

4. RESULTATS

4.- RESULTATS

4.1.- Obtenció d'un model d'excitotoxicitat *in vitro* per alliberament de glutamat endogen

Per tal de produir un alliberament de glutamat de les cèl·lules granulars de cerebel en cultiu, que pogués al seu torn induir excitotoxicitat, es van provar dos sistemes diferents de despolarització de les cèl·lules, la veratridina, que obre els canals de Na⁺ dependents de voltatge i inhibeix la seva inactivació, i un increment isosmòtic en la concentració de K⁺ extracel·lular.

Els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel van ser exposats a veratridina 10 i 50 µM en el medi de cultiu i es va mesurar la lactat deshidrogenasa (LDH) en el medi de cultiu a diferents temps com a mesura de la citotoxicitat. En la figura 4.1 es mostra que la veratridina 10 µM va produir citotoxicitat a les 24 hores d'exposició, però no a temps d'entre 0.5 i 4 hores. D'altra banda, la concentració de veratridina 50 µM va produir citotoxicitat al temps més curt mesurat (30 minuts d'exposició) i aquesta no va incrementar amb el temps. En els mateixos cultius tractats amb veratridina es va mesurar el glutamat present en el medi de cultiu. Els resultats obtinguts pels temps de 0.5, 1 i 24 hores es representen en la taula 4.1. Tal i com es pot observar, no va haver-hi diferències significatives entre tractaments i temps d'exposició. No es podia doncs correlacionar la mort cel·lular produïda per la veratridina amb el glutamat present al medi extracel·lular.

Taula 4.1.- Concentracions de glutamat en el medi de cultiu, en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel exposats a veratridina 10 i 50 µM

Temps (h)	Control	Veratridina 10 µM	Veratridina 50 µM
0.5	0.028 ± 0.014	0.062 ± 0.031	N.D.
1	0.119 ± 0.042	0.116 ± 0.041	N.D.
24	0.061 ± 0.009	0.061 ± 0.009	0.114 ± 0.011

No hi ha diferències significatives entre les diferents concentracions de veratridina ni els diferents temps. N.D: glutamat no detectable. Els resultats es mostren com a mitjana ± SEM de 2 experiments diferents.

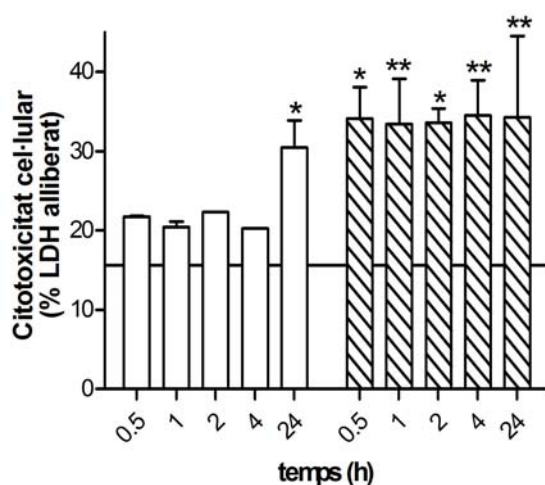


Figura 4.1.- Citotoxicitat en funció de la concentració de veratridina (10 µM, barres blanques i 50 µM, barres ratllades) i del temps d'exposició a aquesta. La veratridina es va exposar en medi de cultiu i l'activitat de la LDH es va mesurar al medi de cultiu a diferents temps i a les cèl·lules. Els resultats estan expressats com a % LDH alliberat, respecte el total de LDH de cada pou. $(LDH \text{ al pou} / (LDH \text{ medi} + LDH \text{ cèl·lules}) * 100)$ La barra horitzontal negra, marca el % de LDH alliberat en cultius control (15.6 %). * $P < 0.05$ i ** $P < 0.01$ vs control. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM de dos experiments, cadascun fet en triplicat.

D'altra banda, els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel es van exposar a diferents concentracions de K^+ en una solució salina tamponada amb HEPES (HBS) durant diferents períodes de temps. En aquest cas es va mesurar la citotoxicitat, mitjançant el mètode del MTT, 24 hores després de l'exposició a K^+ (veure materials i mètodes) i es va mesurar el glutamat en la solució HBS. En la figura 4.2A es mostra com l'exposició d'aquests cultius a 100 mM de K^+ per 5 minuts va produir citotoxicitat. Aquesta toxicitat no va incrementar amb exposicions de fins a 30 minuts de manera significativa. En la figura 4.2B es mostra el glutamat alliberat a la solució HBS en les mateixes condicions. La concentració de K^+ de 100 mM que va produir mort significativa també va incrementar significativament la concentració de glutamat en el medi d'exposició.

Com que amb la despolarització amb veratridina no es va observar glutamat alliberat, a diferència del que va succeir amb la despolarització amb K^+ , es van incubar els cultius amb veratridina i un inhibidor dels transportadors de glutamat, el L-TPDC, per tal de forçar les condicions d'exposició a glutamat en inhibir la seva recaptació. La figura 4.3 mostra que la incubació simultània dels cultius primaris de cèl·lules

granulars de cerebel per 5 minuts amb 50 μM de veratridina i 1 mM de L-tPDC en solució HBS amb 5.4 mM de K^+ va produir neurotoxicitat a les 24 hores (figura 4.3A), i que en aquest cas es va observar un increment important de glutamat en el medi d'exposició (figura 4.3B). D'altre banda, el L-tPDC per si sol, també va produir neurotoxicitat significativa, tot i no incrementar el glutamat significativament.

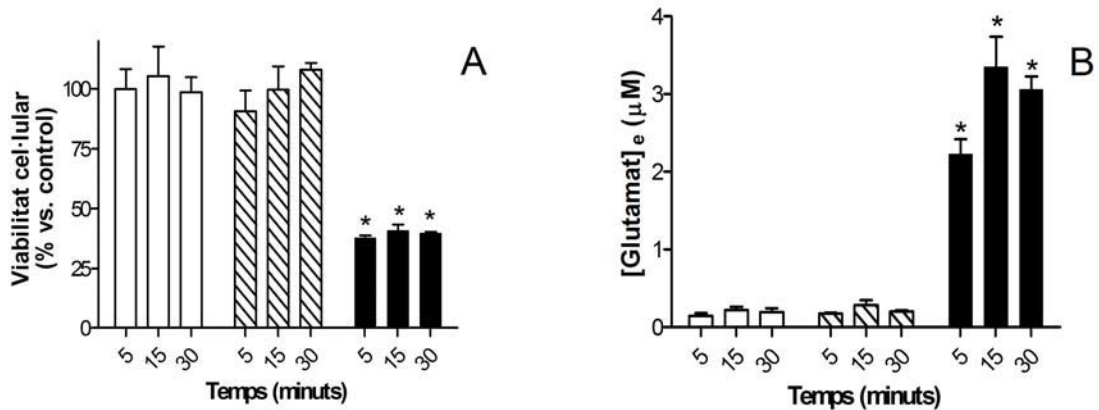


Figura 4.2.- Viabilitat cel·lular mesurada per el mètode del MTT (A) i glutamat alliberat en el medi d'exposició (B) en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebels exposats de 5 a 30 minuts a diferents concentracions de K^+ : 25 mM (barres blanques), 50 mM (barres ratllades) i 100 mM (barres negres). La gràfica representa la mitjana \pm SEM d'un cultiu fet amb triplicats. * $P < 0.001$ vs. el mateix temps amb 25 mM de K^+ . No hi ha diferències significatives entre els diferents temps d'exposició.

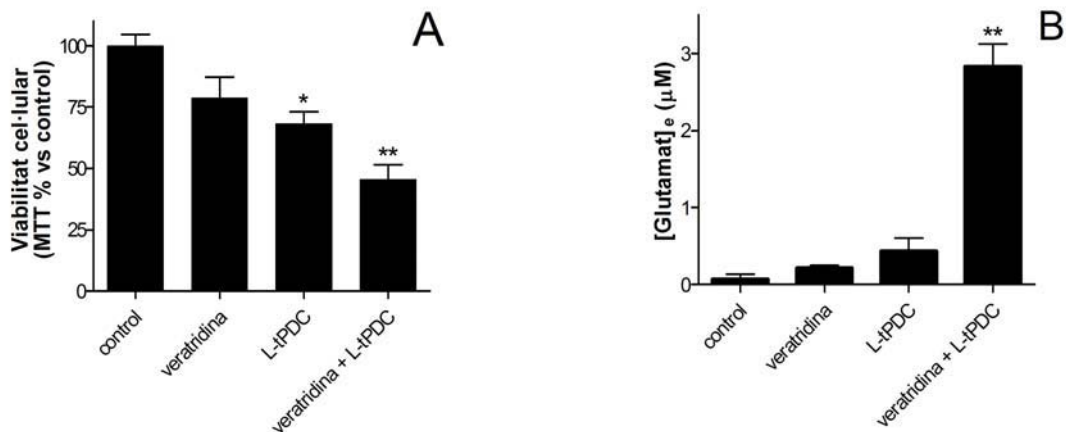


Figura 4.3.- Viabilitat cel·lular mesurada per el mètode del MTT (A) i glutamat alliberat en el medi d'exposició (B) en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel exposades per 5 minuts a 50 μM de veratridina i 1 mM de L-tPDC. La gràfica representa la mitjana \pm SEM de 6 pous provinents de 2 experiments. * $P < 0.05$ i ** $P < 0.001$ vs. control.

Per a veure si la neurotoxicitat produïda per la veratridina amb L-tPDC podia ser revertida per un antagonista del receptor NMDA, es van incubar els cultius amb 50 μ M de veratridina, 1 mM de L-tPDC i 10 μ M de MK-801. La figura 4.4 mostra que el MK-801 no va protegir de la mort produïda per veratridina i L-tPDC. El MK-801 tampoc va evitar la disminució de la viabilitat (no significativa) que es va produir amb 50 μ M de veratridina ni amb 1 mM de L-tPDC. Es conclou doncs, que la toxicitat que produeix la veratridina, no s'explica només pel mecanisme d'excitotoxicitat.

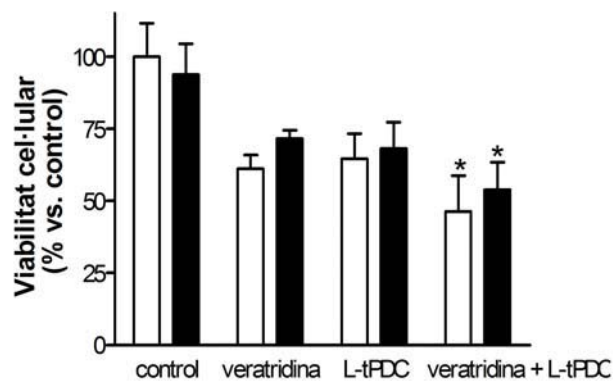


Figura 4.4.- Efecte de 10 μ M de MK-801 (absència de MK-801: barres blanques; presència de MK-801: barres negres) en la toxicitat produïda per exposició de 5 minuts a veratridina 50 μ M i a L-tPDC 1 mM, mesurada, pel mètode del MTT, a les 24 hores. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM d'un experiment en triplicat. No hi ha diferències significatives entre l'absència i la presència del MK-801. * $P < 0.05$ vs. els respectius controls.

