

1. INTRODUCCIÓ

1.- INTRODUCCIÓ

La neurotoxicologia és l'estudi dels efectes adversos causats per compostos químics sobre el sistema nerviós. Es coneixen centenars de substàncies tòxiques pel sistema nerviós, tant d'origen natural com sintètic, algunes d'elles es coneixen des de l'antiguitat (p.ex. la cicuta i el mercuri) i d'altres són productes arribats amb la industrialització (plaguicides, etc.). Les substàncies capaces de travessar la barrera hematoencefàlica podran afectar el sistema nerviós central. És per això que durant el desenvolupament, quan la barrera hematoencefàlica encara no està ben formada, el sistema nerviós central és especialment vulnerable a l'atac de neurotòxics. Les neurones són cèl·lules especialment vulnerables ja que presenten nombroses dianes per a diferents agents neurotòxics. S'han descrit agents neurotòxics que actuen sobre: la síntesi de proteïnes i l'activitat enzimàtica (plaguicides organofosforats), l'estat energètic de la cèl·lula (MPTP), els canals iònics (tetrodoxina, conotoxines, piretroids, DDT), l'excitosi dels neurotransmissors (toxina botulínica), els receptors de neurotransmissors (hexaclorociclohexans, àcid domoic) o el transport axonal (colquicina), entre d'altres.

Molts agents neurotòxics actuen sobre els sistemes de neurotransmissors. Es pot considerar que un compost és potencialment neurotòxic si: a) redueix o incrementa l'alliberament pre-sinàptic de neurotransmissor, b) altera la concentració o el temps de residència del neurotransmissor en la sinapsi o c) actua com a agonista o antagonista als receptors post-sinàptics (Spencer 2000). Es coneixen productes tòxics per a pràcticament tots els sistemes de neurotransmissors. Així per exemple, els plaguicides organofosforats i alguns agents nerviosos utilitzats com a armes de guerra, inhibeixen l'acetilcolinesterasa, de manera que incrementen l'efecte de l'acetilcolina sobre els seus receptors. La cocaïna inhibeix el transport de catecolamines. El MDMA produeix l'alliberament de serotonina. L'àcid domoic actua com a agonista dels receptors d'àcid kaïníc de glutamat, causant hiperexcitabilitat i excitotoxicitat, i els plaguicides organoclorats de la família dels ciclodienos i del hexaclorociclohexà actuen com a antagonistes del receptor GABA_A, causant també hiperexcitabilitat.

La conseqüència de l'exposició a un agent neurotòxic en la funció neurològica depèn de: la dosi del compost, de la freqüència i la duració de l'exposició, de la diana d'actuació i de la via neuronal afectada. Cal tenir en compte que moltes vegades la

resposta neurotòxica a una dosi elevada i única d'un compost, no prediu l'existència ni el tipus de resposta que es pot produir amb exposicions repetides del mateix compost a dosis més baixes. El sistema nerviós presenta mecanismes adaptatius i compensatoris, de manera que té la capacitat d'emmagatzemar efectes adversos a costa d'una reducció en la capacitat de compensació, sense mostrar una disminució funcional aparent. Així doncs, els efectes de l'exposició a un neurotòxic poden passar inadvertits fins que es produeix una agressió posterior.

Els plaguicides organoclorats són un grup de plaguicides entre els quals hi ha molts agents neurotòxics per a humans. El seu ús va ser molt estès entre els anys 40 i 60, essent molt importants per a l'augment de la producció agrícola de l'època i per a prevenir vectors de malalties com la malària, la incidència de la qual va ser reduïda espectacularment. Aquest fet va motivar que el descobridor de l'efecte plaguicida d'un d'aquests compostos, el 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetà (DDT), fos guardonat amb el premi Nobel l'any 1948. L'any 1962 Rachel Carson publicava el llibre "*Silent spring*", una revisió de la literatura científica on s'advertia del perill per a l'ambient i per als humans de l'ús indiscriminat del DDT i d'altres plaguicides organoclorats. La publicació del llibre va causar l'alarma social i, tot i els esforços de les empreses productores del DDT per a desacreditar-ne l'autora, les evidències científiques reportades van promoure, a la dècada dels 70, l'establiment de les primeres lleis reguladores de l'ús d'aquests plaguicides, ja que quedava demostrat que presentaven una lenta degradació i una elevada bioacumulació. Des dels anys 70 fins a l'actualitat l'ús de la majoria d'aquests plaguicides ha disminuït fins a la desaparició total del seu ús i producció en molts països desenvolupats. Tanmateix, degut a la utilització indiscriminada que se'n va fer i a què encara són utilitzats en països en vies de desenvolupament, a dia d'avui encara se'n troben residus als quals està exposada la població general, sobretot per via alimentària. Així doncs, actualment considerem molts d'aquests plaguicides com a "Contaminants orgànics persistents" (COP). Si bé es coneixen els mecanismes neurotòxics d'aquests plaguicides en dosis agudes, l'efecte de dosis més baixes durant temps perllongats no s'ha descrit de manera clara.

Amb la present tesi es pretén aportar un xic més d'informació dels efectes dels plaguicides organoclorats sobre el sistema nerviós, centrant-nos en els sistemes GABAèrgic i glutamatèrgic.

1.1.- La transmissió de l'impuls nerviós

El sistema nerviós està format per dos tipus principals de cèl·lules: les neurones i les cèl·lules de la glia. Les neurones són les cèl·lules que processen la informació, mentre que les cèl·lules de la glia fan una varietat de funcions com subjecció, nutrició, formació de la mielina, resposta a les lesions o modulació de l'entorn per captació de neurotransmissors i ions.

Cada neurona estableix centenars de connexions especialitzades amb d'altres neurones (sinapsis). El procés de transmissió de la informació d'una neurona a una altre es produeix per dos possibles processos: la neurotransmissió química i l'elèctrica. En les sinapsis elèctriques les membranes de dues neurones adjacents estan unides físicament mitjançant hemicanals. La unió dels citoplasmes de les dues cèl·lules permet una transmissió molt ràpida. La major part de les senyals entre neurones es produeixen, però, per neurotransmissió química, en la què un impuls elèctric produeix l'alliberament de neurotransmissor de la neurona presinàptica, que s'unirà a receptors específics en la neurona postsinàptica.

Les neurones són cèl·lules excitables, tenen dos tipus de canals per a les senyals: a) els canals de repòs, que generen el potencial de repòs i b) els canals sensibles a voltatge, que són els responsables dels corrents actius que generen el potencial d'acció. La majoria de neurones en repòs tenen un potencial de membrana entre - 60 i - 70 mV que ve donat per una distribució desigual de càrregues entre l'interior i l'exterior de la cèl·lula. En la taula següent es mostren les concentracions intracel·lulars i extracel·lulars dels principals ions en neurones de mamífer.

| | Concentració (mM) | |
|-----------------|-------------------|----------------|
| | Intracel·lular | Extracel·lular |
| K ⁺ | 140 | 5 |
| Na ⁺ | 5-15 | 145 |
| Cl ⁻ | 4-30 | 110 |

Taula 1.1.- Concentracions dels principals ions en neurones de mamífer. Extret de Purves et al. (2001).

El potencial de repòs de la membrana (V_m) és proper al potencial d'equilibri del potassi (E_K), el que significa que en una cèl·lula en repòs el potassi és l'espècie iònica amb permeabilitat més alta. La membrana també és permeable al Na^+ , de manera que l'entrada de Na^+ fa que el K^+ no estigui exactament en el seu potencial d'equilibri i que, per tant, tingui tendència a sortir fora de la cèl·lula. Aquests dos fluxos passius es contraresten pel flux actiu que dóna la bomba de Na^+/K^+ (Koester i Siegelbaum 2000).

Els senyals que fan el potencial de membrana més positiu es diu que despolaritzen i els que el fan més negatiu hiperpolaritzen. El potencial d'acció comença al donar-se un estímul despolaritzant que provoca l'obertura de canals de Na^+ . El Na^+ entra a la cèl·lula a favor de gradient, fet que provoca una despolarització total de la membrana. Posteriorment, els canals de K^+ sensibles a voltatge s'obren, de manera que el K^+ surt de la neurona i repolaritza la membrana. La bomba de Na^+/K^+ extreu Na^+ a l'exterior i entra K^+ per regenerar el gradient. Durant la despolarització de la membrana de la terminal s'obren els canals de calci dependents de voltatge, fet que provoca una entrada de calci a la terminal que promourà l'anclatge de les vesícules sinàptiques a la membrana i acabarà amb l'alliberament del neurotransmissor de dins les vesícules sinàptiques. El neurotransmissor alliberat s'unirà, de manera reversible, a receptors de la membrana postsinàptica. Depenent del tipus de receptor es donarà directament un canvi en la permeabilitat de la membrana postsinàptica (receptors ionotòpics) o es desencadenarà una cascada de senyalització intracel·lular (receptors metabotòpics). El neurotransmissor alliberat a la sinapsi és ràpidament eliminat per inactivació a través d'enzims específics, o per recaptació a la terminal presinàptica i a les cèl·lules de la glia.

En el present treball s'han utilitzat dos agents que produeixen la despolarització de la membrana neuronal: la veratridina que produeix l'obertura de canals de Na^+ dependents de voltatge i inhibeix la seva inactivació (Meder *et al.* 1997), i un increment en la concentració de K^+ extracel·lular, que produeix una entrada de K^+ a l'interior de la cèl·lula.

1.2.-La distribució de l'ió clorur

L'ió clorur és el principal anió del fluid extracel·lular. En moltes cèl·lules es distribueix de manera passiva a través de la membrana, de manera que està en equilibri ($E_{Cl} =$

V_m). Aquest fet va fer que no es parés massa atenció als efectes d'aquest anió fins als anys 70. Avui en canvi, sabem que el Cl^- és l'anió predominant que condueix el corrent a través dels canals de la membrana neuronal operats pels neurotransmissors inhibidors (GABA i glicina). En la majoria de neurones, el potencial d'equilibri del Cl^- (E_{Cl}) és de -75 mV , poc més hiperpolaritzat que el potencial de membrana en repòs (-65 mV). Aquest fet evidencia que en neurones existeixen mecanismes de transport actiu per a l'ió Cl^- . La majoria d'aquests mecanismes són sistemes de transport actiu secundaris, és a dir que utilitzen el gradient existent d'un ió conductor per a moure en contra de gradient l'ió Cl^- . En l'esquema següent es representen els mecanismes de transport per a l'ió clorur que es coneixen en neurones.

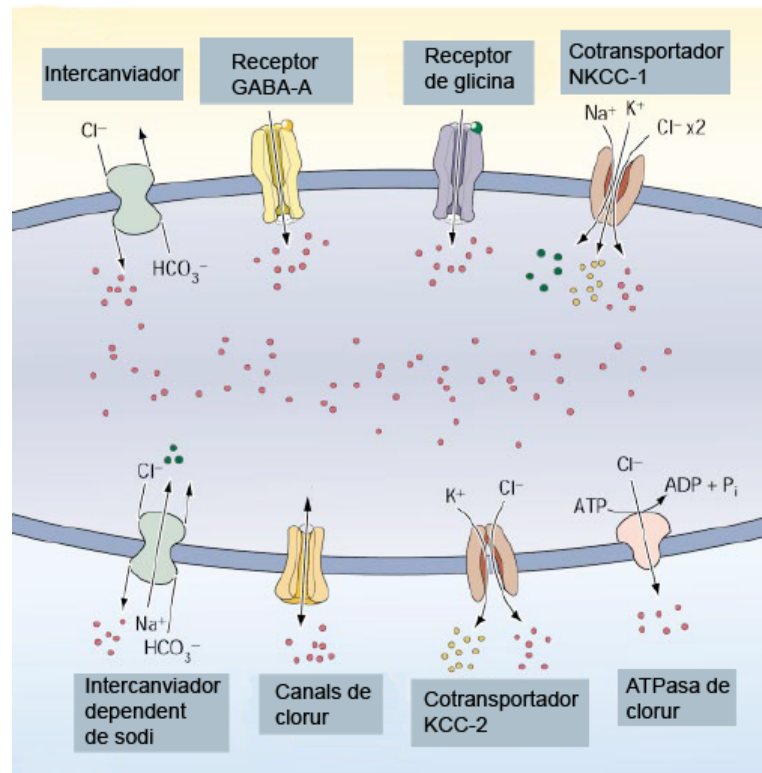


Figura 1.1.- Canals i transportadors implicats en el moviment de Cl^- en neurones. Modificada de Schwartz-Bloom i Sah (2001).

