 1987; 1995; Choi et al., 1987). En los experimentos de sustitución iónica, Choi y sus colaboradores comprobaron que, a pesar de que la remoción de Na^+ extracelular elimina el hinchamiento neuronal agudo en cultivos de células corticales expuestas a glutamato, las neuronas todavía sufren degeneración retardada a menos que el Ca^{2+} extracelular sea removido. Sus observaciones sugirieron 2 componentes de la excitotoxicidad: primero un componente agudo dependiente de Na^+ y Cl^- marcado por el hinchamiento celular inmediato, y segundo, una degeneración celular retardada mediada por Ca^{2+} . Concluyeron pues que el componente de Ca^{2+} es la causa más significativa de muerte neuronal. Se ha confirmado en muchos trabajos subsecuentes que existe una relación estrecha entre la excesiva entrada de Ca^{2+} y el daño neuronal (Choi, 1988a;

Tymianski y Tator, 1996; Tymianski, 1996).

Al principio, se consideraba que los receptores tipo NMDA eran los únicos que participaban en la excitotoxicidad (Choi, 1988b); sin embargo, ahora está claro que la activación de los receptores no-NMDA es igual de importante (Koh et al., 1990; Prehn et al., 1995). De esta manera, el mediador predominante del daño neuronal es la sobrecarga en la concentración intracelular de Ca^{2+} libre, que se puede dar por un mayor flujo a través de los receptores tipo NMDA, de los receptores tipo AMPA permeables a Ca^{2+} , por su liberación de sitios donde se acumula intracelularmente (como el retículo endoplásmico) y por su deficiente amortiguamiento por las mitocondrias.

Por lo tanto, la excitotoxicidad es un proceso en el cual la sobreactivación de los receptores postsinápticos de glutamato, da lugar a una despolarización prolongada de las neuronas, permitiendo una entrada masiva de Ca^{2+} principalmente a través de estos receptores al glutamato permeables a este catión, desencadenando la activación no controlada de procesos perjudiciales que eventualmente producen muerte neuronal (Arundine y Tymianski, 2003, figura 4).

En la actualidad, existe amplia evidencia experimental que sugiere que la excitotoxicidad puede estar jugando un papel muy importante en las enfermedades neurodegenerativas (Coyle y Puttfarcken, 1993; Lipton y Rosenberg, 1994; Doble, 1999).

Se han distinguido 2 tipos de excitotoxicidad, denotados con los términos excitotoxicidad clásica y excitotoxicidad indirecta o lenta (Doble, 1999; Van Den Bosch et al., 2006). La excitotoxicidad clásica se refiere a la degeneración neuronal que ocurre después de un incremento de la concentración extracelular de glutamato, mientras que la excitotoxicidad indirecta se refiere a la muerte de una neurona postsináptica debilitada en la presencia de niveles normales de glutamato sináptico. Se piensa que en condiciones como epilepsia, accidentes cerebrovasculares (isquemia) y neurotraumatismos, el daño neuronal es inducido por elevaciones agudas de glutamato, mientras en enfermedades neurodegenerativas la excitotoxicidad se da por elevaciones más crónicas y suaves de glutamato.

Las concentraciones elevadas de glutamato extracelular pueden darse cuando la liberación de las terminales presinápticas es aumentada o cuando la recaptura de la hendidura sináptica es insuficiente; también pueden resultar de la liberación del contenido intracelular de glutamato de neuronas dañadas lo cual puede dar lugar a la muerte excitotóxica de neuronas vecinas, participando así en la propagación de la neurodegeneración. En el caso de la excitotoxicidad indirecta, una estimulación

normal de los receptores al glutamato de una neurona postsináptica debilitada es suficiente para causar daño y matar a la célula. Por ejemplo, el trastorno de la función mitocondrial puede resultar en este tipo de excitotoxicidad ya que la neurona tiene un estado energético deficiente y por lo tanto los niveles de ATP intracelulares disminuidos; como consecuencia, la neurona no puede satisfacer las demandas de los muchos procesos dependientes de ATP, se daña y por último muere (Novelli et al., 1988; Henneberry et al., 1989).

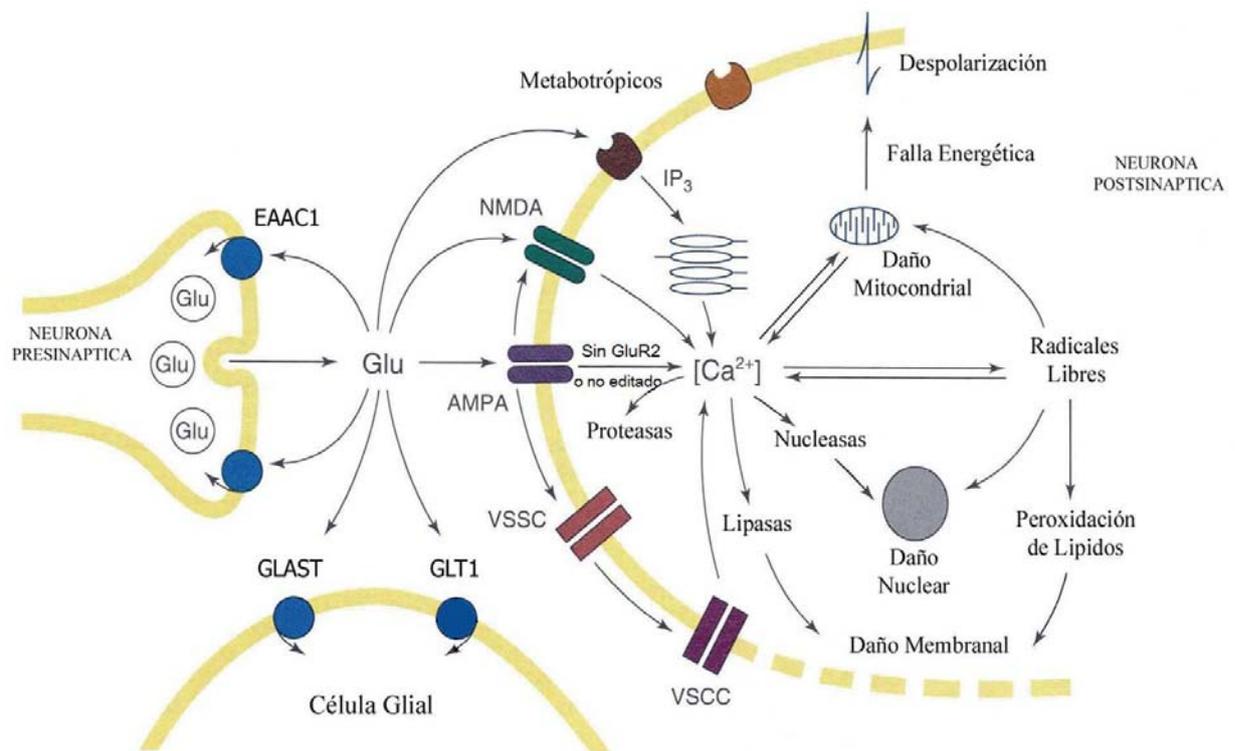


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos bioquímicos involucrados durante la excitotoxicidad glutamatergica. El aumento en la concentración extracelular de glutamato en el espacio sináptico puede producir una estimulación excesiva de los receptores al glutamato, incluyendo los receptores tipo AMPA permeables a Ca^{2+} que carecen de la subunidad GluR2 o no está editada y los receptores tipo NMDA. Esto da como resultado un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , lo que desencadena procesos de deterioro como daño mitocondrial con la consecuente alteración del metabolismo energético, generación de radicales libres, activación de enzimas líticas como las proteasas, lipasas, endonucleasas, despolarización de membranas, daño nuclear y membranal. Todo esto eventualmente produce muerte neuronal. NMDA: Receptores tipo N-metil-D-aspartato; AMPA: Receptores tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; VSSC: Canales de sodio sensibles a voltaje; VSCC: Canales de calcio sensibles a voltaje; IP₃: Inositol-1,4,5-trifosfato; Glu: Glutamato; EAAC1: Acarreador de aminoácidos excitadores 1; GLAST: Transportador de glutamato/aspartato; GLT1: Transportador de glutamato 1.

La muerte neuronal excitotóxica tiende a ser una muerte necrótica (Choi et al., 1987; Gwag et al., 1997), aunque también se ha reportado el paso a una forma de muerte apoptótica ante una intensidad decreciente de exposición a glutamato (Tenneti et al., 1998). La función mitocondrial y la medida en la

que el ATP disminuye son factores críticos que determinan la forma de muerte neuronal por excitotoxicidad, pueden inducir necrosis temprana en una subpoblación de las neuronas asociada con un severo agotamiento de ATP, o apoptosis retardada en las neuronas sobrevivientes a la fase necrótica asociada con una disminución más moderada de ATP (Ankarcrona et al., 1995).

Calcio, mitocondria, estrés oxidativo y su relación con la muerte neuronal

En condiciones fisiológicas, el Ca^{2+} participa como mensajero intracelular en muchas de las funciones celulares normales, como son el crecimiento celular, diferenciación, transducción de señales, regulación de la excitabilidad membranal, exocitosis y la actividad sináptica. La concentración citoplásmica de Ca^{2+} en las neuronas en estado de reposo es mantenida en niveles bajos (~100 nM), a una concentración 10,000 veces menor que la del medio extracelular; para asegurar esto, las neuronas poseen mecanismos homeostáticos especializados, como son la regulación de la entrada y salida de Ca^{2+} , la quelación por proteínas que capturan calcio, almacenamiento en la mitocondria y el retículo endoplásmico, y remoción por medio de las Ca^{2+} -ATPasas. Además, las neuronas no sólo controlan los niveles de Ca^{2+} intracelular, sino que también la localización de estos iones mediante una interacción compleja entre la entrada, salida, amortiguamiento y almacenamiento interno de Ca^{2+} . Así, bajo condiciones fisiológicas, estos procesos hacen posible que las señales de Ca^{2+} se mantengan espacial y temporalmente localizadas, permitiendo que múltiples rutas de señalización reguladas por este catión ocurran independientemente dentro de la misma célula.

Durante la neurotransmisión, las elevaciones fisiológicas de Ca^{2+} intracelular son importantes después de la activación normal de los receptores postsinápticos, sin embargo, ante la sobreactivación de los receptores, la excesiva entrada de Ca^{2+} extracelular junto con su salida de compartimentos intracelulares, puede elevar su concentración a niveles que excedan la capacidad de los mecanismos que la regulan. Ésto provoca la activación inapropiada de procesos dependientes de Ca^{2+} que normalmente están inactivos u operan a niveles bajos, provocando trastornos metabólicos y muerte celular eventual (Tymianski y Tator, 1996).

La concentración intracelular excesiva de Ca^{2+} daña a las neuronas a través de varios mecanismos, incluyendo la activación de varias enzimas, como proteasas, lipasas, fosfatasa y endonucleasas, provocando alteraciones en proteínas, lípidos, membranas, y ácidos nucleicos; la generación de

especies reactivas de oxígeno (ROS) tóxicas, daño mitocondrial y trastornos del metabolismo energético, así como despolarización de membranas; todos estos eventos producen eventualmente destrucción de membranas y muerte neuronal (Arundine y Tymianski, 2003; Shaw, 1999).

El SNC es particularmente vulnerable a daño oxidativo debido a su alto gasto de energía y demanda de oxígeno. El estrés oxidativo se da cuando la producción de ROS es tan elevada que supera la capacidad de las defensas antioxidantes de la célula que normalmente desintoxican rápidamente los reactivos intermedios o reparan el daño resultante (enzimas de defensa antioxidante y compuestos antioxidantes per se), creando un desequilibrio en el balance normal redox de la célula y generando una concentración de radicales libres por encima de los niveles normales. Dada su alta reactividad, la producción aumentada de ROS puede desencadenar la degradación peroxidativa de lípidos de membrana, el daño a enzimas, otras proteínas y ácidos nucleicos, generando así una serie de eventos destructivos al dañar todos los componentes de la célula. El estrés oxidativo es una característica común de muchas formas diferentes de enfermedades neurodegenerativas (Andersen, 2004).

El incremento intracelular de Ca^{2+} estimula la producción de radicales libres mediante la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS), enzima que cataliza producción de óxido nítrico (NO^{\bullet}). También en condiciones de Ca^{2+} intracelular elevado, la xantina deshidrogenasa (XDH) es convertida a xantina oxidasa (XOD) vía activación de proteasas, y la conversión de hipoxantina y xantina a ácido úrico por medio de la XOD da lugar a la producción del radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). El NO^{\bullet} reacciona rápidamente con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ dando el anión peroxinitrito (ONOO^-), que se descompone al radical hidroxilo ($^{\bullet}\text{OH}$), el radical de oxígeno más reactivo. Por otro lado, la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por la superóxido dismutasa (SOD) produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cuál en la presencia de Fe^{2+} se descompone a $^{\bullet}\text{OH}$ mediante la reacción de Fenton. También se puede dar la reacción entre el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 resultando en la producción de $^{\bullet}\text{OH}$.

La activación excesiva de los receptores al glutamato provoca estrés oxidativo; muchos estudios corroboran que hay una mayor producción de ROS durante la excitotoxicidad y que el daño oxidativo resultante es un componente muy importante de la degeneración neuronal (Atlante et al., 2001; Bondy et al., 1993; Almeida et al., 2001; Lafon-Cazal et al., 1993a; Lafon-Cazal et al., 1993b; Reynolds y Hastings, 1995; Matson et al., 1995; Dugan et al., 1995; Coyle y Puttfarcken, 1993).

La principal función de las mitocondrias en las células es llevar a cabo la síntesis de ATP, sin embargo las mitocondrias poseen también otras funciones, como la de amortiguamiento de Ca^{2+} intracelular, y participan en procesos asociados con daño y muerte celular, como son el estrés oxidativo, la excitotoxicidad y la muerte necrótica y apoptótica. Así, la mitocondria juega un papel central en la sobrevivencia y muerte de las neuronas.

El flujo de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria da lugar al bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna haciendo que la matriz sea alcalina y negativa con respecto al espacio intermembrana. La fuerza protón-motriz (Δp) es el gradiente de protones con potencial electroquímico que se encuentra a través de la membrana mitocondrial interna y suministra la energía para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i por medio de la ATP sintasa. La Δp depende principalmente del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) que es el potencial eléctrico (negativo en el interior), pero también del gradiente de pH (ΔpH) que es el potencial químico (alcalino en el interior), a través de la membrana mitocondrial interna. La energía conservada en un gradiente de protones también puede impulsar el transporte de solutos contra gradiente a través de la membrana. El $\Delta\psi_m$ es el parámetro central que controla 3 procesos celulares fundamentales y de gran relevancia para la sobrevivencia neuronal: la síntesis de ATP, el secuestro de Ca^{2+} mitocondrial, y la generación mitocondrial de ROS. Inversamente, $\Delta\psi_m$ es controlado por la disponibilidad de sustrato, la demanda de ATP, la capacidad de la cadena respiratoria, la conductancia de protones mitocondrial y por el secuestro de Ca^{2+} mitocondrial (Nicholls y Budd, 2000). Por lo tanto, el estatus de las propiedades bioenergéticas de las mitocondrias es crucial en el control de la susceptibilidad de las neuronas a estrés neurodegenerativo agudo o crónico y también en la determinación del destino de la célula en términos de sobrevivencia, apoptosis o necrosis.

Gran parte de la demanda de ATP en las neuronas es utilizada en el bombeo de iones a través de la membrana plasmática para mantener el potencial de membrana. Así, la Na^+/K^+ ATPasa es el proceso de mayor demanda de ATP dentro de la neurona (Scott y Nicholls, 1980). El flujo masivo de iones durante la actividad sináptica y más aun durante la excitotoxicidad, exige una alta demanda energética a la neurona, ya que se aumenta la hidrólisis de ATP por la activación de la Na^+/K^+ ATPasa para sacar el exceso de Na^+ de la célula, y la regulación de Ca^{2+} intracelular también es energéticamente costosa.

El Ca^{2+} es extruído de la célula y secuestrado en el retículo endoplásmico mediante transporte activo utilizando Ca^{2+} -ATPasas, y también es eliminado de la célula por transporte activo secundario utilizando el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que al sacar Ca^{2+} y meter Na^+ a la célula activa a la Na^+/K^+ ATPasa para sacar el exceso de Na^+ . La mitocondria también juega un papel crítico en la regulación de la concentración de Ca^{2+} citosólico, ya que secuestra este catión cuando la elevación en el Ca^{2+} citosólico excede la capacidad de los mecanismos de transporte activo, por medio de un uniportador que se encuentra en la membrana mitocondrial interna, y que es impulsado por el gran potencial eléctrico que existe a través de ésta (Nicholls, 1985). Esta captación de Ca^{2+} dentro de la mitocondria participa también en su funcionamiento, por ejemplo en la activación enzimática.

Para evitar una acumulación potencialmente letal de este catión en la matriz mitocondrial (que se alcanzaría cuando la concentración de Ca^{2+} libre se elevara a un valor 10^5 - 10^6 mayor que en el medio extramitocondrial, concentración con la que se llegaría al equilibrio termodinámico debido al elevado potencial de membrana mitocondrial), existe un sistema de salida que intercambia Ca^{2+} por Na^+ ; también está presente un transportador Na^+/H^+ mitocondrial, y así el flujo de iones en condiciones de una constante entrada de Ca^{2+} mitocondrial, consiste en una recirculación secuencial de Ca^{2+} , Na^+ y H^+ , la última impulsada por la cadena respiratoria (Nicholls y Budd, 2000; Crompton y Heid, 1978). Con todo, cuando la concentración de Ca^{2+} está por encima de un determinado punto crítico, en la presencia de concentraciones fisiológicas de fosfato, se forma en la matriz mitocondrial un complejo Ca^{2+} -fosfato osmóticamente inactivo y rápidamente dissociable, así las mitocondrias funcionan como amortiguadores eficientes de Ca^{2+} extramitocondrial, acumulando el catión (Nicholls, 1978; Becker et al., 1980). La cinética del transporte de Ca^{2+} mitocondrial sugiere que el organelo actúa como un almacén temporal de Ca^{2+} durante los picos de concentraciones citoplásmicas altas de este catión, puesto que el complejo calcio-fosfato es rápidamente dissociable puede liberar el Ca^{2+} nuevamente al citoplasma cuando su concentración se recupera por debajo del punto crítico. Mientras la mitocondria continúa polarizada, el calcio citosólico se acumula en la matriz mitocondrial a través del uniportador de Ca^{2+} . Cuando la mitocondria se despolariza, el calcio acumulado regresa al citoplasma, ya sea a través del propio uniportador de calcio, del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o a través del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPM, un gran complejo protéico que forma un poro no selectivo en la membrana mitocondrial interna). Además, cuando la concentración de Ca^{2+} no se

recupera por debajo del punto crítico, la acumulación excesiva del Ca^{2+} en la matriz mitocondrial puede conducir al hinchamiento mitocondrial, pérdida del control respiratorio, colapso del $\Delta\psi_m$ (despolarización) afectando la síntesis de ATP, y liberación del Ca^{2+} de la matriz provocado por la permeabilización de la membrana mitocondrial interna denominada transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) (Al Nasser y Crompton, 1986; Nicholls y Budd, 2000). Por esta razón, la acumulación de Ca^{2+} mitocondrial parece jugar un papel clave en la excitotoxicidad glutamatérgica (Nicholls et al., 2003).

In vitro, las neuronas expuestas a concentraciones tóxicas de glutamato presentan un patrón típico de 3 distintas fases de elevación del Ca^{2+} citoplásmico: primero se da un pico elevado, que es seguido por una recuperación que lleva a una meseta que se mantiene por un periodo de tiempo. Esta recuperación puede deberse a la activación retardada de los mecanismos de extrusión de Ca^{2+} , al secuestro mitocondrial, a la parcial desensibilización de los receptores NMDA o a la desensibilización rápida de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje. Después de esta segunda fase caracterizada por una meseta, se da una pérdida descontrolada e irreversible de la homeostasis de Ca^{2+} citoplásmico llamada alteración de la regulación retardada de Ca^{2+} (DCD). La DCD predice con seguridad la lisis de la membrana plasmática y muerte necrótica subsecuentes (Tymianski et al., 1993). Las fases segunda y tercera pueden proceder aún después de la remoción del glutamato extracelular (Ankarcrona et al., 1995; Milani et al., 1991; Randall y Thayer, 1992; Tymianski et al., 1993; Wang y Thayer, 1996). Hay evidencia de que la DCD es el punto final irreversible de una secuencia que involucra la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, la generación incrementada de ROS, y el daño oxidativo a la célula dando lugar a la falla en la extrusión de Ca^{2+} . La DCD parece ser resultado de una falla en los mecanismos de extrusión de Ca^{2+} más que un flujo aumentado (Khodorov et al., 1996; Castilho et al., 1998), y una falla en la extrusión de Ca^{2+} podría resultar del agotamiento del ATP citoplásmico. Asimismo, la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática es muy sensible a daño oxidativo (Pereira et al., 1996). También se ha visto que éste induce la MPT en mitocondrias aisladas (Saxena et al., 1995). Hay evidencia que sugiere que el estrés oxidativo induce alteración de la regulación de Ca^{2+} citoplásmico y muerte neuronal (Beal, 1996; Coyle y Puttfarcken, 1993; Castilho y Nicholls, 1999).

Las mitocondrias consumen aproximadamente 98 % del oxígeno requerido por la célula debido a que son el sitio donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, lo que las constituye un sitio primario de

producción intracelular de ROS. Diversos pasos en la ruta de reducción del oxígeno en las mitocondrias tienen el potencial para producir radicales libres porque el flujo de electrones mitocondrial que se da por la cadena respiratoria puede tener fugas de estos electrones hacia el oxígeno en sitios potenciales. Así, en el paso de electrones a través del complejo III y del complejo I interviene un radical ubisemiquinona como intermediario que puede, con baja probabilidad, pasar un electrón al O_2 formando el radical $O_2^{\cdot-}$ que es un intermediario muy reactivo y un poderoso oxidante (Turrens et al., 1985; Dykens, 1997). Del O_2 usado por mitocondrias que respiran activamente, un porcentaje (desde un 0.1% hasta un 4 %) forma $O_2^{\cdot-}$, este radical libre debe ser eliminado rápidamente para evitar sus efectos letales sobre la célula. Las células poseen varias formas de la enzima SOD (la CuZn-SOD citoplásmica ó SOD1 y la Mn-SOD mitocondrial ó SOD2) para impedir el daño oxidativo por el radical superóxido. Esta enzima cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ produciendo H_2O_2 y O_2 . El H_2O_2 generado es convertido a H_2O por la acción de 2 enzimas, la catalasa y la glutatión peroxidasa. La glutatión reductasa recicla el glutatión oxidado a su forma reducida utilizando electrones del NADPH. El glutatión reducido, que se encuentra en el citoplasma y en las mitocondrias, es el principal amortiguador redox celular contra el estrés oxidativo (Nicholls y Budd, 2000; Atlante et al., 2001). No obstante, defectos en los complejos de la cadena de electrones u otras perturbaciones de la mitocondria pueden ser responsables de una excesiva producción mitocondrial de radicales libres, provocando o incrementando la probabilidad de daño celular (Dykens, 1994). Se ha observado la estimulación de la producción mitocondrial de ROS ante la exposición a NMDA y kainato (Dugan et al., 1995; Carriedo et al., 1998). Asimismo, la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria aislada incrementa la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Dykens, 1994; Kowaltowski et al., 1996).

Además, es importante considerar que las mitocondrias no sólo pueden ser productoras de radicales libres, sino que son un blanco susceptible de éstos. Así, una situación patológica en la que se dé una producción inicial de ROS podría reducir la respiración mitocondrial y producir daño oxidativo a proteínas, lípidos o ácidos nucleicos mitocondriales, provocando daño grave y alterando la función normal de este organelo (Lenaz et al., 2002). Se ha demostrado que el DNA mitocondrial es más susceptible al daño por radicales libres que el DNA nuclear debido a su localización cercana a un sitio de importante producción de radicales libres, la cadena de transporte de electrones, a su carencia de histonas protectoras, y a mecanismos de reparación menos efectivos comparados con los que se

encuentran en el núcleo (Richter et al., 1988). El estado redox de la mitocondria también afecta la apertura de la MPT.

Se ha encontrado que la excitotoxicidad mediada por glutamato provoca notables cambios en la función mitocondrial in vitro, reducción en los niveles de ATP, colapso del potencial de membrana mitocondrial, una disminución del consumo de oxígeno mitocondrial y celular, y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa que preceden a la muerte celular (Ankarcrona et al., 1995; Atlante et al., 1996; Maus et al., 1999; Monje et al., 2001). Existe un vínculo entre la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular inducida por excitotoxicidad y el colapso de $\Delta\psi_m$, ya que este aumento de Ca^{2+} intracelular y su acumulación en el organelo es suficiente para inducir despolarización mitocondrial prominente y persistente, dando lugar a la disfunción mitocondrial y a la muerte de las neuronas in vitro (Schinder et al., 1996; White y Reynolds, 1996).

Por otra parte, hay evidencia abundante in vitro e in vivo de que cualquier restricción en la capacidad de la célula para generar ATP puede exacerbar o hasta inducir la excitotoxicidad glutamatérgica (excitotoxicidad indirecta). La hipótesis excitotóxica ligada a energía (Beal et al., 1993; Greene y Greenamyre, 1996; Henneberry, 1997; Henneberry et al., 1989; Novelli et al., 1988) propone que la correlación entre el daño excitotóxico y la restricción de energía se debe a la despolarización de la membrana plasmática resultante de la limitación energética. La disminución en los niveles de ATP causa una reducción en la función de la Na^+/K^+ ATPasa y de la Ca^{2+} ATPasa disminuyendo la extrusión de Na^+ y de Ca^{2+} . Esto provoca la despolarización de la membrana plasmática, y por lo tanto el aumento en la liberación de glutamato por exocitosis al espacio extracelular, y también el flujo de Ca^{2+} hacia el citosol a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y del receptor NMDA, también dependiente de voltaje. Además, en condiciones de falla energética, los transportadores del glutamato operan en dirección inversa porque el gradiente electroquímico Na^+/K^+ se colapsa debido al decremento de ATP, resultando en la disminución de la captura y en la liberación de glutamato no vesicular al espacio extracelular (Longuemare y Swanson, 1995; Jabaudon et al., 2000).

La observación de que la inhibición de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria puede inducir cambios patológicos en regiones del cerebro específicas muy similares a las observadas en ciertas enfermedades neurodegenerativas ha generado un gran interés. La asociación entre la

excitotoxicidad glutamatérgica y la limitación bioenergética ha sido propuesta para las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, la ALS (Beal, 1998), y en muchos casos están involucrados complejos específicos de la cadena respiratoria.

II. ANTECEDENTES

Esclerosis Lateral Amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS), descrita en 1869 por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot, es una enfermedad neurodegenerativa devastadora que se caracteriza por la muerte selectiva y progresiva de las motoneuronas superiores e inferiores, lo que va conduciendo a una parálisis progresiva, depresión respiratoria y muerte usualmente a los 2-5 años después del comienzo de los síntomas. Dependiendo de cuáles motoneuronas son afectadas principalmente, ya sea las motoneuronas inferiores, localizadas en las astas ventrales de la médula espinal, o las motoneuronas superiores, localizadas en el tallo cerebral y en la corteza motora cerebral, la ALS puede ser clasificada de 2 formas: de inicio espinal (~75% de los casos), caracterizada por debilidad y atrofia muscular, calambres, fasciculaciones (contracciones, sacudidas y temblores involuntarios de grupos de fibras musculares), espasticidad o aumento anormal del tono muscular y parálisis, y de inicio bulbar (~25% de los casos), que se caracteriza por disfagia (dificultad para tragar) y disartria (dificultad para hablar) progresivas, espasticidad e hiperreflexia (Mulder et al., 1986). También se da una pérdida anormal de la masa muscular y del peso corporal. Puesto que la pérdida neuronal en ALS es selectiva, la enfermedad no disminuye la capacidad mental de los enfermos. En la mayoría de los pacientes con ALS, la muerte se debe a paro respiratorio provocado por la denervación de los músculos respiratorios y del diafragma. La prevalencia de la ALS es de aproximadamente 2 a 6 casos por cada 100,000 habitantes cada año y la edad media de inicio de los síntomas es de 55 años, aunque puede comenzar a edades menores (Chancellor y Warlow, 1992).

La enfermedad se da en las formas familiar y esporádica, con síntomas y cursos clínicos muy similares y características patológicas comunes, como la presencia de acumulaciones anormales de neurofilamentos en las motoneuronas afectadas (Julien, 2001). La esclerosis lateral amiotrófica familiar (FALS) representa un 5-10 % de los casos y tiene un patrón de herencia autosómica dominante, mientras que la esclerosis lateral amiotrófica esporádica (SALS) tiene una mayor

frecuencia y constituye la mayoría de los casos de ALS (~90-95 %). Entre los casos de FALS, aproximadamente 20 % son causados por mutaciones en el gen *SOD1* que codifica para la enzima Cu^{2+} - Zn^{2+} superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Rosen et al., 1993). Sin embargo, la causa de la mayoría de los casos de ALS es desconocida hasta la fecha y se han propuesto varias hipótesis como probables mecanismos que expliquen la muerte selectiva de las motoneuronas superiores e inferiores. Estas hipótesis incluyen daño oxidativo debido a la acumulación de ROS, deterioro del transporte y estrangulación axonal, desorganización de neurofilamentos, mal plegamiento de proteínas y toxicidad de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, inflamación, apoptosis y excitotoxicidad causada por una excesiva neurotransmisión glutamatérgica (Julien, 2001; Boillee et al., 2006; Bruijn et al., 2004; Cleveland y Rothstein, 2001; Rowland y Shneider, 2001; Shaw, 2005). Debido a que el curso clínico de la enfermedad es muy variable, el mecanismo de muerte neuronal puede resultar de la lamentable coincidencia de muchos factores antes que de una sola alternativa.

La patogénesis de la ALS ha sido estudiada en muestras de autopsia de pacientes con la enfermedad, pero esto no ha proporcionado información fehaciente de los mecanismos patofisiológicos de la degeneración de las motoneuronas durante la etapa clínica progresiva, desde el comienzo de la enfermedad hasta la muerte de los pacientes. Las características patológicas distintivas que se han encontrado en la médula espinal de pacientes de ALS a los que se les ha practicado la autopsia, incluyen la atrofia de motoneuronas dañadas con hinchamiento notable del cuerpo neuronal y axones proximales, anormalidades intracitoplásmicas de los neurofilamentos, y la presencia de cuerpos de Bunina (que son inclusiones intracitoplasmáticas pequeñas y eosinofílicas, de material electrodensito amorfo, de origen lisosomal y que son inmunorreactivas para cistatina C y transferrina, generalmente se consideran una característica patológica específica de la ALS), inclusiones ubiquitinadas en los axones afectados y en los cuerpos celulares que se pueden dividir en cuerpos esféricos compactos (inclusiones parecidas a los cuerpos de Lewy) o inclusiones con perfil filamentoso; esta patología de las motoneuronas es frecuentemente acompañada de gliosis reactiva (Strong et al., 2005).

