



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

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A FLUORURO EN LOS
TRANSPORTADORES DE GLUTAMINA SNAT3 Y SNAT5”**

Tesis que presenta:

Ana Lidia García López

Para obtener el Grado de Doctor en Ciencias

En la Especialidad de Toxicología

Director de la Tesis:

Dr. Arturo Ortega Soto

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el laboratorio 31 de Neurotoxicología del Departamento de Toxicología, bajo la dirección del Dr. Arturo Ortega Soto, con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt-México) a través del donativo 255087 y de la beca de doctorado con No. de registro 455449.

Agradecimientos

A todos los integrantes del laboratorio 31 de Neurotoxicología del Departamento de Toxicología.

A mis compañeros Dra. Orquidia Guadalupe Méndez Flores y Dr. Marco Flores Méndez, por compartirme sus conocimientos durante mi primer año y primeros meses de trabajo experimentales en el laboratorio 31.

A mis compañeros, Catia, Ada, Jazz, Janisse, Isabel, Laura, Andrea y Freddy. Gracias por los momentos gratos, experiencias y conocimientos compartidos en el laboratorio 31.

A mis compañeros y amigos de generación de Maestría y Doctorado en la Especialidad de Toxicología, gracias por su amistad y compañerismo.

Por la asistencia técnica para la realización de los experimentos a Luis Cid Cid y Blanca Ibarra López.

A la M. en C. Clara R. Hernández Kelly por su apoyo y asistencia durante la realización de experimentos y el manejo de equipos en el laboratorio.

A los miembros del comité de asesores de este trabajo, Dra. Rossana Citlali Zepeda Hernández (Universidad Veracruzana), Dr. Gabriel Roldán Roldán (Facultad de Medicina UNAM), Dra. Emma Soraida Calderón Aranda y Dr. Olivier Christophe Barbier. Agradezco su asistencia a los seminarios de evaluación y sus comentarios y aportes realizados a este trabajo. Muchas gracias por el tiempo dedicado a revisar este trabajo.

Al Dr. Arturo Ortega Soto. Asesor de Tesis y tutor. Por sus líneas de investigación, el conocimiento y la dirección de este trabajo. Por darme la oportunidad de estar en un lugar en donde crecer intelectualmente y por la apertura y libertad experimental que tuve en el laboratorio. Por el compromiso que tiene con el aprendizaje y el desarrollo de las capacidades intelectuales y científicas de sus alumnos. Por ser ejemplo de los valores de compromiso, responsabilidad, disciplina y perseverancia.

A mi familia, muchas gracias por todo. Agradezco a mis padres, hermanos, cuñados y sobrinos su ejemplo, comprensión, apoyo y amor.

A Dios. Gracias Padre por permitirme conocer el mundo fascinante de la investigación científica y llegar a la presentación final de este trabajo.

Resumen

La Glutamina es el aminoácido más abundante en Sistema Nervioso Central. Es el principal precursor de los neurotransmisores, glutamato y GABA. La lanzadera GABA/glutamato/glutamina provee a las neuronas con glutamina. Los transportadores SNAT3 y SNAT5, desde las células gliales, transportan la glutamina al fluido extracelular en una forma Na^+ dependiente.

El Fluoruro (F^-), es un contaminante ambiental que se encuentra en agua, comida, sal y productos dentales. Causa daños en el Sistema Nervioso Central y afecta funciones cognitivas en poblaciones expuestas, muy probablemente por disrupción de la neurotransmisión glutamatérgica y/o GABAérgica.

Teniendo en consideración el papel que los transportadores SNAT tienen en el reciclamiento de los neurotransmisores glutamato y GABA, evaluamos el efecto que la exposición a F^- tiene en la expresión funcional de SNAT3 y SNAT5 en la línea celular de células de Müller de retina de humano, MIO-M1.

Una reducción del 20% en la captura de [^3H]-glutamina fue producida por la exposición a F^- (500 μM). Los análisis tipo Michaelis-Menten revelaron una disminución de la velocidad máxima de transporte (V_{max}). Los ensayos de unión a radioligando, mostraron una disminución de la unión a glutamina en las células. El análisis, mostró en inmunoquímicas una reducción en la cantidad de SNAT3 y SNAT5 en las células. Los datos obtenidos apoyan la idea de las células gliales como blanco del F^- .

Abstract

Glutamine is the most abundant extracellular amino acid in the Central Nervous System. It is the main precursor of the neurotransmitters glutamate and GABA. The GABA/glutamate/glutamine shuttle provides neurons with glutamine. Glutamine transporters, SNAT3 and SNAT5, expressed in glial cells, supply neurons with glutamine in a Na⁺-dependent manner.

Fluoride (F⁻), is an environmental pollutant present in water, food, salt and dental products, that impairs cognitive functions in exposed population, likely through a disruption of glutamatergic and/or GABAergic neurotransmission.

Taking into consideration the involvement that the SNAT transporters have in the recycling of glutamate and GABA neurotransmitters, we evaluated the effect of F⁻ exposure in the functional expression of SNAT3 and SNAT5 in the human retinal Müller glia cell line, MIO-M1.

A reduction of 20% in the [³H]-glutamine uptake was produced by the exposure to F⁻ (500 μM). The Michaelis-Menten analysis revealed a reduction in *V_{max}*. The radioligand binding assays, showed a decrease in the glutamine binding in the cells. The immunochemical experiments demonstrated a reduction of SNAT3 and SNAT5 protein levels of F⁻ exposed cell cultures. These results support the idea of glial cells as an important target of F⁻.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Glutamato	12
1.1.1. Metabolismo del glutamato.....	12
1.1.2. Receptores de glutamato.....	13
1.1.3. Transportadores de glutamato	21
1.1.4. Reciclaje del glutamato	24
1.2. Glutamina.....	26
1.2.1. Transportadores de glutamina.....	26
1.2.2. Transportadores de glutamina de la familia slc38a	27
1.2.3. SNAT3	28
1.2.4. SNAT5	30
1.2.5. SNAT2	32
1.3. HIPOCAMPO.....	34
1.4. CEREBELO	38
1.5. CELULAS GLIALES DE MÜLLER	41
1.6. EVITACIÓN PASIVA	44
1.7. FLUORURO.....	46
1.7.1. Ocurrencia y fuentes de exposición a fluoruro	46
1.7.2. Biomarcadores de exposición y efecto	48
1.7.3. Toxicocinética del fluoruro.....	48
1.7.4. Concentración de fluoruro en sistema nervioso central (SNC).....	50
1.7.5. Neurotoxicidad, gliotóxicidad y efectos neuroconductuales.....	51
1.8. JUSTIFICACION.....	55
1.9. HIPOTESIS.....	56
1.10. OBJETIVOS	56
1.10.1. Objetivo general.....	56
1.10.2. Objetivos particulares	56
2. MÉTODOS.....	57
2.1. Reactivos	57
2.2. Cultivo celular.....	57

2.3.	Inmunocitoquímica	57
2.4.	Ensayo de viabilidad celular	58
2.5.	Ensayo de transporte de glutamina	59
2.6.	Cinética de transporte de glutamina.....	59
2.7.	Ensayos de unión a radioligando.....	60
2.8.	Inmunodetección en fase sólida	60
2.9.	Análisis estadístico	61
3.	RESULTADOS	62
3.1.	Expresión de SNAT3 y SNAT5 en células MIO M1.....	62
3.2.	Efecto de la exposición a F ⁻ sobre la viabilidad celular de las células MIO-M1.....	64
3.3.	Efecto del F ⁻ en la captura de [³ H]-Glutamina en células MIO-M1	65
3.4.	Efecto de la exposición a F ⁻ sobre la cinética de transporte de glutamina	68
3.5.	Efecto del F ⁻ sobre la unión de [3H]-Glutamina a la membrana celular	70
3.6.	Efecto de la exposición a F ⁻ en la expresión de los transportadores SNAT3 y SNAT5.....	72
3.7.	Efecto de Ca ²⁺ intracelular en la captura de [³ H]-Glutamina	74
4.	DISCUSIÓN.....	76
4.1.	Modelo del efecto de la exposición a F ⁻ en células MIO M1.....	81
5.	CONCLUSIONES	82
6.	PERSPECTIVAS	82
7.	REFERENCIAS.....	83

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Modelo del receptor GRIN1/GRIN2.	15
Figura 2. Estructura secundaria de las subunidades GRIA.	17
Figura 3. Estructura GRIA2 homomérico obtenido por cristalografía.	18
Figura 4. Estructura de los receptores GRM.	20
Figura 5. A. Vista superior de la estructura de ensamblaje de GltPh (Transportador en bacterias homólogo a EAATs). B. Topología transmembranal de los transportadores de aa excitadores EAATs.	22
Figura 6. Representación de la localización de los transportadores GLAST, GLT1 Y EAAT4	23
Figura 7. Secuencia de aa y estructura del transportador SNAT1.	28
Figura 8. Estructura secundaria del transportador SNAT2.	33
Figura 9. Corte coronal de cerebro de rata. A) Fotografía de un corte coronal de cerebro de rata. B) Sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl	36
Figura 10. A) Cito-arquitectura de la corteza cerebelar. B) Organización sináptica en la capa molecular del cerebelo.	40
Figura 11. Diagrama representativo del reciclamiento de los neurotransmisores GABA y Glu en la retina.	42
Figura 12. Localización de las células en la retina de humano,	43
Figura 13. Imágenes de células de la línea celular MIO-M1.	62
Figura 14. Los transportadores SNAT3 y SNAT5 son expresados en células de la línea celular MIO-M1.	64
Figura 15. La exposición a F ⁻ no afecta la viabilidad celular.	65
Figura 16. La exposición a F ⁻ disminuye la captura de [³ H]-L-Gln.	66
Figura 17. Efecto del F ⁻ sobre la captura de Gln a diferentes tiempos (3,6,12,15 y 30 min).	67
Figura 18. La exposición a F ⁻ en presencia de Na ⁺ disminuye la V _{max} de transporte de glutamina.	69
Figura 19. La exposición a F ⁻ en presencia de Li ⁺ disminuye la V _{max} de transporte de glutamina.	70
Figura 20. La exposición a F ⁻ reduce la unión de [³ H]-L-Gln en células MIO-M1.	71
Figura 21. La exposición a F ⁻ reduce los niveles de las proteínas SNAT3 y SNAT5 en células MIO-M1.	73
Figura 22. La actividad del intercambiador sodio calcio (NQX) media la reducción en la captura de [³ H]-Gln producida por la exposición a F ⁻ en células MIO-M1.	75
Figura 23. La actividad de transporte de Gln en células gliales de Müller es afectada por el F ⁻ .	81

Abreviaturas

[³ H]-L-Gln	Glutamina tritiada
[Ca ²⁺] _i	Calcio intracelular
aa	Aminoácidos
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AQ4	Acuaporina 4
ASCT	Transportadores de alanina, serina y cisteína
Asp	Aspartato
ATD	Dominio amino terminal
ATP	Trifosfato de adenosina
BAPTA	Agente permeable y quelante de Ca ²⁺ intracelular
CaMKII	Proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺ /Calmodulina II
CAT	Catalasa
CGBs	Células gliales de Bergmann
CRALBP	Proteína de unión a retinaldehído
CTD	C-terminal
DAG	Diacilglicerol
DL-TBOA	DL-treo-b-benzil-oxi-aspartato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucina
EAATs	Transportadores de aminoácidos excitadores
EC ₅₀	Concentración efectiva media
eEF2K	Quinasa del factor eucariótico de elongación 2
F ⁻	Ion fluoruro
FCE	Fluido cerebro espinal
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GAD	Descarboxilasa de glutamato
GLAST	Transportador de glutamato y aspartato
Gln	Glutamina
GLT-1	Transportador de glutamato
Glu	Glutamato
GluRs	Receptores de glutamato
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GRI _s	Receptores ionotrópicos
GRMs	Receptores metabotrópicos
GS	Glutamina sintetasa
HF	Fluoruro de hidrógeno
INL	Membrana nuclear interna
IP ₃	1,4,5-trifosfato
IQ	Coeficiente intelectual
KA	Kainato
Li ⁺	Ion litio
KBP	Proteína de unión a kainato
KBR	Bloqueador de NQX, KB-R7943

Kir4.1	Canal de potasio rectificador subtipo 4.1
K _m	Constante de Michaelis
LAT	Transportadores del sistema L
LBD	Dominio de unión a ligando
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
MeAIB	Ácido α-metil-amino-Isobutírico
MG	Microglía
CGMs	Células gliales de Müller
MIO-M1	Línea celular de Müller de origen humano
MNTB	Núcleo medial del cuerpo trapezoide
mPFC	Corteza prefrontal medial
mRNA	ARN mensajero
MSO	Metionina sulfoximina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	Bomba sodio (Na ⁺), potasio (K ⁺) ATPasa
NaF	Fluoruro de sodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NQX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
NTD	N-terminal
O ₂ [*]	Radical superóxido
PAG	Glutaminasa activada por fosfato
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLCβ1	Fosfolipasa Cβ1
PLD	Fosfolipasa D
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
rMC1	Células de Müller de rata
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	ARN pequeño de interferencia
SLC38	Acarreador de solutos 38
SLCs	Acarreadores de solutos
SNAT	Transportador de aminoácidos neutros
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
TMD	Dominio transmembranal
vGLUT	Transportador vesicular de glutamato
V _{max}	Velocidad máxima de transporte

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Glutamato

El glutamato (Glu) es el neurotransmisor excitador más abundante en el Sistema Nervioso Central (SNC). Se encuentra en concentraciones de entre 5 a 15 mmol/kg en tejido cerebral, y en el citoplasma de neuronas glutamatérgicas la concentración se encuentra en un rango aproximado de entre 5 a 10 mM, las concentraciones más elevadas de Glu en estas células están localizadas en las terminales axónicas (1). En los axones el Glu es concentrado en vesículas sinápticas en donde pueden encontrarse concentraciones de más de 100mM (2) En fluidos extracelulares en SNC, el Glu es mantenido a bajas concentraciones, de aproximadamente 25nM, y en plasma sanguíneo la concentración se encuentra entre 30 a 80 μ M. El Glu es sintetizado en neuronas por transaminación del 2-oxoglutarato, intermediario del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), y por metabolismo del aminoácido glutamina (Gln); en las terminales presinápticas el Glu es formado a partir de Gln vía desamidación metabolizada por la enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG) en las mitocondrias (3,4).

1.1.1. Metabolismo del glutamato

El Metabolismo del Glu está compartimentalizado. La compartimentalización en el SNC se logra por la separación del cerebro y la sangre por la barrera hematoencefálica, que impide el paso de la mayoría de los solutos hacia el cerebro. El Glu en suero es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica y por tanto es sintetizado por las células del SNC (5).

En el cerebro, el Glu es sintetizado en neuronas y en células gliales (6). El Glu es un cosustrato para la formación de α -cetoglutarato, catalizada por aminotransferasas, y es el precursor inmediato para formación del neurotransmisor inhibidor ácido gamma aminobutírico (GABA); GABA es formado en neuronas por descarboxilación de Glu por la enzima descarboxilasa de glutamato (GAD). En células gliales el Glu es el precursor directo para la formación del aminoácido Gln,

la reacción es catalizada por la enzima glial glutamina sintetasa (GS). La localización y especialización bioquímica y anatómica de los pies terminales de las células gliales en el SNC permite a estas células remover al neurotransmisor Glu de la hendidura sináptica y proveer a las neuronas con Gln para el reabastecimiento de Glu; la transferencia de Gln desde las células gliales a las neuronas y de los neurotransmisores Glu y GABA hacia las células gliales desde las neuronas ha sido denominada lanzadera GABA/glutamato/glutamina o **ciclo glutamato/glutamina**. En las neuronas, la Gln es el principal precursor de la síntesis de Glu y a su vez de GABA y también es utilizado para la síntesis de proteínas y producción de energía. Las células gliales responden a cambios en la neurotransmisión, por medio de activación de los receptores de glutamato gliales y los transportadores de aminoácidos (aa) excitadores gliales (7–9).

1.1.2. Receptores de glutamato

Los receptores de Glu se encuentran distribuidos en todo el SNC, son receptores sinápticos y no sinápticos localizados principalmente en las membranas de las neuronas y las células gliales. Los receptores de Glu (GluRs) son los principales mediadores de la transmisión excitadora y están involucrados en la activación de cascadas de señalización requeridas para la plasticidad sináptica y el aprendizaje y la memoria. Los receptores de Glu están funcionalmente divididos en receptores ionotrópicos (GRI) y en receptores metabotrópicos (GRM).

Los GRI son canales permeables a cationes Ca^{2+} , Na^+ y K^+ , abiertos por ligando, que varían en la tasa en la que son activados, desactivados y desensibilizados. Los GRI han sido clasificados en tres subtipos de acuerdo a sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas, en receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y receptores a kainato (KA) (10). Los GRI son estructuras multiméricas compuestas por combinaciones variables de subunidades que les confieren funciones específicas, las tres familias de receptores son codificadas por familias de genes distintas (11).

Los receptores NMDA son tetrámeros que están formados por combinación de diferentes subunidades: GRIN1, GRIN2 y GRIN3. La estructura de los canales NMDA contiene dos subunidades GRIN1 en combinación con subunidades GRIN2 y/o GRIN3. La mayoría de los NMDAR en el SNC de mamíferos están compuestos por subunidades GRIN1 y GRIN2 (12). Las subunidades GRIN1 están expresadas ubicuamente en el SNC de vertebrados, y las subunidades GRIN2 tienen regulación espacial y temporal, lo que confiere propiedades funcionales, anatómicas y farmacológicas diferenciales a los receptores NMDA. El procesamiento postranscripcional del RNA de GRIN1 por corte y empalme alternativo genera ocho variantes de la subunidad. Cuatro subunidades del receptor GRIN2 son codificadas por cuatro genes (GRIN2A-D), y dos subunidades del receptor GRIN3 son codificadas por dos genes (GRIN3A y B). Cada subunidad del receptor NMDA contiene un dominio amino terminal (ATD), un dominio extracelular de unión a ligando (LBD), un dominio transmembranal (MD) formando el canal iónico, y el dominio carboxilo terminal se encuentra en la cara intracelular del receptor (13). Un modelo de la estructura del receptor GRIN1/GRIN2 se muestra en la **Figura 1**. Los receptores NMDA en condiciones normales están bloqueados por Mg^{2+} y las probabilidades de apertura del canal dependen del voltaje de la membrana plasmática en las células.

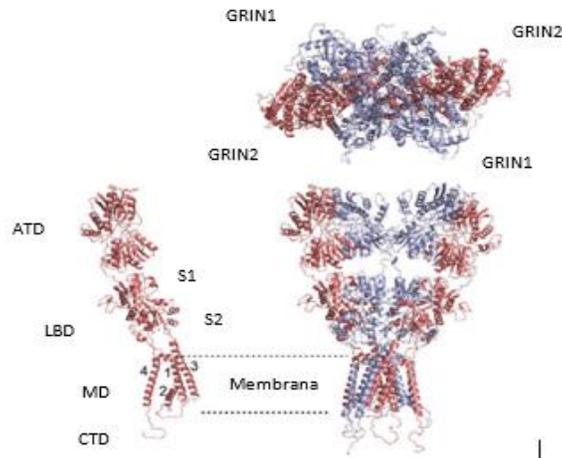


Figura 1. Modelo del receptor GRIN1/GRIN2. Izquierda: Organización de una subunidad, dos dominios extracelulares, el dominio amino terminal ATD y el dominio de unión a ligando LBD compuesto de S1 y S2 conectados al canal iónico formado por cuatro hélices transmembranales (MD) comunicadas con el dominio carboxilo terminal CTD. Derecha: Modelo tetramérico del receptor, subunidades GRIN1 en azul y GRIN2 en rojo. Adaptado de Vyklícky y colaboradores, 2014. (13).

