

5 . DISCUSSIÓ

5.- DISCUSSIÓ

En el present treball s'ha establert un model d'excitotoxicitat *in vitro* per alliberament de glutamat endogen, basat en la despolarització amb una solució isosmòtica contenint una elevada concentració de potassi extracel·lular ($[K^+]_e$), que produeix l'alliberament de glutamat de les cèl·lules granulars de cerebel. D'altra banda, els resultats obtinguts indiquen que la mort neuronal produïda per veratridina en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, no és deguda a un mecanisme excitotòxic, doncs la mort no es va relacionar amb l'activació del receptor NMDA, ni es va observar un increment de glutamat en el medi que es pogués correlacionar amb la mort neuronal produïda. No obstant, es va demostrar que la veratridina és capaç de produir l'alliberament del neurotransmissor de les cèl·lules en cultiu, ja que quan es van exposar els cultius a veratridina juntament amb un inhibidor de la recaptació de glutamat (L-tPDC) es va observar un increment significatiu de glutamat al medi. El tractament conjunt dels cultius amb veratridina i L-tPDC va produir mort neuronal significativa que no va ser protegida per l'antagonista del receptor NMDA, MK-801. Aquests resultats són coincidents amb els descrits per Ramnath *et al.* (1992) i Dargent *et al.* (1996) en els què la neurotoxicitat produïda per 100 μ M de veratridina durant 1 hora en cultius de neurones corticals i per 100 μ M durant 18 hores en cultius de cèl·lules granulars de cerebel no va ser protegida per antagonistes del receptor NMDA. Schramm *et al.* (1990) reportaren que el MK-801 protegeix els cultius de cèl·lules granulars de cerebel de la toxicitat produïda per 10 μ M de veratridina per 5 minuts, però que a concentracions més elevades de veratridina només va ser parcialment inhibida pel MK-801. En el present treball no es va detectar neurotoxicitat a aquesta concentració de veratridina per a temps curts. Un possible mecanisme pel qual la veratridina podria produir neurotoxicitat seria que l'increment persistent de la concentració de Na^+ intracel·lular disminuiria la capacitat neuronal d'extreure Ca^{2+} a través de l'intercanviador de Na^+/Ca^{2+} produint una desestabilització de l'homeòstasi del Ca^{2+} (Kiedrowski *et al.* 1994; Dargent *et al.* 1996).

L'exposició dels cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel a alta $[K^+]_e$ per 5 minuts, va produir alliberament de glutamat endogen i neurotoxicitat. El fet de què la neurotoxicitat fos previnguda utilitzant antagonistes del receptor NMDA i per eliminació enzimàtica del glutamat alliberat, demostra que el glutamat és l'agent causant de la neurotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$ en aquests cultius. Els resultats reportats per Schramm *et al.* (1990) en els quals el MK-801 protegeix de la mort

neuronal induïda per 90 mM de K^+_e en els mateixos cultius, estarien amb consonància amb els obtinguts en el present treball. Així doncs, s'adoptà aquest sistema com a model *in vitro* d'excitotoxicitat produïda per alliberament de glutamat endogen. Cal tenir en compte que en certes situacions patològiques com la isquèmia o els traumatismes, el K^+ extracel·lular es veu incrementat podent arribar a concentracions de 80 mM o més (Somjen 1979; Hansen 1985; Goodman *et al.* 1999; Reinert *et al.* 2000).

L'alliberament de glutamat produït per l'exposició de 5 minuts a alta $[K^+]_e$ és calci-dependent, ja que l'omissió del calci de la solució o bé l'addició de riluzole van disminuir el glutamat a pràcticament els nivells basals. En canvi, l'inhibidor no-transportable dels transportadors de glutamat, TBOA, no va disminuir el glutamat alliberat, indicant que no hi ha alliberament net per part dels transportadors. La funcionalitat dels transportadors de glutamat es va quantificar també mitjançant la captació de $[^3H]$ -aspartat, resultant aproximadament del 50 % amb 100 mM de K^+ . Aquest fet explica que no hi ha ni alliberament ni captació neta de glutamat a la concentració de 100 mM de K^+ . D'altra banda, el TBOA aplicat amb una concentració de K^+_e de 25 mM, va incrementar el glutamat present al medi, fet que no es va produir amb la $[K^+]_e$ de 5 mM. Això demostra que en les condicions de $[K^+]_e$ de 25 mM s'està produint alliberament i recaptació de glutamat, essent la recaptació del 100 % respecte al control a 5 mM de K^+_e (figura 4.9). Els resultats del present treball concorden amb els obtinguts per Waagepetersen *et al.* (2005) en cultius de cèl·lules granulars de cerebel, segons els quals, amb una despolarització de 55 mM de K^+ , el TBOA incrementa el glutamat present al medi. No obstant, els mateixos autors havien descrit anteriorment que el TBOA disminueix l'alliberament de D- $[^3H]$ aspartat estimulat per 55 mM de K^+_e , en cultius de cèl·lules granulars cerebel (Waagepetersen *et al.* 2001). Aquesta divergència de resultats indicaria que el D- $[^3H]$ aspartat no és transportat (almenys prou eficientment) dins les vesícules glutamatèrgiques. Si fos així, el D- $[^3H]$ aspartat alliberat provindria bàsicament del citosol i podria ser disminuït per TBOA. Aquests treballs juntament amb el present, demostren la importància de mesurar el glutamat endogen quan es realitzen aquests tipus d'estudis.

