



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“EFECTO DEL MANGANESO SOBRE EL TRANSPORTADOR DE
AMINOÁCIDOS NEUTROS SNAT3 EN CÉLULAS GLIALES DE
BERGMANN”**

Tesis que presenta:

I.B. JAZMÍN SOTO VERDUGO

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias
en la especialidad de Toxicología

Directores de tesis:

Dr. Arturo Ortega Soto

Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Neurotoxicología del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de los doctores Arturo Ortega Soto y Esther Ivonne López-Bayghen Patiño. La autora, Jazmín Soto Verdugo, contó con el apoyo económico de CONACyT a través de la beca de maestría No. 456284.

En memoria de Luisa María

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mis padres, Martha Verdugo y Luis Soto, por esforzarse cada día en darme lo mejor. Por todo el apoyo, sabias palabras, comprensión y cariño que me han dado en cada momento de mi vida. Sobre todo, con su ejemplo de perseverancia, trabajo duro y disciplina ustedes han forjado la persona que ahora soy. A pesar de la distancia siempre los llevo conmigo.

A mi hermana Brisa, por todos los momentos que hemos vivido juntas, por enseñarme a compartir y ser una mejor persona. A mi hermanita Luisa, por enseñarme tanto amor en tan poco tiempo.

A toda mi familia, por sus oraciones y palabras de aliento. En especial a mi tía Griselda.

A Manuel Viveros, gracias brindarme tu apoyo incondicional, tu amor y sobre todo por estar conmigo en uno de los momentos más difíciles de mi vida.

A mis compañeros y amigos de generación de maestría 2016-2018, por todos los momentos que compartimos durante este tiempo, les deseo éxito en todo lo que se propongan.

Al colegio de profesores del departamento de Toxicología, por sus enseñanzas y su apoyo en mi formación académica.

A mis compañeros del laboratorio 31, por compartir tantos buenos y malos momentos juntos. Principalmente Ana, Catya, Ada, Janisse y Laura, por sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, gracias por su amistad.

A Luisa Clara R. Hernández Kelly, Luis Cid Cid y Blanca Rocío Ibarra López del departamento de Toxicología por su asesoría técnica en los métodos realizados en este proyecto. Sin olvidar a la Dra. Donají Chí Castañeda, por su entrenamiento en las técnicas aplicadas en este trabajo y sus consejos para sobrevivir en el laboratorio.

A mi comité evaluador, Dra. Libia Vega y Dra. Rossana Zepeda por sus observaciones, sugerencias y por darse tiempo de revisar este escrito.

A la persona que hizo posible este proyecto, Dr. Ortega, le agradezco por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por guiarme en el andar científico, incluso a pesar de mí... Por su confianza, paciencia y palabras de aliento. A mi cotutora, Dra. Esther López-Bayghen por sus enseñanzas y buena disposición para el logro de este proyecto.

ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CAMKII	Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina.
cAMP	Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
CGB	Células gliales de Bergmann
COX-2	Ciclooxygenasa-2
DMT1	Transportador de metales divalentes 1
DTT	1,4-Ditiotreitol
EAAT	Transportador de aminoácidos excitadores
EGF	Factor de crecimiento endotelial
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
ERM	Familia de ezrina, radixina y moesina
FERM	Dominio de la proteína 4.1, ezrina, radixina y moesina
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAT	Transportador de ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Transportador de glutamato y aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato 1
Glu	Glutamato
GS	Glutamina sintetasa
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
KA	Kainato
KBP	Proteína de unión a kainato
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MCT	Transportador de mocarboxilatos
MEK	Cinasa de MAPK
mGluR	Receptores metabotrópicos de glutamato
MKP	Fosfatasa de MAPK
MMT	Metilciclopentadienil manganeso tricarbonilo
Mn-SOD	Manganeso-superóxido dismutasa
mPTP	Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NCX	Intercambiador sodio/calcio
Nedd4-2	Proteína ubiquitina-ligasa E3
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NHERF1	Factor regulador del intercambiador de Na^+/H^+ tipo 1

NMDA	N-metil-D-aspartato
PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida
PDZ	Dominio PDZ
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC/IP3/DAG	Fosfolipasa C/Inositol 1,4,5-trifosfato/Diacilglicerol
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato
SLC	Familia transportadora de solutos
SNAT	Transportador de aminoácidos neutro
Tf	Transferrina
TRPM7	Receptor de potencial transitorio de la familia M7
V_{máx}	Velocidad máxima
ZIP	Transportador de zinc

RESUMEN

El glutamato (Glu), es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de los vertebrados, se elimina de la hendidura sináptica por una familia de transportadores de Glu dependientes del sodio. Dentro de la célula glial, el Glu se metaboliza a glutamina (Gln) por la glutamina sintetasa y se libera a las neuronas a través de los transportadores de aminoácidos neutros dependientes del sodio del sistema N. La Gln se captura por las neuronas, completando el ciclo Glu/Gln. Las células gliales de Bergmann (CGB) son un tipo de glía radial especializada que reside en el cerebelo. En este contexto, estudios recientes demuestran que el manganeso (Mn^{2+}) se acumula de manera significativa en el cerebelo. El Mn^{2+} es un elemento esencial, que en altas dosis ejerce efectos oxidativos y neurotóxicos. La neurotoxicidad por la exposición a Mn se caracteriza por un deterioro astrocítico tanto en la expresión como en la actividad de los transportadores de Gln. El sistema N es el facilitador principal del eflujo de Gln de las células gliales. Además, la alteración de las vías de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) representan un evento temprano relacionado a la exposición a Mn en el cerebro inmaduro. Los mecanismos moleculares que median la neurotoxicidad inducida por Mn, particularmente en el contexto del ciclo Glu/Gln, aún no han sido entendidos del todo. Por lo tanto, decidimos investigar el papel de la exposición a corto plazo de Mn^{2+} en CGB, como un modelo establecido y validado para estudiar las interacciones glía/neurona. Con este fin, cultivos primarios de CGB de pollo se expusieron a concentraciones subtóxicas de Mn (50-500 μM) durante tiempos de 15 minutos a 2 horas. Se evaluó la liberación de [3H] -L-Gln, así como el patrón de fosforilación de la proteína cinasa en respuesta a señales extracelulares (ERK). El tratamiento con Mn^{2+} disminuyó la liberación de Gln, aunque este efecto no se mantuvo en presencia de aspartato (Asp). La exposición a Mn^{2+} aumentó la fosforilación de ERK1/2, desde las concentraciones más bajas probadas. El efecto no se potenció con la co-exposición a Asp. Además, la fosforilación de ezrina tampoco se alteró por los tratamientos con Mn^{2+} . En general, estos hallazgos sugieren que la alteración de las rutas de señalización de MAPK intracelulares pueden representar un evento temprano relacionado con los efectos de Mn^{2+} y aunque el efecto parece ser independiente del transporte de Glu, la alteración de la homeostasis de Glu puede conducir a un deterioro de la neurotransmisión glutamatérgica.

ABSTRACT

Glutamate (Glu), the main excitatory neurotransmitter in the mammalian brain, is cleared from the synaptic cleft by a family of sodium-dependent Glu transporters. Within the glial compartment, it is metabolized to glutamine (Gln) through Gln synthetase and released to the neurons through sodium-dependent neutral amino acid carriers of the N system. Gln is taken up by neurons completing the Glu/Gln cycle. Bergmann glial cells (BGC) are a type of specialized radial glia that reside in the cerebellum. In this context, recent studies have shown that one of the targets for manganese accumulation is the cerebellum. Manganese (Mn^{2+}) is an essential trace element that in high doses can exert serious oxidative and neurotoxic effects. Mn^{2+} neurotoxicity is characterized by astrocytic impairment both in the expression and activity of Gln transporters. System N is a major facilitator of Gln efflux from glial cells. Also, altered intracellular mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathways represent an early event linked to Mn^{2+} exposure in the immature brain. The molecular mechanisms mediating Mn^{2+} -induced neurotoxicity, particularly in the context of the Glu/Gln cycle, have yet to be completely understood. Hence, we decided to investigate the role of Mn^{2+} short-term exposure on BGC, as a well-established model of glia/neuronal interactions. To this end, primary cultures of chick cerebellar BGC were exposed to subtoxic concentrations of Mn^{2+} ($MnCl_2$; 50-500 μM) from 15 minutes to 2 hours. [3H]-L-Gln release, as well as the extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 phosphorylation pattern were evaluated. Mn^{2+} treatment reduced Gln release although this effect was not sustained under a background of aspartate (Asp). Mn^{2+} exposure increased ERK1/2 phosphorylation, from the lowest time and concentration tested. The effect was not potentiated on a co-exposure with Asp. Also, the treatment with Mn^{2+} did not alter phospho-ezrin levels in the plasma membrane. Overall, these findings suggest that altered intracellular MAPKs signaling pathways may represent an early event triggered by Mn^{2+} exposure, although the effect appears to be independent of Glu transport. The disruption of Glu homeostasis may lead to impairment of glutamatergic neurotransmission.

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	IV
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE GENERAL.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	1
1.1.1. <i>Células gliales</i>	1
1.1.2. <i>Glutamato</i>	3
1.1.3. <i>Lanzadera Glu/Gln</i>	7
1.1.4. <i>Lanzadera astrocito-neurona-lactato</i>	7
1.1.5. <i>Vía de señalización MAPK-ERK 1/2</i>	8
1.1.6. <i>Anclaje de transportadores en la membrana plasmática: papel de ezrina</i>	8
1.2. MANGANESO	9
1.2.1. <i>Esencialidad versus toxicidad</i>	9
1.2.2. <i>Toxicocinética</i>	10
1.2.3. <i>Mecanismos de neurodegeneración inducidos por el Mn</i>	11
1.3. JUSTIFICACIÓN	14
1.4. HIPÓTESIS	15
1.5. OBJETIVOS.....	15
1.5.1. <i>Objetivo general</i>	15
1.5.2. <i>Objetivos específicos</i>	15
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
2.2. MATERIAL BIOLÓGICO	16
2.3. REACTIVOS	17
2.4. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS GLIALES DE BERGMANN	17
2.5. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MTT	17
2.5.1. <i>Principio</i>	17
2.5.2. <i>Procedimiento</i>	18
2.6. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE [3H]-L-GLUTAMINA.....	18
2.6.1. <i>Principio</i>	18
2.6.2. <i>Procedimiento</i>	18
2.7. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES Y MEMBRANALES	19
2.7.1. <i>Principio</i>	19
2.7.2. <i>Procedimiento</i>	19

2.8.	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.....	20
2.8.1.	<i>Principio</i>	20
2.8.2.	<i>Procedimiento</i>	20
2.9.	INMUNODETECCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	21
2.9.1.	<i>Principio</i>	21
2.9.2.	<i>Procedimiento</i>	21
2.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
III.	RESULTADOS	22
3.1.	LA EXPOSICIÓN A Mn^{2+} NO DISMINUYE LA VIABILIDAD EN CGB	22
3.2.	LA LIBERACIÓN DE $[^3H]$ -L-GLN NO DISMINUYE EN CGB TRAS LA EXPOSICIÓN A Mn^{2+}	23
3.3.	EL TRATAMIENTO CON Mn^{2+} AUMENTA LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2	24
3.4.	EL AUMENTO EN LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2 TRAS LOS TRATAMIENTOS CON Mn^{2+} NO ES DEPENDIENTE DEL TRANSPORTE DE ASP	26
3.5.	LA EXPOSICIÓN A Mn^{2+} NO AFECTA LA FOSFORILACIÓN DE EZRINA, PROTEÍNA IMPORTANTE EN EL ANCLAJE DE PROTEÍNAS A LA MEMBRANA PLASMÁTICA	27
IV.	DISCUSIÓN.....	29
4.1.	LA EXPOSICIÓN A Mn^{2+} NO AFECTA LA VIABILIDAD EN CGB.....	29
4.2.	LA LIBERACIÓN DE $[^3H]$ -L-GLN NO DISMINUYE EN CGB TRAS LA EXPOSICIÓN A Mn^{2+} 30	
4.3.	EL TRATAMIENTO CON Mn^{2+} AUMENTA LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2	32
4.4.	EL AUMENTO EN LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2 TRAS LOS TRATAMIENTOS CON Mn^{2+} NO ES DEPENDIENTE DEL TRANSPORTE DE ASP	34
4.5.	LA EXPOSICIÓN A Mn^{2+} NO AFECTA LA FOSFORILACIÓN DE EZRINA, PROTEÍNA IMPORTANTE EN EL ANCLAJE DE PROTEÍNAS A LA MEMBRANA PLASMÁTICA	34
V.	CONCLUSIONES	36
VI.	PERSPECTIVAS	36
VII.	REFERENCIAS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<i>Figura 1.</i> Estructura básica de la corteza cerebelar	2
<i>Figura 2.</i> Estructura básica de los receptores glutamatérgicos	4
<i>Figura 3.</i> Estequiometría del transporte de Glu.....	5
<i>Figura 4.</i> Formas de transporte de los transportadores de Gln de la familia slc38.....	6
<i>Figura 5.</i> Efecto del Mn^{2+} en la función mitocondrial y la desregulación del Ca^{2+}	12
<i>Figura 6.</i> Efectos del Mn^{2+} en la lanzadera Glu-Gln en astrocitos corticales.....	13
<i>Figura 7.</i> Esquema del protocolo experimental	16
<i>Figura 8.</i> Efecto del Mn^{2+} en la viabilidad celular de CGB.....	22
<i>Figura 9.</i> Efecto del tratamiento con Mn^{2+} en la liberación de Gln en CGB.....	24
<i>Figura 10.</i> Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones y tiempo de Mn^{2+} sobre la fosforilación de ERK 1/2	25
<i>Figura 11.</i> Efecto del Mn^{2+} y el transporte de Asp en la fosforilación de ERK 1/2 en CGB	27
<i>Figura 12.</i> Efecto del tratamiento con $MnCl_2$ sobre la fosforilación de ezrina en CGB	28
<i>Figura 13.</i> Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de SNAT3 de <i>Gallus gallus</i> y sus sitios de fosforilación mediados por PKC	32

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Células del sistema nervioso central

Existen dos tipos celulares principales en el sistema nervioso: las neuronas y las células gliales. Las neuronas se relacionan directamente con la transmisión eléctrica y el procesamiento de información, mientras las células gliales, aunque por mucho tiempo fueron pasadas por alto en el ámbito de la investigación del sistema nervioso central (SNC), llevan a cabo una gran cantidad de funciones importantes, tales como: dar soporte físico a las neuronas durante su migración, como almacén metabólico de las neuronas, control del tráfico de sustancias entre el torrente sanguíneo y el cerebro, señalización neurotrófica y modulación de la plasticidad sináptica (Elsayed y Magistretti, 2015).

1.1.1. Células gliales

Rudolf Virchow describió por primera vez a las células gliales como una sustancia conectiva no-neuronal en el cerebro y médula espinal en la que se encuentran distintos elementos del sistema nervioso (Virchow, 1846). El avance de la ciencia permitió identificar y clasificar estas células en dos categorías principales: microglía y macroglía; siendo la microglía, el conjunto de macrófagos residentes en el CNS. Por otro lado, la macroglía se encuentra a su vez dividida en astrogλία, oligodendrogλία, glía ependimaria y células de Schwann. La astrogλία presenta diferentes fenotipos dependiendo de la región del sistema nervioso en donde se encuentre. Por ejemplo, al localizarse en la sustancia gris se les conoce como astrocitos protoplasmáticos, a los presentes en la sustancia blanca: astrocitos fibrosos, astrocitos perivasculares a los que están en la periferia de los vasos sanguíneos, células de Müller en la retina y células gliales de Bergmann (CGB) en el cerebelo (Reichenbach y Wolburg, 2005).

1.1.1.1. Células gliales de Bergmann

Las CGB son un tipo de glía radial especializada que se encuentra en el cerebelo, particularmente en la capa molecular de la corteza cerebelar (figura 1). Se ha demostrado que los cuerpos celulares de las CGB se encuentran estrechamente

asociados a los de las células de Purkinje (Fülöp *et al.*, 1979). Dado que la sinaptogénesis ocurre en la capa molecular, las fibras de las CGB envuelven las sinapsis desarrolladas en las dendritas de las células de Purkinje (Yamada *et al.*, 2000). Es por lo que se considera que las CGB se encuentran implicadas en casi todas las sinapsis de las células de Purkinje, tanto excitadoras (Glu) como inhibitoras (ácido γ -aminobutírico: GABA; Bradford, 1988). Las CGB expresan transportadores glutamatérgicos, GABAérgicos y de aminoácidos neutros (EAATs, GATs y SNATs, respectivamente), al igual que receptores de Glu ionotrópicos de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato (KA) y ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), así como metabotrópicos de tipo I, II y III (mGluR; (López-Bayghen *et al.*, 2003a; López-Bayghen *et al.*, 2003b).