A més dels sistemes de transport actiu s'han descrit, en diversos tipus neuronals, canals de Cl^- regulats per:

- a) Unió de lligand: són els receptors GABA_A i els receptors de glicina.
- b) Voltatge i increment del volum cel·lular (KCC-2): s'activen per hiperpolarització, increment del volum cel·lular i per acidificació del medi extracel·lular. La seva activació deguda a un increment de la $[\text{Cl}^-]_i$ podria ser

important per a prevenir un cúmul de clorur intracel·lular que es donaria durant l'activitat neuronal intensa. Cal tenir en compte que un increment important de la $[Cl^-]_i$ faria que el GABA tingués accions excitadores (veure més endavant). De totes maneres, els animals *knock-out* presenten degeneració dels testicles i de la retina però no presenten una vulnerabilitat especial als agents convulsionants, tal i com seria d'esperar.

c) Increment del volum cel·lular: estarien implicats en els processos de regulació del volum cel·lular (RVD; *regulatory volume decrease*) activant-se quan es produeix un inflament, i sembla que a part de ser permeables al Cl^- també ho serien a osmolits orgànics com la taurina o el glutamat, és per això que també se'ls ha anomenat canals d'osmolits i anions estimulats per volum (VSOAC's, *volume-stimulated osmolyte and anion channel*). La seva activació depèn de la presència d' ATP intracel·lular, tot i que no és necessària la seva hidròlisi. Tot i que el CIC-2 també està activat per inflament s'identifiquen clarament separats un de l'altre ja que presenten conductàncies diferents.

d) Calci intracel·lular: s'activen per increments en la $[Ca^{2+}]_i$. Segurament tenen la funció de regular l'excitabilitat neuronal.

Els dos últims tipus d'aquests canals corresponen a canals que encara no han estat clonats, i per tant la informació que se'n té és molt més limitada (veure Jentsch *et al.* 2002 per a revisió).

En quan a la farmacologia dels canals i transportadors de clorur cal dir que la majoria de bloquejants tenen potències baixes i són molt poc selectius, alguns tenen efectes també sobre cascades de senyalització intracel·lular. El quadre següent mostra un resum de la farmacologia d'aquests canals i transportadors.

Introducció

| | CIC-2 | Cl (volum) | Cl (Ca ²⁺) | NKCC1 | KCC2 | ATPasa |
|-------------------|-------|------------|------------------------|-------|------|--------|
| DIDS | 0 | + | 0 | | 0 | |
| Àcid niflúmic | | 0 | + | | | |
| NPPB | | + | + | | | |
| Tamoxifèn | | ++ | | | | |
| Àcid 9-antranílic | 0 | 0 | 0 | | | |
| Bumetanida | | | | ++ | + | |
| Furosemida | | | | + | + | |
| Àcid etacrínic | | | | | | 0 |

Taula 1.2.- Farmacologia dels canals i transportadors de clorur. ++: $IC_{50} \leq 5 \mu M$; +: $5 \mu M < IC_{50} \leq 100 \mu M$; 0: $100 \mu M < IC_{50} \leq 2 mM$. (Kaila 1994; Payne 1997; Jentsch et al. 2002; Payne et al. 2003) DIDS: àcid 4,4'-diisotiocianat-estilbè-2,2'-disulfònic; NPPB: àcid 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoic.

1.3.- La neurotransmissió per aminoàcids

1.3.1.- La neurotransmissió excitadora: sistema glutamatèrgic

1.3.1.1.- El glutamat com a neurotransmissor: Síntesi, metabolisme, alliberament i recaptació

El glutamat és un aminoàcid no essencial implicat en el metabolisme cel·lular general. En les dècades dels 1950 i 1960 es va establir que el glutamat tenia una acció excitadora en el cervell i la medul·la espinal dels vertebrats. Actualment sabem que el glutamat és el principal neurotransmissor excitador del sistema nerviós central, essent responsable d'una tercera part de la neurotransmissió sinàptica excitadora. El sistema glutamatèrgic està implicat en la plasticitat neuronal i en processos patològics com són l'epilèpsia, el dany isquèmic, l'esquizofrènia o la mort neuronal per excitotoxicitat.

La majoria del glutamat que es troba en el cervell prové de la síntesi local a partir de glutamina i d'intermediaris del cicle de Krebs (α -cetoglutarat) (figura 1.2). No tot el glutamat que es sintetitza serveix com a neurotransmissor sinó que pot retornar al cicle de Krebs o servir com a intermediari per a la síntesi d'altres molècules. Només un 20% del glutamat que es troba al sistema nerviós central tindria funció

neurotransmissora. El glutamat amb funció de neurotransmissor és emmagatzemat en vesícules sinàptiques mitjançant els transportadors vesiculars de glutamat (VGLUT1, VGLUT2 i VGLUT3), aquest serà alliberat de manera calci-dependent en resposta a un estímul despolaritzant. Cal tenir en compte que degut a l'elevada concentració de glutamat no encapsulat en vesícules, es pot donar un alliberament de glutamat a través de canals sensibles a volum (VSOAC's) o a través del funcionament revers dels transportadors de membrana, com es descriu més endavant (Nedergaard *et al.* 2002).

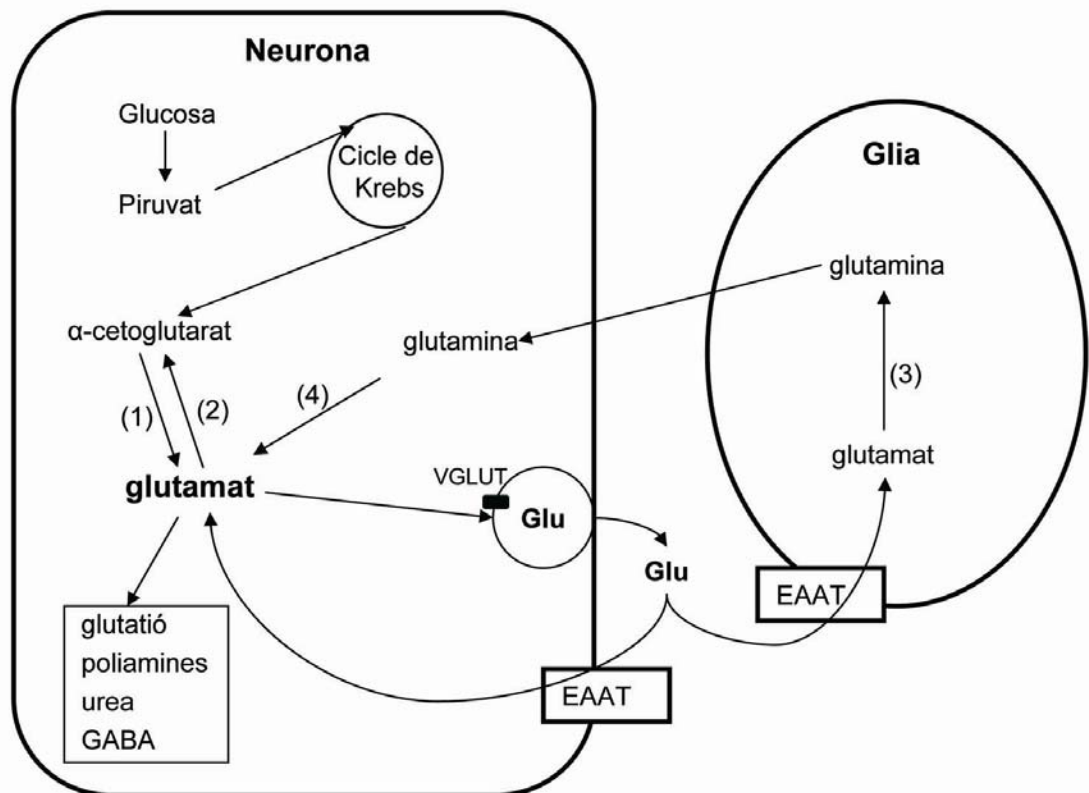


Figura 1.2.- Esquema de les vies metabòliques implicades en la síntesi i degradació de glutamat. VGLUT: transportador vesicular de glutamat, EAAT: transportador d'aminoàcids excitadors. Enzims implicats: glutamat deshidrogenasa (1), aspartat aminotransferasa (2), glutamina sintetasa (3), glutaminasa (4)

El glutamat alliberat en l'espai sinàptic és recaptat per transportadors específics, anomenats transportadors de glutamat dependents de sodi d'alta afinitat o transportadors d'aminoàcids excitadors (EAAT's) (per a revisió veure Danbolt 2001, Gadea i López-Colomé 2001a, Schousboe *et al.* 2004). Aquests catalitzen el transport de L-glutamat utilitzant el gradient de Na^+ i K^+ existent a través de la membrana

plasmàtica. Són també capaços de transportar L- i D-aspartat (d'aquí el seu nom de transportadors d'aminoàcids excitadors). Degut a què aquests transportadors capten el glutamat utilitzant el gradient de Na^+ i K^+ existent a través de la membrana, dissipacions del gradient produiran disminució del transport, podent fins i tot revertir-lo en el sentit d'alliberació de glutamat citoplasmàtic a l'espai extracel·lular. S'ha descrit que en situacions de privació d'oxigen i glucosa, en què el gradient de Na^+ i K^+ no pot ser mantingut per la cèl·lula, hi hauria alliberament de glutamat per funcionament revers dels transportadors (Jabaudon *et al.* 2000; Rossi *et al.* 2000).

Fins ara, s'han clonat 5 transportadors de glutamat dependents de sodi d'alta afinitat: EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 i EAAT5. L'existència dels acrònims GLAST (transportador de glutamat i aspartat), GLT-1 (transportador de glutamat 1) i EAAC1 (transportador d'aminoàcids excitadors 1), és deguda a què els tres es van clonar el mateix any i en conseqüència no es va poder adoptar una nomenclatura coordinada. Tots aquests transportadors són proteïnes d'una mateixa família i no tenen una homologia significant amb els transportadors de neurotransmissors acoblats a Na^+ i Cl^- . Els transportadors EAAT1 i EAAT2 estan expressats quasi exclusivament en cèl·lules de la glia. El transportador EAAT3 està expressat majoritàriament en neurones, localitzant-se en el soma i la membrana perisinàptica de les dendrites. També s'ha descrit la seva presència en astròcits i oligodendròcits d'algunes regions cerebrals. Els transportadors EAAT4 i EAAT5 estan expressats en les neurones purkinje cerebel·lars i en les cèl·lules de Müller de la retina, respectivament. Els transportadors gials són quantitativament els més importants i serien els responsables de la finalització de la neurotransmissió glutamatèrgica en el sistema nerviós central. S'ha demostrat que, en rates amb l'expressió dels transportadors gials disminuïda es produeix neurodegeneració i posterior paràlisi (Rothstein *et al.* 1996). La funció dels transportadors neuronals no és molt clara. Així, Rothstein *et al.* (1996) reportaren que la disminució de l'expressió del transportador EAAC1 mitjançant oligonucleòtids antisentit produeix neurotoxicitat lleugera i epilèpsia en rates. En canvi, el ratolí *knock-out* pel EAAC1 (*eaac-1^{-/-}*) presenta una activitat locomotora espontània reduïda, però no neurodegeneració ni epilèpsia (Peghini *et al.* 1997). Finalment, certs estudis en còrtex i en cerebel han demostrat que els 5 subtipus de transportadors de glutamat porten associada una conductància per a l'ió Cl^- , si bé aquesta no estaria acoblada termodinàmicament de manera directa al transport de glutamat. Aquesta conductància per a l'ió clorur seria quantitativament important en el cas del EAAT4 i EAAT5.