Dels resultats obtinguts en aquest treball se'n dedueix que la mínima concentració a la qual el glutamat pot produir neurotoxicitat, en condicions de receptor NMDA activat, seria de 2 - 3 μ M. Aquesta concentració està en consonància amb l'afinitat del glutamat pel receptor NMDA (Meldrum 2000); en canvi, és inferior a la concentració

que produeix neurotoxicitat en cultius de cèl·lules granulars de cerebel no exposades a alta $[K^+]_e$ (aproximadament 50 μ M per 24 hores, Griffiths *et al.* 1997). D'altra banda, Goldberg i Choi (1993) descriuen que en cultius neocorticals sotmesos a privació d'oxigen i glucosa es produeix neurotoxicitat dependent de receptor NMDA, la qual es relaciona amb nivells de glutamat extracel·lular mesurats de 2 - 2.5 μ M. Tapia *et al.* (1999) també reporten nivells semblants de glutamat (3 μ M) relacionats amb neurodegeneració en animals en els quals es subministra 4-aminopiridina a través d'una sonda de microdiàlisi. En cultius de cèl·lules granulars de cerebel exposats a glutamat en un medi lliure de Mg^{2+} per 20 minuts, la concentració de 15 μ M de glutamat va produir una disminució de la viabilitat cel·lular del 50 % respecte el control (Pérez-Capote *et al.* 2004). En conjunt aquestes dades suggereixen que la concentració de glutamat neurotòxica en neurones amb manca d'energia cel·lular o que tenen la membrana despolaritzada, seria inferior a la concentració descrita com a neurotòxica en neurones que no es troben en aquestes condicions crítiques. Cal tenir en compte que la despolarització de la membrana plasmàtica, la captació de glutamat i l'estat energètic de la cèl·lula són factors íntimament relacionats (Doble 1999; Tapia *et al.* 1999), així per exemple, una falta d'aportament energètic a la neurona faria que els nivells d'ATP disminuïssin i no es poguessin mantenir els gradients iònics mitjançant la bomba de Na^+/K^+ , fet que duria a què els transportadors de glutamat funcionessin en el sentit d'alliberament de glutamat i a què es produís la despolarització de la membrana cel·lular.

Els cultius neuronals de cerebel estan compostos de més d'un 90 % de cèl·lules granulars de cerebel, i d'aproximadament un 5 % de neurones GABAèrgiques (Currie i Dutton 1980). Certs treballs han descrit una sensibilitat especial de les neurones GABAèrgiques presents en aquests cultius a la neurotoxicitat per àcid kaïníc (Drejer i Schousboe 1989; Damgaard *et al.* 1996) o per canvi de medi (Aloisi *et al.* 1985). En aquest treball es va excloure la possibilitat de què les neurones GABAèrgiques del cultiu fossin més sensibles a l'excitotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$, ja que no hi havia colocalització selectiva del iodur de propidi i de la GAD després del tractament, ni va disminuir el nombre de neurones GAD-positives. El contacte de les cèl·lules GAD-positives va confirmar que els nostres cultius contenen aproximadament un 6 % de neurones GABAèrgiques.

S'ha descrit prèviament que l'exposició dels cultius de cèl·lules granulars de cerebel a alta $[K^+]_e$ produeix un increment en la $[Ca^{2+}]_i$ de manera dependent del calci

extracel·lular i de l'activació del receptor NMDA (Hartley *et al.* 1993; Rosa *et al.* 1997). El present treball també descriu que l'alta $[K^+]_e$ produeix una entrada de clorur en aquestes cèl·lules, d'acord amb el que s'havia descrit anteriorment utilitzant d'altres tipus neuronals (Chow *et al.* 1991; Slemmer *et al.* 2004). Recentment, altres autors han descrit que l'activació dels receptors NMDA i AMPA/KA també produeix una entrada de clorur a les neurones en cultiu, i que aquesta condueix a la mort neuronal (Chen *et al.* 1999; Beck *et al.* 2003; Van Damme *et al.* 2003).