Basándose en los múltiples eventos que se considera contribuyen a la pérdida selectiva de las motoneuronas como blancos para la terapia, se han probado muchas drogas diferentes en su capacidad para aliviar o retardar los síntomas de los pacientes con ALS o para prolongar su sobrevivencia, pero desgraciadamente ninguno ha sido efectivo. El único compuesto utilizado actualmente que disminuye

ligeramente la progresión de la enfermedad y prolonga, también ligeramente, la supervivencia de los pacientes con ALS, sin mejorar la función motora, es el riluzol. Esta droga reduce la liberación de glutamato de las terminales nerviosas probablemente mediante la estabilización del estado inactivo de los canales de Na^+ dependientes de voltaje y por una vía intracelular acoplada a proteínas G (Bensimon et al., 2002; Bensimon et al., 1994; Doble, 1996; Lacomblez et al., 2002; Lacomblez et al., 1996).

Las mutaciones en la SOD1 son la causa de un tipo de FALS

La Cu^{2+} - Zn^{2+} superóxido dismutasa (SOD1) es una enzima citoplásmica expresada ubicuamente que cataliza la dismutación del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ a $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ y por lo tanto es una importante enzima antioxidante que protege a las células contra el estrés oxidativo. El átomo de cobre de la enzima es alternativamente reducido y oxidado por el superóxido, mientras que el átomo de zinc da estabilidad estructural a la proteína: ambos cationes están localizados al fondo de un canal del sitio activo (Liochev y Fridovich, 2000; Tainer et al., 1982). Las mutaciones de la SOD1 que causan la enfermedad están diseminadas a lo largo de la estructura primaria de la proteína. Se han encontrado más de 100 mutaciones (Andersen, 2000; Andersen et al., 2001; Gaudette et al., 2000), y todas excepto una, SOD1^{D90A} (Andersen et al., 1996; Andersen et al., 1995), causan la enfermedad hereditaria dominante. Se han desarrollado ratones y ratas transgénicos que expresan la SOD1 humana mutada como modelos animales de la ALS, los que han sido ampliamente utilizados para tratar de entender los mecanismos de la muerte selectiva de las motoneuronas y para probar agentes terapéuticos; sin embargo, estos modelos tienen la enorme limitación de que sólo representan una pequeña proporción de los enfermos con FALS y aproximadamente sólo del 2–3 % del total de la ALS humana, además, muchos de los agentes terapéuticos que han funcionado al menos en parte en este modelo resultan ser inefectivos para el tratamiento de la ALS. Las mutaciones más comunes que han sido expresadas en los ratones transgénicos son la G93A, A4V, G37R y G85R (Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995; Bruijn et al., 1997). La enfermedad en los ratones transgénicos comienza con debilidad en las extremidades posteriores, deterioro en la extensión de las patas y longitud de zancada acortada, y continúa hasta la parálisis completa de las extremidades, principalmente las traseras, en pocos días (Gurney et al., 1994).

Ha sido un reto tratar de entender la toxicidad de las mutantes de la SOD1. Se ha demostrado que la toxicidad mediada por la SOD1 en la ALS no se debe a la pérdida de su actividad catalítica, sino más bien a una ganancia de función que le confiere una ó más propiedades tóxicas que son independientes de los niveles de su actividad de dismutasa (Brown, 1995). Los principales argumentos contra la importancia de la pérdida de la función como dismutasa son que los ratones knockout para la SOD1 no desarrollan enfermedad de las motoneuronas (Reaume et al., 1996) y que los niveles de actividad de la SOD1 no correlacionan con la enfermedad ni en los ratones ni en los humanos. De hecho, algunas enzimas con mutaciones retienen su actividad de dismutasa completa (Borchelt et al., 1994; Bowling et al., 1995), y el incremento crónico en los niveles de SOD1 nativa (y por lo tanto de actividad de dismutasa) no tienen efecto en el curso de la enfermedad (Bruijn et al., 1998) o hasta la aceleran (Jaarsma et al., 2000). La propiedad tóxica adquirida probablemente perturba muchas funciones celulares básicas en las neuronas, incluyendo la ruptura de proteínas por el sistema ubiquitina-proteosoma, el transporte axonal anterógrado lento, el transporte axonal retrógrado rápido, la homeóstasis de Ca^{2+} , la función mitocondrial y el mantenimiento de la arquitectura del citoesqueleto (Bruijn et al., 2004). La toxicidad puede resultar de, ya sea una química aberrante, mediada por los agregados de proteínas mutantes desdobladas, que puede desregular el equilibrio redox (Harraz et al., 2008) o producir pérdida o secuestro de componentes celulares esenciales, por ejemplo saturando las chaperonas que intervienen en el plegamiento de proteínas y/o la maquinaria de la degradación de proteínas (Bruijn et al., 2004; Cleveland y Rothstein, 2001; Harraz et al., 2008). Esto incluye estrés del retículo endoplásmico y acumulación de la SOD1 mutante en microsomas (Kikuchi et al., 2006; Nishitoh et al., 2008). El descubrimiento de inclusiones citoplásmicas prominentes en las motoneuronas y, en algunos casos, dentro de los astrocitos que las rodean en los modelos de los ratones de ALS mediados por la SOD1 mutada y en todos los casos reportados de ALS humana (Bruijn et al., 1998), dio lugar a la hipótesis de toxicidad por la agregación de proteínas. Estas inclusiones son generalmente elementos insolubles a detergentes, dispersados en el citosol, que han sido caracterizados por tinciones para ubiquitina y SOD1 (Basso et al., 2006; Wood et al., 2003). La toxicidad a las motoneuronas generada por las mutantes de SOD1 parece ser no autónoma de un solo tipo celular, ya que el daño por las mutantes ocurre no solamente en las neuronas, sino también en las células no-neuronales, sugiriendo que la muerte neuronal depende, al menos en parte, de una

contribución de los astrocitos de alrededor y posiblemente otros tipos celulares (Cassina et al., 2008; Clement et al., 2003; Yamanaka et al., 2008).

Hipótesis de la excitotoxicidad mediada por glutamato como causa de la ALS

Se encontró que la alta incidencia de ALS-PDC (amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex) en la Isla de Guam, localizada en el Pacífico occidental, se debía a la ingestión en la dieta de la semilla *Cycas circinalis*. Algunos contaminantes raros de alimentos son análogos del glutamato y causan excesiva activación de sus receptores, produciendo muerte neuronal. Esta semilla contiene el aminoácido β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), el cual en presencia de bicarbonato, se vuelve excitotóxico mediante un mecanismo que involucra la activación de los receptores AMPA y NMDA. La acción del BMAA puede ser bloqueada por el antagonista de los receptores tipo NMDA D-AP5 y por el antagonista de los receptores tipo AMPA/kainato NBQX (Spencer et al., 1987; Rao et al., 2006; Ince y Codd, 2005).

De entre las diferentes hipótesis postuladas, la excitotoxicidad mediada por glutamato es considerada como un mecanismo probable que conduce a la degeneración de motoneuronas tanto en la SALS como en la FALS. Como ya se mencionó, el glutamato puede producir excitotoxicidad por medio de la sobreactivación de los receptores tipo NMDA, AMPA y kainato. Las motoneuronas espinales son particularmente vulnerables a AMPA o kainato, agonistas de los receptores tipo AMPA, probablemente por el flujo de Ca^{2+} a través de este tipo de receptores permeables a Ca^{2+} que carecen de la subunidad GluR2 o cuya subunidad no ha sido editada posttranscripcionalmente en el sitio Q/R, tanto in vitro (Carriedo et al. 1995; Carriedo et al., 1996; Greig et al., 2000; Hugon et al. 1989; Rothstein y Kuncl 1995; Shaw 1999; Van Damme et al., 2002; Van Den Bosch et al., 2000; Williams et al., 1997) como in vivo (Corona y Tapia, 2004; Corona y Tapia, 2007). Por lo tanto, la activación de este tipo de receptores puede tener consecuencias patofisiológicas significativas que pueden estar involucradas en la ALS.

Los resultados de estudios sobre la expresión de GluR2 en motoneuronas espinales de humanos y ratas son controversiales ya que algunos estudios han informado que la subunidad GluR2 no se ha podido detectar en estas neuronas (Williams et al., 1997; Bar-Peled et al., 1999), mientras que en otros estudios se ha detectado y hasta cuantificado el nivel de expresión del mRNA de esta subunidad

(Tomiya et al., 1996; Virgo et al., 1996; Kawahara et al., 2003). Así, Williams y colaboradores informaron que en motoneuronas humanas normales de médula espinal no se detectó el mRNA de la subunidad GluR2, mientras que los mRNAs de las demás subunidades estaban claramente presentes, sugiriendo que la mayoría de los receptores tipo AMPA en estas células son permeables a Ca^{2+} (Williams et al., 1997). Por otro lado, en otro estudio se midió la abundancia relativa del mRNA de la subunidad GluR2 in situ en motoneuronas de médula espinal humana y en otros subconjuntos neuronales y se demostró que los niveles de mRNA de la subunidad GluR2 en las motoneuronas espinales era menor en comparación con los de otras poblaciones neuronales, pero no se encontró diferencia entre los pacientes con ALS y otros pacientes neurológicos (Kawahara et al., 2003). A diferencia de esto, Virgo y colaboradores cuantificaron los niveles de mRNA de las subunidades del receptor en homogenados de médula espinal encontrando una disminución significativa del mRNA de la subunidad GluR2 en las médulas espinales de pacientes con ALS comparado con los controles (Virgo et al., 1996). Además, también se han investigado los cambios moleculares del mRNA de la subunidad GluR2 de los receptores tipo AMPA en médula espinal de pacientes con ALS, pacientes con otras enfermedades neurológicas y pacientes control. Se mostró que existe un defecto en la edición del mRNA que codifica para esta subunidad en las motoneuronas espinales de individuos afectados por la ALS. Se encontró que la eficiencia de la edición del sitio Q/R en el mRNA de la subunidad GluR2 era significativamente menor en las astas ventrales de la médula espinal de pacientes con ALS comparado con cualquier región espinal de los controles con otras enfermedades y controles normales (Takuma et al., 1999). De igual forma se encontró después que la edición de esta subunidad GluR2 era deficiente en las motoneuronas espinales de algunos pacientes con ALS, mientras que no estaba alterada en las motoneuronas de pacientes control, y era prácticamente normal en las células cerebelares de Purkinje en ambos grupos de pacientes con y sin ALS (Kawahara et al., 2004; Kwak y Kawahara, 2005). Por otra parte, se encontró que la eficiencia para editar el sitio Q/R del RNA de la subunidad GluR2 en las ratas transgénicas con la SOD1 humana mutada era normal (Kawahara et al., 2006), sugiriendo que los mecanismos de muerte neuronal en la SALS y la FALS son diferentes.

Las motoneuronas son particularmente vulnerables a la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular porque tienen una baja capacidad de amortiguamiento debido a mecanismos deficientes de homeostasis de Ca^{2+} intracelular. Las motoneuronas espinales de personas sanas y pacientes con ALS, y de ratas y ratones

carecen de las 2 principales proteínas que unen calcio, la calbindina D-28k y la parvalbúmina, mientras que otras motoneuronas que generalmente no se afectan en la ALS, como las de los núcleos oculomotor y de Onuf sí expresan alguna de estas proteínas (Alexianu et al., 1994; Ince et al., 1993; Celio, 1990; Palecek et al., 1999). Además, se ha demostrado *in vitro* que las motoneuronas no tienen la capacidad mitocondrial suficiente para amortiguar grandes elevaciones en las concentraciones de calcio que se dan como consecuencia de la activación rápida y repetitiva de los receptores tipo AMPA por la exposición a kainato, debido en parte a una densidad mitocondrial por volumen menor comparada con neuronas no-motoras (Grosskreutz et al., 2007). Por lo tanto, la sobreactivación de los receptores tipo AMPA permeables a Ca^{2+} , que son abundantes en las motoneuronas espinales, le confieren a estas células especial vulnerabilidad a la excitotoxicidad mediada por los receptores AMPA. De hecho, la exposición a AMPA de cultivos de motoneuronas espinales causa un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} que conduce a una sobrecarga de Ca^{2+} y despolarización mitocondriales, y a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Carriedo et al., 2000). Muchas líneas de evidencia sugieren que el daño mitocondrial, posiblemente relacionado con alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} , está involucrado en la ALS esporádica y familiar (Manfredi y Xu, 2005; Menzies et al., 2002; Swerdlow et al., 1998; von Lewinski y Keller, 2005).

Análisis post-mortem de la corteza motora y de la médula espinal de pacientes con ALS revelaron una reducción en el contenido del transportador de glutamato EAAT2 (Rothstein y Kuncl, 1995; Rothstein et al., 1992; Shaw et al., 1994). Este descubrimiento dio lugar a la hipótesis de que el mal funcionamiento de EAAT2 podría ser un mecanismo importante que pudiera explicar la causa de la muerte de las motoneuronas en la ALS. Sin embargo, aun no se sabe si la pérdida de los transportadores de glutamato en el tejido de pacientes con ALS es una consecuencia o la causa de la pérdida neuronal (Sasaki et al., 2000). Además, aun cuando se han descrito niveles incrementados de glutamato en el líquido cefalorraquídeo y plasma de pacientes con SALS (Plaitakis y Caroscio, 1987; Rothstein et al., 1990), este incremento ocurrió solamente en ~40 % de los pacientes (Shaw et al., 1995; Spreux-Varoquaux et al., 2002), sugiriendo que el glutamato elevado no parece ser el factor desencadenante para la muerte de motoneuronas en la SALS. Asimismo, descubrimientos recientes de nuestro laboratorio no apoyan esta hipótesis, ya que el bloqueo farmacológico agudo (Corona y Tapia, 2004) y crónico (Tovar-y-Romo et al., 2009) del transporte de glutamato en la médula espinal de rata

in vivo, que resulta en concentraciones extracelulares de glutamato elevadas, no causó ni muerte neuronal ni déficits motores. Tampoco se observó daño neuronal en el hipocampo y corteza motora de los ratones transgénicos FALS en los que el glutamato extracelular fue elevado por el bloqueo del transporte (Tovar-y-Romo y Tapia, 2006).

Mitocondria y ALS

En tejidos de autopsias de pacientes con ALS se han observado anomalías morfológicas y ultraestructurales de las mitocondrias. Se encontraron agregados de mitocondrias anormales en la región subsarcolemal del músculo esquelético y en nervios intramusculares (Afifi et al., 1966; Atsumi, 1981). Posteriormente, también se detectaron anomalías morfológicas de la mitocondria en axones proximales y en las astas ventrales de la médula espinal de pacientes con SALS se encontraron conglomerados densos de mitocondrias (Hirano et al., 1984; Sasaki e Iwata, 1996). Estas alteraciones se observaron también en menor proporción en las neuronas no afectadas. Además, en biopsias de músculos de pacientes con ALS se encontraron mitocondrias con volumen incrementado y con niveles de Ca^{2+} elevados en las terminales nerviosas, lo que no se observó en pacientes con otras neuropatías ni en los sujetos controles (Siklos et al., 1996). Por otro lado, se encontraron mitocondrias gigantes con inclusiones intramitocondriales en el hígado de 21 pacientes con ALS, estas alteraciones fueron específicas de la enfermedad (Nakano et al., 1987). Las observaciones de la función mitocondrial han proporcionado evidencia consistente con las observaciones morfológicas. Se han identificado déficits en las actividades de los complejos I y IV de la cadena respiratoria en músculo esquelético y médula espinal de pacientes con SALS (Wiedemann et al., 1998; Vielhaber et al., 2000; Borthwick et al., 1999; Wiedemann et al., 2002). No obstante, en otro trabajo no se encontraron defectos en la función de la cadena respiratoria mitocondrial de músculo esquelético de pacientes con ALS comparados con los controles (Echaniz-Laguna et al., 2002). También se ha reportado en algunos pocos casos de ALS que la enfermedad resulta ser una mitocondriopatía (Finsterer, 2002; Finsterer, 2003; Comi et al., 1998). Se encontró una mutación en el DNA mitocondrial en el gen que codifica para la subunidad I del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial en un caso de SALS (Comi et al., 1998). Todos estos datos sugieren que el daño en la cadena respiratoria mitocondrial podría ser un acontecimiento relevante en la patogénesis de la SALS. El problema es que no se sabe aún si las anomalías en las

mitocondrias reflejan la causa del proceso de la enfermedad o si son consecuencia del transcurso de la degeneración neuronal, ésto debido a que los estudios en los tejidos humanos se realizan después del comienzo de la enfermedad o post-mortem, por esta razón es necesario hacer más estudios para poder determinar el grado de implicación de la disfunción mitocondrial en la ALS humana.

Estrés oxidativo en la ALS

Se ha propuesto que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos implicados en la degeneración de las motoneuronas en la ALS. Existe numerosa evidencia que apoya la participación del estrés oxidativo en la patogénesis de la ALS. Tejidos post mortem de pacientes con ALS han revelado daño oxidativo incrementado a los componentes celulares comparado con los controles. Estas muestras de tejido del SNC (principalmente de la médula espinal) de pacientes con SALS y FALS han mostrado aumento del daño oxidativo al DNA (Ferrante et al., 1997; Fitzmaurice et al., 1996), niveles elevados de proteínas carboniladas (Shaw et al., 1995; Ferrante et al., 1997) y de 3-nitrotirosina; notablemente, la inmunorreactividad para la 3-nitrotirosina se detectó más intensamente en las motoneuronas (Abe et al., 1995; Abe et al., 1997; Beal et al., 1997). Además, se encontró que la peroxidación de lípidos y la glicoxidación de proteínas eran mayores en las motoneuronas espinales y las células gliales (Shibata et al., 2001).

Los marcadores de daño oxidativo también se han analizado en muestras de líquido cefalorraquídeo y en plasma sanguíneo de pacientes vivos con ALS durante el curso de la enfermedad, mostrando un aumento en el daño oxidativo al DNA en ambos fluidos y también en orina -que fue determinado midiendo los niveles de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2'dG), un marcador estable de daño oxidativo a DNA, por medio de un método de cromatografía líquida electroquímica basado en una columna de carbón porosa selectiva para las purinas- (Bogdanov et al., 2000; Ihara et al., 2005), peroxidación de lípidos tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo (Oteiza et al., 1997; Smith et al., 1998; Bonnefont-Rousselot et al., 2000; Simpson et al., 2004), y una elevación notable en los niveles de 3-nitrotirosina en el líquido cefalorraquídeo (Tohgi et al., 1999), aunque este último resultado es controversial (Ryberg et al., 2004). El incremento en el daño oxidativo a las macromoléculas también ha sido demostrado en los modelos transgénicos de ratones con FALS que expresan la SOD1 mutada (Andrus et al., 1998; Liu et al., 1998; Liu et al., 1999; Poon et al., 2005;

Casoni et al., 2005), sugiriendo que el estrés oxidativo es un mecanismo que participa en la patogénesis de al menos un ~20 % de los pacientes con FALS. En modelos in vitro, las motoneuronas espinales a las que se les ha inducido excitotoxicidad por la exposición a AMPA, presentaron sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial desencadenando despolarización mitocondrial y generación de ROS (Carriedo et al., 2000).

Todos estos datos apoyan la hipótesis de que el estrés oxidativo es un mecanismo que contribuye al daño de las motoneuronas en la ALS, sin embargo, aun no está claro si el estrés oxidativo es una causa o una consecuencia de la enfermedad, puesto que puede desencadenar otros procesos celulares que han sido propuestos también como mecanismos de neurodegeneración (como son la excitotoxicidad, disfunción mitocondrial, agregación de proteínas, etc), o puede ser provocado o agravado por ellos.

Se ha probado la administración de antioxidantes en los ratones transgénicos que expresan la SOD1 mutada, en general estos tratamientos han modificado tanto el tiempo de inicio de los síntomas como la sobrevivencia. El tratamiento de los animales con vitamina E, catalasa y ginseng retrasaron significativamente la edad de inicio de los síntomas pero con efecto insignificante en la sobrevivencia (Gurney et al., 1996; Reinholz et al., 1999; Jiang et al., 2000). Los tratamientos con la coenzima Q10, creatina, un extracto de vino tinto y miméticos de la SOD1 / catalasa extendieron la sobrevivencia pero no la edad de inicio de los síntomas (Matthews et al., 1998; Klivenyi et al., 1999; Amodio et al., 2006; Jung et al., 2001). Por otro lado, los tratamientos con celastrol, té verde y Neu2000 retrasaron tanto el inicio de los síntomas como la edad de muerte (Kiaei et al., 2005; Koh et al., 2006; Shin et al., 2007). La profirina de manganeso AEOL-10150 administrada continuamente desde el inicio de los síntomas retrasó el progreso de la parálisis e incrementó notablemente la sobrevivencia y por esta razón parece ser un agente antioxidante prometedor en el tratamiento de la ALS (Crow et al., 2005). Desafortunadamente, muchos de los agentes terapéuticos que han tenido efectos positivos en los ratones transgénicos, han fallado en tener éxito en los pacientes. Las pruebas clínicas para antioxidantes como la vitamina E, la *N*-acetilcisteína, la L-metionina, la coenzima Q10 y la selegilina que es un inductor de las enzimas antioxidantes, no han mostrado resultados benéficos. Sin embargo, la calidad y diseño de los estudios clínicos ha sido pobre en general y un factor crítico es entender la farmacocinética y la farmacodinamia de los compuestos para que los estudios sean capaces de detectar algún efecto si lo hay. Además, un reto asociado con la terapia antioxidante para los pacientes con

ALS es la falta de compuestos antioxidantes potentes que crucen la barrera hematoencefálica. Actualmente se están realizando las pruebas clínicas para el antioxidante AEOL 10150, la profirina de manganeso que atrapa peroxinitrito y otros oxidantes perjudiciales, y también se está estudiando en humanos el antioxidante MCI-186 (edaravona), un atrapador de radicales libres con efectos potenciales en la función mitocondrial (Barber et al., 2006; Corona et al., 2007; Brooks, 2009).

Modelo *in vivo* de degeneración aguda de motoneuronas espinales por excitotoxicidad

Se han desarrollado modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* para tratar de entender mejor la enfermedad y estos modelos también han permitido probar posibles estrategias terapéuticas. Sin embargo, estos modelos tienen muchas limitaciones y no han tenido éxito en el diseño de tratamientos efectivos que detengan el curso de la enfermedad. Por lo tanto, todavía se necesita un modelo integral que reproduzca la muerte de las motoneuronas crónica y progresiva y las principales características de la enfermedad. Debido a que hay más modelos animales para la FALS que para la SALS a pesar de que ésta última representa más del 90 % de los casos, y basados en el hecho de que la sobreactivación de los receptores tipo AMPA permeables a Ca^{2+} , que son abundantes en las motoneuronas espinales, hace a estas células especialmente vulnerables a la excitotoxicidad, se desarrolló en el laboratorio un modelo *in vivo* de muerte selectiva de motoneuronas, basado en la perfusión por microdiálisis de AMPA en la zona lumbar de la médula espinal de ratas, que puede ser útil para estudiar los mecanismos de muerte de motoneuronas y para probar agentes terapéuticos potenciales (Corona y Tapia, 2004). El objetivo de los primeros experimentos en este esfuerzo era probar si la excitotoxicidad producida por los agonistas de los receptores NMDA y AMPA/kainato o por el glutamato endógeno induciría muerte de las motoneuronas espinales y parálisis en la rata. Se encontró que la concentración endógena de glutamato extracelular elevada mediante la inhibición del transporte de glutamato no causó alteraciones motoras ni pérdida de motoneuronas, resultados que no apoyan la hipótesis de la excitotoxicidad mediada por glutamato resultante de la pérdida de los transportadores de glutamato. Por otro lado, la perfusión de AMPA, a diferencia de la de NMDA o la de kainato, produjo parálisis permanente en la extremidad posterior ipsilateral y una pérdida notable de las motoneuronas espinales (figura 5), que comenzó a las ~3-6 horas después del comienzo de la perfusión y fue progresando hasta alcanzar el punto final a las 12 horas, cuando se da la pérdida de

prácticamente todas las motoneuronas en el segmento espinal estudiado. Todos estos efectos fueron prevenidos por el NBQX, antagonista de los receptores tipo AMPA, y por un inhibidor de proteasas (Corona y Tapia, 2004; Corona y Tapia, 2008).

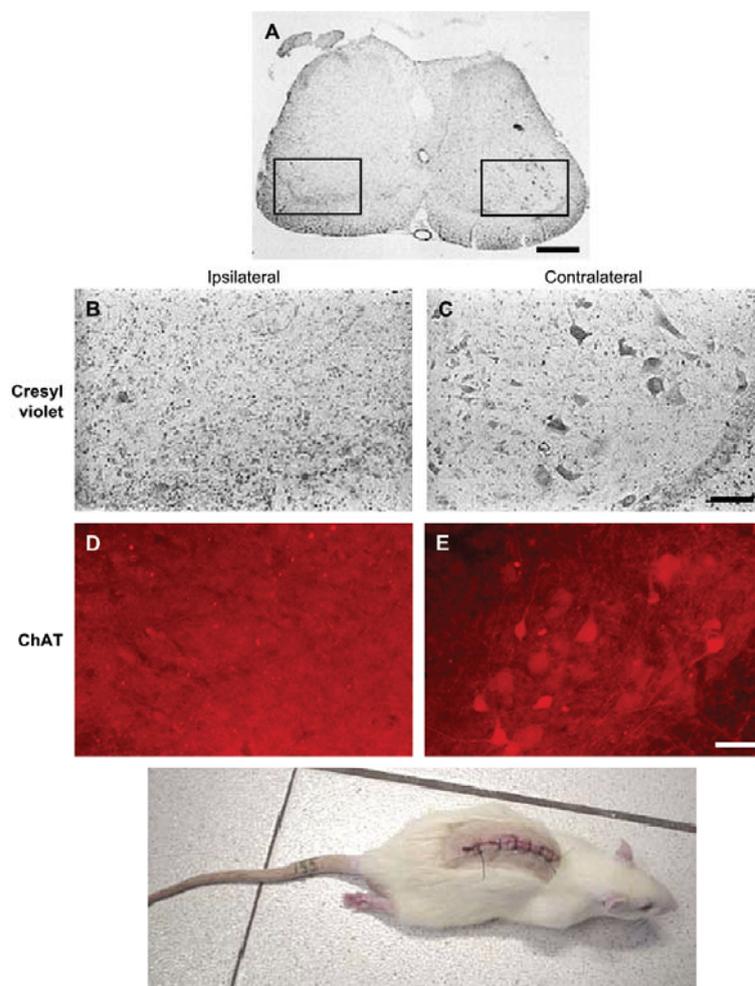


Figura 5. Micrografías representativas del efecto de la perfusión por microdiálisis de AMPA 6 mM en la médula espinal lumbar de la rata, 24 horas después del experimento. Los rectángulos en A indican las regiones amplificadas de las astas ventrales que se muestran en B y C. Nótese la pérdida casi completa de las motoneuronas en el lado ipsilateral visualizadas después del tñido con violeta de cresilo (A-C) o por medio de la inmunohistoquímica para la colina acetiltransferasa (ChAT), enzima que sintetiza la acetilcolina en las motoneuronas (D-E). Las motoneuronas del lado contralateral muestran una morfología e inmunohistoquímica normales. La fotografía de abajo muestra una rata tratada con AMPA 6 mM 24 horas después del experimento, mostrando una total parálisis de la pata ipsilateral al sitio de la microdiálisis. Barra en (A) = 400 μm , (B-E) = 100 μm (Tomado de Corona y Tapia, 2007).

El hecho de que la muerte de las motoneuronas en este modelo comience solamente después de las 3-6 horas de la infusión de AMPA, y sea completa hasta las 12-24 horas condujo a la hipótesis de que la entrada de Ca^{2+} probablemente a través de los receptores tipo AMPA permeables a Ca^{2+} , induce un proceso deletéreo retardado que conduce a la muerte de las motoneuronas. Para probar esta hipótesis, el AMPA fue co-administrado con 1-naftil acetil espermina (NAS), que es un bloqueador selectivo de

los receptores tipo AMPA que carecen de la subunidad GluR2 (Greig et al., 2000; Koike et al., 1997; Noh et al., 2005; Yin et al., 2002). Este compuesto previno significativamente la pérdida de las motoneuronas y la parálisis subsecuente (Corona y Tapia, 2007), indicando que las motoneuronas espinales de la rata poseen receptores tipo AMPA permeables a Ca^{2+} funcionales que carecen de la subunidad GluR2, y sugiriendo que el proceso celular que lleva a la muerte de las motoneuronas en este modelo, in vivo, es desencadenado por un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} vía estos receptores. La hipótesis de que ese incremento es responsable del daño fue confirmada por la co-perfusión del quelante de Ca^{2+} intracelular, el ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-*N,N,N',N'*-tetraacético tetrakis (acetoximetil ester) (BAPTA-AM) con AMPA, que fue tan efectivo como el NAS en la prevención del daño a las motoneuronas y la parálisis (Corona y Tapia, 2007). La relevancia de estos descubrimientos es notable porque, a diferencia de algunos otros experimentos realizados in vitro en los cuales la concentración de Ca^{2+} en el medio de cultivo tuvo que ser elevada de 2 mM a 10 mM (Van Den Bosch et al., 2000; Carriedo et al., 1996), la muerte neuronal se debe a los incrementos de Ca^{2+} citoplásmico que ocurren bajo las concentraciones fisiológicas extracelulares de este catión (2 mM). Todos estos datos en conjunto sugieren que los receptores tipo AMPA pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la ALS.