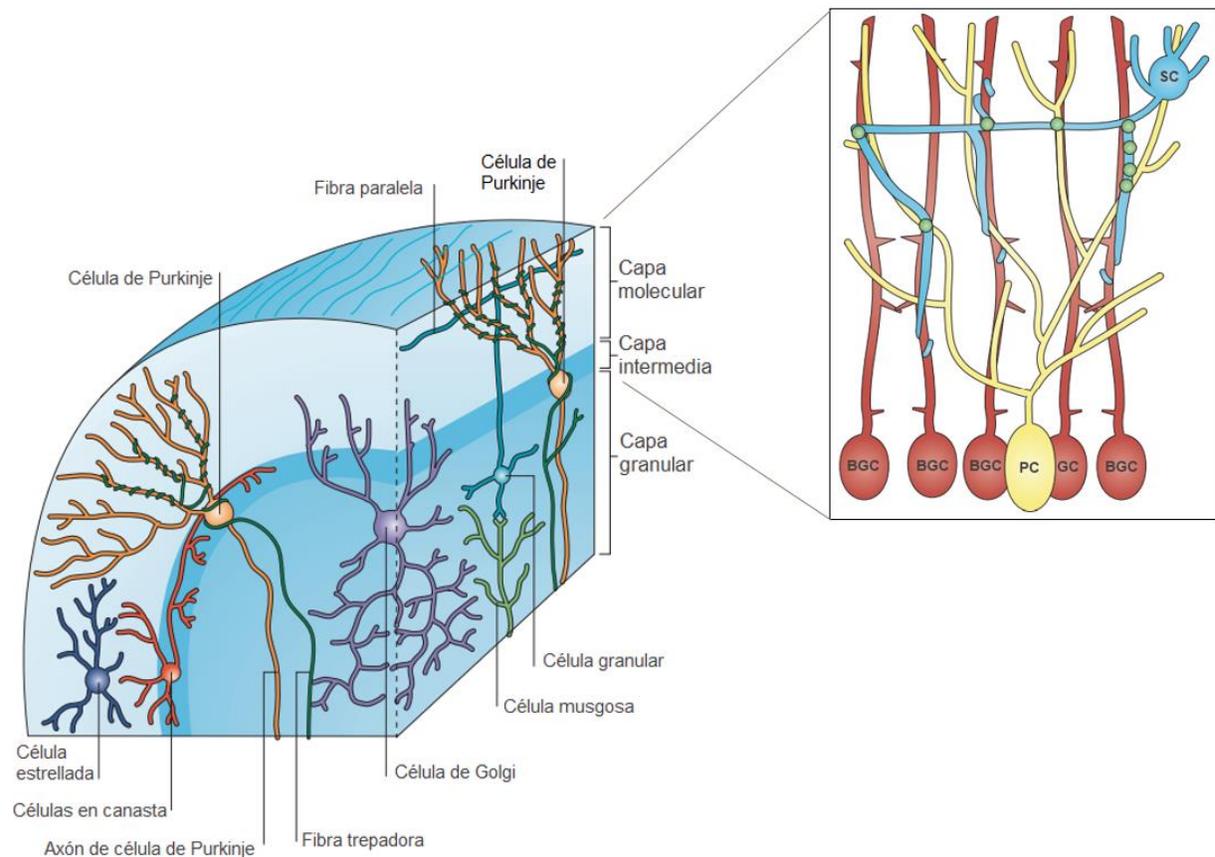


Figura 1. Estructura básica de la corteza cerebelar. Imagen de un corte transversal de un lóbulo cortical individual, indicando la presencia de las tres capas distintivas del córtex cerebelar (Modificado de Apps y Garwicz, 2005; Chao *et al.*, 2009).

1.1.2. Glutamato

El Glu es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central en vertebrados, y está relacionado con muchos aspectos del funcionamiento del encéfalo como la cognición, la memoria y el aprendizaje. El Glu además funge un papel esencial en el desarrollo del SNC, inducción y eliminación de sinapsis, así como en la migración, diferenciación y muerte celular. Las concentraciones de Glu en el medio extracelular y el líquido cefalorraquídeo se encuentran alrededor de 4 y 10 μM , respectivamente (Danbolt, 2001). En el SNC, el Glu se sintetiza a partir de α -cetoglutarato, al añadirle un grupo amino, acción mediada por la enzima glutamato deshidrogenasa o al remover un grupo amino del aminoácido Gln a través de la enzima glutaminasa. El metabolismo de Glu se puede llevar a cabo tanto por neuronas como células gliales.

1.1.2.1. Receptores de glutamato

El Glu ejerce sus acciones al activar receptores específicos de membrana, los cuales se clasifican en dos grupos de acuerdo con su mecanismo de transducción de señales (figura 2), iGluRs y mGluRs ((Hollmann y Heinemann, 1994), de los cuales los primeros son canales iónicos activados por ligando que permiten el influjo de iones al unirse Glu (Traynelis *et al.*, 2010) y dentro de esta se encuentran las subfamilias NMDA, AMPA y KA; llamadas de esta manera debido a los agonistas farmacológicos que se unen selectivamente a los miembros de estas subfamilias. El influjo de concentraciones altas de cationes al activar simultáneamente una gran cantidad de iGluRs, resulta en un potencial de acción (Traynelis *et al.*, 2010). Por otro lado, los mGluRs, son receptores acoplados a proteínas G, los cuales cuentan con una estructura clásica de siete segmentos transmembranales e inician sus cascadas de señalización al unirse Glu. Basados en la homología de las secuencias, farmacología y asociaciones de segundos mensajeros, los mGluRs pueden ser subcategorizados en grupo I, II y III (Conn y Pin, 1997). La activación del grupo I de mGluRs y acople a las proteínas G_q inicia cascadas de señalización relacionadas con fosfolipasa C/inositol 1,4,5-trifosfato/diacilglicerol (PLC/IP3/DAG, por sus siglas en inglés). Los grupos II y III reducen los niveles de AMP cíclico (cAMP) al iniciar la señalización inhibitoria de la proteína G_i .

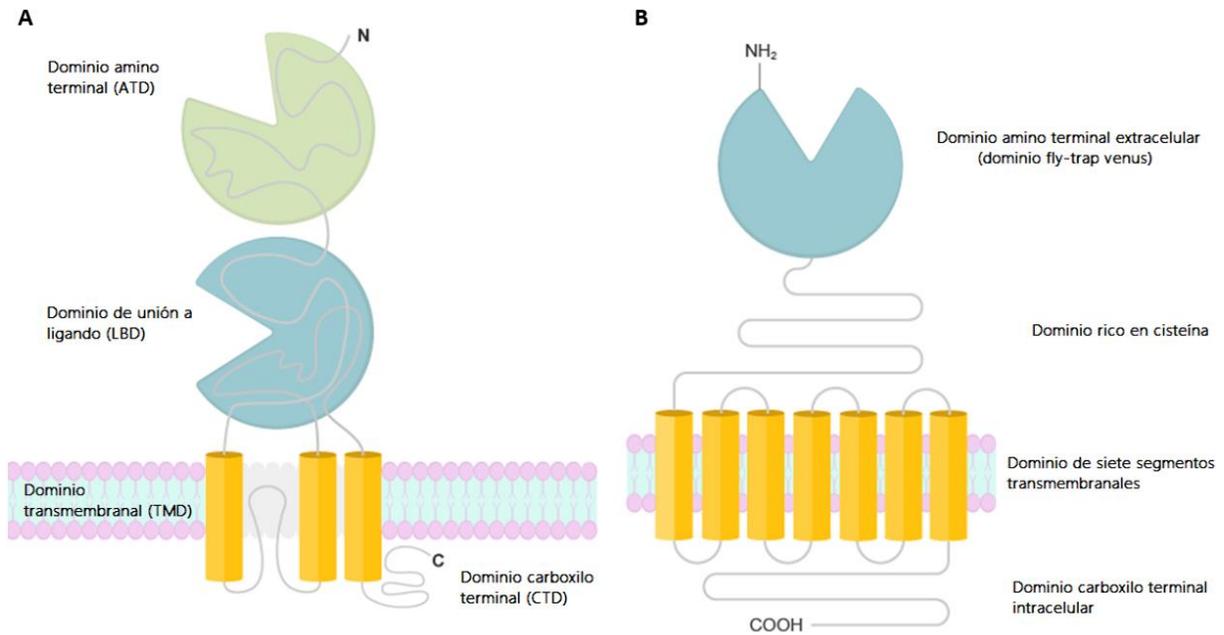


Figura 2. Estructura básica de los receptores glutamatergicos. A) Receptores ionotrópicos, **B)** Receptores metabotrópicos (Adaptada de Kenny y Markou, 2004; Traynelis *et al.*, 2010).

1.1.2.2. Transportadores de glutamato

Una vez que el Glu ejerce sus acciones sobre los receptores membranales, los niveles de Glu en el espacio sináptico se regulan por una familia de transportadores de alta afinidad dependientes de sodio que se encuentran principalmente en astrocitos (Schousboe, 1981). En mamíferos, existen 5 tipos de transportadores de Glu denominados EAAT (por sus siglas en inglés) del 1 al 5. Estos transportadores se encargan de mantener las concentraciones de Glu reguladas para evitar la desensibilización o activación crónica de los receptores, y de evitar la excitotoxicidad. Los transportadores EAAT-1 (transportador de Glu y Asp: GLAST) y EAAT-2 (transportador de Glu 1: GLT-1) se encargan de más del 80% de la captura de Glu en el cerebro (Eulenburg y Gomeza, 2010; Swanson, 2013). El transportador predominante en las CGB es EAAT1/GLAST (Maragakis *et al.*, 2004). Recientemente, diversos estudios sugieren que los transportadores de Glu tienen un papel importante en la señalización activada por este aminoácido (Flores-Méndez *et al.*, 2013; López-Colomé *et al.*, 2012; Martínez-Lozada *et al.*, 2013). Además, se reporta que

EAAT1/GLAST es capaz de acoplarse con la ATPasa Na^+/K^+ (Gegelashvili *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2009).

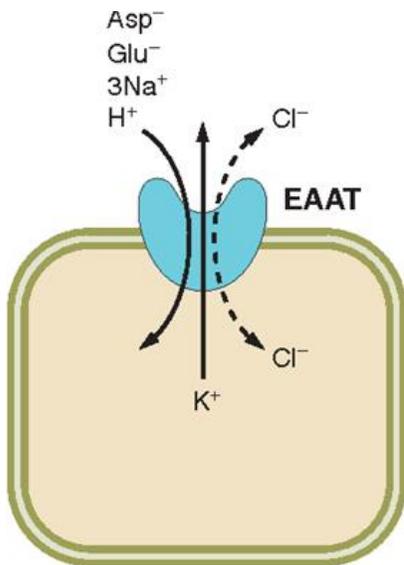


Figura 3. Estequiometría del transporte de Glu. El transportador EAAT puede transportar una molécula de Glu junto con 3 moléculas de Na^+ y una de H^+ y en contraflujo una de K^+ (Modificado de Vandenberg y Ryan, 2013).

1.1.2.3. Transportadores de glutamina

Existen varias familias de transportadores de Gln: sistemas L, ^+L , ASC y A (Dolińska *et al.*, 2004; Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2009). Aunque todos estos transportadores son capaces de transportar Gln, se cree que algunos (L, ^+L y ASC) son intercambiadores (Bröer *et al.*, 2000; Pineda *et al.*, 1999), los cuales transportan Gln al secuestrar otro aminoácido, por lo cual se considera que estos no son responsables del eflujo neto de Gln requerido en el reciclamiento de neurotransmisores. Por otro lado, los transportadores del sistema A y el sistema N catalizan el flujo sólo de un aminoácido por ciclo de transporte y tienen la capacidad de alterar el contenido total de aminoácido presente en la célula glial. El transporte de Gln mediado por el sistema A es electrogénico, es decir, está acoplado al co-transporte de un ión Na^+ (Chaudhry *et al.*, 2002), por lo cual es capaz de mediar el influjo de Gln solo en los potenciales de membrana negativos de las células gliales. En contraste, el transporte de Gln mediado por el sistema N se acopla al transporte de un ión Na^+ y a contraflujo un H^+ , lo cual resulta en un mecanismo de transporte electroneutro que es bidireccional bajo condiciones fisiológicas (Bröer *et al.*, 2002; Chaudhry *et al.*, 1999; 2002). Lo cual

comprueba que el transporte mediado por el sistema N es un mecanismo potencial del eflujo de Gln en BGC como parte de la lanzadera Glu/Gln.

1.1.2.3.1. Sistema N

Los principales integrantes de la familia de transportadores del sistema N son SNAT3/SN1 y SNAT5/SN2, producto de los genes *slc38a3* y *slc38a5*, respectivamente (Bröer, 2014). SNAT3 transporta principalmente Gln, histidina y asparagina (Chaudhry *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2000) y su expresión en el cerebro es exclusivamente glial, concentrándose de manera especial alrededor de los procesos neuronales (Boulland *et al.*, 2002; 2003). Aunque SNAT5 también se encuentra en células gliales, tiene una mayor cantidad de sustratos, transportando de manera adicional serina, alanina y glicina (Hamdani *et al.*, 2012; Nakanishi *et al.*, 2001a; Nakanishi *et al.*, 2001b). Por lo cual se considera que SNAT3 es el principal transportador de Gln en CGB. SNAT3 puede inducir cambios en las células dado el contratransporte de H^+ . Además, SNAT3 es capaz de llevar a cabo un transporte eficiente de Gln tanto con Na^+ como con Li^+ , como catión acoplado al transporte de Gln (Chaudhry *et al.*, 1999; Nakanishi *et al.*, 2001a)

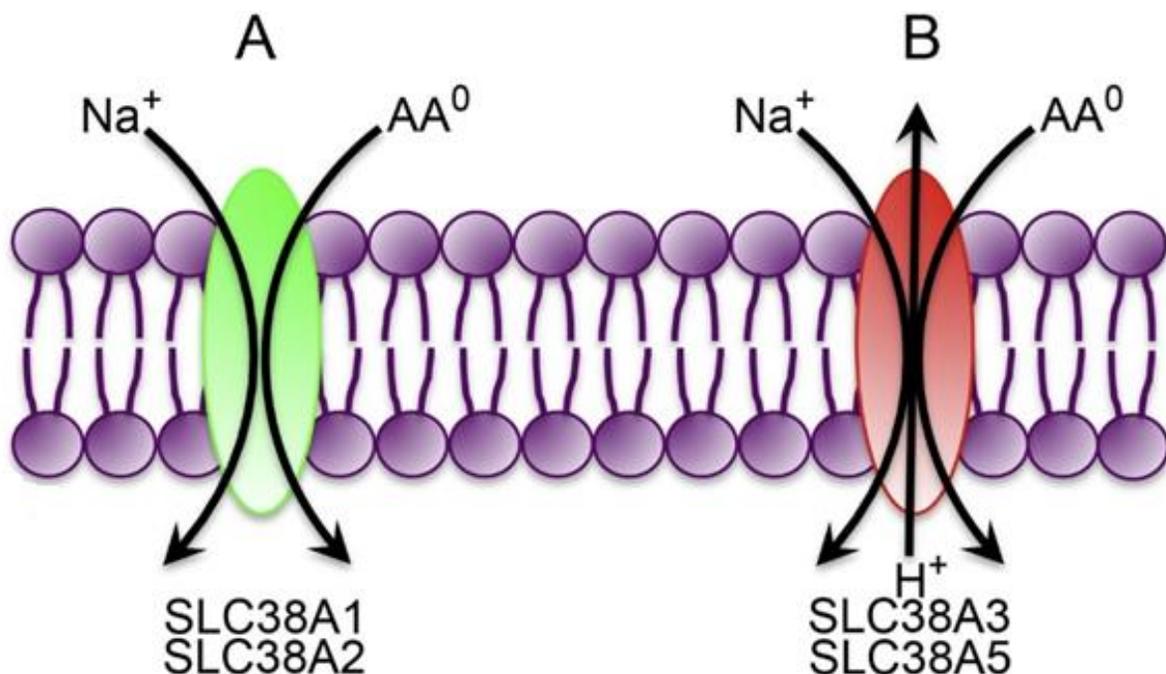


Figura 4. Formas de transporte de los transportadores de Gln de la familia *slc38*. (Tomada de Bhutia y Ganapathy, 2016).

1.1.3. Lanzadera Glu/Gln

Las células gliales forman una sinapsis tripartita al estar localizadas estrechamente cerca de las estructuras pre y postsinápticas (Perea *et al.*, 2009). Dado lo anterior, las CGB pueden detectar los niveles locales de actividad neural al reaccionar ante neurotransmisores y, en respuesta, liberar sustancias que modulan tales sinapsis. El Glu liberado a la hendidura sináptica se captura por las células gliales gracias a los EAATs, específicamente EAAT1/GLAST en CGB, para convertirse a Gln por la enzima glutamina sintetasa (GS). Esta Gln se transporta fuera de la célula glial hacia las neuronas, donde se utiliza para re-sintetizar Glu con la ayuda de la enzima transglutaminasa y de esta manera continuar con la neurotransmisión. Evidencia reciente demuestra que se requiere la Gln extracelular para mantener los niveles máximos de la transmisión sináptica excitadora (Billups *et al.*, 2013; Marx *et al.*, 2015; Rae *et al.*, 2003; Tani *et al.*, 2014). Debido a que la GS es la principal enzima productora de Gln, y ésta se encuentra exclusivamente en glía (Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979), las células gliales son de vital importancia en el reciclaje de neurotransmisores.

1.1.4. Lanzadera astrocito-neurona-lactato

En 1994, Magistretti y Pellerin, basándose en observaciones en cultivos primarios de astrocitos, postularon un modelo operacional que propone un posible mecanismo de acople cuantitativo entre el metabolismo glutamatérgico y la demanda de glucosa en el SNC (Pellerin y Magistretti, 1994). Tras la activación neuronal y a liberación sináptica de Glu, la captura de Glu llevada a cabo por los astrocitos induce un incremento en la captura de glucosa de los capilares, que se realiza por los transportadores de glucosa GLUT1 gracias a la activación previa de la ATPasa Na^+/K^+ (Pellerin y Magistretti, 1994; Pellerin *et al.*, 1997). Posteriormente, la glucosa entra en el proceso de glucólisis y se convierte en lactato por los astrocitos, los cuales se encuentran enriquecidos en lactato deshidrogenasa 5 (LDH_5). El intercambio de lactato entre los astrocitos y las neuronas se opera por los transportadores de monocarboxilatos (MCT). El lactato se convierte en piruvato dentro de las neuronas, ya que estas cuentan con la LDH_1 . El piruvato, entra al ciclo de los ácidos tricarbónicos a través de su transformación a acetil CoA

por la enzima piruvato deshidrogenasa, generando 18 moléculas de ATP por molécula de lactato (Pellerin *et al.*, 1998).

