



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“EFECTO DEL MODAFINILO EN LA MODULACIÓN DEL
TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS SNAT3 Y EN EL
PROCESO DE TRADUCCIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA DE
BERGMANN”**

TESIS QUE PRESENTA:

BIOL. LAURA ISABEL MÉNDEZ ALDANA

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

CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2018

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurotoxicología del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. Arturo Ortega Soto y la Dra. Esther López-Bayghen Patiño, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del financiamiento al proyecto No. 255087.

RESUMEN

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central, su recaptura por medio de sus transportadores protege a las neuronas de la excitotoxicidad que puede causar la sobre estimulación de sus receptores. Anteriormente se ha reportado que existe un acople metabólico entre el transportador de glutamato presente en las Células Gliales de Bergmann y el transportador de aminoácidos neutros SNAT3 de dichas células, lo cual, muestra que la recaptura de Glutamato junto con el ingreso de Na^+ permite que el cambio de gradiente favorezca la liberación de Glutamina a través de dicho transportador. Además, se ha demostrado que cuando el glutamato ingresa a la célula glial hay un efecto bifásico con respecto al tiempo en el proceso de traducción que se detiene a los 10 y 15 min de estimulación con Glutamato y se reestablece a 1 h. El modafinilo es un fármaco utilizado para tratar desórdenes de sueño que promueve estados de vigilia. Por lo que se sugiere que el estímulo con Modafinilo aumentará el efecto ya conocido provocado por glutamato en el transporte de Glutamina y en el proceso traduccional. Se realizaron capturas de Glutamina para estudiar la función y propiedades cinéticas de SNAT3 bajo el estímulo con Modafinilo e inmunodetecciones en fase sólida para conocer el estado de fosforilación del Factor de Elongación eucariótico 2. La mayor captura de Glutamina se observó a los 18 minutos con un estímulo de 100 μM por 30 min. Los parámetros cinéticos mostraron que el Modafinilo disminuye la afinidad del transportador por Glutamina. El patrón de fosforilación de eEF2 se vio aumentado con el estímulo con Modafinilo, sin embargo, al colocar un antagonista de CaM no se observó menor fosforilación del factor de elongación, sugiriendo que la ruta $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ no está involucrada en el aumento del patrón de fosforilación de eEF2 provocada por Modafinilo. Con estos datos se concluye que el transporte de Glutamina, así como el proceso de traducción son afectados por el estímulo con Modafinilo.

ABSTRACT

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system. Its uptake by their transporters protects neurons from excitotoxicity which can cause the overstimulation of their receptors. It has been reported that there is a metabolic coupling between Glutamate Aspartate Transporter and Sodium-coupled Neutral Amino Acid Transporter 3 in cerebellar Bergmann Glial Cells plasma membrane, which shows that Glutamate uptake and Na^+ influx lead to a gradient turnover that produces a glutamine release through its transporter. Moreover, it has been proved that when Glutamate enters the cell, it leads to a biphasic effect on the translation process timing, stopping translation at 10 and 15 minutes with Glutamate stimulation and restoring it after 1 hour. Modafinil is a drug used to treat sleep disorders that promotes awake and awareness states. Hence, we considered that Modafinil stimulus would enhance the already acknowledged effect of Glutamate upon Glutamine transport and at the translational process. Uptake assays were done to find out if Modafinil alters the function and kinetic values of SNAT3 and Western Blot assays to know the phosphorylated levels of eEF2 under Modafinil stimulus. The maximal Glutamine uptake was seen at 18 minutes with 100 μM of Modafinil for 30 minutes. The kinetic parameters showed that Modafinil diminishes Glutamine transporter affinity. The phosphorylation pattern of eEF2 was upregulated under Modafinil stimulation, even though, a CaM antagonist didn't restore the phosphorylation pattern, suggesting that $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ pathway isn't involved in the phosphorylation increase of eEF2 induced by Modafinil. Considering that, we conclude that glutamine transport is affected by Modafinil and that elongation process $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ dependent doesn't affect the eEF2 phosphorylation state under Modafinil stimulus.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis Directores de Tesis. Al Dr. Arturo Ortega Soto por haber sido un muy buen formador desde los cursos hasta la dirección de mi tesis, por sus consejos académicos y de experiencia de vida que me brindó. A la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen por haberme permitido realizar esta tesis bajo su dirección y aportarme su valiosa asesoría.

Agradezco al Colegio de Profesores del Departamento de Toxicología, Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño, Dra. Andrea Marisa Gabriela De Vizcaya Ruiz, Dra. María De la Luz Del Razo Jiménez, Dra. Libia Vega Loyo, Dra. María Isabel Hernández Ochoa, Dra. Emma Calderón Aranda, Dra. María del Rocío Gómez Ortega, Dra. Betzabet Quintanilla Vega, Dr. Arturo Ortega Soto, Dr. Arnulfo Albores Medina, Dr. Adolfo Sierra Santoyo, Dr. Mariano Enrique Cebrián García, Dr. Olivier Christophe Barbier por compartir su conocimiento y experiencia durante mi formación en este posgrado.

Agradezco a mis revisores de tesis por sus valiosas críticas constructivas que me dieron a lo largo de la elaboración de este trabajo. Al Dr. Arnulfo Albores Medina, por siempre referir a los aspectos químicos básicos tan importantes en esta área de estudio y a la Dra. Anayansi Molina Hernández por aceptar ser mi revisora desde el punto de vista neurocientífico y por permanecer en mi vida académica como una buena formadora.

Agradezco la valiosa asesoría técnica de Luisa Clara Regina Hernández Kelly, Blanca Rocío Ibarra López y Luis Ángel Cid Cid del Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN, por el entrenamiento en las metodologías realizadas en este trabajo.

Agradezco a los integrantes de mi laboratorio, por haber formado equipo conmigo para la realización de este trabajo y haber hecho agradable la permanencia en él. Así como a aquellos que llegaron a realizar prácticas durante mi estancia con quienes aprendí a enseñar parte de las técnicas que conocía

Agradezco a mis compañeros de generación que contribuyeron a la realización de trabajos en equipo siempre con la mejor disponibilidad y esfuerzo. Y a mis amigos que siempre aligeraron la carga que el trabajo implicó.

Agradezco a mi mamá por absolutamente todo lo que me ha dado desde antes de nacer hasta el día de hoy.

A mi familia por siempre impulsarme, motivarme e inspirarme a estudiar y por tolerar el hecho de darles el tiempo que me sobraba del invertido para este trabajo.

Agradezco en particular a mis amigas y compañeras Nadia y Esmeralda por haberse convertido en personas importantes en mi vida y haber sido excelentes consejeras, escuchas y compañeras de aventuras durante todo este lapso.

Agradezco a CONACYT por la beca de manutención otorgada.

A todo el personal administrativo gracias al cual el Departamento de Toxicología del CINVESTAV se mantiene trabajando.

Al CINVESTAV en general por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en tan honorable Centro de Investigación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
CÉLULAS GLIALES DE BERGMANN	9
GLUTAMATO	12
GLUTAMINA	15
LANZADERA GLUTAMATO-GLUTAMINA	15
SNAT3.....	17
TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS	19
ELONGACIÓN PROTÉICA	19
eEF2	20
MODAFINILO.....	21
FARMACOCINÉTICA DEL MODAFINILO	21
MECANISMO DE ACCIÓN DEL MODAFINILO	22
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
MATERIAL BIOLÓGICO	25
REACTIVOS	25
CULTIVO CELULAR	25
CAPTURA DE L-[³ H] GLUTAMINA Y CURVA MICHAELIS MENTEN.....	25
INMUNODETECCIÓN EN FASE SÓLIDA	26
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA	37

Índice de figuras

Fig. 1 Esquema representativo de la interacción entre los tipos celulares de la corteza cerebelar.

Fig.2 Esquema representativo de la lanzadera L-Glu/L-Gln en las CGB.

Fig 3. Modafinilo y metabolitos.

Fig.4 Función de SNAT3 después de la estimulación con modafinilo por 30 min.

Fig. 5 Función de la captura de SNAT3 a diferentes concentraciones.

Fig. 6 Inmunodetección de peEF2 con respecto al eEF2 total a tiempos cortos.

Fig. 7 Inmunodetección de peEF2 con respecto al eEF2 total a diferentes tiempos.

Fig. 8 Inmunodetección de peEF2 con respecto al eEF2 total a diferentes concentraciones.

Fig. 9 Inmunodetección de peEF2 con respecto al eEF2 total después de la exposición a W7.

Abreviaturas

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
CGB	Células gliales de Bergmann
D-Asp	D-Aspartato
DMSO	Dimetilsulfóxido
GLAST	Transportador de Glutamato y Aspartato
GS	Glutamina Sintetasa
EAAT	Transportador de Aminoácidos Excitadores
eEF1 α	Factor de Elongación eucariótico 1 α
eEF2	Factor de Elongación eucariótico 2
eEF3	Factor de Elongación eucariótico 3
eEF2K	Cinasa del Factor de Elongación eucariótico 2
iGluR	Receptores Glutamatérgicos ionotrópicos
KA	Receptores Kainato
K _M	Constante de Michaelis-Menten
L-Gln	L-Glutamina
L-Glu	L-Glutamato
mGluR	Receptores Glutamatérgicos metabotrópicos
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
PKA	Proteína Cinasa A
PKC	Proteína Cinasa C
SNC	Sistema Nervioso Central

INTRODUCCIÓN

El L-Glutamato (L-Glu) es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (SNC). Su acumulación en la hendidura sináptica conduce a la sobre-estimulación de sus receptores y con ello al proceso conocido como excitotoxicidad. En la actualidad, el consumo de fármacos con blanco en el sistema nervioso central representa, por un lado, la posibilidad de tratar trastornos neurológicos de etiologías directamente relacionadas con la alteración de los procesos bioquímicos y moleculares que suceden en sus unidades funcionales, las neuronas, y en las células que permiten que ellas realicen correctamente su función, las células gliales; y por el otro, la posibilidad de abusar de los estados producidos por este tipo de compuestos que atraviesan con facilidad la barrera hematoencefálica y modifican dichos procesos bioquímicos y moleculares.

Un fármaco que ha ganado popularidad por su gran disponibilidad y por su capacidad de producir estados de alerta y reducir la fatiga en personas sanas y por lo tanto estimular al SNC, es el Modafinilo.

A pesar de que ha sido complicado llegar a un consenso del mecanismo de acción de dicho compuesto, es evidente que altera a varios sistemas bioquímicos del SNC y entre ellos al principal, el glutamatérgico. Por lo tanto, conocer algunos aspectos claves relacionados con la alteración de la actividad del L-Glu en las células de soporte del SNC, de las cuales, ya se ha probado su efecto en poblaciones gliales aisladas, resulta una actividad importante para conocer el funcionamiento de estas células bajo el incremento en los niveles de L-Glu y bajo la modificación de este sistema de neurotransmisión como el producido por cualquier otro estimulante del SNC.