Els resultats obtinguts en la figura 4.3 i 4.4 indicaren que la incubació per 5 minuts dels cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel amb 1 mM de L-tPDC, tot i no produir alliberament significatiu de glutamat, podia produir neurotoxicitat a les 24 hores de l'exposició. Cal tenir en compte que el L-tPDC és un inhibidor substrat dels transportadors de glutamat, de manera que és transportat a l'interior de les cèl·lules al mateix temps que produeix l'alliberament del glutamat citosòlic (Waagepetersen *et al.* 2001). Aquest efecte en la viabilitat neuronal podria doncs ser degut a un efecte intracel·lular del L-tPDC, o bé a una disfunció dels transportadors més perllongada en el temps que nosaltres no hauríem detectat. En motiu d'aquest resultat es va optar per utilitzar al llarg del treball, l'inhibidor dels transportadors de glutamat, no-transportable, TBOA.

Així doncs, havent rebutjat la veratridina com a agent inductor d'excitotoxicitat en els cultius de cèl·lules granulars de cerebel, i en vista dels resultats obtinguts amb la despolarització per alta $[K^+]_e$ (figura 4.2), es va realitzar una corba concentració-resposta analitzant, per diferents concentracions de K^+_e , el glutamat alliberat i la mort neuronal produïda. Els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel van alliberar glutamat endogen de manera significativa quan van ser exposats a $[K^+]_e \geq 70$ mM per 5 minuts (figura 4.5A). La viabilitat cel·lular va ser quantificada, 24 hores després de l'exposició de 5 minuts a K^+ . La figura 4.5B mostra que la viabilitat cel·lular, mesurada pel mètode del MTT, va ser significativament reduïda a $[K^+]_e \geq 80$ mM. La determinació de la viabilitat cel·lular per l'assaig del roig neutre va donar resultats similars, i mesurant pel mètode de la LDH, la toxicitat va ser significativa partir de 90 mM de $[K^+]_e$ (13.98 ± 1.79 i 26.51 ± 0.86 % LDH alliberat en 5 i 90 mM de K^+ respectivament; $P < 0.05$). Donada la similitud entre els mètodes, es va utilitzar l'assaig de MTT al llarg de l'estudi. Com que els cultius de cèl·lules granulars de cerebel es cultiven a una concentració de K^+ de 25 mM, i degut a que no es van observar diferències en la viabilitat en els cultius exposats a 5.4 o a 25 mM de K^+ , els controls es van fer a 25 mM de K^+ , a no ser que s'especifiqui el contrari. S'adoptà com a eina per a produir l'alliberament de glutamat i la mort neuronal la concentració de 100 mM de K^+ , a la qual ens referim com a alta $[K^+]_e$.

Utilitzant el mètode de despolarització per K^+ s'obtenia una bona correlació entre el glutamat alliberat en el medi d'exposició i la mort neuronal mesurada per MTT a les 24 hores posteriors ($r^2 = 0.9691$; $P < 0.0001$). En aquest cas la mort produïda per 100 mM de K^+ , va ser revertida utilitzant l'antagonista competitiu del receptor NMDA D-AP5 i l'antagonista no-competitiu MK-801 (figura 4.6). Per tal de comprovar que la neurotoxicitat produïda per l'exposició dels cultius a elevades $[K^+]_e$ és deguda al glutamat que s'allibera, es van exposar els cultius a 100 mM de K^+ , glutamat-piruvat transaminasa (GPT) i piruvat per tal de degradar el glutamat alliberat. El glutamat en la solució HBS va ser de 3.3 ± 0.6 i 1.3 ± 0.2 en absència i presència del GPT, respectivament ($P < 0.05$). En aquestes condicions no es va donar mort cel·lular, els valors de reducció del MTT van ser de 71.6 ± 7.7 i 102.6 ± 1.9 % respecte el control en absència i presència del GPT respectivament ($P < 0.05$). Així doncs, la despolarització per alta $[K^+]_e$ produïa, en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, mort per excitotoxicitat.

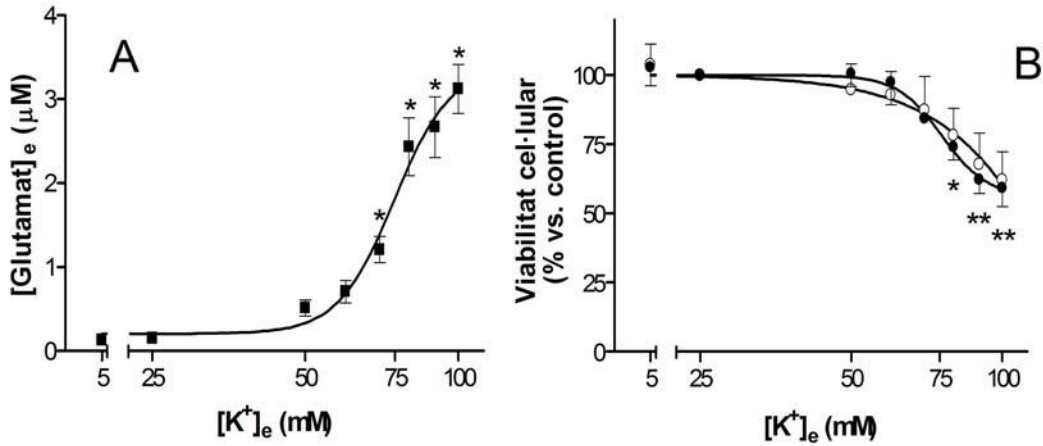


Figura 4.5.- (A) Alliberament de glutamat endogen induït per K^+ en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Els resultats estan expressats com a concentració de glutamat en la solució salina tamponada amb HEPES (HBS) després de 5 minuts d'exposició. Cada punt representa la mitjana \pm SEM de 8 experiments amb triplicats dins cada experiment. * $P < 0.001$ vs. 5.4 de mM K^+ . (B) Viabilitat cel·lular en funció de l'exposició a K^+ . Els cultius es van exposar a K^+ per 5 minuts i la viabilitat cel·lular es va determinar 24 hores més tard pel mètode del MTT (●) o pel del roig neutre (○). * $P < 0.05$ i ** $P < 0.001$ vs. 5.4 mM de K^+ . Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM de 2 a 4 experiments fets en triplicat.

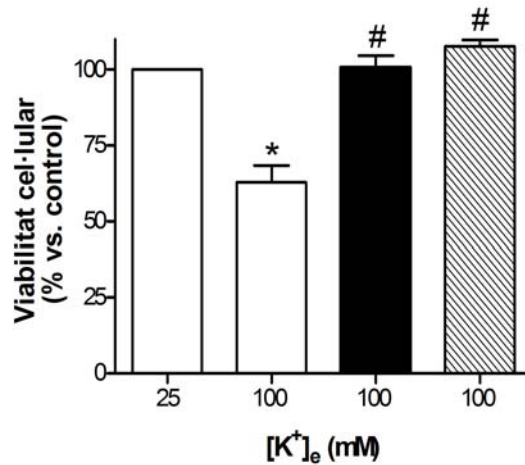


Figura 4.6.- Efecte dels antagonistes del receptor NMDA en la toxicitat induïda per 100 mM de K^+ . Barres blanques: solució HBS en absència de fàrmacs; barra negra: MK-801 (10 μ M); barra ratllada: D-AP5 (300 μ M). El MK-801 i el D-AP5 no van modificar la reducció de MTT en tampó amb 25 mM de K^+ . * $P < 0.001$ vs. 25 mM K^+ ; # $P < 0.001$ vs. 100 mM K^+ en tampó en absència de fàrmacs.

Per a saber si les cèl·lules continuaven alliberant glutamat després de l'estímul despolaritzant, es va quantificar el contingut de glutamat en el medi de cultiu recollit a les 24 hores de l'exposició a alta $[K^+]_e$. No es van trobar diferències entre les cèl·lules exposades per 5 minuts a 25 mM de K^+ i a 100 mM de K^+ (0.09 ± 0.03 i 0.16 ± 0.01 μ M, respectivament).

4.2.- Caracterització del model d'excitotoxicitat per exposició a alta $[K^+]_e$

Per a determinar si el glutamat alliberat per la despolarització amb alta $[K^+]_e$ era d'origen sinàptic o bé provenia de la reversió dels transportadors de glutamat, les cèl·lules es van exposar a K^+ en diferents condicions. Per a determinar l'origen calci-dependent del glutamat alliberat es van incubar els cultius amb medi lliure de calci i 3 mM d'EGTA, o bé amb 100 μ M de riluzole per inhibir l'alliberament per exocitosis (Jehle *et al.* 2000) (figura 4.7). L'alliberament de glutamat endogen va ser inhibit en un 79-86 % en medi lliure de calci i amb riluzole. Aquesta reducció de l'alliberament de glutamat va prevenir de la neurotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$ (els valors de reducció de MTT van ser de 99.7 ± 5.8 % respecte el control en medi lliure de calci i, amb riluzole els valors de reducció de MTT van passar del 66 % respecte el control amb alta $[K^+]_e$ a un 97 % respecte el control amb alta $[K^+]_e$ i riluzole).

Per a determinar l'alliberament degut a la reversió dels transportadors de glutamat es va utilitzar l'inhibidor no-transportable dels transportadors de glutamat, DL-treo- β -benziloxiaspartat (TBOA) (Bak *et al.* 2003) (figura 4.8). El TBOA (200 μ M) no tenia efecte sobre l'alliberament de glutamat induït per 100 mM de K^+ . En canvi, el TBOA va incrementar el glutamat alliberat per 25 mM de K^+ ($P < 0.001$). Això s'explicaria perquè el TBOA inhibeix la recaptació de glutamat alliberat degut a una despolarització mitjana (25 mM de K^+), que d'altre manera seria recaptat pels transportadors. El resultat obtingut amb 100 mM de K^+ i TBOA indicaria que aquesta concentració de K^+ seria capaç d'inhibir en aproximadament el 50 % la funció del transportador, de manera que si bé no hi hauria captació neta de glutamat cap a l'interior de les cèl·lules, tampoc hi hauria un alliberament net per part del transportador. Es quantifica aquesta disminució en la funcionalitat del transportador utilitzant la captació de $[^3H]$ -aspartat. (figura 4.9). En els cultius exposats a 25 i a 100 mM de K^+ , la captació de $[^3H]$ -aspartat va ser respectivament, de 95 ± 3.8 i 43.3 ± 1.9 %, respecte la captació a 5.4 mM K^+ .

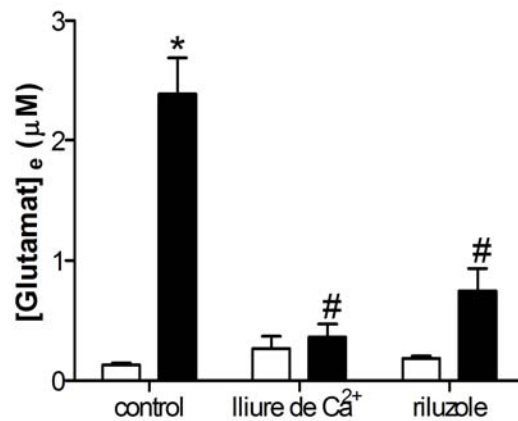


Figura 4.7.- Efecte de medi lliure de calci amb 3 mM d'EGTA, i 100 μM de riluzole en l'alliberament de glutamat en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel tractats amb 25 (barres blanques) i 100 mM de K⁺ (barres negres). Els resultats es mostren com a mitjana ± SEM de 2 a 7 experiments, cada un en triplicat. * $p < 0.001$ vs 25 mM de K⁺, # $P < 0.001$ vs 100 mM de K⁺ en condicions control.