Sustratos energéticos y antioxidantes como neuroprotectores

Dado que uno de los mecanismos mediante los cuales la concentración intracelular incrementada de Ca^{2+} induce la muerte neuronal es la deficiencia en la función mitocondrial (Beal, 1992; Manfredi y Xu, 2005; Nicholls y Budd, 2000; Schinder et al., 1996; von Lewinski y Keller, 2005), se quiso probar si esta deficiencia está involucrada en la degeneración de las motoneuronas espinales inducida por AMPA. También en el trabajo anteriormente mencionado (Corona y Tapia, 2007) y utilizando el mismo modelo, se estudió el efecto neuroprotector del piruvato, un sustrato del metabolismo energético que es rápidamente oxidado por la mitocondria, perfundiéndolo por microdiálisis en la médula espinal. Este compuesto también previno la parálisis y la muerte de las motoneuronas. El hecho de que el piruvato también proteja de los efectos excitotóxicos del AMPA, sugiere que la concentración intracelular incrementada de Ca^{2+} interfiere con el metabolismo energético mitocondrial. Concordando con esta idea, en cultivos de neuronas del núcleo estriado de ratón, el

piruvato y el lactato protegieron de la neurotoxicidad inducida por NMDA o AMPA (Maus et al., 1999). La suplementación con piruvato atenúa significativamente la excitotoxicidad en células granulares cerebrales sometidas a una exposición crónica a glutamato (Jekabsons y Nicholls, 2004). Por otro lado, el piruvato protegió del daño inducido por H₂O₂ también en cultivos de neuronas del núcleo estriado de ratón. Al parecer el efecto neuroprotector del piruvato también se debe a la habilidad que tienen los α -cetoácidos de actuar como atrapadores de radicales libres, de hecho, varios α -cetoácidos como son el oxaloacetato, el α -cetobutirato y el α -cetoglutarato, tuvieron el mismo efecto neuroprotector ante la toxicidad inducida por H₂O₂ (Desagher et al., 1997). En una línea celular híbrida motoneuronas-neuroblastoma (VSC 4.1) expresando la SOD1 mutada (G93A) que es considerada como un modelo de ALS in vitro, el piruvato redujo significativamente la muerte celular y la producción de ROS inducidas por cobre, ya que el tratamiento con cloruro de cobre redujo la viabilidad e incrementó los niveles de peróxidos endógenos en estas células (Kim et al., 2005). Esto sugiere que, aunque el piruvato está probablemente actuando como un sustrato energético suplementario para restaurar la función mitocondrial, también es probable que actúe como un antioxidante. En otro estudio de citotoxicidad inducida por H₂O₂, realizado en cultivos de la línea celular V79 de hamster chino (fibroblastos pulmonares) se observó una protección eficiente contra los efectos letales del H₂O₂ por el piruvato y otros α -cetoácidos, como el α -cetobutirato, α -cetoglutarato y α -cetoadipato, aunque para que éstos últimos ejercieran sus efectos protectores se requirieron concentraciones mayores, indicando que tanto el piruvato como otros α -cetoácidos poseen actividad antioxidante (Andrae et al., 1985). Esto se atribuye a la capacidad que tienen los α -cetoácidos de reaccionar vía no-enzimática con el H₂O₂ descarboxilándose, de esta manera convierten el H₂O₂ a H₂O liberando CO₂ y produciendo el ácido carboxílico correspondiente:



Existe evidencia del efecto neuroprotector del cuerpo cetónico D- β -hidroxibutirato (D-BHB) contra la toxicidad producida por glutamato. El daño neuronal y el estrés oxidativo mediados por la excitotoxicidad provocada por la inyección intraestriatal de glutamato en ratas, se ven aumentados cuando a éstas se les provoca daño en el metabolismo energético mediante la inhibición de la glucólisis por la administración sistémica de iodoacetato (IOA). El tratamiento de estas ratas con D-

BHB reduce significativamente las lesiones estriatales y la lipoperoxidación (Mejía-Toiber et al., 2006). Asimismo, los ratones transgénicos que expresan el gen de la SOD1 humana mutada (G93A) fueron alimentados con una dieta cetogénica teniendo como resultado alteraciones significativas en las manifestaciones clínicas de la enfermedad. La función motora de los ratones transgénicos alimentados con la dieta cetogénica se preservó por más tiempo comparada con los ratones control; la dieta también tuvo efecto en el peso de los animales durante el progreso de la enfermedad, ya que los animales alimentados con la dieta cetogénica ganaron peso más rápidamente durante la fase presintomática y perdieron peso más lentamente conforme la enfermedad fue progresando. También se observó una preservación significativa de las motoneuronas de la médula espinal lumbar en los ratones tratados al final del estudio (Zhao et al., 2006).

Existe cada vez más evidencia experimental que sugiere que el estrés oxidativo está involucrado en la patogénesis de la ALS. Por esta razón, como ya se mencionó, se han probado algunos antioxidantes en los modelos experimentales de la ALS para observar su efecto neuroprotector y su potencial uso en el tratamiento de la enfermedad. En un estudio realizado con los ratones transgénicos SOD1-G93A, se probó la eficacia del ascorbato sólo y combinado con trientina, un quelante de cobre, antes o después del inicio de los síntomas de la enfermedad. Los ratones tratados sólo con ascorbato administrado antes del inicio de los síntomas, sobrevivieron significativamente más tiempo que los ratones control; este efecto también se observó en los ratones tratados con ascorbato y trientina, además, la función motora se preservó por más tiempo en este grupo (Nagano et al. 2003). En otro trabajo en el cual se examinaron los efectos neuroprotectores del ácido ascórbico contra la toxicidad inducida por NMDA y glutamato en cultivos de neuronas de corteza cerebral, el ascorbato protegió completamente contra el daño inducido por una baja concentración de NMDA y redujo significativamente la muerte neuronal inducida por una concentración mayor de NMDA o por glutamato (Majewska y Bell, 1990). De igual manera, se ha comprobado en otros trabajos la neuroprotección proporcionada por el ácido ascórbico contra daños resultantes por excitotoxicidad tanto in vitro como in vivo (MacGregor et al., 1996; Majewska et al., 1990; Kim et al., 2008).

Todos estos datos sugieren que tanto el ácido ascórbico como los sustratos energéticos mencionados pueden servir como neuroprotectores contra la muerte excitotóxica y en el tratamiento de la ALS.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En los antecedentes presentados se mencionó que la muerte selectiva de las motoneuronas inducida por la administración de AMPA se debe fundamentalmente al aumento intracelular de Ca^{2+} a través de los receptores tipo AMPA permeables a este catión. Las mitocondrias juegan un papel importante en la respuesta de las neuronas a la estimulación excitotóxica y la función mitocondrial puede verse afectada por este aumento de Ca^{2+} . Asimismo, la producción de ROS se incrementa ante una concentración elevada de Ca^{2+} intracelular y el estrés oxidativo es un mecanismo que se da durante la excitotoxicidad. Es relevante conocer la importancia de la participación de estos mecanismos en la degeneración de las motoneuronas para poder proponer agentes neuroprotectores dirigidos a preservar la función mitocondrial y evitar el estrés oxidativo en enfermedades en las que la excitotoxicidad esté muy probablemente contribuyendo a la neurodegeneración, como la ALS.

IV. HIPÓTESIS:

El aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} inducida por la administración de AMPA puede producir, entre otras cosas, una deficiencia de la función mitocondrial y trastorno del metabolismo energético, así como la generación de ROS. Estos 2 mecanismos participan de manera importante en la muerte de motoneuronas espinales.

El déficit de la función mitocondrial resultará en una disminución en la producción de ATP, lo cual es al menos parcialmente responsable de la muerte neuronal, por lo que la administración de sustratos energéticos que puedan contribuir al restablecimiento o al aumento de la producción de energía y por lo tanto a mantener la homeostasis en la concentración intracelular de Ca^{2+} , pueden ejercer protección contra la neurodegeneración inducida por el AMPA.

Asimismo, la administración de antioxidantes o sustratos que puedan contribuir a la disminución de la producción de ROS evitará el estrés oxidativo, ejerciendo así un efecto protector contra la neurodegeneración.

V. OBJETIVOS:

1. Conocer la importancia de la participación de la deficiencia de la función mitocondrial y del estrés oxidativo en la muerte selectiva de las motoneuronas espinales ocasionada por la sobreactivación farmacológica de los receptores AMPA.
2. Conocer los posibles efectos neuroprotectores de diferentes sustratos energéticos que actúen estimulando el metabolismo energético y la producción de energía y/o como antioxidantes (lactato, α -cetobutirato, β -hidroxibutirato, ascorbato) en el modelo agudo de muerte de motoneuronas provocado mediante la perfusión de AMPA por microdiálisis en la médula espinal de ratas.
3. Analizar histológica e inmunohistoquímicamente la potencial protección de las motoneuronas espinales de la rata con los diferentes agentes neuroprotectores en comparación con el daño producido en las motoneuronas espinales por la perfusión de AMPA solo y relacionarlo con la función motora de las ratas.

VI. METODOLOGÍA:

Cirugía y microdiálisis en la médula espinal

El modelo experimental son ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 280-310 g. Se anestesian con una mezcla de 4-5 % de halotano en una mezcla 95 % O₂ / 5 % CO₂ y se montan en aparatos estereotáxicos para médula espinal (David Kopf, Tujunga, CA), con una almohadilla isotérmica a 37 °C (Braintree Scientific, INC) para mantener la temperatura del animal. Una vez anestesiadas, se les realiza una incisión longitudinal en la región de las vértebras lumbares, las cuáles son expuestas después de separar y limpiar cuidadosamente el músculo que las rodea. Se taladra un orificio de ~1-2 mm de diámetro en la segunda-tercera vértebra lumbar y una vez expuesta la médula se procede a eliminar las meninges con mucho cuidado para evitar alguna hemorragia; se retira la sangre para observar fácilmente la médula y se introduce en ella una cánula de microdiálisis (membrana de diálisis de cuprofano de 1 mm de longitud x 0.24 mm de diámetro, CMA/7 Microdialysis Probe, Solna, Sweden, previamente lavada con agua destilada por 1 hora a un flujo de 15 μ l / minuto), en el asta

dorsal derecha sin llegar al asta ventral para evitar daño mecánico en esta región (se introduce únicamente la membrana de diálisis de 1 mm).

Los animales se mantienen con baja anestesia (de 0.8 a 1 % de halotano) durante todo el experimento, y las cánulas de microdiálisis se perfunden continuamente con solución Krebs-Ringer normal que contiene 118 mM NaCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 4.7 mM KCl, 1.18 mM MgSO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 10 mM de glucosa y 2.5 mM CaCl_2 (pH 7.4) a un flujo de 2 μl / minuto, utilizando una microjeringa montada en una bomba de microinyección (CMA/100, Carnegie, Sweden). Después de un periodo de estabilización de 60 minutos, se colectan continuamente fracciones de microdiálisis de 25 μl (12.5 minutos). Según sea el caso, el sustrato energético o antioxidante que se está probando como neuroprotector se perfunde desde la estabilización junto con la solución Krebs-Ringer, probándolo a diferentes concentraciones (adicionándolo a la solución Krebs-Ringer normal y reduciendo la concentración de NaCl proporcionalmente para mantener la osmolaridad, así como ajustando el pH a 7.4 si es necesario). Las 3 primeras fracciones colectadas se utilizan para determinar los niveles basales de aminoácidos y en las 2 siguientes fracciones se cambia el medio de perfusión por un medio con AMPA (Tocris, Bristol, U.K.) 6 mM (disuelto previamente en agua estéril y adicionándolo a la solución Krebs-Ringer + el sustrato energético o antioxidante a probar si es el caso y reduciendo la concentración del NaCl proporcionalmente para mantener la osmolaridad). Por último se procede a recolectar 3 fracciones adicionales con solución Krebs-Ringer + sustrato energético o antioxidante. Es importante considerar que la eficiencia de la membrana de diálisis de la cánula para los compuestos de bajo peso molecular como los utilizados en este trabajo y para los aminoácidos colectados es del 7-11 % (Massieu et al., 1995). De hecho, la eficiencia de las cánulas de microdiálisis para el AMPA fue previamente evaluada in vitro por medio de la determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) después de su derivatización con o-ftaldialdehído, y se encontró que es de 9.5 ± 1.1 % (Corona y Tapia, 2007). La concentración de AMPA utilizada y la duración de su administración fueron escogidas en base a observaciones dosis-respuesta y resultados previos del laboratorio (Corona y Tapia, 2004; 2007). Las concentraciones iniciales de lactato, α -cetobutirato, β -hidroxibutirato y ascorbato fueron escogidas en base a resultados previos de este laboratorio para el piruvato (Corona y Tapia, 2007), y en base a los trabajos de otros investigadores, extrapolándolas a nuestras condiciones experimentales de microdiálisis y tomando en cuenta la eficiencia de la membrana de diálisis que para

fines de los cálculos fue considerada del 10 %.

Se realizan también ratas control perfundiéndolas con los sustratos energéticos o antioxidante en la solución Krebs-Ringer para probar que no exista ninguna alteración conductual, ni en las concentraciones de aminoácidos, ni alteraciones histológicas.

Una vez concluido el experimento se sutura la piel del animal, se discontinúa la anestesia y se mantienen los animales en cajas durante 24 horas en el bioterio con agua y comida ad libitum. Los animales tratados se observan durante y después de la cirugía.

Evaluación de la función motora

Para analizar la función motora cuantitativamente, se realiza la prueba del rotarod (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) 6 y 24 horas después de la cirugía. Las ratas se someten a 2 sesiones de entrenamiento, un día antes y minutos antes de la cirugía. Se colocan en la barra del rotarod con una aceleración de 0.2 rpm/s comenzando desde 10 rpm, y se mide el tiempo que tardan en caer, tomando como límite máximo 120 segundos.

Evaluación histológica

A las 24 horas de la cirugía, después de realizarles la prueba del rotarod, los animales se anestesian profundamente con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico y se perfunden transcardialmente con 250 ml de solución salina al 0.9 %, seguida de 250 ml de paraformaldehído al 4 % en buffer de fosfatos (PB) 0.1 M, pH 7.4. Se extrae la porción lumbar de la médula espinal, se mantiene en postfijación con paraformaldehído al 4 % durante 24 horas a 4°C, y después se transfiere a soluciones de sacarosa al 10 %, 20 % y 30 % durante 24 horas cada una. Posteriormente, las médulas son embebidas en “Tissue tech” y se obtienen cortes coronales seriados de 40-50 µm en un crióstato. Cortes alternados de la médula se tiñen con violeta de cresilo o se tratan para inmunohistoquímica colocándolos en una caja con buffer de fosfatos-salina (PBS) 0.1 M. Se confirma en todos los casos la correcta localización de la cánula de microdiálisis en las astas dorsales sin que haya daño mecánico en las astas ventrales. En las médulas teñidas con violeta de cresilo, se cuentan las motoneuronas morfológicamente no dañadas que se encuentran en el asta ventral, identificadas por su soma de gran tamaño (> 25 µm), con citoplasma claramente visible, similares en apariencia a las de las ratas control

o a las de el asta ventral contralateral correspondiente, en un campo 10x del microscopio. Se cuentan 5-6 cortes de la médula espinal por cada rata, separados entre sí ~40-50 μm .

Inmunohistoquímica

Médula espinal

Dado el carácter colinérgico de las motoneuronas espinales, éstas se identifican mediante detección de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Los cortes de la médula se colocan en cajas con 500 μl de PBS 0.1 M pH 7.4, y se mantienen bloqueando durante 2 horas en agitación con albúmina de suero bovino al 5 % (BSA) disuelta en buffer de fosfatos-salina con Tritón X-100 (PBS-Tx) al 0.3 %. Los cortes se incuban posteriormente con un anticuerpo primario de cabra anti-ChAT (Chemicon, Temecula, CA, USA) a una dilución de 1:200 en PBS-Tx al 0.3 % y albúmina al 5 %, durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante. Se realizan controles a los cuáles no se les adiciona el anticuerpo primario.

Al día siguiente se lavan los cortes 2 veces durante 10 minutos con PBS-Tx al 0.3 % y se adiciona el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a una dilución de 1:200 en PBS-Tx al 0.3 % y se incuban durante 1-2 h. Después de 3 lavados de 10 min con PBS-Tx al 0.3 %, se agrega avidina acoplada a Texas Red (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a una dilución de 1:200 en PBS- Tx al 0.3 % con un pH de 8.2. La avidina se prepara 30 min antes, en la oscuridad y se guarda en refrigeración. Una vez incubadas las muestras con avidina, se cubre la caja totalmente con papel aluminio, se mantiene en la oscuridad y con agitación continua durante 1-2 h. Por último se realizan 3 lavados de 10 min con PBS y los cortes se montan en portaobjetos, con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratorios, Burlingame, CA), y se observan en un microscopio Nikon equipado con epifluorescencia.

Análisis de aminoácidos extracelulares

El contenido de aminoácidos en las fracciones de microdiálisis se mide por HPLC después de su derivatización con *o*-ftaldialdehído, como se ha descrito previamente (Salazar et al., 1994; Massieu et al., 1995). Las fracciones recolectadas (25 μl) se mezclan con un mismo volumen de *o*-ftaldialdehído (OPA) y 3 min después se inyectan 20 μL en un cromatógrafo líquido de alta resolución Beckman

equipado con una columna ODS (25 cm x 4 mm). Como fase móvil se utilizan metanol grado HPLC y acetato de potasio (0.1 M, pH 5.5) y se corre en un gradiente lineal de 25 a 75 % metanol, a un flujo de 1.5 ml/minuto (duración de 15 min). La detección se realiza por la medición de la fluorescencia del derivado de OPA, a 330 nm de excitación y 460 nm de emisión. La cuantificación de aminoácidos se realiza por comparación con una mezcla estándar de aminoácidos que fueron procesados de la misma manera. Los valores reportados no fueron corregidos para la eficiencia de la membrana de diálisis, que para las cánulas con una membrana de 1 mm de longitud usadas es de 7.7 ± 1.3 % para el glutamato y 11.3 ± 0.37 % para el aspartato como ha sido reportado previamente (Corona y Tapia, 2007), valores similares a los obtenidos anteriormente (del 7-11 %) para las membranas de 2 mm en pruebas de recuperación in vitro (Massieu et al., 1995).

Análisis estadístico

El conteo de motoneuronas y los resultados de la prueba del rotarod con los diferentes tratamientos fueron analizados con la prueba estadística ANOVA con comparaciones post-hoc de la prueba Tukey. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VII. RESULTADOS:

CONTROL

Como control se utilizaron ratas a las cuales se les perfundió únicamente solución Krebs-Ringer en la región lumbar de la médula espinal por medio de la cánula de microdiálisis introducida en el asta dorsal, para comprobar que estas ratas no presentan ninguna alteración conductual ni daño de las motoneuronas que se encuentran en el asta ventral. Estas ratas efectivamente no presentan ninguna alteración motora manteniéndose en el rotarod hasta el tiempo límite de 120 seg (figura 19), e histológicamente no presentan pérdida ni daño de motoneuronas (figuras 6 y 20).

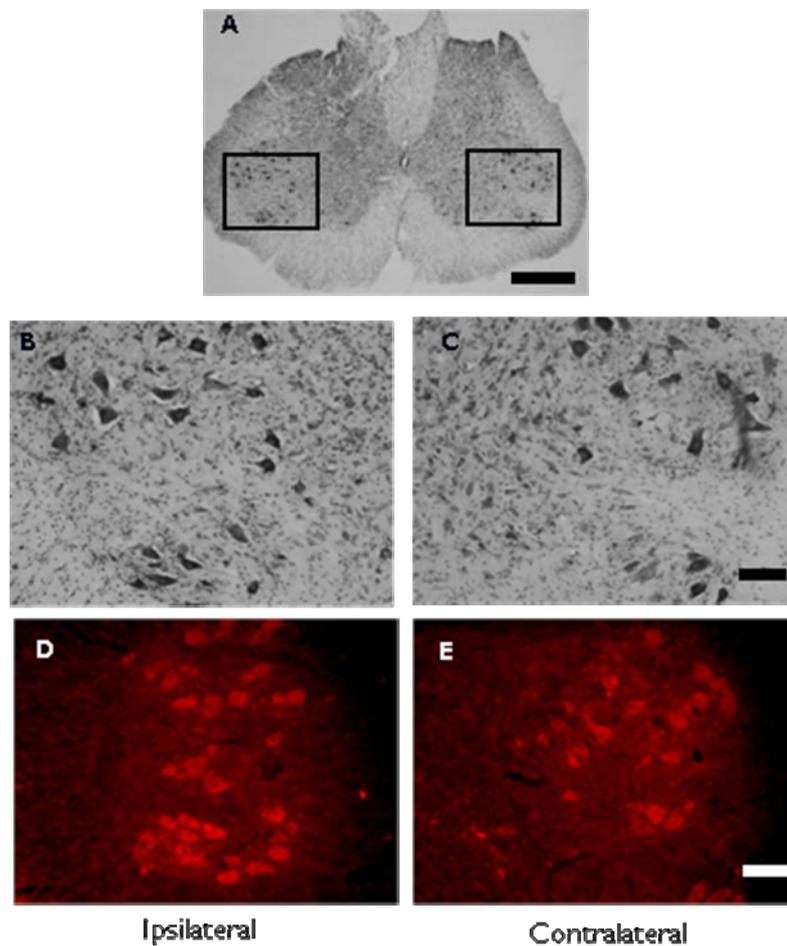


Figura 6. Micrografías representativas de una rata control perfundida sólo con medio Krebs-Ringer. Se muestra la morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar 24 horas después del experimento. A, B y C: tinciones con violeta de cresilo. En A se observa el tracto de la cánula de microdiálisis en el asta dorsal ipsilateral. B y C corresponden a los cuadros en A. D y E: inmunohistoquímica para la ChAT en las astas ventrales ipsilateral y contralateral. Nótese que las motoneuronas en las astas ventrales se encuentran bien preservadas en todas las micrografías. Barras: en A = 500 μ m, B-E = 100 μ m.

En todas las condiciones descritas a continuación se perfundió como agente neuroprotector potencial el sustrato energético o antioxidante a las concentraciones indicadas disuelto en solución Krebs-Ringer desde la estabilización y durante toda la operación (en total 160 min), y se les perfundió AMPA 6 mM durante 2 fracciones (25 min) según el modelo agudo de muerte de motoneuronas anteriormente descrito (Corona y Tapia, 2004). Dado que el AMPA se perfunde durante 2 fracciones y considerando el 10 % de eficiencia para la membrana de diálisis, la cantidad total de AMPA que pasa a la médula espinal es de ~ 0.03 μ moles. Se realizaron intercaladamente controles de ratas tratadas sólo con AMPA 6 mM, presentando éstas parálisis de la pata trasera ipsilateral, un enorme déficit en el desempeño de la prueba del rotarod y pérdida severa de las motoneuronas en el asta ventral del lado ipsilateral a la introducción de la cánula de microdiálisis, reproduciéndose los resultados ya descritos (figuras 5, 19 y 20). También se realizaron controles perfundiendo cada uno de los sustratos energéticos o antioxidante sólo sin la perfusión de AMPA a las concentraciones a las que se probó cada uno, en ningún caso estos compuestos provocaron pérdida de motoneuronas ni alguna alteración o déficit motor (datos no mostrados).

Es importante mencionar que en todos los casos se midieron las concentraciones extracelulares de glutamato y aspartato; en ningún caso, con ninguno de los compuestos probados en este trabajo, se observaron elevaciones ni modificaciones significativas en los niveles extracelulares de estos aminoácidos, como tampoco sucede con la sola perfusión de AMPA 6 mM.

LACTATO

Como se mencionó en los antecedentes, previamente se probó la perfusión de un sustrato energético que también tiene propiedades antioxidantes, el piruvato, el cual se utilizó a una concentración de 20 mM; este sustrato previno la neurodegeneración y la parálisis producida por el AMPA (Corona y Tapia, 2007). Por esta razón, en este trabajo se decidió probar el lactato, que también puede actuar como sustrato energético pero no tiene efectos antioxidantes.

- Lactato 20 mM

Se probó la perfusión del lactato a una concentración de 20 mM junto con el AMPA 6 mM, a esta concentración no se observó protección contra la muerte de motoneuronas ni se previno la parálisis

(datos no mostrados). Dado que el lactato se perfunde desde la hora de estabilización y considerando el 10 % de eficiencia para la membrana de diálisis, la cantidad total de lactato que pasa a la médula espinal a esta concentración es de ~ 0.64 μ moles.

- Lactato 50 mM

La perfusión de lactato 50 mM previno parcialmente tanto las alteraciones motoras, como la parálisis provocada por el AMPA 6 mM. En todas las ratas se observó un déficit a diferentes niveles de la actividad motora en la prueba del rotarod (figura 9 y 19), conductualmente algunas ratas mostraron parálisis parcial debido a que mostraron dificultad para incorporar por completo la pata derecha al caminar. Dado que el lactato se perfunde desde la hora de estabilización y durante las 8 fracciones de microdiálisis (160 min en total), y considerando el 10 % de eficiencia para la membrana de diálisis, la cantidad total de lactato que pasa a la médula espinal a esta concentración es de ~ 1.6 μ moles. Histológicamente se observó que la pérdida de aproximadamente el 89 % de motoneuronas relativo al control provocada por el AMPA, se redujo a un 52 % aproximadamente en presencia de lactato 50 mM (figuras 7, 9 y 20).

- Lactato 100 mM

La perfusión de lactato 100 mM previno las alteraciones motoras y la parálisis provocadas por el AMPA 6 mM. En todas las ratas tratadas se observó un ligero déficit de la actividad motora en la prueba del rotarod (figuras 9 y 19). Dado que el lactato se perfunde desde la hora de estabilización y durante las 8 fracciones de microdiálisis (160 min en total), y considerando el 10 % de eficiencia para la membrana de diálisis, la cantidad total de lactato que pasa a la médula espinal a esta concentración es de ~ 3.2 μ moles. Histológicamente se observó que el lactato 100 mM redujo aproximadamente al 40 % la pérdida de motoneuronas provocada por el AMPA (figuras 8, 9 y 20).

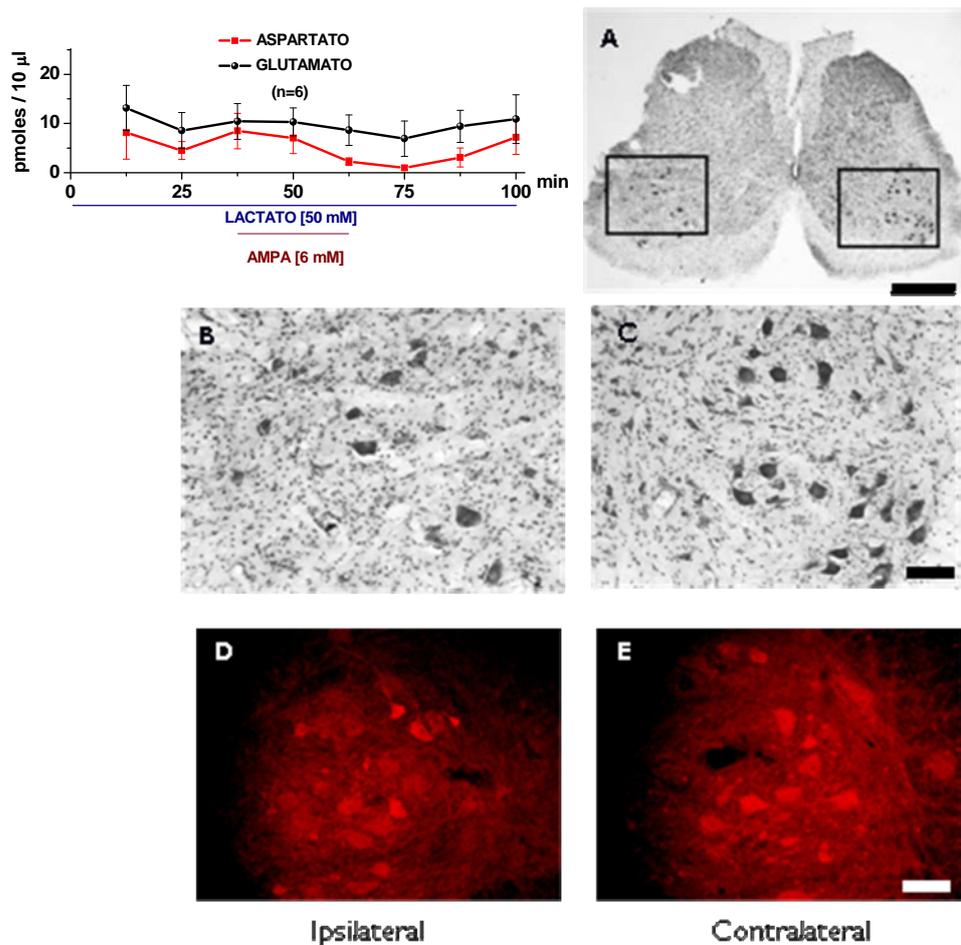


Figura 7. Micrografías representativas de una rata perfundida con lactato 50 mM + AMPA 6 mM (n = 9). Se muestra la morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar 24 horas después del experimento. Tinciones con violeta de cresilo en A, B y C. Los rectángulos en A indican las regiones amplificadas de las astas ventrales que se muestran en B y C. D y E: inmunohistoquímica para la ChAT en las astas ventrales contralateral e ipsilateral. Nótese la disminución en el número de motoneuronas en el lado ipsilateral en comparación con el lado contralateral. Para datos cuantitativos del número de motoneuronas véase las figuras 9 y 20. Barras: en A = 500 µm, B-E = 100 µm. No se modificó la concentración extracelular de los aminoácidos glutamato y aspartato como se puede observar en la gráfica superior izquierda, n = 6 para la determinación de aminoácidos extracelulares.

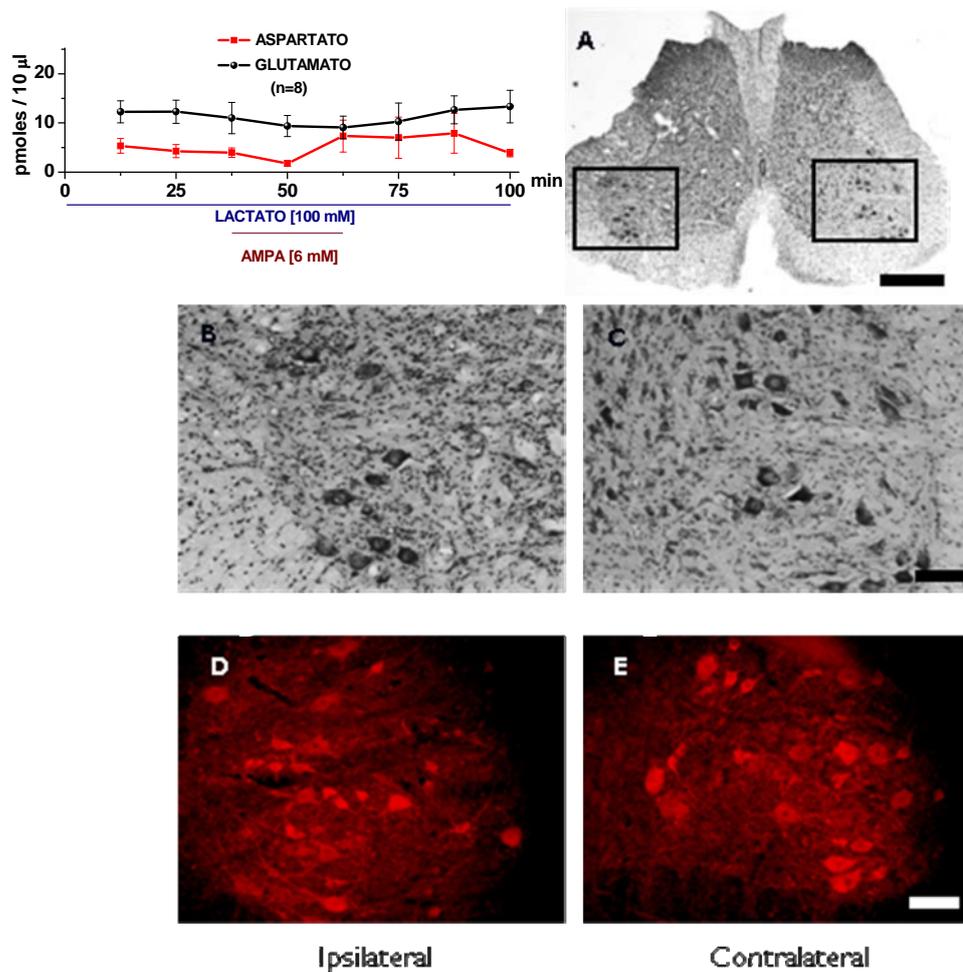


Figura 8. Micrografías representativas de una rata perfundida con lactato 100 mM + AMPA 6 mM (n = 9). Se muestra la morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar 24 horas después del experimento. Tinciones con violeta de cresilo en A, B y C. Los rectángulos en A indican las regiones amplificadas de las astas ventrales que se muestran en B y C. D y E: inmunohistoquímica para la ChAT en las astas ventrales contralateral e ipsilateral. Nótese la protección de las motoneuronas en el lado ipsilateral. Para datos cuantitativos del número de motoneuronas véase las figuras 9 y 20. Barras: en A = 500 μm, B-E = 100 μm. No se modificó la concentración extracelular de los aminoácidos glutamato y aspartato como se puede observar en la gráfica superior izquierda, n = 8 para la determinación de aminoácidos extracelulares.