CÉLULAS GLIALES DE BERGMANN

La glía es un grupo heterogéneo de células del SNC que incluye astrocitos, glía marginal y glía radial, dichas células están implicadas en la regulación del crecimiento neuronal, diferenciación y sinaptogénesis. Las interacciones que ejerce la glía con las neuronas responden al microambiente en el que se encuentran, ya sea, a lo largo de sus procesos sinápticos y perinodales o por medio de sus uniones

estrechas. Las membranas astrocíticas están localizadas inmediatamente adyacentes a las sinapsis glutamatérgicas en el cerebelo, corteza, hipocampo y en el tallo cerebral. Esta interacción resulta sumamente dinámica e incrementa cuando hay potenciación a largo plazo, la cual es evidencia de una gran actividad glutamatérgica (Jones y Greenough 1996; Wenzel et al. 1997). Las células gliales contienen, sintetizan y liberan neuropéptidos, aminoácidos, eicosanoides, esteroides y factores de crecimiento que tienen una interacción directa con las neuronas (Bardoni et al. 2010). La producción de varios estímulos entre estas provoca la liberación de dichas sustancias, por lo que la definición funcional y anatómica de sinapsis incluye un componente glial activo que interactúa de manera coordinada y bidireccional con las neuronas presinápticas y postsinápticas.

Las células gliales de Bergmann (CGB), son un tipo de glía radial cerebelar que representa un reservorio neuronal y permanece hasta la edad adulta (Götz, Hartfuss, y Malatesta 2002).

El cerebelo es una estructura cerebral que participa en la coordinación e integración de los procesos cognitivos y motores (Delgado-García 2001). Las proyecciones cerebelares se han relacionado con la respiración, cognición, con la detección de discrepancias sensoriales, así como en la predicción de eventos sensoriales, además de estar involucradas en el autismo y la esquizofrenia. Las neuronas en la corteza cerebelar se clasifican en células granulares, estrelladas, células en cesta, células de Golgi y células de Purkinje. Los axones de las células granulares carecen de mielina y ascienden de la capa granular a la capa molecular superficial, donde se bifurcan y forman fibras paralelas que corren a lo largo de la superficie de la corteza cerebelar y conectan con las dendritas de las células de Purkinje. Las fibras paralelas son glutamatérgicas y usualmente excitan una fila completa de células de Purkinje (Saab y Willis 2003).

Las CGB son astrocitos cerebelares unipolares cuyas fibras están asociadas con células granulares en desarrollo y células maduras de Purkinje (Yamada y Watanabe 2002). Por lo que la coordinación de numerosos procesos fisiológicos y

de la sinaptogénesis está basada en la interacción apropiada entre la glía de Bergmann y las células de Purkinje.

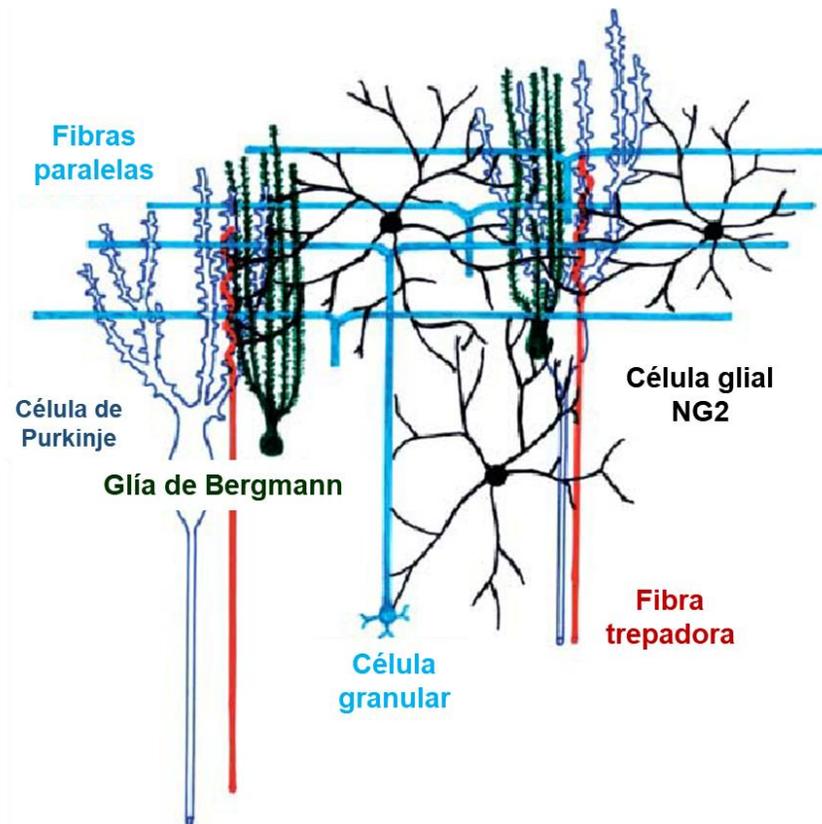


Fig. 1 Esquema representativo de la interacción entre los tipos celulares de la corteza cerebelar (Tomado y traducido de (Wigley et al. 2007)).

El descubrimiento de la comunicación bidireccional entre las células de Purkinje y la glía de Bergmann a través de rutas de señalización del Ca^{2+} tiene implicaciones funcionales y anatómicas complejas para ambos tipos celulares. En el cerebelo maduro, las células gliales de Bergmann responden a la actividad sináptica y ajustan su morfología y propiedades de membrana a sus diferentes roles. Las fibras paralelas que son los axones de las células granulares, establecen numerosas sinapsis con las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje (López-Bayghen et al. 2007). Se ha estimado que el árbol dendrítico de una célula de Purkinje individual tiene 175 000 sinapsis en las fibras paralelas, dichas sinapsis utilizan al L-Glu como neurotransmisor, por lo que, se ha sugerido que la maquinaria

glial es responsable de cambios plásticos en la transmisión sináptica cerebelar, por medio de los receptores y transportadores de L-Glu, los cuales son los principales blancos cuando el L-Glu es liberado durante la actividad sináptica (Bellamy y Ogden 2005).

Las CGB extienden sus procesos a través de la capa molecular encerrando las sinapsis que ahí se encuentran, expresan transportadores de L-Glu, receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) y N-Metil-D-Aspartato (NMDA). La estimulación de las fibras trepadoras y de las fibras paralelas a las neuronas de Purkinje produce corrientes internas en la glía de Bergmann adyacente debido a la captura electrogénica de L-Glu y la activación de receptores AMPA (Bergles, Dzubay, y Jahr 1997).

Este tipo de células gliales es el más abundante en el cerebelo, comprendiendo más del 90% de la glía cerebelar. Además, se ha visto involucrado en la captura y reciclaje de neurotransmisores, homeostasis de K^+ y en la regulación del pH, por lo que, las CGB se han considerado como un excelente modelo para analizar las bases de la señalización neuronal-glial en el contexto de la transmisión glutamatérgica (López-Bayghen et al. 2007).

GLUTAMATO

En el SNC, L-Glu es el principal neurotransmisor excitador y requiere de la participación de células neuronales y gliales para realizar su función, constituyendo uno de los ejemplos más caracterizados de sinapsis tripartita. L-Glu ejerce sus funciones a través de la activación de receptores de membrana específicos, clasificados en dos principales grupos: ionotrópicos (iGluR) y metabotrópicos (mGluR). Hallazgos recientes sugieren la participación de transportadores de L-Glu en la señalización activada por este aminoácido (Martínez-Lozada y Ortega 2015).

Los receptores de L-Glu se clasifican de acuerdo con la homología de su secuencia y a la estrategia de transducción de señales en dos principales subtipos, los iGluRs que están acoplados a canales iónicos que a su vez se clasifican de acuerdo con su perfil farmacológico en AMPA, NMDA y Kainato (KA). Los receptores AMPA

tienen diferentes propiedades, de acuerdo con los canales catiónicos que posean (GluA1, GluA2, GluA3 y GluA4), por lo que la sola presencia de una subunidad GluA2 favorece la permeabilidad de Na^+ y su ausencia, la permeabilidad a Ca^{2+} , como aquellos expresados en las CGB (Sommer et al. 1991).

En contraste, los mGluRs son miembros de la clase C de receptores acoplados a proteínas G y han sido clasificados con base en la homología de su secuencia, la proteína G acoplada y su farmacología en tres grupos. El grupo I que está compuesto por mGluR 1 y mGluR 5 y está acoplado a la estimulación de la fosfolipasa C, con una consecuente liberación intracelular de Ca^{2+} . El grupo II que contiene a mGluR2 y mGluR 3 y está acoplado con la inhibición de la enzima adenilato ciclasa. Y el grupo III que está constituido por mGluR4, mGluR6, mGluR7y mGluR8 y también se encuentra acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa (Martin et al. 1993).

Las células gliales expresan diferentes tipos de receptores glutamatérgicos, dependiendo de la región cerebral y de la etapa de diferenciación. Los receptores AMPA expresados CGB son canales permeables a Ca^{2+} (Jonas y Burnashev 1995). Se ha demostrado que el influjo de Ca^{2+} tiene un rol importante en el metabolismo y la estructura glial y que, por lo tanto, los receptores AMPA pueden regular el repertorio proteico a nivel transcripcional y traduccional en las CGB, por medio de la activación de cascadas de señalización inducida por segundos mensajeros que culminan en la liberación de sustancias neuroactivas (González-Mejía et al. 2006; Barrera et al. 2010; López-Bayghen y Ortega 2011) y que activa la unión de factores de transcripción como c-Fos, FosB, c-Jun, Jun B, zif/268, CREB y NF- κ B al DNA (Kaltschmidt y Kaltschmidt 2015; Pende et al. 1994).

Los transportadores de L-Glu en el SNC están expresados en las neuronas y en la glía, ellos median la captura electrogénica de L-Glu y están asociados con una conductancia aniónica que está estequiométricamente desacoplada al flujo de L-Glu.

Hasta ahora, se han caracterizado cinco subtipos de transportadores de L-Glu conocidos como Transportadores de Aminoácidos Excitadores (EAAT1-5). EAAT1

y EAAT2 se han reportado específicamente en células gliales y EAAT3-5 están presentes en neuronas. Los transportadores EAAT1, también conocidos como Transportadores de Glutamato/Aspartato dependientes de Na^+ (GLAST) y EAAT2 ó Transportador de Glutamato 1 (GLT1), son responsables de aproximadamente el 80-90% de la actividad de captura de L-Glu en el cerebro (Eulenburg y Gomeza 2010).

La inhibición de la síntesis de cada subtipo de transportador de L-Glu mediante nucleótidos anti-sentido reduce selectiva y específicamente la expresión de proteínas y la función de los transportadores de L-Glu. La pérdida de transportadores gliales (GLAST y GLT1) eleva los niveles de L-Glu extracelular y promueve la neurodegeneración característica de la excitotoxicidad y parálisis progresiva, lo cual es prueba de que proveen la mayor parte del transporte de este amino ácido y de que son esenciales para el mantenimiento de la baja concentración de L-Glu extracelular previniendo un evento neurotóxico (Rothstein et al. 1996).