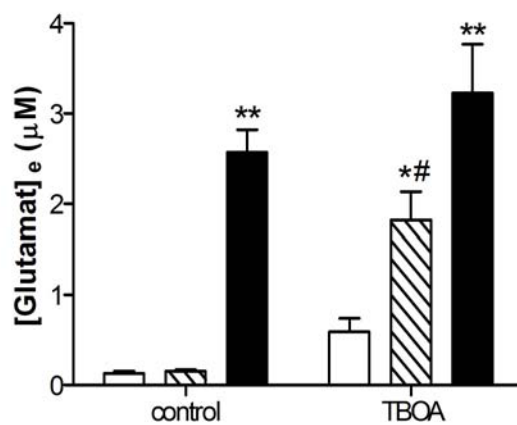


Figura 4.8 .- Efecte de 200 μM de DL-treo-β-benziloxiaspartat (TBOA), en l'alliberament de glutamat induït per 5.4 mM de K⁺ (barres blanques), 25 mM de K⁺ (barres ratllades) i 100 mM K⁺ (barres negres). Els resultats es mostren com a mitjana ± SEM de 4 a 8 experiments, cada un en triplicat. * $P < 0.05$ i ** $P < 0.001$ vs. el mateix tractament a 5.4 mM de K⁺. # $P < 0.001$ vs igual concentració de K⁺ en condicions control.

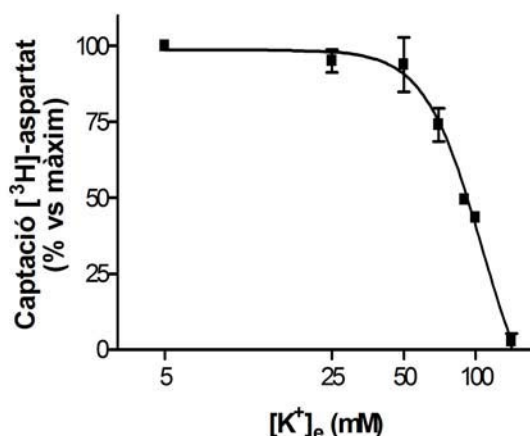


Figura 4.9.- Captació de [³H]-aspartat en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel amb diferents concentracions de K⁺_e. (La captació de [³H]-aspartat en 5.4 mM de K⁺ era de 5.8 ± 0.3 pmol/mg proteïna). Els punts representen la mitjana ± SEM de dos experiments cadascun fet en triplicat.

4.3.- Concentracions baixes de glutamat causen mort per excitotoxicitat en condicions despolaritzants

D'acord amb la figura 4.5, l'exposició a 80 mM de K⁺_e (la mínima concentració que produeix neurotoxicitat) va resultar en una concentració de glutamat en el medi d'exposició de 2.4 ± 0.3 μM (intervalls de confiança del 95 %: 1.6 - 3.2 μM) (les cèl·lules s'exposaren en un volum de 0.5 ml per pou en plaques de cultiu de 24 pous). Inversament, les cèl·lules es van exposar per 5 minuts a 3 μM de glutamat afegit exògenament en el medi amb 5.4 mM de K⁺ sense Mg²⁺, per tal de permetre l'obertura del receptor NMDA. Es va afegir TBOA (200 μM) per a evitar la captació del glutamat. La figura 4.10A mostra com el tractament de 5 minuts amb 3 μM de glutamat i TBOA va produir neurotoxicitat a les 24 hores de l'exposició. Ni el glutamat ni el TBOA per si sols van produir neurotoxicitat. En absència de TBOA es va produir una reducció del glutamat en el medi d'exposició de 3 μM a 1.8 ± 0.2 μM degut a la captació per part dels transportadors, mentre que l'exposició a glutamat més TBOA va resultar en una concentració de glutamat extracel·lular de 4.2 ± 0.6 μM (intervalls de confiança del 95 %: 2.3 - 6 μM), figura 4.10B. En conjunt aquests resultats indiquen que la concentració de glutamat llindar en què es produeix excitotoxicitat a través del receptor NMDA, en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, és aproximadament de 2 μM.

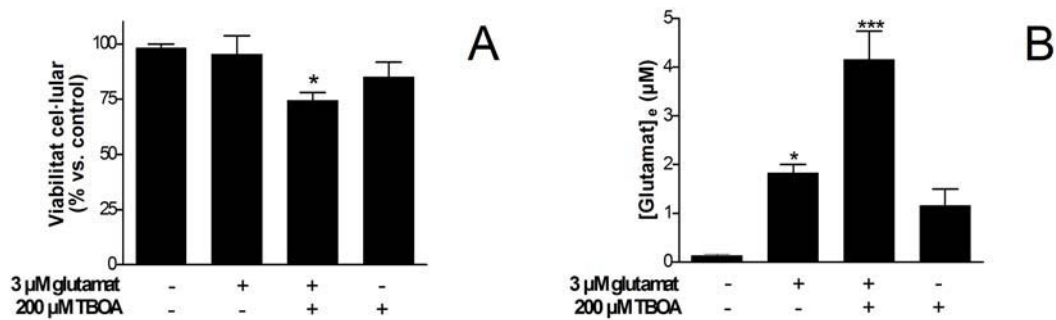


Figura 4.10.- Viabilitat cel·lular (A) i concentració de glutamat extracel·lular (B) en cultius primaris exposats per 5 minuts a glutamat afegit exògenament en medi lliure de magnesi contenint 5.4 mM de K^+ . El TBOA es va afegir per a evitar la captació de glutamat. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM de 3 a 4 experiments fets en triplicat. * $P < 0.05$ i *** $P < 0.001$ vs. les cèl·lules incubades amb solució HBS sense glutamat ni TBOA afegit.

Els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel contenen també una població de neurones GABAèrgiques (Damgaard *et al.* 1996; Kovacs *et al.* 2003). S'ha descrit que aquestes neurones GABAèrgiques són més vulnerables a la toxicitat de l'àcid kaínic (Drejer i Schousboe 1989). Per a veure si l'exposició a alta $[K^+]_e$ pot causar una mort selectiva d'aquest tipus neuronal es van marcar les neurones GABAèrgiques utilitzant un anticòs contra el GAD₆₇, i al mateix temps es va utilitzar iodur de propidi per a marcar els nuclis de les neurones mortes. Les cèl·lules GAD positives van ser un 5.9 ± 1.9 i 5.8 ± 1.9 % en cultius tractats amb 25 i 100 mM de K^+ respectivament. En els mateixos cultius el marcatge amb iodur de propidi va ser del 1.2 ± 0.2 % respecte el total de neurones en cultius tractats amb 25 mM de K^+ , i de 37.1 ± 9.4 % en els cultius tractats amb 100 mM de K^+ . Menys d'un 10 % (8.7 ± 2.6 %) de les cèl·lules GAD-positives van colocalitzar amb el iodur de propidi, descartant cap mena d'efecte selectiu sobre les neurones GABAèrgiques. La figura 4.11 mostra una imatge representativa de la immunocitoquímica de GAD i iodur de propidi en cultius exposats a 100 mM de K^+ .

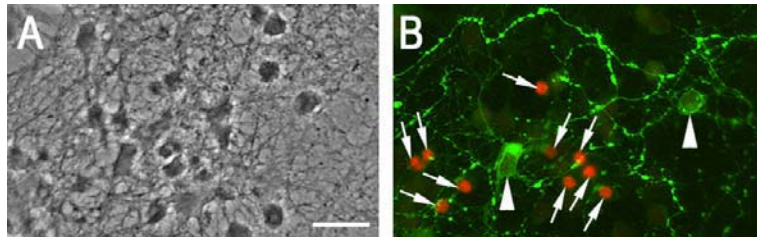


Figura 4.11.- Fotomicrografies dels cultius de cèl·lules granulars de cerebel després de l'exposició a 100 mM de K^+ . El mateix camp es mostra en contrast de fases (A) i en fluorescència (B). La immunofluorescència per la GAD_{67} es visualitza en color verd, les puntes de fletxa senyalen els cossos neuronals de les cèl·lules GAD positives. Les fletxes senyalen les cèl·lules mortes, marcades amb iodur de propidi (vermell). La barra dibuixada representa 20 μm . La fotomicrografia és representativa de 3 cultius diferents.

4.4.-Relació entre l'homeòstasi del clorur, l'alliberament de glutamat i la mort excitotòxica.

S'ha descrit que un increment isosmòtic en la $[K^+]_e$ i la conseqüent acumulació de K^+ en les cèl·lules, causa una entrada de Cl^- i d'aigua que produeix un inflament cel·lular (Schousboe i Pasantes-Morales 1989; Ochoa-de la Paz LD *et al.* 2005). L'exposició dels cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel a 100 mM de K^+ per 5 minuts va produir una entrada de clorur a l'interior de les cèl·lules (valors de captació de $^{36}Cl^-$ de 0.68 ± 0.03 i 1.88 ± 0.03 nmol $^{36}Cl^-$ /mg prot a 25 i a 100 mM de K^+ respectivament; $P < 0.0001$). L'observació microscòpica dels cultius mentre s'exposaren a 100 mM de K^+ donà una imatge compatible amb un inflament de les cèl·lules (figura 4.12).

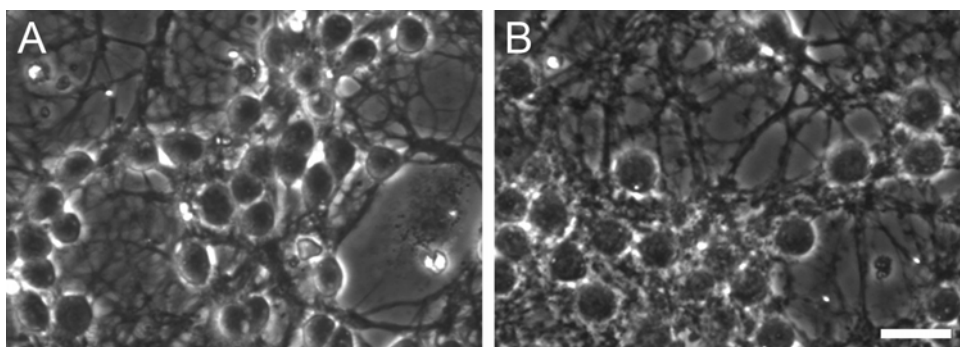


Figura 4.12.- Fotomicrografies dels cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel vistos en contrast de fases al ser exposats durant 5 minuts a 25 mM de K^+ (A) i a 100 mM de K^+ (B). La barra representa 20 μm .