En aquest treball s'obtingué una protecció completa de la mort neuronal induïda per exposició de 5 minuts a alta $[K^+]_e$, tant amb antagonistes del receptor NMDA (MK-801 i AP-5), com amb antagonistes del receptor GABA_A (bicuculina, picrotoxinina i SR 95531). Consistent amb el seu efecte sobre el receptor GABA_A, la picrotoxinina va disminuir el flux de $^{36}Cl^-$ induït per alta $[K^+]_e$. A més, els antagonistes del receptor GABA_A van disminuir el glutamat alliberat al medi d'exposició. Raiteri *et al.* (2001) van descriure que en terminals glutamatèrgiques despolaritzades, l'activació dels receptors GABA_A, produeix l'obertura de canals aniònics sensibles a àcid niflúmic i a NPPB involucrats en un alliberament addicional de glutamat. En el nostre model l'activació dels receptors GABA_A estaria causada pel GABA alliberat de les neurones GABAèrgiques del cultiu com a resposta a l'alta $[K^+]_e$ i/o al glutamat. Els nostres resultats mostren que l'activació dels receptors GABA_A per part del GABA alliberat en els cultius, estaria involucrada en la neurotoxicitat mediada per l'alta $[K^+]_e$. Una prova més de la implicació del GABA en l'excitotoxicitat, és el fet de què els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel cultivats en presència d'àcid kaïníc per a eliminar l'alliberament de GABA, van ser resistents a la neurotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$ i per glutamat exògen, tot i que aquests cultius expressaven receptors NMDA funcionals. La picrotoxinina també va protegir de la mort neuronal induïda per l'exposició de 5 minuts a elevada concentració de glutamat (100 μ M en solució amb 25 mM de K^+). Els resultats d'aquest treball coincideixen amb d'altres treballs indicant un paper clau del GABA en la generació de l'excitotoxicitat (Muir *et al.* 1996; Chen *et al.* 1998; 1999; Van Damme *et al.* 2003). Recentment, Rossi *et al.* (2003) i Chadderton *et al.* (2004) descriueren que el patró de descàrrega de les cèl·lules granulars en el cerebel és controlat per l'activació dels receptors GABA_A. Mentre que l'activació dels receptors GABA_A normalment resulta en una inhibició global, en condicions despolaritzants, com les utilitzades en aquest treball, podria contribuir a incrementar l'excitotoxicitat enlloc d'exercir un efecte protector. Cal tenir en compte que les

concentracions de K^+ i de GABA són elevades en dialitzats cerebrals humans en algunes condicions neuropatològiques (Reinert *et al.* 2000; Hutchinson *et al.* 2002).

Es va provar també, si l'entrada de clorur a les cèl·lules a través de canals no-operats per receptor podia contribuir a l'excitotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$. De tots els bloquejants de canals de clorur assajats, van ser protectors de la neurotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$, l'àcid niflúmic i el NPPB (100 μ M); aquests dos també van disminuir la concentració de glutamat alliberat al medi per sota del llindar definit com a neurotòxic. A l'igual que la picrotoxina, l'àcid niflúmic i el NPPB també van resultar protectors del dany excitotòxic induït per l'exposició de 5 minuts a 100 μ M de glutamat en medi amb 25 mM de K^+ . S'ha descrit que a la concentració utilitzada, l'àcid niflúmic i el NPPB inhibeixen canals de clorur activats per calci (Frings *et al.* 2000; Jentsch *et al.* 2002). No obstant això, no es va observar reducció del flux de $^{36}Cl^-$ estimulat per alta $[K^+]_e$ ni amb l'àcid niflúmic, ni amb el NPPB. Utilitzant tècniques electrofisiològiques Van Damme *et al.* (2003) van descriure que la magnitud dels corrents de Cl^- sensibles a àcid niflúmic i a NPPB en motoneurons eren més petits que aquells que es donaven a través del receptor $GABA_A$. Així doncs, podria ser que la baixa conductància d'aquests canals no en permetés l'anàlisi mitjançant l'assaig de captació de $^{36}Cl^-$. Recentment, s'han descrit dos efectes oposats de l'àcid niflúmic en el control de l'homeòstasi del clorur: una reducció de la $[Cl^-]_i$ en cultius de neurones hipocàmpals (Slemmer *et al.* 2004) i un increment en l'entrada de Cl^- induïda per aspartat a través del transportador neuronal de glutamat EAAT4 (Poulsen i Vandenberg 2001). No es coneix si l'àcid niflúmic podria produir un efecte similar en el transportador neuronal EAAT3 expressat en cèl·lules granulars de cerebel. (Numakawa *et al.* 2001; Fonfría *et al.* 2005). Cal tenir en compte, però, que el transportador EAAT3 presenta una menor conductància pel Cl^- que el EAAT4. Una acció dual similar de l'àcid niflúmic en diferents canals de clorur amb diferent localització cel·lular en les cèl·lules granulars de cerebel també explicaria l'absència de l'efecte observat sobre la captació de $^{36}Cl^-$ induïda per alta $[K^+]_e$. S'han descrit, també, altres dianes d'actuació de l'àcid niflúmic que podrien explicar la protecció exercida per aquest compost sobre l'excitotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$: el receptor NMDA (Lerma i Martin 1992) i el receptor $GABA_A$ (Sinkkonen *et al.* 2003). El possible efecte de l'àcid niflúmic 100 μ M sobre els receptors NMDA i $GABA_A$, en cultius de cèl·lules granulars de cerebel, va ser exclòs en el present treball. D'altre banda també s'ha descrit que l'àcid niflúmic inhibeix l'alliberament de glutamat a través de canals d'anions en sinaptosomes de terminals glutamatèrgiques despolaritzats (Raiteri *et al.*

2001). Així doncs, a desgrat de no haver vist un efecte de l'àcid niflúmic i el NPPB en l'entrada de $^{36}\text{Cl}^-$ induïda per alta $[\text{K}^+]_e$, el fet que aquests compostos exerceixen el mateix efecte protector de l'excitotoxicitat, i que d'altres autors han descrit que aquests dos fàrmacs disminueixen els corrents de Cl^- induïts per AMPA, glutamat i per alta $[\text{K}^+]_e$ (Van Damme *et al.* 2003; Slemmer *et al.* 2004), és consistent amb un efecte sobre el moviment dels ions Cl^- a través de la membrana de les cèl·lules granulars de cerebel.