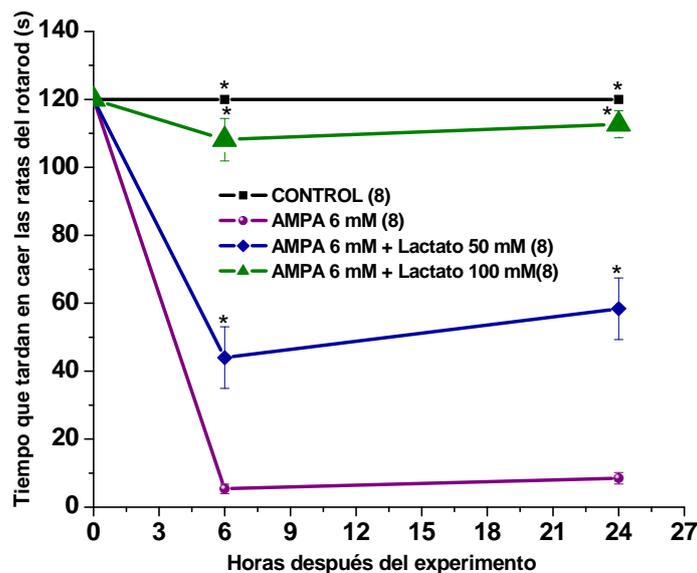
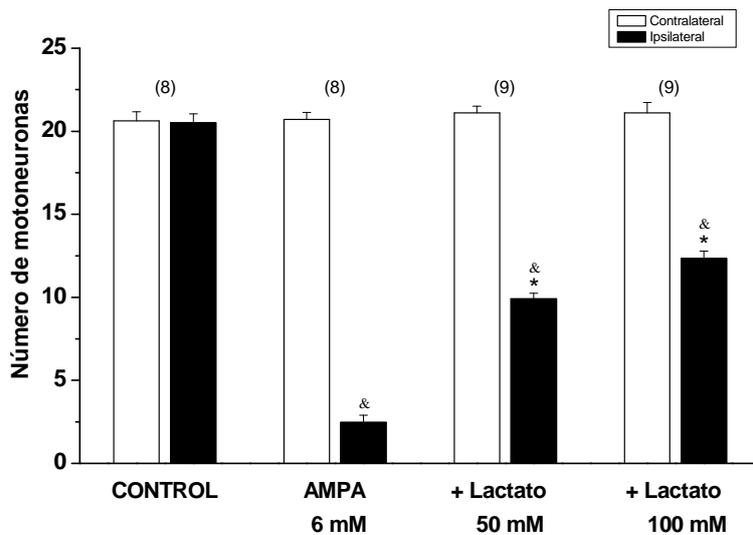


Figura 9. Arriba se muestran los conteos del número de motoneuronas sanas en las astas ventrales ipsilaterales y contralaterales de las médulas espinales de las ratas perfundidas con solución Krebs-Ringer (control), AMPA 6 mM, y AMPA 6 mM + lactato 50 y 100 mM. Valores promedio \pm SEM para el número de ratas indicado arriba de las barras. * $p < 0.001$ vs. el asta ventral ipsilateral perfundida sólo con AMPA. & $p < 0.001$ vs. el asta ventral contralateral correspondiente. Abajo se muestran los valores obtenidos en la prueba del rotarod. El tiempo cero representa las sesiones de entrenamiento (límite máximo 120 seg). Como control se utilizaron ratas sin operar u operadas a las cuáles sólo se les perfundió solución Krebs-Ringer. En la gráfica se observan las ratas tratadas con AMPA sólo y las ratas tratadas con AMPA + lactato 50 mM y 100 mM. Los datos representan el promedio \pm SEM del número de ratas indicado entre paréntesis. * $p < 0.001$ vs. el grupo de ratas tratadas sólo con AMPA.

α -CETOBUTIRATO

Se evaluó también el posible efecto neuroprotector de otro α -cetoácido, debido a la capacidad antioxidante que éstos poseen.

- α -Cetobutirato 20 mM

La perfusión de α -cetobutirato a esta concentración previno la parálisis provocada por el AMPA 6 mM, observándose únicamente un déficit muy pequeño de la actividad motora en la prueba del rotarod (figuras 11 y 19). Dado que el α -cetobutirato se perfunde desde la hora de estabilización y durante las 8 fracciones de microdiálisis (160 min en total), y considerando el 10 % de eficiencia para la membrana de diálisis, la cantidad total de α -cetobutirato que pasa a la médula espinal a esta concentración es de ~ 0.64 μ moles. Se observó que la perfusión de α -cetobutirato 20 mM previno la pérdida de motoneuronas provocada por el AMPA reduciéndola a un 39 % aproximadamente (figuras 10, 11 y 20).

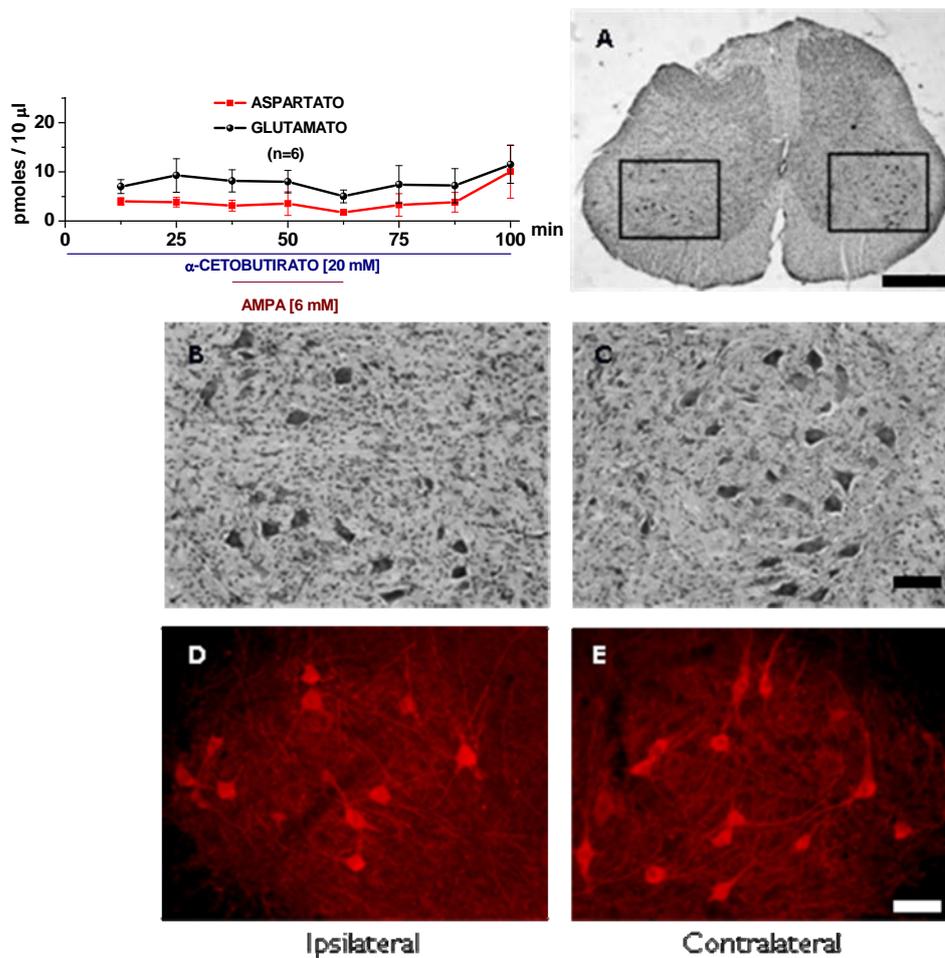


Figura 10. Micrografías representativas de una rata perfundida con α -cetobutirato 20 mM + AMPA 6 mM ($n = 9$). Se muestra la morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar 24 horas después del experimento. Tinciones con violeta de cresilo en A, B y C. Los rectángulos en A indican las regiones amplificadas de las astas ventrales que se muestran en B y C. D y E: inmunohistoquímica para la ChAT en las astas ventrales contralateral e ipsilateral. Nótese la protección de las motoneuronas en el lado ipsilateral. Para datos cuantitativos del número de motoneuronas véase las figuras 11 y 20. Barra en A = 500 μ m, B-E = 100 μ m. No se modificó la concentración extracelular de los aminoácidos glutamato y aspartato como se puede observar en la gráfica superior izquierda, $n = 6$ para la determinación de aminoácidos extracelulares.

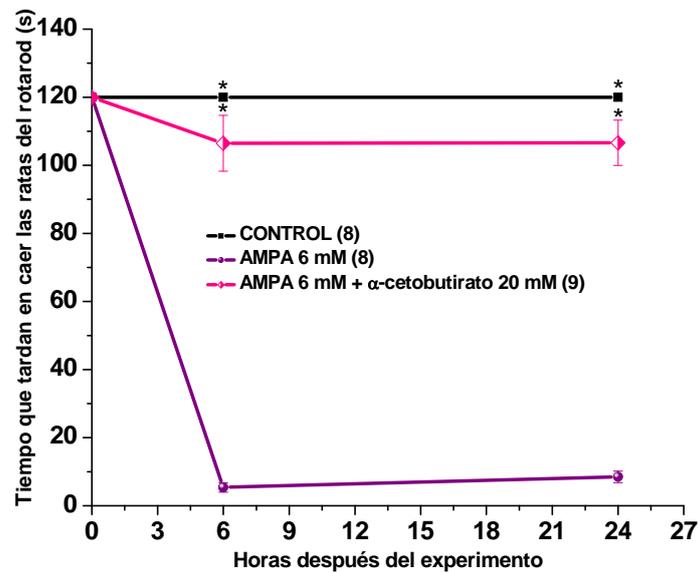
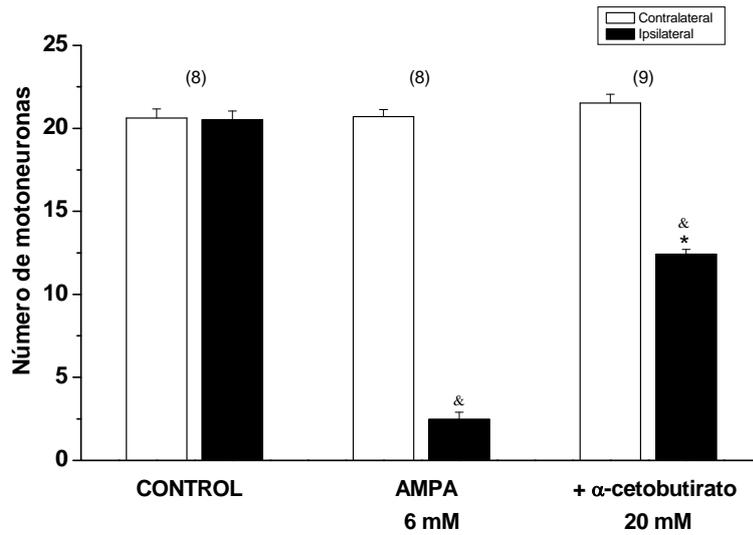


Figura 11. Arriba se muestran los conteos del número de motoneuronas sanas en las astas ventrales ipsilaterales y contralaterales de las médulas espinales de las ratas perfundidas con solución Krebs-Ringer (control), AMPA 6 mM, y AMPA 6 mM + α -cetobutirato 20 mM. Valores promedio \pm SEM para el número de ratas indicado arriba de las barras. * $p < 0.001$ vs. el asta ventral ipsilateral perfundida sólo con AMPA. & $p < 0.001$ vs. el asta ventral contralateral correspondiente. Abajo se muestran los valores obtenidos con la prueba del rotarod. El tiempo cero representa las sesiones de entrenamiento (límite máximo 120 seg). Como control se utilizaron ratas sin operar u operadas a las cuáles sólo se les perfundió solución Krebs-Ringer. En la gráfica se observan las ratas tratadas con AMPA sólo y las ratas tratadas con AMPA + α -cetobutirato 20 mM. Los datos representan el promedio \pm SEM del número de ratas indicado entre paréntesis. * $p < 0.001$ vs. el grupo de ratas tratadas sólo con AMPA.

β -HIDROXIBUTIRATO

También se evaluó el efecto neuroprotector del β -hidroxibutirato debido a que muchos estudios sustentan los efectos protectores de los cuerpos cetónicos en diversas condiciones patológicas.

- β -Hidroxibutirato 20 mM

La perfusión de β -hidroxibutirato 20 mM no logró prevenir por completo ni las alteraciones motoras, ni la parálisis provocada por el AMPA 6 mM. Se observó un déficit parcial de la actividad motora en la prueba del rotarod (figuras 14 y 19), las ratas mostraron una parálisis parcial debido a que mostraron dificultad para enderezar la pata derecha al caminar. Dado que el β -hidroxibutirato se perfunde desde la hora de estabilización y durante las 8 fracciones de microdiálisis (160 min en total), y considerando el 10 % de eficiencia para la membrana de diálisis, la cantidad total de β -hidroxibutirato que pasa a la médula espinal a esta concentración es de ~ 0.64 μ moles. La pérdida de las motoneuronas en esta condición fue aproximadamente del 55 % (figuras 12, 14 y 20).

- β -Hidroxibutirato 50 mM

A diferencia de la concentración más baja anteriormente probada, la perfusión de β -hidroxibutirato 50 mM sí previno las alteraciones motoras y la parálisis provocadas por el AMPA 6 mM. En todas las ratas tratadas hubo sólo un pequeño déficit de la actividad motora en la prueba del rotarod (figura 14 y 19). Dado que el β -hidroxibutirato se perfunde desde la hora de estabilización y durante las 8 fracciones de microdiálisis (160 min en total), y considerando el 10 % de eficiencia para la membrana de diálisis, la cantidad total de β -hidroxibutirato que pasa a la médula espinal a esta concentración es de ~ 1.6 μ moles. El β -hidroxibutirato 50 mM redujo aproximadamente al 42 % la pérdida de motoneuronas provocada por el AMPA (figuras 13, 14 y 20).

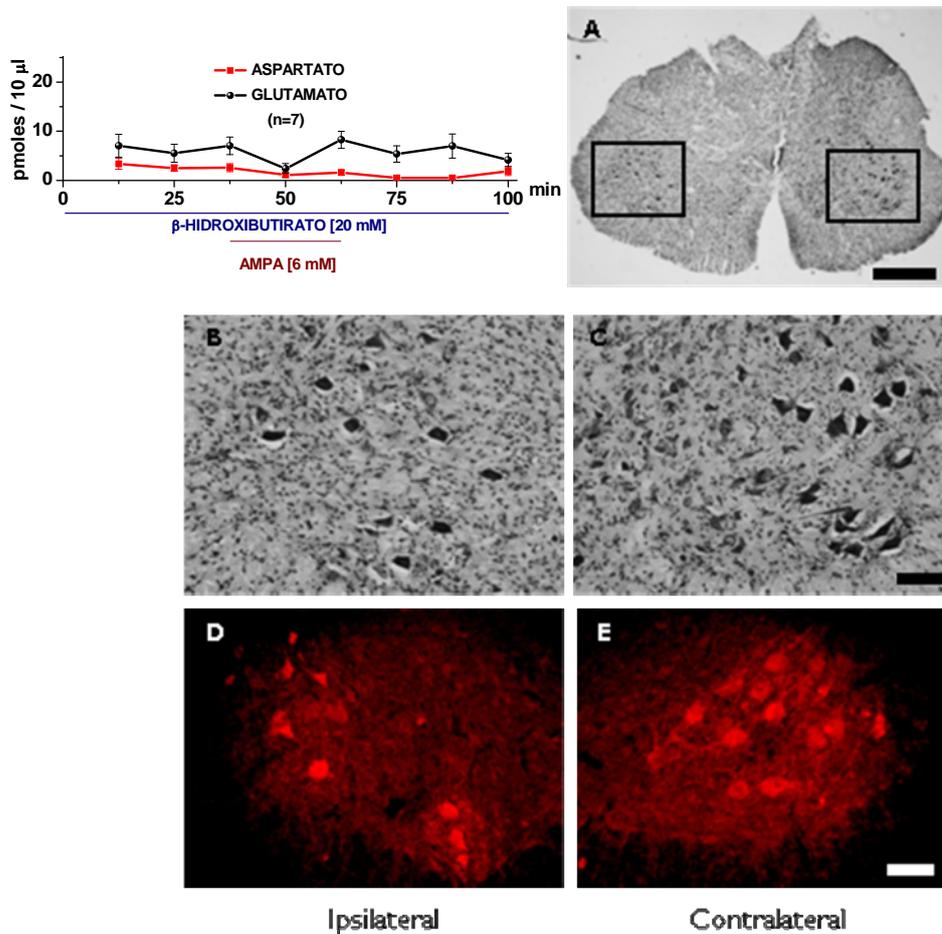


Figura 12. Micrografías representativas de una rata perfundida con β -hidroxibutirato 20 mM + AMPA 6 mM ($n = 9$). Se muestra la morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar 24 horas después del experimento. Tinciones con violeta de cresilo en A, B y C. Los rectángulos en A indican las regiones amplificadas de las astas ventrales que se muestran en B y C. D y E: inmunohistoquímica para la ChAT en las astas ventrales contralateral e ipsilateral. Nótese la disminución en el número de motoneuronas en el lado ipsilateral en comparación con el lado contralateral. Para datos cuantitativos del número de motoneuronas véase las figuras 14 y 20. Barra en A = 500 μ m, B-E = 100 μ m. No se modificó la concentración extracelular de los aminoácidos glutamato y aspartato como se puede observar en la gráfica superior izquierda, $n = 7$ para la determinación de aminoácidos extracelulares.

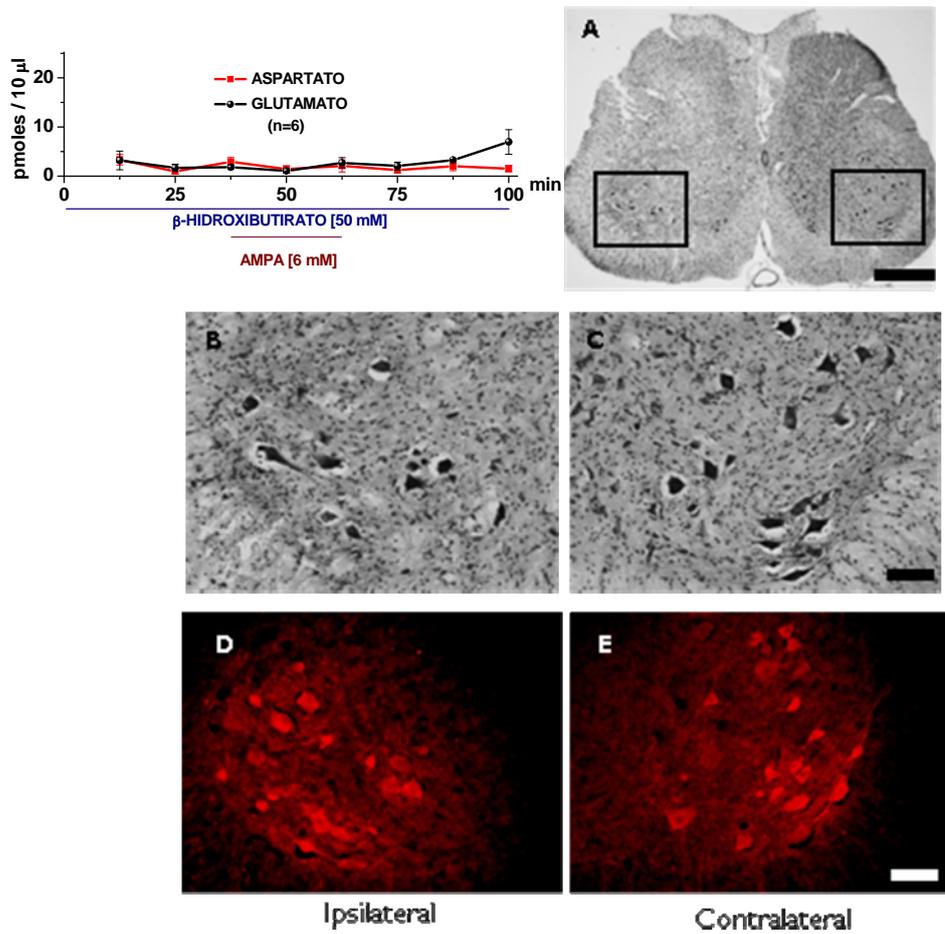


Figura 13. Micrografías representativas de una rata perfundida con β -hidroxibutirato 50 mM + AMPA 6 mM (n = 9). Se muestra la morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar 24 horas después del experimento. Tinciones con violeta de cresilo en A, B y C. Los rectángulos en A indican las regiones amplificadas de las astas ventrales que se muestran en B y C. D y E: inmunohistoquímica para la ChAT en las astas ventrales contralateral e ipsilateral. Nótese la protección de las motoneuronas en el lado ipsilateral. Para datos cuantitativos del número de motoneuronas véase las figuras 14 y 20. Barra en A = 500 μ m, B-E = 100 μ m. No se modificó la concentración extracelular de los aminoácidos glutamato y aspartato como se puede observar en la gráfica superior izquierda, n = 6 para la determinación de aminoácidos extracelulares.

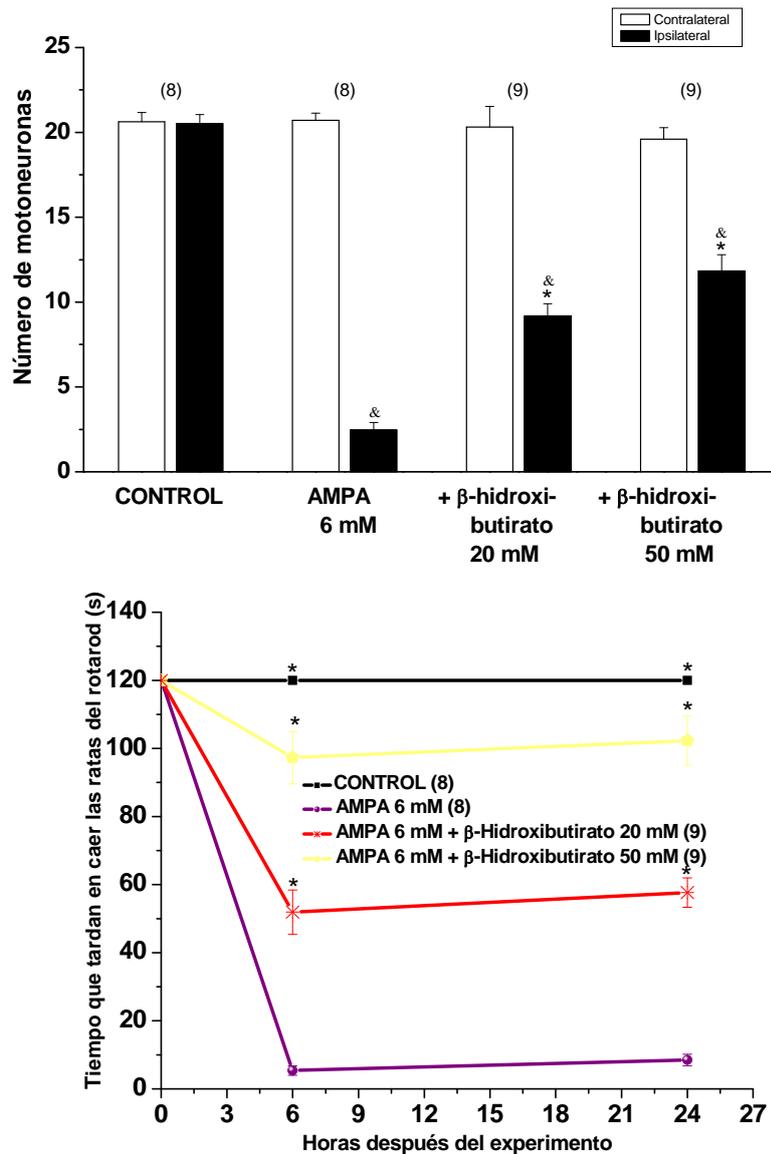


Figura 14. Arriba se muestran los conteos del número de motoneuronas sanas en las astas ventrales ipsilaterales y contralaterales de las médulas espinales de las ratas perfundidas con solución Krebs-Ringer (control), AMPA 6 mM, y AMPA 6 mM + β-hidroxi-butirato 20 y 50 mM. Valores promedio ± SEM para el número de ratas indicado arriba de las barras. * $p < 0.001$ vs. el asta ventral ipsilateral perfundida sólo con AMPA. & $p < 0.001$ vs. el asta ventral contralateral correspondiente. Abajo se muestran los valores obtenidos en la prueba del rotarod. El tiempo cero representa las sesiones de entrenamiento (límite máximo 120 seg). Como control se utilizaron ratas sin operar u operadas a las cuáles sólo se les perfundió solución Krebs-Ringer. En la gráfica se observan las ratas tratadas con AMPA sólo y las ratas tratadas con AMPA + β-hidroxi-butirato 20 y 50 mM. Los datos representan el promedio ± SEM del número de ratas indicado entre paréntesis. * $p < 0.001$ vs. el grupo de ratas tratadas sólo con AMPA.

ASCORBATO

Debido a que existe mucha evidencia de la participación del estrés oxidativo y la generación de ROS en los mecanismos de la muerte de las motoneuronas, se evaluó el efecto neuroprotector del ascorbato, ya que este compuesto actúa sólo como antioxidante.

- Ascorbato 10 mM

La perfusión de ascorbato 10 mM disminuyó sólo un poco las alteraciones motoras y la parálisis provocada por el AMPA 6 mM. Se observó un mayor déficit de la actividad motora en la prueba del rotarod que en las ratas tratadas con los demás sustratos (figuras 18 y 19), las ratas mostraron una parálisis parcial. Dado que el ascorbato se perfunde desde la hora de estabilización y durante las 8 fracciones de microdiálisis (160 min en total), y considerando el 10 % de eficiencia para la membrana de diálisis, la cantidad total de ascorbato que pasa a la médula espinal a esta concentración es de ~0.32 μ moles. La pérdida de las motoneuronas en este caso se redujo únicamente al 67 % aproximadamente (figuras 15, 18 y 20).

- Ascorbato 20 mM

Se observó sólo una pequeña diferencia entre los resultados obtenidos con la perfusión de ascorbato 20 mM y la concentración anterior; de igual manera no se previnieron totalmente ni las alteraciones motoras, ni la parálisis provocada por el AMPA 6 mM. Se observó un déficit también considerable de la actividad motora en la prueba del rotarod (figuras 18 y 19), las ratas también mostraron una parálisis parcial. Dado que el ascorbato se perfunde desde la hora de estabilización y durante las 8 fracciones de microdiálisis (160 min en total), y considerando el 10 % de eficiencia para la membrana de diálisis, la cantidad total de ascorbato que pasa a la médula espinal a esta concentración es de ~0.64 μ moles. La pérdida de las motoneuronas en esta condición se redujo al 59 % aproximadamente (figuras 16, 18 y 20).

- Ascorbato 50 mM

De igual manera, en este caso no se observó gran diferencia en los resultados obtenidos con la perfusión de ascorbato 50 mM a comparación de las otras 2 concentraciones de ascorbato utilizadas.

No se previnieron por completo ni las alteraciones motoras, ni la parálisis provocada por el AMPA 6 mM. Se observó un déficit parcial en la actividad motora en la prueba del rotarod (figuras 18 y 19), las ratas mostraron una parálisis parcial igualmente. Dado que el ascorbato se perfunde desde la hora de estabilización y durante las 8 fracciones de microdiálisis (160 min en total), y considerando el 10 % de eficiencia para la membrana de diálisis, la cantidad total de ascorbato que pasa a la médula espinal a esta concentración es de ~ 1.6 μ moles. La pérdida de las motoneuronas en esta condición se redujo al 58 % aproximadamente (figuras 17, 18 y 20).

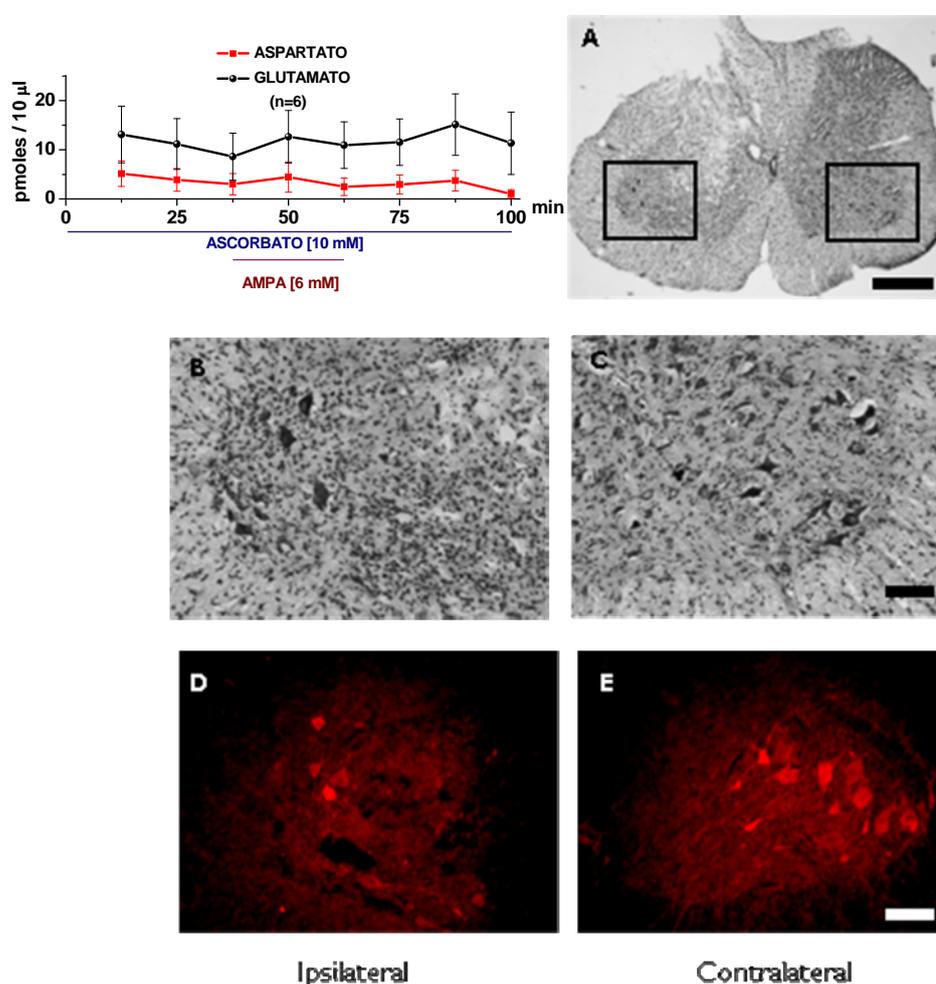


Figura 15. Micrografías representativas de una rata perfundida con ascorbato 10 mM + AMPA 6 mM (n = 8). Se muestra la morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar 24 horas después del experimento. Tinciones con violeta de cresilo en A, B y C. Los rectángulos en A indican las regiones amplificadas de las astas ventrales que se muestran en B y C. D y E: inmunohistoquímica para la ChAT en las astas ventrales contralateral e ipsilateral. Nótese la gran disminución en el número de motoneuronas en el lado ipsilateral en comparación con el lado contralateral. Para datos cuantitativos del número de motoneuronas véase las figuras 18 y 20. Barra en A = 500 μ m, B-E = 100 μ m. No se modificó la concentración extracelular de los aminoácidos glutamato y aspartato como se puede observar en la gráfica superior izquierda, n = 6 para la determinación de aminoácidos extracelulares.