1.1.5. Vía de señalización MAPK-ERK 1/2

Las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos) son una familia de cinasas serina-treonina, las cuales juegan un papel importante en el neurodesarrollo y neuroplasticidad (Peres *et al.*, 2013). Las MAPK intervienen en diversas respuestas celulares, tales como proliferación, diferenciación, supervivencia celular, muerte y transformación celular. Los principales miembros de esta familia son las cinasas N-terminal de c-Jun (JNKs), p38^{MAPK} y las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2; Thomas y Huganir, 2004; Kim y Choi, 2010). La vía de señalización MAPK-ERK 1/2 (p44/p42) se puede activar por diversos estímulos extracelulares como mitógenos, factores de crecimiento, citocinas, así como iones (Baccarini, 2005; Meloche y Pouyssegur, 2007; Roux y Blenis, 2004). Una vez que se presenta el estímulo se inicia una cascada de tres pasos; que consiste en varias cinasas de cinasas MAPK, las cuales incluyen miembros de la familia Raf, Mos y Tpl2/COT. También están las cinasas de MAPK donde los principales miembros son MEK 1 y MEK2. Finalmente, las MAPK (p44/p42) se activan después de la fosforilación de los residuos en bucle Thr202-X-Tyr204 y Thr185-X-Tyr187, donde la X puede ser cualquier aminoácido (Murphy y Blenis, 2006; Rubinfeld y Seger, 2005) Existen diversos blancos río debajo de la vía de señalización, tales como p90RSK y el factor de transcripción Elk-1 (Dalby *et al.*, 1998; Marais, Wynne, y Treisman, 1993). ERK 1/2 se regulan negativamente por una familia de fosfatasas específicas de MAPK conocidas como MKPs, así como por los inhibidores de MEK, U0126 y PD98059 (Owens y Keyse, 2007).

1.1.6. Anclaje de transportadores en la membrana plasmática: papel de ezrina

Las proteínas ezrina, radixina y moesina forman parte de la familia ERM, la cual regula interacciones entre los microfilamentos de actina y la membrana celular (Vaheri *et al.*, 1997). Ezrina es una fosfoproteína de 80 kDa antes conocida como citovilina (Bretscher, 1983). Ezrina por una parte une los filamentos de actina a la membrana plasmática y por otro lado ancla proteínas de membrana en sitios específicos,

permitiendo a las células mantener funciones especializadas en superficies de membrana definidas (Dransfield, 1997). Esta proteína se regula a través de cambios conformacionales inducidos por la fosforilación mediada por fosfolípidos y proteínas cinasas, lo cual resulta en su activación (Bonilha, 2007). El reclutamiento de ezrina a ciertas áreas de la membrana depende de una primera unión de PIP₂ a un subdominio del amino terminal del dominio FERM seguido por la traslocación a la membrana plasmática y la fosforilación de un residuo de treonina (T567; Fievet *et al.*, 2004). Además, ezrina es capaz de unirse a proteínas con dominios PDZ (como los son transportadores y canales iónicos), a través de proteínas de anclaje como NHERF1 (Weinman *et al.*, 2006). Tal es el caso del transportador EAAT1/GLAST, donde en estudios recientes se muestra que ezrina forma un complejo junto con NHERF1 y GFAP, manteniendo a EAAT1/GLAST en la membrana plasmática (Aven *et al.*, 2006; López-Colomé *et al.*, 2016; Nijboer *et al.*, 2013; Sullivan *et al.*, 2007).

1.2. Manganeso

El manganeso (Mn²⁺) es un elemento del grupo 7 de la tabla periódica y el 12º elemento más abundante en la biósfera. Se encuentra ampliamente distribuido en polvo, sedimento, agua, así como en agentes biológicos (Aschner *et al.*, 2007). Su forma más común es la inorgánica, con 11 estados de oxidación del -3 al +7 (USEPA, 1984). En tejido vivo, los estados de oxidación predominantes son Mn²⁺, Mn³⁺ y posiblemente Mn⁴⁺, siendo el estado divalente el más abundante (Archibald y Tyree, 1987).

1.2.1. Esencialidad *versus* toxicidad

El Mn²⁺ es un elemento esencial en diversas funciones biológicas. Es cofactor de una amplia variedad de enzimas, desde cinasas, fosfatasa, sintetasa y óxido-reductasas (Quintanar, 2008). Dentro de las óxido-reductasas tenemos a la catalasa, peroxidasa y la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD), fungiendo un papel importante al proteger a la célula del daño oxidativo. En el SNC, el Mn²⁺ es necesario en el funcionamiento correcto de la lanzadera Glu/Gln, ya que la enzima GS lo utiliza como cofactor al sintetizar Gln del neurotransmisor Glu. Se estima que alrededor del 80%

del Mn^{2+} que se encuentra en el SNC está contenido en la enzima GS (Wedler, 1984). Sin embargo, a pesar de su esencialidad la exposición crónica a este metal puede tener efectos deletéreos en el sistema respiratorio, sistema reproductivo y el SNC. La afección más característica tras la exposición a Mn^{2+} es la enfermedad neurodegenerativa denominada como manganismo, la cual presenta síntomas similares a los de la enfermedad de Parkinson (Barbeau, 1984; Olanow, 2006). Esta enfermedad se reporta principalmente en personal ocupacionalmente expuesto de las industrias minera y del acero, expuestos de manera crónica al polvo o aerosoles que contienen el metal. Aunque, la introducción del antidetonante de gasolina metilciclopentadienil-manganeso-tricarbonilo (MMT) produjo la preocupación por la salud de poblaciones urbanas de grandes ciudades expuestas al humo de automóviles (Kaiser, 2003).

1.2.2. Toxicocinética

1.2.2.1. Absorción

La principal ruta de absorción es a través del tracto gastrointestinal, pero también puede ocurrir en los pulmones tras exposición inhalatoria (O'Neal y Zheng, 2015). Recientemente se ha aceptado la inyección intravenosa de narcóticos ilegales que contienen Mn^{2+} en su formulación, una tercera ruta de exposición (Outten *et al.*, 2001).

1.2.2.2. Distribución

Hasta la fecha, no se sabe de ninguna proteína de transporte en la célula destinada exclusivamente para el transporte de Mn^{2+} . Sin embargo, utiliza sistemas de transporte que se regulan por otros metales. Los principales transportadores relacionados al acarreo de Mn^{2+} , son los de cationes divalentes y se piensa que son poco eficientes para manejar tanto exposiciones crónicas, así como agudas de este metal. Asimismo, canales de calcio regulados por voltaje, receptores ionotrópicos de Glu, el canal receptor de potencial transitorio de melastina 7 (TRPM7), canales acarreadores de solutos (SLC, incluyendo las proteínas ZIP), canales de almacén operados por Ca^{2+} y procesamiento dependiente/independiente de transferrina (Tf), a través del transportador de metales divalentes 1 (DMT1; Aschner y Dorman, 2006; Erikson *et al.*, 2006; Dean *et al.*, 2009; Fujishiro *et al.*, 2011; Roth *et al.*, 2013).

1.2.2.3. Transformación

El Mn^{2+} no se metaboliza en el organismo. Sin embargo, se encuentra en varios estados de oxidación, y puede ir cambiando sus estados de valencia dentro del cuerpo. Gibbons y colaboradores, reportaron que la ceruloplasmina humana promovió la oxidación de Mn de su forma divalente a la trivalente en un modelo *in vitro*, así como un cambio de complejo de unión de $\alpha 2$ -macroglobulina a transferrina (Gibbons *et al.*, 1976). Es por ello que el metabolismo o sus estados de valencia iniciales pueden ser una determinante importante en la distribución y retención de Mn^{2+} en el cuerpo (ATSDR, 2012). La valencia del Mn también puede influenciar la toxicidad del Mn^{2+} . En estudios *in vitro* el Mn^{3+} parecer más citotóxico que el Mn^{2+} , posiblemente debido a su mayor reactividad oxidativa y su parecido con el hierro (Ali *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2001) Sin embargo, hasta la fecha se desconoce cuánto Mn divalente o trivalente, se encuentra en el interior de la célula y/o mitocondria.

1.2.2.4. Eliminación

La ruta primaria de eliminación es la excreción fecal hepatobiliar con una muy limitada excreción urinaria (Klaassen, 1976). El Mn^{2+} se puede eliminar en leche materna, sudor y cabello, aunque no constituyen rutas importantes de aclaramiento. En el humano, el tiempo de vida media de eliminación de Mn^{2+} del cerebro no difiere mucho de los resultados de otros mamíferos, siendo la vida media de eliminación de 53 días en humanos tras la administración de Mn^{2+} radiactivo (Cotzias *et al.*, 1968).

1.2.3. Mecanismos de neurodegeneración inducidos por el Mn

Los mecanismos por los cuales el Mn^{2+} puede llevar a cabo procesos de neurodegeneración siguen sin ser completamente elucidados. Sin embargo, diversos estudios discuten y proponen los diferentes mecanismos de procesos neurodegenerativos a causa de la exposición a Mn^{2+} .

1.2.3.1. Disfunción mitocondrial y estrés oxidante

Se establece que el Mn^{2+} puede ocasionar disfunción mitocondrial, pues es capaz de inhibir la fosforilación oxidativa en preparaciones de mitocondrias aisladas (Gavin *et al.*, 1999). En células PC12, el Mn inhibe el complejo I de la cadena respiratoria; en

cultivos primarios de neuronas, disrumpe el potencial de membrana mitocondrial e inhibe el complejo II (succinato deshidrogenasa) de la cadena respiratoria.

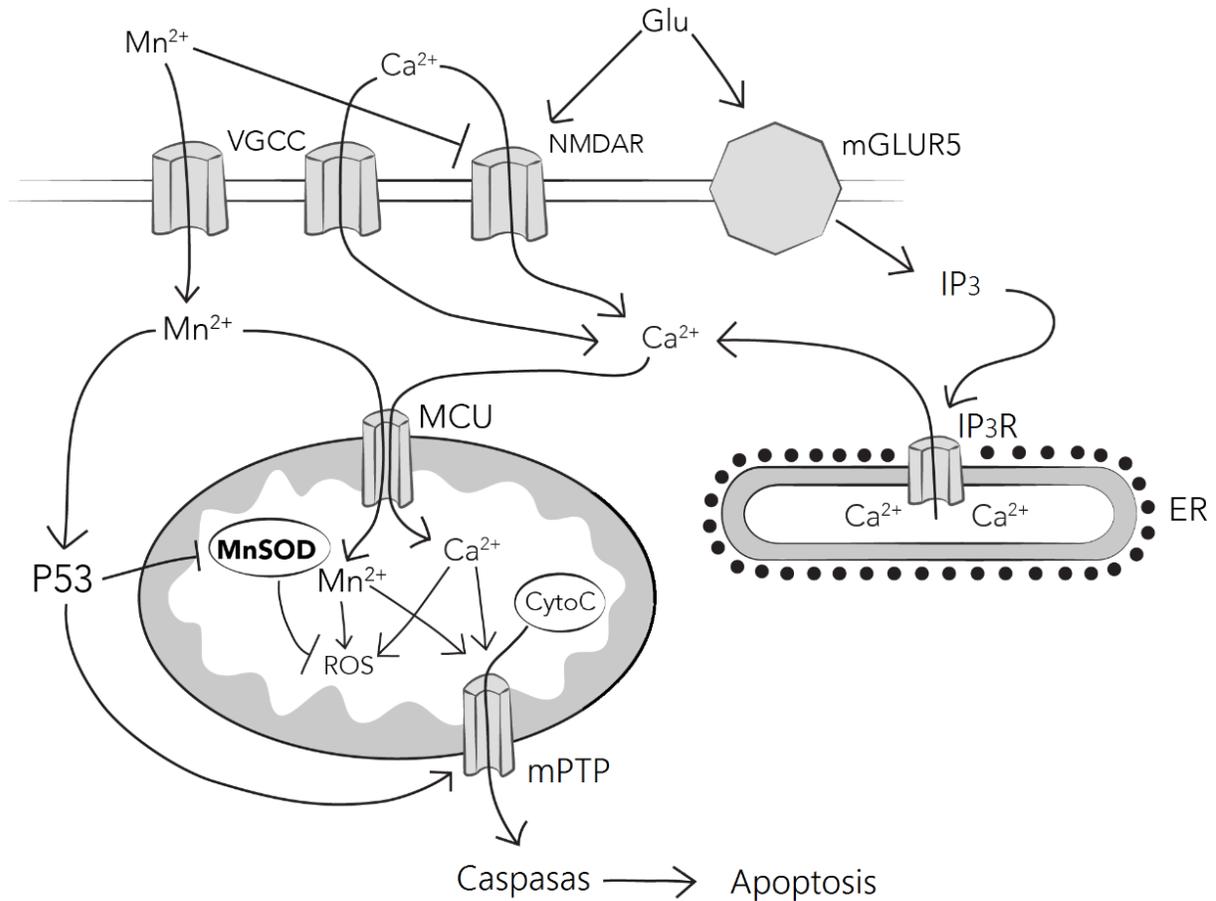


Figura 5. Efecto del Mn^{2+} en la función mitocondrial y la desregulación del Ca^{2+} . (Modificado de Tidball *et al.*, 2015).

De igual forma, estudios *in vivo* en ratas muestran que el tratamiento con Mn^{2+} inhibe los cuatro complejos de la cadena respiratoria y que disminuye la actividad de la monoamina oxidasa. La interferencia en el proceso de fosforilación oxidativa y la inhibición de la actividad mitocondrial, eventualmente llevará a la depleción de ATP, comprometiendo el metabolismo energético de la célula (Quintanar, 2008). El Mn tiende a acumularse dentro de la mitocondria, lo cual a su vez ocasiona acumulación de calcio (Ca^{2+}) en el mismo organelo. La depolarización de la membrana a causa del

exceso de Mn^{2+} y Ca^{2+} resulta en la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP;), el cual es capaz de liberar citocromo c (figura 5) y de tal forma iniciar una cascada apoptótica mediada por caspasas (Brustovetsky *et al.*, 2002). Los efectos productores de ROS a causa del Mn^{2+} en la mitocondria se atenúan con la adición de antioxidantes. La actividad de enzimas antioxidantes disminuye tras el tratamiento con $MnCl_2$ (Chtourou *et al.*, 2011).

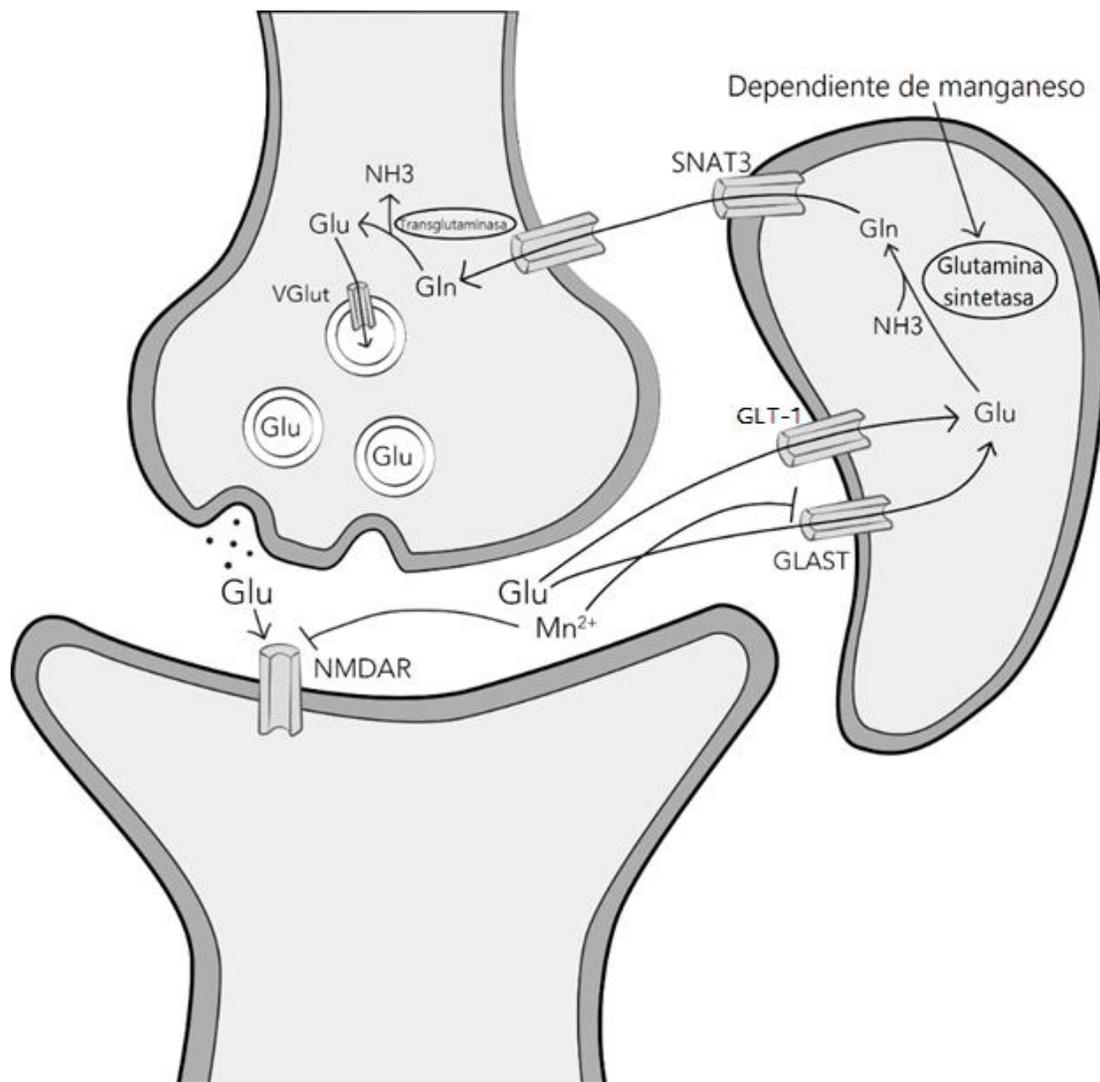


Figura 6. Efectos del Mn^{2+} en la lanzadera Glu-Gln en astrocitos corticales. Modificado de (Tidball *et al.*, 2015).