En el present treball no es va observar efecte protector de l'excitotoxicitat induïda per alta $[\text{K}^+]_e$ amb el bloquejant del cotransportador NKCC, bumetanida. Aquest resultat contrasta amb el reportat per Beck *et al.* (2003), segons el qual la bumetanida protegeix de la neurotoxicitat induïda per glutamat en cultius de neurones corticals. De totes maneres, la utilització d'un model diferent fa difícil la comparació. Finalment, el DIDS (100 μM) va reduir parcialment l'alliberament de glutamat sense protegir les cèl·lules de l'excitotoxicitat. El fet de què ni el DIDS ni el tamoxifèn, a concentracions que bloquegen els canals de Cl^- sensibles a volum (Jentsch *et al.* 2002), no evitessin completament els efectes produïts per l'exposició a alta $[\text{K}^+]_e$ indicaria que l'inflament cel·lular no contribuiria de manera important a l'alliberament de glutamat degut a l'exposició de 5 minuts a alta $[\text{K}^+]_e$ ni a la mort neuronal que se'n deriva. El resultat obtingut en el present treball, coincideix amb el treball reportat per Schousboe *et al.* (1990), que descriu que les cèl·lules granulars de cerebel en cultiu responen a l'inflament produït per alta $[\text{K}^+]_e$ en un medi isosmòtic alliberant taurina com a osmolit, i que en canvi l'alliberament de glutamat com a osmolit és poc important. En el treball de Tuz *et al.* (2004) s'arriba a la mateixa conclusió utilitzant sinaptosomes corticals.

Dels resultats obtinguts en el present treball, proposem un model d'excitotoxicitat (figura 5.1) en el qual la despolarització per alta $[\text{K}^+]_e$ produeix un alliberament de glutamat i de GABA dels cultius, que actuant en els receptors NMDA i GABA_A respectivament, produiran una entrada de Ca^{2+} i de Cl^- a les neurones. En les terminals glutamatèrgiques despolaritzades, el flux de clorur podria activar un alliberament addicional de glutamat a través de canals aniònics sensibles a àcid niflúmic i a NPPB. D'altra banda, la despolarització i l'entrada de calci a través dels receptors NMDA, incrementen la força conductora per l'entrada de Cl^- , i a més l'increment en el calci intracel·lular activaria els canals de clorur sensibles a calci i a àcid niflúmic. Finalment una acció sinèrgica de l'entrada de calci i l'entrada de clorur produiria la mort neuronal.