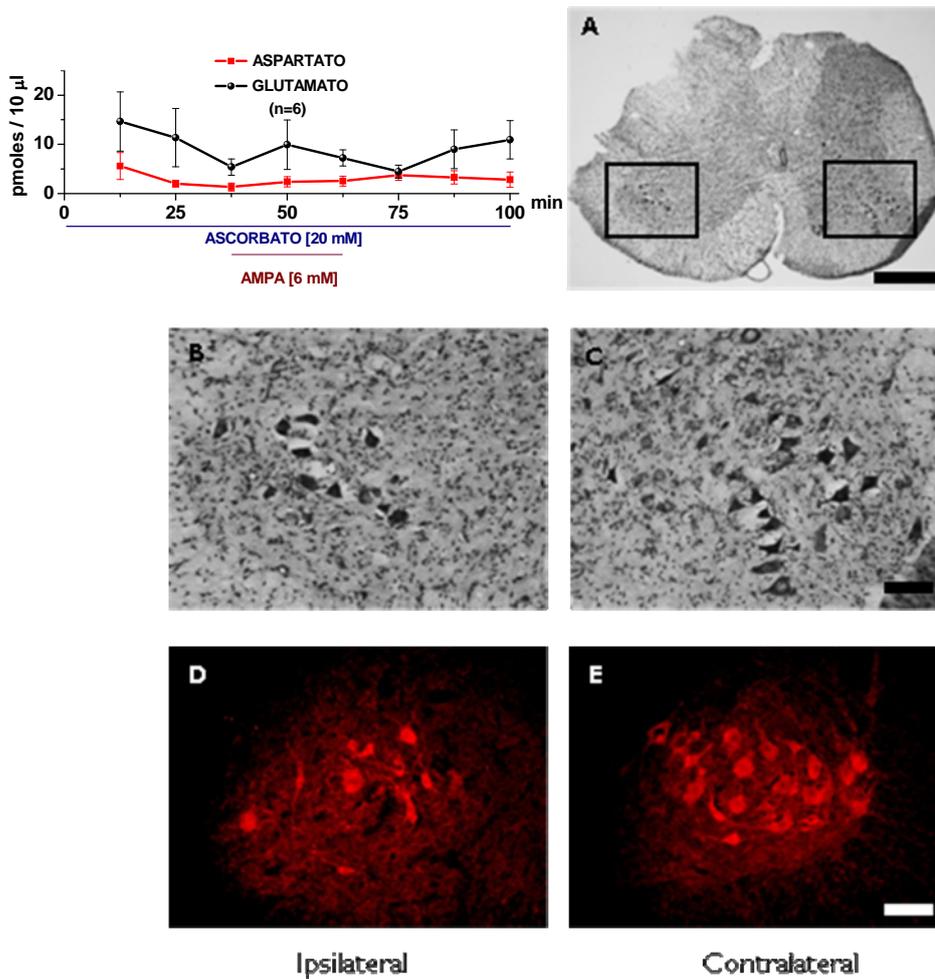


Figura 16. Micrografías representativas de una rata perfundida con ascorbato 20 mM + AMPA 6 mM (n = 8). Se muestra la morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar 24 horas después del experimento. Tinciones con violeta de cresilo en A, B y C. Los rectángulos en A indican las regiones amplificadas de las astas ventrales que se muestran en B y C. D y E: inmunohistoquímica para la ChAT en las astas ventrales contralateral e ipsilateral. Nótese la disminución en el número de motoneuronas en el lado ipsilateral en comparación con el lado contralateral. Para datos cuantitativos del número de motoneuronas véase las figuras 18 y 20. Barra en A = 500 µm, B-E = 100 µm. No se modificó la concentración extracelular de los aminoácidos glutamato y aspartato como se puede observar en la gráfica superior izquierda, n = 6 para la determinación de aminoácidos extracelulares.

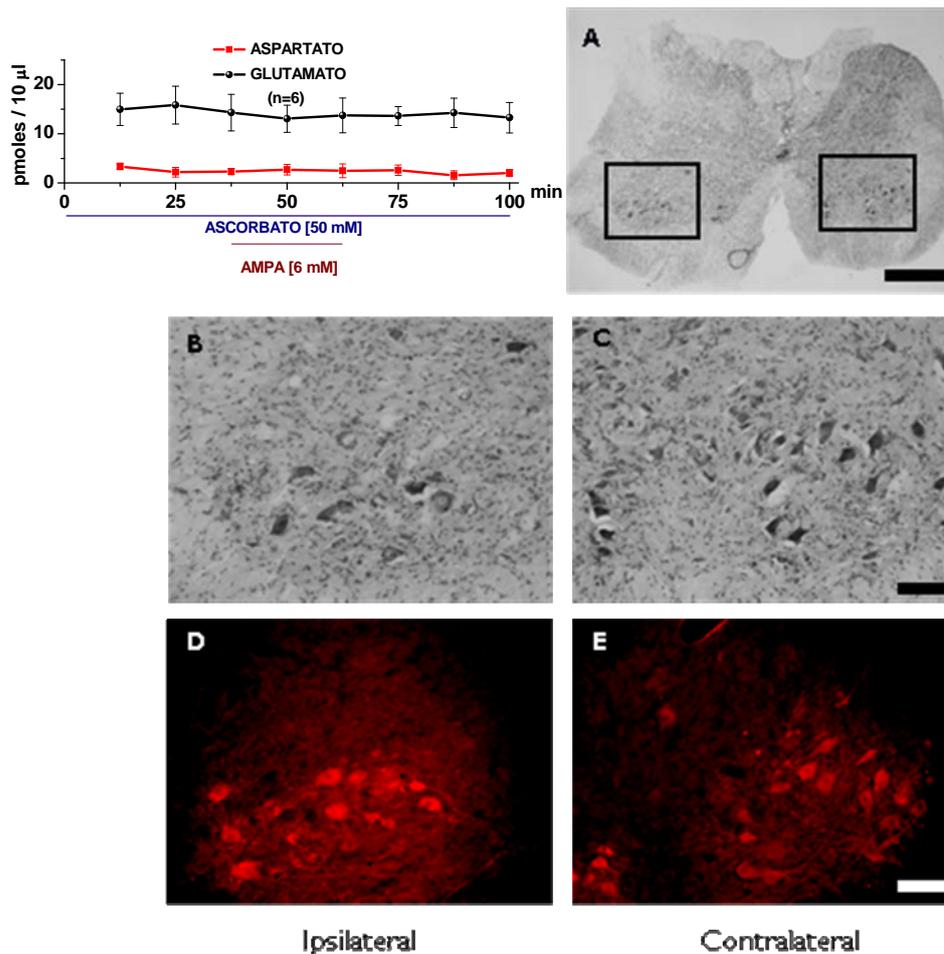


Figura 17. Micrografías representativas de una rata perfundida con ascorbato 50 mM + AMPA 6 mM (n = 9). Se muestra la morfología de las motoneuronas de la médula espinal lumbar 24 horas después del experimento. Tinciones con violeta de cresilo en A, B y C. Los rectángulos en A indican las regiones amplificadas de las astas ventrales que se muestran en B y C. D y E: inmunohistoquímica para la ChAT en las astas ventrales contralateral e ipsilateral. Nótese que aun a esta concentración alta de ascorbato hay disminución en el número de motoneuronas en el lado ipsilateral en comparación con el lado contralateral. Para datos cuantitativos del número de motoneuronas véase las figuras 18 y 20. Barra en A = 500 μm, B-E = 100 μm. No se modificó la concentración extracelular de los aminoácidos glutamato y aspartato como se puede observar en la gráfica superior izquierda, n = 6 para la determinación de aminoácidos extracelulares.

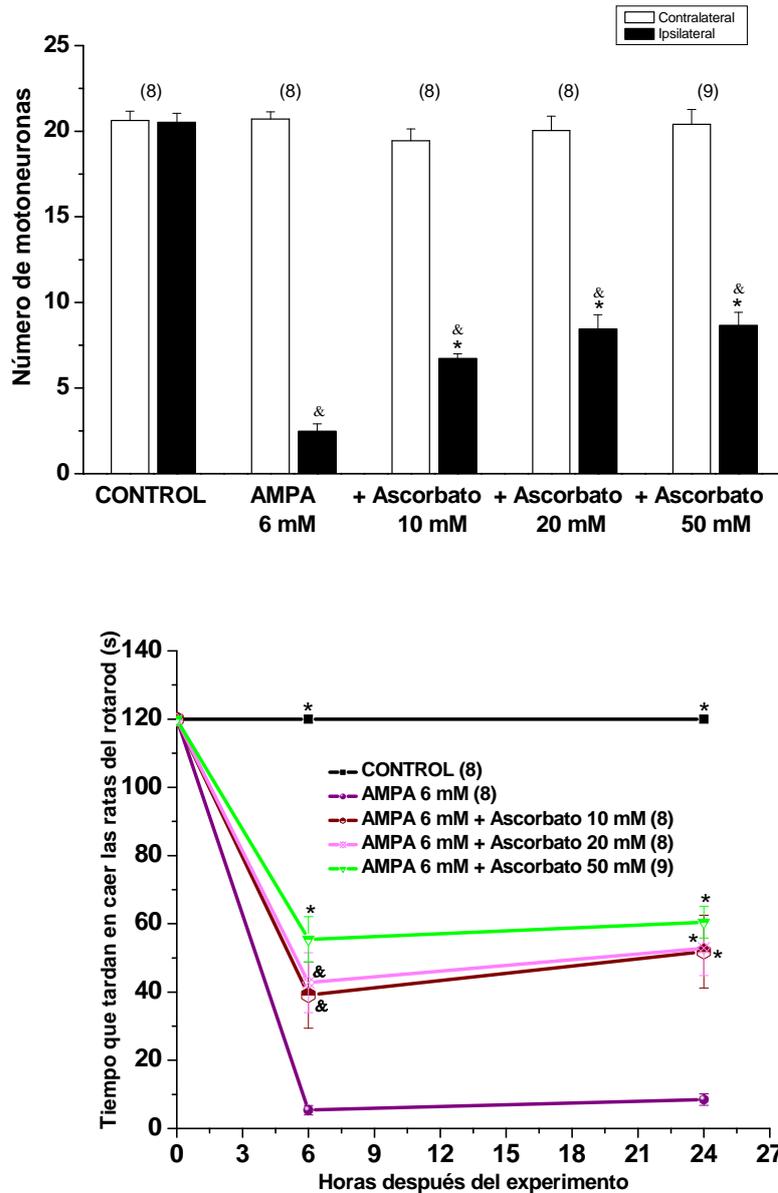


Figura 18. Arriba se muestran los conteos del número de motoneuronas sanas en las astas ventrales ipsilaterales y contralaterales de las médulas espinales de las ratas perfundidas con solución Krebs-Ringer (control), AMPA 6 mM, y AMPA 6 mM + ascorbato 10, 20 y 50 mM. Valores promedio \pm SEM para el número de ratas indicado arriba de las barras. * $p < 0.001$ vs. el asta ventral ipsilateral perfundida sólo con AMPA. & $p < 0.001$ vs. el asta ventral contralateral correspondiente. Abajo se muestran los valores obtenidos en la prueba del rotarod. El tiempo cero representa las sesiones de entrenamiento (límite máximo 120 seg). Como control se utilizaron ratas sin operar u operadas a las cuáles sólo se les perfundió solución Krebs-Ringer. En la gráfica se observan las ratas tratadas con AMPA sólo y las ratas tratadas con AMPA + ascorbato 10, 20 y 50 mM. Los datos representan el promedio \pm SEM del número de ratas indicado entre paréntesis. * $p < 0.001$ vs. el grupo de ratas tratadas sólo con AMPA. & $p < 0.01$ vs. el grupo de ratas tratadas sólo con AMPA.

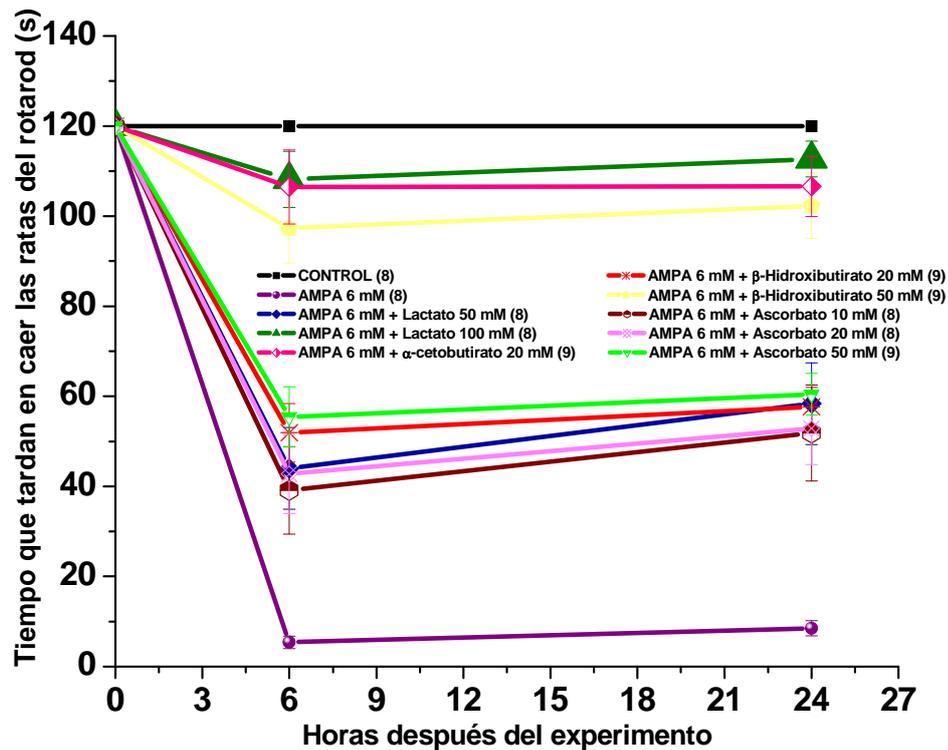


Figura 19. Desempeño en la prueba del rotarod de las ratas tratadas con las diferentes condiciones. El tiempo cero representa las sesiones de entrenamiento (límite máximo 120 seg). Como control se utilizaron ratas sin operar ($n = 4$) u operadas a las cuáles sólo se les perfundió solución Krebs-Ringer ($n = 4$). En la gráfica se observan las ratas tratadas con AMPA sólo y las ratas tratadas con AMPA + lactato 50 mM y 100 mM, α -cetobutirato 20 mM, β -hidroxibutirato 20 y 50 mM, y ascorbato 10, 20 y 50 mM. Los datos representan el promedio \pm SEM del número de ratas indicado entre paréntesis. En el grupo de ratas control no hay SEM porque todos los animales permanecieron en el rotarod durante los 120 segundos establecidos como límite máximo.

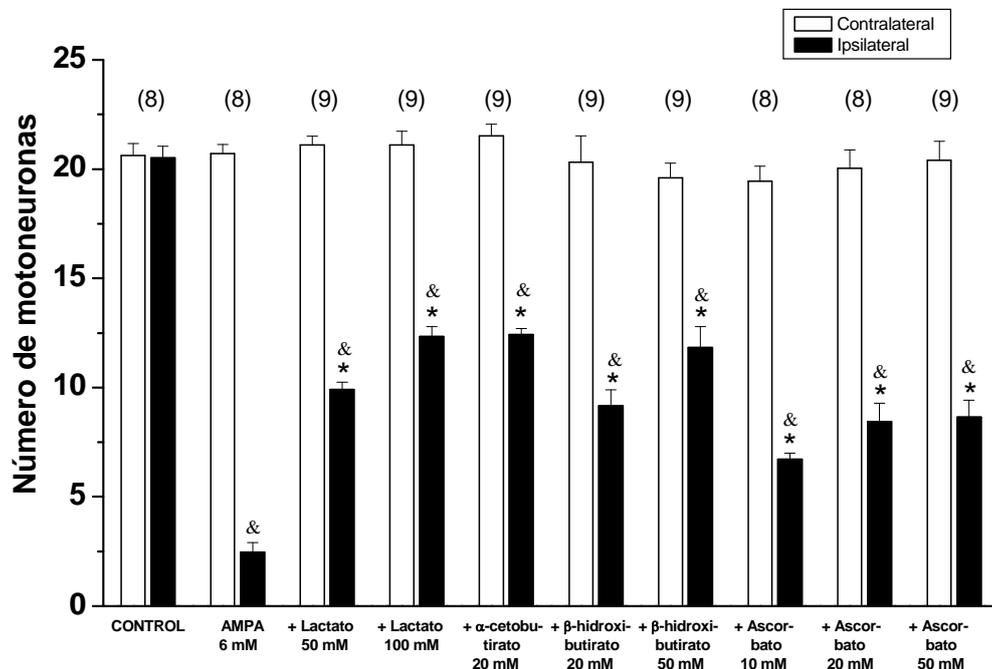


Figura 20. Número de motoneuronas sanas cuantificadas en las astas ventrales ipsilateral y contralateral de las médulas espinales teñidas con violeta de cresilo de las ratas control y ratas tratadas con AMPA 6 mM sólo o AMPA 6 mM + los diferentes compuestos, 24 h después del experimento. Nótese la pérdida de motoneuronas con AMPA 6 mM en el lado ipsilateral y la prevención de ésta con lactato 50 y 100 mM, α -cetobutirato 20 mM, β -hidroxibutirato 20 y 50 mM, y ascorbato 10, 20 y 50 mM. Los datos representan el promedio \pm SEM para el número de ratas indicado en la parte superior de las barras. * $p < 0.001$ vs. el asta ventral ipsilateral perfundida sólo con AMPA. & $p < 0.001$ vs. el asta ventral contralateral correspondiente.

VIII. DISCUSIÓN:

Para tratar de entender los mecanismos bioquímicos por los cuáles se da la degeneración selectiva de las motoneuronas espinales inducida mediante la sobreactivación de los receptores AMPA en nuestro modelo, nos hemos enfocado en el estudio de la participación de la deficiencia de la función mitocondrial y del estrés oxidativo en esta muerte excitotóxica. Una clave para responder la pregunta de si estos 2 fenómenos juegan un papel crucial en la degeneración de las motoneuronas son las propuestas terapéuticas encaminadas a evitar el déficit energético y a proteger a la célula del daño oxidativo.

Para esto, se han probado en este trabajo distintos sustratos que puedan actuar por medio de 2 mecanismos: 1) aumentando la producción de energía por medio del metabolismo energético; y 2) atrapando los radicales libres o disminuyendo la producción de ROS. Por esta razón, examinamos el potencial neuroprotector del lactato, el α -cetobutirato, el β -hidroxibutirato y el ascorbato.

Participación de las deficiencias de la función mitocondrial y del metabolismo energético, y del estrés oxidativo en la muerte de motoneuronas espinales

- Mecanismos de neuroprotección del lactato, del piruvato y del α -cetobutirato

Previamente en el laboratorio se probó la perfusión de piruvato a una concentración de 20 mM para estudiar la posible participación de las deficiencias energéticas mitocondriales en el daño neuronal inducido por AMPA (Corona y Tapia, 2007). El piruvato previno las alteraciones motoras y la parálisis y también redujo la pérdida de motoneuronas. El piruvato es un intermediario oxidable del metabolismo energético que es convertido a acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa mitocondrial. La acetil-CoA entra directamente al ciclo TCA, donde se da su oxidación completa a CO₂ y la energía de oxidación se conserva en forma de ATP y, temporalmente, en forma de las coenzimas reducidas NADH y FADH₂, que son transportadores electrónicos que posteriormente entran a la cadena respiratoria donde se da la transferencia electrónica al O₂ y la síntesis de más ATP mediante la fosforilación oxidativa. En las neuronas, el sustrato mitocondrial dominante es el piruvato derivado de la glucólisis. La razón por la cual el piruvato ofrece neuroprotección es probablemente porque actúa

como sustrato energético, pero también puede actuar como antioxidante como será discutido ampliamente más adelante; sin embargo nosotros desconocíamos si la producción de radicales libres participa importantemente en nuestro modelo. Por esta razón, en este trabajo se decidió probar el efecto protector del lactato que puede actuar como sustrato energético pero no tiene efecto antioxidante directo per se. Tanto el lactato como el piruvato cruzan la barrera hematoencefálica y son transportados al interior de las neuronas por medio de difusión facilitada mediada por el co-transportador específico de H^+ -ácidos monocarboxílicos (Dringen et al., 1993). Como se puede observar en los resultados, la protección que ejerce el lactato es dosis-dependiente, ya que a una concentración de 20 mM no protege (datos no mostrados), mientras que a una concentración de 50 mM protege parcialmente y a una concentración de 100 mM ofrece una muy buena protección como se puede observar en el desempeño motor, similar a la observada con el piruvato 20 mM (Corona y Tapia, 2007). El hecho de que el lactato necesite una concentración mucho mayor que el piruvato para proteger en la misma proporción podría deberse a que la protección ejercida por el lactato se da al convertirse a piruvato por medio de la lactato deshidrogenasa (LDH). La hipótesis de la lanzadera de lactato astrocitos-neuronas postula que en el SNC de los mamíferos existe un acoplamiento metabólico entre la glía y las neuronas, que los astrocitos son el principal sitio de consumo de glucosa durante la actividad neuronal, ahí la glucosa es convertida a lactato por vía glicolítica, el lactato es entonces liberado al espacio extracelular y tomado por las neuronas para utilizarlo como un sustrato metabólico suplementario; esto podría llevarse a cabo en condiciones de reposo, pero podría aumentar por la activación sináptica ante la alta demanda energética. Se ha demostrado que las neuronas utilizan lactato preferentemente como sustrato energético oxidable y que hay una producción predominante de lactato por los astrocitos, que existe un sistema activo para la captura del lactato por las neuronas y que existe la maquinaria enzimática que permite que el lactato entre al ciclo de Krebs en las neuronas (Pellerin y Magistretti, 1994; Tsacopoulos y Magistretti, 1996; Bouzier-Sore et al., 2006; Bouzier-Sore et al., 2003, Smith et al., 2003, O'Brien et al., 2006, Aubert et al., 2005). Esta hipótesis ha sido objeto de muchos estudios y controversias (Fillenz, 2005; Zielke et al., 2007; Dienel y Hertz, 2001). Sin embargo, estos trabajos demuestran que el lactato puede ser transportado al interior de las neuronas y utilizado como sustrato energético por lo que podemos sugerir que el lactato administrado por microdiálisis está siendo utilizado por las motoneuronas como sustrato energético en nuestros

experimentos. El lactato (al igual que el piruvato) es un sustrato ventajoso para las neuronas, ya que la energía es obtenida como NADH sin el gasto de ATP. Así, después de la conversión del lactato a piruvato por medio de la reacción catalizada por la LDH, 1 mol de lactato puede proveer 18 moles de ATP por medio de la fosforilación oxidativa. Además, para que la glucólisis se lleve a cabo requiere consumir ATP en 2 de sus reacciones (hexocinasa y fosfofructocinasa); ésto implica que una célula cuyos niveles de ATP están disminuyendo, aunque sea transitoriamente, podría sufrir un colapso irreversible a medida que la glucólisis se ve limitada y si hay escasez de algún otro sustrato oxidable, exacerbando así el decremento en ATP. Un mecanismo para reiniciar la glucólisis en una neurona cuyo ATP está agotado es la utilización de lactato o piruvato, que son sustratos neuronales efectivos (Nicholls y Budd, 2000). En el SNC de los mamíferos, los astrocitos pueden proteger a las neuronas no solamente recapturando el glutamato, sino también por medio de la liberación del producto glicolítico lactato, para ser utilizado por neuronas vecinas como sustrato energético. El lactato, predominantemente suministrado por la glía, facilita la recuperación de las neuronas después de un insulto bioenergético (Izumi et al., 1997; Schurr et al., 1997a; Schurr et al., 1997b).

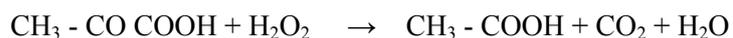
El hecho de que para ser utilizado como sustrato energético el lactato deba ser convertido a piruvato, no descarta el que una proporción del piruvato así producido intracelularmente pueda actuar como antioxidante, aparte de actuar como sustrato energético al entrar al ciclo TCA ayudando a que haya una mayor producción de ATP. Existe evidencia de que el piruvato y el L-lactato pueden proteger a las neuronas de la neurotoxicidad inducida por NMDA que se incrementa por la privación de glucosa, rescatando su carga energética celular, ya que estos sustratos contrarrestaron fuertemente la enorme disminución en el contenido de ATP neuronal que se da como resultado. El piruvato protegió a las neuronas estriatales contra la neurotoxicidad y la disminución en los niveles de ATP inducidos por NMDA en la presencia y ausencia de glucosa. También protegió contra la neurotoxicidad inducida por AMPA. Además, el piruvato disminuyó la acumulación retardada de glutamato extracelular (Maus et al., 1999). Asimismo existe evidencia de que el piruvato sólo o en combinación con fosfato inorgánico puede rescatar a las neuronas granulares cerebelares de la muerte producida por la exposición a glutamato (Eimerl y Schramm, 1995). También se ha propuesto que el piruvato puede prevenir el daño neuronal excitotóxico asociado con isquemia/hipoglicemia debido a que protege in vivo contra la neurotoxicidad mediada por glutamato en el hipocampo de ratas a las que se les ha administrado

crónicamente yodoacetato, un inhibidor de la glucólisis (Massieu et al., 2000). De igual manera se demostró el efecto protector del piruvato in vitro en cultivos de neuronas granulares cerebelares contra el daño inducido por la exposición simultánea al *L-trans*-pirrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC) que inhibe la recaptura de glutamato y al ácido 3-nitropropiónico (3-NP) que es una toxina mitocondrial que inhibe a la succinato deshidrogenasa, el complejo II de la cadena de transporte de electrones (García y Massieu, 2001). Estas observaciones fueron luego extendidas a experimentos in vivo donde se encontró que el piruvato protege parcialmente contra el daño neuronal inducido por la inyección intraestriatal de PDC (que da lugar a una elevación sustancial de los niveles extracelulares de glutamato) en animales que han sido tratados con una inyección intraperitoneal de 3-NP con lo que se les ha inhibido su metabolismo energético mitocondrial parcial y transitoriamente, condiciones que podrían simular el daño neuronal por isquemia cerebral al reproducir 2 eventos asociados con ella como son niveles incrementados de aminoácidos excitadores extracelulares y falla del metabolismo energético (Massieu et al., 2001). Después demostraron in vitro que la exposición de las neuronas granulares cerebelares a 3-NP y PDC simultáneamente resulta en una disminución progresiva de la capacidad reductora de la mitocondria y en un decremento rápido de los niveles de ATP, seguidos de la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y la aparición de núcleos condensados. Esta disminución en la actividad mitocondrial y en los niveles de ATP es prevenida en presencia de piruvato, además de que se reduce el número de núcleos condensados y se preserva la integridad de la membrana plasmática, estos resultados sugieren que el efecto protector del piruvato está relacionado a su papel como sustrato metabólico mitocondrial (García y Massieu, 2003).

Por otro lado, los mecanismos de neuroprotección del piruvato también se han asociado a su habilidad para ejercer efectos antioxidantes en el SNC y otros tejidos susceptibles a estrés oxidativo. Se ha demostrado que el piruvato protege fuertemente a las neuronas contra la toxicidad producida por el H₂O₂ adicionado exógenamente y producido endógenamente. Esta neuroprotección se ha atribuido a la capacidad que tienen los α -cetoácidos de reaccionar vía no-enzimática con el H₂O₂ descarboxilándose, convirtiendo el H₂O₂ a H₂O, produciendo el ácido carboxílico correspondiente y liberando CO₂:



La reacción en el caso del piruvato es:



De hecho, varios α -cetoácidos incluyendo el α -cetobutirato protegieron también a las neuronas, mientras que el lactato, que no es un α -cetoácido, no protegió de la toxicidad inducida por H_2O_2 (Desagher et al., 1997). En otro trabajo se demostró que el piruvato protege a las células humanas de neuroblastoma mediante sus acciones antioxidantes en la mitocondria, ya que suprimió la producción de superóxido mitocondrial y atenuó el colapso de $\Delta\psi_m$ inducido por estrés oxidativo. Se comprobó que puede actuar como atrapador de radicales libres ya que atenuó la formación de ROS y la muerte celular inducidas por H_2O_2 de manera dosis-dependiente, ejerciendo sus efectos protectores aun cuando su administración se retardó hasta 2 horas después de la exposición a H_2O_2 (Wang et al., 2006). El piruvato también disminuye la muerte celular de neuronas granulares cerebelares en la presencia de oligomicina (un inhibidor de la ATP sintasa) aunque no pueda contribuir a la producción de ATP, sugiriendo que la polarización mitocondrial puede proteger, probablemente porque mantiene los niveles de NADPH y glutatión reducidos (Jekabsons y Nicholls, 2004). Además, se ha propuesto que el piruvato (junto con el malato) ayuda a mejorar la función de los mecanismos homeostáticos de Ca^{2+} , en particular, aumentando la eficiencia de la extrusión de Ca^{2+} al medio y de la acumulación de Ca^{2+} en las pozas intracelulares, aumenta así la contribución de la mitocondria para la homeostasis de Ca^{2+} neuronal, probablemente debido a que el incremento en la tasa respiratoria que se da en presencia de piruvato y malato resulta en un $\Delta\psi_m$ aumentado, y por lo tanto mitiga la neurotoxicidad mediada por glutamato (Ruiz et al., 1998; Villalba et al., 1994). Consecuentemente, las mitocondrias en las neuronas utilizan el piruvato para generar Δp , sintetizar ATP y amortiguar el Ca^{2+} citosólico. Por lo tanto, los mecanismos protectores del piruvato, ya sea administrado exógenamente o producido endógenamente a partir del lactato, son probablemente múltiples, incluyendo la estimulación del ciclo TCA y de la producción de ATP, su función antioxidante y ayudando a la homeostasis de Ca^{2+} intracelular.

Por esta razón, para poder conocer cuál de estos mecanismos está contribuyendo más a la neuroprotección, decidimos probar otro α -cetoácido que compartiera la capacidad de actuar como atrapador de radicales libres con el piruvato, pero no sus demás propiedades. Se eligió entonces el α -

cetobutirato, el cual se pensó al principio equivocadamente que no podía contribuir a la producción de energía, sin embargo, el α -cetobutirato es metabolizado por medio de la enzima α -cetobutirato deshidrogenasa a propionil-CoA que puede ser convertido a metilmalonil-CoA y subsecuentemente a succinil-CoA y así entrar a ciclo TCA, ya que el succinil-CoA es un intermediario de este ciclo. De hecho, se ha comprobado que la α -cetobutirato deshidrogenasa activa está presente en el cerebro de rata y se ha medido su actividad (Steele et al., 1984). El α -cetobutirato es un intermediario metabólico natural producto de la degradación de los aminoácidos metionina y treonina para que se dé la completa oxidación de éstos. El α -cetobutirato ofrece una muy buena neuroprotección y evita por completo la parálisis en las ratas cuando es administrado a una concentración de 20 mM, resultados muy similares a los obtenidos con piruvato a esa misma concentración. Estos resultados y la similitud en sus estructuras químicas, sugieren que pueden proteger por mecanismos similares, y por lo tanto que este sustrato también está siendo metabolizado para la producción de energía por medio del ciclo TCA y de la fosforilación oxidativa, además de que también puede estar actuando como atrapador de ROS por la propiedad que tienen los α -cetoácidos de reaccionar directamente con el H_2O_2 .

