



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Efecto de la exposición a Modafinilo sobre la regulación de Glutamina
sintetasa”**

TESIS

Que presenta

Q.F.B. JANISSE SILVA PARRA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE TOXICOLOGÍA

Director de tesis:

Dr. Arturo Ortega Soto

Ciudad de México

Septiembre, 2018

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. Arturo Ortega Soto, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del financiamiento al proyecto No. 255087, la beca de Maestría No. 458171 y con la generosa aportación de Soluciones para un México Verde, S.A. de C.V.

Agradezco a:

A mi director de tesis; al Dr. Arturo Ortega Soto, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su valiosa guía y sus enseñanzas que van más allá de la formación académica, por sembrar y mantener la sed de conocimiento y el pensamiento crítico.

Al Conacyt por la beca otorgada.

Al Cinvestav y al Departamento de Toxicología.

A mis asesores, a la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño y la Dra. Rossana Cítlali Zepeda Hernández, por todo su apoyo, por las críticas las revisiones realizadas al presente trabajo y por su atenta disposición.

Al Colegio de Profesores y al Dr. Gabriel Roldán, quienes tuvieron un importante papel en mi formación académica.

A los Auxiliares de Investigación la M. en C. Luisa Clara Regina Hernández Kelly y al I.B.Q Luis Cid Cid por su ayuda en las técnicas realizadas y al técnico Blanca Rocío Ibarra.

A la Dra. Donají Chí y a las M. en C. Catya Jiménez y Anita García por apoyarme en puntos clave del desarrollo del trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por los malos y los buenos e inolvidables ratos, por sus críticas, por estar conmigo, incluso en los momentos oscuros y por darme enseñanzas.

A mis compañeros y amigos de la generación, por su amistad incondicional por todas las experiencias y muy gratos recuerdos, que anhelaré por siempre.

A mis amigos: Lu, Sergio, Diana, Héctor, Dani, Arturo, Poleth, el maestro, Malu, Luna, Karo, Fran, Ignacio quienes, a pesar de la distancia, de todo, han estado, por sus consejos, por su infinita amistad que traspasa las barreras, los quiero.

A todas las personas que a través del tiempo he tenido el placer de conocer, que me han enseñado y reafirmado de formas inimaginables lo bello que es vivir, con todo lo que implica, que han aportado a forjar la persona que ahora soy.

A Luna, Rayas y Cornelia

A mi familia, a mis papás, por darme la vida, la educación y los valores que me rigen, a mi mamá quién me ha alentado en todo lo que he hecho en mi vida y creer en mí, incluso más allá de la barrera del entendimiento, a mi hermana Araceli por ser un verdadero ejemplo a seguir, por ser mi amiga, mi consejera y cuidar de mí. A mi hermana Imelda y mis sobrinas, por todo lo bello que me han enseñado. A mis tías María, Rosy, por quererme tanto.

Contenido

ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
<i>NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA.....</i>	11
<i>GLAST/EAATI.....</i>	15
<i>LANZADERA GLUTAMATO/GLUTAMINA.....</i>	16
<i>GLUTAMINA SINTETASA.....</i>	17
<i>MODAFINILO.....</i>	19
<i>PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.....</i>	20
<i>MECANISMO DE ACCIÓN.....</i>	20
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
<i>OBJETIVOS PARTICULARES.....</i>	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
<i>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</i>	23
<i>MATERIAL BIOLÓGICO.....</i>	23
<i>REACTIVOS.....</i>	23
<i>TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.....</i>	24
<i>LISIS DE TEJIDO.....</i>	24
<i>CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....</i>	24
<i>Fundamento.....</i>	24
<i>Procedimiento.....</i>	24
<i>ACTIVIDAD DE GS.....</i>	24
<i>Fundamento.....</i>	24
<i>Procedimiento.....</i>	25
<i>INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN FASE SÓLIDA.....</i>	25
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</i>	26
RESULTADOS.....	27
<i>EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A MODAFINILO SOBRE LOS NIVELES DE GS.....</i>	27
<i>EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A MODAFINILO SOBRE LA ACTIVIDAD DE GS.....</i>	29
<i>EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A MODAFINILO SOBRE LOS NIVELES DE AKT/PKB.....</i>	30
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	34
PERSPECTIVAS.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

FIG. 1 MODELO DE UN COMPARTIMENTO QUE RESALTA EL PAPEL CENTRAL DEL GLUTAMATO COMO UN AMORTIGUADOR DE NITRÓGENO EN EL CEREBRO.....	11
FIG. 2 ESQUEMA DE LA NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA.....	12
FIG. 3 CLASIFICACIÓN EN HUMANO HUGO (HUMAN GENOME ORGANISATION) DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO.	13
FIG. 4. REPRESENTACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS GLUTAMATÉRGICA.	15
FIG. 5. SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE GLAST.....	16
FIG. 6. ESQUEMA DE LA LANZADERA GLUTAMATO/GLUTAMINA.....	17
FIG. 7. ESTRUCTURA DE LA GLUTAMINA SINTETASA.....	18
FIG. 8. EL GLUTAMATO INDUCE UN INCREMENTO EN LOS NIVELES PROTEICOS DE GLUTAMINA SINTETASA.....	19
FIG. 9. ESTRUCTURA DEL MODAFINILO Y SUS METABOLITOS.....	20
FIG. 10. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.....	23
FIG. 11. NIVELES DE GS EN CEREBELO.....	27
FIG. 12. NIVELES DE GS EN CORTEZA PREFRONTAL Y MEDIAL.....	28
FIG. 13. NIVELES DE GS EN HIPOCAMPO.....	28
FIG. 14. ACTIVIDAD DE GLUTAMINA SINTETASA.....	29
FIG. 15. NIVELES DE PKB P SER 473 EN CEREBELO.....	30
FIG. 16. NIVELES DE PKB P SER 473 EN CORTEZA.....	31
FIG. 17. NIVELES DE PKB P SER 473 EN HIPOCAMPO.....	31

Abreviaturas

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
ASP	Aspartato
ATP	Adenosín tri fosfato
ATPasa	Adenosin trifosfatasa
BCAAs	Aminoácidos de cadena ramificada
CGB	Células glia de Bergmann
DTT	Ditiotreitol
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GLAST	Transportador de glutamato y aspartato
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GS	Glutamina sintetasa
GSH	Glutation
Inh IV	Inhibidor IV de PKB
KA	Kainato
Mod	Modafinilo
NMDA	N-metil-D-aspartato
PKB	Proteína cinasa B
SNAT	Transportador de aminoácidos neutros
Wort	Wortmanina

Resumen

La neurotransmisión glutamatérgica es una de las más importantes del sistema nervioso central, está conformada por las neuronas presinápticas que liberan glutamato (Glu), neuronas postsinápticas que expresan receptores a Glu y las células gliales que a través de transportadores remueven el Glu de la hendidura sináptica. En la célula glial, el Glu es transformado a glutamina (Gln) mediante la glutamina sintetasa (GS). La Gln es liberada hacia la neurona presináptica, en donde es transformada a glutamato mediante la glutaminasa. La disrupción en alguno de los componentes de la transmisión sináptica glutamatérgica se asocia con enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad Alzheimer, Parkinson, epilepsia, entre otras. Actualmente se sabe que distintos agentes pueden afectar ésta transmisión *e.g.* el modafinilo (Mod) es un fármaco psicoestimulante promotor de la vigilia que ha mostrado capacidad para alterar componentes de la transmisión glutamatérgica. Ante esto, nos planteamos evaluar el efecto que tiene la exposición a Mod sobre la GS, esperando cambios en los niveles de GS, así como en su actividad. Decidimos evaluar los niveles de proteína *in vivo* mediante inmunodetección en fase sólida y la actividad enzimática por cuantificación de γ -glutamihidroxamato, después de tratamientos con glutamato y modafinilo. Al evaluar la actividad, observamos un aumento de la actividad inducido por la exposición a modafinilo, el cual es inhibido por la co-exposición a Glu y Mod. No obstante, en los niveles de GS, no obtuvimos diferencias significativas, sin embargo, los niveles de fosforilación de AKT/PKB aumentaron. Estos resultados sugieren que la exposición a Mod afecta la señalización glutamatérgica modificando la actividad y la activación de la vía AKT/PKB en un modelo *in vitro* e *in vivo*.

Abstract

Glutamatergic neurotransmission is one of the main functions of the central nervous system, consists of presynaptic neurons that release glutamate (Glu), postsynaptic neurons that express Glu receptors and glial cells that through transporters remove Glu from the synaptic cleft. In glial cells, Glu is transformed into glutamine (Gln) by glutamine synthetase (GS). Gln is released into the presynaptic neuron, where it is transformed into glutamate by glutaminase. Disruption in some of the components of glutamatergic synaptic transmission is associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson, epilepsy, among others. Currently, it is known that modafinil (Mod), a psychostimulant drug that promotes wakefulness, alters the components of the glutamatergic transmission. Given this fact, we considered to evaluate the effect Mod on GS protein and activity levels by western blot and by quantification of γ -glutamyl hydroxamate, respectively. We observed an increase in GS activity induced by exposure to modafinil, which is inhibited by co-exposure to Glu and Mod. However, the GS protein levels do not change. Surprisingly, AKT / PKB phosphorylated levels in different brain regions are changed upon Mod exposure. These results suggest that exposure to Mod disrupts glutamatergic signaling in both an *in vitro* and *in vivo* model.

Introducción

Neurotransmisión glutamatérgica

El glutamato (Glu) es un aminoácido que está implicado en diversas funciones; por una parte juega un papel importante en la homeostasis y amortiguamiento del nitrógeno y también está inmerso en diversas vías del metabolismo celular y balance energético (Fig. 1) (Cooper & Jeiter, 2016). Adicionalmente, es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de los vertebrados, en una de las más importantes vías de comunicación en el sistema nervioso central; la neurotransmisión glutamatérgica, la cual sirve como una estación de retransmisión excitadora entre las terminales nerviosas presinápticas que liberan al Glu hacia las espinas dendríticas postsinápticas. Las células gliales se encuentran en estrecho contacto rodeando la interacción entre ambas neuronas, por lo que es conocida como una “sinapsis tripartita” (Fig. 2) (Niciu *et al.*, 2012; Perea *et al.*, 2009).