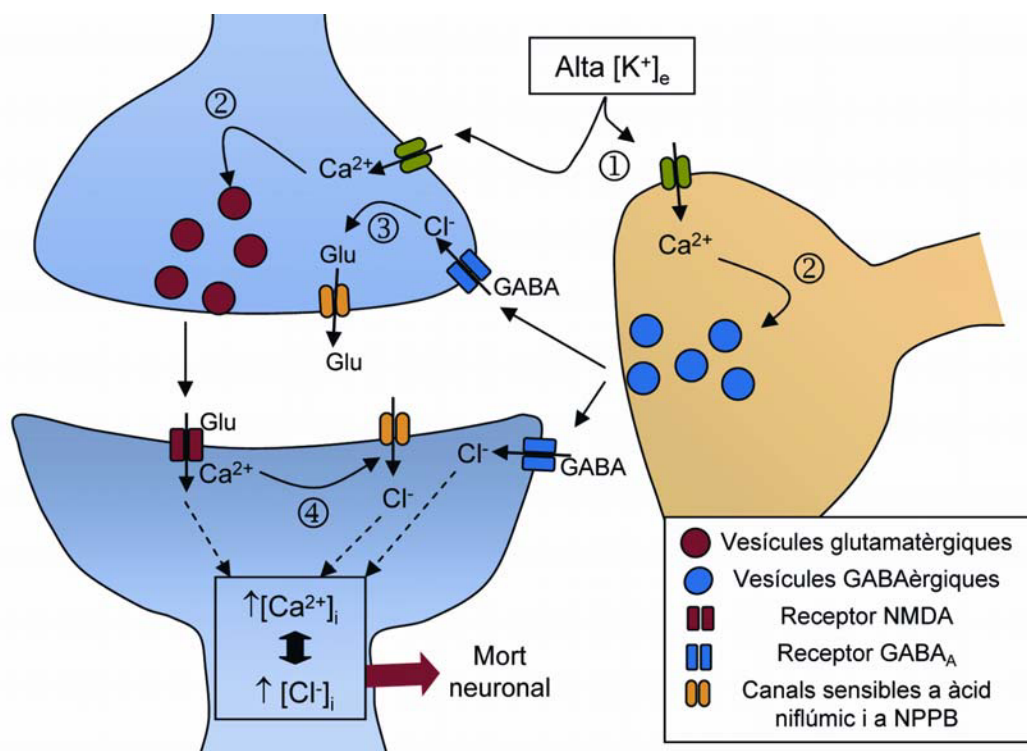


Figura 5.1.- Model d'excitotoxicitat per despolarització per alta $[K^+]_e$ en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. L'alta $[K^+]_e$ produiria la despolarització de les terminals glutamatèrgiques i GABAèrgiques (1) produint l'alliberament del neurotransmissor de manera calci-dependenta (2). L'activació dels receptors NMDA i GABA_A produiria l'entrada de Ca²⁺ i de Cl⁻. L'entrada de Cl⁻ a la terminal glutamatèrgica podria produir un alliberament de glutamat a través de canals sensibles a àcid niflúmic i a NPPB (3). L'entrada de Cl⁻ activaria canals de Cl⁻ activats per calci (4). L'entrada massiva de Ca²⁺ i de Cl⁻ produiria la mort neuronal.

Drejer i Schousboe (1989) van descriure que el tractament crònic dels cultius primaris de neurones de cerebel amb àcid kaínic 50 μ M produïa la mort de les neurones GABAèrgiques en cultiu, podent-se obtenir així un cultiu pur de cèl·lules granulars de cerebel. En el present treball es va utilitzar aquest tractament amb àcid kaínic per a demostrar la implicació del GABA alliberat en el mecanisme excitotòxic. Tal i com es va comprovar, el tractament crònic dels cultius amb àcid kaínic va eliminar completament l'alliberament de GABA induït per alta $[K^+]_e$, aquest tractament però no va fer tenir cap efecte en el nombre de cèl·lules GAD-positives del cultiu. Es va observar, però, un canvi en el marcatge immunofluorescent de la GAD: mentre que els cultius control presentaven una elevada immunofluorescència puntejada en les neurites, els cultius tractats amb àcid kaínic presentaven una menor immunofluorescència en les neurites i aquestes presentaven una aparença llisa. Pels resultats obtinguts en el present treball es podria associar la pèrdua de la

immunofluorescència puntejada de la GAD₆₇ en les neurites de les cèl·lules tractades amb àcid kaínic amb la pèrdua de l'alliberament vesicular de GABA en aquestes condicions. En el treballs de Drejer i Schousboe (1989) i Damgaard *et al.* (1996) es van utilitzar mètodes d'alliberament de neurotransmissor marcats (³H]GABA i ³H]D-aspartat) i autoradiografia per a l'anàlisi de l'efecte de l'àcid kaínic sobre els cultius de cèl·lules granulars de cerebel. En aquests treballs es descrigué que mentre l'alliberament i la captació del ³H]D-aspartat (utilitzat per a marcar la fracció glutamatèrgica) no disminueixen pel tractament amb àcid kaínic, els de ³H]GABA són pràcticament eliminats. Simmons i Dutton (1992) utilitzant immunohistoquímica contra la GAD, reporten que l'àcid kaínic va disminuir en un 80 % la fluorescència associada a la GAD. Amb les imatges que obtingueren aquests últims, però, no podien identificar les neurones individualment i per tant contar-les. Els nostres resultats doncs, no són contradictoris amb els reportats anteriorment, però sí que ho és la conclusió que d'ells se'n deriva. Si bé és cert que desapareix part de la fluorescència associada a la GAD, el nombre de cèl·lules GAD-positives no disminueix. Per tant, si bé les neurones GABAèrgiques perden la capacitat d'alliberar GABA, i possiblement de captar-lo, (fet que explicaria els resultats obtinguts per Drejer i Schousboe (1989) i Damgaard *et al.* (1996)), aquestes no moren. Aquesta conclusió estaria d'acord amb les dades de Kovacs *et al.* (2003) en què descriuen que l'exposició crònica a L-tPDC, no mata a les neurones GABAèrgiques del cultiu de neurones cerebelars, però en canvia el fenotip. S'ha descrit que les cèl·lules granulars de l'hipocamp, considerades glutamatèrgiques, poden induir l'expressió de la GAD₆₇ després de tractaments amb àcid kaínic (Sperk *et al.* 2003). La possibilitat de què les cèl·lules GAD-positives compartissin l'expressió d'un fenotip glutamatèrgic, es va evaluar mitjançant la doble immunocitoquímica de la GAD i del transportador vesicular de glutamat (VGLUT1). Aquest dos marcadors no van presentar colocalització ni en els cultius control ni en els tractats amb àcid kaínic, excloent la possibilitat de què hi hagués expressió de la GAD en neurones glutamatèrgiques.

En el present treball es va plantejar l'estudi de l'efecte de concentracions subcitotòxiques de plaguicides organoclorats sobre els sistemes glutamatèrgic i GABAèrgic dels cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, quan s'incubaven durant un temps perllongat. L'estudi de la persistència d'aquests compostos en el medi de cultiu a 37 °C, va demostrar que només el dieldrín era altament persistent, mentre que el α -endosulfan i el lindà es degradaven ràpidament. L'elevada resistència a la degradació del dieldrín ja havia estat reportada anteriorment (U.S.Department of

health and human services 2002). Aquest fet ha estat el motiu per a classificar el dieldrín dins el Conveni d'Estocolm en l'annex que inclou els productes a ser eliminats. La ràpida degradació dels plaguicides α -endosulfan i lindà en el medi de cultiu, reportada en el present treball, demostra la importància de conèixer l'estabilitat dels compostos objectes d'estudi quan es realitzen estudis toxicològics *in vitro* amb exposicions més o menys perllongades.