- *Mecanismos de neuroprotección del β -hidroxibutirato*

Probamos también el β -hidroxibutirato, el cual es un cuerpo cetónico que se utiliza como combustible en tejidos extrahepáticos a través de su oxidación, primero a acetoacetato por acción de la D- β -hidroxibutirato deshidrogenasa; el acetoacetato se activa formando su éster de coenzima A por la transferencia de CoA a partir de succinil-CoA, formándose acetoacetyl-CoA el que, por acción de la tiolasa, se rompe en 2 moléculas de acetyl-CoA que entran en el ciclo TCA donde son oxidados por completo y producen energía sintetizando ATP por medio de la fosforilación oxidativa. El SNC central adulto tiene la capacidad de transportar y usar los cuerpos cetónicos como sustratos energéticos alternativos (Hawkins et al., 1971) a pesar de que la glucosa es su principal sustrato energético. De hecho, cuando la concentración de cuerpos cetónicos se incrementa (en situaciones como inanición prolongada o como resultado de una dieta cetogénica o de una infusión exógena), su oxidación en el cerebro aumenta (Owen et al., 1967). Debido a que la disfunción mitocondrial puede estar jugando un papel importante en la muerte neuronal que se da en la ALS, y a que los cuerpos cetónicos promueven

la producción de energía mitocondrial, se probó el efecto de una dieta cetogénica en los ratones transgénicos SOD1-G93A. Los animales alimentados con esta dieta preservaron la función motora por más tiempo, se evitó la pérdida de peso corporal, y hubo protección contra la pérdida de motoneuronas de la médula espinal lumbar. Además, se comprobó que el D-β-hidroxiacetato (isómero fisiológicamente activo) promueve la síntesis de ATP incrementándola y evita la neurotoxicidad de las motoneuronas espinales de los ratones transgénicos G93A provocada por la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Esto sugiere que el tratamiento con la dieta cetogénica puede disminuir el deterioro motor y proteger a las motoneuronas por medio de la promoción de la producción de energía mitocondrial (Zhao et al., 2006). También se ha demostrado el efecto neuroprotector del D-β-hidroxiacetato contra la toxicidad glutamatérgica, ya que el tratamiento con este cuerpo cetónico reduce el daño neuronal y la lipoperoxidación provocados por la inyección intraestriatal de glutamato a ratas a las que se les ha inhibido la glucólisis con yodoacetato. Esta protección puede deberse a que la suplementación del metabolismo mitocondrial con este sustrato energético permite que la célula contrarreste la cascada neurotóxica desencadenada por la sobreactivación de los receptores a glutamato gracias a que el D-β-hidroxiacetato estimula la producción de ATP y el consumo de O₂ y favorece el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial (Mejía-Toiber et al., 2006). Por otro lado, este mismo grupo después demostró que la capacidad antioxidante de los cuerpos cetónicos contribuye a su efecto protector contra el daño oxidativo asociado con la producción de radicales libres y disminución energética. Se estudió la capacidad del acetoacetato y los 2 isómeros D- (fisiológico) y L- (no fisiológico) del β-hidroxiacetato para atrapar diversas ROS, estos 2 últimos atraparon efectivamente los radicales [•]OH. Además, los 3 cuerpos cetónicos redujeron la muerte celular y la producción de ROS inducida por el yodoacetato, mientras que solamente el D-β-hidroxiacetato y el acetoacetato previnieron la disminución de ATP neuronal. Además, la administración de D- ó L- β-hidroxiacetato previno el aumento en la peroxidación de lípidos en el hipocampo inducido por hipoglicemia en un modelo in vivo (Haces et al., 2008). En nuestro modelo, la administración de DL-β-hidroxiacetato (mezcla racémica) ejerció una protección dosis-dependiente, ya que con una concentración de 20 mM ofrece muy poca protección tanto en la viabilidad de las motoneuronas como en la conducta de las ratas, presentando éstas una parálisis parcial, mientras que a una concentración de 50 mM ofrece buena protección contra la

neurodegeneración y se evita por completo la parálisis. El β -hidroxibutirato puede estar actuando entonces mediante la estimulación del metabolismo energético mitocondrial, y también disminuyendo la producción de ROS y por lo tanto los efectos nocivos del estrés oxidativo.

- *Mecanismos de neuroprotección del ascorbato*

Por todo lo anteriormente discutido, no podíamos concluir si en nuestro modelo hay producción de radicales libres, así que probamos el potencial protector del ácido ascórbico para tratar de encontrar el mecanismo bioquímico principalmente involucrado en la muerte de las motoneuronas. El ascorbato es una vitamina hidrosoluble (vitamina C) que se encuentra en todo el cuerpo, ya que es un cofactor de muchas reacciones enzimáticas y además también funciona como un excelente antioxidante. El ascorbato reacciona efectivamente con los radicales superóxido e hidroxilo donándoles un electrón o bien puede regenerar la forma reducida del α -tocoferol. El ascorbato también puede evitar la pérdida de glutatión reducido proporcionando protección antioxidante adicional indirecta. La concentración de ascorbato en el SNC, principalmente en las neuronas, es mantenida a un nivel mucho más alto que en el plasma (las concentraciones de vitamina C en el cerebro son ~ 10 veces más altas que en sangre). Ésto sugiere que este compuesto juega un papel esencial en la eliminación de ROS en el SNC, donde el metabolismo aerobio es muy activo (Rice, 2000). Las concentraciones de ácido ascórbico en el plasma, líquido cefalorraquídeo y cerebro en los mamíferos son de ~ 0.05 , 0.2 y 1 mM, respectivamente (Spector y Johanson 2006). En ciertas neuronas, la concentración puede llegar a ser tan alta como 10 mM (Rice, 2000). Tanto la forma reducida (ácido ascórbico), como la forma oxidada (ácido dehidroascórbico) de la vitamina C pueden ser transportadas a través de la membrana plasmática por medio de distintos transportadores. El ácido dehidroascórbico puede ser internalizado por medio de los transportadores de hexosas (GLUT1, GLUT3 y GLUT4) y luego ser reducido a ácido ascórbico por diferentes sistemas enzimáticos, de hecho el ácido dehidroascórbico es transportado por GLUT4 a los astrocitos. Además, el ácido dehidroascórbico puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica por medio del transportador GLUT1. La forma reducida del ácido ascórbico es transportada por un mecanismo activo que requiere 2 transportadores de vitamina C dependientes de Na^+ (SVCT1 y SVCT2). La forma reducida del ácido ascórbico es bombeada al SNC por medio del transportador activo SVCT2 que se encuentra en la membrana basolateral del plexo coroideo, y luego

es liberado al líquido cefalorraquídeo. Del líquido cefalorraquídeo, el ácido ascórbico difunde a través del espacio extracelular y es acumulado y concentrado en las neuronas por el mismo transportador SVCT2. Así, los sistemas de transportadores SVCT2 en el plexo coroideo y en la membrana celular de las neuronas proveen un sistema homeostático poderoso que transporta y concentra el ácido ascórbico en las neuronas (Spector y Johanson, 2006). El reciclaje continuo de la vitamina C ayuda claramente a proteger a las células nerviosas del daño oxidativo. Los seres humanos, a diferencia de los roedores y otros animales, no podemos sintetizar la vitamina C endógenamente (Nishikimi et al., 1994), por lo que es indispensable consumirla en los alimentos o como suplemento.

Las propiedades bioquímicas del ascorbato están vinculadas a papeles protectores críticos en estados normales y patológicos (Kok, 1997). La neuroprotección proporcionada por el ácido ascórbico ha sido demostrada en muchos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*: el ácido ascórbico protege las células nerviosas contra daños resultantes por toxicidad por aminoácidos excitadores e isquemia (MacGregor et al., 1996; Majewska et al., 1990; Majewska y Bell, 1990; Kim et al., 2008; Stamford et al., 1999). También se ha descrito que la vitamina C entra a la mitocondria y le confiere protección contra el daño oxidativo (Sagun et al., 2005). El papel del ácido ascórbico en la protección contra estrés oxidativo es controversial porque también tiene propiedades pro-oxidantes en presencia de metales de transición libres *in vitro*, sin embargo, es incierto si estos mecanismos ocurren *in vivo* y los datos en animales muestran un papel antioxidante para la vitamina C (Carr y Frei, 1999). Además, los sistemas *in vitro* en general son más limitados que los modelos *in vivo* por su pobre representación de las condiciones redox extracelulares y su falta de secuestro de metales; y bajo condiciones normales *in vivo*, es muy poco probable que se dé la actividad pro-oxidante del ascorbato en el SNC porque los metales de transición están prácticamente ausentes en forma libre (Kok, 1997).

En nuestros experimentos, observamos solamente una protección parcial con las concentraciones de ascorbato utilizadas, ya que disminuyó solo un poco la pérdida de las motoneuronas y no previno las alteraciones motoras por completo. Esto puede deberse a que la disminución terapéutica de radicales libres puede ser llevada a cabo por el ácido ascórbico solamente a concentraciones fisiológicas muy altas (de mínimo 10 mM) (Jackson et al., 1998), y recordemos que la eficiencia de la cánula es de ~10 %, por lo que en nuestros experimentos están pasando concentraciones de alrededor de 1, 2 y 5 mM. Además es importante tomar en cuenta que el SNC está protegido de altas dosis orales o parenterales

de ácido ascórbico porque su sistema de transporte se satura a la mitad a concentraciones aproximadamente iguales a las concentraciones normales en plasma de 0.05 mM. Así, debido a la barrera y los sistemas homeostáticos poderosos que existen para el ácido ascórbico en el SNC, aun dosis masivas de ácido ascórbico administradas intravenosamente no incrementan la concentración de ácido ascórbico en el tejido nervioso significativamente (Spector, 2009). Por esta razón, puede ser que en nuestro modelo no se hayan alcanzado las concentraciones intracelulares suficientemente altas para que el ascorbato pudiera ejercer una mayor actividad antioxidante para proporcionar una mejor neuroprotección, además el hecho de que a las 3 concentraciones probadas se obtuvieron resultados muy similares apoya la hipótesis de que el transportador se está saturando, lo que no permitiría obtener concentraciones intracelulares más altas aun administrando concentraciones extracelulares mayores. Además, a pesar de que la vitamina C se encuentra principalmente en su forma reducida (ácido ascórbico) tanto en la sangre como en el cerebro, la forma química de la vitamina C que cruza la barrera hematoencefálica es la forma oxidada de la vitamina C (ácido dehidroascórbico), que después de entrar al tejido nervioso por medio del transportador de glucosa GLUT1, es reducido y acumulado en la forma de ácido ascórbico (Agus et al., 1997; Vera et al., 1993; Vera et al., 1995). Concordando con esto, en un estudio realizado in vivo de isquemia cerebral focal provocada transitoria o permanentemente, se observó una gran neuroprotección dosis-dependiente en los ratones a los que se le administró intravenosamente ácido dehidroascórbico en tiempos clínicamente relevantes, mientras que esto no se observó en los ratones tratados con ácido ascórbico exógeno o con vehículo. Este hecho se atribuyó a que el ácido dehidroascórbico es un precursor de antioxidante que puede cruzar la barrera hematoencefálica y puede ser convertido intracelularmente de forma natural a ácido ascórbico, permitiendo que se alcancen concentraciones de ascorbato fisiológicamente altas en el cerebro que no se alcanzan con la administración exógena de ácido ascórbico (Huang et al., 2001). Por otro lado, los ratones transgénicos SOD1-G93A tratados con ascorbato antes del inicio de los síntomas sobrevivieron por más tiempo (Nagano et al., 2003), pero la mejora observada no fue tan pronunciada como con otros tratamientos probados en estos ratones, además de que no se retardó el tiempo del inicio de los síntomas y la función motora se preservó por más tiempo sólo en los ratones tratados con ascorbato + trientina, un quelante de cobre. Debido a que éstos también son experimentos in vivo, la poca protección puede deberse a que el ácido ascórbico administrado exógenamente (se administró en

la dieta formulado a una concentración de 0.8% peso/peso, los animales recibieron comida y agua ad libitum) tal vez no alcanzó concentraciones intracelulares suficientemente altas.

- *Participación de las deficiencias energética y de la función mitocondrial en la muerte excitotóxica de las motoneuronas espinales*

Previamente en nuestro laboratorio se comprobó la importancia de la participación del Ca^{2+} intracelular incrementado en este modelo agudo de muerte de motoneuronas in vivo, ya que la co-administración de AMPA con NAS, un antagonista específico de los receptores tipo AMPA permeables a Ca^{2+} que carecen de la subunidad GluR2, y de BAPTA-AM, un éster que al entrar a las células es hidrolizado por esterasas intracelulares siendo capaz de quelar Ca^{2+} intracelular, resultó en una neuroprotección significativa y evitó la parálisis de la pata ipsilateral de las ratas (Corona y Tapia, 2007). Los mecanismos para regular la concentración de Ca^{2+} intracelular, ya sea extruyendo de la célula o secuestrando en pozas intracelulares el exceso de este catión, son muy costosos energéticamente porque dependen del transporte activo de la Ca^{2+} -ATPasa y del intercambiador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ que activa a la $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPasa para sacar el exceso de Na^{+} que entra a la célula al transportar el Ca^{2+} hacia el exterior por medio del intercambiador. Las mitocondrias también pueden secuestrar Ca^{2+} cuando la concentración de Ca^{2+} citosólico sobrepasa la capacidad de los mecanismos de transporte activo. El impulso para el transporte de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial está dado por la utilización del gradiente de protones a través de la membrana. Por lo tanto, se puede predecir que la activación de los receptores a glutamato conduce a un aumento en la hidrólisis de ATP por la actividad incrementada de las ATPasas de Ca^{2+} y $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ de la membrana plasmática para expulsar el exceso de Ca^{2+} y Na^{+} , y también a un aumento en la respiración mitocondrial para mantener el gradiente de protones que también está siendo utilizado para conducir la absorción de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial. De hecho, se ha observado un incremento inicial y transitorio con respecto a la respiración basal inmediatamente después de la exposición a glutamato de neuronas granulares cerebrales (Jekabsons y Nicholls, 2004). Cuando el Ca^{2+} es excesivo y por lo tanto la mitocondria secuestra mucho de este ion, esto puede provocar despolarización mitocondrial debilitando la capacidad de las neuronas para sintetizar ATP. Dado que Δp depende principalmente de $\Delta\psi_m$, el colapso de $\Delta\psi_m$ provocará el colapso de Δp . El colapso en el Δp tiene como consecuencia no sólo el cese de la síntesis de ATP mitocondrial,

sino también la hidrólisis rápida del ATP citoplásmico porque la función de la ATP sintasa se invierte en un intento para restaurar Δp y esto puede tener como consecuencia un agotamiento del ATP celular (Nicholls y Budd, 2000). La concentración de Ca^{2+} intramitocondrial excesiva también provoca hinchamiento y la liberación del Ca^{2+} de la matriz mitocondrial.

El aumento del gasto energético como consecuencia del aumento del Ca^{2+} citosólico por excitotoxicidad ha sido comprobado *in vitro*, ya que la sobreexpresión de calbindina D28k, una proteína que une calcio y disminuye su aumento intracelular, protegió a las neuronas de la disminución en los niveles de ATP, en el potencial de membrana y en la tasa metabólica provocados al ser tratadas con glutamato. La sobreexpresión de esta proteína también aumentó la sobrevivencia neuronal (Monje et al., 2001; Meier et al., 1998). Además, se ha reportado una marcada disminución en los niveles de ATP como consecuencia de la excitotoxicidad *in vitro* (Ankarcrona et al., 1995; Maus et al., 1999; Monje et al., 2001; Atlante et al., 1996), así como colapso del potencial de membrana mitocondrial (Ankarcrona et al., 1995; Schinder et al., 1996; White y Reynolds, 1996; Monje et al., 2001) y un decaimiento gradual de la tasa metabólica (Raley-Susman et al., 1992; Monje et al., 2001).

Por todo lo anterior, podemos inferir que el aumento en el Ca^{2+} intracelular que ocurre en las motoneuronas por la perfusión del AMPA, es energéticamente muy costoso y este insulto excitotóxico puede disminuir la producción de ATP y agotar las reservas de ATP en el intento de regular la concentración de Ca^{2+} intracelular. El hecho de que el piruvato, el lactato, el α -cetobutirato, y el β -hidroxibutirato protejan claramente de la pérdida de motoneuronas y parálisis inducidas por el AMPA, fortalece la idea de que el Ca^{2+} interfiere con el metabolismo energético mitocondrial. Debido a que durante la sobreactivación de la transmisión glutamatérgica, la deficiencia de ATP puede ser crítica para la recuperación de las neuronas, esta protección muy probablemente se deba al aumento en la producción de ATP. La síntesis de ATP es controlada por el $\Delta\psi_m$, quien a su vez es controlado por la disponibilidad de sustrato, entre otros factores. Por lo tanto, la administración de una mayor cantidad de sustratos energéticos podría satisfacer la alta demanda de ATP que tendrán las motoneuronas en estas condiciones.

Sin embargo, permanece la pregunta de cómo es que las mitocondrias son capaces de sintetizar ATP aun cuando ellas mismas pueden ser blanco del insulto excitotóxico. El hecho de que estos sustratos

sean perfundidos antes, durante y después (160 minutos) de la perfusión del AMPA (25 minutos) no es un hecho trivial, ya que este aumento en la disponibilidad de sustrato desde antes de que la integridad y función de las mitocondrias sea dañada, puede servir para que haya una mayor producción de ATP por medio de su oxidación en la mitocondria, y por lo tanto para que la célula cuente con una mayor reserva energética cuando es sobreexcitada por el AMPA. Otra posible explicación es que aun después de la administración del AMPA, no todas las mitocondrias son dañadas inmediatamente por la acumulación excesiva de Ca^{2+} o por estrés oxidativo, sino que algunas pueden permanecer sanas y funcionales dentro de la misma neurona debido tal vez a su localización subcelular más lejana a los receptores o a los canales de Ca^{2+} . De esta manera, estas mitocondrias funcionales estarían sintetizando una mayor cantidad de ATP estimuladas por la alta demanda y la mayor cantidad de sustratos oxidables.

Finalmente, dado que la absorción de Ca^{2+} por la mitocondria es impulsada por $\Delta\psi_m$, competirá en paralelo con la ATP sintasa mitocondrial por los protones del circuito de protones (Nicholls y Budd, 2000). El transporte de Ca^{2+} podría dominar esta competencia (Rossi y Lehninger, 1964) debido a que la síntesis de ATP requiere un umbral termodinámico para $\Delta\psi_m$, mientras que la acumulación de Ca^{2+} puede proceder a un $\Delta\psi_m$ mucho menor y las excesivas concentraciones de Ca^{2+} disminuyen dramáticamente $\Delta\psi_m$. Ante esta situación, se podría predecir que en las neuronas expuestas solo al AMPA, la síntesis mitocondrial de ATP iría disminuyendo a medida que el Ca^{2+} se transportara del citoplasma a la matriz mitocondrial. Las alteraciones en la síntesis de ATP afectan a su vez la actividad de las bombas de iones responsables de la remoción del Ca^{2+} del citoplasma, ésto junto con la posterior salida del Ca^{2+} de la matriz mitocondrial daría lugar a la DCD que finalmente lleva a la muerte neuronal. Sin embargo, como $\Delta\psi_m$ también es controlada por la disponibilidad de sustrato, el exceso de sustratos mitocondriales que está siendo administrado exógenamente puede ayudar a que la fosforilación oxidativa aumente manteniendo el gradiente electroquímico de protones, evitando la caída en $\Delta\psi_m$ y ayudando a que la síntesis de ATP continúe.

La pregunta clave es si las mitocondrias mantienen su competencia bioenergética completa, particularmente su habilidad para generar ATP en el periodo latente antes de que se dé la DCD, o si la mitocondria está parcial o completamente despolarizada después de los primeros minutos de la

exposición a glutamato o AMPA. Si bien hay polémica al tratar de responder esta pregunta, hay evidencias que sugieren que las mitocondrias de las células granulares de cerebelo expuestas a concentraciones excitotóxicas de glutamato, continúan siendo bioenergéticamente competentes durante la fase antes de que se dé la DCD, y siguen siendo capaces de generar ATP por medio de la fosforilación oxidativa hasta que la DCD está en marcha (Nicholls et al., 1999a; Ward et al., 2000; Jekabsons y Nicholls, 2004). El hecho de que la fosforilación oxidativa mitocondrial continúa funcionando está apoyado por la habilidad del piruvato, que es un sustrato mitocondrial no glicolítico, para mantener a las células granulares cerebelares privadas de glucosa en la presencia de glutamato, mientras que en las células expuestas a glutamato en ausencia de glucosa o un sustrato oxidable se da una inmediata alteración de la regulación de Ca^{2+} citoplásmico (Castilho et al., 1998). Existen datos que indican que la DCD inducida por glutamato se asocia con una pérdida de la respiración en lugar de un desacoplamiento pronunciado (Jekabsons y Nicholls, 2004). Como la respiración mitocondrial puede ser severamente limitada por la falta de sustrato, esto podría resultar en la alteración de la regulación de Ca^{2+} , y la administración de suficiente sustrato podría evitarla.

Por lo tanto, la completa despolarización y pérdida de Δp mitocondrial incapacitando a la mitocondria para producir ATP e incluso ocasionando la degradación de ATP por la ATP sintasa, probablemente es la etapa final en la cadena de eventos que comprenden la DCD y el resultado de un incremento descontrolado en la concentración de Ca^{2+} citosólico después de la falla de la Ca^{2+} -ATPasa y no un evento temprano inicial (Nicholls y Budd, 2000). Es importante notar que la muerte celular ocurre solamente cuando la acumulación de Ca^{2+} supera un umbral de cantidad considerable (Eimerl y Schramm, 1994). El aumento en la producción de ATP desde el inicio podría prevenir estos eventos finales fatales, ya que serviría para satisfacer la alta demanda energética de las neuronas y para que se expulsara de la célula el exceso de este catión manteniendo su homeostasis y evitando así que se llegue a este umbral que provoca la DCD, el daño subsecuente e irreversible a las mitocondrias y el desencadamiento de los procesos intracelulares activados por Ca^{2+} que llevan a la muerte celular.

Muchos estudios han demostrado defectos mitocondriales o en el metabolismo energético en enfermedades neurodegenerativas como la ALS y las enfermedades de Huntington, Alzheimer y Parkinson (Beal, 1992; Beal et al., 1993). Defectos en el metabolismo energético mitocondrial hacen más susceptibles a las neuronas a niveles normales de glutamato (Beal et al., 1993) e, inversamente, la

excitotoxicidad glutamatergica causa, por medio de la sobrecarga de Ca^{2+} , daño mitocondrial y modificación del estado bioenergético de la mitocondria. Entonces, sin importar cuál de estos dos eventos se lleve a cabo primero, esto puede crear un círculo vicioso con un final fatal.

- *Participación del estrés oxidativo en la muerte excitotóxica de las motoneuronas espinales*

Es importante considerar el papel que el estrés oxidativo puede estar jugando en la degeneración de las motoneuronas. El estrés oxidativo puede dañar todos los componentes de la célula generando así una serie de eventos destructivos. Los componentes mitocondriales también pueden ser afectados directamente por el estrés oxidativo provocando disfunción mitocondrial. Además, el daño oxidativo a las mitocondrias y a las proteínas que participan en la extrusión del Ca^{2+} de la neurona puede dar lugar a la DCD. De hecho, el estrés oxidativo altera la regulación citoplásmica de Ca^{2+} e induce muerte neuronal (Beal, 1996; Coyle y Puttfarcken, 1993), y se han probado algunos antioxidantes como la porfirina de manganeso (III) tetrakis (ácido 4-benzóico), la vitamina E, el propil galato, y la α -fenil-N-ter-butil- nitrona (PBN), que previenen o retardan la alteración de la regulación citoplásmica de Ca^{2+} en neuronas expuestas a glutamato (Castilho y Nicholls, 1999; Coyle y Puttfarcken, 1993).

Una hipótesis de cómo se da la sucesión de eventos relacionados con el estrés oxidativo y el daño mitocondrial durante la excitotoxicidad postula que hay 2 fases de formación de ROS después de la sobreexposición al glutamato: una fase temprana de producción de ROS debida a la activación de enzimas como la XOD y tal vez a otros procesos, y una fase tardía de producción de ROS principalmente por la mitocondria. En la fase temprana la mitocondria todavía es capaz de producir ATP. En cambio, en la fase tardía de excitotoxicidad, las mitocondrias ya estarían dañadas, observándose un decremento en la respiración y síntesis de ATP, así como producción elevada de ROS por la mitocondria simultáneamente. Esto ocurre como un proceso de autopropagación, se va agotando la energía celular almacenada, conduciendo al daño de ciertos mecanismos homeostáticos y protectores. En esta fase se da la alteración de la regulación del Ca^{2+} citosólico seguida de la MPT. Finalmente, la creciente producción de ROS agotaría las defensas celulares antioxidantes, dando lugar a un aumento generalizado de estrés oxidativo y de daño mediado por radicales libres en toda la célula, siendo parte de la cascada de eventos que conducen al daño neuronal después de la activación excitotóxica de receptores a aminoácidos excitadores (Atlante et al., 2001).

Dado que se ha comprobado la importante participación del estrés oxidativo en la degeneración neuronal durante la excitotoxicidad (Atlante et al., 2001; Bondy et al., 1993; Almeida et al., 2001; Lafon-Cazal et al., 1993a; Lafon-Cazal et al., 1993b; Reynolds y Hastings, 1995; Matson et al., 1995; Dugan et al., 1995; Coyle y Puttfarcken, 1993), y que la sobrecarga de Ca^{2+} en las mitocondrias incrementa la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y por lo tanto de ROS (Dykens, 1994; Kowaltowski et al., 1996), no podemos descartar el hecho de que el piruvato (ya sea administrado directamente o producido endógenamente del lactato), el α -cetobutirato y el β -hidroxibutirato estén también protegiendo por medio de las cualidades antioxidantes que se ha comprobado que tienen, además de que, como ya se ha discutido, pueden contribuir a la preservación de la homeostasis de calcio intracelular limitando así la producción de radicales libres. El hecho de que el ascorbato, que no es un sustrato energético oxidable y sólo posee actividad antioxidante, esté ejerciendo mucho menor protección que los otros sustratos sugiere que el estrés oxidativo no es el mecanismo más importante en la degeneración de las motoneuronas en nuestro modelo, sin embargo podemos concluir que sí está participando en la muerte dado que hay una protección parcial contra la pérdida de las motoneuronas y la disfunción motora. Sin embargo, se requiere más investigación para dar una conclusión más acertada acerca del papel del estrés oxidativo en esta neurodegeneración debido a que tal vez no se alcanzaron concentraciones intracelulares de ácido ascórbico suficientemente altas para que pudiera ejercer mayor actividad antioxidante y una mejor neuroprotección. Para poder concluir con más certeza acerca de qué tanto están participando la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en este modelo, podría realizarse mayor investigación midiendo directamente la actividad mitocondrial o los niveles energéticos y probando el potencial protector de otros antioxidantes o midiendo marcadores moleculares de estrés oxidativo.

Dada la significativa protección ejercida por el piruvato, el lactato, el α -cetobutirato y el β -hidroxibutirato contra la neurodegeneración de las motoneuronas inducida por excitotoxicidad, que se atribuye a que son excelentes sustratos oxidables que pueden aumentar la producción de energía y a que tienen propiedades antioxidantes, y gracias a su baja toxicidad, estos sustratos pueden tener valor terapéutico potencial en enfermedades neurodegenerativas en las que muy probablemente esté participando la excitotoxicidad, como lo es la ALS.

Existe un umbral en el número de motoneuronas necesario para prevenir las alteraciones motoras y la parálisis en las ratas.

En relación con la protección contra las alteraciones motoras subsecuentes a la muerte de las motoneuronas, y tomando en cuenta todos los compuestos evaluados a diferentes concentraciones en el modelo de degeneración aguda de motoneuronas espinales por excitotoxicidad in vivo, hemos observado en todos los resultados obtenidos con las condiciones probadas que, al parecer, existe un umbral en el número de motoneuronas necesario para prevenir las alteraciones motoras y la parálisis.

La tabla 1 muestra una recopilación de todos los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con los diferentes compuestos neuroprotectores evaluados en este modelo, tanto los resultados ya publicados (Corona y Tapia, 2004; 2007; 2008), como los resultados presentados en esta tesis. Las diversas condiciones se clasificaron en 3 grupos de acuerdo al nivel de protección ejercido:

GRUPO I PROTECCIÓN NOTABLE: La co-perfusión de AMPA con los compuestos clasificados en este grupo en la médula espinal de la ratas, previno por completo la parálisis y las alteraciones motoras provocadas por el AMPA solo. Las ratas tratadas con estos compuestos presentaron solamente un ligero déficit en la prueba del rotarod, y se previno notablemente la pérdida de las motoneuronas de tal manera que en todos los casos se preservó más del 50 % de motoneuronas sanas (desde un 53 hasta un 69 %).

GRUPO II PROTECCIÓN PARCIAL: Las ratas a las cuáles se les co-perfundió AMPA con los compuestos clasificados en este grupo en la médula espinal presentaron alteraciones motoras en la extremidad posterior ipsilateral (como por ejemplo dificultad para enderezar la pata completamente) sin llegar a ser una parálisis total como la que se presenta en las ratas tratadas sólo con AMPA. Esto se ve claramente reflejado en el desempeño de estas ratas en la prueba del rotarod. En cuanto al número de motoneuronas sanas preservadas en el asta ventral de la médula espinal de estas ratas, podemos observar que se preserva un porcentaje significativo de éstas (desde un 33 hasta un 48 %), porcentaje que sin embargo no logra prevenir las alteraciones motoras por completo.

GRUPO III SIN PROTECCIÓN: En este grupo se encuentran las ratas tratadas únicamente con AMPA 6 mM, las cuáles, como ya se ha descrito anteriormente, presentan una parálisis total y permanente de la extremidad posterior ipsilateral, lo cual se puede observar claramente en los resultados obtenidos en la prueba del rotarod ya que estas ratas se cayeron a los pocos segundos. En este caso la pérdida de las

motoneuronas es muy marcada, ya que sólo se preserva aproximadamente el 11 % de neuronas motoras sanas con lo cual la parálisis ya es inevitable.

Con estos resultados hemos podido observar que existe una clara correlación entre el número de motoneuronas vivas y el desempeño motor de los animales (Tabla 1, figuras 21, 22 y 23). Es digno de notarse que, por ejemplo en las ratas tratadas con las diferentes concentraciones de lactato, la pequeña diferencia en la pérdida de aproximadamente un 52 % de las motoneuronas en las ratas tratadas con lactato 50 mM contra la pérdida de aproximadamente un 40 % de las motoneuronas en las ratas tratadas con lactato 100 mM, resulta en una marcada diferencia en el desempeño de la función motora. Así, con estos resultados y todos los demás resultados analizados con las diferentes condiciones, podemos concluir que existe un umbral en el porcentaje de motoneuronas vivas necesario para prevenir por completo las alteraciones en la función motora del animal, ya que en todos los casos mientras se protegieron más del 50 % de las motoneuronas se evitaron por completo las alteraciones motoras y la parálisis, mientras que cuando la preservación de las motoneuronas está por debajo de este umbral el desempeño motor se ve afectado, y cuando la pérdida de motoneuronas es muy severa se manifiesta con la parálisis total de la extremidad inervada por esa región de la médula espinal.