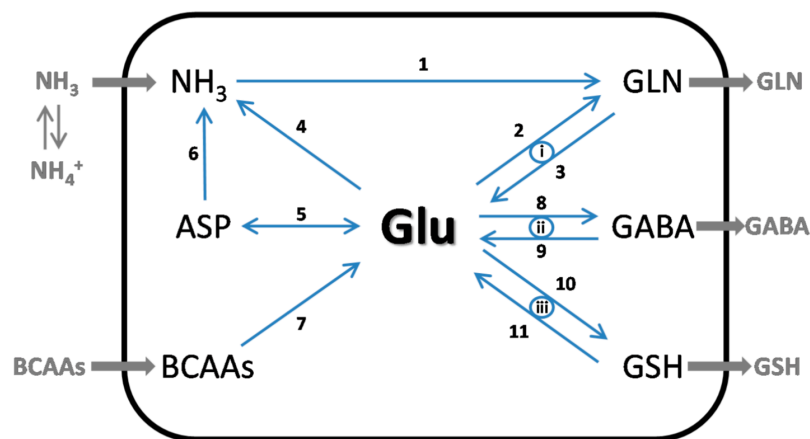


Fig. 1. Modelo de un compartimento que resalta el papel central del glutamato como un amortiguador de nitrógeno en el cerebro. El diagrama resume las enzimas involucradas en la homeostasis del nitrógeno. Las flechas grises indican el mayor flujo de nitrógeno de la sangre a las células (izquierda) y después a fluidos intersticiales (derecha), sin tomar en cuenta la compartimentalización. El amonio entra al cerebro en gran medida por difusión de NH_3 . El nitrógeno adicional entra vía transporte de aminoácidos. Especialmente los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs). **Enzimas:** 1 Glutamina sintetasa (amonio como sustrato), 2 Glutamina sintetasa (glutamato como sustrato), 3 Glutaminasa, 4 Glutamato deshidrogenasa, 5 met y cis aspartato aminotransferasas, 6 enzimas del ciclo de nucleótidos de purina, 7 aminotransferasas de cadena ramificada, 8 Glutamato deshidrogenasa, 9 Enzimas de Conversión de GABA, 10 Glutamato cisteína ligasa + Glutación sintetasa, 11 γ -glutamilttransferasas + cisteinilglicina dipeptidasa. **Ciclos entre astrocitos y neuronas:** i ciclo de la glutamina, ii Ciclo Glutamina GABA, iii Los tres componentes de aminoácidos del glutatión sintetizado en los astrocitos se reciclan y ensamblan de nuevo en las neuronas. (Cooper & Jeiter, 2016)

El Glu ejerce sus acciones al activar receptores membranales que se expresan en neuronas y células gliales y que han sido clasificados en dos principales grupos: Los receptores

ionotrópicos; los cuales son canales iónicos activados por ligando y los receptores metabotrópicos; receptores de Glu acoplados a proteínas G (Niciu *et al.*, 2012) involucrados en la plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria y las funciones superiores (Köles *et al.*, 2016). Los receptores ionotrópicos fueron nombrados, de acuerdo a su agonista: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido propiónico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y Kainato (KA) (Fig. 3) (Köles *et al.*, 2016).

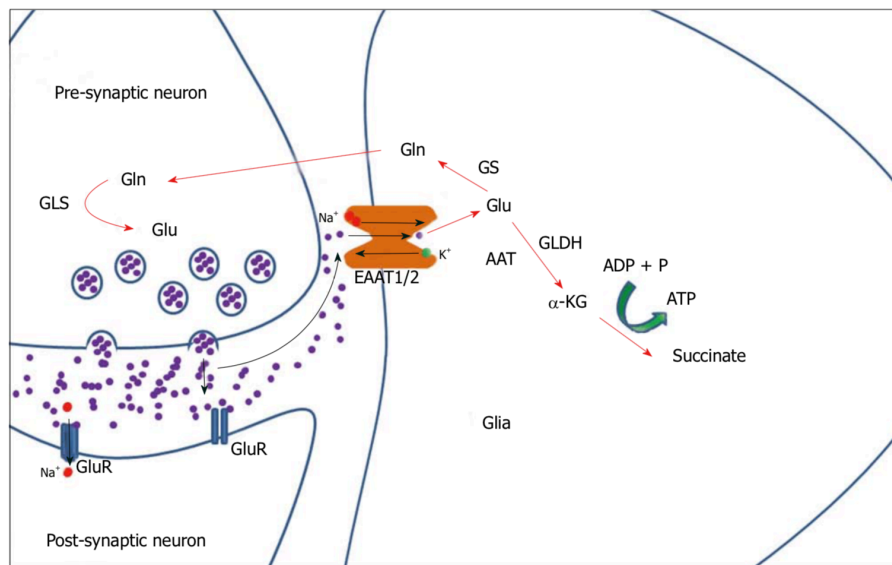


Fig. 2 Esquema de la neurotransmisión glutamatergica. Nótese la interacción tripartita entre la neurona pre y post sináptica y la célula glial. (Parkin *et al.*, 2018).

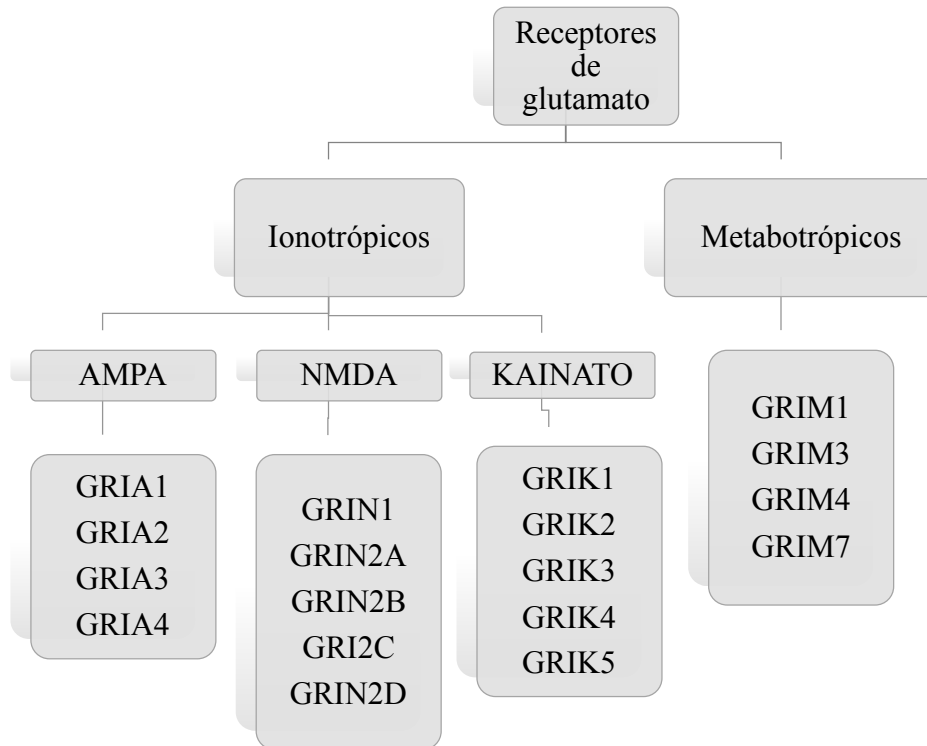


Fig. 3 Clasificación en humano *HUGO* (*Human Genome Organisation*) de los receptores de glutamato (tomado de Collingridge *et al.*, 2009).

El Glu que se encuentra en la hendidura sináptica, es removido mediante un sistema de transportadores de aminoácidos excitadores, conocidos como EAATs (excitatory amino acid transporter), son transportadores de alta afinidad que están acoplados al transporte de Na⁺ y potasio K⁺, capaces de transportar Glu y Aspartato (Asp) (Cuadro. 1) (Danbolt, 2001; Zhou & Danbolt, 2014) para mantener las concentraciones de Glu extracelular (0.6-2 μmol/L) e intracelular (1-10 mmol/L) (Parkin *et al.*, 2018) y evitar el proceso de muerte neuronal por excitotoxicidad.

Cuadro 1. Sistema de transportadores de aminoácidos excitadores

Nombre	Otros nombres
Transportador de aminoácidos excitadores 1 (EAAT1; <i>slc1a3</i>)	GLAST
Transportador de aminoácidos excitadores 2 (EAAT2; <i>slc1a2</i>)	GLT-1; GLT1
Transportador de aminoácidos excitadores 3 (EAAT3; <i>slc1a1</i>)	EAAC1
Transportador de aminoácidos excitadores 4 (EAAT4; <i>slc1a6</i>)	
Transportador de aminoácidos excitadores 5 (EAAT5; <i>slc1a7</i>)	

(Zhou & Danbolt, 2014)

En la Fig. 4 Se muestra la localización de los transportadores presentes en las células gliales del cerebelo, las células gliales de Bergmann (CGB), se extienden hasta las células de Purkinje de la capa molecular del cerebelo, rodeándolas y manteniendo un estrecho contacto con las sinapsis formadas por las fibras paralelas con las dendritas de las neuronas de Purkinje (Kettenmann & Verkhratsky, 2013).