El dieldrín bloqueja el flux de clorur a través del receptor GABA_A (Abalis *et al.* 1986; Obata *et al.* 1988; Pomés *et al.* 1993; 1994; Ikeda *et al.* 1998; Vale *et al.* 2003). En el present treball es va definir que l'exposició aguda a dieldrín disminuïa l'alliberament de glutamat i protegia de la mort neuronal induïda per alta $[K^+]_e$ de manera concentració dependent, essent significatiu per a la concentració de 3 μ M. Aquest efecte és consistent amb un antagonisme del receptor GABA_A, ja que segons el descrit per Vale *et al.* (2003) en els mateixos cultius, la concentració de 3 μ M de dieldrín bloquejaria en aproximadament un 75 % el flux de $^{36}\text{Cl}^-$ induït per 100 μ M de GABA.

En cultius exposats a 3 μ M de dieldrín de manera perllongada i posteriorment exposats a alta $[K^+]_e$ per 5 minuts en absència de dieldrín, es va obtenir també un efecte significatiu sobre l'alliberament de glutamat i la neurotoxicitat respecte als cultius control no exposats a dieldrín. En aquest cas, es va demostrar una reducció de la captació màxima de $^{36}\text{Cl}^-$ induïda per GABA del 38.5 % respecte al control. Igualment la unió de $[^{35}\text{S}]\text{TBPS}$ va ser disminuïda un 81 % respecte al control. Aquests fets són compatibles tant amb una inhibició parcial del receptor GABA_A per part del dieldrín com amb una disminució de la població de receptors GABA_A. Cal tenir en compte que amb els rentats previs utilitzats per a fer aquests assaigs pot romandre dieldrín unit a les cèl·lules. Aquest fet també podria explicar la diferència obtinguda entre la inhibició observada utilitzant l'assaig de captació de $^{36}\text{Cl}^-$ i l'assaig d'unió de $[^{35}\text{S}]\text{TBPS}$. Doncs en el primer els rentats són sensiblement més llargs, fet que podria haver desplaçat més dieldrín. Llorens *et al.* (1990) descriuen que l'addició d'albumina de sèrum boví (BSA) en la solució de rentat extreu de manera significativa restes de lindà en homogenats de cervell d'animals tractats amb el plaguicida, que d'altre manera romandrien units. Per altre banda, si bé la regulació a la baixa dels receptors GABA_A es sol donar per exposicions perllongades a agonistes del receptor o a moduladors positius (Maloteaux *et al.* 1987; Mehta i Ticku 1992), no es pot excloure la possibilitat de què la disminució en el flux de $^{36}\text{Cl}^-$ i en la unió de $[^{35}\text{S}]\text{TBPS}$ observada

en aquest treball sigui deguda a aquest fenomen. Ito *et al.* (1989) van descriure que en rates tractades crònicament amb dosis subconvulsivants de picrotoxinina, la B_{max} de la unió de [35 S]TBPS disminueix de manera significativa en membranes rentades del cortex frontal, l'estriat i el cerebel (sense afectar la K_D), mentre que no es veu afectada la unió de [3 H]muscimol ni de [3 H]flunitrazepam. El mateix tractament amb bicucul·lina, però, produeix un increment en la unió de [3 H]muscimol en regions específiques cerebrals, però no canvia la unió de [35 S]TBPS ni de [3 H]flunitrazepam (Ito *et al.* 1988). D'altra banda, Brannen *et al.* (1998) descriuen una reducció en la unió de [35 S]TBPS en membranes rentades del tronc de l'encèfal, però no en d'altres regions cerebrals, d'embrions tractats *in utero* amb dieldrín. Aquesta disminució va acompanyada d'una disminució en el mRNA de la subunitats α_1 , β_3 i γ_1 del receptor GABA_A (Liu *et al.* 1998). La subunitat β uneix el TBPS, per tant la disminució de l'expressió de la subunitat β_3 podria explicar la disminució en la unió de [35 S]TBPS. Així doncs, no es pot descartar la possibilitat de què les disminucions en el flux de $^{36}\text{Cl}^-$ induït per GABA i en la unió de [35 S]TBPS reportades en el present treball, també puguin reflectir canvis en la composició dels receptors GABA_A en resposta al tractament amb dieldrín.