Estos datos están basados solamente en los resultados de los experimentos de esta tesis y de otros datos de nuestro laboratorio, sobre la cuantificación de motoneuronas en 5 cortes (por cada rata) de la médula espinal lumbar donde se realizó la perfusión con AMPA para el número de ratas indicado en la Tabla 1 y en las figuras 21, 22 y 23. Aunque esto es evidentemente una limitación, nos parece justificado concluir que existe un número mínimo umbral de motoneuronas que es capaz de preservar la función motora del tren posterior de la rata.

Tabla 1. Clasificación por grupos según los efectos protectores de los diferentes compuestos probados en el modelo de degeneración aguda de motoneuronas espinales por excitotoxicidad producido por AMPA in vivo. Los diferentes compuestos utilizados se ordenaron en 3 grupos de acuerdo con el grado de protección ejercida por cada uno contra el déficit de la actividad motora y la muerte de las motoneuronas provocados por la perfusión de AMPA por microdiálisis en la médula espinal de ratas. Los compuestos solos no tuvieron ningún efecto.

Clasificación de grupos de acuerdo a la protección observada en la función motora	Condición*	Protección					
		Motoneuronas sanas				Tiempo en el rotarod (seg)	
		Contralateral		Ipsilateral		6 horas después del experimento	24 horas después del experimento
		Número [#]	% [§]	Número [#]	% [§]		
GRUPO I: PROTECCIÓN NOTABLE	CONTROL (Krebs-Ringer) (n=8)	20.6 ± 0.54	100	20.5 ± 0.53	100	120 ^{&}	120 ^{&}
	AMPA 6 mM + NBQX 500 μ M (n=9) ¹	20.5 ± 0.90	99	10.8 ± 0.89	53	N.D.	N.D.
	AMPA 6 mM + NAS 9 mM (n=10) ²	19.7 ± 0.14	96	11.2 ± 0.30	54	99.5 ± 4.9	100.7 ± 5.2
	AMPA 6 mM + BAPTA-AM 10 mM (n=14) ²	21.9 ± 0.26	106	14.2 ± 0.55	69	107.2 ± 1.3	109.7 ± 1.9
	AMPA 6 mM + Leupeptina 21 mM (n=6) ³	19.6 ± 0.2	95	14.1 ± 0.23	68	100.9 ± 3.55	105.5 ± 3.41
	AMPA 6 mM + Piruvato 20 mM (n=14) ²	20.3 ± 0.27	98	10.9 ± 0.55	53	106.7 ± 2.6	106.9 ± 3.8
	AMPA 6 mM + Lactato 100 mM (n=9)	21.1 ± 0.63	102	12.3 ± 0.45	60	108.1 ± 6.25	112.7 ± 3.97
	AMPA 6 mM + α -cetobutirato 20 mM (n=9)	21.5 ± 0.53	104	12.4 ± 0.28	61	106.5 ± 8.24	106.6 ± 6.65
	AMPA 6 mM + β -hidroxibutirato 50 mM (n=9)	19.6 ± 0.67	95	11.8 ± 0.94	58	97.3 ± 7.67	102.3 ± 7.21
GRUPO II: PROTECCIÓN PARCIAL	AMPA 6 mM + Lactato 50 mM (n=9)	21.1 ± 0.41	102	9.9 ± 0.33	48	44 ± 9.05	58.4 ± 9.05
	AMPA 6 mM + β -hidroxibutirato 20 mM (n=9)	20.3 ± 1.20	98	9.2 ± 0.73	45	51.9 ± 6.52	57.6 ± 4.32
	AMPA 6 mM + Ascorbato 10 mM (n=8)	19.4 ± 0.69	94	6.7 ± 0.28	33	39.1 ± 9.73	51.9 ± 10.65
	AMPA 6 mM + Ascorbato 20 mM (n=8)	20 ± 0.83	97	8.4 ± 0.84	41	42.8 ± 8.76	52.9 ± 8.02
	AMPA 6 mM + Ascorbato 50 mM (n=9)	20.4 ± 0.87	99	8.7 ± 0.77	42	55.4 ± 6.69	60.4 ± 4.61
GRUPO III: SIN PROTECCIÓN	AMPA 6 mM (n=8)	19.3 ± 1.93	94	2.3 ± 0.41	11	5.3 ± 1.39	8.5 ± 1.68

*Las concentraciones se refieren al medio de perfusión por microdiálisis. La eficiencia de la membrana de diálisis es ~10 %.

[#]Se contaron ~5 cortes de la médula espinal por rata. Valores promedio \pm SEM.

[§]Porcentaje aproximado de motoneuronas sanas con respecto al control (ratas intactas sin operar u operadas a las cuáles sólo se les perfundió solución Krebs-Ringer).

[&]Límite máximo establecido.

N.D. = No determinado.

¹Tomado de Corona y Tapia, 2004.

²Tomado de Corona y Tapia, 2007.

³Tomado de Corona y Tapia, 2008.

Todos los demás datos son de la presente tesis.

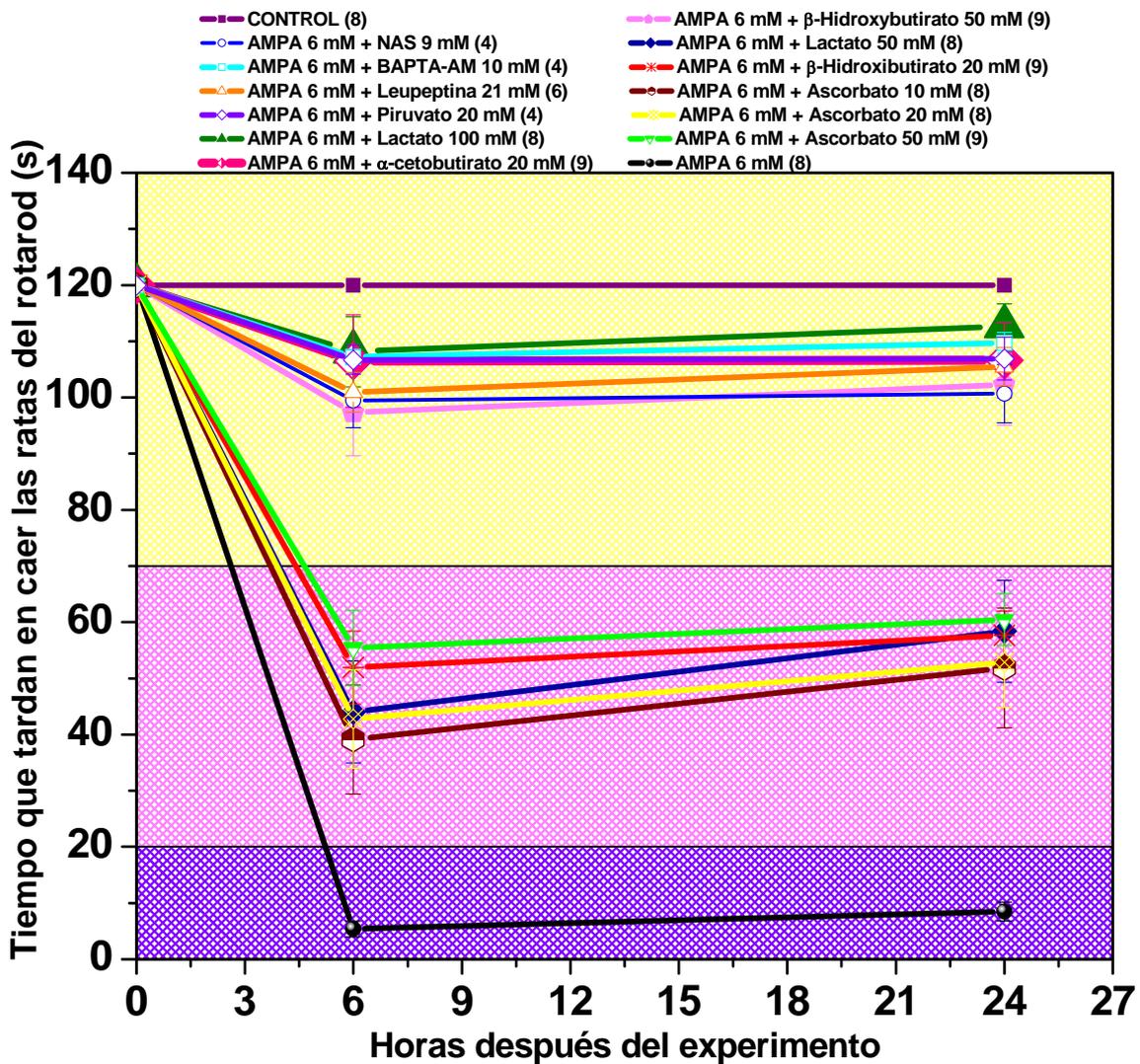


Figura 21. Prueba del rotarod para todas las condiciones probadas hasta el momento en el modelo de degeneración aguda de motoneuronas espinales por excitotoxicidad in vivo. Se han agrupado las diferentes condiciones de acuerdo al grado de protección observada en la función motora en esta prueba. El grupo I (fondo amarillo) incluye las ratas control y las ratas tratadas con los compuestos que ejercieron una protección notable; el grupo II (fondo rosa) incluye a las ratas tratadas con los compuestos que ejercieron una protección parcial; y el grupo III (fondo morado) de ratas no protegidas incluye a las ratas tratadas sólo con AMPA y que por lo tanto presentaron una parálisis en la pata trasera ipsilateral. Para datos cuantitativos más precisos y referencias obsérvese la Tabla 1.

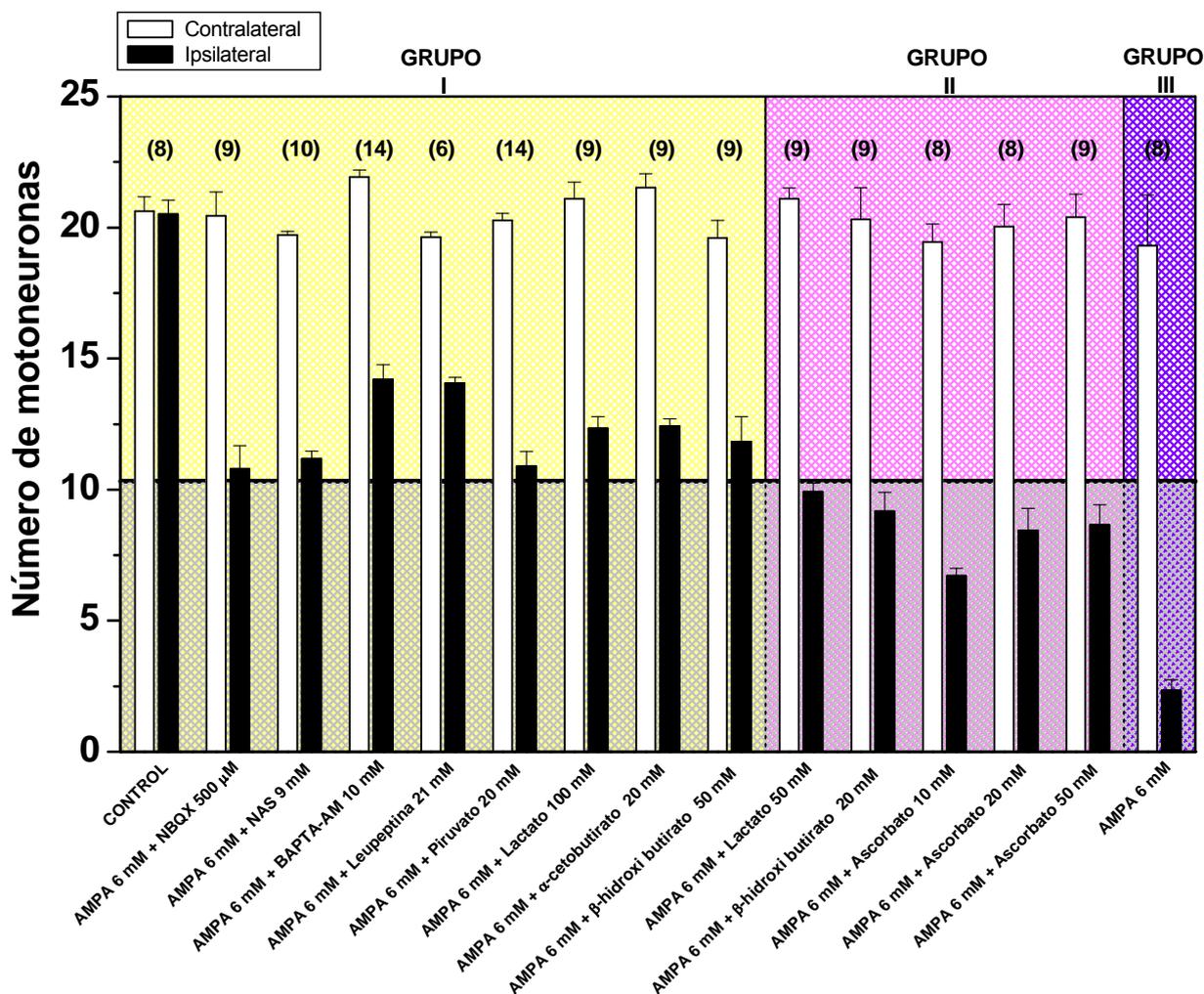


Figura 22. Número de motoneuronas sanas en las astas ventrales ipsilateral y contralateral de las ratas tratadas con AMPA (último par de barras) y con AMPA + los diferentes compuestos probados en el modelo de degeneración aguda de motoneuronas espinales por excitotoxicidad in vivo como se indica. La línea negra horizontal que divide la gráfica indica el 50 % del número de motoneuronas con respecto a las ratas control y la parte sombreada de la gráfica indica el número de motoneuronas que están por debajo del 50 %. Las diferentes condiciones se ordenaron de acuerdo con la clasificación de los 3 grupos descritos en el texto, en la Tabla 1 y en la figura 21; para cada grupo se utilizan los mismos colores de fondo. Obsérvese la correlación que existe entre el número y porcentaje de motoneuronas sanas y el grado de protección de la función motora (véase Tabla 1 y figuras 21 y 23). Todas las ratas tratadas con los compuestos clasificados en el grupo I por haber protegido notablemente la función motora preservaron más del 50 % de motoneuronas sanas, mientras que los tratamientos que no alcanzaron a superar el umbral de más de este 50 % pero que sí protegieron un porcentaje considerable de motoneuronas preservaron parcialmente la función motora (grupo II), y las ratas tratadas sólo con AMPA (grupo III), que presentan parálisis de la pata ipsilateral, tienen una severa pérdida de motoneuronas (aproximadamente del 89 %). Datos de Corona y Tapia, 2004; 2007; 2008 y de la presente tesis.

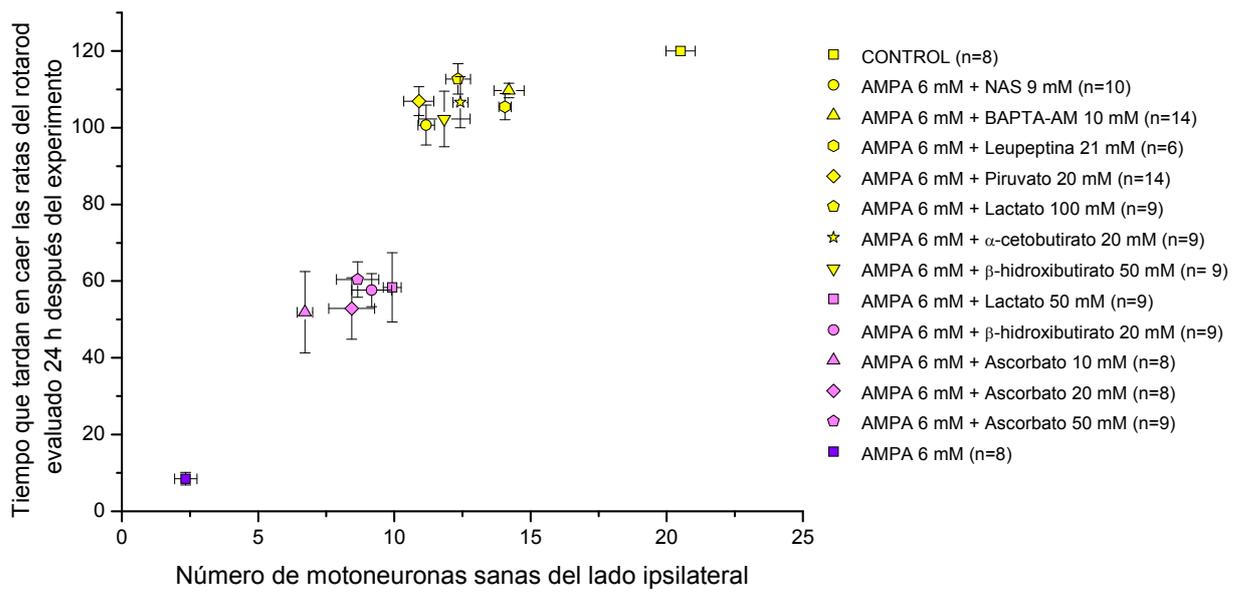


Figura 23. Correlación entre el número de motoneuronas sanas en las astas ventrales del lado ipsilateral y el tiempo en el que permanecen caminando en el rotarod las ratas tratadas con AMPA y con AMPA + los diferentes compuestos probados en el modelo de degeneración aguda de motoneuronas espinales por excitotoxicidad in vivo, evaluado a las 24 horas. Se pueden observar claramente la separación de los 3 grupos descritos en el texto, en la Tabla 1 y en las figuras 21 y 22, los mismos colores que se utilizaron de fondo en éstas se usaron para las figuras que representan cada grupo en esta gráfica. Datos de Corona y Tapia, 2004; 2007; 2008 y de la presente tesis.

IX. CONCLUSIONES:

- Los mecanismos que intervienen en la degeneración de las motoneuronas espinales in vivo son multifactoriales, dado que ninguna de las estrategias que se han probado en este modelo para evitar la pérdida de las motoneuronas ha protegido por completo. Sin embargo, podemos concluir que el déficit energético mitocondrial y el estrés oxidativo juegan un papel crucial, ya que la administración de sustratos oxidables que muy probablemente están aumentando los niveles energéticos y posiblemente los efectos antioxidantes de los sustratos probados ejercen neuroprotección significativa.

- La protección obtenida con la suplementación con sustratos energéticos sugiere que el déficit energético puede estar jugando un papel más relevante que el estrés oxidativo en la neurodegeneración de motoneuronas espinales in vivo dados los resultados obtenidos con el antioxidante probado en nuestro modelo. Sin embargo, se requiere más investigación para dar una conclusión más acertada.

- Aunque no se tiene la certeza de que la causa principal de la degeneración selectiva de las motoneuronas en la ALS es la excitotoxicidad, es una de las hipótesis más convincentes, dada la especial vulnerabilidad de las motoneuronas al AMPA y el hecho de que los receptores de este tipo se encuentran abundantemente en la médula espinal. Por esta razón, los datos obtenidos en este trabajo pueden contribuir al entendimiento de los mecanismos que están participando en la muerte neuronal en esta enfermedad que también parece ser multifactorial, y los sustratos probados podrían ser agentes terapéuticos potenciales. Además, aun cuando la excitotoxicidad no fuera la causa

primaria de la degeneración de las motoneuronas, existe mucha evidencia que indica que la disfunción mitocondrial está involucrada en la patogénesis de la ALS, ya que se ha demostrado que existen alteraciones estructurales y funcionales en las mitocondrias de los pacientes con ALS. Asimismo, también hay bastante evidencia de la participación del estrés oxidativo en esta enfermedad.

- Al parecer existe un umbral en el número de motoneuronas necesario para prevenir las alteraciones motoras y la parálisis, ya que el análisis de los resultados obtenidos en este y trabajos previos con todas las condiciones probadas en este modelo, muestra que existe una clara correlación entre la sobrevivencia de motoneuronas y la función motora. Así, mientras se preserve más del 50 % de las motoneuronas, se evitan tanto las alteraciones en el desempeño motor como la parálisis, mientras que cuando no se supera este umbral de protección ocurre un déficit parcial en el desempeño motor, y cuando hay una pérdida severa de motoneuronas se produce inevitablemente la parálisis.

❖ REFERENCIAS:

- Abe, K., Pan, L.H., Watanabe, M., Kato, T., Itoyama, Y., 1995. Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 199, 152–154.
- Abe, K., Pan, L.H., Watanabe, M., Konno, H., Kato, T., Itoyama, Y., 1997. Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Res.* 19, 124–128.
- Afifi, A.K., Aleu, F.P., Goodgold, J., MacKay, B., 1966. Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 16, 475–481.
- Agus, D.B., Gambhir, S.S., Partridge, W.M., Spielholz, C., Baselga, J., Vera, J.C., Golde, D.W., 1997. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J. Clin. Invest.* 100, 2842-2848.
- Al Nasser, I., Crompton, M., 1986. The reversible Ca^{2+} -induced permeabilization of rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 239, 19-29.
- Alexianu, M.E., Ho, B.K., Mohamed, A.H., La Bella, V., Smith, R.G., Appel, S.H., 1994. The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 36, 846-858.
- Almeida, A., 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.
- Amodio, R., Esposito, E., De Ruvo, C., Bellavia, V., Amodio, E., Carruba, G., 2006. Red wine extract prevents neuronal apoptosis in vitro and reduces mortality of transgenic mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1089, 88–97.
- Andersen, J.K., 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med. Suppl.* 10, S18-S25.
- Andersen, P.M., 2000. Genetic factors in the early diagnosis of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, 1 Suppl 1, S31-42.
- Andersen, P.M., Forsgren, L., Binzer, M., Nilsson, P., Ala-Hurula, V., Keranen, M.L., Bergmark, L., Saarinen, A., Haltia, T., Tarvainen, I., Kinnunen, E., Udd, B., Marklund, S.L., 1996. Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain* 119, 1153-1172.
- Andersen, P.M., Nilsson, P., Ala-Hurula, V., Keranen, M.L., Tarvainen, I., Haltia, T., Nilsson, L., Binzer, M., Forsgren, L., Marklund, S.L., 1995. Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 10, 61-66.
- Andersen, P.M., Spitsyn, V.A., Makarov, S.V., Nilsson, L., Kravchuk, O.I., Bychkovskaya, L.S., Marklund, S.L., 2001. The geographical and ethnic distribution of the D90A CuZn-SOD mutation in the Russian Federation. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, 2, 63-69.
- Andrae U., Singh J., Ziegler-Skylakakis K., 1985. Pyruvate and related alpha-ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 28, 93-8.
- Andrus, P.K., Fleck, T.J., Gurney, M.E., Hall, E.D., 1998. Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 71, 2041–2048.
- Ankarcróna, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., Nicotera, P., 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961-973.
- Arundine, M., Tymianski, M., 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell calcium* 34, 325-337.
- Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Giannattasio, S., Marra, E., Passarella, S., 2001. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* 497, 1-5.
- Atlante, A., Gagliardi, S., Minervini, G.M., Marra, E., Passarella, S., Calissano, P., 1996. Rapid uncoupling of oxidative phosphorylation accompanies glutamate toxicity in rat cerebellar granule cells. *Neuroreport* 7, 2519-2523.
- Atsumi, T., 1981. The ultrastructure of intramuscular nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 55, 193–198.
- Aubert, A., Costalat, R., Magistretti, P.J., Pellerin, L., 2005. Brain lactate kinetics: Modeling evidence for neuronal lactate uptake upon activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 16448-16453.
- Barber, S.C., Mead, R.J., Shaw, P.J., 2006. Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 1051–1067.
- Bar-Peled, O., O'Brien, R.J., Morrison, J.H., Rothstein, J.D., 1999. Cultured motor neurons possess calcium-permeable AMPA/kainate receptors. *Neuroreport* 10, 855-859.

- Basso, M., Massignan, T., Samengo, G., Cheroni, C., De Biasi, S., Salmona, M., Bendotti, C., Bonetto, V., 2006. Insoluble mutant SOD1 is partly oligoubiquitinated in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J. Biol. Chem.* 281, 33325-33335.
- Beal, M.F., 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* 31, 119-130.
- Beal, M.F., 1996. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 661-666.
- Beal, M.F., 1998. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 211-223.
- Beal, M.F., Ferrante, R.J., Browne, S.E., Matthews, R.T., Kowall, N.W., Brown, Jr. R.H., 1997. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis, *Ann. Neurol.* 42, 644-654.
- Beal, M.F., Hyman, B.T., Koroshetz, W., 1993. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci.* 16, 125-131.
- Becker, G.L., Fiskum, G., Lehninger, A. L., 1980. Regulation of free Ca^{2+} by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 255, 9009-9012.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., Delumeau, J.C., Bejuit, R., Truffinet, P., Meininger, V., 2002. A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 249, 609-615.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., Meininger, V., 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N. Engl. J. Med.* 330, 585-591.
- Berdichevsky, E., Riveros, N., Sanches-Armass, S., Orrego, F., 1983. Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx onto rat brain cortex cells in vitro, *Neurosci. Lett.* 36, 75-80.
- Bogdanov, M., Brown, R.H., Matson, W., Smart, R., Hayden, D., O'Donnell, H., Beal M.F., Cudkowicz, M., 2000. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radical Biol. Med.* 29, 652-658.
- Boillee, S., Vande Velde, C., Cleveland, D.W., 2006. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52, 39-59.
- Bondy S.C., Lee D.K., 1993. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res.* 610, 229-233.
- Bonnefont-Rousselot, D., Lacomblez, L., Jaudon, M., Lepage, S., Salachas, F., Bensimon, G., Bizard, C., Doppler, V., Delattre, J., Meininger, V., 2000. Blood oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 178, 57-62.
- Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.S., Guarnieri, M., Xu, Z.S., Wong, P.C., Brown, R.H., Jr., Price, D.L., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., 1994. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8292-8296.
- Borthwick, G.M., Johnson, M.A., Ince, P.G., Shaw, P.J., Turnbull, D.M., 1999. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann. Neurol.* 46, 787-790.
- Bouzier-Sore, A.K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.M., Pellerin, L., 2006. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1687-1694.
- Bouzier-Sore, A.K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P.J., Pellerin, L., 2003. Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 1298-1306.
- Bowling, A.C., Barkowski, E.E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P., Horvitz, H.R., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr., 1995. Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 64, 2366-2369.
- Broman, J., Hassel, B., Rinvik, E., Ottersen, O.P., 2000. Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 18: Glutamate. Editors Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. Elsevier Science. Chapter 1, 1-44.
- Brooks, B.R., 2009. Managing amyotrophic lateral sclerosis: slowing disease progression and improving patient quality of life. *Ann. Neurol.* 65 (suppl), S17-S23
- Brown, R.H., Jr., 1995. Superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis: models for gain of function. *Curr. Opin Neurobiol.* 5, 841-846.
- Bruijn, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., Cleveland, D.W., 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18, 327-338.
- Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., Cleveland, D.W., 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281, 1851-1854.
- Bruijn, L.I., Miller, T.M., Cleveland, D.W., 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 723-749.
- Burnashev N., Monyer H., Seeburg P. H. and Sakmann B., 1992a. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8, 189-198.

- Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J.P., Günther, W., Seeburg, P.H., and Sakmann, B., 1992b. Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257, 1415–1419.
- Carr, A., Frei, B., 1999. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological condition? *FASEB J.* 13, 1007–1024.
- Carriedo, S.G., Sensi, S.L., Yin, H.Z., Weiss, J.H., 2000. AMPA exposures induce mitochondrial Ca^{2+} overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci.* 20, 240-250.
- Carriedo, S.G., Yin, H.Z., Lamberta, R., Weiss, J.H., 1995. In vitro kainate injury to large, SMI-32(+) spinal neurons is Ca^{2+} dependent. *Neuroreport* 6, 945-948.
- Carriedo, S.G., Yin, H.Z., Sensi, S.L., Weiss, J.H., 1998. Rapid Ca^{2+} entry through Ca^{2+} -permeable AMPA/Kainate channels triggers marked intracellular Ca^{2+} rises and consequent oxygen radical production. *J. Neurosci.* 18, 7727-7738.
- Carriedo, S.G., Yin, H.Z., Weiss, J.H., 1996. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J. Neurosci.* 16, 4069-4079.
- Casoni, F., Basso, M., Massignan, T., Gianazza, E., Cheroni, C., Salmona, M., Bendotti, C., Bonetto, V., 2005. Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: possible multifunctional role in the pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 16295–16304.
- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de Leon, A., Robinson, K.M., Mason, R.P., Beckman, J.S., Barbeito, L., Radi, R., 2008. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J. Neurosci.* 28, 4115-4122.
- Castilho, R.F., Hansson, O., Ward, M.W., Budd, S.L., Nicholls, D.G., 1998. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 18, 10277-10286.
- Castilho, R.F., Nicholls, D.G., 1999. Oxidative stress, mitochondrial function and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 72, 1394–1401.
- Celio, M.R., 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35, 375-475.
- Chancellor, A.M., Warlow, C.P., 1992. Adult onset motor neuron disease: worldwide mortality, incidence and distribution since 1950. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 55, 1106-1115.
- Chiosa, L., Gane, P., 1956. Action of glutamic acid on the higher nervous activity of small laboratory animals (rats); considerations on the relations between the biochemical substratum and the higher nervous activity. *Rev. Sci. Med.* 1, 165-171.
- Choi, D.W., 1985. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* 58, 293–297.
- Choi, D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7, 369–379.
- Choi, D.W., 1988a. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS* 11, 465–467.
- Choi, D.W., 1988b. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1, 623–634.
- Choi, D.W., 1995. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death, *Trends Neurosci.* 18, 58–60.
- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M.A., Kriegstein, A.R., 1987. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7, 357-368.
- Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boillee, S., Rule, M., McMahon, A.P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R.J., Brown, R.H., Jr., Julien, J.P., Goldstein, L.S., Cleveland, D.W., 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302, 113-117.
- Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 806-819.
- Comi, G.P., Bordoni, A., Salani, S., Franceschina, L., Sciacco, M., Prella, A., Fortunato, F., Zeviani, M., Napoli, L., Bresolin, N., Moggio, M., Ausenda, C.D., Taanman, J.W., Scarlato, G., 1998. Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann. Neurol.* 43, 110–116.
- Corona, J.C., Tapia, R., 2004. AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord in vivo. *J. Neurochem.* 89, 988-997.
- Corona J.C., Tapia, R., 2005. Mecanismos de neurodegeneración. *Mensaje Bioquímico Vol. XXIX*, 17-27.
- Corona, J.C., Tapia, R. 2007. Ca^{2+} -permeable AMPA receptors and intracellular Ca^{2+} determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacology* 52, 1219-1228.
- Corona, J.C., Tapia, R., 2008. Calpain inhibition protects spinal motoneurons from the excitotoxic effects of AMPA in vivo. *Neurochem. Res.* 33, 1428-34.
- Corona, J.C., Tovar-y-Romo, L.B., Tapia, R., 2007. Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets.* 11, 1415-1428.
- Coyle, J.T., Puttfarcken, P.S., 1993. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689-695.