Los receptores NMDA compuestos por las subunidades GRIN1 y GRIN2 tienen sitios de unión a Glu y a glicina (Gly); el sitio de unión a Glu se encuentra en la subunidad GRIN2 y los sitios de unión a Gly, en la subunidad GRIN1. La ocupación de los sitios de unión a Gly en la subunidad GRIN1 es requerida para la activación del receptor por Glu o NMDA. Las afinidades de Gly reportadas para los sitios de unión en la subunidad, se encuentran en un rango de entre 0.1 a 3 μM . La concentración de Gly extracelular varían entre regiones en el cerebro y se encuentran en un rango micro-molar bajo (concentraciones suficientes para saturar el sitio de unión en el receptor); en el fluido cerebro espinal (FCE) la concentración reportada es $4.2 \pm 1.6 \mu\text{M}$, y no existen datos respecto a la concentración de Gly en la hendidura sináptica (14,15). Las moléculas D-serina, L-serina, D-alanina y L-alanina son coagonistas de los receptores NMDA (GRIA1/GRIA2B), y el aminoácido D-serina es el principal coagonista de los receptores NMDA de localización sináptica; la EC_{50} para la acción coagonista de D-serina es de $0.65 \mu\text{M}$, mientras

que la a EC_{50} para L-Glu determinada en receptores NMDAR (GRIA1/GRIA2B) es de 2.9 μM (16,17).

Los receptores AMPA (GRIA) son estructuras tetraméricas de localización postsináptica compuestos por las subunidades GRIA1, GRIA2, GRIA3 y GRIA4; las subunidades del receptor comprenden 900 aa aproximadamente y son producto de diferentes genes que presentan un 70% de homología de secuencia (18). Todas las subunidades del receptor existen como dos variantes de corte y empalme alternativo, y el cambio en las variantes afecta la cinética de desensibilización de los receptores (19,20). Cada subunidad GRIA contiene tres dominios transmembranales, un asa reentrante, un dominio N-terminal extracelular y un C-terminal intracelular. El dominio de unión a ligando se encuentra en la región N-terminal y el asa saliente entre los dominios transmembranales M3 y M4 (18).

Figura 2. Los receptores AMPA son canales iónicos permeables a iones Na^+ y K^+ principalmente, y median la respuesta postsináptica rápida inmediata a la liberación de Glu, su cinética de activación por la unión del neurotransmisor se encuentra en una escala de tiempo de los sub milisegundos y produce despolarización rápida de la neurona postsináptica que resulta en propagación de impulsos entre las células nerviosas y la activación de los receptores NMDA (21).

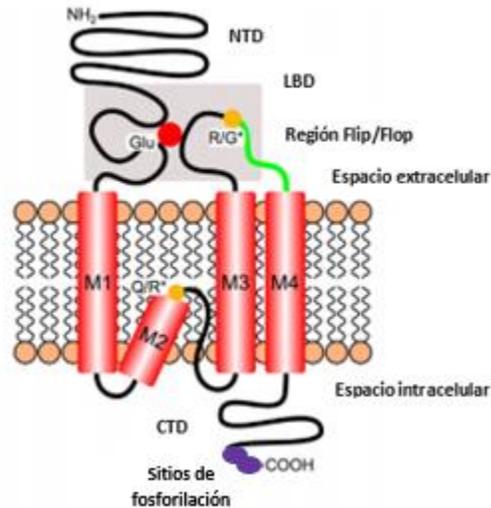


Figura 2. Estructura secundaria de las subunidades GRIA. El dominio de unión a ligando (LBD) mostrado en el recuadro gris, se encuentra en el N-terminal (NTD) y el asa entre M3 y M4. La variación por corte y empalme alternativo que ocurre en la región Flip/Flop (en verde) resulta en cambio del aminoácido arginina (R) a glicina (G), dando dos variantes para cada secuencia de subunidad. La edición en la región M2 solo ocurre en la subunidad GRIA1, la mayoría de las subunidades GRIA1 contiene arginina (R) en vez de glutamina (Q) y baja permeabilidad a Ca^{2+} . El C-terminal (CTD) de la mayoría de las subunidades GRIA contiene sitios de unión a proteínas de la densidad post sináptica y sitios de fosforilación a diferentes proteínas cinasas (CaMKII, PKC, PKA y Src) ejemplificados en morado. Adaptada de Freudenberg y colaboradores, 2015. (22).

Las subunidades GRIA son abundantes y están ampliamente distribuidas en el SNC, su expresión es regulada durante el desarrollo y su expresión es diferencial (23), fluctúan respecto a su localización celular y su inserción a la membrana postsináptica es dependiente de actividad, su vida media en la membrana postsináptica es de 15 minutos. Un 60 al 70% de los GRIA tienen localización intracelular (24). Las células gliales expresan receptores AMPA (25).

Los receptores que contienen la subunidad GRIA2, son impermeables a Ca^{2+} debido a la edición constitutiva (glutamina/arginina [Q/R]) de su mRNA y por lo tanto son permeables a iones Na^+ (26). Los receptores que no contienen la subunidad GRIA2 son permeables a Ca^{2+} . Las subunidades de los GRI contienen cuatro dominios: un dominio amino terminal (ATD) un dominio de unión a ligando (LBD), ambos

localizados extracelularmente, un dominio transmembranal (TMD) y el dominio intracelular (CTD). El ensamblaje de las subunidades GRIA depende de los dominios estructurales ATD, LBD y TMD; el dominio amino terminal es responsable de la formación de dímeros inestables, la asociación de dímeros se genera entre las regiones ATD mostradas en la **Figura 3.**, y los dominios transmembranales facilitan la formación del tetrámero TMD (27). El estado de fosforilación y proteínas accesorias pueden regular a las subunidades GRIA y modificar las respuestas postsinápticas a Glu.

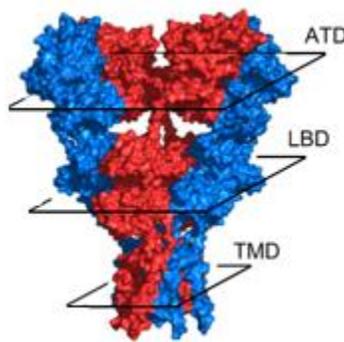


Figura 3. Estructura GRIA2 homomérica obtenida por cristalografía. Tomado de Gan y colaboradores, 2015. (27).

Los receptores tipo Kainato (KARs) fueron identificados por la activación selectiva del agonista kainato y median corrientes postsinápticas respondiendo al neurotransmisor Glu. El canal iónico formado por estos receptores es permeable a iones Na^+ y K^+ y su activación induce su inmovilización en la membrana postsináptica, lo que produce modulación de la plasticidad a corto plazo en las neuronas glutamatérgicas (28). Los receptores tipo Kainato están compuestos por las subunidades GRIK1, GRIK2, GRIK3, GRIK4 y GRIK5. Las subunidades que componen a los KARs están ampliamente expresadas en el cerebro, y muestran patrones diferenciales de expresión en la materia gris. Los KARs postsinápticos participan en la neurotransmisión excitadora, y subunidades específicas de los KARs tienen un papel importante en la cognición, aprendizaje y memoria (29). Se ha propuesto que los KARs participan en el desarrollo cerebral ya que están

presentes en neuronas post mitóticas inmaduras, en este estadio los KARs se postula son extrasinápticos y tienen permanencia extra sináptica después de la maduración, se cree que los KARs pueden contribuir a la regulación del crecimiento dendrítico y a la plasticidad durante el desarrollo (30). Los KARs localizados en terminales gabaérgicas están involucrados en la neurotransmisión inhibitoria en la modulación de la liberación del neurotransmisor GABA (31).

Mediante la auto-radiografía con uso de [³H]-Kainato, se ha demostrado que los sitios de unión a kainato son más abundantes en cerebelo que en cerebro, la proteína a la cual se une el radioligando es la proteína de unión a Kainato (KBP) (32). Selvin y colaboradores mostraron que la unión específica de [³H]-Kainato en el cerebelo de rata aumenta a la segunda y tercera semana de nacimiento, en la temporalidad en que la sinaptogénesis de fibras paralelas ocurre (33). La proteína KBP en el cerebelo se encuentran expresada en la membrana de las células gliales de Bergmann (BGCs), de manera prominente en las membranas de BGCs que rodean las sinapsis establecidas entre las fibras paralelas y las células de Purkinje. La estructura de la proteína KBP tiene cuatro dominios transmembranales (M1-M4) y características de canal iónico; por lo que se cree es una subunidad de los receptores a Kainato (KARs) (34). El Kainato en BGCs obtenidas de cerebelo pollo, *in vitro*, induce influjo de iones Na⁺ que lleva a activación de los intercambiadores Na⁺/Ca²⁺ y Na⁺/H⁺, e incremento en Ca²⁺ intracelular [Ca²⁺]_i (32). Por otra parte, en la preparación de rebanada cerebelar se mostró, haciendo uso del indicador de Ca²⁺ Fura-2, que las concentraciones de [Ca²⁺]_i incrementan en BGC en la presencia de kainato (Müller & Kettenman, 1995); así mismo, en preparaciones cerebelares se ha mostrado que la estimulación (200 μs, 50 Hz) de las fibras paralelas que induce respuestas en las células de Purkinje induce incrementos rápidos en [Ca²⁺]_i en dominios adyacentes a las sinapsis en las BGCs (35).

Los receptores metabotrópicos de glutamato (GRMs) exhiben distribución diseminada en el SNC, son miembros de la clase C de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Ocho tipos diferentes de GRMs (GRM1-GRM8) han sido caracterizados y divididos en tres grupos, grupo I, II y III, de acuerdo con

su homología de secuencia, las vías de transducción de señales que activan y perfil farmacológico (36). Los GRMs consisten en tres dominios, un dominio N-terminal de unión a ligando extracelular (LBD), un dominio transmembranal de siete hélices (TMD) y un dominio rico en cisteínas (CDR) que une a LBD y TM. Los GRMs se ensamblan en dímeros u oligómeros estables, la formación de dímeros es necesaria para la activación de proteínas G y es parcialmente mediada por la formación de un puente disulfuro entre los dominios LBD. La estimulación de los GRMs produce reorientación de los dominios extracelulares y transmembranales y el desacoplamiento de proteínas $G\alpha\beta\gamma$, llevando a incremento de segundos mensajeros mediado por $G\alpha$ y la regulación de canales iónicos por proteína $G\beta\gamma$ (37).

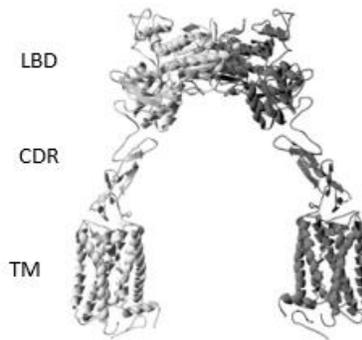


Figura 4. Estructura de los receptores GRM. Organización general de un receptor GRM, deducida de dímeros GRM3. Dominios extracelulares LBD y CDR asociados a dominios de 7 pases transmembranales TM. Tomado de Nicoletti y colaboradores (36) (36).

Los GRMs clasificados en el grupo I (GRM1 y GRM5) son activados por el análogo ácido L-quiscuálico. GRM1 y GRM5 están acoplados a la activación de proteínas $G\alpha_{q/11}$, que estimulan a la enzima fosfolipasa $C\beta 1$ ($PLC\beta 1$), la cual hidroliza fosfoinosítidos en la membrana plasmática, llevando a la formación de 1,4,5-trifosfato (IP3) y a la formación de diacilglicerol (DAG). El IP3 induce la apertura de canales de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico y el incremento de $[Ca^{2+}]_i$. El DAG y el Ca^{2+} activan a la proteína cinasa C (PKC), la cual se ha propuesto modula canales

iónicos y activa diversas proteínas intracelulares como son las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), la fosfolipasa D (PLD) y la fosfolipasa A₂ (PLA₂). Los GRMs pertenecientes al grupo I están extensamente expresados en el SNC y se encuentran principalmente localizados en las postsinápsis y en la zona perisináptica, rodeando a receptores ionotrópicos y modulando la excitabilidad neuronal (38).

Los GRMs clasificados en los grupos II (GRM2 y GRM3) y III (GRM4, GRM6, GRM7 y GRM8) comparten aproximadamente un 70% de homología de secuencia y normalmente inhiben la neurotransmisión glutamatérgica. Están acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ predominantemente y regulan negativamente a la enzima adenilato ciclasa que previene la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). La activación de GRMs acoplados a proteínas G $\beta\gamma$ modulan a canales iónicos dependientes de voltaje. Estos receptores se encuentran localizados presinápticamente y actúan inhibiendo la liberación de Glu y GABA (39).

1.1.3. Transportadores de glutamato

Las concentraciones de Glu en la hendidura sináptica, y los efectos sinápticos que ejerce sobre sus receptores, seguido a su liberación, son rápidamente terminados por acción de transportadores de Glu de alta afinidad pertenecientes a la familia *slc1a*, expresados en neuronas y células gliales. Cinco de estos transportadores: transportadores de aa excitadores (EAATs) han sido caracterizados (EAAT1-EAAT5) y su afinidad de transporte se encuentra en un rango Km de entre 1 a 100 μ M. En el SNC maduro EAAT1 (GLAST) es expresado por células gliales de Bergmann (BGCs) en cerebelo y por células gliales de Müller en la retina, EAAT2 (GLT-1) esta expresado en astrocitos en cerebro principalmente, EAAT3 (EAAC1) en neuronas en cerebro, EAAT4 en neuronas en el cerebelo y EAAT5 en foto receptores y células bipolares en la retina. (40–43). Los EAATs están acoplados funcionalmente a la bomba sodio (Na⁺), potasio (K⁺) ATPasa (Na⁺/K⁺ ATPasa), forman parte de un mismo complejo molecular y utilizan el gradiente electroquímico generado por la Na⁺/K⁺ ATPasa para transportar Glu (44). Los EAATs son

transportadores activos secundarios, el transporte de una molécula de Glu al interior de las células esta acoplado al transporte de 3 iones Na^+ y un ion H^+ y al contra transporte de un ion K^+ , siendo el transporte de Glu por tanto electrogénico (45).

La estructura de los EAATs posee un N-terminal intracelular, ocho dominios transmembranales (TMDs) y un C-terminal intracelular. La región N-terminal y los dominios transmembranales TMD1-6 forman una estructura tipo barril, mientras que el péptido C-terminal está compuesto de dos dominios transmembranales TMD7 y 8, dos asas entrantes son formadas entre TMD 8 y 7 y TMD7 y TMD6, en estas se encuentran los sitios de unión a sustrato y sitios de unión a cationes (46).

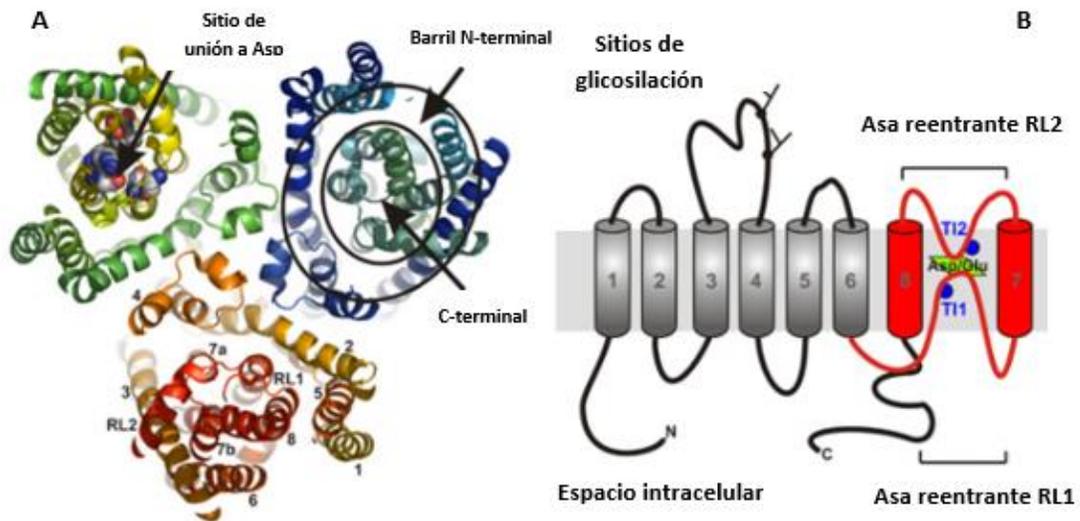


Figura 5. A. Vista superior de la estructura de ensamblaje de GltPh (Transportador en bacterias homólogo a EAATs). Se ejemplifica el barril N-terminal y el C-terminal, el sitio de unión a Asp y las asas reentrantes RL1 y RL2. **B.** Topología transmembranal de los transportadores de aa excitadores EAATs. Se ejemplifican: el dominio N-terminal, TMDs1-6, sitios de glicosilación entre TMD3 y TMD4, dominio C-terminal, TMDs 7 y 8 y asas reentrantes RL1 y RL2 en rojo, sitio de unión a cationes T11 y T12 en azul y sitio de unión a Asp/Glu. Adaptado de Grever y colaboradores, 2008. (46).

EAAT1 (GLAST) y EAAT2 (GLT-1) capturan la mayoría del Glu liberado durante la neurotransmisión excitadora en SNC. La función de ambos transportadores es

esencial para el desarrollo del SNC, la diferenciación y supervivencia neuronal y la migración celular. La inhibición de la expresión de GLAST y GLT-1 *in vitro* e *in vivo* produce niveles extracelulares elevados de Glu, neurotoxicidad y neurodegeneración. (47–49). Mediante inactivación génica constitutiva de GLT1 se ha demostrado que más del 90% de la captura de Glu es mediada por astrocitos en el cerebro anterior (50). Por otra parte, en cerebelo haciendo uso del bloqueador de EAATs, DL-treo-b-benzil-oxi-aspartato (DL-TBOA) se ha demostrado que el bloqueo de los transportadores en BGCs prolonga la permanencia de Glu en las sinapsis establecidas entre fibras paralelas y las dendritas de las células de Purkinje y produce el derrame de Glu a espacios extrasinápticos, activando GRIs y GRMs tanto postsinápticos como extrasinápticos (51).

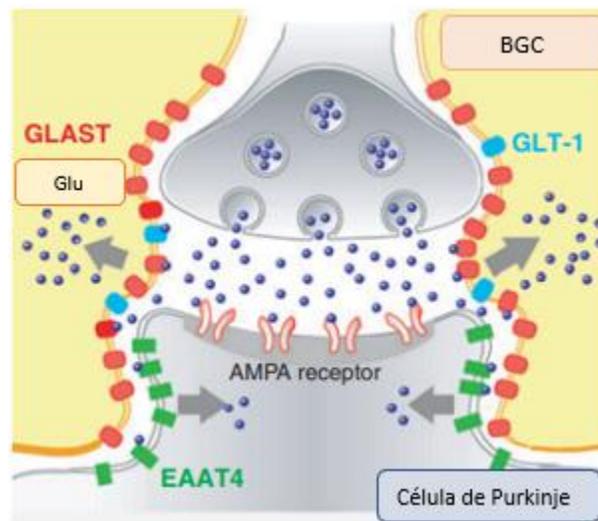


Figura 6. Representación de la localización de los transportadores GLAST, GLT1 Y EAAT4 en una sinapsis entre una fibra paralela y una célula de Purkinje en el cerebelo maduro. Adaptado de Takayasu y colaboradores, 2009. (51).

GLAST y GLT1 son expresados en el cerebelo; las sinapsis excitadoras en la capa molecular del cerebelo se encuentran completamente rodeadas y separadas unas de otras por procesos de las células gliales de Bergmann (BGCs), en estos procesos se expresan GLAST y GLT1, teniendo densidades promedio de 4700 y 740

moléculas por μm^2 en la membrana celular, respectivamente (52). La localización de GLT1 fue reportada en procesos de BGCs, por Danbolt y colaboradores en 1992, GLT1 fue localizado en la vecindad de las dendritas de las células de Purkinje y rodeando procesos de las células granulares en la capa granular del cerebelo de rata. Por otra parte, Rothstein y colaboradores en 1994, haciendo uso de anticuerpos contra dominios putativos del C-terminal de GLT1, mostraron que, en el SNC en rata, GLT1 se encuentra localizado en astrocitos exclusivamente y que es detectable en extractos proteicos de tejido de diferentes regiones cerebrales y cerebelo. En la capa molecular en el cerebelo GLT1 se encuentra localizado en zonas discretas, rodeando a las células de Purkinje (53,54). La disminución en la expresión de GLT1 en BGCs está asociada a mal funcionamiento de las células de Purkinje en modelos de Distrofia Miotónica, en donde afectaciones en la captura de Glu producen hiperactividad neuronal y descoordinación motriz (55).