Existeixen diversos inhibidors dels transportadors de glutamat, molts d'ells són inhibidors competitiu i transportables i la majoria causen alliberament de glutamat per intercanvi. Un exemple d'aquests és l'àcid L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxílic (L-tPDC), que és substrat pels transportadors EAAT1-3. Existeixen però també inhibidors competitiu no transportables com el DL-treo-β-benziloxiaspartat (TBOA), que tindran capacitat d'inhibir el transport tant en el sentit de captació de glutamat com en sentit invers (Jabaudon *et al.* 2000; Waagepetersen *et al.* 2001).

1.3.1.2.- Receptors de glutamat

Existeixen 6 classes funcionals de receptors de glutamat, tres d'ells són receptors ionotròpics (canals iònics) i tres són receptors metabotròpics (acoblat a proteïna G). S'han identificat 27 gens diferents que codifiquen per subunitats de receptors de glutamat, a més existeixen variants de *splicing* i modificacions post-transcripcionals, el que fa que existeixi una gran diversitat molecular de receptors de glutamat (taula 1.3).

| | | Subtipus de receptors de glutamat | | | | | |
|--------------------|--|-----------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|--|
| | | Ionotròpics | | | Metabotròpics | | |
| Classes funcionals | | NMDA | AMPA | KA | Grup I | Grup II | Grup III |
| Gens | | NR1 (a-g) NR2A-D NR3A-B | GluR1-4 (GluRA-d) | GluR5-7 KA1 KA2 | mGlu1a-d mGlu5a, b | mGlu2 mGlu3 | mGlu4a, b mGlu6 mGlu7a, b mGlu8a, b |

Taula 1.3.- Classificació dels diferents subtipus de receptors de glutamat. (De Artigas i Suñol 2005).

Els receptors ionotròpics AMPA i KA i els receptors metabotròpics de glutamat s'han localitzat també en astròcits. Aquests presenten les mateixes propietats generals que aquells localitzats en neurones a excepció dels receptors AMPA que presenten una major permeabilitat pel Ca^{2+} . S'ha descrit que els astròcits responen al glutamat amb increments de Ca^{2+} intracel·lular que es propaguen a través del sinciti d'astròcits. La funció d'aquestes onades de Ca^{2+} seria, segurament, la de modular l'homeòstasi extracel·lular de manera coordinada i afectar per tant la fisiologia i l'excitabilitat

neuronal. (Hansson *et al.* 2000; Carmignoto 2000) A més, els astròcits poden alliberar glutamat a través de la funció reversa dels transportadors, a través de canals activats per inflament cel·lular i de manera calci-dependent (Nedergaard *et al.* 2002; Bezzi *et al.* 2004).

1.3.1.2.1.- Receptors metabotrópics

Els receptors metabotrópics de glutamat comparteixen la morfologia molecular amb d'altres receptors metabotrópics units a proteïna G, tenen estructura de 7 dominis transmembrana amb l'extrem N-terminal extracel·lular i el C-terminal intracel·lular. Els receptors del grup I activen la fosfolipasa C, produint diacilglicerol i inositol trifosfat com a missatgers secundaris i conseqüentment provoquen un increment del Ca^{2+} intracel·lular i de l'activitat metabòlica i elèctrica. Els del grup II i III estan negativament acoblats a la adenilat ciclasa, produint una inhibició de l'activitat metabòlica i d'alliberament de neurotransmissors. Els del grup II i III actuen com a autoreceptors i heteroreceptors inhibidors. Funcionalment estan implicats en la neurotransmissió excitadora ràpida així com també en la regulació de l'excitabilitat neuronal, inhibició presinàptica i plasticitat sinàptica.

1.3.1.2.2.- Receptors ionotrópics.

1.3.1.2.2.1.- Receptors AMPA (Àcid 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolil)-propionic) i KA (kainat)

Són els que es coneixien anteriorment com a receptors no-NMDA, degut a què es definien com a llocs no sensibles als antagonistes selectius dels receptors NMDA. Posteriorment, la biologia molecular va permetre distingir-los entre ells com a dos entitats diferents. Els dos posseeixen característiques similars, són canals catiónics permeables al Na^+ i presenten característiques d'excitació ràpida. Generalment són impermeables al Ca^{2+} a excepció d'aquells receptors AMPA que no tenen subunitat GluR2 i que són de 3 a 5 vegades més permeables al Ca^{2+} que als ions monovalents. Els receptors AMPA tenen menys afinitat pel glutamat que els de NMDA (EC_{50} de 200-500 μM i 2.5-3 μM respectivament) però la seva cinètica d'activació és més ràpida i són els responsables de la fase inicial dels potencials post-sinàptics excitadors. El receptor AMPA és una estructura pentamèrica formada per 5 subunitats, localitzada principalment post-sinàpticament. El receptor KA no està tant ben caracteritzat com

l'AMPA, probablement també és una estructura pentamèrica situada tant pre-sinàpticament com post-sinàpticament. Hi ha evidències de què els receptors KA regulen l'alliberament de neurotransmissor tant en terminals excitadores com inhibidores (Lerma 2003).

Els receptors AMPA i KA no es van poder diferenciar farmacològicament de manera clara fins a la dècada dels 90. El primer agonista amb una activitat potent sobre els receptors AMPA fou el compost natural àcid quìsqualic. Posteriorment es va sintetitzar l'AMPA, el qual també activa a alguns subtipus de receptors de KA. Els compostos naturals àcid kaínic i àcid domoic són agonistes dels receptors KA i AMPA, amb la particularitat de què no produeixen desensibilització dels receptors AMPA. Tant l'àcid kaínic com el domoic són neurotoxines molt potents. El compost 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) va ser el primer antagonista potent dels receptors AMPA/KA descobert, aquest però és poc selectiu, actuant també sobre els receptors de NMDA. L'antagonista 1,2,3,4-tetrahidro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxalina-7-sulfona- mida (NBQX) sintetitzat posteriorment és més selectiu. Paternain *et al.* (1995) van demostrar que les 2-3-benzodiazepines, GYKI52466 i GYKI53655, són antagonistes dels receptors AMPA sense tenir efecte sobre els receptors KA. El fet de què nombroses evidències experimentals confereixen un rol als receptors AMPA i en menor nombre als KA en l'epilèpsia està incentivant el desenvolupament de nombrosos antagonistes d'aquests receptors (per a revisió veure Madsen *et al.* 2001).

1.3.1.2.2.2.- Receptor NMDA (àcid N-metil-D-aspàrtic)

Els receptors NMDA són altament permeables al Ca^{2+} . Tenen a més del lloc d'unió del glutamat, un lloc d'unió per a la glicina que actua com a coagonista. En condicions de repòs (potencial de membrana de aproximadament -70 mV) el receptor està bloquejat per l'ió Mg^{2+} , que es situa a dins el canal. Aquest bloqueig del Mg^{2+} és dependent de voltatge. Així, quan la membrana es despolaritza (essencialment per l'activació dels receptors AMPA) el Mg^{2+} perd afinitat pel seu lloc d'unió i el canal permea Ca^{2+} . A més, el receptor NMDA està fortament regulat per lligands endògens que influeixen en la probabilitat d'obertura del receptor. Presenta un lloc d'unió de poliamines, que són moduladors positius, i llocs per Zn^{2+} i H^+ que inhibeixen el flux de Ca^{2+} . Existeix també regulació redox. Els agents reductors com el ditiotreitòl (DTT)

potencien les respostes del receptor NMDA i els agents oxidants resulten inhibidors. En la figura 1.3 es mostra un esquema del receptor amb els seus llocs d'unió.

Fins ara s'han identificat 3 famílies de subunitats de receptors NMDA. Una composta per un sol gen, el NR1, i les altres per varis (NR2A-D, NR3A-B). Sembla que els receptors NMDA serien estructures heteromèriques on sempre hi hauria una subunitat imprescindible, la NR1. L'estequiometria de les diferents subunitats no es coneix. Tot i que els homodímers de la subunitat NR1 són capaços de formar canals funcionals quan s'injecta el cDNA en oòcits de *Xenopus*, això no és donaria en cèl·lules de mamífers (Sucher *et al.* 1996). L'expressió de la subunitat NR1 és pràcticament ubiqua al sistema nerviós central, en canvi els diferents gens NR2 tenen diferents patrons d'expressió. Així per exemple, en el cervell de rata adulta, la subunitat NR2A s'expressa majoritàriament en l'escorça cerebral i en l'hipocamp, mentre que la subunitat NR2B s'expressa exclusivament en el prosencèfal. Al cerebel hi predominaria l'expressió de NR2C, que en canvi és molt baixa a la resta de regions. La subunitat NR2D es trobaria majoritàriament en diencèfal i en regions del baix tronc de l'encèfal. L'expressió de NR3A es dona en totes les regions excepte en el cerebel (Nakanishi 1992). Els animals neonats presenten un patró d'expressió de les subunitats NR2 diferent als adults. Així doncs, les diferències anatòmiques i funcionals de les diferents subunitats NR2 serien la base molecular que explicaria l'heterogeneïtat de respostes fisiològiques i farmacològiques dels receptors NMDA. Per exemple, els receptors expressats en el cerebel (NR1/NR2C) tenen més afinitat pels agonistes i són menys sensibles als antagonistes del lloc d'unió del glutamat i als agents que bloquegen el canal obert (Lynch i Guttman 2002; Llansola *et al.* 2005).

Les subunitats NR1 i NR2 contenen seqüències consens de fosforilació per quinases dependents de Ca^{2+} -calmodulina, per la proteïna quinasa C (PKC) i per la proteïna quinasa A (PKA) (per revisió veure Yamakura i Shimoji 1999; Llansola *et al.* 2005; Sánchez-Pérez 2005). A més, els receptors NMDA que contenen les subunitats NR1/NR2A i NR1/NR2D presenten una inactivació dependent de Ca^{2+} intracel·lular, per un mecanisme que segurament involucraria una proteïna reguladora i els filaments d'actina. Un altre mecanisme d'inactivació dependent de Ca^{2+} intracel·lular seria per interacció de la calmodulina amb el domini NR1 del receptor. S'han descrit dos llocs d'unió per la calmodulina en aquest domini: un d'alta afinitat, que només es trobaria en algunes variants de *splicing*, i un de baixa afinitat que es troba en totes les variants de *splicing*. La unió de la calmodulina a la subunitat NR1 produiria una

reducció de la freqüència d'obertura del canal (Ehlers *et al.* 1996). Aquest mecanisme de regulació per Ca^{2+} podria servir de defensa enfront d'una entrada excessiva de Ca^{2+} , la qual produiria neurotoxicitat, tal i com es comentarà més endavant. Així doncs, els receptors NMDA són altament regulats, no només per als múltiples llocs d'unió a nivell extracel·lular sinó també a nivell intracel·lular.

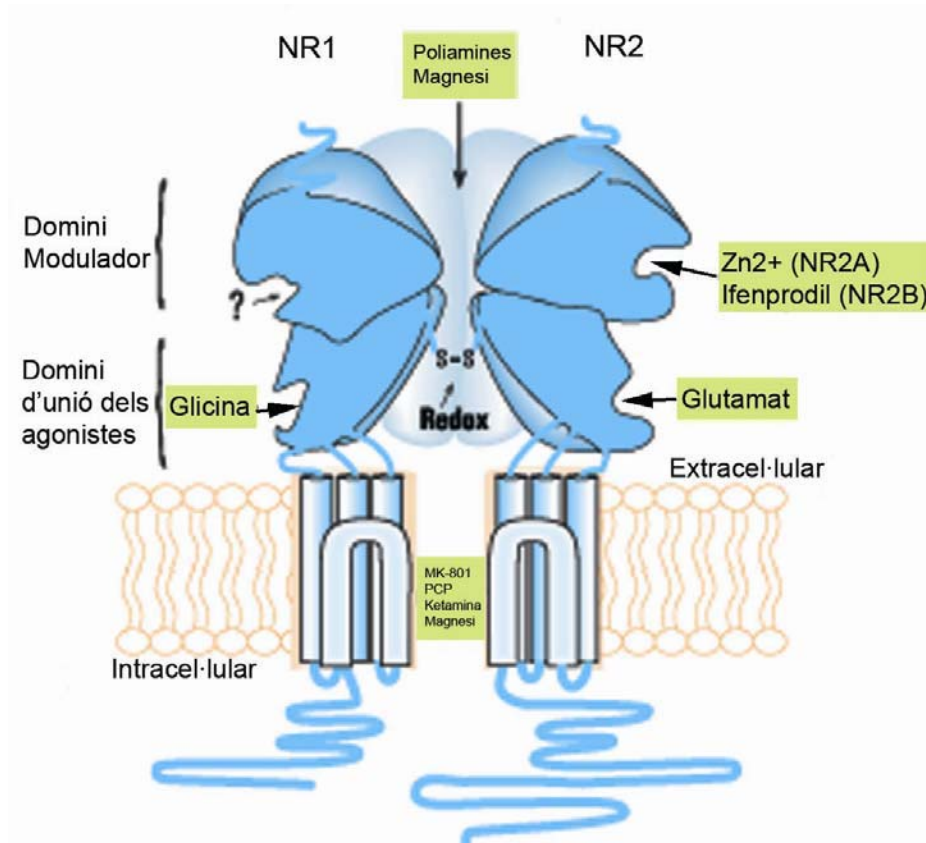


Figura 1.3.- Model del receptor NMDA amb els llocs d'unió a diferents moduladors. Extret de Kemp i McKernan (2002). L'extrem N-terminal de les subunitats és extracel·lular, mentre que els C-terminal és intracel·lular.