- Crompton, M., Heid, I., 1978. The cycling of calcium, sodium and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 91, 599-608.
- Crow, J.P., Calingasan, N.Y., Chen, J., Hill, J.L., Beal, M.F., 2005. Manganese porphyrin given at symptom onset markedly extends survival of ALS mice. *Ann. Neurol.* 58, 258–265.
- Curtis, D.R., Phillis, J.W., Watkins, J.C., 1960. The chemical excitation of spinal neurons by certain acidic amino acids. *J. Physiol.* 150, 656-682.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology* 65, 1-105.
- Desagher, S., Glowinski, J., Prémont, J., 1997. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J. Neurosci.* 17, 9060-9067.
- Diemel, G.A., Hertz, L., 2001. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J. Neurosci. Res.* 66, 824-838.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7-61.
- Doble, A., 1996. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 47, S233-241.
- Doble, A., 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol. Ther.* 81, 163–221.
- Dringen, R., Wiesinger, H., Hamprecht, B., 1993. Uptake of L-lactate by cultured rat brain neurons. *Neurosci. Lett.* 163, 5-7.
- Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Handran, S.D., Rothman, S.M., Lin, 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.
- Dykens, J., 1997. Mitochondrial free radical production and oxidative pathophysiology: implications for neurodegenerative disease. In: *Mitochondria and Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*. Wiley, New York, 29–51.
- Dykens, J.A., 1994. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : implications for neurodegeneration. *J. Neurochem.* 63, 584-591.
- Echaniz-Laguna, A., Zoll, J., Ribera, F., Tranchant, C., Warter, J.M., Lonsdorfer, J., Lampert, E., 2002. Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients. *Ann. Neurol.* 52, 623–627.
- Eimerl, S., Schramm, M., 1994. The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *J. Neurochem.* 62, 1223-1226.
- Eimerl, S., Schramm, M., 1995. Resuscitation of brain neurons in the presence of Ca^{2+} after toxic NMDA-receptor activity. *J. Neurochem.* 65, 739-743.
- Ferrante, R.J., Browne, S.E., Shinobu, L.A., Bowling, A.C., Baik, M.J., MacGarvey, U., Kowall, N.W., Brown Jr., R.H., Beal, M.F., 1997. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 69, 2064–2074.
- Ferrante, R.J., Shinobu, L.A., Schulz, J.B., Matthews, R.T., Thomas, C.E., Kowall, N.W., Gurney, M.E., Beal, M.F., 1997. Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation, *Ann. Neurol.* 42, 326–334.
- Fillenz, M., 2005. The role of lactate in brain metabolism. *Neurochem. Int.* 47, 413-417.
- Finsterer, J., 2002. Mitochondriopathy as a differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 3, 219–224.
- Finsterer, J., 2003. Mitochondriopathy mimicking amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologist* 9, 45–48.
- Fitzmaurice, P.S., Shaw, I.C., Kleiner, H.E., Miller, R.T., Monks, T.J., Lau, S.S., Mitchell, J.D., Lynch, P.G., 1996. Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 19, 797–798.
- Furuta, A., Rothstein, J.D., Martin, L.J., 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat central nervous system development. *J. Neurosci.* 17, 8363–8375.
- 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.
- 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.
- Gaudette, M., Hirano, M., Siddique, T., 2000. Current status of SOD1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 1, 83-89.
- Greene, J.G., Greenamyre, J.T., 1996. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog. Neurobiol.* 48, 613–621.
- Greig, A., Donevan, S.D., Mujtaba, T.J., Parks, T.N., Rao, M.S., 2000. Characterization of the AMPA-activated receptors present on motoneurons. *J. Neurochem.* 74, 179-191.
- Grosskreutz, J., Haastert, K., Dewil, M., Van Damme, P., Callewaert, G., Robberecht, W., Dengler, R., Van Den Bosch, L., 2007. Role of mitochondria in kainate-induced fast Ca^{2+} transients in cultured spinal motor neurons. *Cell Calcium.* 42, 59-69.
- Gurney, M.E., Cutting, F.B., Zhai, P., Doble, A., Taylor, C.P., Andrus, P.K., Hall, E.D., 1996. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 39, 147–157.

- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R.L., Siddique, T., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.
- Gwag, B.J., Koh, J.Y., Demaro, J.A., Ying, H.S., Jacquin, M., Choi, D.W., 1997. Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. *Neuroscience* 77, 393-401.
- Haces, M.L., Hernández-Fonseca, K., Medina-Campos, O.N., Montiel, T., Pedraza-Chaverri, J., Massieu, L., 2008. Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp. Neurol.* 211, 85-96.
- Harraz, M.M., Marden, J.J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V.S., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., Schoneich, C., Engelhardt, J.F., 2008. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J. Clin. Invest.* 118, 659-670.
- Hassel, B., Dingleline, R., 2006. Glutamate. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, 7th edition. Edited by Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S., Price, D. Elsevier Academic Press. Chapter 15, 267-290.
- Hawkins, R.A., Williamson, D.H., Krebs, H.A., 1971. Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem. J.* 122, 13-18.
- Henneberry, R.C., 1997. Excitotoxicity as a consequence of impairment of energy metabolism: the energy-linked excitotoxic hypothesis. In: *Mitochondria and Free Radicals in Neurodegenerative Disease*, edited by Beal, M.F., Howell, N., Bodis-Wollner, I. New York: Wiley-Liss, vol. 6, 111-143.
- Henneberry, R.C., Novelli, A., Cox, J.A., Lysko, P.G., 1989. Neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons. An hypothesis for cell death in aging and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 568, 225-233.
- Hirano, A., Donnenfeld, H., Sasaki, S., Nakano, I., 1984. Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43, 461-470.
- Hollmann M., Hartley M. and Heinemann S., 1991. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science (New York, N.Y)* 252, 851-853.
- Hollmann, M., Heinemann, S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31-108.
- Huang, J., Agus, D.B., Winfree, C.J., Kiss, S., Mack, W.J., McTaggart, R.A., Choudhri, T.F., Kim, L.J., Mocco, J., Pinsky, D.J., Fox, W.D., Israel, R.J., Boyd, T.A., Golde, D.W., Connolly, E.S. Jr., 2001. Dehydroascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 11720-11724.
- Hugon, J., Vallat J.M., Spencer, P.S., Leboutet, M.J., Barthe, D., 1989. Kainic acid induces early and delayed degenerative neuronal changes in rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 104, 258-262.
- Hume R. I., Dingleline R. and Heinemann S. F., 1991. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science (New York, N.Y)* 253, 1028-1031.
- Ihara, Y., Nobukuni, K., Takata, H., Hayabara, T., 2005. Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu,Zn-superoxide dismutase mutation. *Neurol. Res.* 27, 105-108.
- Ince, P., Stout, N., Shaw, P., Slade, J., Hunziker, W., Heizmann, C.W., Baimbridge, K.G., 1993. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 19, 291-299.
- Ince, P.G., Codd, G.A., 2005. Return of the cycad hypothesis - does the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) of Guam have new implications for global health? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 31, 345-353.
- Izumi, Y., Benz, A.M., Katsuki, H., Zorumski, C.F., 1997. Endogenous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. *J. Neurosci.* 17, 9448-9457.
- Jaarsma, D., Haasdijk, E.D., Grashorn, J.A., Hawkins, R., van Duijn, W., Verspaget, H.W., London, J., Holstege, J.C., 2000. Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol. Dis.* 7, 623-643.
- Jabaudon, D., Scanziani, M., Gahwiler, B.H., Gerber, U., 2000. Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5610-5615.
- Jackson, T.S., Xu, A., Vita, J.A., Keaney, J.F. Jr., 1998. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ. Res.* 83, 916-922.
- Jekabsons, M.B., Nicholls, D.G., 2004. In situ respiration and bioenergetic status of mitochondria in primary cerebellar granule neuronal cultures exposed continuously to glutamate. *J. Biol. Chem.* 279, 32989-33000.
- Jiang, F., DeSilva, S., Turnbull, J., 2000. Beneficial effect of ginseng root in SOD-1 (G93A) transgenic mice. *J. Neurol. Sci.* 180, 52-54.
- Julien, J.P., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis: Unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104, 581-591.

- Jung, C., Rong, Y., Doctrow, S., Baudry, M., Malfroy, B., Xu, Z., 2001. Synthetic superoxide dismutase/catalase mimetics reduce oxidative stress and prolong survival in a mouse amyotrophic lateral sclerosis model. *Neurosci. Lett.* 304, 157–160.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., 2000. Principles of neural science. 4th edition. McGraw-Hill. Chapters 10, 12 and 15.
- Kawahara, Y., Ito, K., Sun, H., Aizawa, H., Kanazawa, I., Kwak, S., 2004. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427, 801.
- Kawahara, Y., Kwak, S., Sun, H., Ito, K., Hashida, H., Aizawa, H., Jeong, S.Y., Kanazawa, I., 2003. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J. Neurochem.* 85, 680-689.
- Kawahara, Y., Sun, H., Ito, K., Hideyama, T., Aoki, M., Sobue, G., Tsuji, S., Kwak, S., 2006. Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci. Res.* 54, 11-14.
- Khodorov, B.I., Fayuk D.A., Koshelev, S.G., Vergun, O.V., Pinelis, V.G., Vinskaya N.P., Storozhevykh, T.P, Arsenyeva, E.N., Khaspekov, L.G., Lyzhin, A.P., 1996. Effect of a prolonged glutamate challenge on plasmalemmal calcium permeability in mammalian central neurones. Mn^{2+} as a tool to study calcium influx pathways. *Int. J. Neurosci.* 88, 215–241.
- Kiaei, M., Kipiani, K., Petri, S., Chen, J., Calingasan, N.Y., Beal, M.F., 2005. Celastrol blocks neuronal cell death and extends life in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener. Dis.* 2, 246–254.
- Kikuchi, H., Almer, G., Yamashita, S., Guegan, C., Nagai, M., Xu, Z., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., 2nd, Przedborski, S., 2006. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6025-6030.
- Kim, E.J., Won, R., Sohn, J.H., Chung, M.A., Nam, T.S., Lee, H.J., Lee, B.H., 2008. Anti-oxidant effect of ascorbic and dehydroascorbic acids in hippocampal slice culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 8-14.
- Kim, H.J., Kim, J.M., Park, J.H., Sung, J.J., Kim, M., Lee, K.W., 2005. Pyruvate protects motor neurons expressing mutant superoxide dismutase 1 against copper toxicity. *Neuroreport* 16, 585-589.
- Kleckner, N.W., Dingledine, R., 1988. Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science.* 241,835-837.
- Klivenyi, P., Ferrante, R.J., Matthews, R.T., Bogdanov, M.B., Klein, A.M., Andreassen, O.A., Mueller, G., Wermer, M., Kaddurah-Daouk, R., Beal, M.F., 1999. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.* 5, 347–350.
- Koh, J.Y., Goldberg, M.P., Hartley, D.M., Choi, D.W., 1990. Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. *J. Neurosci.* 10, 693-705.
- Koh, S.H., Lee, S.M., Kim, H.Y., Lee, K.Y., Lee, Y.J., Kim, H.T., Kim, J., Kim, M.H., Hwang, M.S., Song, C., Yang, K.W., Lee, K.W., Kim, S.H., Kim, O.H., 2006. The effect of epigallocatechin gallate on suppressing disease progression of ALS model mice. *Neurosci. Lett.* 395, 103–107.
- Koike, M., Iino, M., Ozawa, S., 1997. Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 29, 27-36.
- Kok, A.B., 1997. Ascorbate availability and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Med. Hypotheses* 48, 281-296.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J., Vercesi, A.E., 1996. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature or inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 271, 2929-2934.
- Kwak, S., Kawahara, Y., 2005. Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Med.* 83, 110-120.
- Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P.N., Debove, C., Bejuit, R., Truffinet, P., Meininger, V., 2002. Long-term safety of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 3, 23-29.
- Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P.N., Guillet, P., Meininger, V., 1996. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. Lancet* 347, 1425-1431.
- Lafon-Cazal, M., Culcasi, M., Gaven, F., Pietri, S., Bockaert, J., 1993b. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: putative mediators of NMDA-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 32, 1259-1266.
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., Bockaert, J., 1993a. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364, 535-537.
- Lenaz, G., Bovina, C., D'Aurelio, M., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M.L., Giuliano, G., Merlo Pich, M., Paolucci, U., Parenti Castelli, G., Ventura, B., 2002. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 959, 199–213.

- Levy, L.M., Warr, O., Attwell, D., 1998. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J. Neurosci.* 18, 9620–9628.
- Liochev, S.I., Fridovich, I., 2000. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase. *J. Biol. Chem.* 275, 38482–38485.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 330, 613–622.
- Liu, D., Wen, J., Liu, J., Li, L., 1999. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids, *FASEB J.* 13, 2318–2328.
- Liu, R., Althaus, J.S., Ellerbrock, B.R., Becker, D.A., Gurney, M.E., 1998. Enhanced oxygen radical production in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 44, 763–770.
- Longuemare, M.C., Swanson, R.A., 1995. Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake. *J. Neurosci. Res.* 40, 379–386.
- Lucas, D.R., Newhouse, J.P., 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* 58, 193–201.
- MacGregor, D.G., Higgins, M.J., Jones, P.A., Maxwell, W.L., Watson, M.W., Graham, D.I., Stone, T.W., 1996. Ascorbate attenuates the systemic kainate-induced neurotoxicity in the rat hippocampus, *Brain Res.* 727, 133–144.
- Majewska, M.D., Bell, J.A., 1990. Ascorbic acid protects neurons from injury induced by glutamate and NMDA. *NeuroReport* 1, 194–196.
- Majewska, M.D., Bell, J.A., London, E.D., 1990. Regulation of NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate, *Brain Res.* 537, 328–332.
- Manfredi, G., Xu, Z., 2005. Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion* 5, 77–87.
- Massieu, L., Del Río, P., Montiel, T., 2001. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience* 106, 669–677.
- Massieu, L., 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., 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.
- Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S., Yuzaki, M., 2002. Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30, 43–52.
- Matthews, R.T., Yang, L., Browne, S., Baik, M., Beal, M.F., 1998. Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8892–8897.
- Mattson M.P., Lovell, M.A., Furukawa, K., Markesbery, W.R., 1995. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentrations and neurotoxicity, and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 65, 1740–1751.
- 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.
- Meier, T.J., Ho, D., Park, T., Sapolsky, R., 1998. Gene transfer of calbindin D28k cDNA via Herpes simplex virus amplicon vector decreases cytoplasmic calcium ion response and enhances neuronal survival following glutamatergic challenge but not following cyanide. *J. Neurochem.* 71, 1013–1023.
- Mejía-Toiber, J., Montiel, T., Massieu, L., 2006. D-β-Hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition in vivo. *Neurochem. Res.* 31, 1399–1408.
- Menzies, F.M., Ince, P.G., Shaw, P.J., 2002. Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem. Int.* 40, 543–551.
- Milani, D., Guidolin, D., Facci, L., Pozzan, T., Buso, M., Leon, A., Skaper, S.D., 1991. Excitatory amino acid-induced alterations of cytoplasmic free Ca²⁺ in individual cerebellar granule neurons: role in neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 28, 434–441.
- Monje, M.L., Phillips, R., Sapolsky, R., 2001. Calbindin overexpression buffers hippocampal cultures from the energetic impairments caused by glutamate. *Brain Res.* 911, 37–42.
- Mulder, D.W., Kurland, L.T., Offord, K.P., Beard, C.M., 1986. Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 36, 511–517.
- Nagano, S., Fujii, Y., Yamamoto, T., Taniyama, M., Fukada, K., Yanagihara, T., Sakoda, S., 2003. The efficacy of trientine or ascorbate alone compared to that of the combined treatment with these two agents in familial amyotrophic lateral sclerosis model mice. *Exp. Neurol.* 179, 176–180.

- Nakano, Y., Hirayama, K., Terao, K., 1987. Hepatic ultrastructural changes and liver dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 44, 103–106.
- Nicholls, D.G., 1978. The regulation of extra-mitochondrial free Ca^{2+} by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 176, 463-474.
- Nicholls, D.G., 1985. A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog. Brain Res.* 63, 97-106.
- Nicholls, D.G., Budd, S.L., 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80, 315-360.
- Nicholls, D.G., Budd, S.L., Ward, M.W., Castilho, R.F., 1999. Excitotoxicity and mitochondria. In: *Mitochondria in the Life and Death of the Cell*, edited by Brown, G.C., Nicholls, D.G., Cooper, C. London: Portland.
- Nicholls, D.G., Vesce, S., Kirk, L., Chalmers, S., 2003. Interactions between mitochondrial bioenergetics and cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. *Cell Calcium* 34, 407–424.
- Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Yagi, K., 1994. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J. Biol. Chem.* 269, 13685-13688.
- Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., Ichijo, H., 2008. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.* 22, 1451-1464.
- Noh, K.M., Yokota, H., Mashiko, T., Castillo, P.E., Zukin, R.S., Bennett, M.V., 2005. Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 12230-12235.
- Novelli, A., Reilly, J.A., Lysko, P.G., 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.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A., 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465.
- O'Brien, J., Kla, K.M., Hopkins, I.B., Malecki, E.A., McKenna, M.C., 2007. Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. *Neurochem. Res.* 32, 597-607.
- Olney, J.W., 1969. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719–721.
- Olney, J.W., 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. Editors: McGeer, E.G., Olney, J.W., McGeer, P.L. New York: Raven Press, 95-121.
- Olney, J.W., Price, M.T., Samson, L., Labruyere, J., 1986. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 65, 65–71.
- Oteiza, P.I., Uchitel, O.D., Carrasquedo, F., Dubrovski, A.L., Roma, J.C., Fraga, C.G., 1997. Evaluation of antioxidants, protein, and lipid oxidation products in blood from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurochem. Res.* 22, 535-539.
- Owen, O.E., Morgan, A.P., Kemp, H.G., Sullivan, J.M., Herrera, M.G., Cahill Jr., G.F., 1967. Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.* 46, 1589-1595.
- Palecek, J., Lips, M.B., Keller, B.U., 1999. Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *J. Physiol.* 520 Pt 2, 485-502.
- Pasantes, H., Sánchez, J., Tapia, R., 1991. *Neurobiología Celular*. Fondo de Cultura Económica, S.A. de C.V. México. Cap VIII.
- Pellerin L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10625-10629.
- Pereira, C., Ferreira, C., Carvalho, C., Oliveira, C., 1996. Contribution of plasma membrane and endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases to the synaptosomal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase during oxidative stress. *Brain Res.* 713, 269–277.
- Plaitakis, A., Caroscio, J.T., 1987. Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 22, 575-579.
- Poon, H.F., Hensley, K., Thongboonkerd, V., Merchant, M.L., Lynn, B.C., Pierce, W.M., Klein, J.B., Calabrese, V., Butterfield, D.A., 2005. Redox proteomics analysis of oxidatively modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice—A model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biol. Med.* 39, 453–462.
- Prehn, J.H., Lippert, K., Kriegstein, J., 1995. Are NMDA or AMPA/kainate receptor antagonists more efficacious in the delayed treatment of excitotoxic neuronal injury? *Eur. J. Pharmacol.* 292, 179–189.
- Raley-Susman, K.M., Miller, K.R., Owicki, J.C., Sapolsky, R.M., 1992. Effects of excitotoxin exposure on metabolic rate of primary hippocampal cultures: application of silicon microphysiometry to neurobiology. *J. Neurosci.* 12, 773-780.
- Randall, R.D., Thayer, S.A., 1992. Glutamate induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 12, 1882-1895.
- Rao, S.D., Banack, S.A., Cox, P.A., Weiss, J.H., 2006. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Exp. Neurol.* 201, 244-252.

- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr., Scott, R.W., Snider, W.D., 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13, 43-47.
- Reinholz, M.M., Merkle, C.M., Poduslo, J.F., 1999. Therapeutic benefits of putrescine-modified catalase in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 159, 204-216.
- Reynolds, I.J., Hastings, T.G., 1995. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 15, 3318-3327.
- Rice, M.E., 2000. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 23, 209-216.
- Richter, C., Park, J.W., Ames, B.N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6465-6467.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., Rhmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Haplerin, J.J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W.Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R., Brown, R.H. Jr., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62.
- Rossi, C.S., Lehninger, A.L., 1964. Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca²⁺ and phosphate and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 239, 3971-3980.
- Rothman, S.M., 1985. The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* 5, 1483-1489.
- Rothstein, J.D., Kuncl, R.W., 1995. Neuroprotective strategies in a model of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity. *J. Neurochem.* 65, 643-651.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W., 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13, 713-725.
- Rothstein, J.D., Martin, L.J., Kuncl, R.W., 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 326, 1464-1468.
- Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, A., Stauch, B.L., Coyle, J.T., 1990. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 28, 18-25.
- Rowland, L.P., Shneider, N.A., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 344, 1688-1700.
- Ruiz, F., Alvarez, G., Pereira, R., Hernandez, M., Villalba, M., Cruz, F., Cerdan, S., Bogonez, E., Satrustegui, J., 1998. Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *NeuroReport* 9, 1277-1282.
- Ryberg, H., Soderling, A.S., Davidsson, P., Blennow, K., Caidahl, K., Persson, L.I., 2004. Cerebrospinal fluid levels of free 3-nitrotyrosine are not elevated in the majority of patients with amyotrophic lateral sclerosis or Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 45, 57-62.
- Sagun, K.C., Cárcamo, J.M., Golde, D.W., 2005. Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glu1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *FASEB J.* 19, 1657-1667.
- Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S., Tapia, R., 1994. Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of γ -aminobutyric acid. *Neurochem. Int.* 24, 363-368.
- Sasaki, S., Iwata, M., 1996. Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47, 535-540.
- Sasaki, S., Komori, T., Iwata, M., 2000. Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 100, 138-144.
- Sasaki, Y.F., Rothe, T., Premkumar, L.S., Das, S., Cui, J., Talantova, M.V., Wong, H.K., Gong, X., Chan, S.F., Zhang, D., Nakanishi, N., Sucher, N.J., Lipton, S.A., 2002. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J. Neurophysiol.* 87, 2052-2063.
- Saxena, K., Henry, T.R., Solem, L.E., Wallace, K.B., 1995. Enhanced induction of the mitochondrial permeability transition following acute menadione administration. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 79-84.
- Schinder, A.F., Olson, E.C., Spitzer, N.C., Montal, M., 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16, 6125-6133.
- Schmitt, A., Asan, E., Lesch, K.P., Kugler, P., 2002. A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* 109, 45-61.
- Schmitt, A., Asan, E., Puschel, B., Jons, T., Kugler, P., 1996. Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 71, 989-1004.
- Schurr, A., Payne, R.S., Miller, J.J., Rigor, B.M., 1997a. Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an in vitro study. *Brain Res.* 744, 105-111.

- Schurr, A., Payne, R.S., Miller, J.J., Rigor, B.M., 1997b. Brain lactate is an obligatory aerobic energy substrate for functional recovery after hypoxia: further in vitro validation. *J. Neurochem.* 69, 423–426.
- Scott, I.D., Nicholls, D.G., 1980. Energy transduction in intact synaptosomes: influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. *Biochem. J.* 186, 21–33.
- Seeburg, P.H., 1993. The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16, 359–365.
- Shaw, P.J., 1999. Calcium, glutamate, and amyotrophic lateral sclerosis: more evidence but no certainties. *Ann. Neurol.* 46, 803–805.
- Shaw, P.J., 2005. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 1046–1057.
- Shaw, P.J., Forrest, V., Ince, P.G., Richardson, J.P., Wastell, H.J., 1995. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4, 209–216.
- Shaw, P.J., Ince, P.G., Falkous, G., Mantle, D., 1995. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann. Neurol.* 38, 691–695.
- Shaw, P.J., Ince, P.G., Matthews, J.N., Johnson, M., Candy, J.M., 1994. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the spinal cord and motor cortex in motor neuron disease: a quantitative autoradiographic study using [3H]MK-801. *Brain Res.* 637, 297–302.
- Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S., Kobayashi, M., 2001. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res.* 917, 97–104.
- Shin, J.H., Cho, S.I., Lim, H.R., Lee, J.K., Lee, Y.A., Noh, J.S., Joo, I.S., Kim, K.W., Gwag, B.J., 2007. Concurrent administration of Neu2000 and lithium produces marked improvement of motor neuron survival, motor function, and mortality in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Pharmacol.* 71, 965–975.
- Siklos, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R.G., Joo, F., Appel, S.H., 1996. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 39, 203–216.
- Simpson, E.P., Henry, Y.K., Henkel, J.S., Smith, R.G., Appel, S.H., 2004. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 62, 1758–1765.
- Smith, D., Pernet, A., Hallett, W.A., Bingham, E., Marsden, P.K., Amiel, S.A., 2003. Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 23, 658–664.
- Smith, R.G., Henry, Y.K., Mattson, M.P., Appel, S.H., 1998. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 44, 696–699.
- Spector, R., 2009. Nutrient transport systems in brain: 40 years of progress. *J. Neurochem.* 111, 315–320.
- Spector, R., Johanson, C.E., 2006. Micronutrient and urate transport in choroid plexus and kidney: implications for drug therapy. *Pharm. Res.* 23, 2515–2524.
- Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A.C., Ross, S.M., Roy, D.N., Robertson, R.C., 1987. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237, 517–522.
- Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P.F., Le Forestier, N., Marouan, A., Dib, M., Meininger, V., 2002. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J. Neurol. Sci.* 193, 73–78.
- Stamford, J.A., Isaac, D., Hicks, C.A., Ward, M.A., Osborne, D.J., O'Neill, M.J., 1999. Ascorbic acid is neuroprotective against global ischemia in striatum but not hippocampus: histological and voltammetric data. *Brain Res.* 835, 229–240.
- Steele, R.D., Weber, H., Patterson, J.I., 1984. Characterization of α -Ketobutyrate Metabolism in Rat Tissues: Effects of Dietary Protein and Fasting. *J. Nutr.* 114, 701–710.
- Strong, M.J., Kesavapany, S., Pant, H.C., 2005. The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 649–664.
- Swerdlow, R.H., Parks, J.K., Cassarino, D.S., Trimmer, P.A., Miller, S.W., Maguire, D.J., Sheehan, J.P., Maguire, R.S., Pattee, G., Juel, V.C., Phillips, L.H., Tuttle, J.B., Bennett, J.P., Jr., Davis, R.E., Parker, W.D., Jr., 1998. Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 153, 135–142.
- Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Beem, K.M., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 1982. Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* 160, 181–217.
- Takuma, H., Kwak, S., Yoshizawa, T., Kanazawa, I., 1999. Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 46, 806–815.
- 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., 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699–1702.
- Tapia, R., 1998. Cellular and molecular mechanisms of neurodegeneration. *Gac. Méd. Mex.* 134, 685–703.

- Tapia, R., Medina-Ceja, L., Peña, F., 1999. On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem. Int.* 34, 23-31.
- Tenneti, L., D'Emilia, D.M., Troy, C.M., Lipton, S.A., 1998. Role of caspases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J. Neurochem.* 71, 946-959.
- Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Ishizaki, E., Isobe, C., 1999. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 46, 129-131.
- Tomiyama, M., Rodriguez-Puertas, R., Cortes, R., Christnacher, A., Sommer, B., Pazos, A., Palacios, J.M., Mengod, G., 1996. Differential regional distribution of AMPA receptor subunit messenger RNAs in the human spinal cord as visualized by in situ hybridization. *Neuroscience* 75, 901-915.
- Tovar-y-Romo, L.B., Santa-Cruz, L.D., Zepeda, A., Tapia, R., 2009. Chronic elevation of extracellular glutamate due to transport blockade is innocuous for spinal motoneurons in vivo. *Neurochem. Int.* 54, 186-191.
- Tovar-y-Romo, L.B., Tapia, R., 2006. Cerebral neurons of transgenic ALS mice are vulnerable to glutamate release stimulation but not to increased extracellular glutamate due to transport blockade. *Exp. Neurol.* 199, 281-290.
- Tsacopoulos, M., Magistretti, P.J., 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* 16, 877-885.
- Turrens, J. F., Alexandre, A., Lehninger, A. L., 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 237, 408-414.
- Tymianski, M., 1996. Cytosolic calcium concentrations and cell death in vitro. In: *Advances in Neurology: Cellular and Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage*. Editors: Siesjo, B.K., Wieloch, T. Lippincott-Raven, Philadelphia, 85-105.
- Tymianski, M., Charlton, M.P., Carlen, P.L., Tator, C.H., 1993. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J. Neurosci.* 13, 2085-2104.
- Tymianski, M., Tator, C.H., 1996. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 38, 1176-1195.
- Van Damme, P., Van Den Bosch, L., Van Houtte, E., Callewaert, G., Robberecht, W., 2002. GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity. *J. Neurophysiol.* 88, 1279-1287.
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., Robberecht, W., 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762, 1068-1082.
- Van Den Bosch, L., Vandenberghe, W., Klaassen, H., Van Houtte, E., Robberecht, W., 2000. Ca²⁺-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J. Neurol. Sci.* 180, 29-34.
- Vera, J.C., Rivas, C.I., Fischbarg, J., Golde, D.W., 1993. Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* 364, 79-82.
- Vera, J.C., Rivas, C.I., Velásquez, F.V., Zhang, R.H., Concha, I.I., Golde, D.W., 1995. Resolution of the facilitated transport of dehydroascorbic acid from its intracellular accumulation as ascorbic acid. *J. Biol. Chem.* 270, 23706-23712.
- Vielhaber, S., Kunz, D., Winkler, K., Wiedemann, F.R., Kirches, E., Feistner, H., 2000. Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 123, 1339-1348.
- Villalba, M., Martinez-Serrano, A., Gomez-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. Effects on intracellular calcium pools. *J. Biol. Chem.* 269, 2468-2476.
- Virgo, L., Samarasinghe, S., de Belleruche, J., 1996. Analysis of AMPA receptor subunit mRNA expression in control and ALS spinal cord. *Neuroreport* 7, 2507-2511.
- von Lewinski, F., Keller, B.U., 2005. Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci.* 28, 494-500.
- Wang, G.J., Thayer, S.A., 1996. Sequestration of glutamate-induced Ca²⁺ loads by mitochondria in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 76, 1611-1621.
- Wang, X., Perez, E., Liu, R., Yan, L.J., Mallet, R.T., Yang, S.H., 2007. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res.* 1132, 1-9.
- Ward, M.W., Rego, A.C., Frenguelli, B.G., Nicholls, D.G., 2000. Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 20, 7208-7219.
- White, R.J., Reynolds, I.J., 1996. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J. Neurosci.* 15, 5688-5697.
- Wiedemann, F.R., Manfredi, G., Mawrin, C., Beal, M.F., Schon, E.A., 2002. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J. Neurochem.* 80, 616-625.
- Wiedemann, F.R., Winkler, K., Kuznetsov, A.V., Bartels, C., Vielhaber, S., Feistner, H., Kunz, H., 1998. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 156, 65-72.

- Williams, T.L., Day, N.C., Ince, P.G., Kamboj, R.K., Shaw, P.J., 1997. Calcium-permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 42, 200-207.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., Price, D.L., 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14, 1105-1116.
- Wood, J.D., Beaujeux, T.P., Shaw, P.J., 2003. Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 29, 529-545.
- Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E.A., Garcia, M.L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O.R., Cleveland, D.W., Goldstein, L.S., 2008. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 7594-7599.
- Yin, H.Z., Sensi, S.L., Ogoshi, F., Weiss, J.H., 2002. Blockade of Ca²⁺-permeable AMPA/kainate channels decreases oxygen-glucose deprivation-induced Zn²⁺ accumulation and neuronal loss in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 22, 1273-1279.
- Zerangue, N., Kavanaugh, M.P., 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383, 634-637.
- Zhao, Z., Lange, D.J., Voustantiounk, A., MacGrogan, D., Ho, L., Suh, J., Humala, N., Thiyagarajan, M., Wang, J., Pasinetti, G.M., 2006. A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurosci.* 7, 29.
- Zielke, H.R., Zielke, C.L., Baab, P.J., Tildon, J.T., 2007. Effect of fluorocitrate on cerebral oxidation of lactate and glucose in freely moving rats. *J. Neurochem.* 101, 9-16.