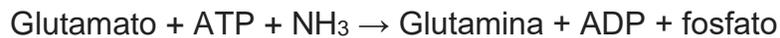
1.1.4. Reciclaje del glutamato

El Glu liberado en las sinapsis es reciclado para mantener la transmisión excitadora entre neuronas. En el reciclamiento participan las células gliales y las neuronas. El reciclaje es llevado a cabo por transportadores de aa excitadores EAATs de localización glial (EAAT1 y EAAT2), la enzima glial glutamina sintetasa (GS), los transportadores gliales SNAT3 y SNAT5, los transportadores neuronales SNAT1 y SNAT2, y la enzima neuronal glutaminasa activada por fosfato (PAG).

Los transportadores de glutamina de localización glial SNAT3 y SNAT5 pertenecen a la familia de genes *s/c38* y exportan Gln al espacio extracelular desde la glía, los transportadores de glutamina SNAT1 y SNAT2, pertenecen también a la familia de genes *s/c38*, tienen localización neuronal, y capturan Gln hacia el espacio intracelular. La enzima PAG sintetiza Glu a partir del precursor Gln (7,56,57).

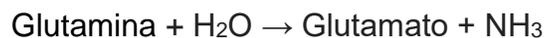
La enzima glutamina sintetasa (GS) es la única enzima en humanos capaz de sintetizar Gln; estructuralmente está compuesta de dos pentámeros en forma de anillo, que forman un decémero. En el SNC está localizada en el citoplasma de

células gliales, y de manera particular, elevadas concentraciones son encontradas en los procesos de células gliales que rodean las sinapsis excitadoras, desde dónde el Glu es capturado al interior de la glía por actividad de los EAATs (58). En el cerebro adulto la GS es expresada por astrocitos (59), en el cerebelo es expresada por las células gliales de Bergmann (BGCs) y en la retina por las células gliales de Müller (60,61); la enzima GS participa en el reciclaje de Glu al catalizar la síntesis de Gln a partir de la condensación de Glu con un ion amonio con utilización de ATP:



La síntesis de Gln mediada por GS en la glía, es necesaria para la formación y reabastecimiento de Glu en las neuronas. Como lo sugirieron Rothstein y colaboradores, la actividad de GS es requerida para la liberación de Glu en las terminales excitadoras; la inhibición de la actividad de GS (51%) por inyección ventricular de metionina sulfoximina (MSO), inhibidor de la GS, causa una disminución del 50% en la liberación de Glu dependiente de Ca^{2+} en tejido estriado de rata, con restablecimiento en la liberación de Glu por infusión de Gln 0.5mM (62), de igual manera, Tani y colaboradores investigaron la participación de la actividad de GS en la neurotransmisión excitadora entre colaterales de Shaffer y axones de la capa cortical 1 en rebanadas de hipocampo; la inhibición de la actividad de GS con MSO produjo una disminución en la liberación de Glu seguida a la estimulación de alta frecuencia, disminución que fue reestablecida por la aplicación de Gln (63).

La enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG) es una amidohidrolasa que cataliza la síntesis de Glu a partir de Gln según la reacción:



En el SNC, PAG está expresada en la materia gris y presenta una Km de 0.6 mM. En el cerebelo la enzima PAG está localizada en las terminales de fibras musgosas y en las terminales de las fibras paralelas. La actividad de PAG ha sido estudiada con el uso del inhibidor 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON), y se ha concluido que en las terminales de las fibras paralelas su actividad es necesaria para mantener el

contenido de Glu durante estimulación sináptica mediante la síntesis de Glu a partir de Gln (64).

1.2. Glutamina

La Gln es el aminoácido más abundante en la circulación sanguínea en el cuerpo, es un constituyente de las vías de metabolismo del nitrógeno, la síntesis del óxido nítrico, es un sustrato energético celular y en el sistema nervioso central es el principal precursor de los neurotransmisores Glu y GABA. La Gln en el cerebro de mamíferos se encuentra en un rango de concentración de 6 a 11 mM. La concentración reportada en astrocitos está entre 7 a 14 mM. En el fluido cerebro espinal (FCE) es de 0.5mM y en los espacios extracelulares se han reportado concentraciones de 0.13 a 0.3 mM (65).

1.2.1. Transportadores de glutamina

La homeostasis de las concentraciones de aa en el cerebro es mantenida por moléculas transportadoras, la mayoría de los aa se encuentran en SNC a 10% aproximadamente de las concentraciones en plasma sanguíneo, excepto la Gln, cuyas concentraciones son similares a las halladas en plasma, pero finamente reguladas en el cerebro (65).

El movimiento de aa a través de las membranas celulares plasmáticas es mediado por proteínas transportadoras que pertenecen a diferentes familias de los acarreadores de solutos (SLCs), 400 genes de transportadores han sido identificados y clasificados en 11 familias SLCs (66).

Los transportadores pertenecientes a las familias de genes *slc1*, *slc7* y *Slc38*, transportan la mayoría de Gln en mamíferos. Los transportadores del sistema ASC (ASCT2 y ATB0) en la familia *slc1* transportan preferencialmente Ala, Ser y Cys en co-transporte de Na⁺ y en anti-porte de aa; los transportadores en la familia *slc7* (LAT1 y LAT2) pertenecen al sistema L, funcionan de manera independiente al gradiente de Na⁺ y transportan los aa Leu, Ile, Met, Val, Cys, aa ramificados (BCH) y aa aromáticos en anti-porte de aa (67,68). En la familia *slc38* los transportadores

que transportan Gln pertenecen a los sistemas A y sistema N; los sistemas A y N utilizan el gradiente electroquímico de Na^+ para transportar aa pequeños (69,70).

1.2.2. Transportadores de glutamina de la familia slc38a

La familia de transportadores SLC38 en humanos está compuesta de once miembros (SLC38a1-11), de estos, siete han sido caracterizados o parcialmente caracterizados (SLC38A1-7) y designados como transportadores de aa acoplados a sodio (SNATs), cuatro transportadores de esta familia permanecen como transportadores huérfanos (SLC38A8-11). Los SNATs han sido divididos en los sistemas A y N, división basada en sus propiedades bioquímicas de transporte y perfil de aa transportables. SLC38A1 (SNAT1), SLC38A2 (SNAT2) y SLC38A4 (SNAT4) pertenecen al sistema A de transporte y SLC38A3 (SNAT3), SLC38A5 (SNAT5) y SLC38A7 (SNAT7) al sistema N de transporte (71).

El transporte mediado por los transportadores del sistema A sufre inhibición por pH bajo, está acoplado a la Na^+/K^+ ATPasa, es dirigido por el gradiente electroquímico de Na^+ y la estequiometría de transporte es un Na^+ por un aminoácido (1:1), co-transporte (72). Los transportadores del sistema A transportan los siguientes aa: SNAT1 transporta Gln, Ala, Ser, Cys, Gly, Asn, Hys, Met, Thr, Pro, Tyr y Val. SNAT2 transporta Gln, Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Asn, Hys y Met. SNAT4 transporta Gln, Gly, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn y Met. El sistema A es inhibido por el compuesto ácido metil-amino-isobutírico (MeAIB). Los tres transportadores clasificados en el sistema A de transporte están codificados por genes anotados en el cromosoma 12. En el SNC, SNAT1 y SNAT2 están expresados en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (69).

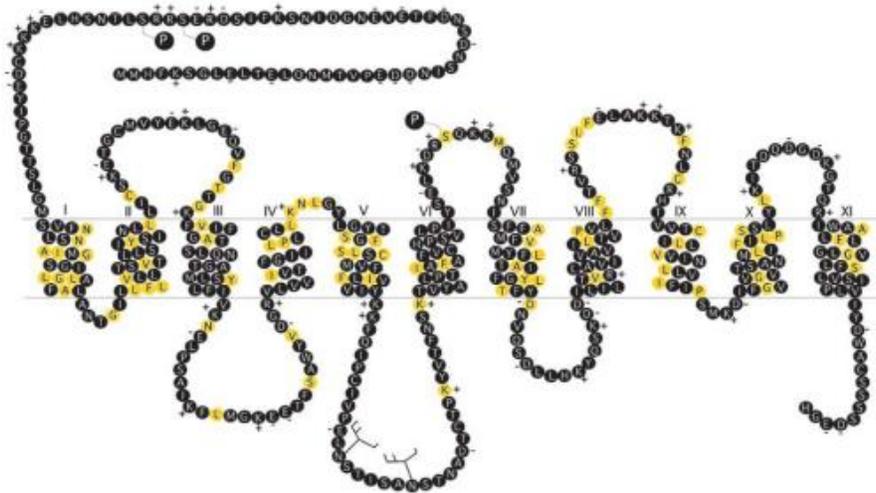


Figura 7. Secuencia de aa y estructura del transportador SNAT1. Once pases transmembranales y los posibles sitios de fosforilación y glicosilación son mostrados. Tomado de Mackenzie y Erickson, 2004 (72) (71).

El transporte mediado por los transportadores del sistema N es dirigido por el gradiente electroquímico de Na^+ y la estequiometría de transporte es un Na^+ por un aminoácido (1:1), co-transporte y contra transporte con un H^+ , generando un mecanismo de transporte electro-neutro. SNAT3 y SNAT5, pero no SNAT7 toleran la sustitución de Na^+ por Li^+ . Los transportadores del sistema N, SNAT3 y SNAT5 transportan Gln, Hys y Asn principalmente, y en SNC se encuentran expresados en astrocitos. SNAT7 transporta Gln, Hys y Ala y se expresa en neuronas GABAérgicas en cerebro (67,73).

1.2.3. SNAT3

La proteína SNAT3 es una proteína integral de membrana codificada por el gen *s/c38a3* (miembro 3 de la familia de acarreadores de solutos), el gen se encuentra localizado en el cromosoma 3. SNAT3 es una proteína transportadora de membrana constituida por 504 aa, con topología de diez pases transmembranales, cinco dominios citosólicos y seis dominios no citosólicos. Es dependiente de sodio y antiportadora de un aminoácido por un protón. Transporta Gln, Hys, Asn y Ala en

co-transporte de Na^+ en dirección tanto hacia el interior de la célula, como al exterior, dependiendo de los gradientes de concentración de los aa sustrato y las concentraciones de iones sodio. El transporte mediado por SNAT3 es tolerante a Li^+ y sensible a pH, y la captura de aa es inhibida por despolarización de la membrana plasmática celular (74).

SNAT3 está expresada principalmente en la retina, en músculo esquelético, en hepatocitos peri-venosos y peri-portales en hígado, en el túbulo proximal en riñón y en el adulto en células gliales y células endoteliales en SNC. En el cerebro y cerebelo se encuentra expresada abundantemente en células gliales en la sinapsis gabaérgicas y en la sinapsis glutamatérgicas (75,76). La expresión de SNAT3 es requerida en el cerebro para la regulación de aa y su pérdida no puede ser compensada. Los ratones mutantes para SNAT3 son viables hasta los veinte días de nacidos y tienen hipoglicemia, crecimiento deteriorado y niveles mayores de Gln y menores niveles de Glu y GABA en el cerebro (77).

Se han reportado ocho posibles sitios de fosforilación en la secuencia primaria en SNAT3 de humano (Ser54, Ser52, Ser47, Ser159, Pro53, Thr150, Tyr160, Tyr330), cinco sitios de ubiquitinación (Lys17, Lys46, Lys51, Lys55 y Lys460) y un sitio de glicosilación (Ala30). Mediante la utilización de rebanadas cerebrales se ha demostrado que en atrociitos de la sinapsis del Cáliz de Held, la expresión de SNAT3 en la membrana plasmática es regulada por PKC en una manera dependiente de caveolina. La activación de PKC con PMA lleva a una reducción en la captura de Gln en estas células (78). La expresión de SNAT3 es regulada también por degradación por la ubiquitina ligasa Nedd4-2. Esto fue demostrado en astrociitos corticales expuestos a Mn^{2+} , la degradación de la proteína ocurre por la vía del proteasoma 26S (79).

La activación de los EAATs y transporte de Glu (0.5mM) en astrociitos corticales de rata produce la liberación de Gln, en una manera sodio dependiente (80), de igual manera en el núcleo medial del cuerpo trapezoide en rata (MNTB), en los astrociitos de la sinapsis glutamatérgica del Cáliz de Held, se demostró que la activación de los EAATs gliales con 200 μM D-Asp produce de manera acoplada la liberación de

Gln desde estas células, y la Gln liberada es secuestrada por neuronas (81). SNAT3 participa en la liberación de Gln desde los astrocitos, la liberación ocurre como consecuencia de la actividad de transporte de los EAATs. La actividad de transporte de los transportadores del sistema N es favorecida a pH entre 7 y 8 y la Km para Gln reportada en astrocitos es de 0.9 ± 0.4 mM. La estimulación por Glu sin embargo no produce un cambio en la transcripción, traducción o un aumento de transportadores SNAT3 en la membrana plasmática celular, se cree que actúa directamente en el transportador (82).

Mediante el uso de inmunoprecipitación y experimentos de colocalización, se ha demostrado en cerebelo de rata que el transportador de aa excitadores GLAST se encuentra asociado a enzimas glicolíticas, proteínas mitocondriales y la ATPasa Na^+/K^+ , formando un complejo macromolecular (4). Así mismo mediante inmunoprecipitación se ha demostrado que la proteína GLAST se asocia también de manera física con el transportador SNAT3 cuando células gliales de Bergmann son estimuladas con L-Glu 1 mM, y que la L-[H^3]-Gln es liberada desde las células gliales por la estimulación de las células con L-Glu o D-Asp (83). En células gliales de Müller de la línea celular MIO-M1 la interacción física de GLAST con SNAT3 ha sido también detectada por inmunoprecipitación después de estimulación con Glu 1mM.

1.2.4. SNAT5

La proteína SNAT5 es una proteína integral de membrana codificada por el gen *s/c38a5* (miembro 5 de la familia de acarreadores de solutos), el gen se encuentra localizado en el cromosoma Xp11.23. SNAT5 es una proteína transportadora de membrana constituida por 472 aa, tiene 62% de identidad con la secuencia de la proteína SNAT3. Se sugiere que la proteína presenta una topología de once pases transmembranales. Es dependiente de sodio y antiportadora de un aminoácido por un protón. Transporta Gln, Hys, Asn, Ala, Ser y Gly, en co-transporte de Na^+ en dirección tanto hacia el interior de la célula, como al exterior, dependiendo de los gradientes de concentración de los aa sustrato y las concentraciones de iones sodio.

La Km para Hys es de 0.6 mM a pH 8. Y la Km determinada para Gln es de aproximadamente 1mM. El transporte mediado por SNAT5 es tolerante a Li⁺ y sensible a pH; SNAT5 no reconoce al compuesto ácido α -metil-amino-Isobutírico (MeAIB) como sustrato (84,85).

SNAT5 está expresada principalmente en el SNC, en el hígado, el estómago, el tracto intestinal, y en el pulmón. La edición génica de *slc38a5* genera diferentes variantes de la proteína, con tamaños diferentes (2.6,2.2, 1.9 y 1.4 kb) que son tejido específicas (84). SNAT5 está expresada ubicuamente en el cerebro y cerebelo, la expresión de la proteína es paralela a la expresión de vGLUT1, vGLUT2 y GLT1, en el adulto SNAT5 está expresada en células gliales (86,87). En la retina, SNAT5 tiene localización glial y neuronal, es expresada en las células gliales de Müller y en las células ganglionares (88).

Se han reportado cuatro posibles sitios de fosforilación en la secuencia primaria en SNAT5 de humano (Pro13, Tyr19, Ser36, Ser372), dos sitios de ubiquitinación (Lys37, y Lys460) y un sitio de acetilación (Lys37). No existen estudios respecto a la regulación de SNAT5. Sin embargo, al igual que para SNAT3, por inmunoprecipitación se ha demostrado que la proteína GLAST se asocia de manera física con el transportador SNAT5 cuando células gliales de Müller MIO-M1 son estimuladas con L-Glu 1 mM.

Trabajos realizados en astrocitos corticales de ratón muestran que el transporte de Gln tiene contribución de los sistemas ASC, A y N; y que la contribución principal la realizan los transportadores SNAT3 y SNAT5. EL uso de inhibición farmacológica del transporte por saturación con los aa Hys y Asp, así como la utilización del compuesto MeAIB y la sustitución de Li⁺ en vez de Na⁺, ha permitido demostrar que los transportadores del sistema N son los principales mediadores del transporte de Gln en este modelo (70). De igual manera Hernández-Castillo determinó en células MIO-M1, la contribución que los sistemas ASC, L, A y N tienen en el transporte de Gln en estas células, y mostró que la mayoría del transporte es mediado por los transportadores del sistema N, SNAT3 y SNAT5.

En astrocitos corticales se ha mostrado que el silenciamiento de SNAT3 y SNAT5 (siRNA), produce un aumento de Gln intracelular de casi cuatro veces más comparado con células controles, y una disminución significativa en la liberación de Gln desde las células, los datos cinéticos en este modelo revelan una disminución en el parámetro V_{max} , mostrándose la importante participación que ambos transportadores tienen en la liberación de Gln en estas células (57).

1.2.5. SNAT2

La proteína SNAT2 es una proteína integral de membrana codificada por el gen *s/c38a2* (miembro 2 de la familia de acarreadores de solutos), el gen se encuentra localizado en el cromosoma 12. SNAT2 es una proteína transportadora de membrana constituida por 504 aa, con topología de once pases transmembranales, seis dominios citosólicos y seis dominios no citosólicos. El N terminal de SNAT2 se encuentra en el citoplasma celular y el C terminal se encuentra fuera de la célula. Es dependiente de sodio, transporta aa en co-transporte de Na^+ en dirección hacia el interior de la célula con una estequiometría 1:1 (89,90). El transporte mediado por SNAT2 es intolerante a Li^+ y sensible a pH, con estimulación de actividad de transporte a pH alcalino. El substrato modelo de este transportador es el ácido α -metil-amino-Isobutírico (MeAIB) (91).

SNAT2 en mamíferos está expresada principalmente en el SNC, en la placenta, corazón, pulmón, tejido adiposo, estómago y musculo esquelético. En el SNC, SNAT2 está localizado en cerebro y cerebelo, en el sistema auditivo, las meninges y la espina dorsal. En la corteza cerebral de rata y de humano SNAT2 está expresado en células ependimarias, en neuronas piramidales y no piramidales, en neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas; SNAT2 está expresado en axones y dendritas, en células gliales de Bergmann en cerebelo (91–93).

SNAT2 tiene tres sitios de N-glicosilación. La expresión de SNAT2 es modulada por hormonas, mitógenos y factores de crecimiento. Los tratamientos hipertónicos causan incremento en la expresión del transportador. La expresión del transportador

y su actividad también es regulada por privación de aa, la cual es conocida como regulación adaptativa. La regulación de la proteína por privación de aa está asociada a la activación de la cinasa GCN2, una serina-treonina cinasa que detecta aumentos en ARNt no cargados y que fosforila a la proteína factor eucariótico de inicio de la traducción (eIF2 α), que suprime la traducción general de proteínas y que favorece la traducción del factor de la traducción ATF4. ATF4 induce la transcripción de *s/lc38a2*. La expresión de SNAT2 es inducida también por los activadores de PKA y PKC, forskolina y PMA. Y los inhibidores de las cinasas previenen la expresión de SNAT2 durante la regulación adaptativa (89,94).