El receptor NMDA té un rol molt important en funcions fisiològiques com són la plasticitat sinàptica i la formació de sinapsis, fets que explicarien els fenòmens de la memòria i l'aprenentatge. Una sobreactivació del receptor NMDA, amb la consegüent entrada de Ca^{2+} , però, produeix mort neuronal, fenomen que es coneix amb el nom d'excitotoxicitat i del qual es parla en l'apartat 1.4 de la present introducció. S'ha proposat que moltes malalties neurològiques i neuropsiquiàtriques com la malaltia de Huntington o la d'Alzheimer, els accidents vasculars cerebrals o l'epilèpsia, tindrien un component d'excitotoxicitat. És per això que des de mitjans dels anys 80 la indústria i la sanitat pública han tingut un gran interès en desenvolupar antagonistes dels

receptors de NMDA (Kemp i McKernan 2002; Bleich *et al.* 2003). Entre els antagonistes no competitiu hi ha aquells que s'uneixen a l'interior del canal obert, com ara el MK-801 i els anestèsics dissociatius ketamina i fenciclidina (PCP). També s'uneixen a l'interior del canal l'amantadina i la memantina. Aquests dos últims fàrmacs, a diferència dels anteriors, presenten una baixa afinitat per el receptor i han estat utilitzats per al tractament de la malaltia de Parkinson i d'Alzheimer sense presentar els efectes secundaris que presenten els antagonistes de més alta afinitat (Yamakura i Shimoji 1999). Es consideren també de gran interès farmacològic aquells antagonistes que són específics de subunitat, com per exemple el ifenprodil que és inhibidor no competitiu selectiu de la subunitat NR2B. En el present treball s'ha utilitzat com a antagonistes MK-801 i l'antagonista competitiu del lloc d'unió del glutamat àcid D-2-amino-5-fosfopentanoic (D-AP5).

1.3.2.- La neurotransmissió inhibidora: sistema GABAèrgic

1.3.2.1.- El GABA com a neurotransmissor: síntesi, metabolisme, alliberament i recaptació.

L'àcid γ -aminobutíric (GABA) és el principal neurotransmissor inhibidor del sistema nerviós central de mamífers. La seva existència al cervell de vertebrats va ser descoberta l'any 1950 per 2 grups independentment (Awapara *et al.* 1950; Roberts i Frankel 1950), però degut al fet de trobar-se en grans concentracions al cervell (aproximadament 5 mM) i al fet que productes de la seva via metabòlica formessin part del cicle de Krebs, va impedir que se'l reconegués com a neurotransmissor fins a la dècada dels setanta. Actualment sabem que en el sistema nerviós central de mamífers entre un 30 i un 40 % de les sinapsis utilitzen el GABA com a neurotransmissor.

El sistema GABAèrgic està implicat en una àmplia sèrie de funcions fisiològiques i alteracions neurològiques i psiquiàtriques. És molt clara per exemple la seva implicació en l'epilèpsia, ja que el bloqueig de la neurotransmissió GABAèrgica produeix convulsions, a més s'han relacionat certes mutacions en subunitats del receptor GABA_A amb determinats tipus d'epilèpsia (Kaneko *et al.* 2002).

La síntesi i metabolisme del GABA es produeix per un seguit de reaccions anomenades GABA *shunt* (figura 1.4). El primer pas en el GABA *shunt* és la

transaminació de l' α -cetoglutarat provinent del cicle de Krebs a L-glutamat. El L-glutamat serà posteriorment descarboxilat per la descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD) per a formar GABA. La GAD només s'expressa en aquelles neurones que utilitzen el GABA com a neurotransmissor, és per tant un bon marcador de neurones GABAèrgiques. El GABA és metabolitzat per la GABA transaminasa (GABA-T) i es forma aldehyd semisuccínic, el qual és ràpidament oxidat a àcid succínic que tornarà a entrar al cicle de Krebs. S'han clonat 2 gens diferents per la GAD, el *gad*₆₅ i el *gad*₆₇. Aquestes dues isoformes es coexpressen en la majoria de neurones GABAèrgiques del sistema nerviós central, però tenen diferents propietats cinètiques i diferent localització intracel·lular (Soghomonian i Martin 1998). La GAD₆₅ es troba en terminals nerviosos i està associada a membranes, en canvi la GAD₆₇ és predominantment citosòlica i es troba més àmpliament distribuïda. Arran d'aquesta diferent localització, s'ha proposat que la GAD₆₇ podria estar implicada en la síntesi de GABA metabòlic mentre que la GAD₆₅ estaria implicada en la síntesi del GABA vesicular. Tanmateix, els estudis realitzats amb ratolins *knock-out* indicarien que la GAD₆₇ mantindria la senyalització GABAèrgica normalment. Així, el ratolí *knock-out* pel *gad*₆₅ manté uns nivells normals de GABA i de GAD₆₇ en el cervell, i el seu fenotip és normal excepte en què són més susceptibles a les convulsions (Asada *et al.* 1996; Kash *et al.* 1997). D'altra banda, el ratolí *knock-out* pel *gad*₆₇ neix amb paladar fes i mor al cap de poc de néixer. Finalment, el ratolí *knock-out* heterozigot per la *gad*₆₇ (*gad*₆₅^{+/+}, *gad*₆₇^{+/-}) presenta uns nivells de GABA significativament reduïts tot i que el GAD₆₅ es manté en els nivells normals, fet que indica que la GAD₆₅ no pot compensar la pèrdua parcial de GAD₆₇ (Asada *et al.* 1997). S'ha descrit que existeix una regulació diferencial de les dues isoformes de GAD en diferents regions cerebrals i en diferents condicions fisiològiques i experimentals. Avui però, encara no es coneix exactament quina és la conseqüència funcional de l'existència d'aquestes dues isoformes

El GABA que servirà com a neurotransmissor és emmagatzemat en les vesícules de les terminacions nervioses, mitjançant el transportador vesicular VGAT, des d'on serà alliberat a l'espai sinàptic de manera calci-dependent per despolarització de la membrana. Es sap que també existeix un mecanisme d'alliberament de GABA no vesicular i independent de calci per mitjà del funcionament revers dels transportadors de GABA d'alta afinitat (Belhage *et al.* 1993).

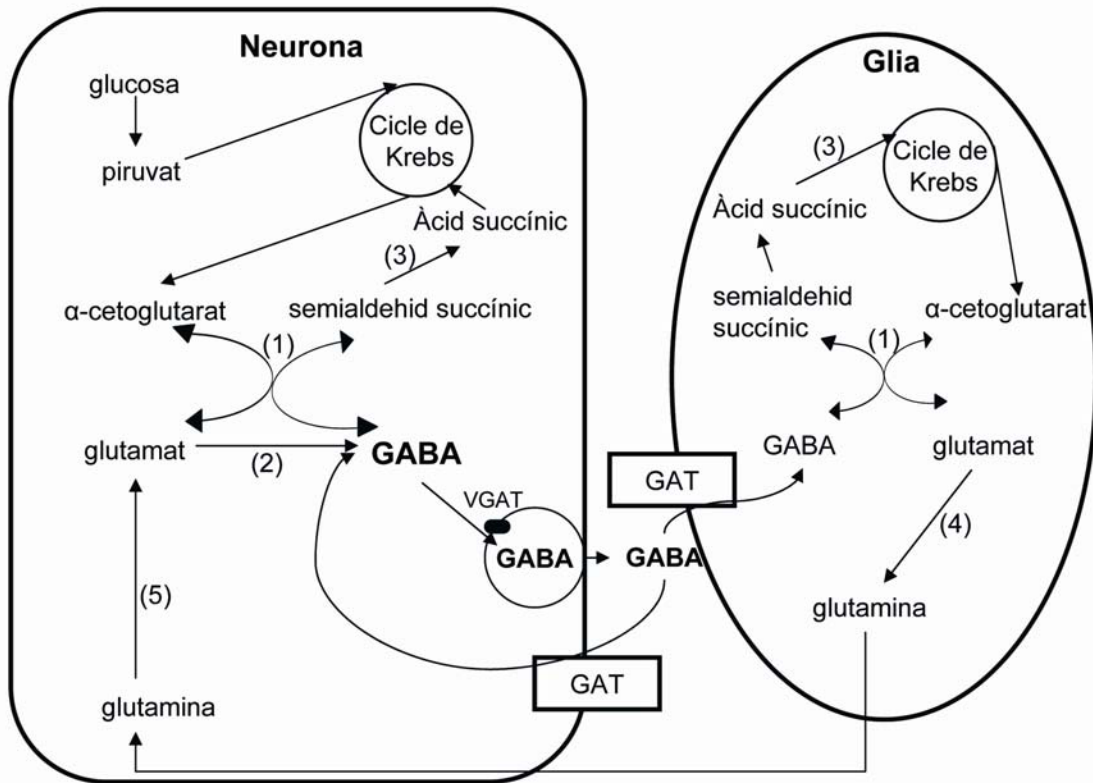


Figura 1.4.- Esquema de la síntesi i metabolisme del GABA. VGAT: transportador vesicular de GABA. GAT: transportador de GABA. Enzims implicats: GABA transaminasa (1), deshidrogenasa de l'àcid glutàmic (2), deshidrogenasa del semialdehid succínic (3), glutamina sintetasa (4), glutaminasa (5).

El GABA alliberat a l'espai sinàptic és recaptat per transportadors presents a la membrana de les cèl·lules glials i de la terminal presinàptica. Els transportadors de GABA, a diferència dels de glutamat, pertanyen a la família de transportadors de neurotransmissors dependents de Na^+ i Cl^- . Fins avui s'han clonat i caracteritzat 4 transportadors de GABA. Per raons històriques la terminologia dels transportadors és una mica confusa, en el quadre següent és detalla.

| Espècie | Nomenclatura | | | |
|---------|--------------|-------|-------|-------|
| Ratolí | GAT1 | GAT2 | GAT3 | GAT4 |
| Rata | GAT-1 | BGT-1 | GAT-2 | GAT-3 |
| Humà | GAT-1 | BGT-1 | N.C. | GAT-3 |

Taula 1.4.- Nomenclatura dels transportadors de GABA clonats de ratolí, rata i humà. N.C.: no clonat. (De Schousboe et al. 2004).

El GAT-1 i el GAT-3 estan expressats exclusivament en el sistema nerviós central, mentre que el BGT-1 i el GAT-2 també estan presents en d'altres teixits perifèrics, especialment en fetge i ronyó. Els GAT no segueixen un patró específic d'expressió en diferents tipus cel·lulars presents al sistema nerviós, així el GAT-1 i el GAT-3 s'han trobat tant en neurones com en astròcits (Gadea i López-Colomé 2001b). El transportador de betaïna/GABA (BGT-1), es va clonar originalment d'una línia cel·lular de ronyó (MDCK) (Yamauchi *et al.* 1992), més tard es va clonar la proteïna homòloga de cervell de ratolí (López-Corcuera *et al.* 1992). Aquest s'expressa en astròcits i en neurones i transporta tant GABA com betaïna, essent l'afinitat pel GABA major que per a la betaïna. Alguns inhibidors dels transportadors de GABA com la tiagabina (inhibidor de GAT-1) han estat utilitzats en teràpies anticonvulsives (Dalby 2003).