1.2.3.2. Alteración en los niveles de neurotransmisores: lanzadera Glu/Gln

El Mn puede afectar la lanzadera Glu/Gln (figura 6). Estudios en astrocitos muestran como el Mn^{2+} disminuye la captura de Glu al disminuir la expresión de GLAST/EAAT1 (Erikson y Aschner, 2003). El Mn^{2+} también puede incrementar la liberación sináptica de Glu e inhibir la conductancia de los receptores NMDA bloqueando el canal del receptor (Crooks *et al.*, 2007). Muchos estudios identifican una interrupción de la captura, liberación y metabolismo de la Gln en astrocitos (Milatovic *et al.*, 2007; Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2009; 2011). Se conoce cómo la exposición a Mn^{2+} causa deficiencia en el transporte y la recaptura de Glu en astrocitos, llevando al aumento de Glu extracelular (Lee *et al.*, 2009b). Además, el Mn disminuye la expresión y la actividad de la GS (Erikson *et al.*, 2006; 2007). Tales cambios pueden iniciar la interrupción de la lanzadera Glu/Gln y de esa forma afectar la homeostasis de la neurotransmisión en las neuronas aledañas a las células gliales (Sidoryk-Wegrzynowicz y Aschner, 2013).

1.3. Justificación

El Mn es un elemento traza esencial en la homeostasis de múltiples procesos celulares. Sin embargo, se reconoce que la exposición ambiental crónica a Mn^{2+} puede causar neurotoxicidad y es un factor de riesgo importante en el desarrollo del desorden neurodegenerativo conocido como manganismo que se caracteriza por compartir síntomas y lesiones morfológicas con la enfermedad de Parkinson. Los cultivos de astrocitos poseen una gran capacidad de acumular Mn^{2+} , incluso, en mayor proporción que las neuronas, y este exceso de Mn^{2+} afecta de manera primaria la función de las células gliales. Una de las principales funciones afectadas es el transporte de Gln, el cual, es indispensable en el reciclamiento del Glu. Glu es el principal neurotransmisor excitador del SNC. El transportador de aminoácidos neutros SNAT3 el mediador del eflujo de Gln de las células gliales hacia las neuronas para sintetizar Glu, por lo tanto, un elemento esencial en el funcionamiento de la lanzadera Glu/Gln. La función del transportador SNAT3 se regula a diversos niveles: conformación de la proteína transportadora (afinidad), expresión del transportador en la membrana plasmática

(V_{Max}), tasa de traducción de su mRNA y transcripción del gen *s/c38A3*. Las cascadas de señalización de las MAPKs, específicamente ERK 1/2 son un punto de convergencia en la regulación de la expresión génica. Por lo que es importante el estudio de la exposición a Mn^{2+} en un modelo tan bien establecido como lo son las CGB en el contexto de la neurotransmisión glutamatérgica.

1.4. Hipótesis

La exposición a Mn afectará el funcionamiento del transportador de aminoácidos neutros SNAT3 en células gliales de Bergmann.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Caracterizar la participación del transportador de aminoácidos neutros SNAT3 en la toxicidad del $MnCl_2$ en células gliales de Bergmann.

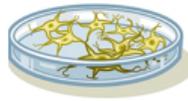
1.5.2. Objetivos específicos

- Evaluar la función del transportador SNAT3 mediante el ensayo de liberación de [3]-L-Gln tras la exposición a una baja concentración y tiempo de $MnCl_2$.
- Determinar la participación de la vía MAPK-ERK en el efecto provocado por la exposición a bajas concentraciones y tiempos de $MnCl_2$.
- Elucidar el posible mecanismo molecular implicado en la respuesta a la exposición a bajas concentraciones y tiempos de $MnCl_2$.
- Evaluar el efecto del $MnCl_2$ en el anclaje de los transportadores a la membrana mediante la detección de ezrina fosforilada.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Estrategia experimental

Cultivo primario de BGC, de cerebelo de embriones de pollo de 14 días



80-100% de confluencia (4-5 días después del cultivo)

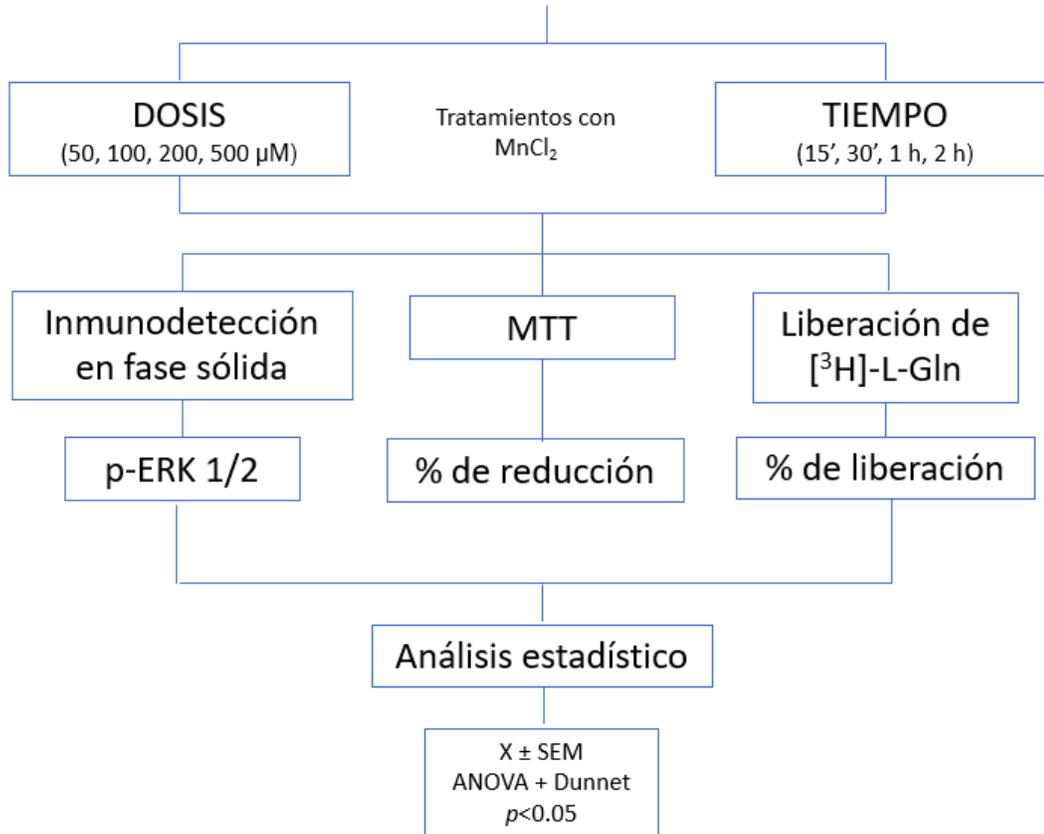


Figura 7. Esquema del protocolo experimental.

2.2. Material Biológico

Embriones de pollo de 10 días fueron donados por Avi-Mex S.A. de C.V., los cuales se mantuvieron en incubación a 37 °C hasta la elaboración del cultivo primario de CGB. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas internacionales sobre el uso ético de animales.

2.3. Reactivos

Los reactivos utilizados en la elaboración del cultivo primario de CGB se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, EE. UU.). El ácido L-glutámico, ácido D-aspartico y bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). La [³H]-L-Gln (50.3 Ci/mmol de actividad específica) se obtuvo de Perkin Elmer (Boston, MA, EE. UU.). Los reactivos utilizados en la inmunodetección en fase sólida se adquirieron de Bio-Rad (Hercules, CA, EE. UU.). El anticuerpo anti-p44/42 fosforilado se adquirió de Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, EE. UU.). El anticuerpo anti-ezrina fosforilada se adquirió de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, EE. UU.). El anticuerpo anti-conejo se obtuvo de GE Healthcare Life Sciences (Chicago, IL, EE. UU.).

2.4. Cultivo primario de células gliales de Bergmann

El cultivo primario de CGB se preparó conforme a la metodología previamente descrita por Ortega y colaboradores (Ortega *et al.*, 1991). A partir de cerebelos de embriones de pollo de 14 días diseccionados y homogenizados de manera enzimática y mecánica, se sembraron con 8×10^5 células/mL en medio Opti-MEM (Medio modificado del suero mínimo de Eagle; GIBCO) suplementado con 2.5% de suero fetal bovino y 50 µg/mL de gentamicina. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad, hasta alcanzar una confluencia entre 85-100% (4-6 días después). La pureza del cultivo (90-95%) se evalúa por la expresión de la proteína de unión a kainato (KBP), la cual es específica de CGB (Somogyi *et al.*, 1990).

2.5. Ensayo de viabilidad celular MTT

2.5.1. Principio

Ensayo colorimétrico que se basa en la reducción metabólica del compuesto soluble amarillo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un producto azul/púrpura insoluble (Slater *et al.*, 1963).

2.5.2. Procedimiento

Monocapas confluentes de CGB sembradas en cajas de cultivo celular de 96 pozos se trataron con 100 μ L de cada estímulo. La viabilidad celular se evaluó a las 3, 6, 12 y 24 h de tratamiento con $MnCl_2$ a diferentes concentraciones (50, 100, 200 y 500 μ M). Tres horas antes de concluir los tratamientos las células se incubaron con reactivo de MTT (5 mg/mL) a 37 °C. Se removió el líquido obtenido y los cristales formados se disolvieron en DMSO. La densidad óptica de las muestras se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm.

2.6. Ensayo de liberación de [3H]-L-Glutamina

2.6.1. Principio

La liberación de L-Gln se lleva a cabo por el sistema N de transportadores de Gln, el cual puede revertir la dirección del transporte de Gln por el cambio en el gradiente electroquímico en células gliales. Tal acto es pieza clave en el funcionamiento normal del ciclo Glu/Gln (Chaudhry *et al.*, 1999).

2.6.2. Procedimiento

Monocapas confluentes de CGB sembradas en cajas Petri de cultivo celular p60 se incubaron durante 2 h en solución de ensayo (HEPES 25 mM, NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, $MgCl_2$ 0.8 mM, Na_2HPO_4 1 mM, glucosa 33.3 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, ajustado a pH 7.4 con TRIS base 3 M) con [3 H]-L-Gln. Tras las 2 h de incubación, se procedió a realizar lavados con solución de ensayo en dos series, la primera 10 lavados cada minuto y la segunda 10 lavados cada 2 minutos, todas las fracciones hasta este punto se descartan con el fin de eliminar el exceso de radiactividad. Al desechar la última fracción de los lavados se procedió a coleccionar el sobrenadante cada dos minutos en 15 ocasiones. De la fracción 6 a la 10 se colocaron los estímulos, el resto de las fracciones se trataron con solución de ensayo. Tras coleccionar las 15 fracciones, se lisaron las células con NaOH 0.1 M, siendo esta la última denominada fracción 16. Finalmente se añadió a cada fracción líquido de centelleo y ácido acético, y se llevaron a analizar a un contador de centelleo líquido Beckmann 7800LS. La suma de las

desintegraciones por minuto de todas las fracciones (1-16) se tomó como 100% de liberación de Gln y a partir de ello se determinó el porcentaje de cada una de las fracciones.

2.7. Obtención de extractos totales y membranales

2.7.1. Principio

El choque osmótico es un método poco agresivo y suficiente para lisar las células. A menudo este método se combina con disrupción mecánica, y se fundamenta en el fenómeno de ósmosis. La técnica consiste en la carga de un volumen dado de células, con frecuencia se utiliza el doble del volumen de las células por volumen de líquido. La célula se expande debido a que contiene solutos que ocasionan un flujo osmótico del líquido hacia su interior. Esta expansión puede conducir a su lisis o rompimiento. La factibilidad del uso de este método depende de la resistencia mecánica de las células de interés. El fraccionamiento celular utiliza una o más propiedades de cada compartimento, tales como la densidad de flotación, densidad de carga superficial, forma y tamaño, y se basa principalmente en la centrifugación diferencial en medios de alta viscosidad a 4 °C.

2.7.2. Procedimiento

Al finalizar cada uno de los estímulos, las CGB se cosecharon mecánicamente y se colectaron en solución salina de fosfatos (K_2HPO_4/KH_2PO_4 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) con inhibidores de fosfatasas y proteasas (Na_3VO_4 2 mM, NaF 25 mM, Na_2MoO_4 10 mM, aprotinina 1 mg/mL, leupeptina 1 mg/mL, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM). Para obtener los extractos totales, las células se centrifugaron a 13, 000 rpm a 4 °C, durante 10 min. El precipitado se homogenizó mecánicamente en solución de lisis (Tris-HCl pH 7.4 50 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, sacarosa 0.32 M) con inhibidores de fosfatasas y proteasas. El homogenizado se centrifugó a 13, 000 rpm durante 10 min a 4 °C, se colectó el sobrenadante y se procedió a la determinación de proteínas. Para obtener los extractos membranales, la pastilla fue homogenizada en 5 volúmenes de solución de homogenización (sacarosa 0.32 M, 10 mM HEPES pH 7.4, EDTA 2

mM) más inhibidores de fosfatasa y se homogenizó mecánicamente (10-15 toques). Después, los homogenados se centrifugaron a 4500 rpm durante 4 min para separar la fracción nuclear (pastilla). El sobrenadante se centrifugó a 13 000 RPM durante 15 minutos y la pastilla de esta segunda centrifugación se resuspendió en solución de lisis (Tris HCl pH 7.4 50 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, sacarosa 0.32 M) más inhibidores de proteasas y fosfatasa y se sonicó en tres ocasiones cada una de 15 segundos, siendo esta la fracción membranal. Finalmente, se procedió a la determinación de proteínas.

2.8. Determinación de proteínas por el método de Bradford

2.8.1. Principio

La unión de moléculas proteicas al colorante Coomassie bajo condiciones acídicas resulta en un cambio de coloración de café a azul. Este método, introducido por Bradford en 1976, cuantifica residuos de aminoácidos básicos de arginina, lisina e histidina, los cuales contribuyen a la formación del complejo proteína-Coomassie (Bradford, 1976).

2.8.2. Procedimiento

Utilizando como estándar una solución 10 mg/mL de γ -globulina se prepararon diluciones del estándar de 1, 2, 3, 6 y 12 $\mu\text{g/mL}$ en un volumen de 80 μL . Se tomó un volumen de 20 μL y se añadieron 180 μL del reactivo de Bradford 1X, se incubó la reacción a temperatura ambiente por 5 min y se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Se determinó la concentración de proteína en las muestras a partir de la curva de calibración estándar. Alrededor de 20-40 μg de proteínas totales se resuspendieron en solución amortiguadora de Laemmli (Tris-HCl pH 6.8 150 mM, SDS al 5%, β -mercaptoetanol al 5%, DTT 150 mM, azul de bromofenol al 3% y glicerol al 30%). Posteriormente, las muestras se sometieron a ebullición durante 10 min, concluido ese tiempo se les provocó un choque térmico en hielo durante 5 min.

2.9. Inmunodetección en fase sólida

2.9.1. Principio

También conocida como Western blot, esta técnica se describió por primera vez en 1979, y se utiliza para detectar y analizar proteínas. El método se basa en la construcción de un complejo proteína-anticuerpo a través de la unión de anticuerpos específicos a proteínas que se encuentran inmovilizadas en una membrana y la consecuente detección del anticuerpo unido a la proteína (Towbin *et al.*, 1979).

2.9.2. Procedimiento

Las muestras de proteína se desnaturalizaron previamente en la solución amortiguadora de Laemmli y se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% con presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se tiñieron con Ponceau S para confirmar que el contenido proteico sea el mismo en todos los carriles. Las membranas se lavaron con PBS para remover el exceso de Ponceau S y se incubaron en solución salina amortiguadora Tris y Tween 20 al 0.1% (TBS-Tween) con leche semidescremada al 5% durante 2 h para bloquear el exceso de sitios de unión inespecíficos de proteína. Posteriormente, las membranas se incubaron por la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios indicados (*p*-p44/42, p-ezrina; 1:1000, 1:200), seguidos de sus anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a peroxidasa de rábano (1:4000, 1:2000). Los polipéptidos inmunorreactivos se detectaron por quimioluminiscencia en un fotodocumentador MicroChemi. Los análisis densitométricos y los datos se analizaron en el software Prisma de GraphPad (San Diego, CA, USA).