La taula 4.8 resumeix els efectes del dieldrín sobre el flux de clorur induït per GABA, l'alliberament de glutamat i la mort neuronal induïdes per alta $[\text{K}^+]_e$. Tal i com es pot observar, es va obtenir una protecció significativa de la mort neuronal, amb la concentració de 3 μM tant en condicions agudes com en exposicions perllongades. En el cas de l'efecte agut es pot justificar aquesta protecció per la important reducció del flux de clorur a través del receptor GABA_A (Vale *et al.* 2003). Tanmateix, en el cas de l'exposició perllongada, la reducció del flux de $^{36}\text{Cl}^-$ va ser només del 38.5 %. Amb motiu de la diferència obtinguda es va considerar la possibilitat de què l'efecte sobre l'alliberament de glutamat i la mort neuronal per incubació amb alta $[\text{K}^+]_e$ que s'obtenia amb l'exposició perllongada a 3 μM de dieldrín no s'expliqués només per una disminució del flux de clorur a través del receptor GABA_A del 38.5%. Cal tenir en compte que l'exposició aguda dels cultius a 0.3 μM i l'exposició perllongada a 3 μM produeixen una inhibició similar del flux de $^{36}\text{Cl}^-$ induït per GABA (Vale *et al.* 2003 i figura 4.8 del present treball). En canvi, l'exposició aguda a 0.3 μM dieldrín no va disminuir el glutamat alliberat per 100 mM de K^+_e per sota del llindar definit com a neurotòxic ni va protegir de la excitotoxicitat induïda per alta $[\text{K}^+]_e$.

El glutamat i el GABA són, respectivament, els principals neurotransmissors excitador i inhibitori en el sistema nerviós central de mamífers. El correcte balanç entre aquests dos neurotransmissors és important per a regular l'activitat del sistema nerviós. Un desequilibri important d'aquest balanç pot conduir a estats patològics; l'epilèpsia en seria un exemple. S'ha demostrat que l'equilibri entre el glutamat i el GABA està altament regulat, ja sigui a nivell metabòlic (el glutamat és precursor metabòlic del GABA), com a nivell de receptors. Així doncs, havent comprovat que el tractament amb dieldrín no produïa canvis en les concentracions intracel·lulars de glutamat, aspartat i GABA, es va plantejar que les modificacions es podien donar a nivell de receptors de glutamat. L'assaig de la funcionalitat dels receptors NMDA dels cultius després del tractament perllongat amb 3 μM de dieldrín, va demostrar que hi havia una disminució de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ màxima induïda per NMDA. Es va comprovar que aquest no era un efecte directe del dieldrín sobre el receptor NMDA, ja que el mateix assaig realitzat en presència de dieldrín, de manera aguda, no va ser diferent del control. Per a determinar si la menor resposta dels cultius a NMDA era deguda a una presència menor de receptors NMDA, es va utilitzar l'assaig d'unió de $[\text{}^3\text{H}]\text{-MK801}$. La unió màxima de $[\text{}^3\text{H}]\text{-MK801}$ també va ser inferior en els cultius tractats perllongadament amb dieldrín que en els cultius control, indicant una menor presència de receptors NMDA en els cultius tractats. Els resultats del present treball indiquen doncs que, en cultius de cèl·lules granulars de cerebel, la inhibició dels receptors GABA_A per part del dieldrín de 2 a 8-12 dies *in vitro* produeix una regulació a la baixa dels receptors NMDA. Pel que sabem, aquest treball és el primer en descriure una regulació a la baixa del receptor NMDA en resposta a una disminució de la funcionalitat dels receptors GABA_A en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. No obstant, utilitzant diferents models de cultius neuronals, altres autors han descrit que la modificació de l'activitat neuronal durant varis dies pot regular l'expressió, la composició de subunitats i la localització neuronal dels receptors NMDA. Així, el bloqueig de l'activitat neuronal per tetrodotoxina o per antagonistes del receptor NMDA induïx l'acumulació dels receptors NMDA a la sinapsi i incrementa l'amplitud dels petits corrents post-sinàptics excitadors mediat per NMDA (mEPSCs); i al contrari, un increment de l'activitat neuronal produït per antagonistes del receptor GABA_A , disminueix el nombre de receptors NMDA sinàptics i el tamany dels corrents mediat per NMDA. (Rao i Craig 1997; Watt *et al.* 2000; Crump *et al.* 2001; Mu *et al.* 2003). D'altres estudis *in vivo* i *in vitro* han descrit que la inhibició crònica dels receptors NMDA produeix canvis en la composició de subunitats i en la funció dels receptors GABA_A (Wang *et al.* 1998; Matthews *et al.* 2000; Kim *et al.* 2000; Yu *et al.*

2002; Van Sickle *et al.* 2002). Els resultats descrits en el present treball doncs, reforcen la idea de què el balanç entre les entrades excitadores i inhibidores pot regular els receptors NMDA.