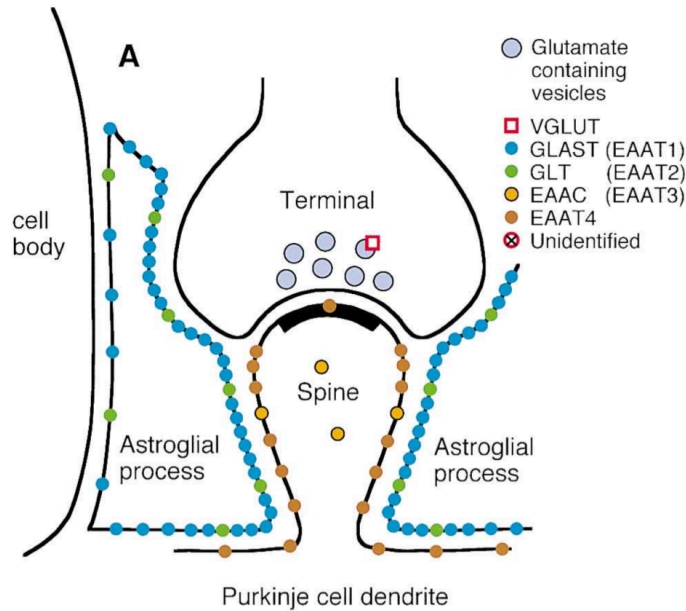


Fig. 4. Representación de la localización de los transportadores de Glutamato en la sinapsis glutamatérgica. La sinapsis entre la espina dendrítica de la fibra paralela y la célula de Purkinje en la capa molecular del cerebelo están rodeadas por las células gliales que contienen en promedio 4700 y 740 moléculas por μm^2 de membrana (Danbolt, 2001).

GLAST/EAAT1

El transportador de Glu más abundante en el cerebelo es GLAST, este transportador junto con GLT1 se encargan del 80 % de remoción de este neurotransmisor en el cerebro (Eulenburg & Gomeza, 2010), Se ha repostado que el transportador GLAST funge como un transductor de señales y que tiene la capacidad de participar en la regulación de expresión génica mediante las vías de señalización que desencadena (Fig. 5) (Martínez-Lozada *et al.*, 2011)

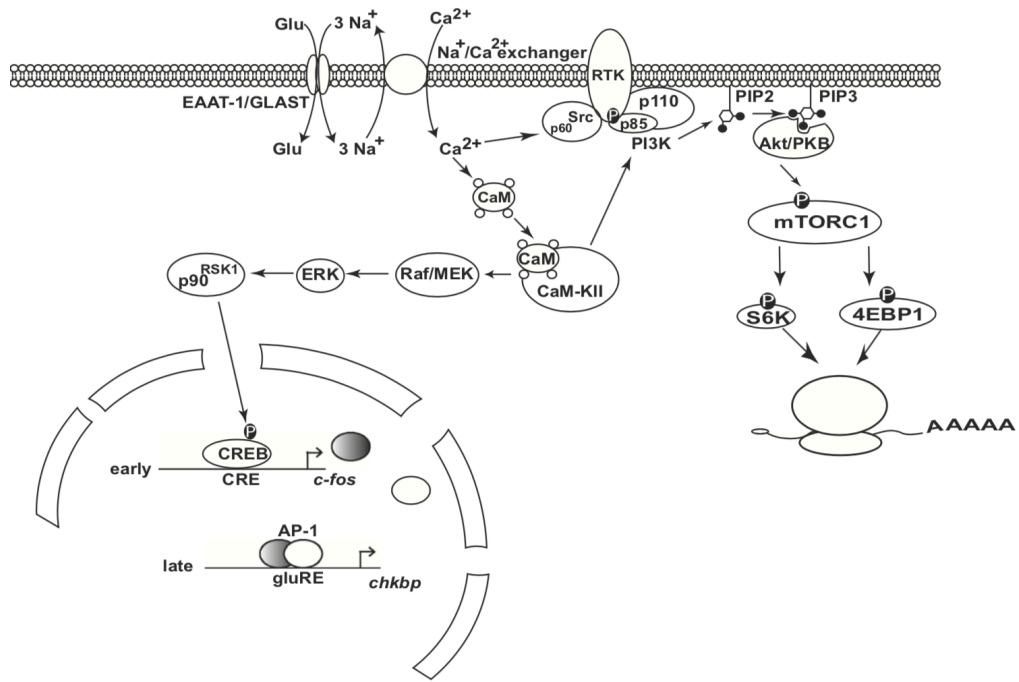


Fig. 5. Señalización a través de GLAST. El transportador GLAST puede desencadenar diversas cascadas de señalización involucrada en la expresión génica (Martínez-Lozada *et al.*, 2011).

Lanzadera Glutamato/Glutamina

La actividad de los transportadores de Glu es dependiente del gradiente electroquímico generado por la adenosintrifosfatasa, ATPasa Na^+/K^+ . Ambos elementos son esenciales para llevar a cabo el transporte, en donde una molécula de Glu es cotransportada al citoplasma de la célula glial junto a dos iones de Na^+ , al tiempo hay antiporte de un ión de K^+ . Lo que representa un transporte electrogénico (Camacho & Massieu, 2006). Parte del Glu entra a la célula, es transformado a Gln por la Glutamina sintetasa (GS), esto con la utilización de una molécula de ATP. Tanto la captura del Glu como su conversión a Gln son eventos dependientes de energía, por lo que, aunado a ellos, se favorece la entrada de glucosa a la célula (Mendez-Flores *et al.*, 2016). La Gln producida es liberada hacia la neurona presináptica; mediante transportadores de aminoácidos neutros conocidos como SNATs, en donde es transformada a Glu mediante la glutaminasa; dicho proceso es conocido como *lanzadera Glu/Gln* (Fig. 6) (Martínez-Lozada *et al.*, 2013).

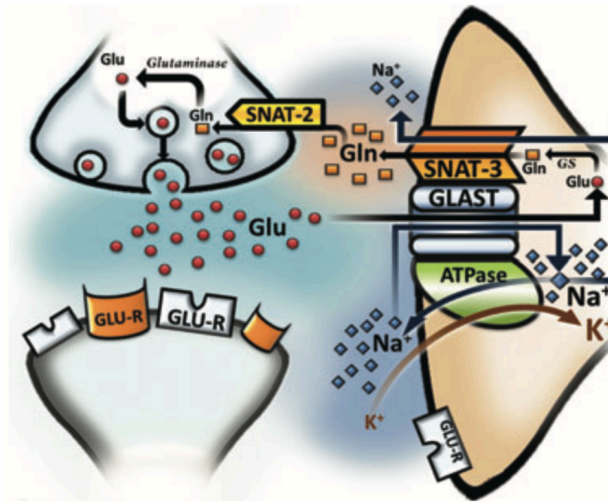
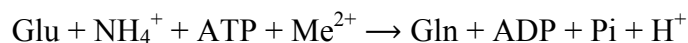


Fig. 6. Esquema de la lanzadera glutamato/glutamina. La imagen representa el acople físico y funcional entre el transportador GLAST, la ATPasa Na⁺/K⁺ y el transportador SNAT3 (Martínez-Lozada *et al.*, 2013).

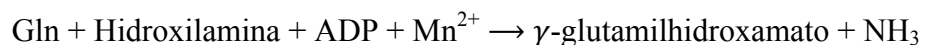
Glutamina sintetasa

La glutamina sintetasa (GS) (EC 6.3.1.2) es una enzima citoplasmática localizada principalmente en cerebro, riñón e hígado que se encarga de la síntesis de glutamina; el aminoácido libre más abundante en el cuerpo humano. Cataliza la condensación de Glu y amoníaco dependiente de ATP para la producción de Gln (Jayakumar & Norebnberg, 2016; Spodenkiewicz *et al.*, 2016).

La GS puede llevar a cabo dos reacciones, una mediante la cual cataliza la biosíntesis de la Glna mediante la siguiente reacción:



En donde Me²⁺ puede ser magnesio o manganeso (Eisenberg *et al.*, 2000), también puede llevar a cabo una reacción reversa si se sustituye al sustrato de amonio por hidroxilamina (NH₂OH) mediante la siguiente reacción:



(Eisenberg *et al.*, 2000; Peng, Bott & Zong, 2016)

La GS está presente en todos los organismos y existen al menos tres distintas formas conocidas como GS I, GS II y GS III (Pesole *et al.*, 1995). La GS I ha sido descrita en procariontas, mientras que la GS II está presente en eucariotas y en algunas bacterias del género *Rhizobium*, *Frankia* y *Streptomyces* y la GS III fue identificado por primera vez en

Bacteroides fragilis y posteriormente en algunas cianobacterias (Krajewski, 2008). Los tres tipos de GS comparten una identidad de secuencia relativamente baja y tienen estructuras cuaternarias distintas. Las GS I son dodecámeros de subunidades idénticas con un peso molecular ~ 55 kDa, las GS II son decámeros compuestas por cadenas polipeptídicas más pequeñas, ~ 40 kDa, mientras que las GS III son también dodecámeros, pero ensamblan subunidades más grandes, de ~ 80 kDa (Krajewski, 2008).

La GS humana pertenece a la clase II de enzimas GS y forma un homodecámero, en el cual, dos anillos pentámeros se acoplan uno al otro, conformando un sitio catalítico con forma de canal que se encuentra en cada interfaz formada por dos subunidades adyacentes, resultando en diez sitios catalíticos en total (Fig. 7)

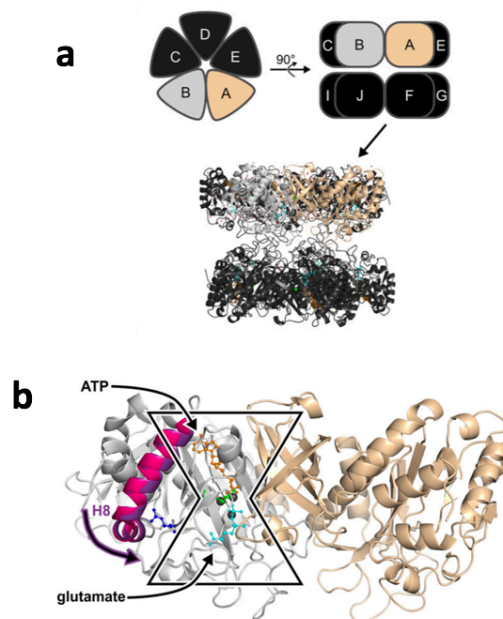


Fig. 7. Estructura de la glutamina sintetasa. (Frieg *et al.*, 2016).