2.10. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como medias \pm el error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA), y comparaciones *post hoc* mediante el método de Dunnet para considerar diferencias estadísticamente significativas de $p \leq 0.05$.

III. RESULTADOS

3.1. La exposición a Mn^{2+} no disminuye la viabilidad en CGB

Como primer acercamiento, se evaluó la viabilidad celular en términos de actividad metabólica tras el tratamiento con Mn^{2+} en CGB. Estudios en astrocitos corticales tras el tratamiento con $MnCl_2$ muestran que a partir de las 24 h de tratamiento la viabilidad

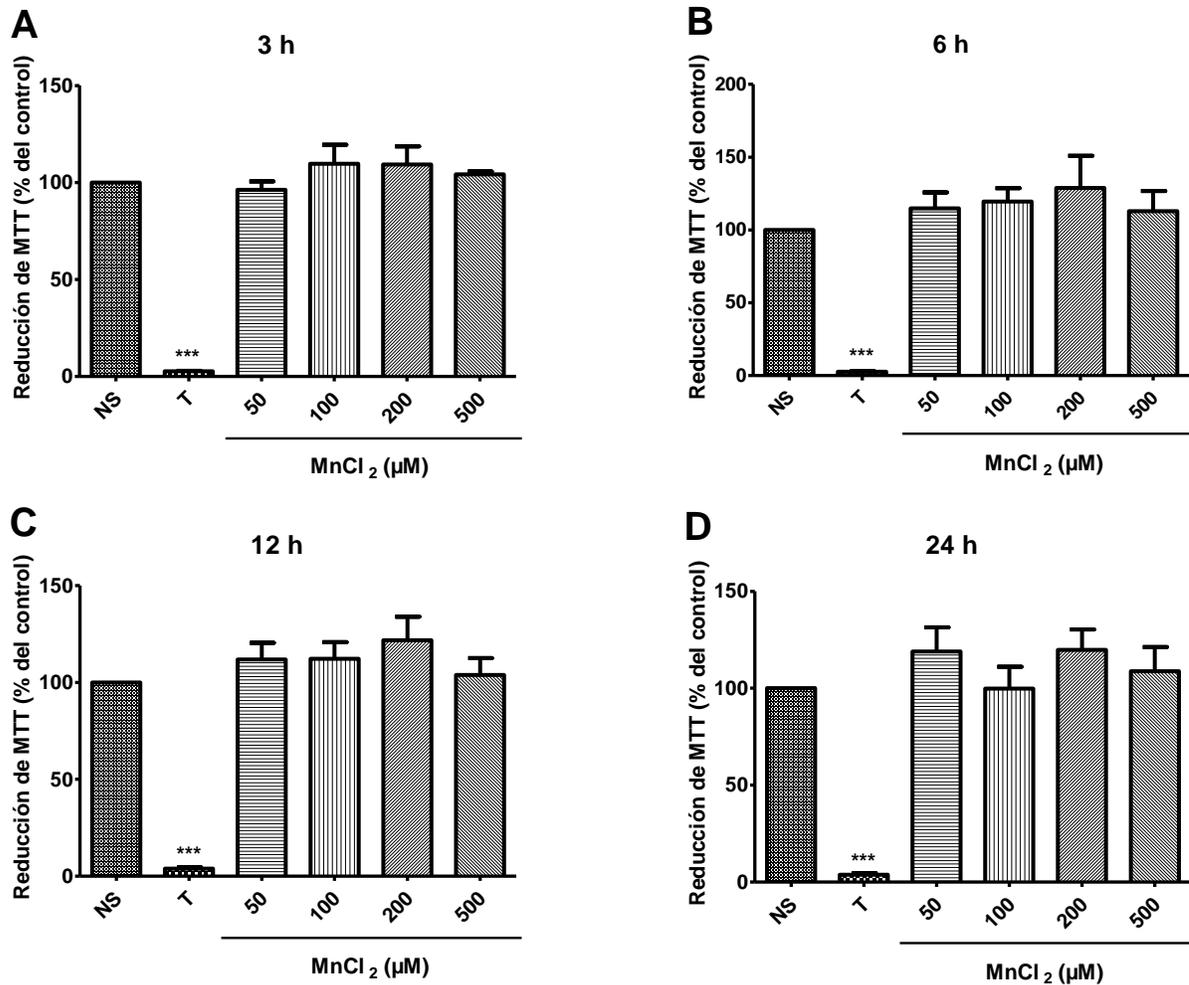


Figura 8. Efecto del Mn^{2+} en la viabilidad celular de CGB. Células gliales de Bergmann estimuladas con 50, 100, 200 ó 500 μM , durante **A)** 3, **B)** 6, **C)** 12, **D)** 24 h de $MnCl_2$. Como control no estimulado (NS), se incubó con vehículo y como control de muerte celular se estimuló con tritón (T) al 1%. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno por sextuplicado. Se realizó análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba *post hoc* de Dunnet, *** $p < 0.001$.

celular se compromete (Lee *et al.*, 2009a; Lee *et al.*, 2009b). En este trabajo, se incubaron CGB a diferente concentración de MnCl_2 de 50, 100, 200 y 500 μM durante tiempos de 3, 6, 12 y 24 h. Como control de muerte se utilizó Tritón al 1%. La figura 8, muestra los resultados obtenidos, y se observa que la viabilidad de las CGB expuestas a las concentraciones y tiempos de MnCl_2 evaluados no disminuyó, ya que no se encontraron diferencias significativas ni una tendencia a la disminución en ninguno de los tratamientos con respecto a los controles. Esto indica que las CGB son resistentes al insulto con MnCl_2 a las concentraciones y tiempos analizados.

3.2. La liberación de [^3H]-L-Gln no disminuye en CGB tras la exposición a Mn^{2+}

En nuestro grupo de trabajo se encontró que la captura de Glu se encuentra ligada a la liberación de Gln (Martínez-Lozada *et al.*, 2013). Estudios en cultivos de astrocitos corticales, muestran que la actividad de los transportadores de Gln disminuye tras el tratamiento con MnCl_2 , específicamente se afecta el sistema N (al cual pertenece SNAT3) al tratar los astrocitos con Mn^{2+} (Milatovic *et al.*, 2007; Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2009; 2011). En el presente trabajo, se evaluó el porcentaje de liberación de Gln al cargar CGB con 0.5 μCi de [^3H]-L-Gln por dos horas. Después de este tiempo se desechó el medio y se reemplazó cada 2 min, cabe mencionar que el medio de los tratamientos con Mn^{2+} contenía MnCl_2 100 μM , es decir, los cultivos fueron pre-estimulados durante media hora. Después de los 30 min, se colectaron 15 fracciones cada 2 min. Las fracciones 6-10 contenían los distintos estímulos. La radiactividad asociada a cada fracción expresada como porcentaje del total de radiactividad, se muestra en la figura 9, donde se observa que solamente con el tratamiento con MnCl_2 100 μM (línea azul) no se indujo la liberación de Gln, mientras que el tratamiento con D-Asp 1 mM (línea verde) sí lo hizo. Al hacer una co-exposición con MnCl_2 100 μM y D-Asp 1 mM (línea amarilla), el pre-estímulo con MnCl_2 no fue capaz de afectar la inducción a la liberación de Gln provocada por el D-Asp. Esto indica, que a pesar de que por sí mismo el tratamiento con Mn no induce la liberación de Gln, tampoco es capaz de reducir la liberación de Gln inducida por el estímulo con D-Asp, ya que el

comportamiento de la co-exposición es muy similar al de D-Asp solo. Es decir, a la concentración y tiempo utilizados el tratamiento con Mn no afecta la función del transportador SNAT3.

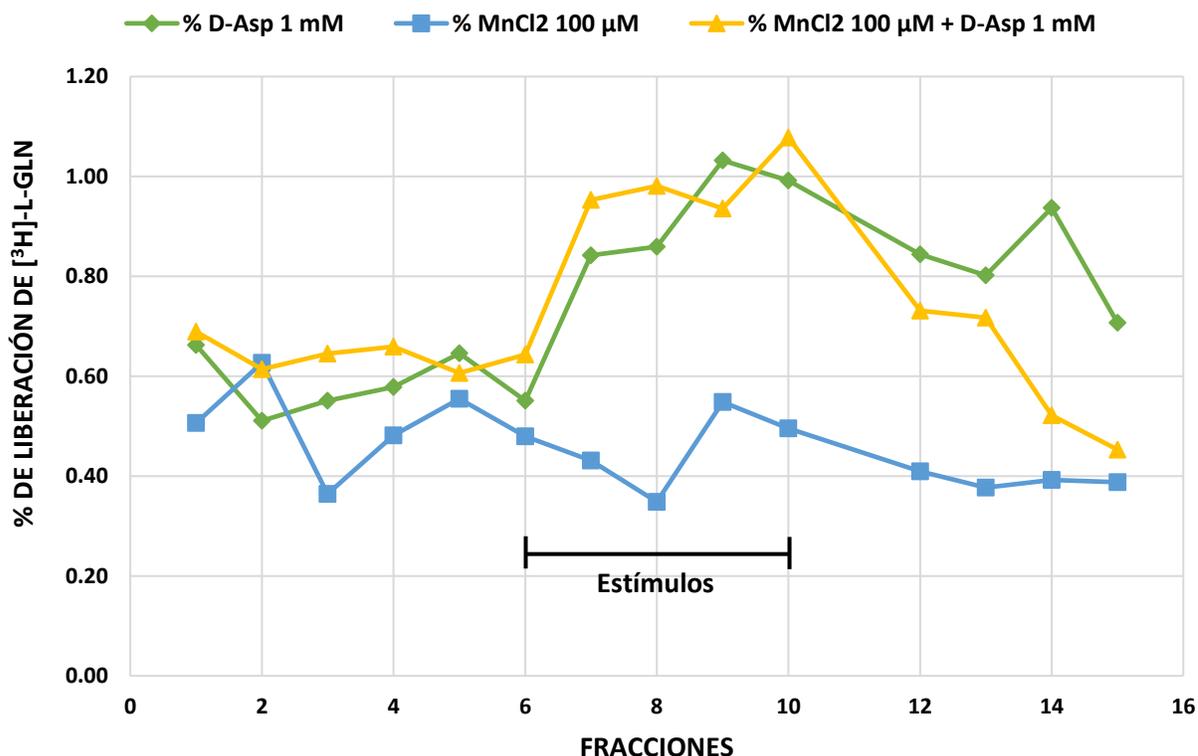


Figura 9. Efecto del tratamiento con Mn²⁺ en la liberación de Gln en CGB. CGB fueron cargadas con 0.5 μCi de [³H]-L-Gln por 2 h. El medio se removió y se reemplazó cada 2 min, durante media hora (en este paso para los tratamientos con Mn²⁺, el medio de reemplazo contenía MnCl₂ 100 μM). Tras 30 min, se colectaron 15 fracciones de 2 min cada una. Las fracciones de la 1-5 y 11-15 contenían solamente en medio de ensayo, mientras que las 6-10 contenían los distintos estímulos, D-Asp 1 mM, MnCl₂ 100 μM y D-Asp 1 mM + MnCl₂ 100 μM. La radiactividad asociada a cada fracción se determinó por conteo de centelleo líquido y se expresó como porcentaje del total de radiactividad en el experimento. Se muestra un experimento típico, realizado por triplicado con resultados similares.

3.3. El tratamiento con Mn²⁺ aumenta la fosforilación de ERK 1/2

Una vez evaluadas la viabilidad celular y la función de liberación del transportador SNAT3 en CGB y observar que éstas no se afectaron tras el tratamiento con MnCl₂, el

siguiente paso fue tratar de elucidar qué otros efectos podría estar ocasionando la exposición a Mn^{2+} en las CGB. Por lo cual, evaluamos el posible efecto del Mn en una vía de señalización que es un punto de convergencia en la regulación génica de una gran variedad de estímulos extracelulares, la vía de las MAPK-ERK1/2. Teniendo en cuenta que existen estudios en los cuales se indica que el Mn^{2+} es capaz de modificar el patrón de fosforilación de ERK 1/2 (Exil *et al.*, 2014), en el presente trabajo evaluamos el efecto del tratamiento con $MnCl_2$ a bajas concentraciones y distintos tiempos de exposición sobre el patrón de fosforilación de ERK 1/2.

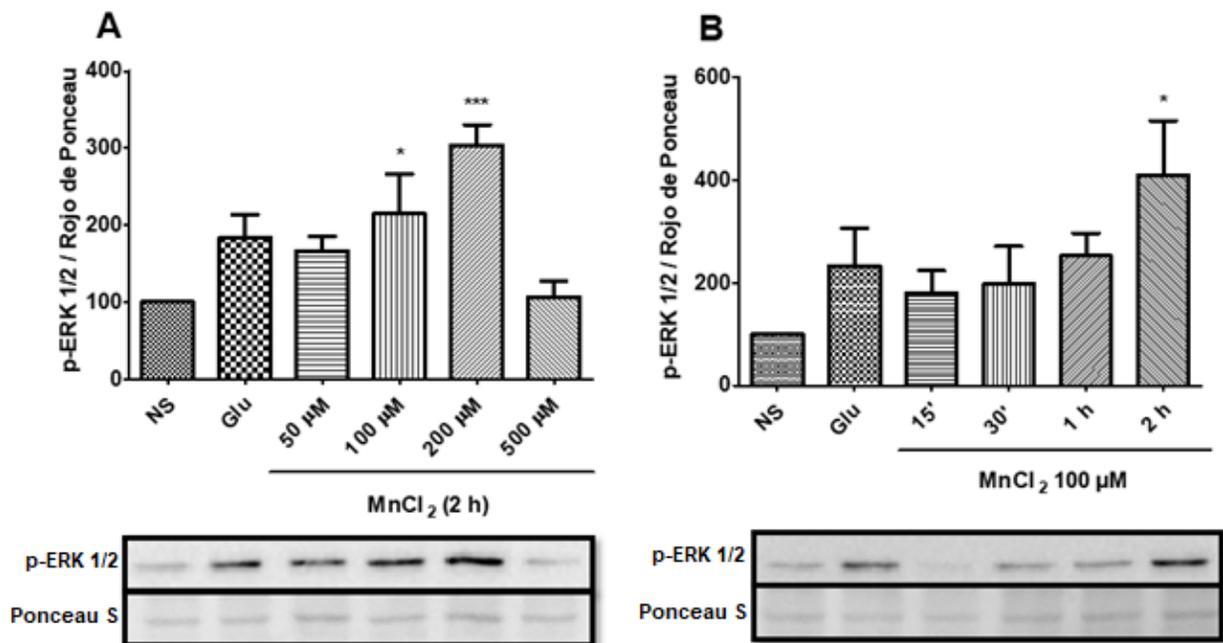


Figura 10. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones y tiempo de Mn^{2+} sobre la fosforilación de ERK 1/2. A) CGB tratadas con 50, 100, 200 o 500 μM de $MnCl_2$ durante 2 h. B) CGB tratadas con $MnCl_2$ a diferentes tiempos de exposición a una concentración de 100 μM . Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes. En la parte inferior se muestra una autoradiografía de un experimento típico. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba *post hoc* de Dunnet, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

En la figura 10A, se observa cómo desde la concentración más baja (50 μM) de $MnCl_2$ existe una tendencia al aumento en la fosforilación de ERK 1/2, sin embargo,

solamente se mantiene hasta la concentración de 200 μM , siendo el aumento significativo en las concentraciones de 100 y 200 μM y donde en la concentración de 500 μM tal inducción se ve abolida, mostrando, en general, un efecto no-monotónico del Mn^{2+} sobre la fosforilación de ERK 1/2 (ya que no se muestra una dependencia de la dosis) a las 2 h de exposición. Después evaluamos la fosforilación de ERK 1/2 al tratar las CGB con 100 μM a tiempos menores de exposición (figura 10B), encontrando un ligero aumento desde los 15 min, conservando una tendencia a aumentar conforme al tiempo siendo la inducción significativa solamente a las 2 h del estímulo.

3.4. El aumento en la fosforilación de ERK 1/2 tras los tratamientos con Mn^{2+} no es dependiente del transporte de Asp

Una vez demostrado que efectivamente el Mn^{2+} es capaz de inducir la fosforilación de ERK 1/2 desde concentraciones y tiempos relativamente bajos, con el fin de elucidar el posible mecanismo molecular involucrado en la inducción de la fosforilación de ERK 1/2 mediada por el Mn^{2+} , evaluamos la posible relación del transporte de Glu en el efecto inducido por el Mn en CGB. En la figura 11 se muestra el efecto del co-tratamiento de MnCl_2 100 μM y D-Asp 1 mM durante 15 min, donde a pesar de que cada uno es inductor de la fosforilación de ERK 1/2 de manera individual, la co-exposición de ambos no mostró un efecto sinérgico (figura 11A), sugiriendo que quizá el efecto del tratamiento con Mn^{2+} no se encuentra directamente relacionado con el transporte de Glu. Para probar de manera clara esta teoría utilizamos como herramienta un potente inhibidor competitivo transportable de transportadores de Glu (EAAT1-4), L-*trans*-2,4-PDC 100 μM 30 minutos antes de los tratamientos con MnCl_2 y D-Asp (figura 11B), observando que la inhibición del transportador GLAST/EAAT1 no alteró el efecto inductor del MnCl_2 sobre las CGB. Aunque no se hayan encontrado diferencias significativas, la evidencia en conjunto muestra que posiblemente el efecto del Mn^{2+} sea uno distinto al del transporte de Glu, lo cual deja abierta la posibilidad a más investigaciones al respecto.