1.3.2.2.- Receptors de GABA

Fins ara s'han descrit dos tipus diferents de receptors de GABA, el GABA_A i el GABA_B. El receptor GABA_A és un canal iònic permeable a clorur, mentre que el receptor GABA_B és un receptor metabotròpic acoblat a proteïna G que regula l'activitat de canals de potassi i de calci. El receptor GABA_B va ser identificat el 1980 per la seva sensibilitat al baclofèn i la seva insensibilitat a la bicuculina (antagonista GABA_A). Els receptors GABA_B medien tant la inhibició pre-sinàptica com post-sinàptica.

1.3.2.2.1.- El receptor GABA_A

El receptor GABA_A és un complex proteic format per diferents subunitats i que té múltiples llocs d'unió per a una gran diversitat de compostos. Tal i com s'esquematitza en la figura 1.5 conté com a mínim un lloc d'unió pel GABA i per a agonistes i antagonistes competitius i diferents llocs d'unió per a barbitúrics, benzodiazepines, neuroesteroides i substàncies convulsivants.

Des de el punt de vista molecular el receptor GABA_A és un heteropentàmer format per 5 subunitats que poden pertànyer a diferents classes. Fins ara s'han clonat 6 subunitats α , 3β , 3γ , 1δ , 1ϵ , 1π , 1θ , 1π , 3ρ (Kash *et al.* 2004). A més, existeixen algunes variants de *splicing* (p.ex: γ_{2S} i γ_{2L}). Depenent de les subunitats que el formin, el receptor tindrà diferents propietats farmacològiques i electrofisiològiques. La majoria de receptors GABA_A nadius estarien compostos per dues subunitats α , dues β

i una γ , concretament la combinació $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ seria la més abundant en la majoria d'àrees cerebrals, representant un 40 % de totes les combinacions possibles.

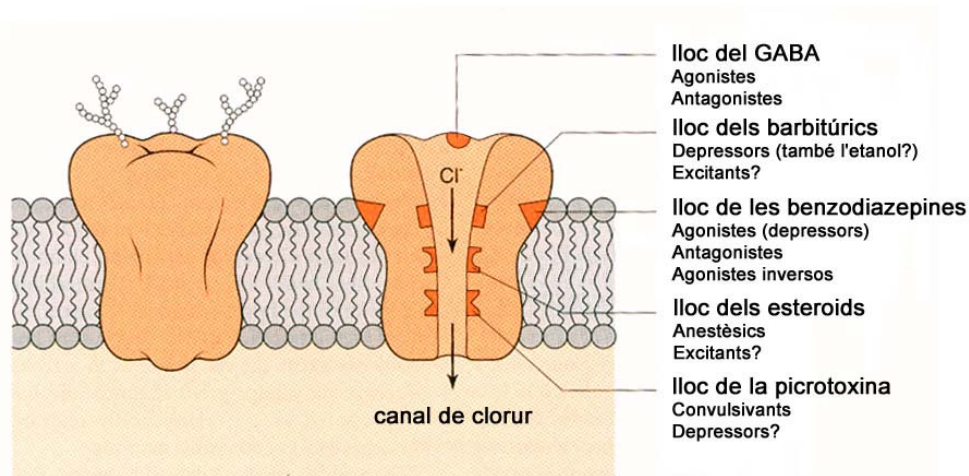


Figura 1.5.- Model estructural del complex receptor GABA_A-canal de clorur. El tall transversal mostra les dianes de diferents compostos que influencien el receptor sense implicar una localització específica. Extret de Olsen i DeLorey (1999).

Els estudis de localització del lloc de reconeixement per als compostos que interaccionen al receptor GABA_A indiquen que el lloc d'alta afinitat d'unió pel GABA es troba a la interfase de les subunitats α i β . La subunitat β és el lloc d'unió del *t*-butilbiciclofosforotinat (TBPS) (lloc convulsivant o lloc del canal o lloc del ionofor). El lloc d'unió de les benzodiazepines es trobaria situat entre les subunitats α i γ (Zezula *et al.* 1996; Mehta i Ticku 1999). Els receptors formats per les subunitats ρ , s'han localitzat en retina i són insensibles a la bicuculina, als barbitúrics, a les benzodiazepines i als neuroesteroides. Aquests receptors van ser designats com a GABA_C el 1984, tot i que actualment la IUPHAR recomana la seva classificació com a GABA_{A0r} (Bormann 2000).

La resposta dels receptors GABA_A a les benzodiazepines depèn doncs de les subunitats α i γ . Així per exemple, els receptors que contenen les subunitats α_4 o α_6 , no uneixen benzodiazepines clàssiques agonistes com el diazepam, però en canvi sí que uneixen altres benzodiazepines no clàssiques com el Ro 15-4513. Les cèl·lules granulars de cerebel són les úniques que expressen la subunitat α_6 . La composició d'aquests receptors proposada seria $\alpha_6\beta_x\gamma_2$ (32 %), $\alpha_1\alpha_6\beta_x\gamma_2$ (37%), $\alpha_6\beta_x\delta$ (14 %), $\alpha_1\alpha_6\beta_x\delta$ (15%) (Sieghart *et al.* 1999). Aquestes dues últimes combinacions donarien lloc a un receptor completament insensible a les benzodiazepines (Korpi *et al.* 2002).

La picrotoxina i el *t*-butilbiciclofosforotinat (TBPS) són agents convulsivants que comparteixen el lloc d'unió al receptor GABA_A. Són antagonistes no-competitius que actuen bloquejant el canal de clorur causant una disminució del temps d'obertura. El lloc de la picrotoxina és on també s'uneixen nombrosos plaguicides i antihelmíntics. La clonació del receptor GABA_A expressat en soques de *Drosophila melanogaster* resistents a l'acció del plaguicida organoclorat dieldrín, va permetre identificar una mutació d'un aminoàcid d'alanina a serina en el segon domini transmembrana de la subunitat β, com a lloc crític d'unió dels compostos que actuen en el lloc del canal (Ffrench-Constant *et al.* 1993). El lloc d'unió de la picrotoxina presenta al·lostèricisme amb el lloc d'unió de les benzodiazepines, depenent del tipus de subunitats que formen el receptor aquest al·lostèricisme serà diferent (Luddens *et al.* 1994). En cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de ratolí s'ha descrit que l'increment en la unió de ³H-flunitrazepam induïda per GABA, és reduïda per 50 μM de picrotoxina i que el GABA és capaç de reduir la unió de ³⁵S-TBPS (Vale *et al.* 1997).

Així doncs, a l'igual que el receptor NMDA, el receptor GABA_A és farmacològicament molt interessant ja que existeixen gran quantitat de substàncies que interaccionen amb aquest complex proteic, ja siguin fàrmacs com les benzodiazepines (utilitzades àmpliament com a ansiolítics, anticonvulsivants, relaxants musculars i sedants) (Sigel i Buhr 1997; Sigel 2002), o altres agents com l'etanol (Hancher *et al.* 2004), els neuroesteroides (Matyas *et al.* 2004; Belelli i Lambert 2005), alguns plaguicides organoclorats (Pomés *et al.* 1993; 1994a; Vale *et al.* 2003), el mercuri (Yuan i Atchison 1997; Fonfría *et al.* 2001; Yuan i Atchison 2003) o altres agents amb possible acció depressora sobre el sistema nerviós central (Vale *et al.* 1997; García *et al.* 2005).

1.3.2.3.- Accions excitadores del GABA

Tot i que tal i com s'ha dit fins ara el GABA és el principal neurotransmissor inhibitor del SNC, recentment, s'ha descrit que en certs casos el GABA pot tenir acció excitadora, especialment en neurones embrioniques o de pocs dies post-natals. Aquesta acció excitadora del GABA s'explicaria perquè en neurones embrioniques la concentració de Cl⁻ intracel·lular seria més gran que en neurones madures, (aproximadament 20 mM i 6 mM respectivament) (Ben Ari 2002; Cupello 2003; Stein i Nicoll 2003). Aquesta concentració més alta de Cl⁻ intracel·lular faria que el potencial

de reversió pel GABA estigués a un nivell més despolaritzat que el potencial de repòs de la membrana. Per tant, quan s'obriria el canal de clorur del receptor GABA_A, el Cl⁻ sortirà de l'interior a l'exterior de la neurona causant una despolarització suficient per a causar un potencial d'acció. S'ha demostrat que el canvi en la [Cl⁻]_i en neurones embrionàries i madures seria degut a un increment en l'expressió del transportador KCC2, (que extreu Cl⁻), i a una disminució de l'expressió del transportador NKCC (que entra Cl⁻ a dins la cèl·lula). El mateix GABA seria el factor tròfic que provocaria aquest canvi en l'expressió (Ganguly *et al.* 2001). En cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de rata s'ha reportat que el GABA produeix elevacions del calci intracel·lular per un mecanisme sensible a bicuculina i a nifedipina, de manera decreixent de 3 a 6 dies *in vitro*. Aquest efecte ja no s'observa a partir de 7 dies *in vitro* (Rego *et al.* 2001).

En alguns casos particulars, també s'han descrit accions excitadores del GABA en neurones madures. Per exemple, en neurones estimulades repetitivament o exposades continuament a GABA, s'han observat respostes bifàsiques (hiperpolarització seguida de despolarització prolongada) degudes al colapse del gradient de Cl⁻ a través de la membrana (Staley *et al.* 1995). En neurones hipocampals en cultiu sotmeses a trauma mecànic també es desenvolupen respostes despolaritzants pel GABA, degut a un canvi en el potencial d'equilibri del Cl⁻ (van den Pol *et al.* 1996).

1.4.- Excitotoxicitat

El 1957 Lucas i Newhouse van descriure per primera vegada l'efecte neurotòxic del glutamat monosòdic (utilitzat com a additiu en moltes preparacions alimentàries) en retina de ratolí (Lucas i Newhouse 1957). Una dècada més tard, Olney descrigué que el glutamat monosòdic induïa necrosi en diverses regions cerebrals de ratolins nous (Olney 1969) i produïa degeneració de les dendrites i els cossos neuronals de l'hipotàlem en nadó de mona (Olney i Sharpe 1969). El 1978 Olney va definir aquests efectes tòxics com a "excitotoxicitat", dany neuronal per sobreexcitació, deguda a una activació excessiva o massa perllongada dels receptors de glutamat.

Així doncs el terme excitotoxicitat es va utilitzar inicialment per a descriure la mort neuronal produïda per concentracions molt altes de glutamat exogen o bé de compostos amb accions agonístiques sobre els receptors de glutamat. La intoxicació

alimentaria de l'any 1987 a Canadà produïda per consum de musclos contaminats amb àcid domoic (anàleg de l'àcid kaïníc) és un exemple d'aquest tipus de toxicitat en humans (Perl *et al.* 1990; Teitelbaum *et al.* 1990; Jeffery *et al.* 2004). Més tard es va descobrir que els antagonistes glutamatèrgics tenien efectes beneficiosos en models animals d'alteracions neurològiques com l'epilèpsia i la isquèmia i per tant el terme d'excitotoxicitat es va ampliar també a la neurotoxicitat mediada per el glutamat endogen. (veure Doble 2000; Obrenovitch i Urenjak 1997; Obrenovitch *et al.* 2000 per a revisió). Des de llavors s'han dut a terme nombrosos estudis *in vitro* i *in vivo* per tal d'explicar la relació entre l'excitotoxicitat i certes malalties neurològiques, i per a explicar quins són els mecanismes mediadors de la mort excitotòxica i com es podria protegir.