La GS en el cerebro se localiza principalmente en las células gliales y participa en la homeostasis del amonio y el metabolismo del Glu (Martinez-Hernández *et al.*, 1976; Cooper & Jeiter, 2016)

La GS es codificada por el gen *glul* localizada en el cromosoma 1 (1q31), existen otros genes vinculados con la expresión de GS; GLUP, GLULL1, GLULL2 y GLULL3, localizados en los cromosomas 9p13, 5q33, 11p15 y 11q24, respectivamente (Wang *et al.*, 1996)

En el 2017, Tiburcio-Félix y colaboradores mostraron en un modelo de células gliales de Bergmann tras la exposición a 1 mM de Glu durante 30 min, los niveles de GS se elevan y que dicho efecto era dependiente del transportador e independiente de los receptores de Glu, en un evento no dependiente de calcio (Fig. 8)

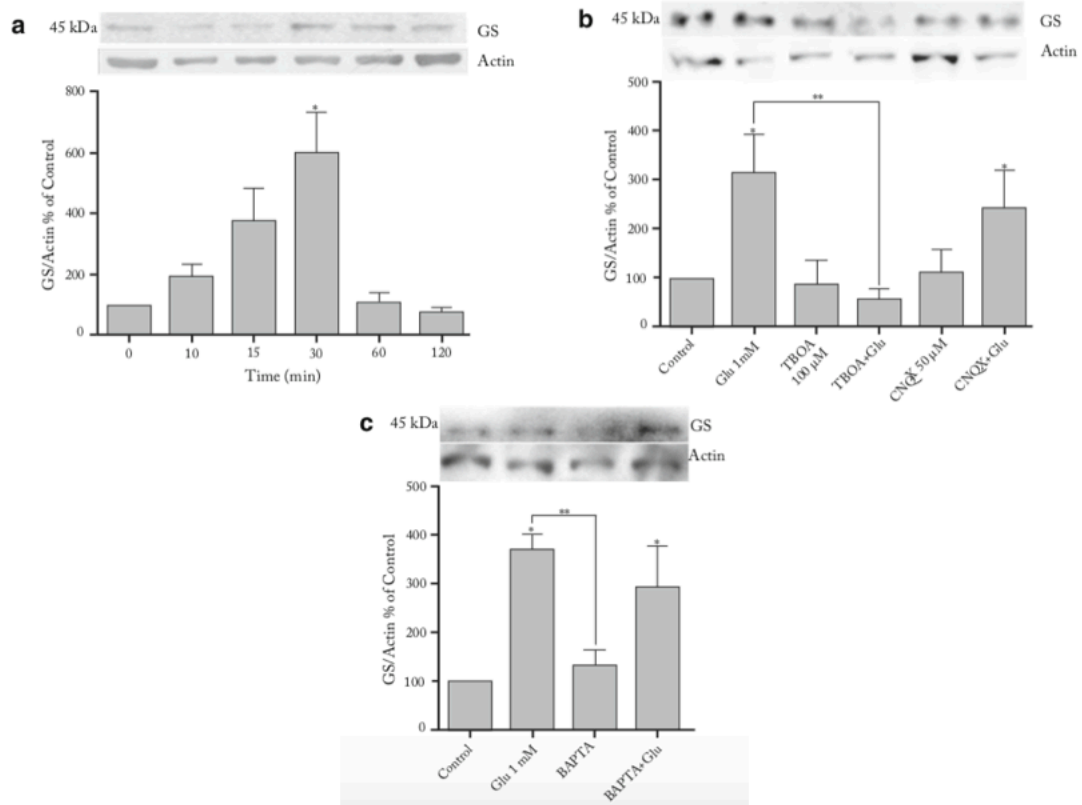


Fig. 8. El glutamato induce un incremento en los niveles proteicos de glutamina sintetasa. Panel a Monocapas de células de la glía de Bergmann (CGB) fueron expuestas a 1 mM de Glu a diferentes tiempos. **panel b** Las CGB fueron pretratadas con un bloqueador de los EAATs; ácido treo-β-benciloxi-aspartico (TBOA, 100 μM) y un agonista de los receptores GRIA 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, 50 μM), durante 30 min, previo al tratamiento con 1 mM de Glu. **Panel c** Las CGB fueron pretratadas con el quelante de Ca²⁺ BAPTA-AM (25 μM) 30 min previo al tratamiento con Glu 1 mM. En la figura se muestran las condiciones de los experimentos, extractos totales de CGB fueron analizados mediante inmunodetección en fase sólida. (Tiburcio-Félix *et al.*, 2017).

Modafinilo

El Modafinilo o 2-[(difenil)metilsulfonil]acetamida fue introducido por el laboratorio L. Lafon en 1994 para el tratamiento de desórdenes del sueño tales como la narcolepsia e hipersomnia idiopática (Lallement, Pérès & Lagarde, 1999). Actualmente, el modafinilo está aprobado por la Agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) como un agente promotor de la vigilia de clase IV para el tratamiento de la somnolencia excesiva en

periodo diurno en patologías como la narcolepsia, desordenes del sueño por trabajo de turno y la apnea obstructiva del sueño. Caracterizado como un psicoestimulante con propiedades para promover la vigilia (Minzenberg & Carter, 2007). En México Modiodal® es un medicamento de venta libre, disponible en tabletas de 100 y 200 mg; la dosis recomendada para el tratamiento de los trastornos del sueño es de 200 mg/día (Kumar, 2008).

Propiedades farmacocinéticas

La fórmula condensada del modafinilo es $C_{15}H_{15}NO_2S$ y tiene un peso molecular de 273.4 g/mol. Es una mezcla racémica con quiralidad; cuyos enantiómeros son equipotentes, con respecto a los efectos fármacológicos reportados (Robertson Jr y Hellriegel, 2003).

El modafinilo es administrado vía oral en dosis que van de 200 a 600 mg/kg, es un compuesto altamente lipofílico y rápidamente absorbido alcanzando concentraciones máximas en plasma a las dos a cuatro horas, con un volumen de distribución alrededor de 0.8 L/kg (Robertson Jr y Hellriegel, 2003; Kumar, 2008). Se une aproximadamente un 60% a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina. Es metabolizado en gran medida en el hígado por el CYP3A4 (Kumar, 2008), produciendo dos metabolitos; el modafinilo ácido y el modafinilo sulfona (Fig. 9) (Robertson Jr & Hellriegel, 2003), con una vida media de 12 a 15 horas, eliminado mayoritariamente vía renal. Menos de 10% es excretado como el compuesto padre (Wong *et al.*, 1999a; Wong *et al.*, 1999b).

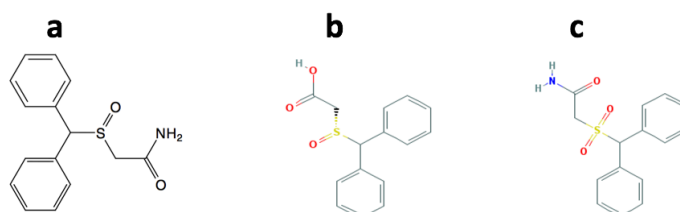


Fig. 9. Estructura del Modafinilo y sus metabolitos. Panel a Modafinilo. **Panel b** Modafinilo ácido. **Panel c** Modafinilo sulfona.

Mecanismo de acción

El modafinilo puede interactuar con diversos sistemas de neurotransmisión y afectar vías como las dopaminérgicas, GABAérgicas, glutamatérgicas, histaminérgicas, noradrenérgicas,

orexigénicas y serotoninérgicas (Gerrard & Malcolm, 2007; Kumar, 2008) y causa efectos tanto neuroquímicos como conductuales, distintos a los causados por drogas de abuso *e.g.* anfetaminas, sin conducir a la adicción de compuesto (Minzenberg & Carter, 2008). Adicionalmente, estudios epidemiológicos han demostrado que el uso del fármaco mejora la memoria y la cognición de individuos sanos (Baranki et al., 2004; Muller et al., 2004). No obstante, el mecanismo por el cual ejerce sus efectos no está totalmente esclarecido.

Algunos estudios han mostrado que la exposición a modafinilo afecta la neurotransmisión glutamatérgica; Touret y colaboradores en 1994 mostraron que la exposición a modafinilo aumenta los niveles de la GS en corteza prefrontal, también se ha mostrado que existen cambios en las concentraciones de Glu y Gln (Bettendorff *et al.*, 1996). En modelos murinos, la exposición al fármaco puede aumentar la liberación de Glu en distintas áreas del encéfalo, tales como el tálamo, hipocampo, cuerpo estriado, el área preóptica medial e hipocampo posterior (Ferraro *et al.*, 1997, 1998, 1999). Más recientemente, en el 2017; Bejarano-Pérez mostró que en un modelo de células gliales de Bergmann, la exposición a 100 μ M de modafinilo modifica la afinidad del transportador GLAST, y que la co-exposición a Glu y modafinilo puede abatir la disminución de la captura de [3 H]-D-Asp producido por la exposición a 1 mM de Glu.

Justificación

El modafinilo es un medicamento de venta libre, que ha mostrado potencial para actuar sobre componentes de la transmisión sináptica glutamatérgica. Sin embargo, su mecanismo de acción sigue siendo desconocido, es necesario esclarecerlo para determinar los efectos de su consumo.

Hipótesis

La exposición a modafinilo modificará los niveles y la actividad de GS en diferentes áreas del cerebro de rata.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición a modafinilo sobre la regulación de GS.