L-Glu es el aminoácido intracelular más abundante (cuyas concentraciones reportadas varían entre 2 y 20 mM) y en el espacio extracelular puede alcanzar la concentración de 100 μM y superar la K_M de sus transportadores gliales que es alrededor de 30 μM , por lo que el acoplamiento de estos con la ATPasa Na^+/K^+ está presente de forma estricta (Rose et al. 2009). Se ha reportado que las células gliales reducen la síntesis de proteínas durante periodos de actividad sináptica sostenida debido al gasto energético que produce el restablecimiento del gradiente de Na^+ producido por la captura de neurotransmisor y un restablecimiento de la síntesis de proteínas a los 60 minutos de estímulo con L-Glu (Barrera et al. 2008; Schousboe y Waagepetersen 2005). El L-Glu participa en el metabolismo de los aminoácidos, puede donar su grupo amino para la síntesis de nuevos aminoácidos mediante el proceso llamado transaminación o puede perder el grupo amino como NH_4^+ , por desaminación a 2-oxoglutarato (Newsholme et al. 2003).

GLUTAMINA

La L-Glutamina (L-Gln) es un aminoácido que tiene un papel fundamental en el metabolismo del nitrógeno. Es el aminoácido más abundante con una concentración de 0.7-1 mM en comparación de la concentración de L-Glu de 0.02 mM (Fishman 1980).

En el hígado, la L-Gln contribuye a la detoxificación de amonio y a la producción de urea mediante la captura y liberación de L-Gln por diferentes poblaciones de hepatocitos. En los riñones, el metabolismo de la L-Gln contribuye a la secreción de ácidos. En el sistema nervioso central, la L-Gln sirve como precursor para L-Glu. Además de ser un donador de nitrógeno para otros aminoácidos, para purinas, pirimidinas y amino azúcares (F. a Chaudhry et al. 1999).

Por lo tanto, el rol de la L-Gln en el metabolismo del nitrógeno y en la transmisión sináptica involucra el transporte a través de la membrana de muchas células.

La estimulación con 50 μ M o 1 mM de D-Aspartato (D-Asp) a las CGB resulta en la liberación de L-Gln, que depende de la captura de L-Glu (Martínez-Lozada et al. 2013). Además, se ha demostrado que la captura de L-Glu activa el influjo de glucosa e incrementa la actividad de la Glutamina Sintetasa (GS) y la expresión de transportadores de L-Glu (Lehmann, Bette, y Engele 2009), lo cual sugiere una relación directa entre la presencia de L-Glu extracelular y la actividad de la conocida lanzadera Glu-Gln.

LANZADERA GLUTAMATO-GLUTAMINA

El incremento de L-Glu extracelular produce una respuesta de las células gliales a la actividad sináptica (Lehmann, Bette, y Engele 2009). Una vez que el L-Glu es liberado por la presinapsis a la hendidura sináptica, una familia de transportadores dependientes de sodio, expresados principalmente en las células gliales, remueven al aminoácido previniendo la muerte neuronal. El influjo sostenido de sodio, asociado con el ingreso de L-Glu a la célula, activa la ATPasa Na^+/K^+ para restaurar el balance iónico, a su vez, el L-Glu activa a la GS, la enzima que realiza la conversión de L-Glu y amonio a L-Gln con el gasto energético de una molécula de

ATP. Ambos eventos previamente mencionados son demandantes de energía, por lo que la glía aumenta su gasto de ATP, favoreciendo la entrada de glucosa y activando varias cascadas de señalización que aseguran la apropiada disponibilidad de L-Gln a las neuronas (Mendez-Flores et al. 2016) para completar el ciclo de la lanzadera L-Glu/L-Gln.

El ciclo de L-Glu/L-Gln es dependiente de energía, ya que una molécula de ATP es consumida en la síntesis de L-Gln a partir de L-Glu, y en gran medida del gradiente de Na⁺, ya que se reduce el eflujo de L-Gln cuando las células carecen de Na⁺ intracelular. Se ha demostrado que el ciclo L-Glu/L-Gln es el principal flujo metabólico en la corteza cerebral de ratas y la ruta predominante del tráfico de precursores de L-Glu entre astrocito y neurona, ya que sólo el 19-26% de la L-Gln se forma por el proceso de anapleirosis en condiciones de anemia normales (Sibson et al. 1997; Deitmer, Bröer, y Bröer 2003), que la concentración de L-Glu regula la proporción de éste que es metabolizado directamente a L-Gln contrario a la cantidad metabolizada en el ciclo de Krebs (Mary C. McKenna et al. 2002) y que el metabolismo en astrocitos está muy compartamentalizado (M C McKenna et al. 1990). Además, se ha mostrado que el L-Glu y GABA no pueden ser generados a partir de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, debido a que las neuronas carecen de la habilidad de llevar a cabo reacciones de anapleirosis por la ausencia de la enzima piruvato descarboxilasa (Schousboe et al. 1997). En la corteza humana, el ciclo consume aproximadamente el 80% de la energía derivada de la oxidación de la glucosa (Shen et al. 1999). Además, se ha demostrado que la captura de L-Glu activa el influjo de glucosa e incrementa la actividad de la enzima GS en astrocitos (Regan et al. 2007). Por lo que la lanzadera L-Glu/L-Gln provee evidencia de la capacidad de las células gliales para responder a la actividad sináptica a través de la modificación de sus funciones celulares.

Las constantes de afinidad de las enzimas involucradas en el ciclo L-Glu/L-Gln y presentes en las células gliales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Constantes de afinidad de enzimas involucradas en la lanzadera L-Glu/L-Gln

Enzima	Sustrato	K_M
GLAST	L-Glu	60 μ M
GS	L-Glu	7 mM
SNAT3	L-Gln	2.925 mM

Durante la transmisión sináptica, el L-Glu que ingresa a la glía y que posteriormente es transformado por la GS en L-Gln, es transportada hacia el espacio extracelular por medio de SNAT3 y SNAT5.

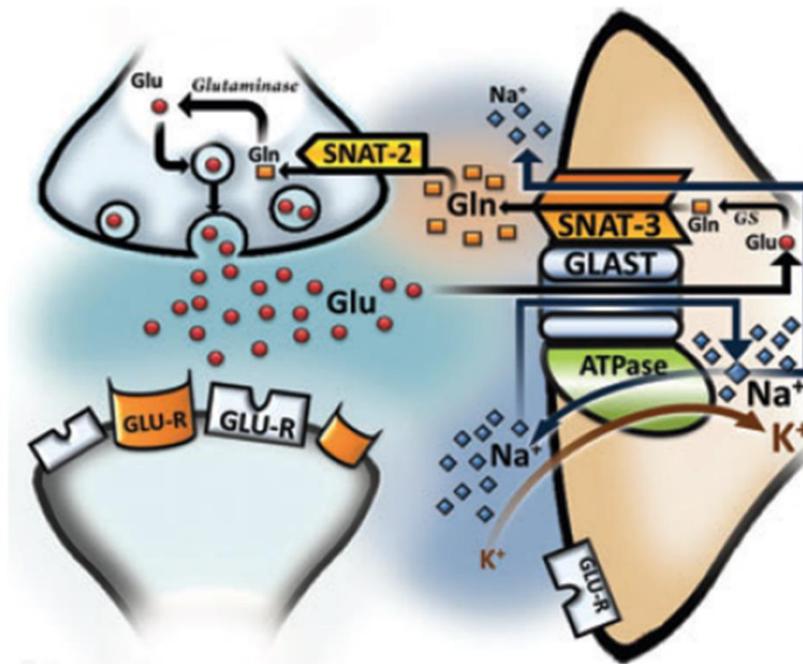


Fig.2 Esquema representativo de la lanzadera L-Glu/L-Gln en las CGB (Tomada de Martínez-Lozada et al., 2013).

SNAT3

SNAT3 es un transportador de aminoácidos sin carga miembro de la familia de transportadores SLC38, cuya expresión en el cerebro está confinada exclusivamente a astrocitos. Es un transportador que puede actuar en sentido reverso, ya que, cuando el gradiente de H^+ está revertido, puede mediar el eflujo

celular de L-Gln y acoplar el transporte de aminoácidos para intercambiar H⁺. Mantiene características de transportadores del sistema N, ya que, es dependiente del Na⁺ y muestra preferencia por L-Gln e histidina. Cuando en la glía se acumula Na⁺ por el ingreso de L-Glu, se favorece el eflujo de L-Gln de la célula (Mackenzie y Erickson 2004).

La importancia del SNAT3 para el eflujo de L-Gln en el astrocito se comprobó con la demostración de que la K_M de este transportador era menor en astrocitos cultivados en presencia de L-Glu (30-60 min, 10-100 μM) (Bröer, Deitmer, y Bröer 2004).

La regulación de estos transportadores puede ser adaptativa y se ha sugerido que el tratamiento con L-Glu en células gliales resulta en la liberación de L-Gln y que hay un acople funcional entre los transportadores de ambos aminoácidos (Martínez-Lozada et al. 2013) sugiriendo que un aumento en la captura de L-Glu puede resultar en el aumento de la expresión de SNAT3. El flujo mediado por SNAT3 se revierte cuando hay una concentración mayor de 0.5mM que es la concentración aproximada y predominante de L-Gln extracelular en el cerebro y entonces, el transportador media la captura, mientras que en concentraciones por debajo de esta media el eflujo (F. A. Chaudhry et al. 2001).

La concentración de L-Gln intracelular se encuentra dentro del rango milimolar, por lo que SNAT3 sólo puede generar un gradiente de concentración superficial de dicho aminoácido a través de la membrana. La función de transporte electroneutro elimina el rol del potencial de membrana como fuerza motriz para la captura dependiente de Na⁺ del transportador y hace al transporte de L-Gln dependiente del gradiente de Na⁺ (F. a Chaudhry et al. 1999).

La actividad de SNAT3 es regulada a nivel transcripcional y traduccional. Se ha demostrado una sofisticada regulación de este transportador mediante las interacciones de iones y proteínas. Los protones regulan la actividad de SNAT3 mediante la competición con el catión de Na⁺ en su sitio de unión, como se observa con el incremento de la K_M para Li⁺ (su sustituto) con poco cambio en la V_{max} sobre la reducción del pH celular (F. A. Chaudhry et al. 2001). Entre las proteínas

involucradas, la ubiquitina-ligasa Nedd4-2 que lo ubiquitina y disminuye su actividad en oocitos de *Xenopus laevis* (Boehmer et al. 2003). Además, se ha observado una disminución de la expresión de SNAT3 regulada por insulina a través de la cascada de señalización de PI3K-mTOR (Gu, Villegas, y Jiang 2005).

TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS

La síntesis de proteínas contribuye a la modulación de la expresión de genes específicos. Está dividida en tres fases: iniciación, elongación y terminación. Las reacciones en cada fase son promovidas por factores proteicos solubles que interactúan de manera transiente con los ribosomas, los mRNAs y con los aminoacil-tRNAs. La traducción es el proceso de mayor consumo de energía en la célula, por lo que debe ser considerado en la actividad metabólica total de la célula mediante el control de las tasas de síntesis de proteína global (Hershey 1991).