La majoria d'estudis *in vitro* sobre l'excitotoxicitat han implicat el receptor NMDA com a principal vehicle del dany excitotòxic. En la majoria de models de cultius cel·lulars els antagonistes del receptor NMDA protegeixen de la mort excitotòxica, i si bé la correlació amb la concentració de Ca^{2+} intracel·lular no és molt clara (Michaels i Rothman 1990), sí que existeix una clara dependència de l'entrada de $^{45}Ca^{2+}$ a través del receptor NMDA (Hartley *et al.* 1993). El 1998 Stout *et al.* van descriure que l'entrada excessiva de Ca^{2+} a través del receptor NMDA s'acumulava a les mitocòndries i que això era el que produïa la mort neuronal retardada (Stout *et al.* 1998). Aquest mecanisme calci-dependent ha estat estudiat extensivament degut a la seva aparent analogia amb la mort neuronal retardada induïda per un episodi isquèmic en certes regions cerebrals. En paral·lel amb els estudis dels efectes neurotòxics del glutamat exogen, altres estudis demostraven la relació de la mort neuronal per privació d'oxigen i glucosa, amb l'excitotoxicitat mediada pel receptor NMDA en cultius neuronals (Rothman 1984; Dessi *et al.* 1993; Goldberg i Choi 1993).

Una alta concentració de glutamat extracel·lular, causa una despolarització persistent de la neurona, iniciada per l'activació dels receptors AMPA i posteriorment per l'activació de canals de sodi dependents de voltatge. Aquesta despolarització causa l'activació dels receptors NMDA. L'entrada dels ions sodi va acompanyada de l'entrada passiva d'ions clorur per a mantenir l'equilibri iònic i d'aigua per a mantenir l'equilibri osmòtic. Aquesta entrada d'aigua produeix un increment en el volum cel·lular. Tot i que aquest inflament de les cèl·lules ha estat descrit en nombroses ocasions, no és clar si és crucial per a què es produeixi neurotoxicitat (Choi 1987). Així Dessi *et al.* (1994) descriuen que la substitució del Cl^- de la solució per anions no-

permeants elimina l'inflament cel·lular produït per exposició a glutamat (100 μ M, 15 min), però es produeix igualment mort neuronal dependent de calci al cap d'unes hores de l'exposició. No obstant, més recentment s'han descrit altres models *in vitro* on l'excitotoxicitat és dependent de l'entrada de Cl^- a través de múltiples vies (Chen *et al.* 1998; 1999; Beck *et al.* 2003; Van Damme *et al.* 2003).

El paper del GABA en el mecanisme excitotòxic és controvertit. En estudis d'excitotoxicitat *in vitro* s'han observat tant efectes protectors com efectes perjudicials del GABA i dels seus agonistes. Així, s'ha descrit que el diazepam aplicat després de la privació d'oxigen i glucosa en talls d'hipocamp, evita l'increment de citocrom C en el citosol, la disminució d'ATP i l'increment en les concentracions intracel·lulars de Ca^{2+} i Cl^- (Galeffi *et al.* 2000; 2004). D'altra banda Muir *et al.* (1996) utilitzant cultius primaris corticals de ratolí, demostren que el GABA i l'agonista del receptor GABA_A muscimol, atenuen la mort neuronal produïda per exposició a agonistes glutamatèrgics i en canvi incrementen la mort neuronal induïda per privació d'oxigen i glucosa (dependent també de receptor NMDA). Aquests últims autors, proposen que l'efecte del GABA en la potenciació o protecció de la mort excitotòxica dependria del grau de despolarització de la membrana cel·lular i de l'estat energètic de la cèl·lula. Els estudis de Chen *et al.* (1998; 1999) de toxicitat de l'àcid kaïníc i del NMDA en retina de pollastre i en cèl·lules granulars de cerebel, i el de Van Damme *et al.* (2003) sobre la toxicitat de l'AMPA en cultius de motoneurons són dos exemples més de models *in vitro* en què l'excitotoxicitat és dependent de l'entrada de clorur a través del receptor GABA_A . Part de la mort neuronal produïda en la isquèmia i en el traumatisme cranioencefàlic es considera excitotòxica (veure més endavant). En aquests trastorns neurològics el GABA, com d'altres neurotransmissors, s'acumula en l'espai extracel·lular i la $[\text{Cl}^-]$ incrementa (Phillis *et al.* 1994; Inglefield i Schwartz-Bloom 1998). Els estudis en models animals d'isquèmia *in vivo* suggereixen que un increment en la neurotransmissió GABA_A resultaria protectora ja que serviria de fre a la hiperexcitació causada per l'excés de glutamat (Schwartz-Bloom i Sah 2001). Tot i això, la finestra terapèutica en la què un increment de la neurotransmissió GABA_A és protectora, és estreta (2 hores després de la isquèmia, (Schwartz-Bloom *et al.* 1998), de manera que el GABA podria tenir un rol diferent al llarg del procés patològic.

En estudis realitzats *in vivo* en models animals d'isquèmia focal, els antagonistes dels receptors ionotròpics de glutamat resulten protectors, però no estan ben definides

quines concentracions extracel·lulars de glutamat serien tòxiques (veure Obrenovitch i Urenkijak 1997, Tapia et al. 1999, Obrenovitch 1999, 2000 per a revisió). Així per exemple, microinjeccions repetides d'una solució 1.8 M de glutamat en l'estriat i en l'hipocamp de rata van produir neurodegeneració en una àrea de només 0.5 mm al voltant de la cànula d'injecció (Mangano i Schwarcz 1983). En estudis *in vivo* en els que s'ha disminuït la funció dels transportadors de glutamat, els resultats han estat contradictoris. Per una banda Rothstein *et al.* (1996), utilitzant oligonucleòtids antisentit pels transportadors GLAST i GLT-1, descriu que es produeix neurodegeneració en l'estriat i en l'hipocamp i ho relaciona amb concentracions extracel·lulars de glutamat de 6 -22 μM . Per l'altra banda, altres estudis, en els que s'injecten inhibidors dels transportadors de glutamat a través de sondes de microdiàlisi, reporten concentracions extracel·lulars de glutamat de 10-30 μM que no es relacionen amb neurodegeneració (Massieu *et al.* 1995; Massieu i Tapia 1997). No obstant, quan es perfundeix 4-aminopiridina a través d'una sonda de microdiàlisi localitzada a l'hipocamp, incrementa la concentració de glutamat mesurat fins a concentracions de 3 μM i es produeix neurodegeneració en les àrees CA1, CA3 i CA4 de l'hipocamp (Tapia *et al.* 1999). En models animals d'isquèmia s'ha descrit que el glutamat incrementa fins a concentracions de aproximadament 80 μM (Wahl *et al.* 1994). En estudis en pacients que havien sofert traumatisme cranioencefàlic les concentracions de glutamat reportades són d'entre 15 i 60 μM (Yamamoto *et al.* 1999; Reinert *et al.* 2000). No hi ha un acord sobre si concentracions elevades de glutamat extracel·lular serien l'única causa de mort neuronal en aquestes patologies. Certs estudis realitzats en pacients amb traumatisme cranioencefàlic descriuen increments en la concentració de potassi i glutamat extracel·lular (Yamamoto *et al.* 1999; Goodman *et al.* 1999; Reinert *et al.* 2000) i alguns estudis relacionen les concentracions de glutamat i de potassi elevades amb l'empitjorament del pacient, indicant que els desequilibris de l'homeòstasi iònica i de glutamat produïrien neurotoxicitat (Spranger *et al.* 1996; Reinert *et al.* 2000). L'origen del glutamat extracel·lular en les diferents patologies relacionades amb l'excitotoxicitat tampoc és clar. Tal i com s'ha descrit al parlar del glutamat, el glutamat és pot alliberar per exocitosi, per reversió dels transportadors de la membrana i a través de canals activats per inflament cel·lular, o pot provenir de les cèl·lules mortes que han alliberat el seu contingut a l'espai extracel·lular.

S'ha proposat que la neurodegeneració crònica que es dona en certes malalties neurològiques seria com a mínim parcialment dependent de la neurotoxicitat produïda

pel glutamat endogen. Entre aquestes hi ha l'esclerosi lateral amiotròfica, la malaltia de Huntington, la d'Alzheimer o la de Parkinson. En el cas de l'esclerosi lateral amiotròfica hi hauria una disminució de l'expressió del transportador glial de glutamat GLT-1 que produiria la degeneració de les motoneurons (Rothstein *et al.* 1992; 1995). L'únic fàrmac aprovat com a tractament estàndard en pacients amb esclerosi lateral amiotròfica és el riluzole, un fàrmac amb propietats anticonvulsions, sedatives i anti-isquèmiques. S'ha demostrat que el riluzole inhibeix l'alliberament de glutamat en cultius de cèl·lules granulars de cerebel sotmeses a condicions d'anòxia (Dessi *et al.* 1993). El mecanisme pel qual actua aquest fàrmac no és conegut, però sembla que podria ser en part per la reducció de l'entrada de calci a través dels canals del tipus P/Q i per l'activació de processos dependents de proteïna G (Wang *et al.* 2004).

1.5.- Els plaguicides organoclorats i la neurotoxicitat

Els plaguicides organoclorats són un gran grup de compostos utilitzats com a insecticides, acaricides i fungicides que es divideixen en 5 grups: a) DDT i els seus anàlegs, b) hexaclorociclohexans (BHC o HCH) c) ciclodienos i compostos similars, d) toxafens i compostos relacionats i e) mirex i clordecona.

Tot i que aquests compostos foren utilitzats àmpliament entre els anys 1940 i 1970, han caigut en desús en els països del primer món degut a la seva toxicitat en animals i humans i a l'elevada persistència al medi. Tot i això, degut al seu baix cost, aquests plaguicides encara són utilitzats en països en vies de desenvolupament. Amb la intenció de trobar una solució global al problema dels contaminants orgànics persistents, el maig del 2001 es va acordar el Conveni d'Estocolm, un instrument internacional que suposarà, en els països on s'apliqui, l'eliminació de la producció i l'ús de molts d'aquests plaguicides. El maig del 2004 amb la ratificació dels 50 països necessaris va entrar en vigor aquest conveni. Actualment Espanya, com molts d'altres països en tot el món, està en procés de redacció del Pla Nacional d'Aplicació per tal de complimentar les obligacions previstes en el Conveni i en el reglament de la Unió Europea (Reglament 850/2004).

Sobre els efectes aguts dels plaguicides organoclorats de la família dels ciclodienos i dels hexaclorociclohexans en el sistema nerviós central, s'ha descrit que indueixen

hiperexcitabilitat en mamífers podent arribar a causar convulsions (Tusell *et al.* 1987; Solà *et al.* 1993; Suñol *et al.* 1998). Aquests compostos inhibeixen de manera competitiva la unió de [³⁵S]-TBPS al receptor GABA_A (Llorens *et al.* 1990; Pomés *et al.* 1993) i modifiquen la unió de [³H]muscimol i [³H]flunitrazepam en certes regions cerebrals (Solà *et al.* 1993). Consistent amb aquest efecte, inhibeixen el flux de ³⁶Cl⁻ induït per GABA en cultius primaris de neurones corticals (Pomés *et al.* 1994a) i en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel (Vale *et al.* 2003). S'obtenen bones correlacions entre la potència de bloqueig del flux de ³⁶Cl⁻, el desplaçament de la fixació de [³⁵S]-TBPS i la letalitat aguda d'aquests compostos (Pomés *et al.* 1993; 1994a; Bloomquist 2002). D'altra banda, s'ha descrit que el lindà, a concentracions superiors a les efectives sobre el receptor GABA_A, produeix citotoxicitat en cultius de neurones corticals (Pomés *et al.* 1994b; Vale *et al.* 1998b) i de cèl·lules granulars de cerebel (Rosa *et al.* 1997; Vale *et al.* 1998). En els cultius de cèl·lules granulars de cerebel, la citotoxicitat del lindà s'ha relacionat amb un increment de la [Ca²⁺]_i deguda a l'entrada a través de canals de Ca²⁺ activats per voltatge i a l'alliberament des de les reserves intracel·lulars (Rosa *et al.* 1997).