Objetivos particulares

- Determinar los niveles proteicos y la actividad de GS en un modelo *in vivo* de ratas Wistar tras la exposición a modafinilo.
- Evaluar si la participación de la vía de PI3K-AKT/PKB en la regulación de la actividad de GS a distintas dosis de modafinilo.
- Analizar si la exposición a modafinilo modifica los niveles de expresión de fosforilación de AKT/PKB.

Materiales y métodos

Estrategia experimental

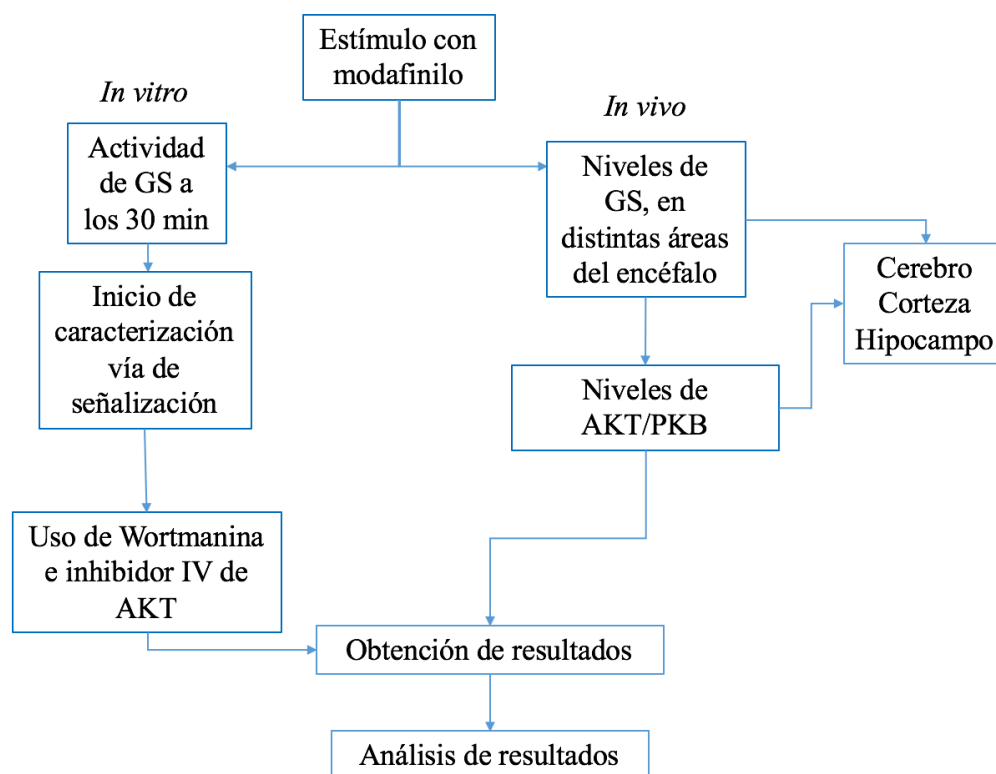


Fig. 10. Esquema general de trabajo.

Material Biológico

Las ratas de 8 días para la fase *in vivo* del proyecto fueron obtenidos del bioterio del Cinvestav. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las normas internacionales sobre el uso ético de animales de experimentación y tuvieron la aprobación del Comité de ética del Cinvestav. Los embriones de pollo de 14 días de incubación fueron donados por Avimex. Los cultivos primarios de células gliales de Bergmann fueron realizados de acuerdo a la metodología propuesta por Ortega y colaboradores (1991).

Reactivos

Imidazol (Sigma I5513-25G), Hidroxilamina (Sigma 159417-100G), $MnCl_2$, L-glutamina (Sigma), $FeCl_3$ (Merck 012450 R), ADP (Sigma 48K7005), TCA (Merck K15252107),

Na₂HAsO₄ (Aldrich 455857-25G), (2-[(difenil)metilsulfonil]acetamida) (Modafinilo) (Dipharma Caronno Pertusella, VA. Italia).

Tratamiento de los animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 8 días a las que se les administraron 9 o 90 mg/kg vía i.p., 4 h después fueron sacrificados por decapitación, las cabezas fueron colocadas en nitrógeno líquido durante 5 s. Inmediatamente después, fueron disecados el cerebelo, la corteza prefrontal y medial y el hipocampo.

Lisis de tejido

Para la detección de GS y PKB se realizó una extracción total, empleando la solución A (EGTA 5 mM, EDTA 2 mM, PMSF 0.5 mM, Tris-HCl 5 mM, leupeptina 1 µg/µL y aprotinina 1 µg/µL), homogenizando hasta incorporación total de los componentes.

Cuantificación de proteínas (Método: Bradford, 1976)

Fundamento

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford está basado en la unión del colorante Azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas, el complejo formado induce un cambio en la absorción máxima que va de 465 a 595 nm, el incremento en la absorbancia que puede ser monitoreado para determinar la concentración de proteínas mediante la ley de Lambert & Beer.

Procedimiento

Se empleó una curva patrón de γ -globulina con concentraciones de 1, 2, 3, 6 y 12 µg/µL, en un volumen de trabajo de 20 µL y un volumen final de 200 µL, se midió la absorbancia a 630 nm usando placas de 96 pozos.

Actividad de GS (Modificado de Peng, Bott & Zong, 2016)

Fundamento

El ensayo para la medición de la glutamina sintetasa está basado en su reacción de γ -glutamyl transferasa, mediante la síntesis de γ -glutamylhidroxamato a partir de Gln e hidroxilanimina.

Procedimiento

Para la del tejido se empleó un sonicador (Branson 2200) se utilizaron cinco ciclos de 30 s. Las muestras fueron congeladas a -80°C durante 30 min, al término, fueron agitadas en agitador orbital (Red Rotor, Hoefler) a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, el lisado celular fue recolectado y centrifugado a 16000 g a 4°C durante 15 min, a partir del sobrenadante, se determinó la concentración de proteínas. Cada reacción, contenía 200 µg de proteína (ajustando el volumen a 50 µL con Sol. L) y 50 µL de solución de ensayo-A (Imidazol 50 mM, Na₂HAsO₄ 20 mM, ADP 0.16 mM, L-Gln 50 mM, Hidroxilamina 25 mM, MnCl₂ 2 mM) las reacciones fueron incubadas durante 45 min a 37°C. Posteriormente la reacción fue detenida por la adición de 100 µL de solución de paro (FeCl₃ 2.42%, HCl 1.82%, TCA 1.45%), las muestras fueron centrifugadas a 16000 g a 4°C por 10 min. Finalmente, la absorbancia fue medida a 560 nm. Se empleó una curva patrón de γ -glutamihidroxamato con concentraciones de 0.024, 0.049, 0.098, 0.195, 0.391, 0.781, 1.563, 3.125, 6.25, 12.5, 25 mM 100 µL + 100 µL de Sol. Para para el blanco fueron empleados 50 µL de Sol. lisis, 50 µL de Sol. Ensayo-A y 100 de Sol. paro.

Los resultados fueron calculados mediante la sig. Ecuación.

$$\frac{[\gamma - \text{glutamihidroxamato mM}] * 100\mu\text{L}}{\frac{\text{tiempo en min}}{\text{Proteína en g}}}$$

Ecuación 1. Actividad de GS en nmol/min/g*10⁵.

Inmunodetección de proteínas en fase sólida

Los lisados de tejido fueron hervidos y desnaturalizados en solución amortiguadora de carga Laemmli y 100 µM de DTT. Posteriormente, realizamos una electroforesis con 100 µg de proteína en geles SDS-PAGE al 10%, que fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas con leche Svelty® al 5% durante 3 horas a temperatura ambiente, seguido de la incubación con anti-GS 1:500 a 4 °C durante 6 días, con anti-fosfo PKB (Ser 478) y con anti-PKB total 1:1000 toda la noche a 4 °C para el control de carga se utilizaron anticuerpos anti-actina. Finalmente, después de varios lavados las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante dos horas a temperatura ambiente. La quimioluminiscencia fue detectada y digitalizada mediante un fotodocumentador,

MicroChemi DNR Bio-Imaging System. Las bandas obtenidas fueron analizadas por densitometría empleando el programa Image J versión 1.50i.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm el error estándar. A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se realizó prueba post hoc Dunnett para determinar las diferencias de los tratamientos con respecto al control, tomando como significativo $p \leq 0.05$, para determinar diferencias entre cada uno de los tratamientos. Los datos fueron analizados en el paquete estadístico Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Resultados

Efecto de la exposición a modafinilo sobre los niveles de GS

Con base en lo reportado por Tiburcio-Félix y colaboradores en el 2017, que los niveles proteicos de la GS pueden ser modificados por un estímulo de Glu y que el modafinilo tiene capacidad para actuar sobre la neurotransmisión glutamatergica (Bejarano-Pérez, 2017), esto en un modelo *in vitro* de células gliales de Bergmann. Nosotros decidimos evaluar si en un modelo *in vivo* el modafinilo, al ser un psicoestimulante, puede modificar los niveles de la GS en áreas con actividad glutamatergica, tales como el cerebelo (Fig. 11), la corteza (Fig. 12) y el hipocampo (Fig. 13).