ELONGACIÓN PROTEICA

La elongación es la segunda de las tres fases de traducción, en eucariotas es influenciada por tres factores principales: el factor de elongación eucariótico 1 α (eEF-1 α), el eEF2 y el factor de elongación eucariótico 3 (eEF3). Mientras eEF1 α y eEF3 reclutan aminoacil-tRNAs al ribosoma, eEF2 es responsable de la traslocación de la cadena polipeptídica naciente del sitio ribosomal A al sitio P (Andersen et al. 2006).

La fosforilación del eEF2 en la Treonina 56 por medio de la cinasa de eEF2 (eEF2K) inhibe su unión a ribosomas, y detiene el proceso de traslocación de tRNA del sitio A al sitio P ribosomal, disminuyendo la síntesis de proteína total. eEF2K es una enzima sustrato específica al residuo Treonina 56 de la eEF2 dependiente de Ca⁺/CaM, por lo que también se conoce como CaMKIII, por lo cual, distintos agentes y tratamientos que aumentan el Ca⁺ citoplasmático inducen a la fosforilación de eEF2. El reinicio del proceso de elongación depende de la defosforilación de eEF2 mediante la inactivación de eEF2K provocada por su fosforilación por la proteína ribosomal S6 (p70S6K) y por la proteína ribosomal p90RSK, las cuales, son activadas por la cinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol (PI3K). Interesantemente, la exposición por una hora a Glu de las CGB activa a p70S6K y p90RSK que, a su

vez, coincide con la fosforilación de eEF2K y reanudación del proceso de traducción antes detenido por la misma concentración de L-Glu (González-Mejía et al. 2006).

eEF2

Es una proteína monomérica que se une a GTP, el cual es necesario para que lleve a cabo su función y se une a un dominio cercano al sitio amino terminal. eEF2 tiene una actividad de GTPasa la cual es aparentemente activada después del paso de traslocación en el dominio ribosomal localizado en la subunidad 60 S. Se ha reportado que eEF2 puede formar complejos de alta afinidad en el estado previo a la translocación y de baja afinidad después de la translocación (cuando la actividad de GTPasa es encendida) con los ribosomas. La hidrólisis de GTP no es requerida para la translocación, pues, sucede cuando la enzima forma el complejo de baja afinidad.

eEF2 lleva a cabo tres tipos de modificaciones covalentes. La primera es la conversión de histidina a diftamida, el cual es un proceso de varios pasos que requiere a varias enzimas de modificación, pero que sin embargo no parecen ser requeridas para su función. Sin embargo, esta modificación es necesaria para que el factor lleve a cabo la ribosilación ADP, el segundo tipo de unión covalente puede ser catalizado por la toxina de la difteria que es conocido como ribosilación ADP de eEF2 e inactiva completamente al factor impidiendo su actividad de GTPasa y su interacción con ribosomas. El tercer tipo de modificación es la fosforilación que ocurre en dos residuos de treonina en el sitio amino terminal (Thr56 y Thr58) que se encuentra en la región responsable de la unión con GTP y que está implicada con su interacción con ribosomas. Esta región corresponde al llamado sitio efector de otras proteínas de unión a GTP y su fosforilación es un proceso ordenado donde la fosforilación de Thr56 es requerida para la fosforilación de Thr58. La fosforilación resulta en la inactivación del factor, por lo que, la fosforilación de Thr es suficiente para alcanzar su completa inactivación (Wang et al. 2001).

La misma cinasa es responsable de la fosforilación del factor en Thr56 y Thr58, y parece ser completamente específica para eEF2. eEF2K tiene una subunidad

catalítica de alrededor de 100KDa que se asocia con Calmodulina, haciendo su actividad basal completamente dependiente de los iones de Ca^{2+} y Calmodulina.

MODAFINILO

El modafinilo es un agente promotor de vigilia de administración oral. Es un racemato con un centro quiral en el azufre del grupo sulfóxido, ambos enantiómeros del modafinilo son aproximadamente equipotentes en sus efectos farmacológicos. Su fórmula molecular es $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$ y su peso molecular es de 273.4 D. Tiene dos metabolitos, que son el modafinilo ácido y el modafinilo sulfona de los cuales no se ha reportado actividad de promoción de la vigilia (Robertson Jr y Hellriegel 2003) (Fig. 3).

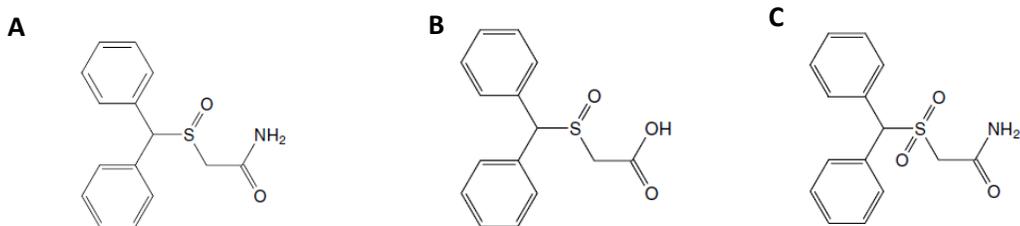


Fig 3. Modafinilo y metabolitos. A. Estructura química del modafinilo. B. Estructura química del ácido de modafinilo. C. Estructura química de la sulfona de modafinilo.

El modafinilo exhibe propiedades farmacológicas diferentes a anfetaminas o metilfenidato, debido a que no es un agente dopaminérgico ni produce la completa activación del Sistema Nervioso Central (SNC), por el contrario, el modafinilo activa selectivamente áreas del hipotálamo que han estado implicadas en la regulación del ciclo normal de vigilia, aunque el mecanismo preciso por el cual actúa el modafinilo aún no está esclarecido (Scammell et al. 2000).

FARMACOCINÉTICA DEL MODAFINILO

Después de una o múltiples dosis de 200 o 400 mg/día, el modafinilo es rápidamente absorbido, alcanzando su concentración máxima a las 2 a 4 horas después de la administración y por lo menos del 40 al 65 por ciento es absorbido. Alcanza su estado farmacocinético estable en 2 a 4 días. Su farmacocinética es dosis

independiente entre 200 y 600 mg/día. Su vida media de eliminación es aproximadamente de entre 12 y 15 horas, lo cual refleja la larga vida del enantiómero *l*.

El modafinilo es principalmente eliminado por su metabolismo en el hígado con subsecuente excreción a través de la orina, menos del 10% de la dosis es excretada sin modificación. Su metabolismo es principalmente mediante la hidrólisis de su amida, con menos contribución de las vías oxidativas mediadas por el citocromo P450.

In vitro, el modafinilo produce una inhibición reversible de CYP2C19 en microsomas de hígado de humano, también causa una inducción de la actividad dependiente de concentración de CYP1A2, CYP2B6 y CYP3A4 y suprime la actividad de CYP2C9 en cultivos primarios de hepatocitos humanos (Robertson et al. 2000).

MECANISMO DE ACCIÓN DEL MODAFINILO

A pesar de que no se ha descubierto el mecanismo de acción de este fármaco, se ha observado que el Modafinilo tiene una interacción con los sistemas histaminérgico, norepinefrinérgico, serotoninérgico, dopaminérgico, orexigénico y glutamatérgico (Gerrard y Malcolm 2007). De manera particular, incrementa el L-Glu en el tálamo y en el hipotálamo sin alterar los niveles de GABA en estos sitios (Ferraro et al. 1997; Haris et al. 2014). Y se ha observado que no afecta directamente a la captura y liberación de GABA o la actividad de L-Glu descarboxilasa (Tanganelli et al. 1995) pero sí a la L-Glu deshidrogenasa encargada de la conversión de L-Glu a α -cetoglutarato (Bettendorff et al. 1996).

El Modafinilo mejoró el ánimo, estado de fatiga, somnolencia y capacidad cognitiva en voluntarios sanos privados de sueño de una manera parecida a la cafeína, pero con una mayor duración del efecto (Kumar 2008).

JUSTIFICACIÓN

El modafinilo (2-[Difenilmetil] sulfinil] acetamida) es un estimulante promotor de vigilia usado para el tratamiento de desórdenes de sueño como en narcolepsia, apnea del sueño, entre otros. Este compuesto ha ganado popularidad en la población, debido a su eficacia como promotor de vigilia, su nula adicción y la ausencia de efectos simpatomiméticos. Además, es utilizado para tratar sedación y fatiga en condiciones médicas y neurológicas, incluyendo esclerosis múltiple, Parkinson, infección de VIH, cáncer y fibromialgia, así como en tratamiento de adicción a cocaína, el síndrome orgánico cerebral y en el aumento de regímenes con fármacos antidepresivos.

Sin embargo, se ha observado que el modafinilo tiene efectos en los sistemas de transmisión glutamatérgica y GABAérgica, incrementando el L-Glu extracelular en el tálamo, y a altas dosis, en el hipocampo y el núcleo estriado. Así como también, que incrementa el L-Glu en el área preóptica media y el hipotálamo posterior.

Por otra parte, se ha documentado que el modafinilo incrementa el contenido de mRNA de la L-Gln sintetasa, enzima clave en el reciclaje del L-Glu y cuya inhibición interrumpe la transmisión glutamatérgica. En conjunto, estos datos sugieren que el modafinilo afecta la lanzadera L-Glu/L-Gln, que participa en la remoción del L-Glu de la hendidura sináptica. En ese contexto, es probable que el modafinilo modifique el eflujo de L-Gln, que es mediado por SNAT3, toda vez que se ha demostrado que aumenta el influjo de L-Glu en las células gliales.

HIPÓTESIS

El modafinilo alterará la función de SNAT3, así como el proceso de elongación en las CGB.