Conseqüentment, es van estudiar les diferents vies de permeació dels ions clorur a la cèl·lula i la seva relació amb l'alliberament de glutamat i amb l'excitotoxicitat.

Es van provar en primer lloc els antagonistes del receptor GABA_A. La taula 4.2 mostra els efectes dels antagonistes de GABA_A sobre l'alliberament de glutamat i sobre la mort neuronal. Tant els antagonistes competitiu (bicucul·lina i SR95531) com els no-competitiu (picrotoxinina) van disminuir el glutamat alliberat per 100 mM de K⁺ i van protegir de la mort excitotòxica. També es van provar els efectes d'inhibidors de canals de clorur no operats per receptor: l'àcid 4,4'-diisotiocianat-estilbè-2,2'-disulfònic (DIDS), l'àcid niflúmic, l'àcid 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoic (NPPB), l'àcid 9-antracecarboxílic i el tamoxifèn; i de l'inhibidor del cotransportador de Na⁺-K⁺-Cl⁻ (NKCC), bumetanida (Frings *et al.* 2000; Jentsch *et al.* 2002; Beck *et al.* 2003). L'àcid niflúmic i el NPPB van inhibir completament l'alliberament de glutamat i la mort neuronal induïda per l'alta [K⁺]_e, mentre que 100 μM de DIDS va reduir parcialment l'alliberament de glutamat induït per alta [K⁺]_e, però no va protegir de la mort neuronal. (Taula 4.3). Ni 200 μM d'àcid 9-antracecarboxílic ni 5 μM de tamoxifèn van canviar els efectes produïts per l'exposició a alta [K⁺]_e. La bumetanida a 10 μM tampoc va modificar l'alliberament de glutamat ni la mort induïda per alta [K⁺]_e. En cultius de neurones corticals s'ha descrit que l'activitat del transportador NKCC està regulada en el desenvolupament (Sun i Murali 1999). Per això es va assajar l'efecte de la bumetanida a 8, 12 i 15 dies *in vitro*. Com que no es van trobar diferències entre aquests diferents temps, les dades en la taula 4.2 representen la mitjana de les dades obtingudes a diferents dies *in vitro*.

Taula 4.2.- Efectes dels antagonistes del receptor GABA_A en l'alliberament de glutamat induït per alta [K⁺]_e i en l'excitotoxicitat en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel.

	[Glutamat] _e (μM)		Viabilitat cel·lular (MTT % vs. control)	
	25 mM K ⁺	100 mM K ⁺	25 mM K ⁺	100 mM K ⁺
Control (6)	0.14 ± 0.03	2.18 ± 0.43***	100	71.8 ± 4.3***
100 μM Bicucul·lina (3)	0.23 ± 0.07	1.14 ± 0.15 ⁺	97.5 ± 2.9	104.3 ± 4.6***
100 μM Picrotoxinina (4)	0.15 ± 0.02	1.21 ± 0.22*, ⁺	103.2 ± 4.4	100.2 ± 4.5***
100 μM SR 95531 (2)	0.15 ± 0.11	0.59 ± 0.20 ⁺	101.8 ± 5.1	106.73 ± 6.7***

* $P < 0.05$ i *** $P < 0.001$ vs. el mateix tractament a 25 mM K⁺; + $P < 0.05$ i *** $P < 0.001$ vs. exposició a 100 mM K⁺ en solució control. Els resultats es mostren en mitjana ± SEM de (n) experiments fets en triplicat.

Taula 4.3.- Efectes dels bloquejants de canals de Cl en l'alliberament de glutamat induït per alta $[K^+]_e$ i la mort excitotòxica en cultius primaris de cèl.lules granulars de cerebel.

	[Glutamat] _e , (μM)		Viabilitat cel·lular (MTT, % del control)	
	25 mM K ⁺	100 mM K ⁺	25 mM K ⁺	100 mM K ⁺
Control (13)	0.13 ± 0.01	2.59 ± 0.24***	100	63.63 ± 2.5 ***
100 μM DIDS (4)	0.27 ± 0.09	1.68 ± 0.31*, ⁺	96.9 ± 7.3	68.9 ± 3.7***
100 μM àcid niflúmic (3)	0.18 ± 0.03	0.94 ± 0.15***	105.7 ± 4.8	100.5 ± 5.7***
100 μM NPPB (2)	0.09 ± 0.01	0.83 ± 0.23**	105.0 ± 5.4	103.4 ± 2.7***
10 μM bumetanida (4)	0.15 ± 0.02	2.22 ± 0.68***	99.4 ± 3.8	61.1 ± 3.7***
5 μM tamoxifèn (3)	0.15 ± 0.004	1.94 ± 0.40**	83.9 ± 9.1	59.4 ± 0.7*
200 μM 9-AC (3)	0.14 ± 0.02	2.39 ± 0.32***	100.2 ± 0.4	71.6 ± 6.0*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ i *** $P < 0.001$ vs. el mateix tractament a 25 mM K⁺; ⁺ $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ i *** $P < 0.001$ vs. 100 mM K⁺ en solució control. Els resultats es mostren com a mitjana ± SEM de (n) experiments fets en triplicat. 9-AC: àcid 9-antracecarboxílic.

Es va determinar si la protecció per els antagonistes del receptor GABA_A, per l'àcid niflúmic i pel NPPB anava acompanyada per una reducció del flux de clorur estimulat per alta $[K^+]_e$. La figura 4.13 demostra que la picrotoxinina (100 μM) va reduir significativament la captació de $^{36}\text{Cl}^-$ induïda per alta $[K^+]_e$. Ni l'àcid niflúmic ni el NPPB van reduir la captació de $^{36}\text{Cl}^-$ induïda per alta $[K^+]_e$. El fet de què ni el NFA ni el NPPB reduïssin el flux de $^{36}\text{Cl}^-$ als 5 minuts, podria ser degut al què s'estigués utilitzant l'assaig en condicions de saturació, es per això que es va analitzar la linealitat de l'assaig de captació de $^{36}\text{Cl}^-$ respecte al temps d'incubació i respecte a la concentració de $^{36}\text{Cl}^-$. En la figura 4.14 es mostra com la linealitat es va mantenir fins als 5 minuts d'incubació (figura 4.14A) i en una rang de concentracions de 0.7 a 3 μCi/ml de $^{36}\text{Cl}^-$ (figura 4.14B), per tant el nostre assaig no es trobava en condicions de saturació.

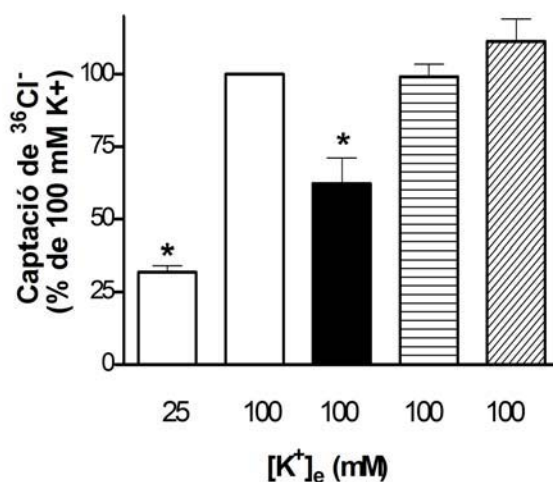


Figura 4.13.- Efectes de la picrotoxina, l'àcid niflúmic i el NPPB en l'entrada de ³⁶Cl⁻ induïda per alta [K⁺]_e. Els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel es van exposar a solució salina tamponada amb HEPES contenint 25 o 100 mM de K⁺ en absència de fàrmacs afegits (barres blanques), o amb 100 μM de picrotoxina (barra negra), 100 μM d'àcid niflúmic (barra amb línies horitzontals) o 100 μM de NPPB (barres amb línies diagonals). Les dades s'expressen com a percentatge de la captació de la captació de ³⁶Cl⁻ en cèl·lules exposades a 100 mM de K⁺ sense fàrmacs afegits. Els resultats es mostren com a mitjana ± SEM de 3 a 6 experiments, fets en triplicat. Cap dels fàrmacs va modificar la captació de ³⁶Cl⁻ en 25 mM de K⁺. * P < 0.001 vs. 100 mM de K⁺ en solució en absència de fàrmacs.

S'ha descrit que l'àcid niflúmic podria modular la funció del receptor GABA_A i del receptor NMDA (Lerma i Martin 1992; Sinkkonen *et al.* 2003). És per això que es va provar si la concentració d'àcid niflúmic que estàvem utilitzant en aquest treball estava actuant en els receptors GABA_A o en els receptors NMDA de les cèl·lules granulars de cerebel, mesurant l'entrada de ³⁶Cl⁻ induïda per GABA, i la fluorescència del Fluo-3 al estimular amb NMDA. L'àcid niflúmic a 100 μM no va antagonitzar els efectes dels agonistes del receptor GABA_A, ni del receptor NMDA (taula 4.4). En canvi es va observar una completa inhibició dels efectes mesurats per els antagonistes picrotoxina i MK801 en el receptor GABA_A i en els receptor NMDA, respectivament.

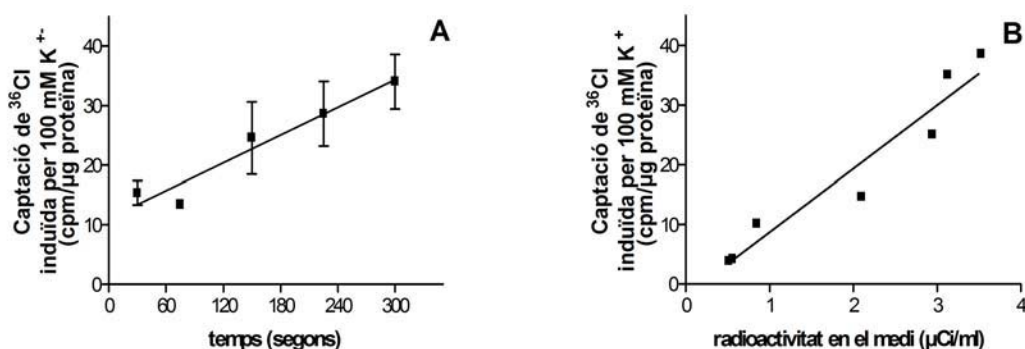


Figura 4.14.- Assaig de linealitat de la captació de ^{36}Cl induïda per 100 mM de K^+ en funció del temps d'exposició (A) i de la radioactivitat en el medi (B). La figura A es mostra com a mitjana \pm SEM de 3 experiments fets en triplicat, $r^2 = 0.9357$, $P < 0.01$. En la figura B es mostren els punts obtinguts en 7 experiments fets en triplicat en els que es va utilitzar un temps d'incubació de 5 minuts; $r^2 = 0.9305$, $P < 0.001$.

Taula 4.4.- Efectes dels bloquejants de canals de Cl^- en els receptors GABA_A i NMDA

	Receptor GABA_A Captació de $^{36}\text{Cl}^-$ (nmol $^{36}\text{Cl}/\text{mg}$ proteïna)	Receptor NMDA Fluorescència de Fluo-3 (unitats arbitràries)
Basal	0.85 \pm 0.09	6.71 \pm 0.81
Agonista	1.38 \pm 0.06 ***	10.92 \pm 0.57**
Agonista + 100 μM àcid niflúmic	1.20 \pm 0.07 *	10.71 \pm 0.50**
Agonista + 10 μM MK-801	N.D.	6.70 \pm 1.07**
Agonista + 100 μM picrotoxinina	0.87 \pm 0.03 ***	N.D.