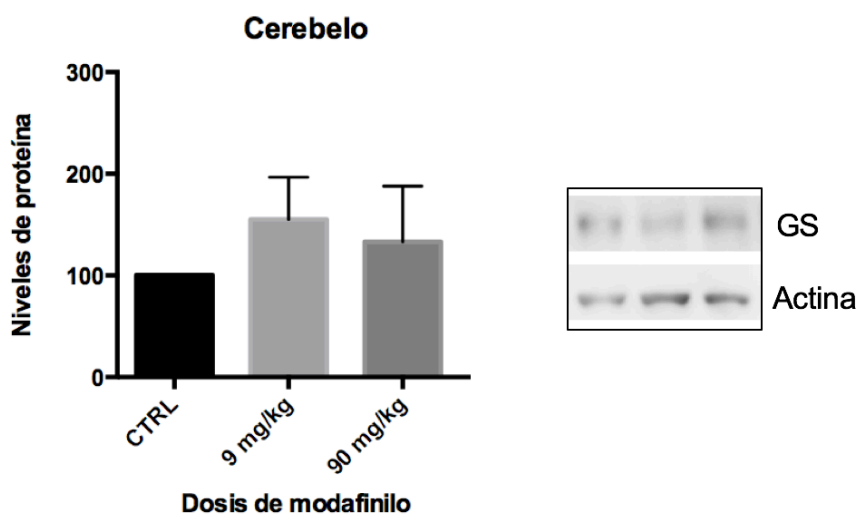


Fig. 11. Niveles de GS en cerebelo. Ratas Wistar macho de 8 días expuestas a diferentes dosis de modafinilo vía i.p. durante 4 h. Los datos expresan la media \pm SEM, tres experimentos independientes, en % del control.

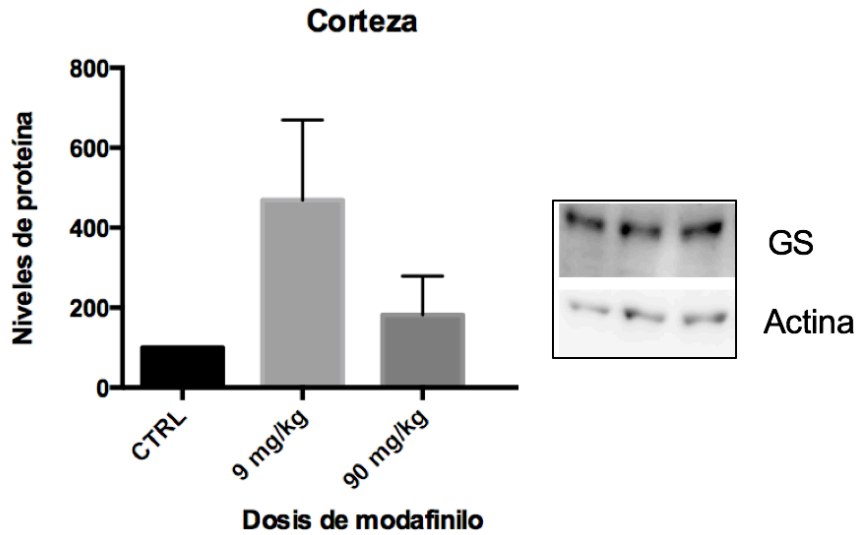


Fig. 12. Niveles de GS en corteza prefrontal y medial. Ratas Wistar macho de 8 días expuestas a diferentes dosis de modafinilo vía i.p. durante 4 h. Los datos expresan la media \pm SEM, tres experimentos independientes, en % del control.

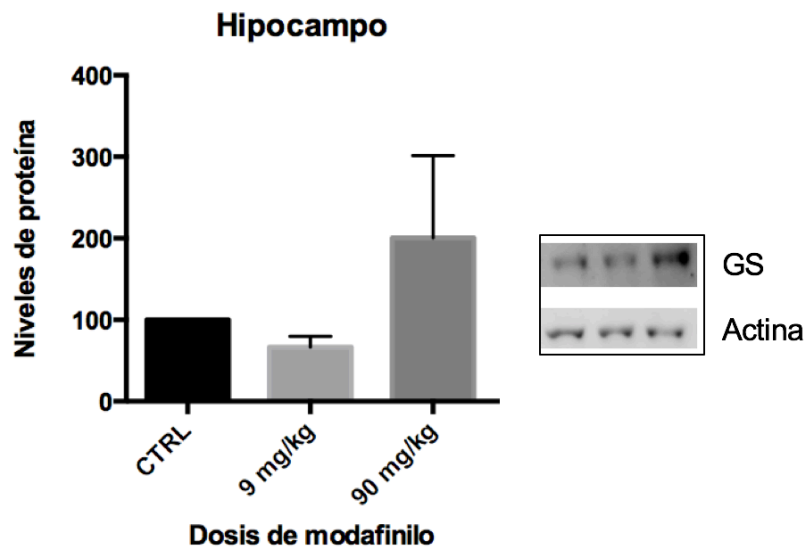


Fig. 13. Niveles de GS en hipocampo. Ratas Wistar macho de 8 días expuestas a diferentes dosis de modafinilo vía i.p. durante 4 h. Los datos expresan la media \pm SEM, tres experimentos independientes, en % del control.

No se obtuvieron diferencias significativas, pero se presenta una clara tendencia a un aumento en los niveles de la enzima.

Efecto de la exposición a modafinilo sobre la actividad de GS

Posterior a evaluar los niveles proteicos de la GS, decidimos determinar si la actividad de la GS podría ser modificada por la exposición a modafinilo; mediante la producción de γ -glutamihidroxiato, y si la actividad de la GS es dependiente de la vía de señalización PI3K-AKT/PKB (Fig.14). Los datos obtenidos demuestran que la exposición a 100 μ M de modafinilo puede aumentar la actividad de la GS, alrededor de 0.5 veces más.

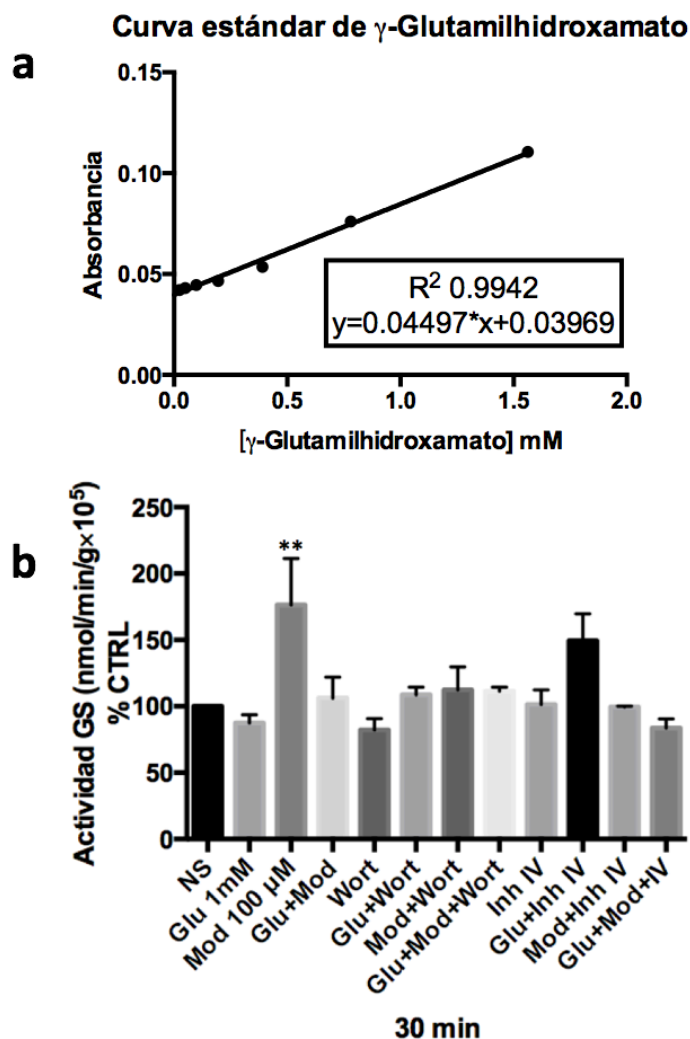


Fig. 14. Actividad de GS. Panel a: Curva estándar de γ -glutamihidroxiato. **Panel b** Los inhibidores fueron colocados 30 min antes de los distintos tratamientos (Wortmanina e inhibidor IV de AKT 100 nM). Los resultados están expresados como la media \pm SEM. Tres experimentos independientes, ANOVA más prueba post hoc Dunnett $p=0.007$ en % del control.

Efecto de la exposición a modafinilo sobre los niveles de AKT/PKB

Adicionalmente, decidimos evaluar si la exposición a modafinilo, en el modelo *in vivo*, puede alterar la vía PI3K-AKT/PKB, modificando los niveles proteicos de AKT/PKB fosforilado en Serina 473 en cerebelo (Fig. 15), corteza (Fig. 16) e hipocampo (Fig. 17). Los resultados muestran que en el cerebelo, hay una disminución en la activación de la vía, por la disminución en la fosforilación en serina 473. Contrastantemente, en la corteza se presenta una mayor fosforilación, en la concentración de 90 mg/kg. Finalmente, en el hipocampo no pudimos observar diferencias significativas en las concentraciones y tiempo empleados.

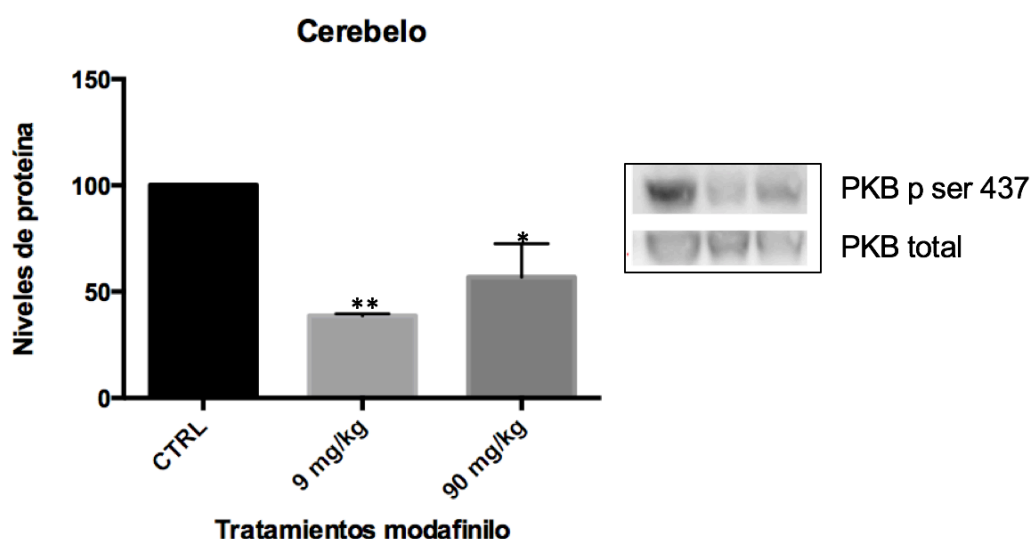


Fig. 15. Niveles de fosfo PKB (Ser 473) en cerebelo. Ratas Wistar macho de 8 días expuestas a diferentes dosis de modafinilo vía i.p. durante 4 h. Los datos expresan la media \pm SEM, tres experimentos independientes $p=0.05$ *, $p=0.002$ ** prueba posthoc Dunnett en % del control.