OBJETIVO GENERAL

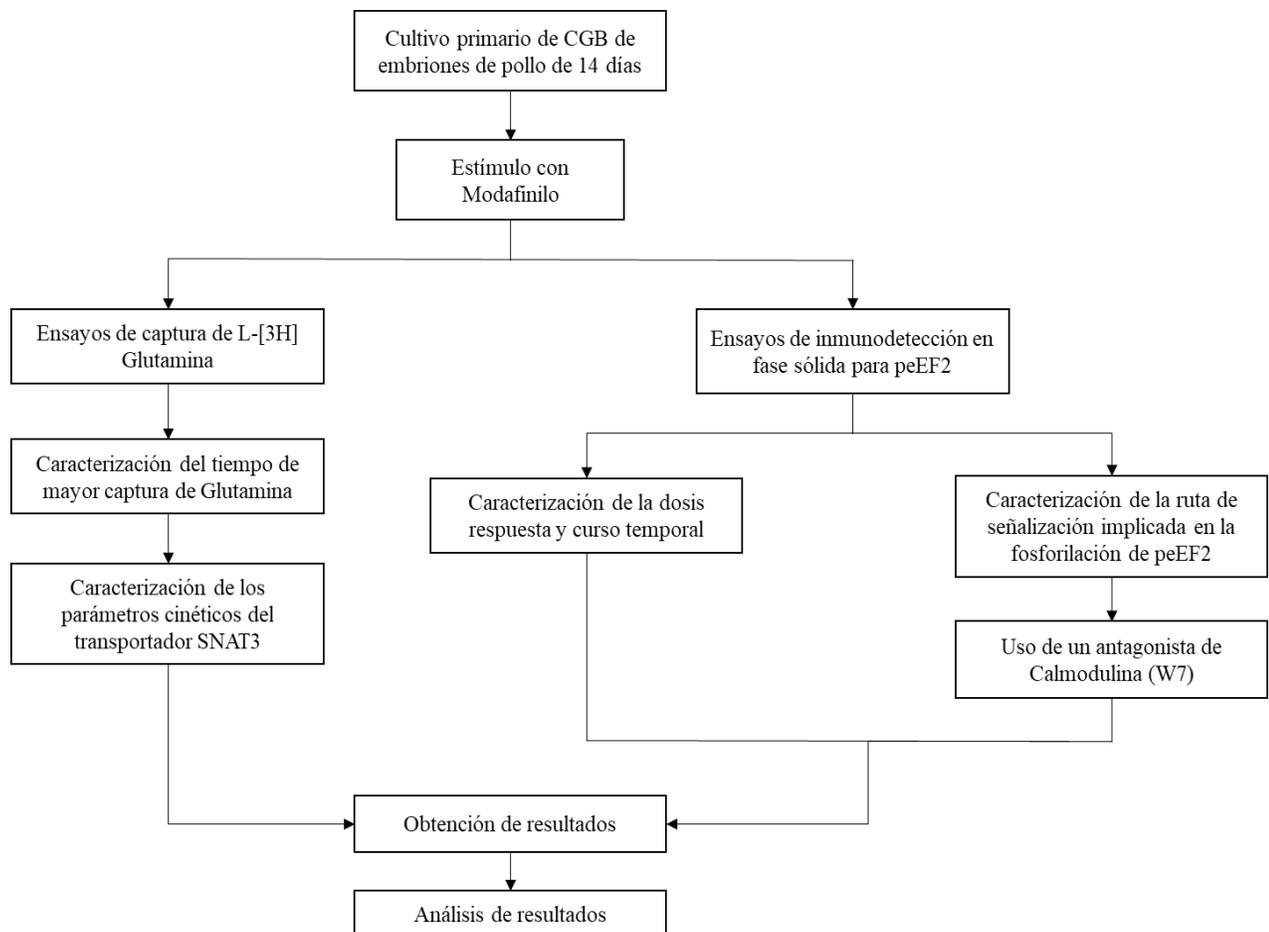
Evaluar el efecto del modafinilo en la captura de L-Gln y en el proceso de traducción de las CGB.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la actividad del transportador SNAT3 en células expuestas a diferentes tiempos y concentraciones de modafinilo.
- Evaluar la actividad del transportador SNAT3 en células expuestas a diferentes tiempos y concentraciones de modafinilo.

MATERIAL Y MÉTODOS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIAL BIOLÓGICO

Los embriones de pollo de 10 días fueron donados por Avi-Mex S.A. de C.V., y se mantuvieron en incubación a 37°C hasta su utilización para el cultivo primario de CGB. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas internacionales sobre el uso ético de animales y de acuerdo a los lineamientos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales del Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV.

REACTIVOS

Los reactivos para la elaboración del cultivo primario se adquirieron en Thermo Fisher (Carlsbad, CA, E.E.U.U.). Los reactivos demetilsulfóxido (DMSO), ciclohexamida (CHX), D-Asp y L-Glu se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.E.U.U.). La L-[³H] Gln (Actividad Específica 50.3 Ci/mmol) fue adquirida de Perkin Elmer (Boston, MA, E.E.U.U.). El (2-[(difenil)metisulfinil] acetamida) (modafinilo) fue comprado a Dipharma (Caronno Pertusella, VA, Italia) y se disolvió en DMSO al 100%.

CULTIVO CELULAR

Se obtuvieron cultivos celulares de CGB de embriones de pollo de 14 días como previamente describió Ortega y colaboradores (Ortega et al., 1991). Las células crecieron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), con 10% de suero fetal bovino, L-Gln (2 mM) y gentamicina (50 µg/mL), y fueron utilizadas los días 3 o 4 después del cultivo.

CAPTURA DE L-[³H] GLUTAMINA Y CURVA MICHAELIS MENTEN

Monocapas confluentes de CGB cultivadas en placas de 24 pozos fueron tratadas con 250 µL con Modafinilo 100 µM de Modafinilo por 30 min. La captura de L-[³H] Gln inició con la adición de 250 µL de solución A (25 mM HEPES-Tris, 130 mM NaCl, KCl 5.4 mM, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 33.3 mM glucosa, 1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) con 0.1 µL de marca radiactiva y con 200 mM de L-Gln a cada pozo por diferentes tiempos (6, 12, 18, 24 y 36 min). La captura terminó con la remoción de la marca radiactiva mediante tres lavados con 250 µL de solución A.

Se agregaron 250 μL de NaOH 0.1 N a cada pozo durante dos horas en agitación a temperatura ambiente, se cuantificó la proteína de cada pozo por el método de Bradford y posteriormente se trasvasó el contenido del pozo a un vial para contador de centelleo y se añadió 10 μL de ácido acético y 2.5 mL de solución de centelleo para poder detectar la radiactividad en un contador de centelleo Beckmann 7800LS. Se realizó un mínimo de tres experimentos por cada condición.

Para la construcción de la curva Michaelis Menten se estimuló a las células con 100 μM de Modafinilo por 30 min y posteriormente se realizaron capturas por 18 minutos con diferentes concentraciones de L-[^3H] Gln (0.5, 2.5, 5, 7.5 μM).

INMUNODETECCIÓN EN FASE SÓLIDA

Las monocapas confluentes de CGB fueron tratadas con 250 μM de Modafinilo a diferentes tiempos (15', 30', 45', 60', 90', 3 h y 6 h) y concentraciones (0.1, 1, 10, 100 y 1000 μM); y cosechadas con solución amortiguadora salina de fosfatos (10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, KCl 2.7 mM, 137 mM NaCl, pH 7.4) conteniendo inhibidores de fosfatasas y proteasas (10 mM NaF, 1 mM Na₂MoO₄, 1 mM Na₃VO₄ y 1 mM PMSF). Las células fueron lisadas con 50 mM de tampón Tris-acetato, pH 7 más 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina y 0.2% de dodecil sulfato sódico (SDS) y precipitadas con una microcentrífuga. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Nanodrop 1976), usando γ -globulina para la curva estándar. Los lisados celulares se hirvieron y desnaturalizaron con solución amortiguadora de carga Laemmli, posteriormente la proteína se analizó en un gel SDS-PAGE al 8% y después se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana con la proteína se bloqueó con leche sin grasa al 5% en solución amortiguadora salina Tris y Tween al 0.1%. Para evitar la unión del anticuerpo a sitios inespecíficos, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con anti-peEF2 y posteriormente con anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente. La inmunoreactividad se detectó mediante quimioluminiscencia con un equipo MicroChemi DNR Bio-Imaging System. Los análisis densitométricos se realizaron con el programa Image J y los datos se analizaron con el software GraphPad.

RESULTADOS

De acuerdo con los resultados previos de nuestro laboratorio, se observó que el estímulo de CGB con Modafinilo a la concentración de 100 μM por 30 minutos produjo una mayor captura de L-Glu a través de GLAST. Con la intención de conocer el tiempo por el cual el transportador de L-Gln tenía la mayor captura de L-Gln bajo el estímulo con Modafinilo por 30 minutos con 100 μM de L-Gln, se probaron distintos tiempos de captura (6, 12, 18, 24 y 36 min).

Nuestros resultados mostraron que el tiempo de captura en el cual había una mayor actividad del transportador de L-Gln esa los 18 minutos (Fig. 4). Por lo que a partir de estos experimentos se decidió hacer capturas durante este lapso.

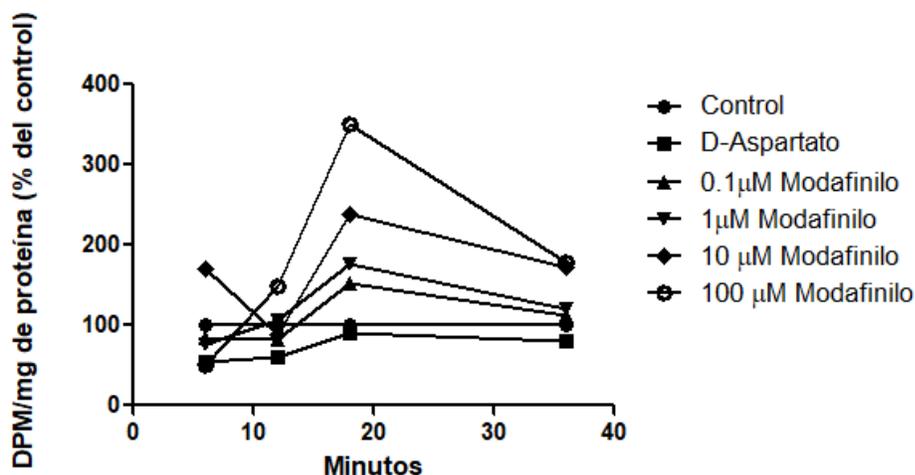


Fig.4 Función de SNAT3 después de la estimulación con modafinilo por 30 min. Captura de L-Gln de monocapas confluentes CGB a diferentes periodos de tiempo estimulados con diferentes concentraciones de Modafinilo. DPM: Desintegraciones Por Minuto. Promedios de los resultados de 4 pozos independientes normalizados con el control como el 100%.

Posteriormente, se construyó una curva Michaelis Menten para conocer los parámetros cinéticos del transportado de L-Gln y se obtuvo que la Constante de Afinidad (K_M) después del estímulo con 100 μM de Modafinilo por 30 minutos fue de 10.46 ± 5.492 mM de L-Gln mientras que la V_{max} fue de 0.1174 ± 0.03987 pmol/min/mg, los cuales disminuyeron comparados con los valores del control que

fueron de 4.167 ± 3.414 mM y 0.1924 ± 0.07164 pmol/min/mg respectivamente (Fig. 5).

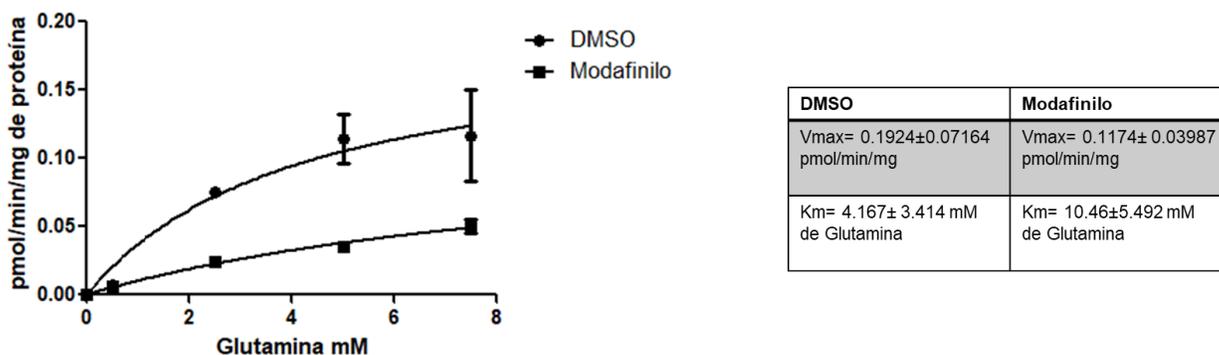


Fig. 5 Función de la captura de SNAT3 a diferentes concentraciones. Parámetros cinéticos en CGB estimuladas con Modafinilo a $100 \mu\text{M}$ por 30 min, utilizando diferentes concentraciones de L-Gln (0.5, 2.5, 5, 7.5 y 10 mM). Promedios de los resultados graficados \pm ES de 8 pozos independientes.