La concentració d'agonista era 100 μM de GABA i de NMDA. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM de 4-7 pous provinents de 2 experiments independents. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. valor basal, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. agonista. N.D.: no determinat.

4.5.-La mort neuronal induïda per l'exposició a alta concentració de glutamat en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, és dependent de receptors NMDA i GABA_A i de canals de Cl^- sensibles a àcid niflúmic i a NPPB.

Els resultats obtinguts indicaren doncs, que davant d'una agressió excitotòxica (100 mM de K^+) es produïa mort neuronal, que podia ser previnguda per antagonistes dels receptors NMDA i GABA_A i pels bloquejants de canals de Cl^- , àcid niflúmic i NPPB. Es

va voler comprovar si aquests fàrmacs, també resultaven protectors quan l'excitotoxicitat s'indueïa per 100 μM de glutamat afegit exògenament en solució HBS amb 25 mM de K^+ . Es va demostrar, que també en aquest cas, tots aquests fàrmacs bloquejaven l'excitotoxicitat (figura 4.15).

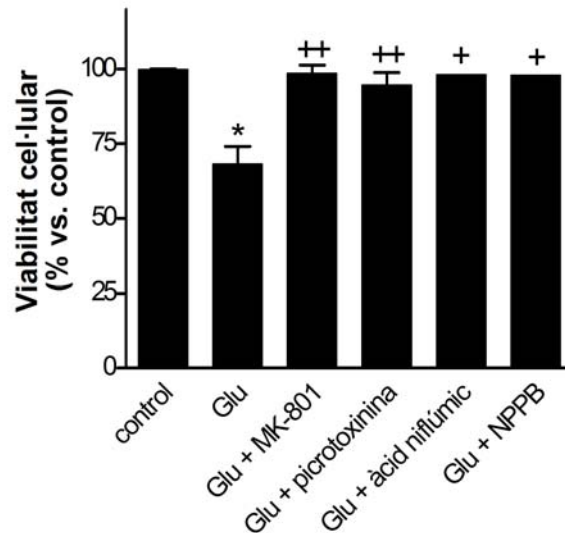


Figura 4.15.- Excitotoxicitat induïda per glutamat en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel en 25 mM de K^+ . Els cultius es van exposar per 5 minuts a 100 μM de glutamat en solució HBS contenint 25 mM de K^+ en absència i presència de 10 μM de MK-801 i 100 μM de picrotoxina, d'àcid niflúmic i de NPPB. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM de 3 experiments fets en triplicat, excepte per les barres de l'àcid niflúmic i del NPPB on es va realitzar un experiment per triplicat, en aquest últim cas es va fer l'estadística amb els propis controls de l'experiment. * $P < 0.01$ vs. cultius control; ** $P < 0.01$ i + $P < 0.05$ vs. tractament amb glutamat.

4.6.- Importància de la neurotransmissió GABAèrgica en la mort excitotòxica

L'exposició dels cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel a 100 mM de K^+ va produir també alliberament de GABA ($0.66 \pm 0.05 \mu\text{M}$ en 25 mM de K^+ i $1.62 \pm 0.26 \mu\text{M}$ en 100 mM de K^+ ; $P < 0.001$). Aquest GABA alliberat podria activar els receptors de GABA expressats en els cultius de cèl·lules granulars de cerebel. (Pomés *et al.* 1993; Vale *et al.* 1997; 2003) Els resultats de la taula 4.2 i de la figura 4.13 ens van portar a verificar si l'alliberament de GABA de les cèl·lules GAD-positives presents al cultiu, podria estar activant els receptors GABA_A i estar involucrat amb l'alliberament

de glutamat i l'excitotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$. Drejer i Schousboe (1989) van descriure que es pot obtenir un cultiu pur de cèl·lules granulars de cerebel, lliure de neurones GABAèrgiques, si s'addiciona àcid kaínic a la concentració de 50 μM al medi de cultiu. Així doncs, en el present treball, es van exposar els cultius crònicament a àcid kaínic 50 μM des de el dia 0 *in vitro*. El tractament dels cultius amb àcid kaínic va eliminar completament l'alliberament de GABA estimulat per alta $[K^+]_e$, passant de concentracions de $1.62 \pm 0.26 \mu\text{M}$ en cultius control a $0.10 \pm 0.04 \mu\text{M}$ en cultius tractats amb àcid kaínic. ($P < 0.001$). Utilitzant aquest paradigma es va trobar que l'exposició dels cultius a 100 mM de K^+ no produïa mort neuronal en cultius tractats amb àcid kaínic. El percentatge de reducció del MTT a les 24 hores de l'exposició a 100 mM de K^+ va ser de $103.9 \pm 1.87 \%$ respecte als cultius exposats a 25 mM de K^+ . A més, es van exposar els cultius tractats amb àcid kaínic a glutamat exogen per 5 minuts, en condicions de receptor NMDA activat, i se'n va determinar la viabilitat 24 hores més tard. En aquests casos 100 μM de glutamat no va produir toxicitat, ni quan es va exposar en solució HBS amb 5.4 mM de K^+ i lliure de Mg^{2+} , ni en solució HBS completa contenint 25 mM o 100 mM de K^+ (els valors de MTT estaven en el rang de 93.3-98.5 % respecte el control). El glutamat a concentració 1 mM tampoc va produir toxicitat (dades no mostrades). En canvi, l'exposició dels cultius no tractats amb àcid kaínic a 100 μM de glutamat en 25 mM de K^+ va reduir la viabilitat neuronal a $65.12 \pm 3.0 \%$ ($P < 0,001$ vs. els cultius control, en absència de glutamat). Arran dels resultats obtinguts, es va determinar si els receptors de NMDA eren funcionals en els cultius tractats amb àcid kaínic, utilitzant com a mesura la fluorescència del Fluo-3 en resposta a canvis en la concentració de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induïts per NMDA. La figura 4.16 mostra la corba concentració-resposta de NMDA- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en cultius tractats amb àcid kaínic. En un experiment representatiu, utilitzant cultius tractats amb àcid kaínic, el NMDA a 100 μM va induir un increment en el calci intracel·lular de $133.8 \pm 18.5 \text{ nM}$ a $408.6 \pm 44.9 \text{ nM}$. Així doncs, malgrat que en els cultius tractats amb àcid kaínic no es produeix neurotoxicitat per exposició a elevades concentracions de glutamat, presenten receptors NMDA funcionals.

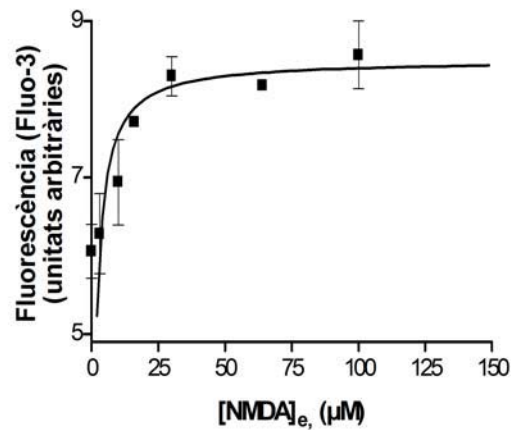


Figura 4.16.- Corba concentració-resposta de la fluorescència del Fluo-3 induïda per NMDA en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel tractades amb 50 µM d'àcid kaïníc. Les cèl·lules es van carregar amb Fluo-3 i es va quantificar la fluorescència induïda per NMDA en un lector de plaques (Ex485/Em530). Cada punt representa la mitjana \pm SEM dels valors de 2 experiments fets en triplicat.

4.7.- Efecte de l'àcid kaïníc sobre els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel

L'efecte de l'àcid kaïníc sobre els cultius de cèl·lules granulars de cerebel es va visualitzar mitjançant una immunocitoquímica amb l'anticòs GAD₆₇. La figura 4.17 mostra els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel (a-d) en contrast de fase i amb fluorescència verda marcant les neurones GABAèrgiques. Es va comprovar que en aquells cultius tractats amb àcid kaïníc hi havia també neurones GAD-positives. El contatge de les neurones GAD-positives va ser per els cultius control de 6.0 ± 1.3 % de les cèl·lules totals i en cultius tractats amb àcid kaïníc de 5.4 ± 0.5 % del total (mitjana \pm SEM), aquesta diferència no era significativa. En la imatge hi ha també les fotomicrografies de un cultiu de neurones corticals, que al ser un cultiu eminentment GABAèrgic presenta un extès marcatge de GAD₆₇.

Tot i que el tractament amb àcid kaïníc no va variar la morfologia general del cultiu com es pot veure en les fotografies de contrast de fases, ni el nombre de cèl·lules GAD-positives, la fluorescència del GAD₆₇ va disminuir en les neurites. En la figura 4.18 es mostra amb més detall com les neurites de les cèl·lules GAD positives control

mostren una fluorescència puntejada, mentre que aquesta desapareix en les cèl·lules tractades amb KA.

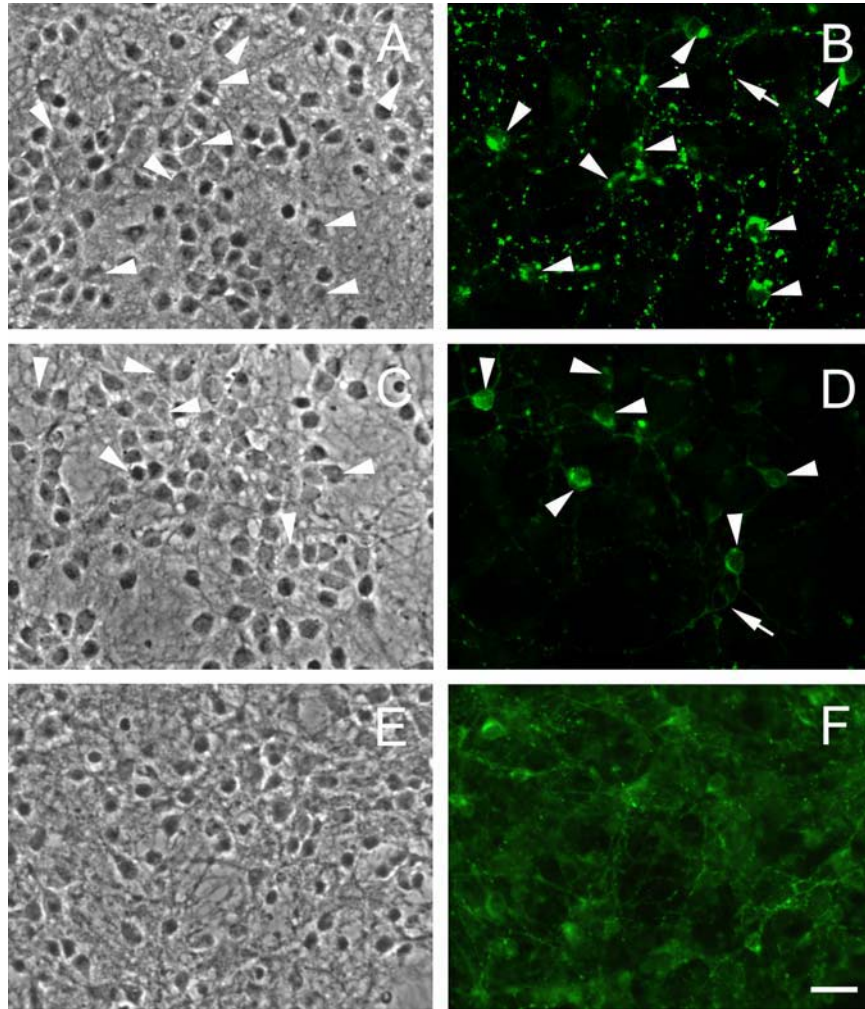


Figura 4.16.- Fotomicrografies de cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel (A - D) i de cultius primaris de neurones corticals (E - F), on es mostra el mateix camp en contrast de fase i amb fluorescència verda marcant les cèl·lules GAD₆₇ positives. (A i B) cultius de cèl·lules granulars de cerebel cultivats sense àcid kaïníc afegit, (C i D) cultius de cèl·lules granulars de cerebel cultivats en presència de 50 μM d'àcid kaïníc, (E i F) cultius de cèl·lules corticals. Les puntes de fletxa i les fletxes indiquen els cossos neuronals i les neurites respectivament. Barra = 20 μm. Les fotomicrografies són representatives de 8 pouets diferents de 2 cultius independents.