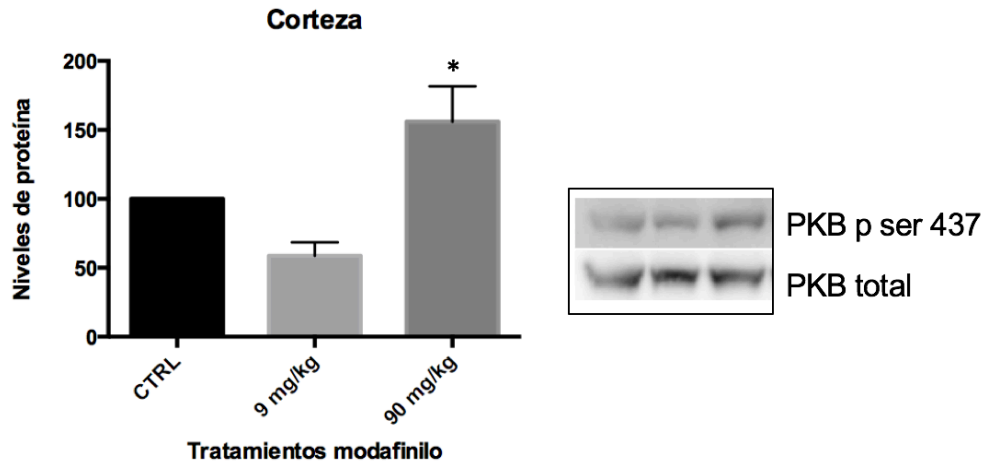


Fig. 16. Niveles de PKB p Ser 473 en Corteza. Ratas Wistar macho de 8 días expuestas a diferentes dosis de modafinilo vía i.p. durante 4 h. Los datos expresan la media \pm SEM, tres experimentos independientes $p=0.05$ * prueba posthoc Dunnett, en % del control.

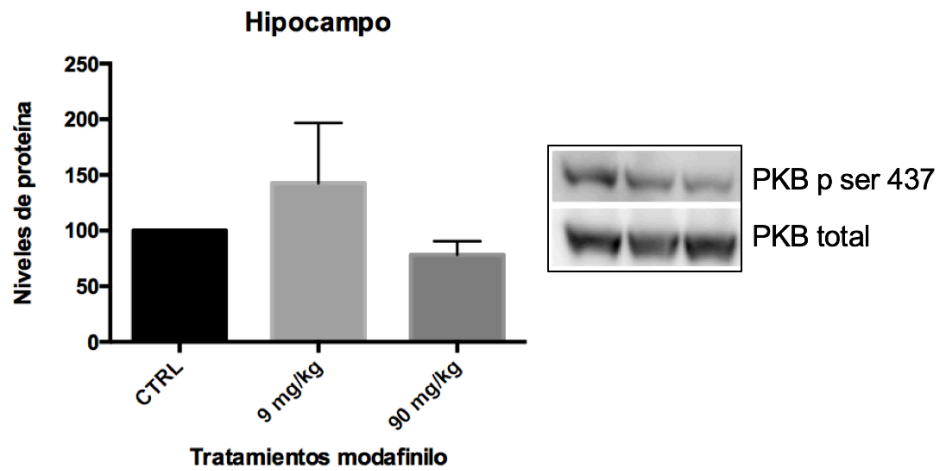


Fig. 17. Niveles de PKB p Ser 473 en Hipocampo. Ratas Wistar macho de 8 días expuestas a diferentes dosis de modafinilo vía i.p. durante 4 h. Los datos expresan la media \pm SEM, tres experimentos independientes $p=0.05$ * prueba posthoc Dunnett, en % del control.

Discusión

Touret y colaboradores en 1994 reportaron que en un modelo de ratas la exposición vía i.p de 64 mg/kg administrados a las 9:00 h, no ejerce efectos significativos en los niveles relativos de GS a 2 y 7 h después del tratamiento, al igual que al las 4 h y las dosis empleadas en el presente trabajo. No obstante, a 128 mg/kg los niveles relativos de GS aumentaron en corteza protoparietal, lo cual sugiere que se deben de emplear dosis mayores de modafinilo para producir el aumento de la GS. Sin embargo, un par de años después, Bettendorff y colaboradores en 1996 mostraron que el tratamiento con 128 mg/kg modafinilo no induce un incremento en los sustratos de la lanzadera Glutama/glutamina, pero sí aumenta la actividad metabólica, para luego tener una fase de deceso. Con nuestros datos no observamos un cambio significativo de la actividad de la GS. Podría hipotetizarse que el estímulo con modafinilo aumenta el metabolismo y la síntesis de proteínas, en nuestros datos, al mostrar activación de la vía AKT/PKB, ligada estrechamente al aumento en la síntesis de proteínas. En cuanto a las diferencias obtenidas en cada una de las áreas, es debido a las características de cada región, no son similares, incluso el tipo y la proporción de transportadores de Glu, es diferente en las áreas analizadas. Lehre y colaboradores en 1995, estimaron la proporción de transportadores en diversas áreas, reportaron que en hipocampo el transportador que es expresado mayoritariamente es GLT1, en contraste con el cerebelo en donde el principal transportador de Glu, es GLAST, en la corteza aproximadamente el 70% corresponde a GLT1 mientras que GLAST representa alrededor del 20%.

Un estudio realizado en nuestro equipo de trabajo, elaborado por Bejarano-Pérez en el 2017 demostró que la co-exposición de Glu y Mod puede modificar los efectos desencadenados por la exposición única a modafinilo, aumentando la captura de [³H]-D-Asp. Sin embargo, al pensar en los resultados que nosotros obtuvimos con respecto a la actividad de la GS, en los que el aumento en la actividad tras la exposición a Mod es abatido ante una co-exposición con Glu y recordando que el influjo de Glu desencadena procesos que son dependientes de energía como el acople funcional con la ATPasa y el transportador SNAT3, descrito por Martínez-Lozada en el 2013, y recordando que la GS es una enzima dependiente de ATP, se planteó la hipótesis de que se desencadenaría un mecanismo de compensación energética, del efecto del Glu; previamente descrito por Méndez-Flores y colaboradores en el 2016 mediante el incremento del influjo de glucosa a la célula y hacer más eficiente el metabolismo

celular, por lo que se plantean algunas perspectivas que permitan caracterizar parte de los eventos desencadenados la co-exposición de modafinilo y Glu.

Otro de los resultados que obtuvimos que abrió el panorama a más preguntas fue que la actividad de GS no depende de la vía PI3K-AKT/PKB, una de las vías desencadenadas por el transportador GLAST (Martínez-Lozada et al., 2011). Contrastando con los resultados reportados por Tiburcio-Félix y colaboradores en el 2017, en donde muestra que los niveles proteicos de GS pueden ser regulados por la señalización del transportador e independiente de calcio. No obstante, Bidmon y colaboradores en el 2008, encontraron que es posible que la actividad de la GS no tenga una relación con sus niveles proteicos. Sin embargo, las vías implicadas en la regulación de la actividad de GS, no están esclarecidas.

Conclusiones

- La exposición a modafinilo no induce cambios significativos en los niveles de GS en ninguna de las regiones evaluadas a las dosis y tiempo empleados
- La exposición a modafinilo modifica la actividad de la GS independiente de la vía IP3K-AKT/PKB
- La exposición a modafinilo tiene potencial de actuar sobre la síntesis de proteínas por la disrupción en la vía IP3K-AKT/PKB/mTOR.
-

Perspectivas

- Evaluar la actividad metabólica después del tratamiento con modafinilo mediante la actividad de:
 - Glutamato deshidrogenasa
 - Lactato deshidrogenasa
 - Malato deshidrogenasa
- Evaluar los niveles de transportadores de glucosa (GLUTs) en la membrana, tras la coexposición a Glu y Mod.
- Caracterizar el efecto de la exposición a modafinilo sobre los niveles de GS y la actividad a diferentes tiempos y concentraciones, incluyendo tiempos largos
- Determinar si la actividad de la GS es dependiente de la señalización de transportadores, mediante el uso de algún bloqueador de transportadores de Glu, como el TBOA

Bibliografía

Arthur J. L. Cooper and Thomas M. Jeitner. 2016. “Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain”. *Biomolecules*. 6 (16): 1-33. doi:10.3390/biom6020016.

Arumugam R. Jayakumar and Michael D. Norenberg. 2016. “Synthetase: Role in Neurological Disorders”. *Springer International Publishing Switzerland*. A. Schousboe, U. Sonnewald (eds.), *The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle*, Advances in Neurobiology 13, DOI 10.1007/978-3-319-45096-4_13.

Bejarano-Pérez. 2017. “EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A MODAFINILO EN EL TRANSPORTE DEL GLUTAMATO EN CÉLULAS GLIALES DE BERGMANN”. CINVESTAV, Ciudad de México, México.