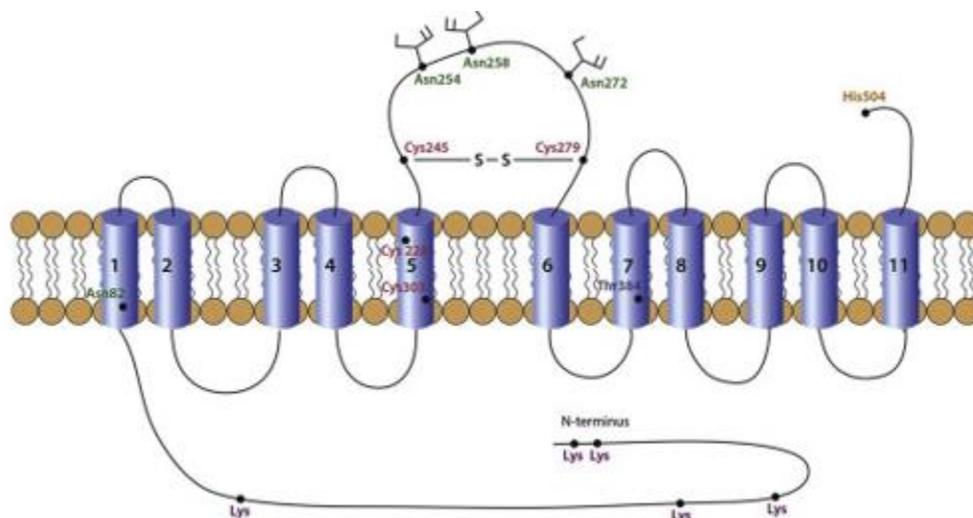


Figura 8. Estructura secundaria del transportador SNAT2. El dominio N-terminal (NTD) se encuentra en la región intracelular y el C-terminal (CTD) se encuentra en el espacio extracelular. La proteína tiene once pases transmembranales (TMDs). Se muestran tres sitios de N-glicosilación. El puente disulfuro establecido entre Cys228 y Cys303 son probablemente parte del dominio transmembranal 5. Las Cys regulan el transporte de la proteína. Asn82 y Thr384 son parte del sitio de unión a Na⁺. El sitio His504 brinda sensibilidad a pH y los residuos Lys en el C terminal son posibles sitios blanco de ubiquitina ligasas para posible degradación mediada por proteasoma. Tomada de R. Menchini y F. Chaudry, 2019. (89).

El uso del compuesto MeAIB que inhibe la captura de aa mediado por el sistema A, SNAT1 y SNAT2, ha permitido mostrar la importancia que este sistema tiene en la captura de Gln en neuronas. En la presencia de MeAIB (10 mM), la captura de Gln

disminuye aproximadamente 23% en rebanadas cerebrales. En células de neuroblastoma la disminución es de 37% (95). El uso del compuesto MeAIB también ha permitido mostrar *in vivo*, que los niveles de Gln incrementan en el espacio extracelular cuando el compuesto es aplicado, muy posiblemente por inhibición de captura en el componente neuronal (96). Por otra parte, en neuronas glutamatérgicas cerebelares granulares, se ha identificado que el transporte de Gln es mediado por los transportadores del sistema A, ASC y L, con una contribución del 54% mediada por el sistema A. En este modelo se determinó que la Km para el transporte de Gln Na⁺ dependiente es de cerca de 0.3 mM, valor que es comparable al de las concentraciones halladas en los espacios extracelulares (56).

1.3. HIPOCAMPO

El hipocampo es la parte del cerebro de los mamíferos que se cree está de manera más directamente involucrada a aspectos relacionados con la memoria y el aprendizaje. También está relacionada con patologías como la epilepsia y la enfermedad de Alzheimer.

La memoria en los mamíferos está dividida en memoria explícita y memoria implícita. En el hipocampo ocurren la memoria y aprendizaje proposicional, o memoria explícita, la información almacenada en el hipocampo puede ser descrita de forma declarativa, como series de enunciados proposicionales. La memoria explícita precisa de recuerdo consciente de sujetos, objetos, lugares y situaciones. Otros tipos de aprendizaje, por ejemplo, el proceso de adquirir habilidades motoras, memorias que involucran a los reflejos, el condicionamiento emocional y memorias que involucran al inconsciente no están relacionados con el hipocampo (97,98).

El hipocampo o formación hipocámpal consiste en tres regiones corticales, el giro dentado, la región del cuerno de Amón CA1-CA3 y el subículo, cada región compuestas de tres capas cada una. El subículo se encuentra entre la corteza entorrinal y el subcampo CA1, y recibe aferencias de éstas dos regiones y envía

proyecciones al núcleo accumbens, la corteza prefrontal, la corteza entorrinal, el hipotálamo y la amígdala. El hipocampo en humanos está situado en la parte anterior del lóbulo temporal medio y tiene forma de bulbo alargado, saliente hacia los ventrículos laterales. Es un componente del sistema límbico, junto con otras estructuras, como lo es la amígdala, la cual está situada en frente del hipocampo. La organización básica de las células en el hipocampo es la misma en todos los mamíferos (99,100). Tiene un gran número de neuronas y un inmenso número de interconexiones. La arquitectura dendrítica y el arreglo de los componentes neuronales del hipocampo determinan su capacidad de codificar información (101). En las espinas dendríticas de las arborizaciones de las neuronas piramidales que conforman el hipocampo es dónde se encuentran la mayoría de las sinapsis excitadoras, las cuales son de naturaleza glutamatérgica. La concentración basal de Glu medida en CA1 es cercana a los 25 nM, la elevación a concentraciones en el rango alto μM de Glu resulta de la exocitosis vesicular; y el transporte del Glu liberado previene la sobreexcitación de receptores post sinápticos (NMDARs) (102–104). La eficacia con la que las sinapsis excitadoras transmiten mensajes puede variar en función de la actividad neural, fenómeno conocido como plasticidad sináptica, en la cual está involucrada la activación de los receptores NMDARs y AMPARs (105). Las modificaciones de la neuro arquitectura ocurren como consecuencia de actividad eléctrica, bloqueo farmacológico y estimulación sensorial; por ejemplo: la estimulación de fibras perforantes producen liberación de Glu en hipocampo con subsecuente reorganización sináptica (101).

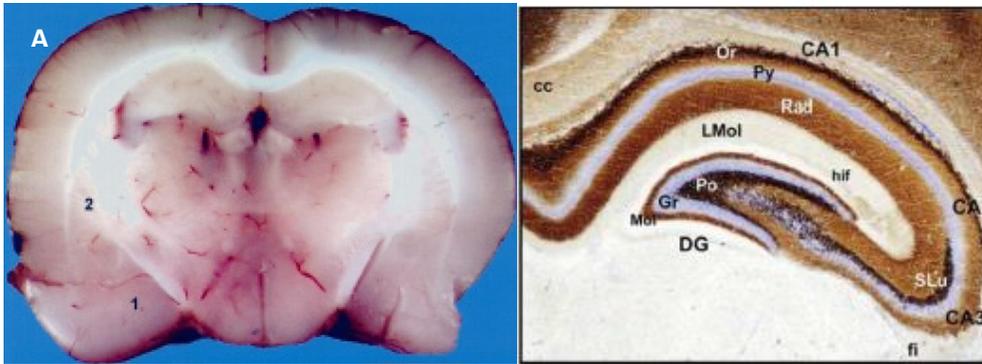


Figura 9. Corte coronal de cerebro de rata. A) Fotografía de un corte coronal de cerebro de rata, se observan la amígdala (1) y el cuerpo estriado (2). B) Sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl. Regiones CA1-CA3 y estratos celulares y fibrosos: Oriens (Or), piramidal (Py), radiado (Rad) y lacunoso molecular (LMol). En CA3, estrato lúcido (SLu). En el giro dentado, justo por debajo de la fisura hipocámpal (hif), capa molecular (Mol), y capa de células granulares (Gr), seguida de la capa polimorfa (Po). fi, fimbria; cc, cuerpo calloso. Tomado de Sánchez-González, 2004. (106).

Los astrocitos en el hipocampo responden a la liberación de Glu. Los astrocitos (CA1) responden a la estimulación eléctrica de las colaterales de Shaffer (50 Hz, 2 seg), incrementos en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos resultan de la activación de GRMs por el Glu liberado neuronalmente. La actividad neuronal resulta en estimulación de GRIs Y GRMs tanto en neuronas como en astrocitos. En el área CA1 en la formación hipocámpal, a diferencia de otras regiones en donde sinapsis excitadoras son establecidas, los procesos de las células gliales, rodean sólo en una cierta proporción la interface sináptica (< 50%), se hipotetiza que las sinapsis que están rodeadas por los procesos de astrocitos en ésta región son las sinapsis activas (107).

En el hipocampo el ciclo glutamato/glutamina supe Gln para la regulación de la transmisión sináptica glutamatérgica; en el hipocampo se expresa de manera abundante la enzima GS, esta expresión soporta la hipótesis del componente glial como soporte metabólico en esta región asociada a la formación de memoria (108–110). En el hipocampo se han medido los mRNA de los componentes del ciclo

glutamato/glutamina: GLAST, GLT-1, GS, PAG, SNAT1, SNAT2 y SNAT3, así como la enzima descarboxilasa del ácido glutámico GAD (111).

En el hipocampo de rata la oxidación de Glu y Gln está compartimentalizada. Las tasas de oxidación fueron medidas por Zielke y colaboradores in vivo por infusión de [¹⁴C]-Glu y [¹⁴C]-Gln, la presencia de [¹⁴C]-Gln determinada en el espacio intersticial cuando [¹⁴C]-Glu es perfundido en el cerebro de ratas, soporta la existencia del ciclo glutamato/glutamina en hipocampo (112). En hipocampo se ha determinado también que el ciclo glutamato/glutamina puede ser alterado en diferentes situaciones patológicas, por ejemplo, por la elevación de amonio en la sangre y por la hipertensión portal (obstrucción de vena portal). En estos casos la actividad de la GS incrementa en el hipocampo y ocurre una disminución en la captura de Glu en fracciones sinaptosomales aisladas (113). La desregulación del ciclo glutamato/glutamina también está asociada en hipocampo a epilepsia y Alzheimer. En la epilepsia el Glu liberado desde la terminales dobla la concentración del que es liberado en situaciones normales y el aclaramiento de Glu disminuye de manera concomitante a los niveles de Gln; en el hipocampo epileptogénico se hipotetiza que el ciclo glutamato/glutamina tiene una tasa baja de funcionamiento que impide el aclaramiento de Glu y que contribuye a la excitotoxicidad (114), la enfermedad de Alzheimer (AD) está caracterizada por déficits cognitivos y daño en la memoria y aprendizaje. En AD hay evidencia de alteración en la expresión de GLT1 en astrocitos y en su actividad de captura; se ha mostrado también que ciertos compuestos pueden mejorar los déficits cognitivos en esta condición al aumentar la expresión y actividad de GLT1 (115).

Mediante el uso de resonancia magnética nuclear (fMRS), se ha mostrado que las concentraciones de glutamato/glutamina (neurotransmisión excitadora), pero no las de GABA incrementan en la corteza prefrontal medial (mPFC), de sujetos, durante la memorización de asociación (memoria episódica) entre nombres y rostros. El incremento de Glutamato/glutamina en mPFC está asociado con conectividad más

fuerte entre mPFC con las regiones del hipocampo y el tálamo, respecto a situaciones control (116).

1.4. CEREBELO

El cerebelo es una masa de tejido nervioso que se encuentra en la parte posterior del encéfalo. Una extensión de la dura madre llamada Tentorium cerebelli, separa el cerebro del cerebelo. El cerebelo está relacionado con la coordinación motora, la postura y el balance, y controla el tono y la actividad muscular voluntaria. Está compuesto de dos hemisferios y los lóbulos anterior, posterior y floculonodular. La materia gris en la corteza cerebelar está compuesta de tres capas, la capa más externa es la capa molecular, la capa intermedia es la capa de las células de Purkinje y la capa interna es la capa de las células granulares. En la corteza cerebelar existen distintos tipos de neuronas que se encuentran distribuidos en las tres capas que conforman esta estructura. Los cinco tipos de neuronas en el cerebelo son las células de Purkinje, las células granulares, las células de Golgi, las células estrelladas y las células en canasta (117,118).

Las células granulares cerebelares están localizadas en la capa interna del cerebelo y son la clase más abundante de neurona en el SNC humano, reciben la principal entrada de información sensorial de las fibras musgosas y tienen axones llamados fibras paralelas que ascienden a la capa molecular; las fibras paralelas bifurcan en la capa molecular para formar ramificaciones en forma de T que se extienden en orientación paralela, formando sinapsis glutamatérgicas con las espinas dendríticas de las células de Purkinje. Los cuerpos celulares de las células de Purkinje se encuentran en la capa intermedia del cerebelo y sus elaboradas dendritas se extienden en la capa molecular, las entradas de información convergen en las células de Purkinje desde fibras paralelas de las células granulares, de fibras trepadoras y de neuronas locales, que son las células en canasta y las células estrelladas. Las células de Purkinje contienen un árbol dendrítico de cerca de 250 μm de ancho, por 300 μm de alto y tiene cerca de 100 000 espinas dendríticas.

Cada célula de Purkinje puede recibir 200,000 inputs de las fibras paralelas e inputs de una fibra trepadora. Las fibras trepadoras modifican la eficacia de las conexiones entre las fibras paralelas y las células de Purkinje, produciendo cambios a largo plazo en la salida de información cerebelar. La salida de información desde las células de Purkinje hacia los núcleos cerebelares representa la única salida de información del cerebelo y es de tipo inhibitoria (gabaérgica) (119–122).

El cerebelo monitorea y ajusta el comportamiento motor y la actividad neuronal en el cerebelo cambia continuamente durante la ejecución de movimientos. El movimiento simple puede generar cambios dinámicos en los patrones de actividad en las células de Purkinje y en las células cerebelares nucleares. La habilidad de coordinar, modular y realizar movimientos suaves se pierde como consecuencia de lesiones en el cerebelo y enfermedades que dañan sus componentes. Las personas que tienen lesiones cerebelares presentan problemas posturales, temblor y dificultad en producir movimientos bien coordinados. De manera adicional a las conexiones que el cerebelo tiene con los córtices motores en el cerebro, también tiene conexiones con el córtex prefrontal y con córtices de asociación, la activación cerebelar ocurre además durante la ejecución de movimientos, durante funciones ejecutivas como el lenguaje, la lectura, la memoria de trabajo, el procesamiento espacial y el procesamiento social/afectivo (123–126).

Las células de la glía radial funcionan como precursores de neuronas y glía y guían la migración celular. En el cerebelo maduro, las células gliales son de tres tipos; oligodendrocitos que se encuentran en la materia blanca, los astrocitos que se encuentran en la capa de células granulares y las células gliales de Bergmann (BGCs), cuyos cuerpos celulares se encuentran en la capa de células de Purkinje. Las BGCs presentan de entre 3 a 6 procesos que ascienden desde sus somas hacia la capa molecular, en donde rodean a las sinapsis establecidas entre neuronas, y terminan en un pie terminal que contacta la membrana basal (127). Las BGCs participan en el reciclamiento del Glu, la homeostasis de iones, la estabilidad estructural de las sinapsis y la plasticidad y función metabólica neuronal. Las BGCs

contribuyen al procesamiento de la información en el cerebelo, las deleciones genéticas de AMPARs (GRIA1 y/o GRIA4) en BGCs afectan el aprendizaje asociativo motor y la coordinación de movimientos finos. Las deleciones producen retraso en la formación de sinapsis glutamatérgicas e incremento en la amplitud y duración de corrientes evocadas en células de Purkinje (128).

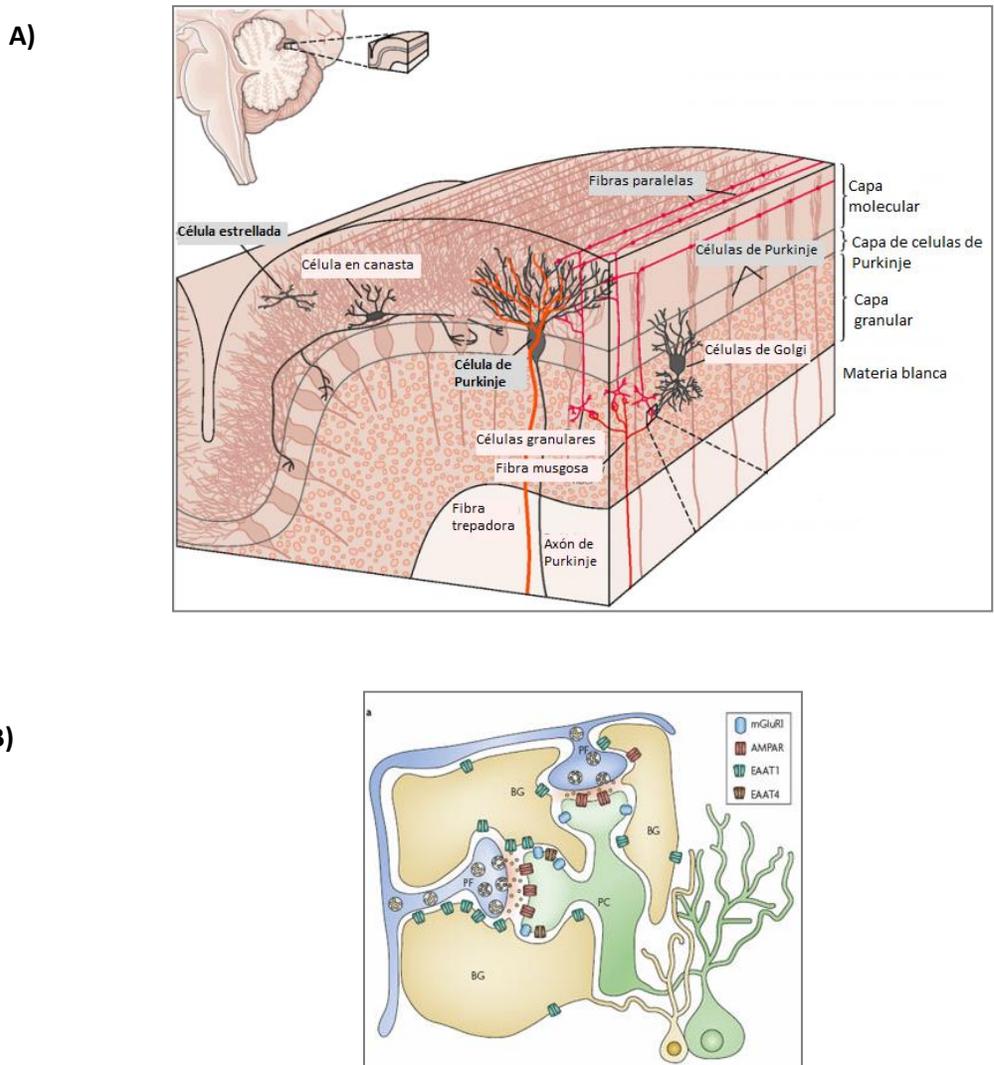


Figura 10. A) Cito-arquitectura de la corteza cerebelar. B) Organización sináptica en la capa molecular del cerebelo. Sinapsis establecida entre una célula de Purkinje (PC) y fibras paralelas (PF) de células granulares; y células gliales de Bergmann CGB. Los contactos sinápticos se encuentran rodeados por BGCs. Ejemplificados también se encuentran receptores mGluR3 y AMPAR y transportadores EAAT1 y EAAT4. Tomada de Tzingounis y Wadiche, 2007. (129).

Las investigaciones llevadas a cabo en el sistema modelo *in vitro* de BGCs obtenidas de cerebelo de pollo, han permitido disecar interacciones neurona-glía. La estimulación con Glu en preparaciones de rebanadas cerebelares o en cultivo celular han proporcionado información respecto a la regulación transcripcional y traduccional de genes importantes para el funcionamiento de la glía. También en este modelo se ha descrito la expresión de transportadores AMPAR y NMDAR, permeables a Ca^{2+} . Y de manera relevante el acople funcional y metabólico que existe entre GLAST y SNAT3 cuando las células son expuestas a Glu. Se ha comprobado además en el modelo de BGCs que el Glu induce la liberación de Gln, (9,83,130); estos y otros hallazgos obtenidos en modelos *in vitro* de células gliales de Müller provenientes de humano, han permitido establecer las bases de estudio sobre las perturbaciones que los neurotóxicos pueden tener en las células gliales y el ciclo glutamato/glutamina.

1.5. CELULAS GLIALES DE MÜLLER

Las células de Müller son uno de los tres tipos de células gliales que se encuentran en la retina, junto con astrocitos y células microgliales; son el principal tipo de células macrogliales y representan el 90% de la glía en la retina. En la retina no vascularizada, las células de Müller contactan y envuelven a las neuronas atravesando todo el grosor de la retina, las células de Müller forman una interfaz entre vasos sanguíneos, neuronas, y espacio sub-retinal, tienen alta conductancia a K^+ en su membrana plasmática y un potencial de membrana de cerca de -80mV, un diagrama de la localización de las células de Müller en la retina se muestra en la **Figura 12**.