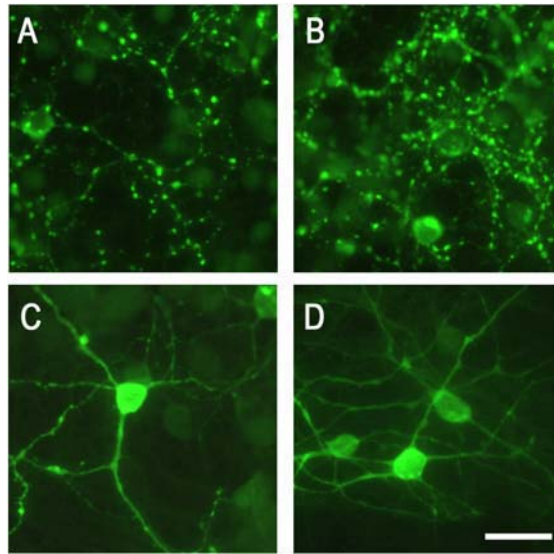
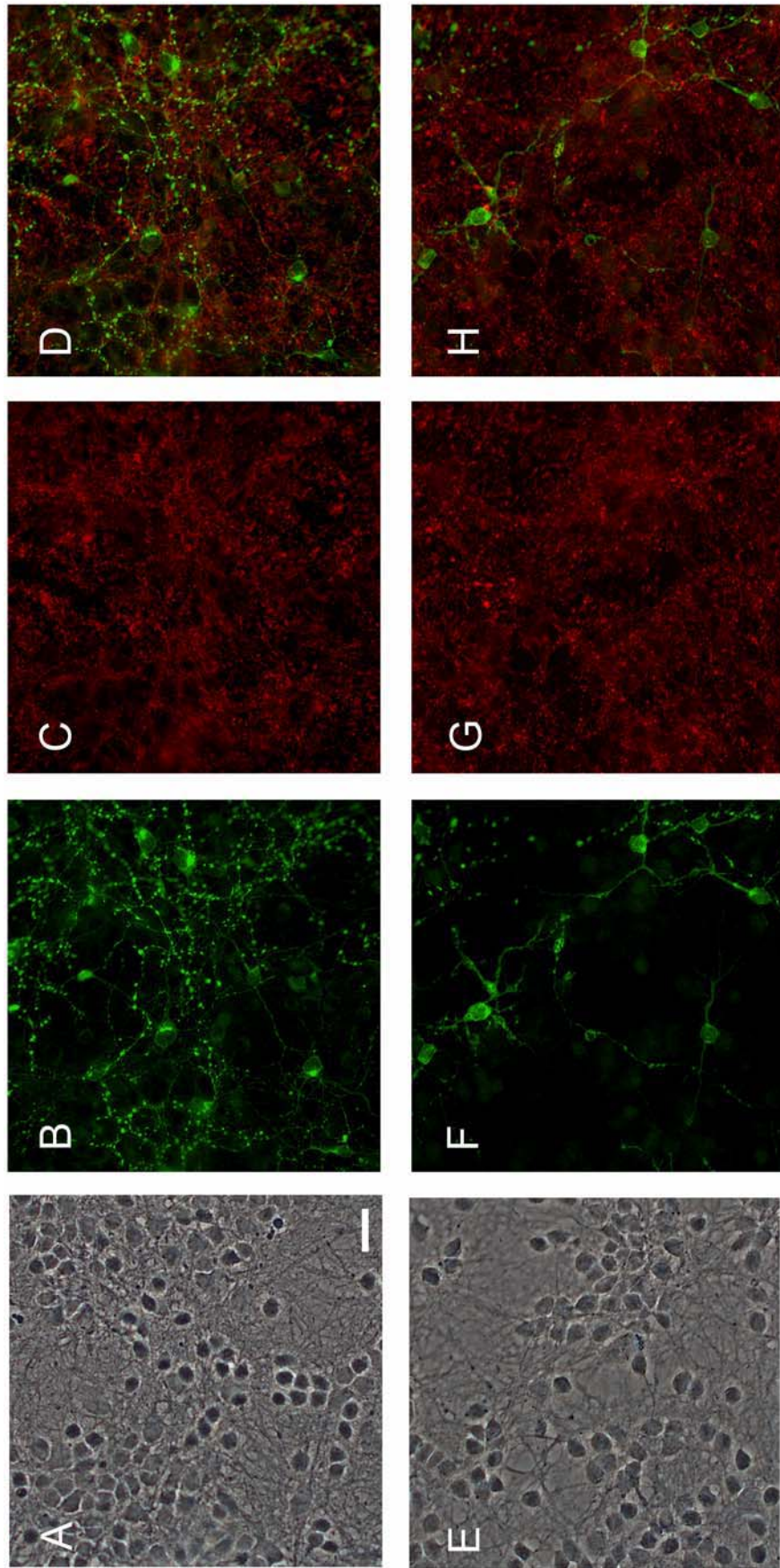


Figura 4.18.- Immunofluorescència pel GAD_{67} en cultius de cèl·lules granulars de cerebel control (A i B) i tractats amb $50 \mu M$ d'àcid kaïníc (C i D). Les fotomicrografies corresponen a diferents pous del mateix cultiu. Barra = $20 \mu m$.

Les cèl·lules granulars del gir dentat de l'hipocamp que projecten a través de les fibres molsoses, són cèl·lules considerades glutamatèrgiques, tot i això, s'ha demostrat que aquestes cèl·lules tenen la capacitat d'expressar GAD i de produir per tant GABA. S'ha demostrat que les convulsions produïdes per àcid kaïníc en rata incrementen l'expressió del GAD en aquestes cèl·lules en més d'un 300 % (Gutierrez 2003; Sperk *et al.* 2003). Per aquesta raó, i davant l'evidència de què amb el tractament d'àcid kaïníc en les cèl·lules granulars de cerebel, hi havia neurones GAD-positives, es va valorar la possibilitat de què les neurones GAD-positives compartissin l'expressió de característiques de fenotip glutamatèrgic (v-glut, el transportador vesicular de glutamat). Tal i com es mostra en la figura 4.19, el marcatge dels cultius amb l'anticòs contra el VGLUT1 va marcar una densa xarxa de neurites, que aparentment no va ser modificada pel tractament amb àcid kaïníc. Les neurites marcades positives per el VGLUT1 no colocalitzaren amb aquelles positives pel GAD, tal com es pot veure amb més detall en la figura 4.20, obtinguda per microscopia confocal.

Figura 4.19 (pàgina següent).- Fotomicrografies de cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel control (A – D) i tractats amb àcid kaïníc (E –H) on es mostra el mateix camp en contrast de fase (A i E), amb fluorescència verda marcant les cèl·lules GAD_{67} positives (B i F), amb fluorescència vermella marcant les neurites positives per VGLUT1 (C i G) i les imatges compostes (D i H). Barra = $20 \mu m$. Les fotomicrografies són representatives de 3 cultius independents.



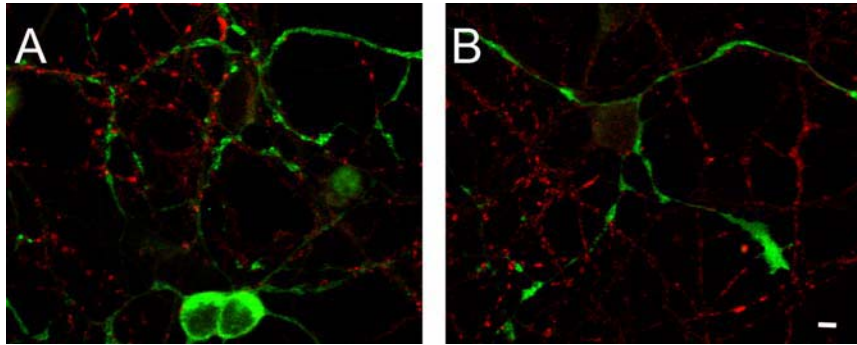


Figura 4.20.- Fotomicrografies dels mateixos cultius que en la figura 4.18, obtingudes per microscòpia concocal. En verd es mostra la GAD₆₇ i en vermell el VGLUT1. (A) cultius sense àcid kaínic i (B) cultius amb 50 μ M d'àcid kaínic. Barra = 2 μ m.

4.8.- El plaguicida organoclorat dieldrín és altament persistent en medi de cultiu

El tercer i quart objectius de la present tesi es centaven en l'estudi la modulació que poden exercir concentracions baixes de plaguicides organoclorats sobre els sistemes glutamatèrgic i GABAèrgic i sobre el model l'excitotoxicitat en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, quan aquests estan exposats durant varis dies en cultiu. Les cèl·lules granulars de cerebel en cultiu moren quan es substitueix el medi per medi fresc (Schramm *et al.* 1990) i per tant el medi de cultiu no es canvia. A més, per a dissoldre els plaguicides s'utilitza DMSO, de manera que per tal de no exposar les cèl·lules a concentracions creixents de DMSO es pretenia tractar els cultius una sola vegada amb el plaguicida. A fi de conèixer l'estabilitat química dels diferents plaguicides organoclorats durant el tractament, es va determinar la concentració de plaguicida després de diferents temps en medi de cultiu a 37°C. La taula 4.5 mostra com mentre la concentració de dieldrín no va disminuir en 8 dies en medi de cultiu, el lindà i el α -endosulfan van degradar-se ràpidament. Així doncs es va optar per a fer els estudis amb només un d'aquests plaguicides, el dieldrín.

Taula 4.5.- Degradació dels plaguicides organoclorats en medi de cultiu a 37 °C en funció del temps.