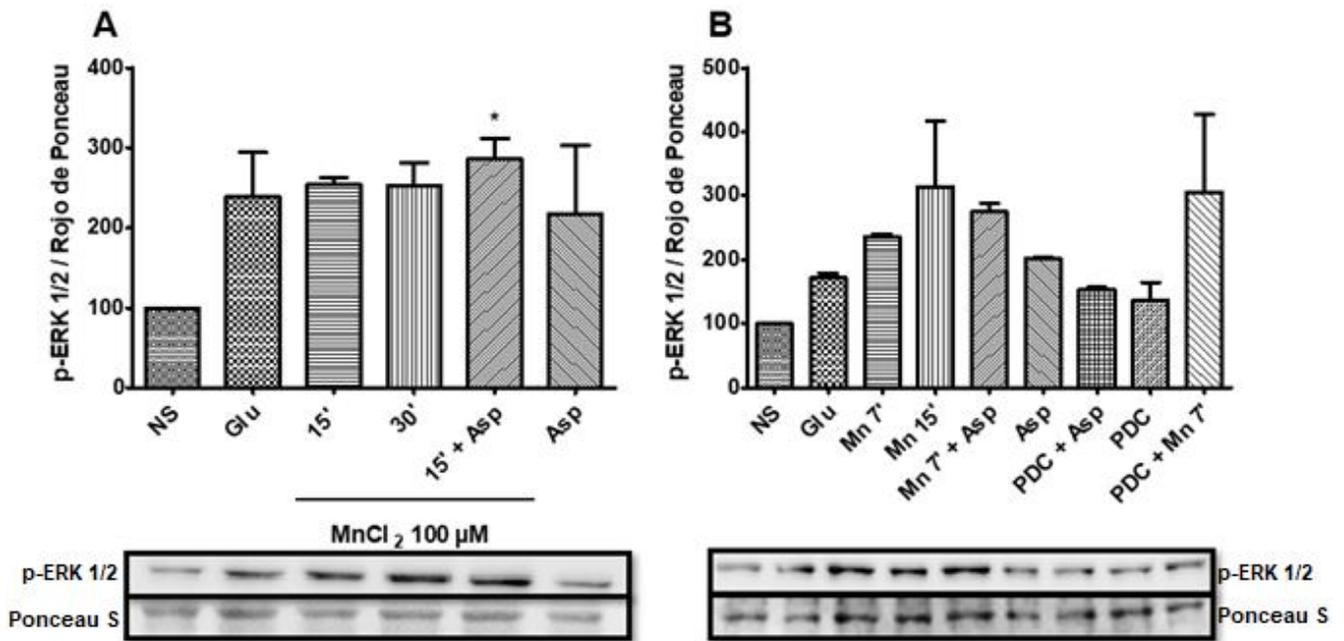


Figura 11. Efecto del Mn²⁺ y el transporte de Asp en la fosforilación de ERK 1/2 en CGB. **A)** CGB se estimularon con MnCl₂ 100 μM durante 15 y 30 min además de D-Asp 60 μM y una combinación de D-Asp + MnCl₂ 100 μM 15 min. **B)** CGB tratadas con MnCl₂ 100 μM 7 y 15 min, Asp 60 μM y con el inhibidor de transportadores de Glu, PDC 100 μM 30 min antes de los tratamientos. Los resultados se expresaron como media ± error estándar de al menos tres experimentos independientes. En la parte inferior se muestra una autoradiografía de un experimento típico. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba *post hoc* de Dunnet, **p*<0.05.

3.5. La exposición a Mn²⁺ no afecta la fosforilación de ezrina, proteína importante en el anclaje de proteínas a la membrana plasmática

Tal como se mencionó en la introducción, el acople funcional y espacial del transportador GLAST/EAAT1 y el transportador SNAT3 es un punto importante en el correcto funcionamiento de la lanzadera Glu/Gln (Martínez-Lozada *et al.*, 2013). Estudios recientes muestran que la fosforilación de ezrina se relaciona con la formación de un complejo con otras proteínas de andamiaje útiles en el anclaje de GLAST/EAAT1 (Aven *et al.*, 2006; López-Colomé *et al.*, 2016; Nijboer *et al.*, 2013; Sullivan *et al.*, 2007). En línea con lo anterior, evaluamos el efecto del tratamiento con Mn sobre la fosforilación de ezrina y su expresión en la fracción membranal, como una posible explicación al efecto del Mn²⁺ en el anclaje de los transportadores a la

membrana plasmática, e indagando sobre el porqué no parece haber un efecto directo sobre la función de los transportadores en CGB a causa del tratamiento con Mn^{2+} . Se puede observar que el efecto del $MnCl_2$ a un periodo corto de exposición (15 min), no parece estar influenciando los niveles de fosforilación de ezrina en la membrana (figura 12), ya que los tratamientos con $MnCl_2$ no conducen a diferencias significativas con respecto al control. Aunque esto no es un método directo para evaluar el ensamblaje del transportador a la membrana como un primer sondeo de este proceso, es indicativo de que posiblemente el andamiaje no esté afectado a tiempos cortos y bajas concentraciones de exposición a Mn^{2+} .

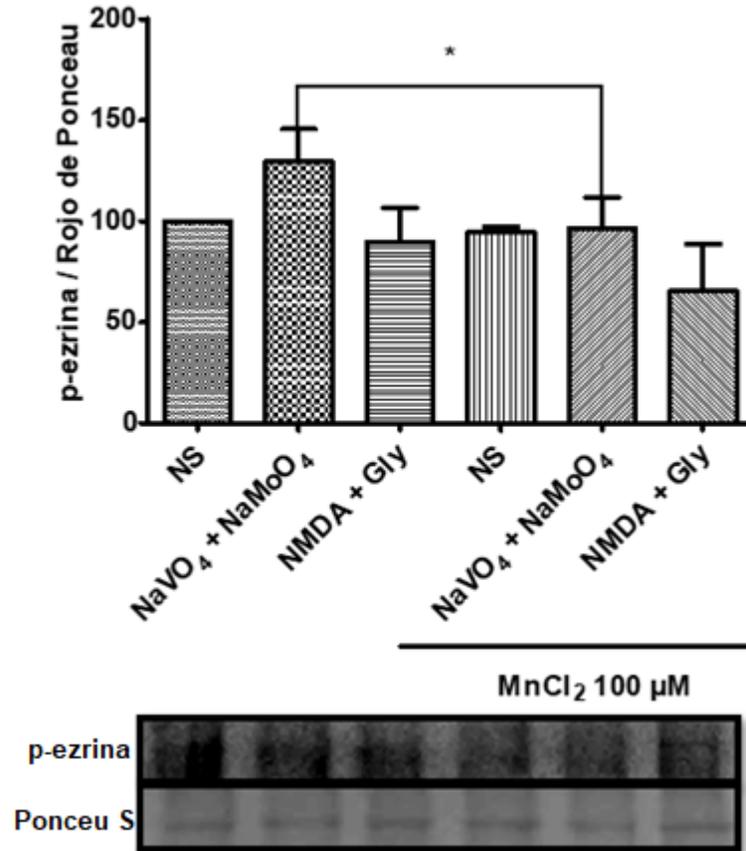


Figura 12. Efecto del tratamiento con $MnCl_2$ sobre la fosforilación de ezrina en CGB. Fracción membranal de proteínas de cultivo de CGB estimuladas con $MnCl_2$ 100 μM , $NaVO_4$ 1 mM + $NaMoO_4$ 10 mM y NMDA 500 μM + Gly 10 μM durante 15 min. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes. En la parte inferior se muestra una autoradiografía de un experimento típico. Se realizó como análisis estadístico una prueba t de Student, * $p < 0.05$.

IV. DISCUSIÓN

El efecto ocasionado por la exposición a Mn^{2+} en el SNC se asocia principalmente a la disfunción de los ganglios basales, ya que el Mn tiende a acumularse en estas regiones (Calne *et al.*, 1994; Eriksson *et al.*, 1992; Nagatomo *et al.*, 1999; Newland *et al.*, 1989). Sin embargo, también se encuentran niveles altos de Mn han en el cerebelo (Sepúlveda *et al.*, 2012; Ye y Kim, 2015), lo cual sugiere que no todos los síntomas y afecciones relacionadas a la exposición a Mn^{2+} son exclusivamente debidos a la disfunción en los ganglios basales. En este contexto, las CGB tienen un papel importante en la estructura y función del cerebelo, ya que son esenciales en la migración y el correcto posicionamiento de las células granulares en el desarrollo temprano del cerebelo, y continúan siendo una parte integral de los circuitos cerebelares en la etapa adulta, en la que cumplen funciones como el control de la homeostasis de iones, estabilidad sináptica, plasticidad, función metabólica y neuroprotección (De Zeeuw y Hoogland, 2015). A pesar de la basta evidencia sobre las diversas funciones que se pueden afectar en el cerebelo (específicamente en las CGB) tras un insulto con Mn^{2+} , los mecanismos que median estas funciones no han sido explorados.

4.1. La exposición a Mn^{2+} no afecta la viabilidad en CGB

Dado que estudios realizados en astrocitos corticales por Lee y colaboradores habían mostrado que desde concentraciones de 200 μM de $MnCl_2$ tras 24 h de exposición la viabilidad celular disminuye de manera significativa y de manera dependiente de la dosis (Lee *et al.*, 2009a; Lee *et al.*, 2009b), evaluamos la viabilidad celular de CGB tras la exposición con $MnCl_2$, observado que ninguno de los tratamientos con $MnCl_2$ disminuyó la viabilidad en CGB. En el primer estudio mencionado, encontraron que el cultivo de astrocitos primarios era más resistente al tratamiento con Mn en comparación al cultivo primario de neuronas (Lee *et al.*, 2009a); lo cual podría indicar que las CGB son más resistentes al daño que produce la exposición a Mn que los astrocitos corticales y las neuronas. Lafarga y colaboradores describen que después del daño citotóxico las CGB muestran una respuesta reactiva (gliosis) inicial

presuntamente orientada a la protección de las células que aún no han sido dañadas por efectos ocasionados por las células muertas (Lafarga *et al.*, 1998). La cual, al ser crónicamente activada, llevará a que las células ya no puedan contrarrestar el daño y finalmente terminen en procesos de muerte celular y apoptosis.

4.2. La liberación de [³H]-L-Gln no disminuye en CGB tras la exposición a Mn²⁺

Tal como se mencionó anteriormente, existen evidencias donde se demuestra que la actividad de los transportadores de Gln (especialmente de SNAT3) disminuye por el tratamiento con MnCl₂ en astrocitos corticales, además de la disminución de los niveles de ARN mensajero y proteína del transportador (Milatovic *et al.*, 2007; Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2009; 2011). El acople funcional entre los transportadores de Glu y SNAT3, gracias al incremento de las concentraciones de Na⁺ ocasionadas por la captura de Glu que a su vez favorece el modo de liberación del transportador SNAT3 se sustenta en estudios recientes (Bröer, *et al.*, 2004; Martínez-Lozada *et al.*, 2013). En el presente trabajo se hizo la colección de fracciones de medio extracelular tras una pre-incubación con [³H]-L-Gln para evaluar la función de eflujo/liberación de Gln del transportador tras los estímulos establecidos. El tratamiento con MnCl₂ no indujo la liberación de Gln, sin embargo, tampoco disminuyó la liberación de Gln inducida por D-Asp. Esto nos lleva a pensar que bajo las condiciones utilizadas en este experimento la función en general del transportador no se atrofió por el tratamiento con Mn. En nuestro grupo de trabajo una investigación en curso indica que bajo tratamientos similares con MnCl₂ en CGB el transporte de Glu aumenta con respecto a los controles, lo cual difiere a los hallazgos obtenidos en astrocitos corticales (Johnson *et al.*, 2018; Karki *et al.*, 2015, 2014; Lee *et al.*, 2009a), aunque cabe mencionar que el principal transportador de Glu que se expresa en astrocitos corticales es GLT-1, mientras que en CGB es GLAST, lo cual es un punto importante a considerar ya que podría mostrar un patrón diferencial en cuando al daño inducido por Mn²⁺. De los ensayos elaborados en astrocitos corticales sólo en uno se ha tratado de evaluar el eflujo de Gln tras el tratamiento con Mn²⁺, y aunque no es un ensayo de liberación como tal, los autores

indican que el eflujo de Gln también se disminuye (Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2009), el resto de los estudios muestra la disminución en la función de captura de Gln. Por otro lado, la regulación de SNAT3 se relaciona con la inducción de proteína cinasa C (PKC). Estudios *in situ* muestran que la activación de PKC induce la fosforilación de SNAT3, regulando su tráfico a la membrana y degradación (Nissen-Meyer *et al.*, 2011). Asimismo, la internalización de SNAT3 tras su fosforilación dependiente de PKC se apoya en un modelo de ovocitos de *Xenopus laevis*, donde la activación de PKC redujo la $V_{m\acute{a}x}$ en la captura de Gln (Balkrishna *et al.*, 2010) y en células PS120. La exposición a Mn^{2+} induce la actividad de PKC, así como isoformas específicas de esta proteína, específicamente la α y δ , en astrocitos corticales a concentraciones de 0.5 y 1 mM durante 8 y 24 h (Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2011). Además, en el mismo estudio demostraron que la activación de PKC δ inducida por el tratamiento con Mn^{2+} induce hiper-ubiquitinación, disminuye la expresión de SNAT3 y la captura de Gln, incrementando la asociación de SNAT3 con la proteína ubiquitina-ligasa E3 (Nedd4-2) en un cultivo primario de astrocitos. En el estudio llevado a cabo por Nissen-Meyer en 2011, se demostró que la inducción de la fosforilación de SNAT3 llevada a cabo por PKC, se producía por las isoformas α y γ . Tal fosforilación tiene lugar en un residuo específico (serina 52) de la región N-terminal en rata. En este estudio realizaron análisis bioinformáticos donde identificaron sitios putativos de fosforilación, donde encontraron 5 sitios de fosforilación de PKC (T32, S52, S314, T458 y T466), en rata. El sitio S52 sólo se conserva en rata y cabra, tales especies muestran una triple secuencia de S en los residuos 51-53, aunque los residuos 51 y 53 se presentan en todas las secuencias que ellos analizaron. Haciendo uso del mismo programa que utilizaron en la publicación mencionada, pero con la secuencia de aminoácidos correspondiente al ortólogo en pollo (Figura 13), se encontraron los residuos S55, S287 y T439 como posibles sitios de fosforilación por PKC; después se realizó una alineación de los aminoácidos de la secuencia de pollo con los de rata y se encontró que el sitio de fosforilación en pollo no corresponde al de S52 en rata (el sitio específico de fosforilación de SNAT3 por PKC), sin embargo, el transportador se puede regular por la fosforilación alternativa de cualquiera de los sitios encontrados. Además, en CGB, la activación de fosfolipasa C (PLC) dependiente de Ca^{2+} induce las isoformas α

y ϵ de PKC, reduciendo de manera significativa la actividad del promotor *chglast* (López-Bayghen y Ortega, 2004), indicando que tales isoformas se expresan en nuestro modelo de estudio en el contexto de la neurotransmisión glutamatérgica.

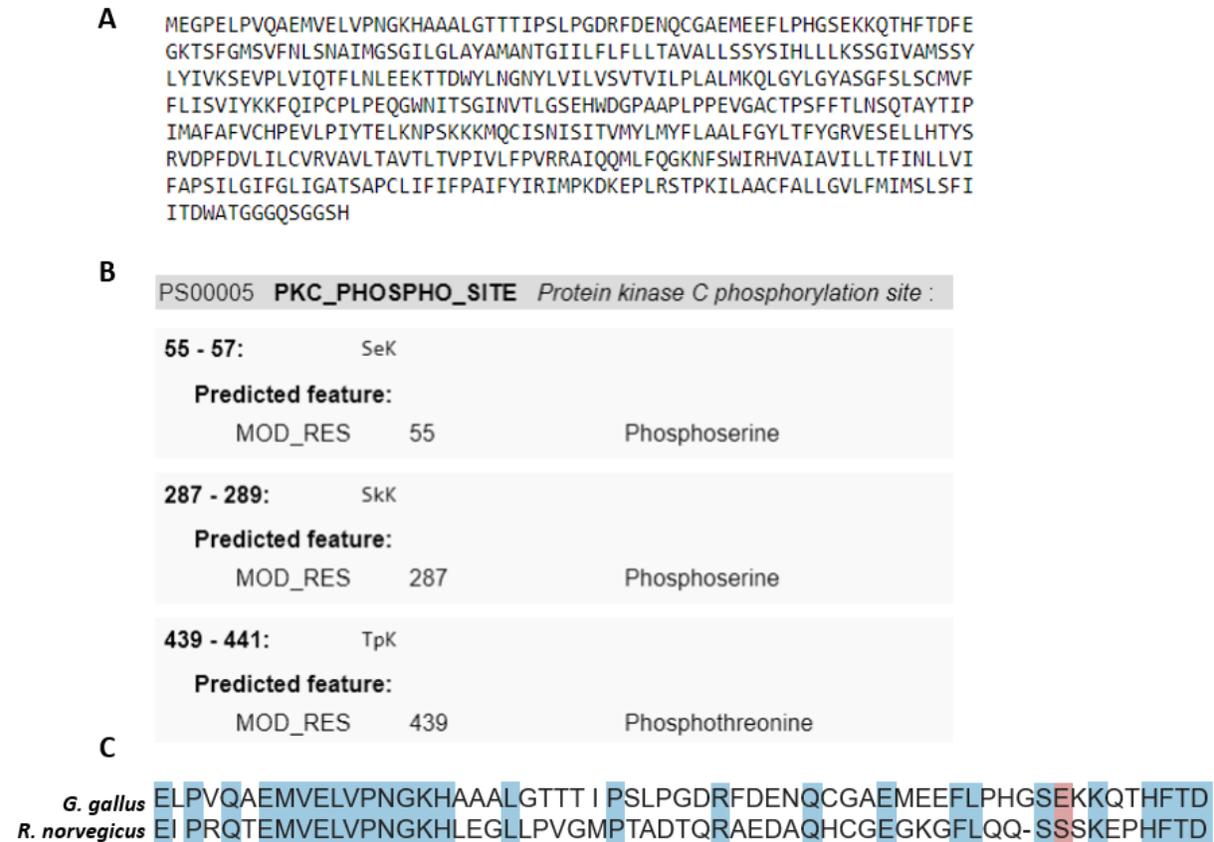


Figura 13. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de SNAT3 de *Gallus gallus* y sus sitios de fosforilación mediados por PKC. A) Secuencia proteica del transportador SNAT3 de pollo de 477 aminoácidos. **B)** Sitios de fosforilación putativos para PKC en SNAT3 obtenidos del programa PROSITE, el cual identifica residuos y motivos con potencial de fosforilación mediado por proteínas cinasas comúnmente caracterizadas. **C)** Secuencia de aminoácidos de SNAT3 de pollo (residuos 5-64) alineada con su ortólogo de rata (residuos 2-60), en azul se muestran las regiones conservadas y en rojo se muestra la región correspondiente al residuo S52.