Las células de Müller se originan a partir de células de la cresta neural. En la retina metabolizan la glucosa, formando lactato y piruvato, los cuales son utilizados en el metabolismo oxidativo neuronal, participan en el reciclaje de pigmentos, en la detoxificación de amonio, liberan sustancias neuro activas y protegen al tejido contra el estrés oxidativo. Las células de Müller mantienen la homeostasis de iones en el

tejido retinal, y reciclan a los neurotransmisores Glu y GABA, metabolizándolos y formando precursores de los neurotransmisores para su utilización neuronal. Marcadores de expresión de las células de Müller son: EAAT2/GLAST, la proteína de unión a retinaldehído (CRALBP), la enzima glutamina sintetasa (GS), el canal de potasio rectificador subtipo Kir4.1, la acuaporina 4 (AQ4), la enzima piruvato carboxilasa y la anhidrasa carbónica C (131–134).

El reciclamiento de los neurotransmisores GABA y Glu es llevado a cabo por el intercambio de moléculas entre neuronas y células de Müller; GABA Y Glu son capturados por los transportadores EAAT1/GLAST y GAT-3 y metabolizados en las células de Müller. En la retina GLAST/EAAT1 esta enriquecido en los procesos que rodean las sinapsis excitadoras, por ejemplo, en los procesos que rodean a los fotorreceptores (bastones). GABA es convertido a Glu por la enzima glía específica GABA transaminasa (GABA-T) y el glutamato es utilizado para la formación de Gln, la conversión es llevada a cabo por la enzima GS. El aminoácido no excitador Gln es liberado al espacio extracelular, por los transportadores SNAT3 y SNAT5. Un diagrama representativo del reciclamiento de los neurotransmisores en la retina se muestra en la **Figura 11**. (131).

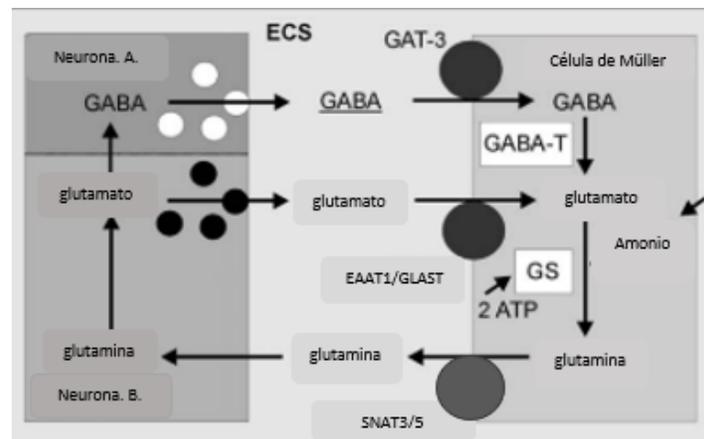


Figura 11. Diagrama representativo del reciclamiento de los neurotransmisores GABA y Glu en la retina. Tomado de Bringmann y colaboradores, 2006 (130) (131).

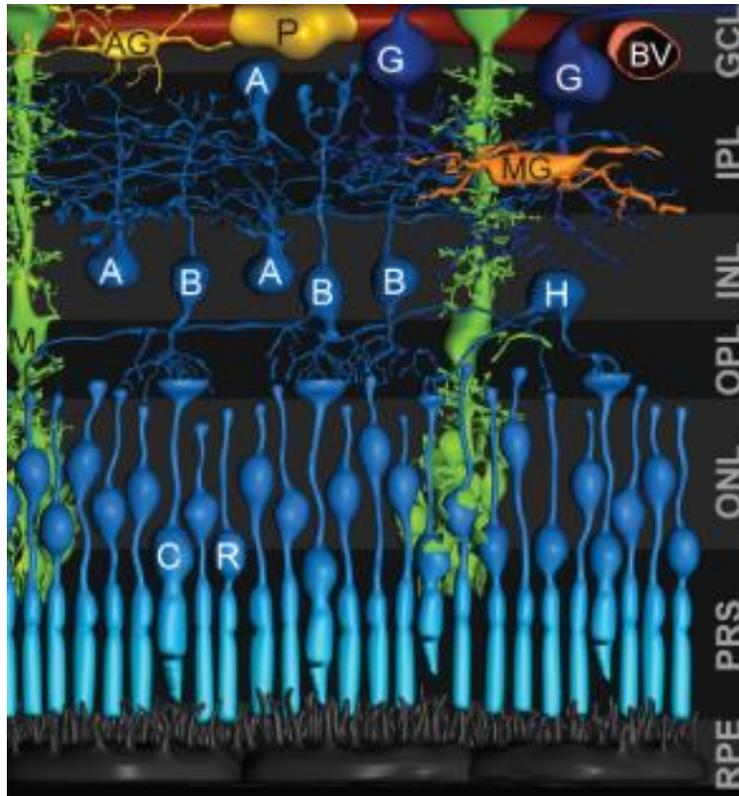


Figura 12. Localización de las células en la retina de humano, Células de Müller en verde (M). Astrocitos (AG) y pericitos (P) en amarillo. Microglía (MG) en naranja. El soma de las células de Müller está localizado en la parte intermedia de la retina, en la membrana nuclear interna (INL). Las células de Müller están en contacto con los vasos sanguíneos y con la superficie interna de la retina. Los procesos de las células de Müller contactan y envuelven los somas de las neuronas en los distintos estratos celulares. Las neuronas están dibujadas en azul: células amácrinas (A), células bipolares (B), células ganglionares (G), células horizontales (H), conos (C), bastones (R). Estratos celulares en la retina: epitelio retinal pigmentario (PRE), segmento de fotorreceptores (PRS), capa nuclear externa (ONL), capa plexiforme externa (OPL), capa plexiforme interna (IPL), capa de las células ganglionares (GCL). Tomado de Reichenbach y Bringmann, 2013 (134). (135).

La expresión y la función de los transportadores SNAT3 y SNAT5 ha sido reportado en células de Müller. En el cultivo de células de Müller de rata rMC1 se demostró la contribución que diferentes sistemas de transporten tienen en el transporte de Gln. Los sistemas expresados en estas células son el sistema N, el sistema A y el sistema L; el transporte mediado por el sistema N es de aproximadamente 70% (88).

El uso de la herramienta farmacológica metionina sulfoximina (MSO) que inhibe a la GS en las células gliales de Müller en la retina ha permitido demostrar que los niveles de Glu y las respuestas fisiológicas a Glu disminuyen cuando está es inhibida y por tanto se ha demostrado la participación de las células gliales de Müller en el reciclamiento del Glu. En la retina las neuronas glutamatérgicas son las células ganglionares y las células bipolares, y Glu es depletado en estas neuronas cuando GS es inhibida (136,137).

Las células de Müller de la línea celular MIO-M1 expresan los transportadores SNAT3 y SNAT5 y estos contribuyen en un 30 % con el transporte de Gln en estas células, siendo los principales mediadores del transporte. La estimulación con Glu y PKA aumentan la expresión de ambas proteínas y la exposición a Glu induce a un acople físico entre EAAT1 y SNAT3/5. El modelo de las células gliales de Müller, tiene los componentes moleculares necesarios para el reciclaje del Glu y las características de acople que han sido mostradas en BGCs y por tanto son un modelo para estudiar los efectos que neurotóxicos tienen en la regulación del ciclo glutamato/glutamina.

1.6. EVITACIÓN PASIVA

El paradigma de evitación pasiva es una prueba de miedo, que se usa para evaluar la memoria a corto y a largo plazo en modelos de roedores. Se usa para evaluar el efecto de desórdenes del SNC en el aprendizaje y memoria, por ejemplo para la enfermedad de Alzheimer (Beta amiloide 25-35), el efecto de sustancias protectoras como las antocianinas y flavonoides, sustancias activadoras de la cognición, fármacos antiepilépticos, fármacos antidepresivos y elementos y sustancias

neurotóxicas (138–141). En esta prueba, los sujetos aprenden a evitar un sitio que supone estar expuesto a un estímulo aversivo o dañino. La memoria de miedo es estudiada por la asociación instrumental entre un ambiente y un estímulo de miedo (descarga eléctrica).

En esta prueba se utiliza una caja que está dividida en dos compartimentos, una compuerta deslizable en medio de la caja separa un compartimento iluminado de otro oscuro. La primera fase de la prueba se llama habituación, en ésta se coloca a los animales en la caja y se les permite explorarla por un tiempo determinado, el ambiente (caja) representa un estímulo neutro. En la siguiente fase, los animales reciben un shock eléctrico (0.4-3 mA) en el compartimento oscuro en la caja, a esta fase se le nombra adquisición. En esta fase se mide la latencia de escape del compartimento oscuro de shock, que suele ser inmediata. Después del escape, los animales son retirados de la caja. El estímulo neutro se vuelve amenazador al recibir una descarga eléctrica, y genera miedo, los animales aprenden a asociar las características del compartimento oscuro en la caja con la descarga eléctrica. La memoria y aprendizaje pueden ser medidos a diferentes tiempos después del entrenamiento, por ejemplo, a las 3, 6 y 24 horas; a la última fase se le llama prueba, y la latencia de entrada desde el compartimento iluminado al compartimento oscuro sirve como una medida de la retención de la memoria y el aprendizaje. La tarea es dependiente de hipocampo (142,143).

La memoria del miedo es formada en el hipocampo, la amígdala basolateral y el córtex prefrontal (144). En el hipocampo ventral y en la corteza prefrontal en la rata los niveles de Glu son 50% mayores que los niveles de aspartato (Asp) y veinte veces más que los del neurotransmisor GABA. Durante la adquisición en la tarea de evitación pasiva, los niveles del Glu aumentan considerablemente en el hipocampo ventral, la administración de tetrodotoxina directamente en el hipocampo vía diálisis reversa previene la liberación del neurotransmisor durante la adquisición, lo que indica una liberación de Glu de neuronas excitadoras en esta prueba conductual (145).

Se ha demostrado que el bloqueo farmacológico de los NMDAR por administración del antagonista no competitivo MK-801 (0.3 mg/kg) 30 minutos antes del entrenamiento de evitación pasiva, daña el aprendizaje pues reduce la respuesta de latencia de entrada al compartimento oscuro en la caja durante la prueba de retención (24h después del entrenamiento), quedando de manifiesto la participación del Glu y sus receptores en la formación de la memoria (146). Así mismo, la infusión de AP5 en el hipocampo y la amígdala, a los 0 min en el entrenamiento y a los 180 min después del entrenamiento en la corteza entorrinal, causa amnesia retrograda en la tarea de evitación pasiva (147). Mediante el uso del agonista ACDP y el antagonista MCPG de los receptores de Glu se ha mostrado que los GRMs en hipocampo regulan la memoria en la tarea de evitación pasiva (148), y que la isoenzima de PKC β I en el hipocampo participa en los eventos sinápticos responsables de la adquisición y consolidación del aprendizaje de evitación pasiva. El bloqueo bilateral de PKC en la región CA1 en el hipocampo por uso del inhibidor CGP 41231 (10 min antes y 50 y 1010 min después del entrenamiento pero no a los 170 min) causa amnesia en el paradigma de evitación pasiva en ratas (149).

1.7. FLUORURO

El flúor (F) es el elemento con número atómico 9 y masa atómica relativa 18,99. Pertenece al grupo de los halógenos, grupo XVII de la tabla periódica. Es el más electronegativo y reactivo de los elementos y por tales propiedades se le encuentra en la naturaleza como fluoruro (F⁻) combinado con otros elementos con excepción del oxígeno, el nitrógeno y gases nobles; en forma elemental es un gas altamente irritante y reactivo (F₂). El F⁻ es el anión inorgánico del elemento flúor y puede actuar como una base y combinarse con un protón para formar fluoruro de hidrógeno (150).

1.7.1. Ocurrencia y fuentes de exposición a fluoruro

El F⁻ tiene una abundancia de aproximadamente 700 ppm en la corteza terrestre y se le encuentra formando compuestos minerales. Las principales fuentes de F⁻ en suelo son los minerales: fluorita (CaF₂), apatita (CaF₂ · 3Ca₃(PO₄)₂), criolita

(Na_3AlF_6) y el topacio (Silicato de Al que contiene F). Las industrias que usan como materia prima materiales que contienen F^- pueden liberar los gases HF y SiF_4 o liberar al F^- en materiales particulados (AlF_3 , Na_3AlF_6 , CaF_2). El depósito húmedo o seco de estas emisiones a las orillas de las industrias aumenta la concentración de F^- en suelo (151,152).

Altas concentraciones de F^- en agua ocurren en diversas regiones del mundo en África, China, medio oriente, el sur de Asia y regiones de América latina y América del norte, debido a la condición geogénica de los subsuelos en donde está contenida. El agua es la principal fuente de exposición a F^- y la organización mundial de la salud recomienda consumir agua que no sobre pase concentraciones de 1.5 mg/L de F^- . No obstante, existen regiones en las que tales niveles son rebasados hasta en más de diez veces. En México, la Norma Oficial Mexicana: NOM-127-SSA1-1994, establece un límite máximo permisible de 1.5 mg/L de F^- en agua para consumo humano, y en la norma NOM-201-SSA1-2002 se establece como límite máximo permisible una concentración de 0.7 mg/L de F^- en agua envasada y en hielo para consumo humano (153).

Todos los alimentos en los que se ha cuantificado el F^- lo contienen en cantidades detectables y cuantificables (154). Las determinaciones de F^- en suero y orina, en conjunto con las cuantificaciones de F^- en agua y alimentos han permitido realizar estimaciones de la proporción de F^- que es ingerida con los alimentos. Según Taves y colaboradores, esta representa un cuarto de la ingesta total diaria (0.4mg de 1.8 mg), (155–157).

Se considera que el F^- a bajas concentraciones tiene efectos benéficos al prevenir la formación de caries dental y por tal motivo, existen países como los Estados Unidos de Norte América en donde se añade F^- a las fuentes de abastecimiento de agua en regiones no endémicas. El F^- es añadido en forma de ácido hexafluorosilícico (H_2SiF_6), fluorosilicato de sodio (Na_2SiF_6) y fluoruro de sodio (NaF). En México, además del agua y los alimentos, otra fuente importante de exposición a F^- es la sal fluorada, la cual tiene una concentración de 612-765 mg de F^- por kg de sal. En la

NOM-040-SSA1-1993 "Sal yodada y sal yodada fluorada" publicada en 1995, se establecen las especificaciones y límites de F^- que debe contener la sal para prevenir la caries dental (158).

La ingestión accidental de productos dentales, de insecticidas y rodenticidas a base de NaF y la exposición a compuestos organofluorados, los cuales raramente liberan F^- bajo condiciones biológicas, son fuentes raras de exposición a F^- (158).

1.7.2. Biomarcadores de exposición y efecto

El moteado de los dientes o fluorosis dental es un biomarcador de exposición y efecto, que refleja la exposición crónica a F^- durante el tiempo de formación del esmalte dental y cuya severidad depende de la dosis y duración de la exposición. En humanos, la fluorosis dental tiene relación directa con la concentración de F^- en plasma, hueso y la concentración en el agua utilizada para beber (159).

1.7.3. Toxicocinética del fluoruro

La toxicocinética del F^- , que comprende su absorción en el organismo, su transporte, distribución, acumulación y eliminación, depende de la vía de exposición y tiempo de exposición. La exposición puede ser oral, inhalatoria y dérmica, y los compuestos que se utilizan para realizar los estudios toxicocinéticos son principalmente el fluoruro de sodio (NaF) y el ácido hidrófluórico; también se han utilizado el fluoruro de calcio y ^{18}F .

1.7.3.1. Absorción

El fluoruro en forma de fluoruro de hidrógeno (HF) se absorbe por vía inhalatoria, en el tracto respiratorio superior principalmente. La distribución del F^- en la sangre es rápida, después de 40 min de exposición, los niveles de F^- detectables en plasma correlacionan con las concentraciones de HF en aire, y los picos máximos de F^- en plasma son detectados a los 60 y 90 min después del inicio de la exposición.

El F^- se absorbe en un 80 a 90% después de ingestión oral a través del tracto gastrointestinal. El tiempo medio de absorción es de aproximadamente 30 min. En el estómago pH (<3.5) predomina la forma de ácido, fluoruro de hidrógeno (HF), que difunde de manera transmembranal a través de los epitelios en respuesta a las diferencias de acidez entre los compartimentos. El coeficiente de permeabilidad de HF es un millón de veces mayor que la permeabilidad del F^- , y la absorción es reducida por la presencia de cationes como el calcio y el aluminio. El F^- que no es absorbido en el estómago es absorbido en el intestino delgado (160,161).

1.7.3.2. Distribución

Después de la absorción el F^- es distribuido a través del torrente circulatorio a órganos y tejidos. El F^- en el plasma no se une a proteínas u otros constituyentes. Los niveles de F^- en plasma varían de acuerdo con los niveles de ingestión y la distribución a órganos y tejidos depende de la irrigación de estos. Los niveles plasmáticos de F^- alcanzan un pico de concentración entre los 30 y 60 min después de la ingestión. La concentración de F^- determinada en plasma sanguíneo es equiparable a las concentraciones en agua y alimentos ingeridos. La concentración del ion en agua es expresada en mg/L y en plasma en $\mu\text{mol/L}$. Si la concentración de F^- en agua es de 1.5 ppm en la sangre la concentración determinada será de alrededor de 1.5 $\mu\text{mol/L}$. Los niveles de F^- decaen en plasma después de los 60 minutos después de la ingestión debido a la distribución, excreción y el depósito en tejidos; la concentración de F^- en las células es de entre 10 a 50 % menor que la concentración en plasma y el depósito ocurre principalmente tejidos calcificados como huesos y dientes, donde se acumula hasta en un 90%. El F^- no se metaboliza en el organismo.

Mediante el análisis de la concentración de F^- en muestras de fluido cerebroespinal (CSF) de humanos endémicamente expuestos, se encontró que el F^- está en un equilibrio dinámico entre la sangre y el CSF y que la concentración en este fluido es similar o ligeramente menor que en la sangre. Presuntivamente el paso del F^- a

través de la barrera hematoencefálica involucra el transporte activo, y se ha sugerido que el paso del ion es similar al transporte de otros halógenos (162).

En un estudio sobre la neurotoxicidad del NaF en Ratas, Mullenix y colaboradores mostraron que el F⁻ ingerido vía oral atraviesa la barrera hematoencefálica y es detectable en diferentes regiones del SNC (hipotálamo, cerebelo, medula oblongata, ganglios basales, corteza e hipocampo) (163). Los experimentos de cinética de distribución de vida corta llevados a cabo con ¹⁸F en rata, llevados a cabo por Whitford y colaboradores, demostraron que es detectable en cerebro después de cinco minutos de su administración (160).

1.7.3.3. Eliminación

El F⁻ es eliminado desde la sangre por excreción en la orina o por depósito en los huesos. El aclaramiento del F⁻ desde el plasma hacía huesos es mayor que la excreción por orina en niños, comparado con la eliminación en adultos (164).

1.7.4. Concentración de fluoruro en sistema nervioso central (SNC)

Como fue demostrado por Inkielewicz y Krechniack en su estudio de exposición subcrónica a F⁻, llevado a cabo en ratas Wistar acerca de la distribución de F⁻ en tejidos blandos, éste puede llegar al cerebro y su concentración incrementa en este órgano en una forma dosis dependiente. En este estudio se subraya que el incremento en la concentración puede explicar el impacto negativo que F⁻ tiene en estructuras cerebrales y en la actividad de muchas enzimas. Es importante mencionar que a las doce semanas de exposición a una concentración de 5mg F⁻ /L, la concentración media encontrada en cerebro fue de $4.63 \pm 0.077 \mu\text{g F}^-/\text{g}$, lo que muestra la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al F⁻ en cerebro (165).

1.7.5. Neurotoxicidad, gliotóxicidad y efectos neuroconductuales

La exposición crónica a F⁻ ha estado asociada a fluorosis, que es un desorden progresivo y degenerativo que afecta diversos órganos. La exposición afecta huesos, dientes, riñón, hígado, SNC y otros órganos y tejidos blandos. Los efectos de la exposición a F⁻ en SNC han sido evaluados en poblaciones, en animales de experimentación y en sistemas reducidos, *in vitro*. Se ha documentado que altos niveles de exposición a F⁻ (3ppm) dañan al SNC, sin producir fluorosis esquelética.