Benedikt Frieg, Boris Görg, Nadine Homeyer, Verena Keitel, Dieter Häussinger, Holger Gohlke. 2016. “Molecular Mechanisms of Glutamine Synthetase Mutations that Lead to Clinically Relevant Pathologies”. *PLOS Computational Biology*. 12 (2): 1-28. DOI: 0.1371/journal.pcbi.1004693.

Bettendorff, L., M. Sallanon-Moulin, M. Touret, P. Wins, I. Margineanu, y E. Schoffeniels. 1996. “Paradoxical sleep deprivation increases the content of glutamate and glutamine in rat cerebral cortex”. *Sleep*. 19 (1) :65-71. doi:10.1093/sleep/19.1.65.

Camacho, A., & Massieu, L. 2006. “Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death”. *Archives of Medical Research*. 37(1) : 11-18. DOI:10.1016/j.arcmed.2005.05.014.

David Eisenberg, Harindarpal S. Gill, Gaston M.U. Pfluegl, Sergio H. Rotstein. 2000. “Structure-function relationships of glutamine synthetases”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1477: 122-145.

Eulenburg, V., Gomeza, J., 2010. “Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Research Reviews*”. 63: 103–112.

Ferraro, L, T Antonelli, W T O’Connor, S Tanganelli, F Rambert, y K Fuxe. 1997. “The antinarcotic drug modafinil increases glutamate release in thalamic areas and hippocampus.” *Neuroreport* 8 (13): 2883–87.

G. Lallement, M. Pérès, D. Lagardel 1999. “Modafinil: A Molecule of Military Interest”. *Médecine et armées*. 27 (3): 197-203.

Gerrard, Paul, y Robert Malcolm. 2007. “Mechanisms of modafinil: A review of current research”. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 3 (3): 349–64.

Gertrudis Perea, Marta Navarrete y Alfonso Araque. 2009. “Tripartite synapses: astrocyte process and control synaptic information”. *Trends in Neurosciences*. 32 (8): 421-431. DOI:10.1016/j.tins.2009.05.001.

Graham L. Collingridge, Richard W. Olsen, John Peters, Michael Spedding. 2009. “A nomenclature for ligand-gated ion channels”. *Neuropharmacology*. 56. 2-5. DOI:10.1016/j.neuropharm.2008.06.063.

Georgia M Parkin, Madhara Udawela, Andrew Gibbons, Brian Dean. 2018. “Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders”. *World Journal of Psychiatry*. 8 (2): 51-63.

GraphPad Software versión 6.01, 2016. San Diego California.

Hans-J. Bidmon, Boris Görg, Nicola Palomero-Gallagher, Axel Schleicher, Dieter Häussinger, Erwin J. Speckmann, y Karl Zilles. 2008. “Glutamine synthetase becomes nitrated and its activity is reduced during repetitive seizure activity in the pentylentetrazole model of epilepsy”. *Epilepsia*. 49 (10): 1733-1748.

I-Chen Peng, Alex J. Bott and Wei-Xing Zong. 2016. "Spectrophotometric Determination of Glutamine Synthetase Activity in Cultured Cells". *Bio-protocol*. 6 (19): 1-5. DOI:10.21769/BioProtoc.1959.

ImageJ versión 1.50i, 2016. Wayne Rasband, National institutes of Health, USA.

Joseph V. Baranski, Ross Pigeau, Peter Dinich, Ira Jacobs. 2004. "Effects of modafinil on cognitive and meta-cognitive performance". *Human Psychopharmacology: Clinical & Experimental*. 19:323–332.

Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. 2013. "Glial Cells. In *Neuroscience in the 21st Century*". 475–506. New York, NY: Springer New York. DOI:10.1007/978-1-4614-1997-6_19.

Michael J Minzenberg and Cameron S Carter 2007. "Modafinil: A Review of Neurochemical Actions and Effects on Cognition". *Neuropsychopharmacology*. 0893 (133): 1-26.

Knut P. Lehre, Line M. Levy, Ole P. Ottersen, Jon Storm-Mathisen, and Niels C. Danbolt. 1995. "Differential Expression of Two Glial Glutamate Transporters in the Rat Brain: Quantitative and Immunocytochemical Observations". *The Journal of Neuroscience*. 15(3): 1835-1853.

Kumar, R. 2008. "Approved and investigational uses of modafinil: an evidence-based review". *Drugs*. 68(13): 1803-1839.

László Köles, Erzsébet Kató, Adrienn Hanuska, Zoltán S. Zádori, Mahmoud Al-Khrasani, Tibor Zelles, Patrizia Rubini y Peter Illes. 2015. "Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glial signalling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems". *Purinergic Signalling*. (12) 1-24. DOI:10.1007/s11302-015-9480-5.

L. Ferraro, T Antonelli, WT O'Connor. 1998. "The effects of modafinil on striatal, pallidal and nigral GABA and glutamate release in the conscious rat: Evidence for a preferential inhibition of striato-pallidal GABA transmission". *Neuroscience Letters*. 253:135–138.

Luca Ferraro, Tiziana Antonelli, Sergio Tanganelli, William T. O'Connor, Miguel Perez de la Mora, Jesus Mendez-Franco, Francis A. Rambert y Kjell Fuxe. 1999. "The vigilance promoting drug modafinil increases extracellular glutamate levels in the medial preoptic area and the posterior hypothalamus of the conscious rat: Prevention by local GABAA receptor blockade". *Neuropsychopharmacology*. 20:346–356.

Marion M. Bradford. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding". *Academic Press*. 72: 248-254.

Mark J. Niciu, Benjamin Kelmendi, Gerard Sanacora. 2012. "Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 100: 656-664. DOI:10.1016/j.pbb.2011.08.008.

Marta Spodenkiewicz, Carmen Diez-Fernandez, Véronique Rüfenacht, Corinne Gemperle-Britschgi y Johannes Häberle. 2016. "Minireview on Glutamine Synthetase Deficiency, an Ultra-Rare Inborn Error of Amino Acid Biosynthesis". *Biology*. 5 (40): 2-17.

Martinez-Hernandez, A.; Bell, K.P.; Norenberg, M.D. 1977. "Glutamine synthetase: Glial localization in brain". *Science* 195: 1356–1358.

Martínez-Lozada, Zila, Alain M. Guillem, Marco Flores-Méndez, Luisa C. Hernández-Kelly, Carmelita Vela, Enrique Meza, Rossana C. Zepeda, Mario Caba, Angelina Rodríguez, y Arturo Ortega. 2013. "GLAST/EAAT1-induced Glutamine release via SNAT3 in Bergmann glial cells: Evidence of a functional and physical coupling". *Journal of Neurochemistry* 125 (4): 545–54. doi:10.1111/jnc.12211.

Mendez-Flores, Orquidia G., Luisa C. Hernández-Kelly, Edna Suárez-Pozos, Mustapha Najimi, y Arturo Ortega. 2016. "Coupling of glutamate and glucose uptake in cultured Bergmann glial cells". *Neurochemistry International* 98: 72–81. doi:10.1016/j.neuint.2016.05.001.

M. Touret, M. Sallanon-Moulin, C. Fages, V. Roudier, M. Didier-Bazes, B. Roussel, M. Tardy, M. Jouvet. 1994. "Effects of modafinil-induced wakefulness on glutamine synthetase regulation in the rat brain". *Molecular Brain Research*. 26: 123-128.

Niels C. Danbolt. 2001. "Glutamate uptake". *Progress in Neurobiology*. 65: 1-105.

Pesole, G., Gissi, C., Lanave, C., and Saccone, C. 1995. "Glutamine synthetase gene evolution in bacteria". *Molecular Biology and Evolution* 12: 189-197.

Reynaldo Tiburcio-Félix, Miguel Escalante-López, Bruno López-Bayghen, Daniel Martínez, Luisa C. Hernández-Kelly, Samuel Zinker, Dinorah Hernández-Melchor, Esther López-Bayghen, Tatiana N. Olivares-Bañuelos y Arturo Ortega. 2017. "Glutamate-Dependent Translational Control of Glutamine Synthetase in Bergmann Glia Cells". *Molecular Neurobiology*. DOI 10.1007/s12035-017-0756-3.

Robertson Jr, Philmore, y Edward T. Hellriegel. 2003. "Clinical Pharmacokinetic Profile of Modafinil". *Clinical Pharmacokinetics*. 42 (2): 123–37. doi:10.2165/00003088-200342020-00002.

Ulrich Müller, Nikolai Steffenhagen, Ralf Regenthal, Peter Bublak. 2004. "Effects of modafinil on working memory processes in humans". *Psychopharmacology* 177:161–169.

Wang, Y.1.; Kudoh, J.; Kubota, R.; Asakawa, S.; Minoshima, S.; Shimizu, N. 1996. "Chromosomal mapping of a family of human glutamine synthetase genes: Functional gene (GLUL) on 1q25, pseudogene (GLULP) on 9p13, and three related genes (GLULL1, GLULL2, GLULL3) on 5q33, 11p15, and 11q24". *Genomics*. 37: 195–199.

Wojciech W. Krajewski. 2008. "Structural Studies of Glutamine Synthetases – Towards the Development of Novel Antitubercular Agents". ACTA UNIVERSITATIS UPSALIENSIS. UPPSALA. Suecia.

Wong, Y. N., King, S. P., Simcoe, D., Gorman, S., Laughton, W., McCormick, G. C., & Grebow, P. 1999a. "Open-label, single-dose pharmacokinetic study of modafinil tablets: influence of age and gender in normal subjects". *Journal of Clinical Pharmacology*. 39(3): 281-288.

Wong, Y. N., Simcoe, D., Hartman, L. N., Laughton, W. B., King, S. P., McCormick, G. C., & Grebow, P. E. 1999b. "A double-blind, placebo-controlled, ascending-dose evaluation of the pharmacokinetics and tolerability of modafinil tablets in healthy male volunteers". *Journal of Clinical Pharmacology*. 39(1): 30-40.

Y. Zhou, N. C. Danbolt. 2014. "Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain". *Journal of Neural Transmission*. 121: 799-817.