4.3. El tratamiento con Mn^{2+} aumenta la fosforilación de ERK 1/2

La regulación de elementos de señalización celular intracelulares por la exposición a Mn^{2+} , así como el mecanismo y objetivo celular de sus efectos es un tema importante

dentro la investigación toxicológica de este metal. La vía de señalización MAPK-ERK 1/2 se activa principalmente por factores de crecimiento, regulando la expresión génica, embriogénesis, proliferación, muerte y supervivencia celular, y neuroplasticidad (Chen *et al.*, 2001; Thomas y Huganir, 2004). La activación de las vías de señalización de las MAPK se relaciona con la neurotoxicidad inducida por el Mn^{2+} . Los modelos experimentales en los que se estudia la activación de MAPK por Mn^{2+} son variados e incluyen: la activación de vías apoptóticas por ERK 1/2 así como activación de caspasa-3 en células PC12 (Cai *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2006; Posser *et al.*, 2009), participación de ERK 1/2 en la expresión de iNOS en microglía (Bae *et al.*, 2006; Crittenden y Filipov, 2011), en cultivo primario de astrocitos ERK 1/2 se relacionó con la expresión de COX-2 (Yin *et al.*, 2008), así como en estudios *in vivo* donde se incrementaron los niveles de isoprostanos F2 con la activación concomitante de ERK 1/2 en tejido estriado de rata (Cordova *et al.*, 2013, 2012). Los resultados del presente estudio muestran que desde concentraciones relativamente bajas y tiempos cortos de exposición a Mn^{2+} aumenta la fosforilación de ERK 1/2. Debido a que en las concentraciones evaluadas no se presentó una disminución en la viabilidad metabólica, la inducción de ERK 1/2 provocada por el Mn^{2+} en esta ventana de exposición es poco probable que sea dependiente de la producción de estrés oxidativo y consecuente muerte celular y apoptosis, como es el caso de los tratamientos prolongados. Dado que la duración de la señalización puede alterar de manera significativa características de elementos río-debajo de las cascadas llevando a distintos destinos de decisión finales (Murphy y Blenis, 2006), el patrón de señalización de ERK 1/2 puede producir efectos de larga duración relacionados ya sea con la migración celular, proliferación, diferenciación o supervivencia. Estudios en células PC-12 muestran que la estimulación con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), produce un patrón de fosforilación característico. El NGF, presenta un patrón de fosforilación sostenido el cual se relaciona con la inducción de la diferenciación celular, en cambio el EGF, muestra un patrón transiente, lo cual conduce al proceso de proliferación celular (Blüthgen y Legewie, 2008).

4.4. El aumento en la fosforilación de ERK 1/2 tras los tratamientos con Mn²⁺ no es dependiente del transporte de Asp

Estudios previos muestran que el transporte de Glu participa en la señalización activada por este aminoácido de manera independiente de los receptores (González y Ortega, 2000; Martínez-Lozada *et al.*, 2011). Buscando un posible mecanismo por el cual el Mn induce la fosforilación de ERK 1/2, y teniendo en cuenta que los estudios en curso en el laboratorio sobre el efecto del tratamiento de Mn²⁺ en el transportador EAAT1/GLAST parece inducir la captura de Asp; encontramos que el efecto inductor del Mn²⁺ en CGB sobre la vía de señalización de las MAPK-ERK es independiente del transporte de Glu. Lo cual deja abierta la pregunta sobre cuál es el papel del Ca²⁺ durante este proceso. Ya que el incremento en el transporte de Glu y el co-transporte de Na⁺, activa al intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX), con la consecuente entrada de Ca²⁺ a la célula, tal incremento de Ca²⁺ induce a CAMKII, PKA, PKC y donde la primera proteína es capaz de activar a Ras y las restantes a MEK1/2, promoviendo esta cascada de señalización. El incremento en los niveles extracelulares de Glu activa a los receptores AMPA lo cual conlleva a la entrada de Ca²⁺, además, el tratamiento con Mn²⁺ disminuye la expresión de receptores NMDA en estudios *in vivo* (Wang *et al.*, 2017), por lo cual no se descarta el efecto de los receptores en el efecto inducido por el tratamiento con Mn²⁺.

4.5. La exposición a Mn²⁺ no afecta la fosforilación de ezrina, proteína importante en el anclaje de proteínas a la membrana plasmática

El correcto anclaje e interacción entre la membrana plasmática y el citoesqueleto es crítico para el funcionamiento normal de los procesos celulares. Las proteínas ERM, como ya se mencionó, son una clase de proteínas determinantes en la conexión entre la membrana y el citoesqueleto de actina. Por lo cual, la localización anormal de ezrina es un factor determinante en la transducción de señales aberrantes tras un insulto. Debido a que el tratamiento con Mn²⁺ parece no estar afectando la función de los transportadores en la membrana plasmática, por lo que fue pertinente preguntar si el anclaje de estos pudiera estar afectado, y por consecuencia provocar un cambio en

los patrones de transducción de señales intracelulares. EAAT1-GLAST y SNAT3 muestran un acople funcional y regional en la membrana, y ezrina es un componente importante del complejo de anclaje de EAAT1/GLAST, por lo cual el evaluar el patrón de fosforilación de ezrina podría parecer un enfoque interesante de estudiar en la exposición a Mn^{2+} . Sin embargo, como se observa en la figura 12, aparentemente el tratamiento con Mn^{2+} no parece estar regulando los niveles de fosforilación de ezrina. A pesar de ello, no es posible descartar que a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a Mn^{2+} el efecto pudiera ser distinto, ya que en estudios realizados en una línea celular de mioblastos de rata la expresión de ezrina muestra ser un fenómeno altamente dinámico (Vásquez-Limeta *et al.*, 2014).

V. CONCLUSIONES

- El tratamiento con Mn^{2+} no disminuye la viabilidad celular en CGB.
- El tratamiento con Mn^{2+} no afecta la función de liberación del transportador SNAT3 a una baja concentración (100 μM) y tiempo de exposición (30 min).
- El tratamiento con Mn^{2+} aumenta significativamente la fosforilación de ERK 1/2 desde concentraciones bajas manteniendo un comportamiento no-monotónico y dependiente del tiempo.
- El aumento en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por el tratamiento con Mn^{2+} es independiente del transporte de Asp.
- El tratamiento con Mn^{2+} no afectó los niveles de fosforilación de ezrina, proteína importante en el acople de los transportadores a la membrana.

VI. PERSPECTIVAS

- Evaluar el papel de PKC en la liberación de Gln tras la exposición a Mn.
- Caracterizar de las vías de señalización de tirosinas cinasas activadas por Mn^{2+} .
- Elucidar el papel de la señalización inducida por Ca^{2+} en el efecto producido por el tratamiento con Mn^{2+} .

VII. REFERENCIAS

- Ali, S. F., Duhart, H. M., Newport, G. D., Lipe, G. W., y Slikker, W. (1995). Manganese-induced reactive oxygen species: comparison between Mn²⁺ and Mn³⁺. *Neurodegeneration: a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration*, 4(3), 329-334. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581566>
- Apps, R., y Garwicz, M. (2005). Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 297. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1646>
- Archibald, F. S., y Tyree, C. (1987). Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 256(2), 638-650. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90621-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90621-7)
- Aschner, M., y Dorman, D. C. (2006). Manganese: pharmacokinetics and molecular mechanisms of brain uptake. *Toxicological reviews*, 25(3), 147—154. <https://doi.org/10.2165/00139709-200625030-00002>
- Aschner, M., Guilarte, T. R., Schneider, J. S., & Zheng, W. (2007). Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(2), 131-147. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2007.03.001>
- ATSDR. (2012). *Toxicological profile for Manganese*. (P. H. S. U.S. Department of Health and Human Services, Ed.). Atlanta, GA.
- Aven, L., Andrew, R., H., H. D., Aung, M. T., Dongsheng, W., David, P., ... Philip, P. (2006). Na⁺-H⁺ exchanger regulatory factor 1 is a PDZ scaffold for the astroglial glutamate transporter GLAST. *Glia*, 55(2), 119-129. <https://doi.org/10.1002/glia.20439>
- Baccarini, M. (2005). Second nature: Biological functions of the Raf-1 «kinase». *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.024>
- Bae, J.-H., Jang, B.-C., Suh, S.-I., Ha, E., Baik, H. H., Kim, S.-S., ... Shin, D.-H. (2006). Manganese induces inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via activation of both MAP kinase and PI3K/Akt pathways in BV2 microglial cells. *Neuroscience Letters*, 398(1-2), 151-154. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2005.12.067>
- Balkrishna, S., Bröer, A., Kingsland, A., & Bröer, S. (2010). Rapid downregulation of the rat glutamine transporter SNAT3 by a caveolin-dependent trafficking mechanism in *Xenopus laevis* oocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00209.2010>
- Barbeau, A. (1984). Manganese and extrapyramidal disorders (a critical review and tribute to Dr. George C. Cotzias). *Neurotoxicology*, 5(1), 13-35. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6538948>
- Bhutia, Y. D., & Ganapathy, V. (2016). Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.12.017>
- Billups, D., Marx, M.-C., Mela, I., & Billups, B. (2013). Inducible Presynaptic Glutamine Transport Supports Glutamatergic Transmission at the Calyx of Held Synapse. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1466-13.2013>
- Blüthgen, N., & Legewie, S. (2008). Systems analysis of MAPK signal transduction. *Essays In Biochemistry*, 45, 95 LP-108. Recuperado de <http://essays.biochemistry.org/content/45/95.abstract>
- Bonilha, V. (2007). Focus on Molecules: Ezrin. *Experimental Eye Research*, 84(4), 613-614.
- Boulland, J. L., Osen, K. K., Levy, L. M., Danbolt, N. C., Edwards, R. H., Storm-Mathisen, J., & Chaudhry, F. A. (2002). Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.01995.x>
- Boulland, J. L., Rafiki, A., Levy, L. M., Storm-Mathisen, J., & Chaudhry, F. A. (2003). Highly differential expression of SN1, a bidirectional glutamine transporter, in astroglia and endothelium in the developing rat brain. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.10188>
- Bradford, H. F. (1988). *Fundamentos de neuroquímica*. Barcelona: Editorial Labor.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bretscher, A. (1983). Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *The Journal of cell biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.425>
- Bröer, a, Wagner, C., Lang, F., & Bröer, S. (2000). Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance. *The Biochemical journal*. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3460705>
- Bröer, A., Albers, A., Setiawan, I., Edwards, R. H., Chaudhry, F. A., Lang, F., ... Bröer, S. (2002). Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013303>
- Bröer, A., Deitmer, J. W., & Bröer, S. (2004). Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20081>
- Bröer, S. (2014). The SLC38 family of sodium-amino acid co-transporters. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1393-y>
- Brustovetsky, N., Brustovetsky, T., Jemmerson, R., & Dubinsky, J. M. (2002). Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane. *Journal of neurochemistry*, 80(2), 207-218. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902111>
- Cai, T., Che, H., Yao, T., Chen, Y., Huang, C., Zhang, W., ... Luo, W. (2011). Manganese induces Tau hyperphosphorylation through the activation of ERK MAPK pathway in PC12 cells. *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq308>
- Calne, D. B., Chu, N. S., Huang, C. C., Lu, C. S., & Olanow, W. (1994). Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.44.9.1583>
- Chao, D. L., Ma, L., & Shen, K. (2009). Transient cell–cell interactions in neural circuit formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 262. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2594>
- Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., & Edwards, R. H. (2002). The glutamine commute: Take the N line and transfer to the A. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200201070>
- Chaudhry, F. A., Schmitz, D., Reimer, R. J., Larsson, P., Gray, A. T., Nicoll, R. A., ... Edwards, R. H. (2002). Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system a transporters. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2211-02.2002> [pii]
- Chaudhry, F. a, Reimer, R. J., Krizaj, D., Barber, D., Storm-Mathisen, J., Copenhagen, D. R., & Edwards, R. H. (1999). Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81674-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81674-8)
- Chen, J. Y., Tsao, G. C., Zhao, Q., & Zheng, W. (2001). Differential cytotoxicity of Mn(II) and Mn(III): special reference to mitochondrial [Fe-S] containing enzymes. *Toxicology and applied pharmacology*, 175(2), 160-168. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9245>
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., ... Cobb, M. H. (2001). MAP kinases. *Chemical reviews*. <https://doi.org/10.1021/cr000241p>
- Chtourou, Y., Trabelsi, K., Fetoui, H., Mkannez, G., Kallel, H., & Zeghal, N. (2011). Manganese Induces Oxidative Stress, Redox State Unbalance and Disrupts Membrane Bound ATPases on Murine Neuroblastoma Cells In Vitro: Protective Role of Silymarin. *Neurochemical Research*, 36(8), 1546-1557. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0483-5>
- Conn, P. J., & Pin, J.-P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205>
- Cordova, F. M., Aguiar, A. S., Peres, T. V., Lopes, M. W., Gonçalves, F. M., Pedro, D. Z., ... Leal, R. B. (2013). Manganese-exposed developing rats display motor deficits and striatal oxidative stress that are reversed by Trolox. *Archives of Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1017-5>
- Cordova, F. M., Aguiar, A. S., Peres, T. V., Lopes, M. W., Gonçalves, F. M., Remor, A. P., ... Leal, R. B. (2012). In

- vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033057>
- Cotzias, G. C., Horiuchi, K., Fuenzalida, S., & Mena, I. (1968). Chronic manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture. *Neurology*, *18*(4), 376-382. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5690743>
- Crittenden, P. L., & Filipov, N. M. (2011). Manganese modulation of MAPK pathways: effects on upstream mitogen activated protein kinase kinases and mitogen activated kinase phosphatase-1 in microglial cells. *Journal of Applied Toxicology*, *31*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1002/jat.1552>
- Crooks, D. R., Welch, N., & Smith, D. R. (2007). Low-level manganese exposure alters glutamate metabolism in GABAergic AF5 cells. *NeuroToxicology*, *28*(3), 548-554. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2007.01.003>
- Dalby, K. N., Morrice, N., Caudwell, F. B., Avruch, J., & Cohen, P. (1998). Identification of Regulatory Phosphorylation Sites in Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-activated Protein Kinase-1a/p90 rsk That Are Inducible by MAPK. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(3), 1496-1505. Recuperado de <http://www.jbc.org/content/273/3/1496.abstract>
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8)
- De Zeeuw, C. I., & Hoogland, T. M. (2015). Reappraisal of Bergmann glial cells as modulators of cerebellar circuit function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00246>
- Dean, A., Ferlin, M. G., Brun, P., Castagliuolo, I., Yokel, R. A., Badocco, D., ... Di Marco, V. B. (2009). 1,6-Dimethyl-4-hydroxy-3-pyridinecarboxylic acid and 4-hydroxy-2-methyl-3-pyridinecarboxylic acid as new possible chelating agents for iron and aluminium. *Dalton Trans.*, (10), 1815-1824. <https://doi.org/10.1039/B819148D>
- Dolińska, M., Zabłocka, B., Sonnewald, U., & Albrecht, J. (2004). Glutamine uptake and expression of mRNA's of glutamine transporting proteins in mouse cerebellar and cerebral cortical astrocytes and neurons. *Neurochemistry International*. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(03\)00123-2](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(03)00123-2)
- Dransfield, D. T. (1997). Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.1.35>
- Elsayed, M., & Magistretti, P. J. (2015). A New Outlook on Mental Illnesses: Glial Involvement Beyond the Glue. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00468>
- Erikson, K. M., & Aschner, M. (2003). Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochemistry International*, *43*(4-5), 475-480. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(03\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(03)00037-8)
- Erikson, K. M., Dorman, D. C., Fitsanakis, V., Lash, L. H., & Aschner, M. (2006). Alterations of Oxidative Stress Biomarkers Due to In Utero and Neonatal Exposures of Airborne Manganese. *Biological Trace Element Research*, *111*(1-3), 199-216. <https://doi.org/10.1385/BTER:111:1:199>
- Erikson, K. M., Dorman, D. C., Lash, L. H., & Aschner, M. (2007). Manganese Inhalation by Rhesus Monkeys is Associated with Brain Regional Changes in Biomarkers of Neurotoxicity. *Toxicological Sciences*, *97*(2), 459-466. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm044>
- Eriksson, H., Tedroff, J., Thuomas, K. A., Aquilonius, S. M., Hartvig, P., Fasth, K. J., ... Heilbronn, E. (1992). Manganese induced brain lesions in *Macaca fascicularis* as revealed by positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Archives of toxicology*, *66*(6), 403-407. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1444804>
- Eulenburg, V., & Gomeza, J. (2010). Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.01.003>
- Exil, V., Ping, L., Yu, Y., Chakraborty, S., Caito, S. W., Wells, K. S., ... Aschner, M. (2014). Activation of MAPK and FoxO by Manganese (Mn) in rat neonatal primary astrocyte cultures. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094753>
- Fievet, B. T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D., & Arpin, M. (2004). Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *The Journal of Cell Biology*, *164*(5), 653 LP-659. Recuperado de <http://jcb.rupress.org/content/164/5/653.abstract>