1.7.5.1. Datos en humanos

Los síntomas neurológicos asociados a la exposición crónica a F⁻ son mareo, cansancio excesivo, dolor de cabeza, aletargamiento (166).

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en regiones donde existe alta exposición a F⁻ por consumo de agua contaminada han reportado un aumento en el desarrollo de problemas neurológicos, relacionados con la capacidad cognitiva en niños. La inteligencia y los niveles de F⁻ han sido comparadas entre poblaciones expuestas a concentraciones altas de F⁻ y poblaciones expuestas a concentraciones bajas de F⁻. En la siguiente tabla se resumen los datos encontrados en los estudios más relevantes y la referencia.

Tabla 1. Estudios de la asociación entre exposición y disminución en IQ en niños.

País	Concentración F⁻	Prueba usada y respuesta	Referencia
China N=512 niños 8-13 años	Mediciones en agua. Alta: 2.47 ± 0.79 ppm Baja: 0.36 ± 0.15 ppm Mediciones en orina Alta: 3.47 ± 1.95 ppm Baja: 1.11 ± 0.39 ppm	Prueba IQ Diferencia significativa entre grupos. Las concentraciones más altas de exposición a F ⁻ estuvieron asociadas a retraso mental	(167) Xiang y colaboradores, 2003.
China N=118 10-12 años	Mediciones en agua Alta: 3.15 ± 0.61 ppm Baja: 0.37 ± 0.04 ppm Mediciones en orina Alta: 4.99 ± 2.57 ppm Baja: 1.43 ± 0.64 ppm	Prueba IQ. Test Raven. Diferencia significativa entre grupos. 21.6% de los niños tuvieron puntajes <70 en la escala IQ en el grupo de alta exposición.	(168) Lu y colaboradores, 2000.
India N=190 12-13 años	Mediciones en agua Alta: 5.55 ± 0.41 ppm Baja: 2.01 ± 0.09 ppm Mediciones en orina Alta: 6.13 ± 0.67 ppm Baja: 2.30 ± 0.28 ppm	Prueba IQ Diferencia significativa entre grupos. Una relación inversa fue presentada entre el IQ y la concentración de F ⁻ en orina	(169) Trivedi y colaboradores, 2007.
México N = 132 6-10 años	Mediciones en agua Alta: 9.4 ± 0.9 ppm Media: 5.3 ± 0.9 ppm Baja: 0.8 ± 1.4 ppm	Prueba IQ Una asociación inversa fue observada entre concentración de F ⁻ en agua y desempeño verbal y valores IQ.	(170) Rocha-Amador y colaboradores, 2007.
Iran N= 293 6-11 años	Mediciones en agua Alta: 5.2 ± 1.1 ppm Media: 3.1 ± 0.9 ppm Baja: 0.8 ± 0.3 ppm	Prueba IQ. Test Raven. Los puntajes IQ de los grupos de exposición media y alta fueron menores al del grupo de exposición baja (P=0.001)	(171) Seraj y colaboradores, 2012.
Azerbaijan N= 39 09-12 años	Mediciones en agua Alta: 3.94 ppm Baja: 0.25 ppm	Prueba IQ. RB Cattell test. La media IQ del grupo de exposición alta fue menor (Media ± SD: 81.21 ± 16.17) que la del grupo de exposición baja (media ± SD: 104.25±20.73, p=0.0004)	(172) Karimzade y colaboradores, 2014.

1.7.5.2. Datos en animales de experimentación

Los estudios de toxicidad crónica con animales de experimentación, han demostrado que la exposición a F^- causa cambios en la morfología y estructura del SNC y anormalidades en el comportamiento en los animales expuestos. Shah y Chinoy, mostraron en ratones, que la exposición a 5 mg/kg de F^- produce daños a nivel macroscópico en los hemisferios cerebrales y disminución en los niveles de ADN y ARN; la reducción en DNA y RNA y proteínas en cerebro, cerebelo y medula oblongata son dosis dependientes (173). También se ha registrado daño en ADN en células cerebrales de ratas expuestas y se ha sugerido que los mecanismos por los cuales el F^- está asociado a daño sináptico y disfunción neuronal son los mecanismos de producción de estrés oxidante, producción de radicales libres y peroxidación lipídica (174,175). La exposición a F^- está asociada también a la desregulación de enzimas, a la homeostasis de Ca^{2+} y a la inducción de muerte celular programada en células del SNC (176).

La histología en conejos intoxicados con NaF ha revelado que el cerebelo es blanco de la acción tóxica de la exposición; después de quince semanas de exposición a 20 y 50 mg de F^- /Kg de peso, en el cerebelo se produjo lisis de las células en la en la capa de las células de Purkinje y pérdida de la capa molecular (177). La lisis de células de Purkinje también ha sido documentada en ratas expuestas por 30 días al F^- (178). La neurodegeneración ha sido reportada en el hipocampo de ratones expuestos a F^- , los cuerpos celulares dañados correspondían a las regiones CA3, CA4 y el giro dentado y los cambios estuvieron acompañados por descoordinación motora (179).

El F^- está asociado, en modelos murinos de exposición crónica y subcrónica, a disminución en la habilidad de aprendizaje. Esto ha sido demostrado usando múltiples paradigmas de aprendizaje y diferentes tiempos y concentraciones de exposición. Los resultados de las investigaciones muestran una disminución significativa en las habilidades de memoria y aprendizaje de los animales expuestos,

comparada con los controles y en muchas de estas se asocia también a cambios en la expresión o función de diferentes proteínas (180–182).

1.7.5.3. Datos de estudios *in vitro* en células gliales

Flores-Méndez y colaboradores, en su estudio de la toxicidad de F⁻ en BGCs, documentaron diversas alteraciones: inhibición en la síntesis de proteínas, incremento en los niveles de Ca²⁺ en el citoplasma celular debido a influjo de Ca²⁺ extracelular, e incremento en la actividad de captura de D-Asp del transportador GLAST (183). En estas células la toxicidad está asociada al Ca²⁺ y a modificación en los sistemas de transporte de aa. No existen reportes adicionales que involucren el estudio de los efectos de la exposición a F⁻ en células macrogliales *in vitro*, sin embargo, si los hay respecto a los efectos de la exposición en microglía *in vitro*. Las células de la microglía BV-2 son activadas por la exposición y liberan ROS, y citocinas proinflamatorias (184).

1.8. JUSTIFICACION

El F^- es un neurotóxico que se encuentra de manera natural en altas concentraciones en agua, concentraciones que en ciertas regiones rebasan los límites considerados como seguros para la ingesta. Las poblaciones que se encuentran expuestas presentan diversas afectaciones, principalmente manifestadas como fluorosis. En el sistema nervioso central el F^- está asociado a daño en procesos cognitivos y el aprendizaje y la memoria.

Estudios conductuales y estudios de aprendizaje y memoria llevados a cabo con roedores y en poblaciones expuestas crónicamente han evidenciado los daños producidos por F^- , sin embargo, los mecanismos moleculares de acción por los cuales el F^- causa tales daños no han sido completamente descritos.

En este trabajo evaluamos cambios en proteínas que participan en la transmisión glutamatérgica. *In vitro*, en células gliales de Müller provenientes de la retina de humano.

Las proteínas transportadoras que evaluamos participan en la homeostasis de aa en cerebro y tienen como función fisiológica, la transferencia de glutamina entre astrocitos y neuronas. SNAT3 y SNAT5 como componente glial participan en las sinapsis glutamatérgicas en la vía denominada lanzadera glutamato-glutamina.

1.9. HIPOTESIS

La expresión de las proteínas SNAT3 y SNAT5 y la captura de Gln en células MIO-M1 disminuirá después de la exposición a F^- .

1.10. OBJETIVOS

1.10.1. Objetivo general

Estudiar el efecto que la exposición a F^- produce en la función y expresión de las proteínas SNAT3 y SNAT5 en células MIO-M1 provenientes de retina de humano.

1.10.2. Objetivos particulares

1. Determinar la expresión de las proteínas SNAT3 y SNAT5 en células MIO-M1.
2. Evaluar el efecto de la exposición a F^- sobre el transporte de Gln en células MIO-M1.
3. Evaluar los parámetros cinéticos K_M y V_{max} , para el transporte de Gln en células MIO-M1 expuestas a F^- y en células control.
4. Determinar el efecto del F^- sobre la unión de Gln en la membrana de las células MIO-M1.

2. MÉTODOS

2.1. Reactivos

Los reactivos utilizados para realizar los cultivos celulares fueron de GE Healthcare (Carlsband, CA, USA). Los anticuerpos utilizados para las detecciones de las proteínas de interés fueron: anti-SNAT5 (sc-50680) de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), anti-SNAT3 (#ab211516) y Alexa Fluor 488 (#ab150077) de Abcam (Cambridge, UK). Los anticuerpos secundarios fueron de Abcam y el anticuerpo anti-actina fue donada por el Dr. Manuel Hernández (Cinvestav). El reactivo de quimioluminiscencia (ECL) y los anticuerpos secundarios ligados a peroxidasa de rábano fueron de GE Healthcare (Carlsband, CA, USA). La glutamina tritiada [³H]-L-Gln con actividad específica de 50 Ci/mmol fue de PerkinElmer (Boston, MA, USA) y el reactivo MTT fue de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Cultivo celular

Las células MIO-M1 fueron sembradas en frascos de 25 cm² a una densidad de 5 x 10⁵ células en medio DEMEM con alta glucosa y Glutamax I (Gibco BRL, Cat. 31966-047), con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina y estreptomicina. Las células fueron levantadas de los frascos por la remoción del medio de cultivo y la adición de tripsina-EDTA (5.0 g/L tripsina, 2.0 g/L EDTA, y 8.5 g/L NaCl), con incubación por 3 min a 37°C. La reacción fue detenida por la adición de DMEM con 10% SFB, las células fueron separadas por centrifugación, el pellet fue suspendido en medio DMEM + 10% SFB Y las células fueron sembradas e incubadas a 37°C hasta alcanzar la confluencia requerida para los procedimientos experimentales particulares.

2.3. Inmunocitoquímica

Para el procedimiento de inmunocitoquímica, células MIO-M1 fueron sembradas sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina (0.01 mg/mL) y fijadas con

paraformaldehído al 4% por diez minutos. Las células fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con 0.5% de tritón X-100 e incubadas por una hora con solución de bloqueo (1% de albumina de suero fetal bovino en PBS) para prevenir la unión no específica. Las células fueron expuestas posteriormente a los anticuerpos primarios anti-SNAT3 y anti-SNAT5 por dos horas a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron lavados con PBS/Tritón X-100 e incubados por una hora a temperatura ambiente con anticuerpos fluorescentes secundarios. Los cubreobjetos fueron posteriormente montados sobre portaobjetos utilizando Fluoroshield/DAPI. Las preparaciones fueron examinadas utilizando un microscopio de inmunofluorescencia (Zeiss Axioskop 40 immunofluorescence microscope y el AxioVision software; Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

2.4. Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) fue utilizado para medir la viabilidad celular. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 1×10^6 células por pozo. Los cultivos celulares fueron tratados con NaF o vehículo en medio DMEM por doce horas, después del tratamiento se añadieron 20 μ L de solución MTT a una concentración de 5mg/L a cada pozo, las placas se incubaron cuatro horas a 37°C. EL medio de cultivo fue posteriormente decantado y los cristales de formazán formados por reducción del MTT fueron disueltos utilizando 50 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia de la solución fue medida con un lector de microplacas a 570 nm, usando una longitud de onda de referencia de 630 nm (BioTek Instruments, VT, USA). Se utilizaron cuadruplicados para cada condición experimental y los experimentos fueron llevados a cabo en tres cultivos independientes.

2.5. Ensayo de transporte de glutamina

Las células MIO-M1 fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 1×10^6 células por pozo. Los cultivos celulares fueron lavados con solución A (25 mM HEPES-Tris, 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgCl_2 , 33.3 mM glucosa, y 1 mM NaH_2PO_4 a pH 7.4) para remover las células no adherentes. Las células fueron expuestas a solución A y a NaF disuelto en solución A (25 mM HEPES-Tris, 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgCl_2 , 33.3 mM glucosa, and 1 mM NaH_2PO_4 at pH 7.4) por treinta minutos. Posteriormente se inició la captura de $[\text{}^3\text{H}]\text{-Gln}$ a $t=0$ por la adición de solución A con $0.5 \mu\text{Ci/ml}$ de $[\text{}^3\text{H}]\text{-Gln}$ y 0.2 mM L-Gln. La captura procedió por treinta minutos. La reacción fue detenida por aspiración del medio radiactivo y por lavado de las células con 0.5 ml de solución A fría. Las células fueron posteriormente sujetas a disolución en 0.5 ml de NaOH 1 M por dos horas y la reactividad fue medida por conteo de centelleo. EL contenido de proteína en cada pozo fue determinado con el ensayo de proteínas de Bradford (Bio-Rad, CA, USA) y la radioactividad fue calculada y expresada como: $[\text{}^3\text{H}]\text{-L-Gln}$ pmol/mg proteína min^{-1} . Tres experimentos independientes fueron llevados a cabo, y cada condición experimental en cada experimento se realizó en cuadruplicados.

2.6. Cinética de transporte de glutamina

Las células MIO-M1 fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 1×10^6 células por pozo. Los cultivos celulares fueron lavados con solución A para remover las células no adherentes. Una placa de células sirvió como células controles, estas fueron expuestas por 30 min a solución A y otra placa de células fue expuesta por 30 min a NaF disuelto en solución A. Posteriormente se inició la captura de $[\text{}^3\text{H}]\text{-Gln}$ en ambas placas a $t=0$ por la adición de solución A con $0.5 \mu\text{Ci/ml}$ de $[\text{}^3\text{H}]\text{-Gln}$ y 0.5, 1.5, 3, 5, y 7.5 mM L-Gln. La captura en cada condición procedió por treinta minutos. La reacción fue detenida por aspiración del medio radiactivo y por lavado de las células con 0.5 ml de solución A fría y posterior disolución de las células en 0.5 ml de NaOH 1 M por dos horas. La reactividad fue

medida por conteo de centelleo. EL contenido de proteína determinado y la radioactividad fue calculada. Cada condición experimental fue llevada a cabo en cuadruplicados y se realizaron tres experimentos independientes procedentes de cultivos celulares diferentes.

2.7. Ensayos de unión a radioligando

Las células MIO-M1 fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 1×10^6 células por pozo. Los cultivos celulares fueron lavados con solución A para remover las células no adherentes. Las células fueron expuestas por 30 min a solución A y por 30 min a NaF disuelto en solución A. Posteriormente se inició la unión de $[^3\text{H}]\text{-Gln}$ a $t=0$ a 4°C por la adición de solución A con $0.8 \mu\text{Ci/ml}$ de $[^3\text{H}]\text{-Gln}$ y 0.2 o 5 mM L-Gln, a $t=30 \text{ min}$ la reacción fue parada con la remoción del medio radiactivo. Las células fueron lavadas con solución A fría y expuestas a 0.5 ml de NaOH frío por dos horas. La radioactividad fue determinada por conteo en líquido de centelleo, el contenido de proteína para cada condición fue determinado con el ensayo de proteínas de Bradford y la unión fue calculada por sustracción de la radioactividad obtenida en la condición 5 mM L-Gln + $0.8 \mu\text{Ci/mL}$ $[^3\text{H}]\text{-L-Gln}$ a la obtenida en la condición 0.2 mM + $0.8 \mu\text{Ci/mL}$ de $[^3\text{H}]\text{-L-Gln}$; y expresada como $[^3\text{H}]\text{-L-Gln}$ pmol/mg proteína min^{-1} . Tres experimentos independientes fueron llevados a cabo y cada condición en cada experimento se realizó en cuadruplicados.

2.8. Inmunodetección en fase sólida

Las células fueron tratadas con solución A o con NaF disuelto en solución A. Después del tiempo de exposición, fueron cosechadas con PBS con inhibidores de proteasas (1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro, 1 mg/mL de aprotinina y 1 mg/mL de leupeptina), centrifugadas y los sobrenadantes fueron aspirados. Las células fueron posteriormente lisadas con solución RIPA (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 1 mg/mL aprotinina, 1 mg/mL leupeptina, 1% de NP-40, 0.25% de deoxicolato de sodio, a pH 7.4) con agitación por una hora. Las

concentraciones de proteína en cada condición fueron determinadas con el método de Bradford y aproximadamente 50 µg de proteína fueron resueltos a través de geles SDS-PAGE al 10% y electro transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa fueron teñidas con Ponceau S para confirmar la transferencia de proteínas y el contenido de proteína en cada condición, el colorante fue retirado por lavado con PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ y 1.8 mM KH₂PO₄). Las membranas fueron incubadas por dos horas con TBS con leche descremada al 5% y Tween 20 al 0.1% para bloquear el exceso de sitios de unión a proteína no específicos. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios por doce horas a 4°C y con anticuerpos secundarios por dos horas a temperatura ambiente. La inmuno reactividad fue detectada por quimioluminiscencia con un sistema de imágenes MicroChemi DNR Bio-Imaging. La densitometría fue llevada a cabo con el programa Image J64 y los datos fueron analizados con el programa Prisma 5 GraphPad.

2.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunn. Para analizar los datos cinéticos se usó la prueba F de suma de cuadrados. Datos específicos sobre otras pruebas utilizadas son indicados en los pies de figura. Los análisis fueron realizados con el programa estadístico Prisma GraphPad (La Jolla, CA, USA).

3. RESULTADOS

3.1. Expresión de SNAT3 y SNAT5 en células MIO M1

Imágenes representativas de los cultivos de células MIO-M1 en campo claro son presentadas en la **Figura 13**. La fotografía A muestra el cultivo celular a una confluencia mayor al 80%, las fotografías B y C muestran cultivos a un 70 % de confluencia y las fotografías D, E y F presentan confluencia menor al 50%. Las células crecieron como monocapas adherentes y exhibieron proyecciones citoplasmáticas y morfología bipolar elongada. Los experimentos fueron llevados a cabo cuando las células se encontraban entre un 90% a 100% de confluencia. Para todos los experimentos se mantuvieron constantes las condiciones experimentales.

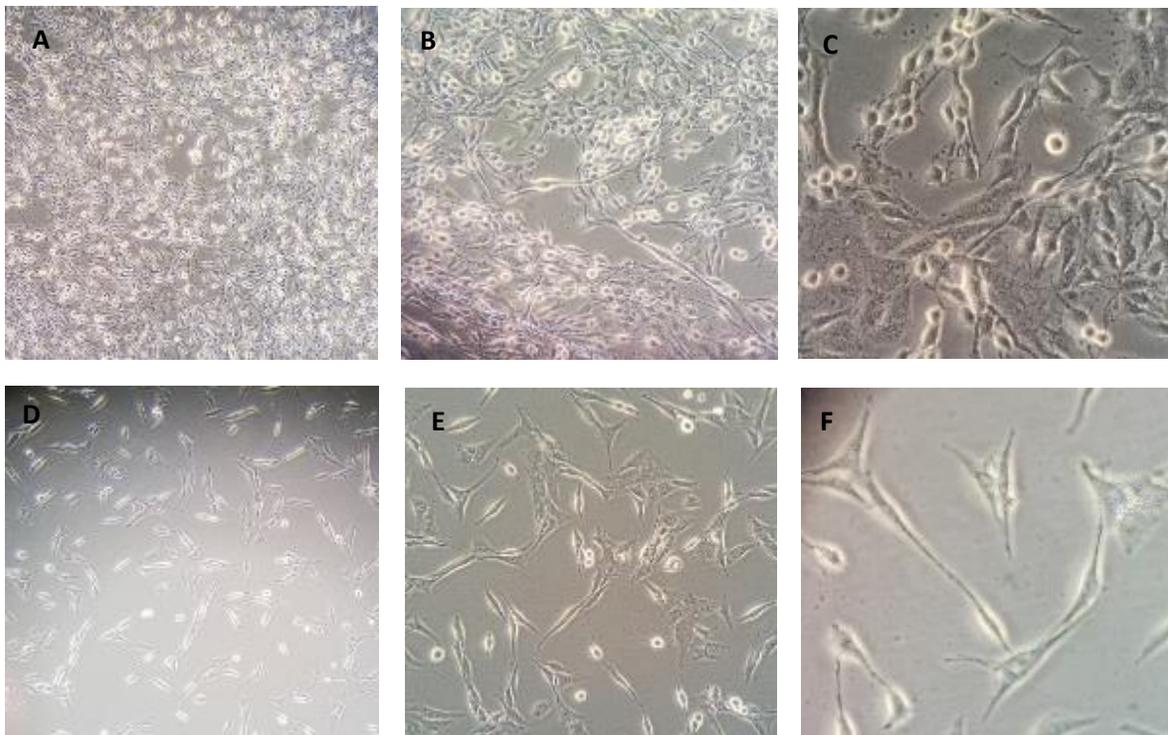


Figura 13. Imágenes de células de la línea celular MIO-M1. A, B y C imágenes de células en cultivo del 70 al 90% de confluencia, magnificaciones 10, 20 y 40X. D, E y F imágenes de células en cultivo a 30% de confluencia, magnificaciones 10, 20 y 40X.