Una vez que se confirmó que los parámetros cinéticos del transportador de L-Gln eran alterados por el estímulo con Modafinilo, se decidió explorar si la disminución del valor de V_{max} obtenida con la curva de Michaelis Menten era debida a una alteración en el perfil total de traducción, por lo que se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida para detectar el estado de fosforilación del eEF2 y así conocer si el modafinilo detiene el proceso traduccional al nivel de la elongación. Se realizaron estímulos con Modafinilo a $100 \mu\text{M}$, partiendo del antecedente en el cual dicha concentración había mostrado una alteración en los parámetros cinéticos del transportador GLAST (Bejarano-Pérez 2017) y SNAT3, a diferentes tiempos que iban desde 15 minutos hasta una hora y media. Mediante dichos ensayos, observamos que, si bien el Modafinilo no produjo diferencias significativas entre los diferentes tiempos de estímulo, en general se observó un patrón de fosforilación que rebasó a el grupo control, observando una tendencia de mayor fosforilación con el estímulo por una hora (Fig.6).

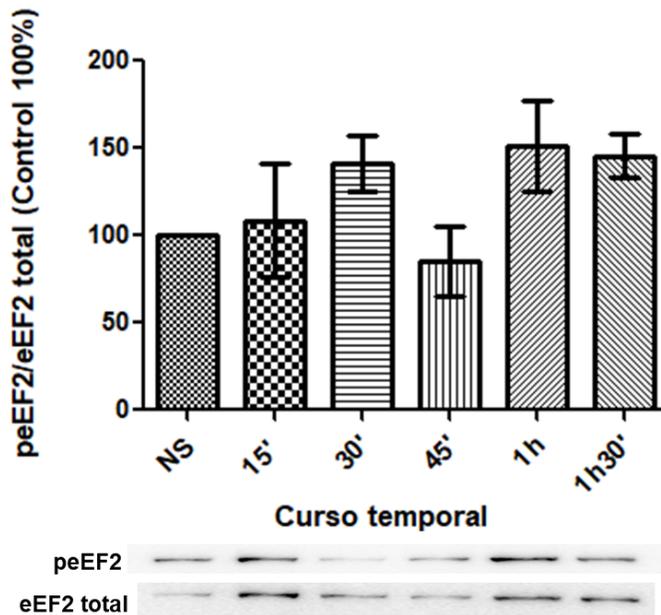


Fig. 6 Inmunodetección de peEF2 con respecto al eEF2 total a tiempos cortos. Monocapas de CGB fueron expuestas a diferentes periodos de tiempo menores a 1h30 min a 100 μ M de Modafinilo. La membrana de nitrocelulosa fue incubada con peEF2 (1:1000) y eEF2 (1:1000) y posteriormente incubada con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa. Se muestra una membrana de un experimento representativo. Se realizaron análisis estadísticos no paramétricos con prueba Kruskal-Wallis y prueba post hoc de Dunn's (*P < 0.05).

Más adelante se realizaron otro grupo de inmunodetecciones en fase sólida para conocer si el estímulo con Modafinilo a 100 μ M por mayor tiempo producía algún efecto en la fosforilación de eEF2, observando que a las 6 horas hubo un aumento en la fosforilación de aproximadamente el doble con respecto al control (Fig. 7).

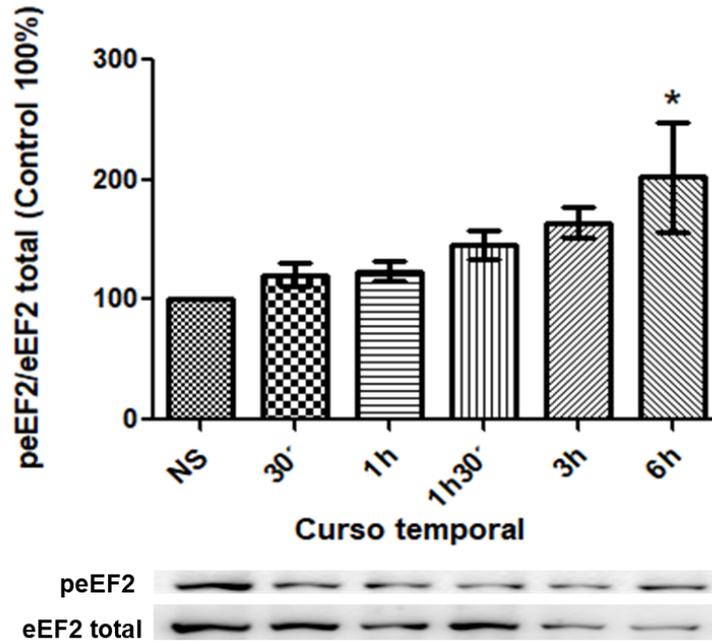


Fig. 7 Inmunodetección de peEF2 con respecto al eEF2 total a diferentes tiempos. Monocapas de CGB fueron expuestas a diferentes periodos de tiempo a 100 μ M de Modafinilo. La membrana de nitrocelulosa fue incubada con peEF2 (1:1000) y eEF2 (1:1000), posteriormente incubada con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa. Se muestra una membrana de un experimento representativo. Se realizaron análisis estadísticos no paramétricos con prueba Kruskal-Wallis y prueba post hoc de Dunn's (*P < 0.05).

Además de los estímulos a diferentes tiempos, también se probaron diferentes concentraciones de Modafinilo, observando que tampoco hubo alguna diferencia significativa entre grupos, pero sí un patrón de fosforilación mayor del eEF2 en comparación con el grupo control (Fig. 8).

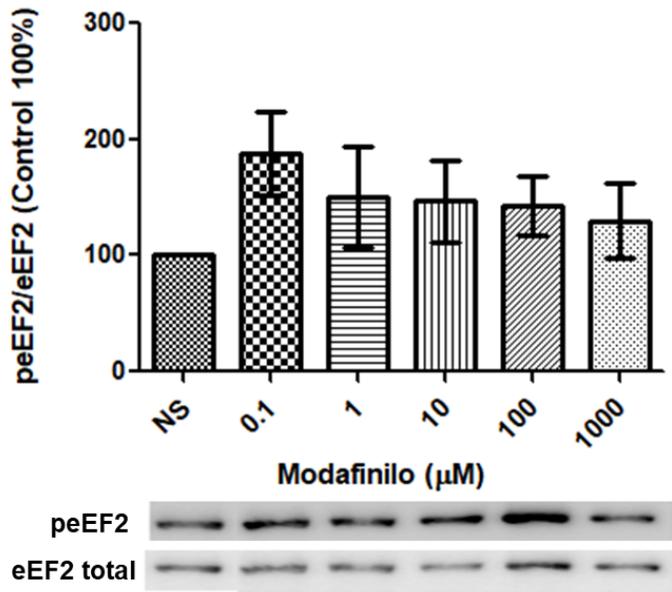


Fig. 8 Inmunodetección de peEF2 con respecto al eEF2 total. Monocapas de CGB fueron tratadas con concentraciones crecientes de Modafinilo por 1h. La membrana de nitrocelulosa fue incubada con peEF2 (1:1000) y eEF2 (1:1000) y posteriormente incubada con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa. Se muestra una membrana de un experimento representativo. Se realizaron análisis estadísticos no paramétricos con prueba Kruskal-Wallis y prueba post hoc de Dunn's (*P < 0.05).

Después de observar un incremento en el patrón de fosforilación producido por Modafinilo, se decidió explorar si dicha fosforilación era provocada por la activación de la eEF2K mediada por Ca⁺/CaM, por lo que se agregó un antagonista de CaM al estímulo con Modafinilo y los resultados mostraron que dicha inhibición de la CaM no mostró una disminución del patrón de fosforilación de eEF2 provocado por Modafinilo (Fig. 6).

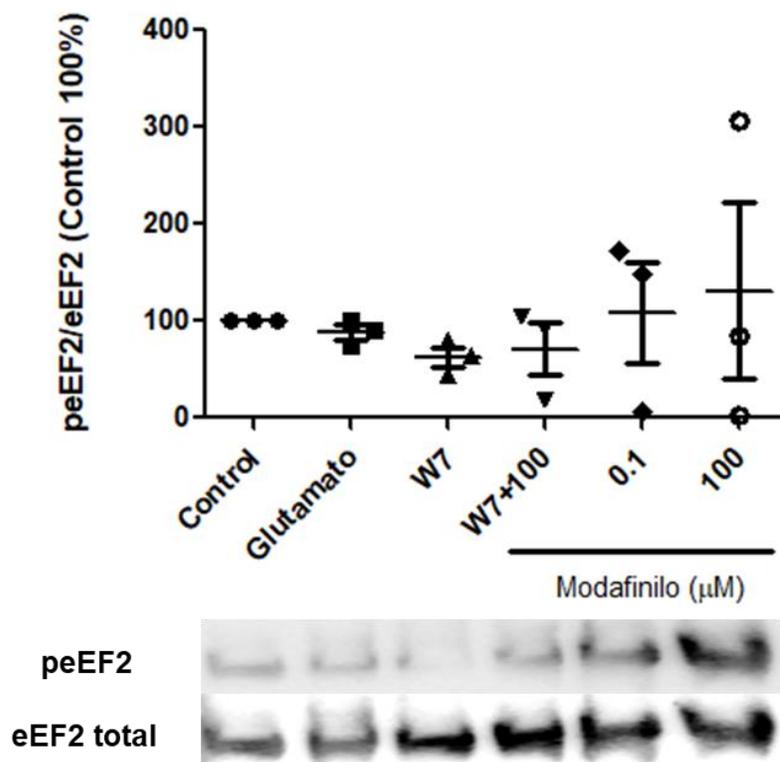


Fig. 9 Inmunodetección de peEF2 con respecto al eEF2 total después de la exposición a W7. Monocapas de CGB fueron expuestas a diferentes periodos de tiempo a L-Glu (1 mM), W7 (antagonista de Cadmodulina), W7 y 100 μ M de Modafinilo o a diferentes concentraciones de Modafinilo (0.1 y 100 μ M). La membrana de nitrocelulosa fue incubada con peEF2 (1:1000) y eEF2 (1:1000), posteriormente incubada con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa. Se muestra una membrana de un experimento representativo. Se muestra una membrana de un experimento representativo. Se realizaron análisis estadísticos no paramétricos con prueba Kruskal-Wallis y prueba post hoc de Dunn's (*P < 0.05).