- Flores-Méndez, M. A., Martínez-Lozada, Z., Monroy, H. C., Hernández-Kelly, L. C., Barrera, I., & Ortega, A. (2013). Glutamate-dependent translational control in cultured bergmann glia cells: EIF2 α phosphorylation. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1024-1>
- Fujishiro, H., Doi, M., Enomoto, S., & Himeno, S. (2011). High sensitivity of RBL-2H3 cells to cadmium and manganese: an implication of the role of ZIP8. *Metallomics*, 3(7), 710-718. <https://doi.org/10.1039/C1MT00020A>
- Fülöp, Z., Lakos, I., Bascó, E., & Hajós, F. (1979). Identification of early glial elements as the precursors of Bergmann-glia: a Golgi-analysis of the developing rat cerebellar cortex. *Acta morphologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 27(4), 273—280. Recuperado de <http://europepmc.org/abstract/MED/399155>
- Gavin, C. E., Gunter, K. K., & Gunter, T. E. (1999). Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity. *Neurotoxicology*, 20 2-3, 445-453.
- Gegelashvili, M., Rodriguez-Kern, A., Sung, L., Shimamoto, K., & Gegelashvili, G. (2007). Glutamate transporter GLAST/EAAT1 directs cell surface expression of FX₂ subunit of Na, K-ATPase in human fetal astrocytes. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.12.015>
- Gibbons, R. A., Dixon, S. N., Hallis, K., Russell, A. M., Sansom, B. F., & Symonds, H. W. (1976). Manganese metabolism in cows and goats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 444(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(76\)90218-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(76)90218-X)
- González, M. I., & Ortega, A. (2000). Regulation of high-affinity glutamate uptake activity in Bergmann glia cells by glutamate. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02226-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02226-5)
- Gu, S., Roderick, H. L., Camacho, P., & Jiang, J. X. (2000). Identification and characterization of an amino acid transporter expressed differentially in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.050318197>
- Hamdani, E. H., Gudbrandsen, M., Bjørkmo, M., & Chaudhry, F. A. (2012). The system N transporter SN2 doubles as a transmitter precursor furnisher and a potential regulator of NMDA receptors. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.22386>
- Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 17(1), 31-108. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.000335>
- Ito, Y., Oh-hashii, K., Kiuchi, K., & Hirata, Y. (2006). p44/42 MAP kinase and c-Jun N-terminal kinase contribute to the up-regulation of caspase-3 in manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Research*, 1099(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2006.03.126>
- Johnson, J., Pajarillo, E., Karki, P., Kim, J., Son, D. S., Aschner, M., & Lee, E. (2018). Valproic acid attenuates manganese-induced reduction in expression of GLT-1 and GLAST with concomitant changes in murine dopaminergic neurotoxicity. *NeuroToxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.05.001>
- Kaiser, J. (2003). Manganese: A High-Octane Dispute. *Science*, 300(5621), 926 LP-928. Recuperado de <http://science.sciencemag.org/content/300/5621/926.abstract>
- Karki, P., Smith, K., Johnson, J., Aschner, M., & Lee, E. (2015). Role of transcription factor yin yang 1 in manganese-induced reduction of astrocytic glutamate transporters: Putative mechanism for manganese-induced neurotoxicity. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.08.002>
- Karki, P., Smith, K., Johnson, J., Aschner, M., & Lee, E. Y. (2014). Genetic Dys-regulation of Astrocytic Glutamate Transporter EAAT2 and its Implications in Neurological Disorders and Manganese Toxicity. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1391-2>
- Kenny, P. J., & Markou, A. (2004). The ups and downs of addiction: Role of metabotropic glutamate receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.03.009>
- Kim, E. K., & Choi, E.-J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>
- Klaassen, C. D. (1976). Biliary Excretion of Metals. *Drug Metabolism Reviews*, 5(2), 165-196. <https://doi.org/10.3109/03602537609029977>
- Lafarga, M., Andres, M. A., Calle, E., & Berciano, M. T. (1998). Reactive gliosis of immature Bergmann glia and

- microglial cell activation in response to cell death of granule cell precursors induced by methylazoxymethanol treatment in developing rat cerebellum. *Anatomy and Embryology*. <https://doi.org/10.1007/s004290050169>
- Lee, E.-S. Y., Sidoryk, M., Jiang, H., Yin, Z., & Aschner, M. (2009b). Estrogen and tamoxifen reverse manganese-induced glutamate transporter impairment in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *110*(2), 530-544. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06105.x>
- Lee, E.-S. Y., Yin, Z., Milatovic, D., Jiang, H., & Aschner, M. (2009a). Estrogen and Tamoxifen Protect against Mn-Induced Toxicity in Rat Cortical Primary Cultures of Neurons and Astrocytes. *Toxicological Sciences*, *110*(1), 156-167. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp081>
- López-Bayghen, E., Aguirre, A., & Ortega, A. (2003a). Transcriptional regulation through glutamate receptors: Involvement of tyrosine kinases. *Journal of Neuroscience Research*, *74*(5), 717-725. <https://doi.org/10.1002/jnr.10807>
- López-Bayghen, E., Espinoza-Rojo, M., & Ortega, A. (2003b). Glutamate down-regulates GLAST expression through AMPA receptors in Bergmann glial cells. *Molecular Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(03\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(03)00136-0)
- López-Bayghen, E., & Ortega, A. (2004). Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST: Role of PKC. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02706.x>
- López-Colomé, A. M., López, E., Mendez-Flores, O. G., & Ortega, A. (2016). Glutamate Receptor Stimulation Up-Regulates Glutamate Uptake in Human Müller Glia Cells. *Neurochemical Research*, *41*(7), 1797-1805. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1895-z>
- López-Colomé, A. M., Martínez-Lozada, Z., Guillem, A. M., López, E., & Ortega, A. (2012). Glutamate Transporter-Dependent mTOR Phosphorylation in Müller Glia Cells. *ASN Neuro*. <https://doi.org/10.1042/AN20120022>
- Maragakis, N. J., Dietrich, J., Wong, V., Xue, H., Mayer-Proschel, M., Rao, M. S., & Rothstein, J. D. (2004). Glutamate Transporter Expression and Function in Human Glial Progenitors. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.10310>
- Marais, R., Wynne, J., & Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90237-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90237-K)
- Martínez-Lozada, Z., Guillem, A. M., Flores-Méndez, M., Hernández-Kelly, L. C., Vela, C., Meza, E., ... Ortega, A. (2013). GLAST/EAAT1-induced Glutamine release via SNAT3 in Bergmann glial cells: Evidence of a functional and physical coupling. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.12211>
- Martínez-Lozada, Z., Hernández-Kelly, L. C., Aguilera, J., López-Bayghen, E., & Ortega, A. (2011). Signaling through EAAT-1/GLAST in cultured Bergmann glia cells. *Neurochemistry International*, *59*(6), 871-879. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2011.07.015>
- Marx, M. C., Billups, D., & Billups, B. (2015). Maintaining the presynaptic glutamate supply for excitatory neurotransmission. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.23561>
- Meloche, S., & Pouységur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, *26*, 3227. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210414>
- Milatovic, D., Yin, Z., Gupta, R. C., Sidoryk, M., Albrecht, J., Aschner, J. L., & Aschner, M. (2007). Manganese Induces Oxidative Impairment in Cultured Rat Astrocytes. *Toxicological Sciences*, *98*(1), 198-205. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm095>
- Murphy, L. O., & Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.03.009>
- Nagatomo, S., Umehara, F., Hanada, K., Nobuhara, Y., Takenaga, S., Arimura, K., & Osame, M. (1999). Manganese intoxication during total parenteral nutrition: report of two cases and review of the literature. *Journal of the neurological sciences*.
- Nakanishi, T., Kekuda, R., Fei, Y. J., Hatanaka, T., Sugawara, M., Martindale, R. G., Ganapathy, V. (2001a). Cloning and functional characterization of a new subtype of the amino acid transport system N. *American journal of physiology. Cell physiology*.

- Nakanishi, T., Sugawara, M., Huang, W., Martindale, R. G., Leibach, F. H., Ganapathy, M. E., Ganapathy, V. (2001b). Structure, function, and tissue expression pattern of human SN2, a subtype of the amino acid transport system N. *Biochemical and biophysical research communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4504>
- Newland, M. C., Ceckler, T. L., Kordower, J. H., & Weiss, B. (1989). Visualizing manganese in the primate basal ganglia with magnetic resonance imaging. *Experimental Neurology*, 106(3), 251-258. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(89\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0014-4886(89)90157-X)
- Nijboer, C. H., Heijnen, C. J., Degos, V., Willemsen, H. L. D. M., Gressens, P., & Kavelaars, A. (2013). Astrocyte GRK2 as a novel regulator of glutamate transport and brain damage. *Neurobiology of Disease*, 54, 206-215. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2012.12.013>
- Nissen-Meyer, L. S. H., Popescu, M. C., Hamdani, E. H., & Chaudhry, F. A. (2011). Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of a Single Serine Residue on the Rat Glial Glutamine Transporter SN1 Governs Its Membrane Trafficking. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3694-10.2011>
- Norenberg, M. D., & Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90071-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90071-4)
- O'Neal, S. L., & Zheng, W. (2015). Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Current Environmental Health Reports*, 2(3), 315-328. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0056-x>
- Olanow, C. (2006). Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012(1), 209-223. <https://doi.org/10.1196/annals.1306.018>
- Ortega, A., Eshhar, N., & Teichberg, V. I. (1991). Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90331-H](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90331-H)
- Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A., & O'Halloran, T. V. (2001). The Independent cue and cusSystems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30670-30677. Recuperado de <http://www.jbc.org/content/276/33/30670.abstract>
- Owens, D. M., & Keyse, S. M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 26, 3203. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210412>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P. G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J. L., ... Magistretti, P. J. (1998). Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. En *Developmental Neuroscience*. <https://doi.org/10.1159/000017324>
- Pellerin, L., Stolz, M., Sorg, O., Martin, J. L., Deschepper, C. F., & Magistretti, P. J. (1997). Regulation of energy metabolism by neurotransmitters in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line. *GLIA*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199709\)21:1<74::AID-GLIA8>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1<74::AID-GLIA8>3.0.CO;2-1)
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>
- Peres, T. V., Pedro, D. Z., De Cordova, F. M., Lopes, M. W., Gonçalves, F. M., Mendes-De-Aguiar, C. B. N., ... Leal, R. B. (2013). In vitro manganese exposure disrupts MAPK signaling pathways in striatal and hippocampal slices from immature rats. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/769295>
- Pineda, M., Fernández, E., Torrents, D., Estévez, R., López, C., Camps, M., ... Palacín, M. (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19738>
- Posser, T., Franco, J. L., Bobrovskaya, L., Leal, R. B., Dickson, P. W., & Dunkley, P. R. (2009). Manganese induces sustained Ser40 phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 110(3), 848-856. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06185.x>
- Quintanar, L. (2008). Manganese neurotoxicity: A bioinorganic chemist's perspective. *Inorganica Chimica Acta*, 361(4), 875-884. <https://doi.org/10.1016/J.ICA.2007.09.008>

- Rae, C., Hare, N., Bubb, W. A., McEwan, S. R., Bröer, A., McQuillan, J. A., ... Bröer, S. (2003). Inhibition of glutamine transport depletes glutamate and GABA neurotransmitter pools: Further evidence for metabolic compartmentation. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01713.x>
- Reichenbach, A., & Wolburg, H. (2005). *Neuroglia*. Oxford University Press.
- Rose, E. M., Koo, J. C. P., Antflick, J. E., Ahmed, S. M., Angers, S., & Hampson, D. R. (2009). Glutamate Transporter Coupling to Na,K-ATPase. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1081-09.2009>
- Roth, J., Ponzoni, S., & Aschner, M. (2013). Manganese Homeostasis and Transport. En L. Banci (Ed.), *Metallomics and the Cell* (pp. 169-201). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5561-1_6
- Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004>
- Rubinfeld, H., & Seger, R. (2005). The ERK cascade: A prototype of MAPK signaling. *Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:151>
- Schousboe, A. (1981). Transport and metabolism of glutamate and gaba in neurons and glial cells. *International Review of Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60289-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60289-5)
- Sepúlveda, M. R., Dresselaers, T., Vangheluwe, P., Everaerts, W., Himmelreich, U., Mata, A. M., & Wuytack, F. (2012). Evaluation of manganese uptake and toxicity in mouse brain during continuous MnCl₂ administration using osmotic pumps. *Contrast Media and Molecular Imaging*. <https://doi.org/10.1002/cmimi.1469>
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., & Aschner, M. (2013). Manganese toxicity in the central nervous system: The glutamine/glutamate-γ-aminobutyric acid cycle. *Journal of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1111/joim.12040>
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Lee, E., Albrecht, J., & Aschner, M. (2009). Manganese disrupts astrocyte glutamine transporter expression and function. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06172.x>
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Lee, E., Mingwei, N., & Aschner, M. (2011). Disruption of astrocytic glutamine turnover by manganese is mediated by the protein kinase C pathway. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.21219>
- Slater, T. F., Sawyer, B., & Sträuli, U. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)90513-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)90513-4)
- Somogyi, P., Eshhar, N., Teichberg, V. I., & Roberts, J. D. B. (1990). Subcellular localization of a putative kainate receptor in Bergmann glial cells using a monoclonal antibody in the chick and fish cerebellar cortex. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90116-L](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90116-L)
- Sullivan, S. M., Lee, A., Björkman, S. T., Miller, S. M., Sullivan, R. K. P., Poronnik, P., ... Pow, D. V. (2007). Cytoskeletal anchoring of glast determines susceptibility to brain damage: An identified role for GFAP. *Journal of Biological Chemistry*. Recuperado de <http://www.jbc.org/content/early/2007/08/06/jbc.M704152200.short>
- Swanson, R. A. (2013). Astrocyte Neurotransmitter Uptake. En *Neuroglia*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195152227.003.0027>
- Tani, H., Dulla, C. G., Farzampour, Z., Taylor-Weiner, A., Huguenard, J. R., & Reimer, R. J. (2014). A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.026>
- Thomas, G. M., & Huganir, R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn1346>
- Tidball, A. M., Bichell, T. J., & Bowman, A. B. (2015). Chapter 22 Manganese and Huntington Disease. En *Manganese in Health and Disease* (pp. 540-573). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782622383-00540>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- USEPA. (1984). Health Assessment Document for Manganese, Final Report. *U.S. Environmental Protection Agency, EPA 600(B83-013F)*.
- Vaheri, A., Carpén, O., Heiska, L., Helander, T. S., Jääskeläinen, J., Majander-Nordenswan, P., ... Turunen, O. (1997). The ezrin protein family: Membrane-cytoskeleton interactions and disease associations. *Current Opinion in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80119-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80119-6)
- Vandenberg, R. J., & Ryan, R. M. (2013). Mechanisms of Glutamate Transport. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2013>
- Vásquez-Limeta, A., Wagstaff, K. M., Ortega, A., Crouch, D. H., Jans, D. A., & Cisneros, B. (2014). Nuclear import of β -dystroglycan is facilitated by ezrin-mediated cytoskeleton reorganization. *PloS one*, *9*(3), e90629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090629>
- Virchow, R. (1846). Über das granuliert Aussehen der Wandungen des Gehirnaventrikels. *Zeitschrift für Psychiatrie, Heft 2*, 242ff.
- Wang, L., HuanHuan, F., Bin, L., XiaoYan, L., WeiWei, C., & XiaoDan, Y. (2017). The effect of postnatal manganese exposure on the NMDA receptor signaling pathway in rat hippocampus. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *31*(12), e21969. <https://doi.org/10.1002/jbt.21969>
- Wedler, F. C., & R.B., D. (1984). *Current Topics in Cellular Regulation*, *24*, 153.
- Weinman, E. J., Hall, R. A., Friedman, P. A., Liu-Chen, L.-Y., & Shenolikar, S. (2006). The association of nherf adaptor proteins with g protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Annual Review of Physiology*, *68*(1), 491-505. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131050>
- Yamada, K., Fukaya, M., Shibata, T., Kurihara, H., Tanaka, K., Inoue, Y., & Watanabe, M. (2000). Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells. *Journal of Comparative Neurology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000228\)418:1<106::AID-CNE8>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000228)418:1<106::AID-CNE8>3.0.CO;2-N)
- Ye, Q., & Kim, J. (2015). Effect of olfactory manganese exposure on anxiety-related behavior in a mouse model of iron overload hemochromatosis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.016>
- Yin, Z., Aschner, J. L., dos Santos, A. P., & Aschner, M. (2008). Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. *Brain Research*, *1203*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.01.079>