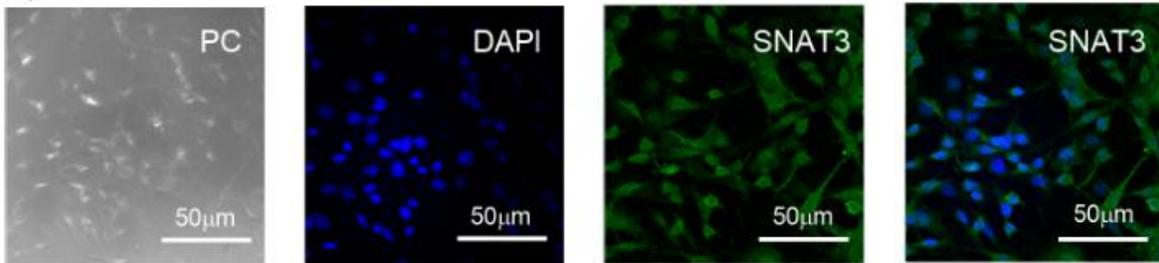
El primer experimento que llevamos a cabo en las células MIO-M1 fue la evaluación de la expresión de las proteínas de interés, SNAT3 y SNAT5, por medio de la inmunodetección. Los resultados se muestran en la **Figura 14**. En trabajos previos realizados en el laboratorio ya se había reportado la expresión de SNAT3 y SNAT5 en esta línea celular, Jeanett Hernández mostró que los niveles de expresión de ambos transportadores eran comparables entre sí y comparables a los niveles de expresión de transportadores expresados en astrocitos corticales de rata y a los expresados en cerebelo de rata y mayores a los expresados en corteza cerebral.

La expresión de ambos transportadores ha sido reportada en otros tipos de células de Müller, de manera específica en el cultivo primario de células de Müller de ratón rMC1. En este tipo de células, la contribución del transporte de Gln mediado por SNAT3 y SNAT5 fue de 70% (88).

a)



b)



c)

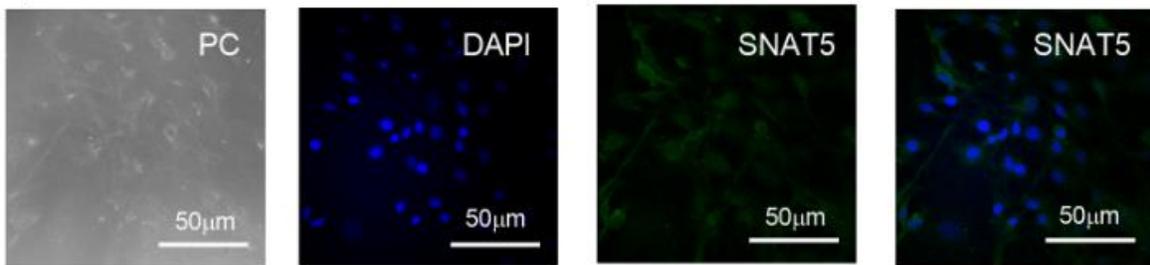


Figura 14. Los transportadores SNAT3 y SNAT5 son expresados en células de la línea celular MIO-M1. a) Extractos proteínicos totales (50µg) fueron analizados por inmunodetección en fase sólida. Una detección representativa es mostrada. b) Caracterización inmunocitoquímica de la expresión de SNAT3. Las células fueron teñidas con anti-SNAT3 (verde) y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). PC: campo claro. C) Caracterización inmunocitoquímica de la expresión de SNAT5. Las células fueron teñidas con anti-SNAT5 (verde) y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

3.2. Efecto de la exposición a F^- sobre la viabilidad celular de las células MIO-M1

En el trabajo sobre el efecto que el F^- ejerce en el control traduccional en el cultivo primario de BGCs llevado a cabo por Flores Méndez y colaboradores, se evaluó la viabilidad celular con la técnica de rojo neutro. Las concentraciones de 1, 2 y 3 mM fueron citotóxicas y la concentración de 500 µM no redujo la viabilidad celular, comparada con los controles (183). En este trabajo encontramos que 500 µM no produce citotoxicidad en las células MIO-M1 cuando estas están expuestas al tóxico

por un periodo de 16 horas, **Figura 15**. Los efectos celulares que F^- tiene sobre la glía ocurren por tanto a otro nivel y no al de muerte celular a esa concentración (500 μM), y fue la utilizada como concentración de exposición en los experimentos en este trabajo.

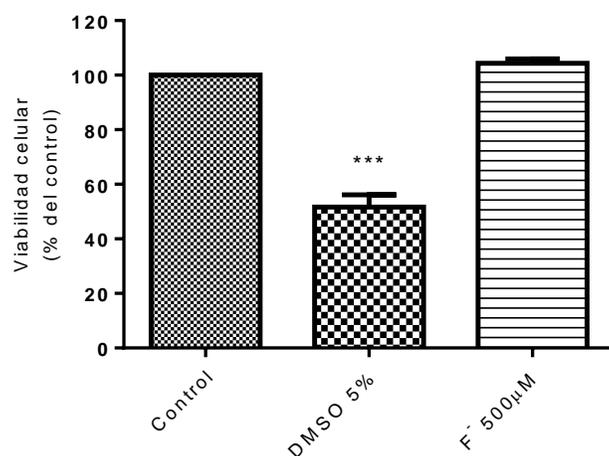


Figura 15. La exposición a F^- no afecta la viabilidad celular. Las células fueron sembradas a una confluencia de 1×10^6 células por pozo y expuestas a vehículo, DMSO y F^- 500 μM . La exposición de las células fue de 16 horas. Los datos están expresados como porcentajes correspondientes a la media \pm DE, tres experimentos independientes fueron llevados a cabo en cuadruplicados. Los datos fueron analizados con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y prueba *post hoc* de Dunn; *** $P < 0.001$.

3.3. Efecto del F^- en la captura de [3H]-Glutamina en células MIO-M1

La exposición de las células MIO-M1 por 30 min a F^- produjo una disminución en la actividad de transporte de Gln en las células, el transporte disminuyó un 22%, los resultados son mostrados en la **Figura 16**.

Al observar la reducción en la actividad de transporte de Gln en las células MIO-M1 expuestas a F^- , planteamos establecer las posibles causas de tal disminución. Las posibilidades de la reducción en el transporte pudieron ser debidas a: a) una interacción directa de F^- con las moléculas transportadoras SNAT3 y SNAT5 que

modificara la captura del Gln, b) una reducción en la afinidad de transporte, c) una reducción en la cantidad de moléculas transportadoras insertadas en la membrana plasmática celular, d) una reducción en la expresión de los transportadores o un aumento en la degradación de los transportadores.

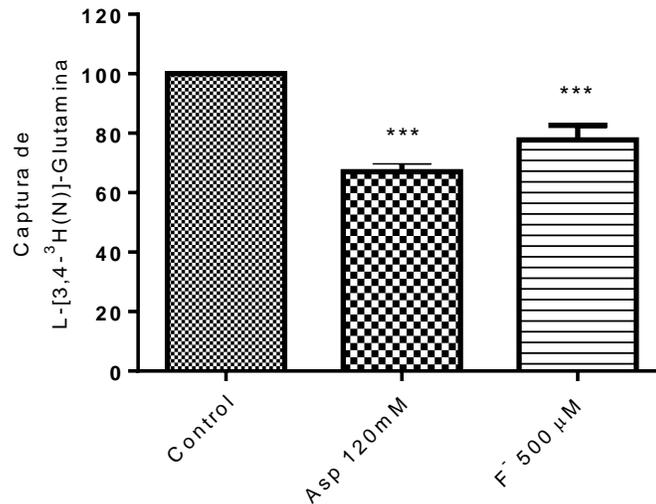


Figura 16. La exposición a F⁻ disminuye la captura de [³H]-L-Gln. Las células fueron sembradas a una confluencia de 1x10⁶ células por pozo y expuestas 30 min a solución A, Asp 120 mM en solución A y F⁻ 500 μM en solución A. La captura de Gln fue llevada a cabo a temperatura ambiente por 30 min. Los experimentos fueron realizados en cuadruplicados, y corresponden a tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y prueba *post hoc* de Dunn; ***P<0.001.

Flores-Méndez y colaboradores, documentaron que la exposición a F⁻ en CGB no modifica la captura de Gln en estas células. En contraste en MGCs encontramos una reducción significativa en la captura. Los resultados diferentes en ambos tipos de glía sugieren que no existe una interacción directa del ion con los transportadores durante la exposición, pero que la preincubación con F⁻ produce cambios intracelulares que posteriormente generan cambios en la actividad de los transportadores. El F⁻ puede tener diferentes blancos intracelulares o cinética de activación diferencial en cada tipo celular. La no interacción directa de F⁻ con SNAT3 y SNAT5 en este trabajo es apoyada por la demostración de que el intercambiador

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ está involucrado en la reducción de la captura de Gln y que antes que los SNAT3/5, éste es blanco de la exposición. EL uso del bloqueador del intercambiador KBR permitió demostrar este hecho.

En un experimento adicional demostramos que la interacción directa de F^- con los transportadores en las células, no produce diferencias en la captura de Gln, respecto a células sin exposición a F^- . En este experimento no encontramos diferencias estadísticamente significativas a tiempos de captura de 3, 6, 12, 15 y 30 min, entre células tratadas y no tratadas. La captura fue lineal en los tiempos probados, **Figura 17.**

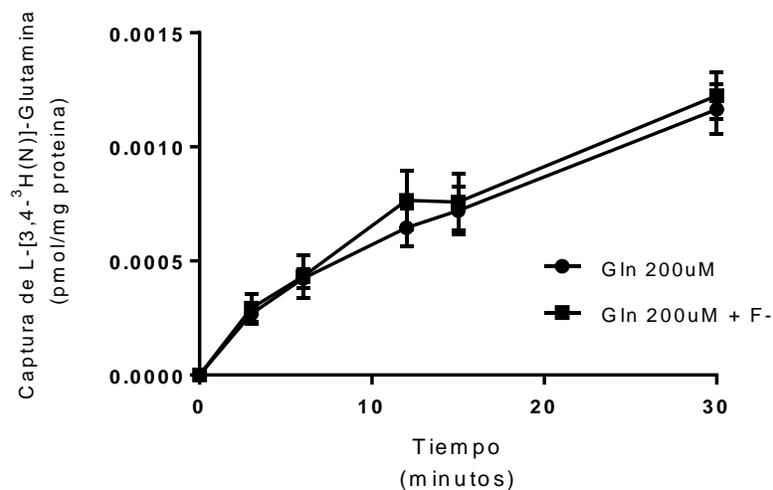


Figura 17. Efecto del F^- sobre la captura de Gln a diferentes tiempos (3,6,12,15 y 30 min). Se realizaron los experimentos utilizando dos cajas de 24 pozos. Las células fueron sembradas a una confluencia de 1×10^6 células por pozo y una caja fue expuesta a solución A + $[\text{3H}]\text{-Gln}$ + 200 μM Gln (Control) y la segunda caja fue expuesta a solución A + $[\text{3H}]\text{-Gln}$ + 200 μM Gln + F^- 500 μM (Exposición) a diferentes tiempos. La captura de Gln fue llevada a cabo a temperatura ambiente. La media \pm SEM de cuadruplicados por condición de un experimento fueron graficados. La prueba T para datos no pareados fue utilizada para comparar los sets de datos y los datos fueron analizados usando la prueba de Holm-Sidak. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre medias de las condiciones experimentales, con alfa = 0.05.

3.4. Efecto de la exposición a F^- sobre la cinética de transporte de glutamina

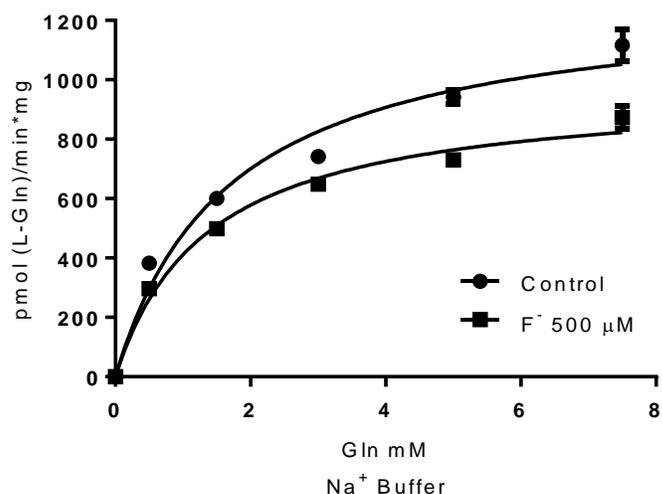
Habiendo determinado que la exposición a F^- disminuye en un 22% la función de transporte de Gln en las células MIO-M1, establecimos que el efecto del F^- no es debido a la muerte celular ni tampoco a una interacción directa de F^- con los transportadores en la membrana plasmática celular. Por ello, procedimos a evaluar los parámetros cinéticos de transporte, K_M y V_{max} de los transportadores en presencia y ausencia del F^- .

En los experimentos para determinar la cinética tipo Michaelis Menten, se realizó la captura en presencia de Na^+ y captura en presencia de Li^+ (por sustitución de Na^+); la captura en presencia de Na^+ representa el transporte total de Gln, y en presencia de Li^+ representa el transporte mediado por los transportadores SNAT3 y SNAT5. En esta cinética, el parámetro K_M es la concentración de sustrato a la cual la reacción llega a la mitad de la V_{max} ; K_M muestra la afinidad (concentración) del transportador para transportar su sustrato. El parámetro V_{max} representa la tasa máxima de transporte alcanzada por el sistema que ocurre a concentraciones saturantes; cuando entre diferentes condiciones experimentales, la V_{max} muestra diferencias, indica una diferencia en la cantidad de moléculas transportadoras en la superficie de la membrana plasmática celular.

Nuestros resultados en los experimentos en presencia de Na^+ , presentados en la **Figura 18**, mostraron que la cinética de transporte correspondiente a la captura total de Gln no fue modificada por la preexposición de las células a F^- (30 min, 500 μM); la V_{max} en las células expuestas a F^- , disminuyó significativamente, comparado con la V_{max} de las células control. Estos resultados indican que el número de moléculas transportadoras de Gln en la membrana plasmática disminuye por la exposición a F^- .

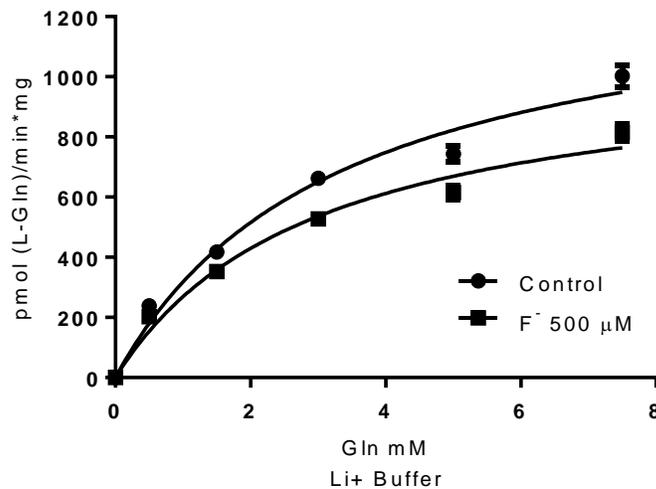
Para discernir si las moléculas que disminuyen en cantidad en la membrana plasmática celular son los transportadores pertenecientes al sistema N de transporte, realizamos la cinética en presencia de Li^+ , pues se conoce que los transportadores del sistema N pueden transportar Gln en presencia de este ion por sustitución de Na^+ . Los valores obtenidos en esta condición mostraron que las

cantidades de SNAT3 y SNAT5 disminuyen significativamente en la membrana plasmática debido a la exposición a F^- , y la reducción es comparable a la reducción en el transporte de Gln total. **Figura 19**. Lo cual indica que el efecto del F^- sobre los transportadores SNAT3 y SNAT5, es responsable de la disminución en el transporte total de Gln.



Na ⁺ buffer	NS	F ⁻
V_{max} (pmol/min*mg)	1288±55	973±29 ****
K_m (mM)	1.7±0.22	1.4±0.13

Figura 18. La exposición a F^- en presencia de Na^+ disminuye la V_{max} de transporte de glutamina. Se realizaron los experimentos utilizando cajas de 24 pozos. Las células fueron sembradas a una confluencia de 1×10^6 células por pozo y las células control fueron expuestas 30 min a solución A, las expuestas fueron tratadas con solución A y F^- 500 μM por 30 min. La captura de $[^3H]$ -L-Gln fue llevada a cabo a temperatura ambiente por 30 min a concentraciones de L-Gln de 0 mM, 0.5 mM, 1.5 mM, 3 mM, 5 mM y 7.5 mM. Fueron graficados la media \pm SEM de tres experimentos independientes, cada condición experimental fue llevada a cabo en cuadruplicado. La cinética de transporte fue determinada por regresión no lineal con el programa Prisma GraphPad. El análisis estadístico utilizado para comparar los datos fue la prueba F de suma de cuadrados; $P < 0.0001$.



Li ⁺ buffer	NS	F ⁻
V_{max} (pmol/min*mg)	1364±81	1066±59****
K_M (Mm)	3.3±0.45	2.97±0.39

Figura 19. La exposición a F⁻ en presencia de Li⁺ disminuye la V_{max} de transporte de glutamina. Se realizaron los experimentos utilizando cajas de 24 pozos. Las células fueron sembradas a una confluencia de 1x10⁶ células por pozo y las células control fueron expuestas 30 min a solución A, las células expuestas fueron tratadas con solución A y F⁻ 500 μM por 30 min. La captura de [³H]-L-Gln fue llevada a cabo a temperatura ambiente por 30 min a concentraciones de L-Gln de 0 mM, 0.5 mM, 1.5 mM, 3 mM, 5 mM y 7.5 mM. Fueron graficados la media ± SEM de tres experimentos independientes, cada condición experimental fue llevada a cabo en cuadruplicado. La cinética de transporte fue determinada por regresión no lineal con el programa Prisma GraphPad. El análisis estadístico utilizado para comparar los datos fue la prueba F de suma de cuadrados; P<0.0001.

3.5. Efecto del F⁻ sobre la unión de [³H]-Glutamina a la membrana celular

Para confirmar el hallazgo encontrado en los experimentos de cinética de transporte, que sugieren una reducción en el número de moléculas transportadoras en la membrana plasmática, realizamos experimentos de unión de [³H]-Gln a la membrana plasmática de las células. En los ensayos de unión de radioligando se miden las interacciones entre moléculas, en este caso la interacción entre [³H]-Gln

y transportadores, para estimar la afinidad entre los reactantes. Este ensayo es cuantitativo, y permite calcular un número que describe la afinidad. En este tipo de experimentos, las concentraciones de uno de los reactantes, el ligando [^3H]-Gln es variable, para calcular la unión específica. La unión de ligando puede medirse en preparaciones de membranas celulares aisladas o en células intactas, en este caso medimos la unión en células intactas. La unión de radioligando a diferencia de la captura, se lleva a cabo a 4°C . Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 20**. y muestran que hubo menos interacciones entre [^3H]-Gln y sus sitios de unión en la membrana plasmática en las células expuestas a F^- , corroborando los datos obtenidos en los experimentos de cinética de transporte.