DISCUSIÓN

Se decidió utilizar la concentración de 100 μ M de Modafinilo por 30 minutos de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, con el cual incrementó afinidad de GLAST por [3 H] D-Asp, para estimular a las CGB y evaluar la actividad de captura de [3 H]L-Gln. La elección de estimular bajo estas condiciones surgió de la lógica de que al existir un acople metabólico entre los transportadores de L-Glu y L-Gln (Martínez-Lozada et al. 2013), por lo que, el efecto producido para el transporte de uno podría a su vez alterar el transporte del otro.

De manera inicial se estudió el tiempo por el cual el sistema capturaba una mayor cantidad de [3 H]L-Gln. De acuerdo con nuestros resultados obtenidos, el mejor tiempo de captura del transportador de L-Gln después del estímulo con 100 μ M de Modafinilo por 30 minutos fue de 18 minutos, por lo que se decidió utilizar este tiempo de captura para los experimentos posteriores.

Las reservas de L-Glu en las neuronas tienen que ser abastecidas por la lanzadera L-Glu/L-Gln, lo cual implica que paralelamente la captura de L-Glu tiene que funcionar a su máxima capacidad en las células gliales. Con el estímulo de Modafinilo, anteriormente observamos que la captura de L-Glu aumentaba en las CGB a causa de la modificación de la K_M que disminuye su valor sin modificar drásticamente el valor de la velocidad máxima de GLAST (Bejarano-Pérez 2017), por lo que decidimos construir una curva Michaelis-Menten que nos permitiera conocer la función del transportador de L-Glu bajo el estímulo de Modafinilo, ya que si bien ya había un aumento de L-Glu intracelular, probablemente también se modificarían los valores cinéticos del transportador de SNAT3.

El valor de la K_M de SNAT 3 en las células estimuladas con Modafinilo fue 2.5 veces mayor que las células estimuladas únicamente con DMSO, lo cual sugiere que después del estímulo con Modafinilo, dicho transportador, requiere de una mayor concentración de sustrato. Contrastando el valor de la K_M bajo el estímulo con Modafinilo, el valor de la velocidad máxima (V_{max}) disminuyó 1.6 veces en comparación con el valor del control, además, notamos que si bien es necesaria una mayor cantidad de sustrato para la enzima que transporta L-Gln, el valor de la

V_{max} nos sugiere que también hay una menor cantidad del transportador en la membrana plasmática, lo cual, explicaría el aumento en el valor de la K_M .

Este estudio muestra de manera novedosa el efecto del Modafinilo sobre las CGB. Si bien ya habíamos observado que bajo el estímulo con este fármaco se afectaba la actividad de uno de los componentes de la lanzadera L-Glu/L-Gln mediante el aumento de la captura de L-Glu, los ensayos realizados en este trabajo nos permiten agregar también que el transportador de L-Gln, SNAT 3, es afectado, permitiendo una menor liberación de L-Gln, una vez que esta es transformada a partir de L-Glu. Con el valor de la V_{max} , suponemos que esa disminución en la liberación de L-Gln es debida a una menor densidad de transportadores en la membrana plasmática de las CGB.

Niessen y colaboradores en 2013 muestran que SNAT3 se fosforila por PKC en su residuo de serina 52 que está ubicado en el extremo N-terminal, lo que produce que disminuya su valor de la V_{max} y sea secuestrado en reservorios intracelulares donde se degrada por la activación constante de PKC, y que el transportador tiene un elemento de respuesta a pH que incrementa sus niveles y su actividad durante la acidosis (Nissen-Meyer y Chaudhry 2017; Karinch et al. 2002). Considerando lo anterior, posiblemente el Modafinilo participe en la activación de alguna o algunas rutas de señalización que activen a PKC y esta a su vez fosforile a SNAT3.

Además, se ha observado que el Modafinilo contrarresta los efectos causados por el aumento de lactato intracelular mediante el incremento del pH (Ueki et al. 1993), sugiriendo que podría estar afectando el pH intracelular de las CGB y de así disminuyendo la expresión proteica del transportador.

En el escenario intracelular, el incremento de la captura de L-Glu produce un aumento en las concentraciones intracelulares de Na^+ , conduciendo a la activación de la ATPasa Na^+/K^+ . A su vez, el consumo de ATP activa la utilización de glucosa y la producción de lactato, lo cual implica una gran demanda metabólica de las CGB (Pellerin et al. 2007) que puede conducir a el paro en el proceso de elongación total, lo cual, bajo dichas circunstancias puede ser preferible a afectar el inicio de la

traducción, la cual está relacionada con un paso regulatorio principal en la biosíntesis proteica (Barrera et al. 2010).

Anteriormente, se ha reportado que el proceso de interrupción de la traducción a nivel de la elongación favorece la traducción de mRNAs con regiones UTR, como lo es el mRNA de la GS (Shin y Park 2004), que coincide con el hecho de que un mayor ingreso de L-Glu requiere a la enzima para transformarlo en L-Gln y favorecer a la lanzadera L-Glu/L-Gln (Regan et al. 2007; Lehmann, Bette, y Engele 2009).

En ese contexto, decidimos averiguar si el Modafinilo puede reducir el perfil de proteínas de las CGB, ya que el control de la traducción implica una respuesta rápida a los estímulos externos en comparación con la transcripción y la mayor parte de los controles transcripcionales son regulados mediante la fosforilación de varios componentes de la maquinaria traduccional como eEF2 que es un factor importante en la traducción proteica (Barrera et al. 2008).

Los resultados que obtuvimos muestran que el modafinilo es capaz de aumentar el patrón de fosforilación de eEF2 para todos los tiempos y concentraciones probadas en comparación con el control, sin mostrar alguna diferencia significativa, lo cual nos indica que posiblemente este fármaco tenga una curva de respuesta no monotónica. Con estos resultados, decidimos explorar si la fosforilación de eEF2 provocada por Modafinilo era dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, ya que la activación de eEF2K es dependiente de ella. Por lo que probamos con un antagonista de CaM que es W7, cuyo efecto produce la inhibición de la actividad cinasa de la enzima.

El uso de W7 nos permitió comenzar a descubrir la ruta de señalización implicada en la fosforilación de eEF2 provocada por Modafinilo, que, según nuestros resultados, no es dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, debido a que W7 no evitó que se fosforilara eEF2 después del estímulo con 100 μM de Modafinilo por 30 minutos. Con estos resultados, suponemos que, entre los mecanismos de acción del Modafinilo, la traducción de proteínas es regulada negativamente a nivel de la traducción, pero que sí bien no son causados por la activación de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, se debe explorar si su efecto activa la señalización de PKC y PKA producida por Ca^{2+} .

CONCLUSIONES

El transporte de L-Gln es afectado por el estímulo con Modafinilo.

El Modafinilo favorece la fosforilación de eEF2.

El Modafinilo regula el proceso de traducción a nivel de la elongación.

El efecto del Modafinilo sobre eEF2 no depende de la formación del complejo Ca^{2+}/CaM .

PERSPECTIVAS

- Explorar si el modafinilo ejerce su efecto a partir de la señalización por Ca^{2+} (PKC, PKA).
- Reducir la expresión de eEF2K.
- Esclarecer el efecto del modafinilo en la fosforilación de eEF2 dependiente de Ca^{2+}/CaM .
- Explorar el nivel de fosforilación de SNAT3 en extractos totales y los niveles de SNAT3 en la membrana plasmática.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, Christian B.F., Thomas Becker, Michael Blau, Monika Anand, Mario Halic, Bharvi Balar, Thorsten Mielke, et al. 2006. "Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site". *Nature*. doi:10.1038/nature05126.
- Bardoni, Rita, Alessia Ghirri, Micaela Zonta, Chiara Betelli, Giovanni Vitale, Valentina Ruggieri, Maurizio Sandrini, y Giorgio Carmignoto. 2010. "Glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signalling in the rat dorsal horn". *Journal of Physiology*. doi:10.1113/jphysiol.2009.180570.
- Barrera, Iliana, Marco Flores-Méndez, Luisa C. Hernández-Kelly, Luis Cid, Miriam Huerta, Samuel Zinker, Esther López-Bayghen, José Aguilera, y Arturo Ortega. 2010. "Glutamate regulates eEF1A phosphorylation and ribosomal transit time in Bergmann glial cells". *Neurochemistry International* 57 (7): 795–803. doi:10.1016/j.neuint.2010.08.017.
- Barrera, Iliana, Luisa C. Hernández-Kelly, Francisco Castelán, y Arturo Ortega. 2008. "Glutamate-dependent elongation factor-2 phosphorylation in Bergmann glial cells". *Neurochemistry International*. doi:10.1016/j.neuint.2007.12.006.
- Bejarano-Pérez. 2017. "EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A MODAFINILO EN EL TRANSPORTE DEL GLUTAMATO EN CÉLULAS GLIALES DE BERGMANN". CINVESTAV, Ciudad de México, México.
- Bellamy, Tomas C., y David Ogden. 2005. "Short-term plasticity of Bergmann glial cell extrasynaptic currents during parallel fiber stimulation in rat cerebellum". *Glia* 52 (4): 325–35. doi:10.1002/glia.20248.
- Bergles, D E, J a Dzubay, y C E Jahr. 1997. "Glutamate transporter currents in bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (26): 14821–25. doi:10.1073/pnas.94.26.14821.
- Bettendorff, L., M. Sallanon-Moulin, M. Touret, P. Wins, I. Margineanu, y E.

- Schoffeniels. 1996. "Paradoxical sleep deprivation increases the content of glutamate and glutamine in rat cerebral cortex". *Sleep*. doi:10.1093/sleep/19.1.65.
- Boehmer, Christoph, Ferah Okur, Iwan Setiawan, Stefan Bröer, y F. Lang. 2003. "Properties and regulation of glutamine transporter SN1 by protein kinases SGK and PKB". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/S0006-291X(03)00921-5.
- Bröer, Angelika, Joachim W. Deitmer, y Stefan Bröer. 2004. "Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate". *GLIA* 48 (4): 298–310. doi:10.1002/glia.20081.
- Chaudhry, F a, R J Reimer, D Krizaj, D Barber, J Storm-Mathisen, D R Copenhagen, y R H Edwards. 1999. "Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission". *Cell*. doi:10.1016/S0092-8674(00)81674-8.
- Chaudhry, Farrukh A., David Krizaj, Peter Larsson, Richard J. Reimer, Christopher Wreden, Jon Storm-Mathisen, David Copenhagen, Michael Kavanaugh, y Robert H. Edwards. 2001. "Coupled and uncoupled proton movement by amino acid transport system N". *EMBO Journal*. doi:10.1093/emboj/20.24.7041.
- Deitmer, Joachim W., Angelika Bröer, y Stefan Bröer. 2003. "Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways". *Journal of Neurochemistry*. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01981.x.
- Delgado-García, José Maria. 2001. "Structure and Function of the cerebellum". *Revista de Neurología*.
- Eulenburg, Volker, y Jesús Gomez. 2010. "Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function". *Brain Research Reviews*. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.01.003.
- Ferraro, L, T Antonelli, W T O'Connor, S Tanganelli, F Rambert, y K Fuxe. 1997.