Estudis realitzats en els últims 10 anys, han descrit la presència d'aquests plaguicides en pràcticament totes les categories d'aliments (Kalantzi *et al.* 2001; Schafer i Kegley 2002; Hites *et al.* 2004). Un estudi realitzat a Espanya indica que el 95 % de les mostres de llet pasteuritzada analitzades contien alguns dels isòmers del hexaclorociclohexà, i que un 13 % d'elles excedien els límits permesos per la Unió Europea (Martínez *et al.* 1997). En el present estudi es pretenia estudiar l'efecte de l'exposició perllongada a aquests plaguicides (ciclodien i hexaclorociclohexans) en cultius neuronals. Amb motiu de la diferent persistència d'aquests compostos en el medi de cultiu, l'estudi va quedar restringir a un sol d'aquests compostos, el dieldrín, que tal i com es va demostrar és molt persistent.

1.5.1.- El dieldrín

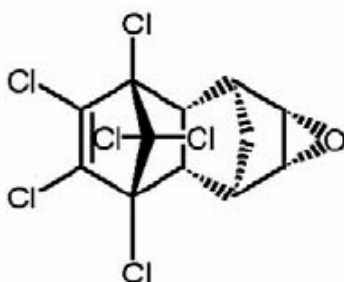


Figura 1.6.- Estructura química del dieldrín (Pes molecular: 380.9 g/mol)

1.5.1.1.- Utilització

El dieldrín és un compost amb funció insecticida i és també producte de degradació d'altres insecticides més potents com l'aldrín que es transforma en dieldrín tant en organismes vius com en l'ambient.

Principalment s'utilitzava en agricultura per al tractament dels sòls, també s'utilitzava en alguns països tropicals com a esprai en les parets i sostres interiors de les cases per a prevenir els vectors de malalties com la malària. A Estats Units, el 1974 l'agència de protecció ambiental (EPA) en va prohibir el seu ús, a excepció del control de tèrmits que va continuar fins al 1987. A Europa, la directiva 79/117/CEE de l'any 1979 en va prohibir el seu ús i la seva comercialització dins del territori de la Comunitat Europea. Dins el Conveni d'Estocolm el dieldrín és classificat dins l'Annex A (productes a ser eliminats).

1.5.1.2.- Efectes en l'ambient

Malgrat les prohibicions d'utilització del dieldrín en molts països industrialitzats, actualment encara se'n pot trobar degut als usos que se n'havia fet fa dècades, a la seva utilització en països en vies de desenvolupament i a la seva capacitat per viatjar llargues distàncies a través de l'adhesió a partícules de pols. La vida mitja del dieldrín en sòls de zones temperades és de 5 anys, mentre que en zones tropicals desapareix en un 90% en un mes. Degut a què és un compost lipofílic en sistemes aquàtics no se'n troba gaire a l'aigua sinó que s'acumula més als sediments i posteriorment es bioacumula en peixos (veure més endavant). Les plantes el poden incorporar a través de les arrels. (U.S.Department of health and human services 2002). Les anàlisis de l'aigua i dels sediments dutes a terme a Nova Orleans després de les inundacions produïdes per l'huracà Katrina, a l'agost del 2005, van demostrar que entre els contaminants presents s'hi trobava el dieldrín, una evidència més de l'elevada resistència a la degradació d'aquest compost (www.epa.gov/katrina/testresults).

1.5.1.3.- Fonts d'exposició humana

En mamífers, el dieldrín es pot absorbir a través de la pell, així com a través de via oral i respiratòria, i s'emmagatzema principalment en teixit adipós, seguit pel fetge,

cervell i sang. La seva toxicitat aguda a través de la pell és similar a la toxicitat per via oral (en rata mascle LD₅₀ de 90 i 46 mg/Kg respectivament (Smith A.G. 1991)). En un estudi recent realitzat en dones post-menopàusiques del sud d'Espanya (Granada i Almeria), s'han trobat nivells de dieldrín de (mitjana + sd) 17.01 ± 16.75 ng/g lípid en teixit adipós i 1.21 ± 1.22 ng/ml de sèrum, estant present en aproximadament el 40% de les dones de l'estudi (Botella *et al.* 2004). L'excreció en llet materna és important, essent aquesta un bon índex d'exposició. Els nens es poden exposar per consum de llet materna i a través de la placenta. Un altre estudi realitzat en la mateixa zona reporta nivells de dieldrín de fins a 5.6 ng/ml en llet materna (Campoy *et al.* 2001). Estudis similars demostren que el dieldrín i altres plaguicides es troben presents en llet humana de tot el món, tant en àrees rurals com urbanes (veure Solomon i Weiss 2002 per a revisió).

Pel que fa als aliments, el dieldrín es trobarà en major concentració en aquells que continguin un alt contingut en greixos (llet, productes làctics, peix, etc.). A la Unió Europea, els límits màxims permesos de residus de plaguicides en aliments estan especificats en la directiva 2004/61/CE, essent pel dieldrín de 10-20 µg/Kg. Un estudi recent descrigué que en salmó de piscifactòries europees els nivells de dieldrín eren de aproximadament 5 µg/Kg de pes humit. A més de dieldrín en aquest estudi troben altres contaminants persistents. Tot i que les concentracions dels contaminants detectades en aquest estudi són inferiors als límits legals establerts, segons les recomanacions de l'EPA de risc acumulat es recomanaria menjar menys d'un àpat de salmó al mes (U.S.EPA 2000; Hites *et al.* 2004). De la mateixa manera, en l'estudi dut a terme a Estats Units per (Schafer i Kegley 2002) on s'analitza la concentració de varis contaminants en una gran varietat d'aliments, s'alerta de què es podrien excedir les dosis de referència del dieldrín per a infants (1 µg/dia, segons l'EPA; www.epa.gov/iris).

1.5.1.4.- Toxicitat sobre el sistema nerviós central

La intoxicació aguda en humans produeix convulsions com a primer símptoma d'intoxicació, a més es pot presentar mal de cap, confusió, pèrdua de gana, nàusees, incoordinació motora, pèrdua de consciència i possible mort. Els efectes poden persistir per varies setmanes després de l'exposició però és possible una recuperació total quan la concentració decau per sota d'un cert nivell crític en el sistema nerviós, la qual cosa no vol dir que aquest s'hagi eliminat del cos sinó que pot haver-hi una

redistribució acumulant-se sobretot en teixit adipós. S'han descrit dos casos d'intoxicació aguda per dieldrín en l'aliment, en un d'ells la Organització Mundial de la Salut (OMS) en va fer el seguiment epidemiològic. La intoxicació va ser deguda a la ingestió d'arròs contaminat, segurament perquè s'havia guardat en un edifici on les parets havien estat tractades amb dieldrín. En la majoria de casos entre 0.5 i 1.5 hores després d'haver menjat l'arròs apareixien símptomes de convulsions, debilitat muscular, vòmits i vertigen (Smith A.G. 1991). La intoxicació aguda per dieldrín produeix doncs, hiperexcitació en el sistema nerviós central, i el tractament consisteix en administrar barbitúrics o benzodiazepines per a promoure un efecte anticonvulsivant. En rata, una dosi única oral de 40 – 50 mg/Kg produeix convulsions (Wagner i Greene 1978; Woolley *et al.* 1985) Les dosis no convulsivants incrementen la susceptibilitat dels animals a convulsions induïdes per altres agents o electroxoc (Smith A.G. 1991).

Estudis d'exposicions cròniques i subcròniques a dieldrín també indiquen afectació del sistema nerviós central. Per exemple en rates, la dosi oral de dieldrín de 0.25 mg/Kg/dia durant 60 - 120 dies disminueix la resposta obtinguda en un test comportamental, i en mones la dosi oral de 0.1 mg/Kg/dia per 55 dies disminueix la capacitat d'aprenentatge. Exposicions llargues a dieldrín en humans han produït deficiències neurològiques i sensibilització a exposicions agudes posteriors. En un estudi de cas es reporta que els sulfatadors de dieldrín patien episodis convulsius sense que s'hagués reportat cap exposició elevada accidental anteriorment. Les convulsions apareixen entre els 14 i 154 dies després de l'inici de l'exposició. Un cas semblant es va reportar en fabricants de dieldrín. D'altres símptomes nerviosos com irritabilitat, mal de cap o vertigen han estat descrit en treballadors implicats en la fabricació del dieldrín (veure U.S. Department of health and human services 2002 per a revisió).

Els efectes hiperexcitadors del dieldrín sobre el sistema nerviós central podrien ser deguts tant a una reducció de la neurotransmissió inhibitoria com a un increment de l'alliberament de neurotransmissors excitadors en la sinapsi. Tal i com s'ha dit anteriorment, el dieldrín actua com a antagonista no competitiu del receptor GABA_A (Ikeda *et al.* 1998; Bloomquist 2002), interaccionant amb el lloc d'unió de la picrotoxinina (Pomés *et al.* 1993) i en conseqüència inhibint el flux de clorur a través del receptor (IC₅₀ 0.2-5 µM) (Abalis *et al.* 1986; Obata *et al.* 1988; Pomés *et al.* 1993; 1994; Ikeda *et al.* 1998; Vale *et al.* 2003). Basant-se en la bona correlació entre la

inhibició del flux de clorur a través del receptor GABA_A pels diferents plaguicides organoclorats de la família dels ciclodienis i de l'hexaclorociclohexà i la seva toxicitat en animals d'experimentació, sembla que l'explicació dels efectes aguts del dieldrín rau en aquest efecte (Bloomquist 2002). S'ha proposat també, que el dieldrín podria produir una facilitació de l'alliberament de neurotransmissors gràcies a la seva capacitat d'inhibir la ATPasa neuronal de calci, possiblement per un mecanisme dependent de calmodulina (concentració efectiva de dieldrín > 25 µM). Aquesta inhibició produiria un increment de calci en la terminal que conduiria a un alliberament de neurotransmissors (Mehrotra *et al.* 1989). S'han descrit efectes sobre l'alliberament de neurotransmissors per un altre plaguicida organoclorat d'acció similar al dieldrín, el lindà (γ-hexaclorociclohexà). El lindà incrementa l'alliberament de [³H]noradrenalina estimulat per K⁺ en talls de còrtex cerebral de rata (Cristòfol i Rodríguez-Farré 1991) i disminueix l'alliberament de [³H]aspartat estimulat per K⁺ en cultius de cèl·lules granulars de cerebel (Damgaard *et al.* 1999).

En un estudi en què s'administraren diàriament dosis subconvulsives de dieldrín (1 mg/Kg) en rata gestant del dia embrioníc 12 al 17, es va descriure que la unió de [³⁵S]TBPS, en membranes rentades abundantment per tal d'eliminar el GABA endogen, estava reduïda en el tronc de l'encèfal dels embrions de 17 dies en comparació amb els embrions controls. Aquest efecte també el produïa la bicuculina i el lindà. En la resta de cervell, però, el tractament amb dieldrín no produïa canvis (Brannen *et al.* 1998). El fet de què en aquest treball les diferències només s'observin a nivell del tronc de l'encèfal, és deu possiblement al major grau de desenvolupament dels receptors GABA_A d'aquesta regió en embrions de 17 dies, doncs el mateix treball demostra una major afinitat pel [³⁵S]TBPS i una major B_{max} en el tronc de l'encèfal respecte la resta de cervell en els embrions control a 17 dies. En rates adultes en canvi, s'ha demostrat una major unió de [³⁵S]TBPS en la capa granular de cerebel que en el tronc de l'encèfal (Solà *et al.* 1993). La mateixa exposició *in utero* a dieldrín o a bicuculina va disminuir l'expressió de les subunitats α₁, β₃ i γ₁ del receptor GABA_A en el tronc de l'encèfal dels embrions de 17 dies (Liu *et al.* 1998). El mateix grup, reporta que en cultius primaris de neurones del tronc de l'encèfal, el tractament amb dieldrín 10 µM durant 2 dies, en medi sense sèrum, incrementa l'expressió de la subunitat β₃ i disminueix les de γ_{2S} i γ_{2L}, mentre que no modifica significativament ni la α₁ ni la γ₁ (Liu *et al.* 1997b). És remarcable que el receptor GABA_A homomèric β₃ és més sensible als ciclodienis i al lindane que el receptor recombinant GABA_A heteromèric natiu (Ratra *et al.* 2001). Les diferències reportades en l'estudi *in vivo* respecte l'estudi

in vitro podrien ser degudes a varis factors: a) diferències en la farmacocinètica del dieldrín, b) duració de l'exposició a dieldrín (5 i 2 dies respectivament), i c) dosi diària de dieldrín (1 mg/Kg i 10 µM respectivament) (Liu *et al.* 1998). En tot cas, aquests estudis indiquen que el dieldrín té efecte sobre el sistema GABAèrgic en desenvolupament. En conseqüència, en podria resultar una alteració en el desenvolupament d'altres tipus neuronals i sistemes de neurotransmissió sobre els quals el GABA actua com a factor tròfic a través del receptor GABA_A, com per exemple, les neurones monoaminèrgiques (Liu *et al.* 1997a) o el sistema glutamatèrgic (Ben Ari *et al.* 1997).