Concentració (µM)	Dieldrín	α-Endosulfan	Lindà
inicial	6 µM	6 µM	6 µM
24 hores	5.7 µM	2.5 µM	4.0 µM
8 dies	5.7 µM	0.1 µM	0.2 µM

Els resultats mostren les concentracions de plaguicides obtingudes en una sola determinació.

4.9.- El dieldrín disminueix l'alliberament de glutamat i protegeix de la neurotoxicitat produïda per alta $[K^+]_e$

S'ha descrit que el dieldrín bloqueja el flux de clorur a través del receptor GABA_A (Vale *et al.* 2003). Es va comprovar doncs, si el dieldrín, a l'igual que els antagonistes del receptor GABA_A, podia reduir l'alliberament de glutamat i la mort neuronal induïda per exposició dels cultius a alta $[K^+]_e$ per 5 minuts. Ja que el dieldrín és un compost altament lipofilic es va pre-incubar durant 10 minuts en el medi de cultiu abans de l'exposició a alta $[K^+]_e$, durant la qual també va estar present. La figura 4.21 mostra que la concentració de dieldrín de 3 µM va disminuir l'alliberament de glutamat i va protegir de la toxicitat induïda per alta $[K^+]_e$ de manera significativa.

4.10.-Tractaments perllongats amb una concentració subcitotòxica de dieldrín disminueixen l'alliberament de glutamat i protegeixen de la neurotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$

La incubació perllongada dels cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel amb 3 µM de dieldrín no va causar mort neuronal (valors de reducció de MTT respecte el control de $100 \pm 5.6 \%$ i $104 \pm 5.0 \%$ en cultius control i tractats amb dieldrín, respectivament), ni peroxidació lipídica (concentració de 8-isoprostà de 84.51 ± 3.99 pg/ml i 76.85 ± 12.26 pg/ml en cultius control i tractats amb dieldrín, respectivament). Aquest tractament, però, va canviar la resposta dels cultius davant de l'estímul excitotòxic (alta $[K^+]_e$). Tal i com es mostra en la figura 4.22, en els cultius tractats amb 3 µM de dieldrín de manera perllongada no es produí mort neuronal al exposar-los a

100 mM de K^+ i l'alliberament de glutamat fou inferior al llindar citotòxic (aproximadament 2 μM). L'alliberament de glutamat i la neurotoxicitat no van variar quan abans de l'exposició a 100 mM de K^+ es van rentar amb solució HBS amb 25 mM de K^+ i un 2% de BSA per tal d'eliminar més eficaçment el dieldrín unit a les cèl·lules (Llorens *et al.* 1990) (dades no mostrades).

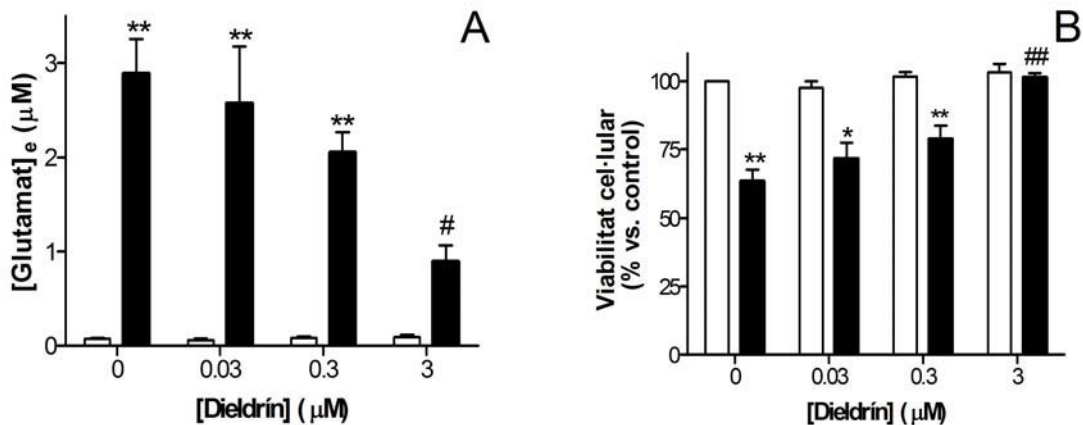


Figura 4.21.- Alliberament de glutamat endogen induït per K^+ en 5 minuts d'exposició (A) i viabilitat cel·lular (B) en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, pre-incubats amb dieldrín durant 10 minuts i exposats a 25 mM de K^+ (barres blanques) o a 100 mM de K^+ (barres negres) en presència de dieldrín. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM de 2-3 experiments fets en triplicat. * $P < 0.01$ i ** $P < 0.001$ vs. la mateixa concentració de dieldrín a 25 mM K^+ . # $P < 0.05$ i ## $P < 0.01$ vs. 100 mM de K^+ en absència de dieldrín.

Per a conèixer la funcionalitat del receptor GABA_A després de la incubació dels cultius amb dieldrín de 2 a 8-12 dies *in vitro* es va determinar la captació de $^{36}\text{Cl}^-$ induïda per GABA en cultius control i en cultius tractats amb dieldrín. El tractament amb 0.3 μM de dieldrín no va produir canvis significatius en la captació de $^{36}\text{Cl}^-$ estimulada per GABA, en canvi, el tractament amb 3 μM de dieldrín va disminuir de manera significativa la captació màxima de $^{36}\text{Cl}^-$ (taula 4.6 i figura 4.23).

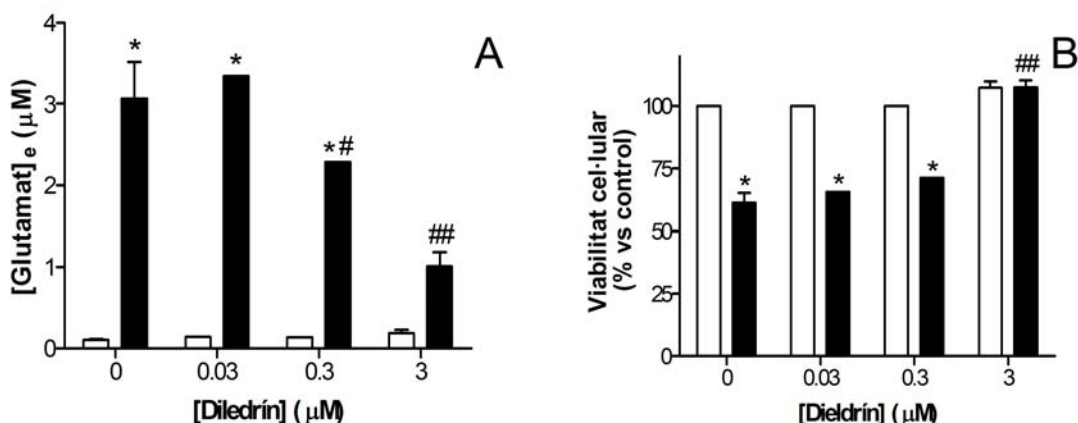


Figura 4.22.- Alliberament de glutamat endogen induït per K^+ en 5 minuts d'exposició (A) i viabilitat cel·lular mesurada a les 24 hores de l'exposició a K^+ (B), en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel incubats amb dieldrín de manera perllongada. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM de 1-4 experiments fets en triplicat. * $P < 0.001$ vs. 25 mM de K^+ a igual dieldrín. # $p < 0.05$ i ## $p < 0.001$ vs 100 mM K^+ sense dieldrín. L'estadística per les concentracions de dieldrín de 0.03 i 0.3 μ M, de les quals només hi ha un experiment, es va fer contra el control del mateix experiment.

Taula 4.6.- Flux de ^{36}Cl induït per GABA en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel controls i tractats amb 0.3 i 3 μ M de dieldrín perllongadament

	Control	Dieldrín 0.3 μ M
Log EC_{50}	-4.882 \pm 0.206	-4.747 \pm 0.270
EC_{50} GABA (μ M)	13.13	17.91
E_{max} (nmol ^{36}Cl /mg prot.)	0.454 \pm 0.085	0.533 \pm 0.047
	Control	Dieldrín 3 μ M
Log EC_{50}	-4.929 \pm 0.169	-4.719 \pm 0.204
EC_{50} GABA(μ M)	11.79	19.08
E_{max} (nmol ^{36}Cl /mg prot.)	0.55 \pm 0.09	0.338 \pm 0.02*

Els valors de Log EC_{50} i de captació màxima foren obtinguts de l'ajust dels valors de captació a una corba sigmoïdal. Els valors de la taula representen la mitjana \pm SEM de 3 a 5 experiments.

* $p < 0.05$ vs. control.

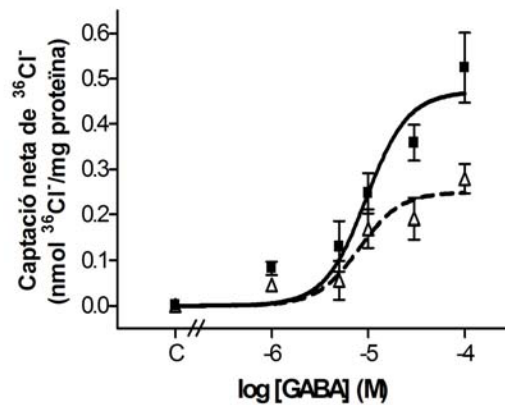


Figura 4.23.- Captació neta de $^{36}\text{Cl}^-$ induïda per GABA en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel controls (quadres negres) i tractats amb $3\ \mu\text{M}$ de dieldrín (triangles blancs) perllongadament. Cada punt és la mitjana \pm SEM de 3 experiments diferents, cadascun en triplicat. L'ajust de la corba és significativament diferent en el tractat amb dieldrín vs. el control ($P < 0.001$).

Es va determinar, també, la unió de $[^{35}\text{S}]\text{-TBPS}$ en cultius controls i en cultius tractats perllongadament amb $3\ \mu\text{M}$ de dieldrín (figura 4.24). El tractament amb $3\ \mu\text{M}$ de dieldrín no va variar la K_D , però va disminuir de manera significativa la unió màxima (taula 4.7).

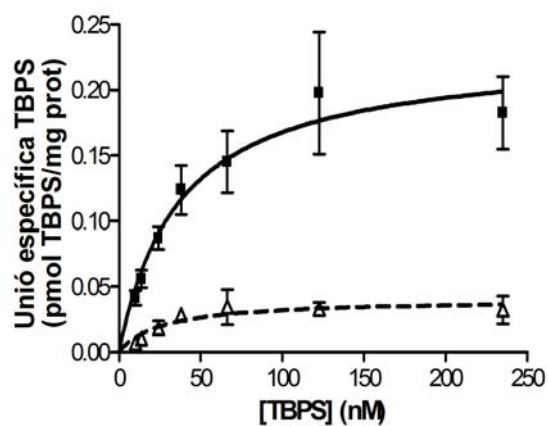


Figura 4.24.- Unió de $[^{35}\text{S}]\text{TBPS}$ en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel control (quadres negres) i tractats perllongadament amb $3\ \mu\text{M}$ de dieldrín (triangles blancs). Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM de 3 experiments fets en triplicat. L'ajust de les corbes exponencials és significativament diferent ($P < 0.0001$).