“The antinarcotic drug modafinil increases glutamate release in thalamic areas and hippocampus.” *Neuroreport* 8 (13): 2883–87.

Fishman, R A. 1980. “Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System”. En *Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System*, 1980. Philadelphia: W. B. Saunders Company.

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

González-Mejía, M. E., M. Morales, L. C R Hernández-Kelly, R. C. Zepeda, A. Bernabé, y A. Ortega. 2006. “Glutamate-dependent translational regulation in cultured Bergmann glia cells: Involvement of p70S6K”. *Neuroscience* 141 (3): 1389–98. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.04.076.

González-Mejía, M. E., M. Morales, L. C R Hernández-Kelly, R. C. Zepeda, A. Bernabé, y A. Ortega. 2006. “Glutamate-dependent translational regulation in cultured Bergmann glia cells: Involvement of p70S6K”. *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.04.076.

Götz, Magdalena, Eva Hartfuss, y Paolo Malatesta. 2002. “Radial glial cells as neuronal precursors: A new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice”. *Brain Research Bulletin* 57 (6): 777–88. doi:10.1016/S0361-9230(01)00777-8.

Gu, Sumin, Carla J. Villegas, y Jean X. Jiang. 2005. “Differential regulation of amino acid transporter SNAT3 by insulin in hepatocytes”. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M504401200.

Haris, M, A Singh, K Cai, K Nath, G Verma, R P Nanga, H Hariharan, J A Detre, N Epperson, y R Reddy. 2014. “High resolution mapping of modafinil induced changes in glutamate level in rat brain”. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0103154.

Hershey, John W B. 1991. “Translational Control in Mammalian Cells”. *Annual review of biochemistry*.

- Jonas, P, y N Burnashev. 1995. "Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels." *Neuron* 15 (5): 987–90. doi:0896-6273(95)90087-X [pii].
- Jones, Theresa A., y William T. Greenough. 1996. "Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment". *Neurobiology of Learning and Memory*. doi:10.1006/nlme.1996.0005.
- Kaltschmidt, Barbara, y Christian Kaltschmidt. 2015. "NF-KappaB in Long-Term Memory and Structural Plasticity in the Adult Mammalian Brain." *Frontiers in molecular neuroscience* 8 (November): 69. doi:10.3389/fnmol.2015.00069.
- Karinch, Anne M, Cheng-Mao Lin, Christopher L Wolfgang, Ming Pan, y Wiley W Souba. 2002. "Regulation of expression of the SN1 transporter during renal adaptation to chronic metabolic acidosis in rats." *American journal of physiology. Renal physiology*. doi:10.1152/ajprenal.00106.2002.
- Kumar, Raminder. 2008. "Approved and investigational uses of modafinil: An evidence-based review". *Drugs*. doi:10.2165/00003495-200868130-00003.
- Lehmann, Claudia, Stefanie Bette, y Jürgen Engele. 2009. "High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes". *Brain Research* 1297. Elsevier B.V.: 1–8. doi:10.1016/j.brainres.2009.08.070.
- López-Bayghen, Esther, y Arturo Ortega. 2011. "Glial glutamate transporters: New actors in brain signaling". En *IUBMB Life*, 63:816–23. doi:10.1002/iub.536.
- López-Bayghen, Esther, Sandra Rosas, Francisco Castelán, y Arturo Ortega. 2007. "Cerebellar Bergmann glia: an important model to study neuron-glia interactions." *Neuron glia biology* 3 (2): 155–67. doi:10.1017/S1740925X0700066X.
- Mackenzie, Bryan, y Jeffrey D. Erickson. 2004. "Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family". *Pflugers Archiv*

European Journal of Physiology 447 (5): 784–95. doi:10.1007/s00424-003-1117-9.

Martin, L. J., C. D. Blackstone, A. I. Levey, R. L. Huganir, y D. L. Price. 1993. “AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain”. *Neuroscience* 53 (2): 327–58. doi:10.1016/0306-4522(93)90199-P.

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

Martínez-Lozada, Zila, y Arturo Ortega. 2015. “Glutamatergic transmission: A matter of three”. *Neural Plasticity*. doi:10.1155/2015/787396.

McKenna, M C, J T Tildon, R Couto, J H Stevenson, y F J Caprio. 1990. “The metabolism of malate by cultured rat brain astrocytes.” *Neurochem Res*.

McKenna, Mary C., Ursula Sonnewald, Xueli Huang, Joseph Stevenson, y H. Ronald Zielke. 2002. “Exogenous Glutamate Concentration Regulates the Metabolic Fate of Glutamate in Astrocytes”. *Journal of Neurochemistry*. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.66010386.x.

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

Nanodrop, Protocol. 1976. “Bradford Protein Assay”. *Methods* 2003: 3. doi:10.1101/pdb.prodprot15.

Newsholme, Philip, Joaquim Procopio, Manuela Maria Ramos Lima, Tania Cristina Pithon-Curi, y Rui Curi. 2003. “Glutamine and glutamate - Their central role in cell metabolism and function”. *Cell Biochemistry and Function* 21 (1): 1–9.

doi:10.1002/cbf.1003.

- Nissen-Meyer, Lise Sofie H., y Farrukh Abbas Chaudhry. 2017. "Corrigendum: Protein kinase C phosphorylates the system N glutamine transporter SN1 (Slc38a3) and regulates its Membrane trafficking and Degradation [Front Endocrinol, 4, (2013) (138)] doi: 10.3389/fendo.2013.00138". *Frontiers in Endocrinology*. doi:10.3389/fendo.2017.00190.
- Pellerin, L, A K Bouzier-Sore, A Aubert, S Serres, M Merle, R Costalat, y P J Magistretti. 2007. "Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update". *Glia*. doi:10.1002/glia.20528.
- Pende, M, L A Holtzclaw, J L Curtis, J T Russell, y V Gallo. 1994. "Glutamate regulates intracellular calcium and gene expression in oligodendrocyte progenitors through the activation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (8): 3215–19. doi:10.1073/pnas.91.8.3215.
- Regan, M. R., Y. H. Huang, Y. S. Kim, M. I. Dykes-Hoberg, L. Jin, A. M. Watkins, D. E. Bergles, y J. D. Rothstein. 2007. "Variations in Promoter Activity Reveal a Differential Expression and Physiology of Glutamate Transporters by Glia in the Developing and Mature CNS". *Journal of Neuroscience*. doi:10.1523/JNEUROSCI.0790-07.2007.
- Robertson Jr, Philmore, y Edward T. Hellriegel. 2003. "Clinical Pharmacokinetic Profile of Modafinil". *Clinical Pharmacokinetics* 42 (2): 123–37. doi:10.2165/00003088-200342020-00002.
- Robertson, P, H H DeCory, A Madan, y A Parkinson. 2000. "In vitro inhibition and induction of human hepatic cytochrome P450 enzymes by modafinil". *Drug Metab Dispos.* 28 (6): 664–71.
- Rose, E. M., J. C. P. Koo, J. E. Antflick, S. M. Ahmed, S. Angers, y D. R. Hampson. 2009. "Glutamate Transporter Coupling to Na,K-ATPase". *Journal of Neuroscience*. doi:10.1523/JNEUROSCI.1081-09.2009.

- Rothstein, Jeffrey D., Margaret Dykes-Hoberg, Carlos A. Pardo, Lynn A. Bristol, Lin Jin, Ralph W. Kuncl, Yoshikatsu Kanai, et al. 1996. "Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate". *Neuron*. doi:10.1016/S0896-6273(00)80086-0.
- Saab, Carl Y., y William D. Willis. 2003. "The cerebellum: Organization, functions and its role in nociception". *Brain Research Reviews* 42 (1): 85–95. doi:10.1016/S0165-0173(03)00151-6.
- Scammell, T E, I V Estabrooke, M T McCarthy, R M Chemelli, M Yanagisawa, M S Miller, y C B Saper. 2000. "Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20 (22): 8620–28. doi:20/22/8620 [pii].
- Schousboe, Arne, y Helle S. Waagepetersen. 2005. "Role of astrocytes in glutamate homeostasis: Implications for excitotoxicity". *Neurotoxicity Research*. doi:10.1007/BF03033975.
- Schousboe, Arne, Niels Westergaard, Helle S. Waagepetersen, Orla M. Larsson, Inger J. Bakken, y Ursula Sonnewald. 1997. "Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites". *GLIA*. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1<99::AID-GLIA11>3.0.CO;2-W.
- Shen, J, K F Petersen, K L Behar, P Brown, T W Nixon, G F Mason, O a Petroff, G I Shulman, R G Shulman, y D L Rothman. 1999. "Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (14): 8235–40. doi:10.1073/pnas.96.14.8235.
- Shin, Daesung, y Chankyu Park. 2004. "N-terminal Extension of Canine Glutamine Synthetase Created by Splicing Alters Its Enzymatic Property". *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M309940200.
- Sibson, N R, a Dhankhar, G F Mason, K L Behar, D L Rothman, y R G Shulman. 1997. "In vivo ¹³C NMR measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate-glutamine cycling." *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America.

doi:10.1073/pnas.94.6.2699.

Sommer, Bernd, Martin Köhler, Rolf Sprengel, y Peter H. Seeburg. 1991. "RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels". *Cell* 67 (1): 11–19. doi:10.1016/0092-8674(91)90568-J.

Tanganelli, Sergio, Miguel Pérez de la Mora, Luca Ferraro, Jesus Méndez-Franco, Lorenzo Beani, Francis A. Rambert, y Kjell Fuxe. 1995. "Modafinil and cortical γ -aminobutyric acid outflow. Modulation by 5-hydroxytryptamine neurotoxins". *European Journal of Pharmacology*. doi:10.1016/0014-2999(94)00675-W.

Ueki, A., L. Rosén, B. Andbjør, U. B. Finnman, U. Altamimi, A. M. Janson, M. Goldstein, L. F. Agnati, y K. Fuxe. 1993. "The vigilance-promoting drug modafinil counteracts the reduction of tyrosine hydroxylase immunoreactivity and of dopamine stores in nigrostriatal dopamine neurons in the male rat after a partial transection of the dopamine pathway". *Experimental Brain Research*. doi:10.1007/BF00228393.

Wang, Xuemin, Wei Li, Michayla Williams, Naohiro Terada, Dario R. Alessi, y Christopher G. Proud. 2001. "Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase". *EMBO Journal*. doi:10.1093/emboj/20.16.4370.

Wenzel, H Jürgen, Paul S Buckmaster, Norma L Anderson, Mareike Wenzel, y Philip A Schwartzkroin. 1997. "Ultrastructural localization of neurotransmitter immunoreactivity in mossy cell axons and their synaptic targets in the rat dentate gyrus". *Hippocampus*. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:5<559::AID-HIPO11>3.0.CO;2-#.

Wigley, Rebekah, Niki Hamilton, Akiko Nishiyama, Frank Kirchhoff, y Arthur M. Butt. 2007. "Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons". En *Journal of Anatomy*. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00729.x.

Yamada, Keiko, y Masahiko Watanabe. 2002. "Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells." *Anatomical science international* 77

(2): 1–15. doi:10.1046/j.0022-7722.2002.00021.x.