Cal tenir present que als 2 dies *in vitro* (dia en què es tracten els cultius amb dieldrín), els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel no són funcionalment madurs. (veure apartat 1.6 de la introducció). Durant el desenvolupament el GABA actua com a factor tròfic, influenciant la proliferació, la migració i la diferenciació neuronal. En els primers estadis del desenvolupament el GABA actua com a aminoàcid excitador (veure apartat 3.2.2 de la introducció). S'ha proposat que la despolarització induïda per GABA juga un paper en l'activació dels receptors NMDA i en la maduració de la neurotransmissió glutamatèrgica (Ben Ari *et al.* 1997; 2002). En cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de rata, s'ha descrit que el canvi de les accions excitadores del GABA, per accions inhibidores es produeix de manera gradual fins als 7 dies *in vitro* (Rego *et al.* 2001), si bé se'n desconeix els curs temporal en cultius obtinguts a partir de cèl·lules de ratolí. Ganguly *et al.* (2001) reporten que el bloqueig crònic dels receptors GABA_A durant el desenvolupament evita el canvi en la resposta del GABA com a aminoàcid inhibidor. No obstant, descriuen que l'increment crònic en la $[K^+]_e$ (10 mM) produeix increments de la $[Ca^{2+}]_i$ en les neurones, fet que estimula el canvi de funció del GABA, inclòs quan els receptors GABA_A estan bloquejats. El fet de què els nostres cultius estan cultivats en presència de 25 mM de K^+ explicaria que tot i el bloqueig de receptor GABA_A per part del dieldrín des dels 2 dies *in vitro*, el GABA actuï produint una entrada de $^{36}Cl^-$ als 8-12 dies, i per tant una acció inhibidora. És difícil concloure, a partir dels nostres resultats, si els canvis produïts en els receptors NMDA podrien estar influenciats per un desenvolupament anòmal. La exposició dels cultius durant 6-10 dies a 3 μM de dieldrín a partir del setè o vuitè dia *in vitro*, ens permetria discernir aquest fet.

Degut a la disminució de receptors NMDA, les cèl·lules tractades de manera prolongada amb dieldrín, permearan menys Ca^{2+} en resposta a glutamat. Possiblement aquesta disminució de l'entrada de calci a la neurona expliqui la protecció observada davant de l'exposició dels cultius a $[K^+]_e$. Altres casos on es produeix una regulació a la baixa dels receptors NMDA en cultius de cèl·lules granulars de cerebel, així ho han reportat. Així per exemple, s'ha descrit que l'exposició dels cultius a NMDA, quan encara no són sensibles a l'excitotoxicitat, produeix una disminució de la captació de $^{45}Ca^{2+}$ en resposta a NMDA, i una posterior

protecció de la mort per excitotoxicitat en resposta al canvi de medi o a NMDA (Oster i Schramm 1993; Resink *et al.* 1996). Cebers *et al.* (1999; 2001) descriuen que el tractament dels cultius de cèl·lules granulars de cerebel amb L-tPDC produeix una acumulació de glutamat en el medi que també produeix una regulació a la baixa del receptor NMDA; en aquest cas, la pèrdua de receptor NMDA també és suficient per a produir la insensibilitat d'aquests cultius a un estímul excitotòxic posterior. En el sentit invers, Crump *et al.* (2001) reportaren que l'increment de receptors NMDA sinàptics produït pel bloqueig crònic de l'activitat, incrementa la susceptibilitat a la mort per excitotoxicitat dels cultius hipocàmpals. Cal tenir en comte, que en el cas presentat en aquest treball, es produeix, de manera paral·lela a la disminució de l'entrada de calci, una disminució de l'entrada de clorur deguda al bloqueig parcial del receptor GABA_A per part del dieldrín. Tal i com s'ha descrit anteriorment, aquest fet també facilitarà un menor alliberament de glutamat i per tant protecció de neurotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$.

Finalment, es va comprovar que la inhibició crònica del receptor GABA_A per part de la microtoxina produïa els mateixos efectes sobre l'alliberament de glutamat i la mort neuronal en resposta a alta $[K^+]_e$ que la incubació crònica amb dieldrín. Aquest fet és indicatiu de què els efectes que produeix l'exposició perllongada a dieldrín són mediatos, almenys en el seu inici, pel bloqueig del receptor GABA_A.

Els resultats del present treball no indiquen que les concentracions baixes de plaguicides organoclorats puguin incrementar la vulnerabilitat de les cèl·lules en cultiu a la mort excitotòxica, ja que en el model d'excitotoxicitat proposat el bloqueig del receptor GABA_A resulta neuroprotector. S'ha reportat un cas similar, en un estudi en el què s'utilitza la deprivació d'oxigen i glucosa per a produir neurotoxicitat en cultius de cèl·lules granulars de cerebel. (Kaasik *et al.* 2001). En aquest treball es demostra que un modulador al·lostèric antagonista del receptor GABA_A, la dehidroepiandrosterona sulfat (Park-Chung *et al.* 1999), protegeix de la neurotoxicitat induïda per deprivació d'oxigen i glucosa, en agut o quan els cultius només es tracten durant les 48 hores anteriors a l'agressió. El mecanisme de protecció seria a través de l'acció inhibidòria de la dehidroepiandrosterona sulfat al receptor GABA_A.

En resum, dels resultats obtinguts en aquest treball se'n dedueix que, en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, el bloqueig del receptor GABA_A de manera perllongada produeix alteracions funcionals en el sistema glutamatèrgic, contribuint a

destacar la importància de l'homeòstasi entre aquests dos sistemes. Cal destacar que la concentració de dieldrín utilitzada en aquest treball és inferior a les concentracions efectives de dieldrín, descrites en la literatura, que medien altres processos de toxicitat cel·lular. Els resultats reportats en aquest estudi sobre els efectes del dieldrín en la neurotransmissió GABAèrgica a concentracions subcitotòxiques, reforcen la idea de què el receptor GABA_A és una diana preferencial de l'acció neurotòxica del plaguicida organoclorat dieldrín.