El dieldrín s'ha implicat en la patogènia del Parkinson idiopàtic, ja que diferents estudis ocupacionals i ambientals així ho indiquen (Tanner i Langston 1990; Golbe 1993; Fleming *et al.* 1994; Gorell *et al.* 1998). En tres estudis es va observar una correlació entre la incidència de la malaltia de Parkinson i els nivells de dieldrín en el cervell (Fleming *et al.* 1994; Corrigan *et al.* 1998; 2000). En els estudis de Corrigan (1998, 2000) es descriuen nivells de dieldrín en el nucli caudat i en la substància negra de malalts de Parkinson de aproximadament 0.5 i 0.9 µg/g lípid respectivament. Aquests valors foren significativament superiors als corresponents a pacients control (0.3 i 0.5 µg/g, respectivament). Cal destacar que a la substància negra de malalts d'Alzheimer els nivells de dieldrín també eren significativament inferiors als dels malalts de Parkinson. Un altre estudi recent relaciona la major incidència de la malaltia de Parkinson amb un major consum de llet. Ja que en aquest estudi exclouen que la major incidència en el Parkinson sigui deguda a factors com el total de kilocalories consumides o el calci consumit en la dieta, s'hipotetitza que els contaminants presents en la llet puguin ésser-ne la causa (Park *et al.* 2005). Certs estudis *in vitro* demostrarien una major susceptibilitat als efectes citotòxics del dieldrín en neurones dopaminèrgiques enfront d'altres tipus neuronals (Sánchez-Ramos *et al.* 1998; Kitazawa *et al.* 2001). Així, Sánchez-Ramos *et al.* (1998) demostren que en cultius de neurones mesencefàliques de rata, les neurones dopaminèrgiques són més sensibles que les demés a la citotoxicitat produïda per exposicions de 24 hores a dieldrín (EC₅₀ de 12 µM i de 85 µM en les neurones dopaminèrgiques i no-dopaminèrgiques respectivament). Kitazawa *et al.* (2001) donen valors de EC₅₀ per la toxicitat d'una hora d'exposició a dieldrín de 143 µM en cèl·lules PC12 i de 292-351 µM en cèl·lules no-dopaminèrgiques. En aquest estudi es relaciona la citotoxicitat del dieldrín amb la generació d'espècies reactives d'oxigen i la peroxidació lipídica. A més, el dieldrín també s'ha implicat en l'etiologia de les malalties que acumulen

cossos de lewy (dipòsits intracel·lulars de α -sinucleïna). S'ha demostrat que el diel·drín estimula la formació de fibril·les de α -sinucleïna *in vitro* (Uversky *et al.* 2001).

1.5.1.4.- Altres efectes tòxics

Amb motiu dels efectes cancerígens del diel·drín en fetge de ratolí, el 1987 la EPA va classificar el diel·drín dins la categoria B2 (probables carcinògens humans). Actualment però s'ha canviat aquesta classificació i el diel·drín es considera possiblement no carcinogen per humans, ja que les dades mecanístiques obtingudes suggereixen que la carcinogeneïtat en ratolins no és rellevant en humans; a més no s'han obtingut dades significants en estudis epidemiològics.

Certs estudis epidemiològics han relacionat els nivells de diel·drín en teixit adipós i en sèrum amb el risc de patir càncer de mama (Hoyer *et al.* 1998; 2000). Un altre estudi ho feia relacionant el fet de viure en àrees on s'utilitzava aquest plaguicida (Engel *et al.* 2005). D'altres estudis però no van trobar aquesta associació entre diel·drín i càncer. (Dorgan *et al.* 1999; Ward *et al.* 2000; Gammon *et al.* 2002). Així doncs, la relació entre el diel·drín i el risc de patir càncer de mama no és clara.

S'ha indicat que el diel·drín podria actuar com a disruptor endocrí, és a dir que tindria l'habilitat d'actuar com una hormona endògena o bé de bloquejar-ne els efectes; si això fos així aquest seria un possible mecanisme pel qual podria produir càncer de mama. Estudis *in vivo* amb animals suggereixen que el diel·drín podria reduir els nivells d'andrògens en animals mascle i actuar com a disruptor endocrí en femelles. Tot i això els estudis *in vitro* sobre la capacitat estrogènica del diel·drín són contradictoris, alguns suggereixen que s'uneixen als receptors d'andrògens i d'estrògens, però la potència amb la que ho fan és baixa i d'altres tests han donat resultats negatius (veure Snedeker 2001 i U.S.Department of health and human services 2002 per a revisió).

S'ha descrit que el diel·drín té propietats proinflamatòries, ja que actua activant els neutròfils quan són exposats a concentracions de 50 μ M de diel·drín per 30 minuts (Pelletier *et al.* 2001). L'activació dels neutròfils es dona per un mecanisme dependent de proteïna kinasa C (PKC) i tirosina-kinasa en neutròfils humans (Pelletier i Girard 2002) o per activació de la fosfolipasa A₂ en neutròfils de rata (Olivero *et al.* 2002).

Un estudi *in vitro* en cultius de cèl·lules d'ovari de hámster xinès (CHO-K1) descriu que l'exposició a dieldrín durant 24 hores produeix citotoxicitat amb una EC₅₀ de 65.9 ± 8.9 µg/ml (173 µM). El dieldrín a 10.5 ± 0.9 µg/ml (27.6 µM) incrementa el glutatió oxidat (24 hores d'exposició) de manera significativa i a 12.5 µg/ml (32.8 µM) produeix peroxidació lipídica (4 hores d'exposició) (Bayoumi *et al.* 2001).

1.6.- Els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel

En el present treball s'utilitzen cultius primaris de neurones. Un cultiu primari és aquell que s'obté directament a partir de l'animal i es manté *in vitro* més de 24 hores. Pot tractar-se de fragments de teixit (cultiu organotípic), com teixit dissociat en cèl·lules (cultiu de cèl·lules disperses) en el que s'ha perdut la organització tissular. En aquest últim cas, podem trobar cultius amb un sol tipus cel·lular (monotípics) o amb varis tipus (cultius mixtes).

Els cultius primaris d'aquest treball són cultius monotípics de neurones granulars de cerebel, ja que estan compostos bàsicament de neurones glutamatèrgiques (cèl·lules granulars de cerebel). Tot i això aquests cultius contenen també entre un 5 i un 10 % d'interneurones GABAèrgiques de tipus cistella i estrellades (Currie i Dutton 1980). La contaminació glial es manté en nivells inferiors al 5 % gràcies a l'addició d' un antimitòtic al medi de cultiu. Aquests cultius han estat considerats funcionalment madurs a 8 dies *in vitro* si es cultiven en condicions despolaritzants (25 mM KCl) (Peng *et al.* 1991), ja que en aquest moment tenen la capacitat d'alliberar glutamat de manera calci depenent (Gallo *et al.* 1982) i expressen de manera funcional receptors pel glutamat (Frandsen i Schousboe 1990; Kato *et al.* 1991; Griffiths *et al.* 1997). L'anàlisi ultraestructural d'aquests cultius a 8 dies *in vitro* mostra que existeixen contactes sinàptics, sobretot del tipus axodendrítics (Peng *et al.* 1991). També expressen de manera funcional el transportador neuronal de glutamat EAAT3 (Numakawa *et al.* 2001; Fonfría *et al.* 2005). A més, aquests cultius expressen gran quantitat de receptors GABA_A (Pomés *et al.* 1993; Vale *et al.* 1997; 2003), tal i com es dona en les neurones de la capa granular del cerebel que és on es troba la major part de receptors GABA_A del cerebel (Olsen i Mikoshiba 1978; Palacios *et al.* 1980). Aquest fet els converteix en un bon material per a estudis d'aquest receptor.

Per tal de mantenir els cultius de cèl·lules granulars de cerebel de rata es necessiten condicions despolaritzants (25 mM de K^+ o NMDA). En cas contrari, les neurones entren en apoptosi (Galli *et al.* 1995). Tanmateix, els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel d'algunes soques de ratolí (p. ex. Balb/C) no tenen aquest requeriment per a sobreviure durant llarg temps *in vitro* (Fujikawa *et al.* 2000). Les cèl·lules granulars de cerebel cultivades a 5.4 mM de K^+ i a 25 mM de K^+ presenten algunes diferències. S'ha descrit que els cultius de ratolí en medi amb 5.4 mM de K^+ difereixen dels cultivats amb 25 mM de K^+ , en què no alliberen glutamat en resposta a un estímul despolaritzant (50 mM de K^+). En ambdós cultius, però, les concentracions intracel·lulars de glutamat i glutamina són similars als 12 dies *in vitro* i es produeix entrada de Ca^{2+} estimulada per K^+ (Peng *et al.* 1991). També s'ha descrit que el patró de desenvolupament dels receptors NMDA i $GABA_A$ és diferent en cultius cultivats a 5.4 mM de K^+ i a 25 mM de K^+ . En referència al receptor NMDA, s'ha reportat que en els cultius cultivats en 25 mM de K^+ ràpidament s'indueix la subunitat NR2A i es regula a la baixa la NR2B, mentre que l'expressió de la NR2C s'indueix de manera gradual. En els cultius cultivats a 5 mM de K^+ , es donen els mateixos canvis però la subunitat NR2B disminueix de manera més gradual, de manera similar a com es dona *in vivo* (Vallano *et al.* 1996). Pel que fa al receptor $GABA_A$, Engblom *et al.* (2003) han descrit que en cultius cultivats a 25 mM de K^+ no s'expressen els receptors $GABA_A$ madurs propis de cerebel, ja que enlloc d'incrementar l'expressió de la subunitat α_6 , incrementa la α_5 . En el mateix treball es reporta que la viabilitat dels cultius obtinguts de ratolins NMRI es redueix en més del 50% en condicions no despolaritzants.

La injecció d'àcid kaínic en el cerebel de rosegadors produeix una degeneració de les neurones de purkinje, en cistella, estrellades i les Golgi, deixant inalterades les neurones granulars (Herndon i Coyle 1977). En cultius de cèl·lules granulars de cerebel es va proposar que l'addició de 50 μ M d'àcid kaínic al medi de cultiu eliminava selectivament les neurones $GABA$ èrgiques del cultiu permetent obtenir un cultiu pur de cèl·lules granulars de cerebel (Drejer i Schousboe 1989).

En el present treball s'ha utilitzat el model de cultiu de cèl·lules granulars de cerebel pel fet de què al contenir un gran nombre de neurones glutamatèrgiques permeten plantejar un estudi d'excitotoxicitat on el glutamat suposadament neurotòxic és alliberat per el propi cultiu, sense necessitat d'afegir-lo exògenament. Aquests cultius han estat utilitzats per a estudis d'alliberament de transmissors (per exemple Bak *et al.* (2004), Waagepetersen *et al.*(2005) i Ando *et al.* (2005)) i d'excitotoxicitat (per

exemple Dessi *et al.* (1993) Berman i Murray (1997) i Castilho *et al.* (1999)). La presència d'unes poques neurones GABAèrgiques i la gran densitat de receptors GABA_A ens permeten estudiar la modulació que pot tenir el neurotransmissor GABA en aquest mecanisme. A més, aquests cultius han estat àmpliament utilitzats per a l'estudi dels efectes dels plaguicides organoclorats (Pomés *et al.* 1993; Rosa *et al.* 1996; Huang i Casida 1996; Vale *et al.* 1997; 2003).