Taula 4.7.- Paràmetres cinètics de la unió de [³⁵S]TBPS en cultius de cèl·lules granulars de cerebel control i tractades perllongadament amb 3 μM de dieldrín.

	Control	Dieldrín 3 μM
K _D TBPS(nM)	36.18 ± 5.95	30.64 ± 1.72
B _{max} (pmol TBPS/mg prot)	0.23 ± 0.05	0.044 ± 0.01*

Els valors de K_D i de B_{max} per la unió de TBPS foren obtinguts de l'ajust dels valors de captació a una hipèrbole. Els valors de la taula representen la mitjana ± SEM 3 experiments fets amb triplicats. * p < 0.05 vs. control

Els efectes observats pel que fa a la resposta davant l'estímul excitotòxic i a la funció dels receptor GABA_A en cultius control i cultius tractats amb dieldrín de manera aguda i perllongada, es resumeix a la taula 4.8

Taula 4.8.- Efectes sobre l'excitotoxicitat i sobre la funció del receptor GABA_A produïts per exposicions agudes i perllongades a dieldrín.

		Dieldrín 0.3 μM	Dieldrín 3 μM
Agut (5 - 10 minuts)	Glu alliberat per 100 mM de [K ⁺] _e	> 2 μM	< 2 μM
	Toxicitat induïda per 100 mM de [K ⁺] _e	Sí	No
	Disminució del flux de ³⁶ Cl ⁻ induït per GABA ^a	40%	75 %
Perllongat (6 -10 dies <i>in vitro</i>)	Glu alliberat per 100 mM de [K ⁺] _e	> 2 μM	< 2 μM
	Toxicitat induïda per 100 mM de [K ⁺] _e	Sí	No
	Disminució del flux de ³⁶ Cl ⁻ induït per GABA	0 %	38.5 %

^a Dades reportades per Vale et al. (2003) en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel.

4.11.- L'exposició perllongada dels cultius primaris de cèl·lules granulars a dieldrín produeix canvis en els receptors NMDA

El conjunt de dades observades en la taula 4.8 indiquen que els efectes produïts per l'exposició perllongada a 3 μM de dieldrín sobre la resposta enfront la despolarització per alta $[\text{K}^+]_e$ no es poden explicar només per la inhibició del flux de clorur a través del receptor GABA_A produïda (veure discussió). Es va doncs valorar la possibilitat de què l'exposició perllongada a dieldrín també hagués produït canvis sobre el sistema glutamatèrgic.

En primer lloc es van quantificar les concentracions d'aminoàcids presents als cultius control i després de ser tractats amb 3 μM de dieldrín de manera perllongada. Tal i com es mostra en la taula 4.9 no hi va haver canvis significatius en les concentracions de glutamat, aspartat i GABA entre els cultius control i els tractats amb dieldrín.

Taula 4.9.- Concentració d'aminoàcids intracel·lulars en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel control i tractats de manera perllongada amb 3 μM de dieldrín.

	Control	Dieldrín 3 μM
Glutamat (nmol/mg prot)	85.64 \pm 16.97	103.40 \pm 15.09
Aspartat (nmol/mg prot)	18.25 \pm 4.93	21.03 \pm 5.82
GABA (nmol/mg prot)	27.12 \pm 0.43	26.08 \pm 1.58

Els resultats de la taula representen la mitjana \pm SEM de 3 experiments, fets amb quadruplicats.

En segon lloc, es va estudiar la funcionalitat del receptor NMDA mitjançant corbes concentració-resposta, exposant els cultius a diferents concentracions de NMDA i analitzant el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mitjançant la sonda fluorescent Fluo-3 (figura 4.25 i taula 4.10). Els cultius tractats perllongadament amb 3 μM de dieldrín van presentar una resposta màxima significativament disminuïda respecte als cultius control, és a dir, l'increment en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al ser exposats a NMDA en una solució lliure de Mg^{2+} i amb 5 μM de glicina va ser significativament reduïda.

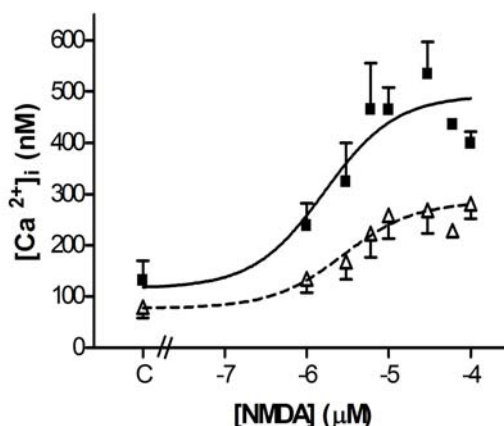


Figura 4.25.- Corba concentració-resposta de l'increment en la $[Ca^{2+}]_i$ (mesurat amb Fluo-3) induït per NMDA en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel control (quadres negres) i tractades de manera perllongada amb $3 \mu M$ de dieldrín (triangles blancs). Cada punt representa la mitjana \pm SEM dels valors de 4 experiments fets en triplicat. L'ajust de corbes és significativament diferent ($P < 0,001$).

Taula 4.10.- Valors calculats per la corba d'increment de $[Ca^{2+}]_i$ induït per NMDA en cultius de cèl·lules granulars de cerebel control i tractades perllongadament amb $3 \mu M$ de dieldrín.

	Control	Dieldrín $3 \mu M$
Log EC_{50}	-5.663 ± 0.206	-5.259 ± 0.067
EC_{50} NMDA (μM)	2.17	5.51
E_{max} ($[Ca^{2+}]_i$ nM)	508.3 ± 5.3	$296.7 \pm 37.0^*$

Els valors de la taula foren obtinguts de l'ajust dels valors obtinguts a una corba sigmoidal. Els valors de la taula representen la mitjana \pm SEM de 4 experiments amb triplicats * $p < 0.01$ vs. control.

Es va analitzar si la presència del dieldrín en agut podia alterar la corba concentració-resposta de NMDA i $[Ca^{2+}]_i$, per això es van pre-exposar els cultius durant 10 minuts a una solució lliure de Mg^{2+} i amb dieldrín $3 \mu M$ abans de ser exposats a diferents concentracions de NMDA en medi lliure de magnesi i $5 \mu M$ de glicina en presència de $3 \mu M$ de dieldrín. Els cultius controls van seguir el mateix procediment exposant-se al vehicle ($0,2 \%$ DMSO). En aquest cas els cultius controls i tractats van presentar igual resposta a l'estimulació amb NMDA (figura 4.26 i taula 4.11).

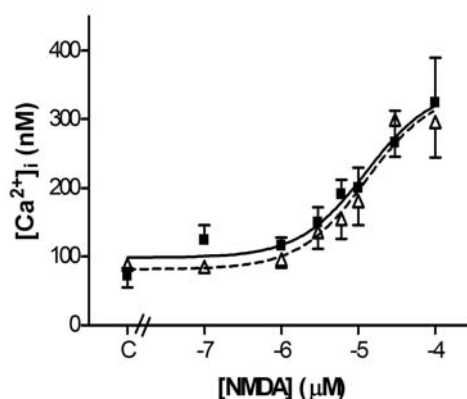


Figura 4.26.- Corba concentració-resposta en cultius control i tractats amb 3 µM de dieldrín durant 10 minuts de pre-incubació i durant l'estímul amb NMDA. Els diferents punts representen la mitjana ± SEM de 3 experiments diferents, cadascun fet en triplicat. L'ajust de corbes no dóna diferències significatives.

Taula 4.11.- Valors calculats per la corba d'increment de $[Ca^{2+}]_i$ induït per NMDA en cultius de cèl·lules granulars de cerebel control i tractades amb 3 µM de dieldrín de manera aguda.

	Control	Dieldrín 3 µM
Log EC ₅₀	-4.969 ± 0.247	-4.880 ± 0,084
EC ₅₀ NMDA (µM)	10.7	13.2
E _{max} ($[Ca^{2+}]_i$ nM)	361.0 ± 91.0	342.9 ± 60.3*

Els valors de la taula foren obtinguts de l'ajust dels valors obtinguts a una corba sigmoïdal. Els valors de la taula representen la mitjana ± SEM de 3 experiments amb triplicats * $p < 0.01$ vs. control.

Per tal de determinar si la reducció en l'efecte màxim pel que fa a la $[Ca^{2+}]_i$ podia ser deguda a una presència menor de receptors NMDA funcionals en els cultius exposats a dieldrín, es va utilitzar l'assaig d'unió del $[^3H]MK-801$ en cultius intactes. Els cultius tractats amb dieldrín van presentar una unió màxima de MK-801 inferior a la dels cultius control (figura 4.27).

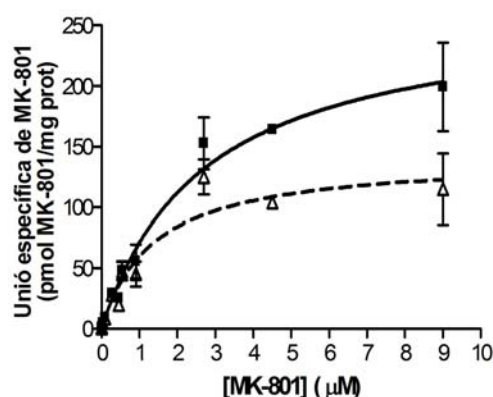


Figura 4.27.- Unió de [³H]MK-801 en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel control (quadres negres) i tractats perllongadament amb 3 µM de dieldrín (triangles blancs). Els resultats es mostren com a mitjana ± SEM de 4 experiments fets en triplicat. L'ajust de les corbes exponencials és significativament diferent ($P < 0.0001$).

4.12.- L'efecte de l'exposició perllongada a dieldrín en la resposta a l'estímul excitotòxic és un efecte mediat inicialment pel bloqueig del receptor GABA_A

Per a comprovar que l'efecte de les incubacions perllongades amb dieldrín sobre l'alliberament de glutamat i la mort neuronal induïda per exposició a alta $[K^+]_e$ és conseqüència de la inhibició del receptor GABA_A, es van incubar els cultius de 2 a 8-12 dies *in vitro* amb 100 µM de picrotoxinina. Aquest tractament va produir el mateix efecte que el dieldrín davant de l'estimulació amb alta $[K^+]_e$ (taula 4.12). La incubació dels cultius amb 100 µM de picrotoxinina no va produir toxicitat (valors de reducció de MTT en cultius tractats amb picrotoxinina de 102.44 ± 8.80 % respecte els cultius control), de la mateixa manera que tampoc en produïa la incubació amb dieldrín.

Taula 4.12.- Incubació de 2 a 8 dies *in vitro* amb 100 µM de picrotoxinina en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel

	Glutamat (µM)		MTT (% vs. control)	
	25 mM KCl	100 mM KCl	25 mM KCl	100 mM KCl
Control	0.15 ± 0.04	3.14 ± 0.35**	100	63.8 ± 9.0*
100 µM picrotoxinina	0.12 ± 0.04	2.10 ± 0.63*	102.4 ± 8.8	98.0 ± 7.4 ⁺

* $P < 0.05$ vs. 25 mM KCl igual tractament. ⁺ $P < 0.05$ vs. 100 mM en control. (n=3 experiments, fets en triplicat)