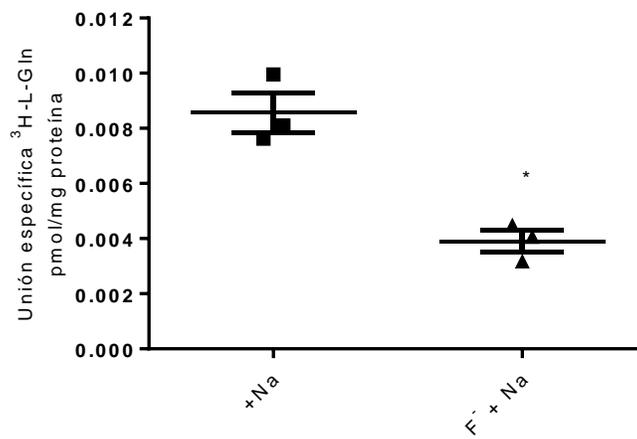


Figura 20. La exposición a F^- reduce la unión de [^3H]-L-Gln en células MIO-M1. Se realizaron los experimentos utilizando cajas de 24 pozos. Las células fueron sembradas a una confluencia de 1×10^6 células por pozo. Las capas confluentes de células MIO-M1 fueron incubadas con solución A o $500 \mu\text{M}$ de F^- en solución A durante 30 min. La unión fue llevada a cabo a 4°C . Los datos están expresados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados en cuadruplicados. El análisis estadístico utilizado fue la prueba t para datos no pareados (* $P < 0.05$).

3.6. Efecto de la exposición a F^- en la expresión de los transportadores SNAT3 y SNAT5

Habiendo mostrado que la exposición a F^- 0.5 mM no produce muerte celular, que reduce el transporte de Gln en las células MIO-M1 y produce una disminución de transportadores SNAT3 y SNAT5 en la membrana de las células después de los 30 min de exposición, decidimos evaluar si la expresión de SNAT3 y SNAT5 era modificada en extractos totales de proteínas obtenidas después de la exposición por 30 min, e incluimos otro tiempo de evaluación, los 60 min. Encontramos que la exposición 500 μ M de F^- produce una disminución estadísticamente significativa en los niveles de proteína SNAT3 y SNAT5, a los 60 min de exposición, comparadas con respectivos controles. Los resultados se muestran en la **Figura 21**. Los hallazgos presentados en este trabajo son los primeros que muestran que la exposición a F^- disminuye la cantidad de proteínas transportadoras de Gln en células gliales.

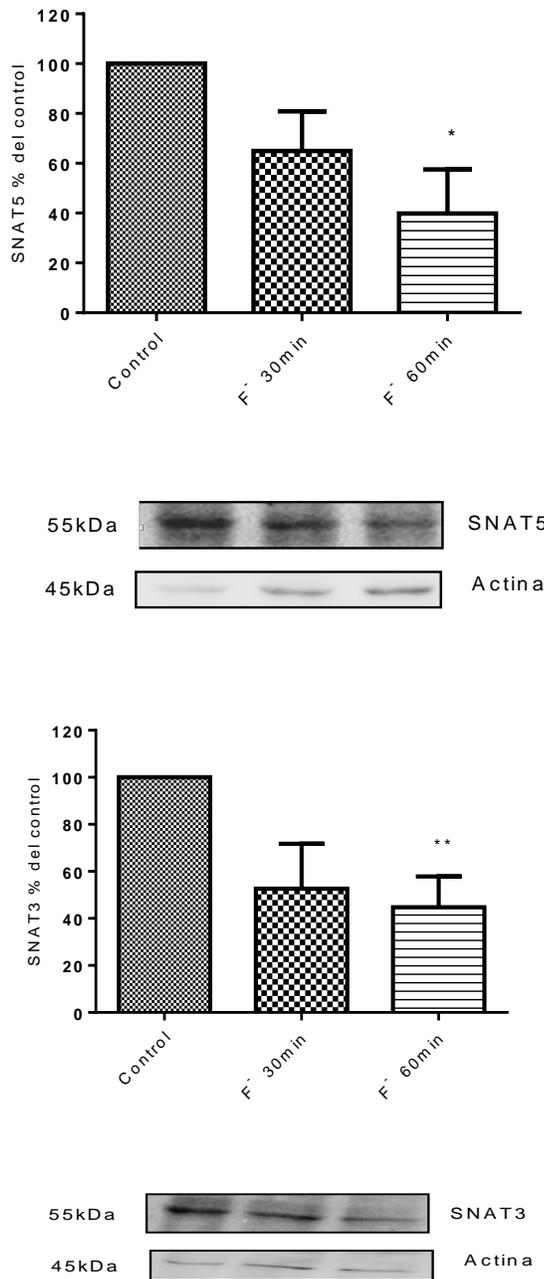


Figura 21. La exposición a F⁻ reduce los niveles de las proteínas SNAT3 y SNAT5 en células MIO-M1. Capas confluentes de células MIO-M1 fueron incubadas con solución A o 500 μ M de F⁻ en solución A durante 30 Y 60 min. Extractos protéicos fueron separados por electroforesis en gel de acrilamida con subsecuente inmunodetección utilizando anticuerpos anti-SNAT3 y anti-SNAT5. En la parte inferior de los gráficos se presentan imágenes de auto-radiogramas representativos para SNAT3 y SNAT5 y actina. Las barras de las gráficas corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis seguida de prueba *post hoc* de Dunn (**P < 0.001).

3.7. Efecto de Ca^{2+} intracelular en la captura de [^3H]-Glutamina

El presente trabajo tiene como antecedentes investigaciones previas llevadas a cabo en nuestro laboratorio de neurotoxicología, en donde se han caracterizado los sistemas de transporte de aa en células gliales, de manera directa, este trabajo continuo con las investigaciones realizadas en glía de Bergmann y el efecto que la exposición a F^- tiene en esas células. Entre los hallazgos encontrados en ese trabajo, se documentó un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}]_i$, la EC_{50} del efecto del F^- que en estas células calculada fue de 0.3 mM. El incremento en el $[\text{Ca}]_i$, produjo en las BGCs una detención en la síntesis de proteínas, por un aumento en la fosforilación de la proteína eEF2K (183).

A nivel celular, el F^- actúa en diferentes blancos moleculares, entre los documentados se encuentra la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$. En eritrocitos de humano el NaF produce incremento en $[\text{Na}^+]_i$ por inactivación de la ATPasa, y tal incremento en el $[\text{Na}^+]_i$ puede a su vez inducir incrementos en $[\text{Ca}]_i$ vía el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NQX) (185,186). En BGCs la exposición a F^- produce un aumento en la actividad de captura en los transportadores GLAST, que involucra un aumento en el influjo de Na^+ , que podría también activar al intercambiador NQX.

Por lo anterior, consideramos que, si el F^- aumentara la actividad de los transportadores EAAT1 en células MIO-M1, el influjo de Na^+ también podría activar al intercambiador NQX. Por esta razón, en las células MIO-M1 evaluamos si el F^- produce un aumento en el influjo de Ca^{2+} mediado por la actividad de NQX, lo que podría estar ligado a el efecto de la exposición en la captura de Gln. Para tal efecto expusimos a las células a F^- , de manera conjunta con el bloqueador de NQX, KB-R7943 (KBR) y al agente permeable y quelante de Ca^{2+} intracelular, ácido acético 2-[2-[2-[2-[Bis(carboximetil)amino]fenoxi]etoxi]-*N*-(carboximetil)anilino] (BAPTA). Los resultados del experimento mostraron que el efecto de reducción en la actividad de captura de Gln es mediado por la actividad del intercambiador NQX y están probablemente relacionados con un incremento en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

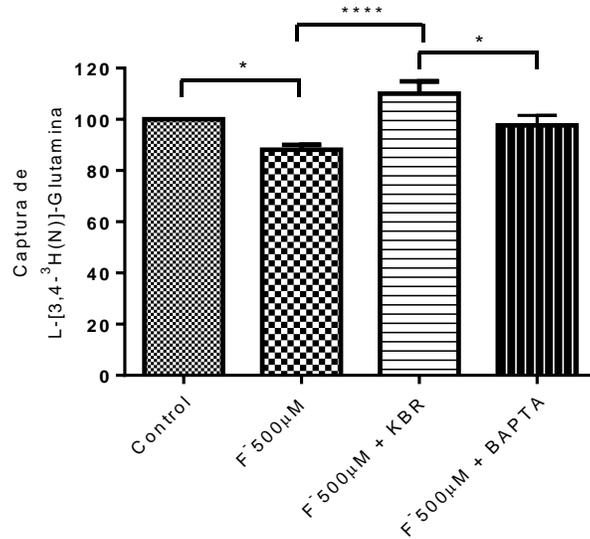


Figura 22. La actividad del intercambiador sodio calcio (NQX) media la reducción en la captura de [³H]-L-Gln producida por la exposición a F⁻ en células MIO-M1. Las células fueron sembradas a una confluencia de 1x10⁶ células por pozo y expuestas 30 min a solución A, F⁻ 500 µM en solución A, F⁻ 500 µM en solución A + KBR y F⁻ 500 µM en solución A + BAPTA. La captura de [³H]-Gln fue llevada a cabo a temperatura ambiente por 30 min. Las barras de las gráficas corresponden a la media ± SEM de tres experimentos independientes realizados en cuadruplicados. Los datos fueron analizados con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y prueba *post hoc* de Dunn; *P<0.01, ****P<0.0001.

4. DISCUSIÓN

La exposición aguda y crónica a F⁻ resulta en daños al SNC, generando deficiencias en la función cognitiva y en la memoria (187,188). El metaanálisis (27 estudios epidemiológicos) llevado a cabo por Choi y colaboradores, concerniente a la neurotoxicidad del F⁻ durante el neurodesarrollo en humanos, arroja conclusiones que apoyan el efecto adverso que la exposición a F⁻ tiene en el desarrollo neuroconductual. Los niños en áreas de exposiciones altas a F⁻ tienen IQ significativamente menor al de los IQ en los grupos de niños control en las áreas de exposición baja (189). El F⁻ puede atravesar la barrera hematoencefálica y ha sido detectado en diferentes tejidos y regiones cerebrales, como son la corteza cerebral, el hipocampo, el cerebelo y la espina dorsal (190).

Por otra parte, la mayoría de los estudios en los que se hace uso de modelos animales de experimentación, principalmente murinos, se ha evaluado el comportamiento y la memoria y aprendizaje, y la afectación generada por la exposición es indiscutible (191).

Con respecto a la prueba de evitación pasiva como paradigma de aprendizaje, en un estudio publicado en 2018 se utilizó para probar el efecto que la exposición a F⁻ a concentraciones de 0, 10 y 20 ppm tenía en ratas Long-Evans macho. La exposición comenzó en la gestación y continuó hasta la edad adulta. En ese estudio no encontraron diferencias en el aprendizaje de evitación pasiva entre grupos tratados y control, cuando la retención se midió a las 24 horas después de realizada la prueba, de manera concordante con pruebas que realizamos en este trabajo *in vivo*, y cuyos resultados y metodología se presentan en la sección de anexos.

A diferencia de nuestro diseño experimental McPherson y colaboradores midieron la extinción de la memoria en días subsecuentes al entrenamiento, y encontraron que en el día cuatro de medición de la retención existió diferencia significativa entre los grupos, hallándose mayor extinción de la memoria en el grupo de alta exposición (20 ppm) a F⁻(192). Éste dato muestra que el F⁻ tiene efecto en el aprendizaje de

tipo evitación pasiva. Es importante mencionar que el shock aplicado en el estudio de McPherson fue de 0.5 mA, Y es considerado un entrenamiento bajo. A diferencia del que usamos en este trabajo que fue de 2mA.

La resistencia a la extinción de la memoria depende de la intensidad del entrenamiento (193), y el tratamiento farmacológico o toxicológico aplicado. Como bien apuntaron Halberstadt y colaboradores, el disminuir la intensidad de la descarga eléctrica puede ser usado para tener mayor sensibilidad para la detección de daños sutiles en el aprendizaje (142).

A nivel celular, los mecanismos que subyacen la toxicidad del F^- no han sido completamente establecidos. Los efectos son diferentes dependiendo el tipo de célula evaluado, se ha sugerido que la generación de estrés oxidante es un mecanismo central en la toxicidad del F^- , la exposición lleva a la peroxidación lipídica, la generación de ROS y radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), la alteración de los niveles de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) (194–196). Otro mecanismo central en la toxicidad del F^- es la activación e inactivación de enzimas, y moléculas transportadoras, como la ATPasa Na^+-K^+ , a la estimulación de la PKC, y la modificación de los niveles de Ca^{2+} intracelular (186,197–199). Pocos estudios han abordado el efecto de la exposición en células gliales, Yan y colaboradores han sugerido en su estudio publicado en 2018 que las células microgliales son activadas por la exposición a F^- en hipocampo, y son mediadoras de los efectos neurotóxicos del ion (200).

A nivel de la neurotransmisión glutamatérgica, se ha reportado que la exposición crónica en animales de experimentación (150ppm durante la gestación y la lactancia) produce niveles de Glu reducidos en hipocampo (181), también se ha reportado que la exposición (25, 50, 100 ppm F^-) produce reducción en la expresión de receptores GluR2 en hipocampo (201); y a concentraciones más cercanas a las que pudieran presentarse de manera real (5 -10 ppm F^- , durante gestación y lactancia). Bartos y colaboradores reportaron que la exposición produce una disminución en la actividad de la enzima glutamato transaminasa y que la habilidad de memoria disminuye en los grupos expuestos al tóxico (202).

La neurotransmisión glutamatérgica está asociada al desarrollo del SNC y a una apropiada función cerebral, y a los procesos de cognición y diversas funciones entre las que se encuentran la memoria y el aprendizaje (203). En la neurotransmisión las células gliales participan activamente regulando los niveles del neurotransmisor Glu en las sinapsis y proveyendo de Gln a las neuronas (204). Los transportadores en las células gliales remueven más del 80% del Glu liberado en las sinapsis; los astrocitos cerebelares expresan GLT1/EAAT2 y las BGCs en cerebelo y las MGCs en la retina expresan GLAST/EAAT1. Debido a que los transportadores SNAT3 y SNAT5 se encuentran expresados en astrocitos corticales, BGCs y MGCs (52,205), hicimos uso de la línea celular de células retinales de Müller MIO-M1 proveniente de humano para evaluar el efecto que la exposición a F^- tiene en el reciclamiento del Glu, a nivel de función y expresión de los transportadores SNAT3 y SNAT5, relevante para la realización de este trabajo fueron los trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio en la línea celular MIO-M1, donde se ha mostrado que SNAT3/5 están acoplados al transporte de Glu y a los llevados a cabo en BGCs concernientes a los efectos de la exposición a F^- en la traducción de proteínas y transporte mediado por GLAST(83,183).

La función de transporte de Gln en las células gliales puede ser evaluada con ensayos de captura de o liberación de [3H]-Glutamina. En las células gliales la activación y función de los transportadores de aa excitadores GLAST/EAAT1 por captura del neurotransmisor Glu y su análogo no metabolizable Asp produce una corriente entrante de sodio, ya que tres iones Na^+ son transportados con una molécula de Glu u Asp; un incremento en la concentración de sodio intracelular $[Na]_i$ favorece la liberación de Gln desde las células al espacio extracelular por la activación de los transportadores SNAT3/5 (83). La caracterización del efecto producido por una preincubación de las células gliales con Asp 120 μM respecto a una disminución en la captura de [3H]-Gln, es un control para los experimentos de captura realizados con este aminoácido, y fue incluido en el experimento junto con el efecto de la exposición a F^- . La exposición de las células MIO-M1 por 30 min a F^-

produjo una disminución en la actividad de transporte de Gln en las células, el transporte disminuyó un 22%. La disminución en la función de transporte de Gln en las células gliales es de gran relevancia pues podría estar asociado a neurotransmisión de Glu alterada.

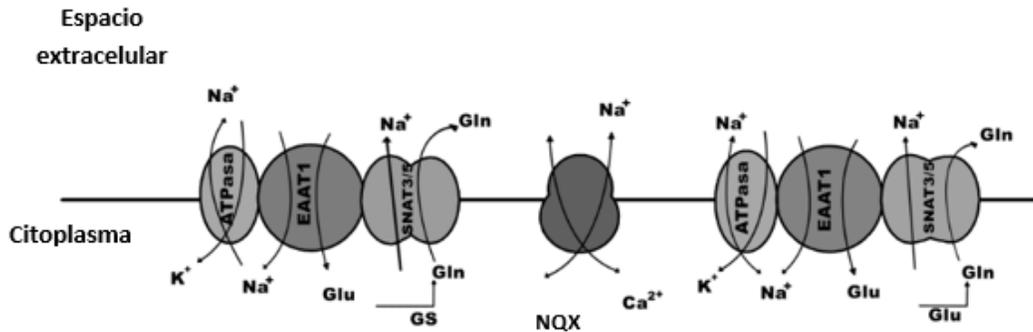
Los resultados que obtuvimos en los experimentos concuerdan con la hipótesis planteada. La exposición a F⁻ en células gliales afecta el transporte de Gln, y probablemente afecte el reciclamiento de Glu en el SNC. Es difícil extrapolar los resultados obtenidos en estudios epidemiológicos con los estudios *in vivo* en modelos animales y con los estudios *in vitro*, debido a la diferencia intrínseca de los niveles a los que se llevan a cabo las investigaciones. Sin embargo, las contribuciones realizadas en los estudios *in vitro* soportan y explican a nivel molecular, las observaciones realizadas en los estudios *in vivo*; por ejemplo, un transporte deficiente de Gln por la exposición a F⁻ concuerda con la disminución de Glu hallada en hipocampo de animales de experimentación expuestos a F⁻ y subsecuentes daños en memoria y aprendizaje (181).

Es importante mencionar que la contribución realizada respecto al estudio *in vitro* en este trabajo corresponde a la toxicidad aguda que el F⁻ ejerce en las células gliales, y que es importante describir tal efecto debido a que la concentración de exposición 9.5 ppm de F⁻ (500 µM) representa concentraciones que han sido reportadas en agua para consumo humano en zonas endémicas, que incluyen diversas regiones de nuestro país (206). Las concentraciones determinadas en orina en personas ocupacionalmente expuestas a F⁻ en trabajadores de plantas de producción de fertilizadores a base fosfatos, han sido comparables con las utilizadas en nuestro estudio *in vitro*, 11.43 ± 7.42 ppm de F⁻ (207), las concentraciones más altas reportadas en trabajadores ocupacionalmente expuestos fueron reportadas en un trabajador de una planta productora de fluoruro de hidrogeno, 15.22 ppm de F⁻ en orina (73).

El principal hallazgo de nuestro trabajo es el de los transportadores SNAT3 y SNAT5 como blanco de la acción tóxica del F^- . Los datos experimentales nos llevaron a deducir que la acción del tóxico no es directa en los transportadores SNAT3 y SNAT5, sino que es debida a un influjo de iones Ca^{2+} al interior de la célula y la perturbación del transporte de Gln es subsecuente a la actividad de los transportadores NQX; proponemos en la siguiente figura, **Figura 23**, un modelo de la acción de F^- en las proteínas transportadoras en las células MIO-M1. Debido a que se ha documentado en CGB que la exposición a F^- produce un aumento en la captura de Glu, no descartamos que en las células MIO-M1 pueda ocurrir tal efecto, si este fuera el caso, la entrada de Glu generaría un cambio en el gradiente de iones Na^+ , esto favorecería la liberación de Gln y a su vez el gradiente del sodio sería reestablecido por la ATPasa Na^+-K^+ . Como se ha apuntado anteriormente, se ha probado que la ATPasa es blanco de la acción del F^- , el cual la inactiva (186,198). Proponemos a la ATPasa, la cual se encuentra en un mismo complejo macromolecular asociada a GLAST/EAAT1 (44), como posible blanco de la exposición a F^- , debido a que al no reestablecerse los gradientes de Na^+ por esta enzima el intercambiador NQX aumente su actividad de liberación de Na^+ e internalización de Ca^{2+} , aunado a esto y debido a los tiempos cortos de exposición a F^- en los que observamos los cambios, proponemos que la disminución en la cantidad de proteínas transportadoras pueda ser debida a degradación de estas. La representación esquemática del efecto en las células MIO-M1 se presenta a continuación.

4.1. Modelo del efecto de la exposición a F^- en células MIO M1

A) Transportadores de la membrana plasmática celular de células MIO-M1



B) Transportadores de la membrana plasmática celular de células MIO-M1 expuestas a F^-

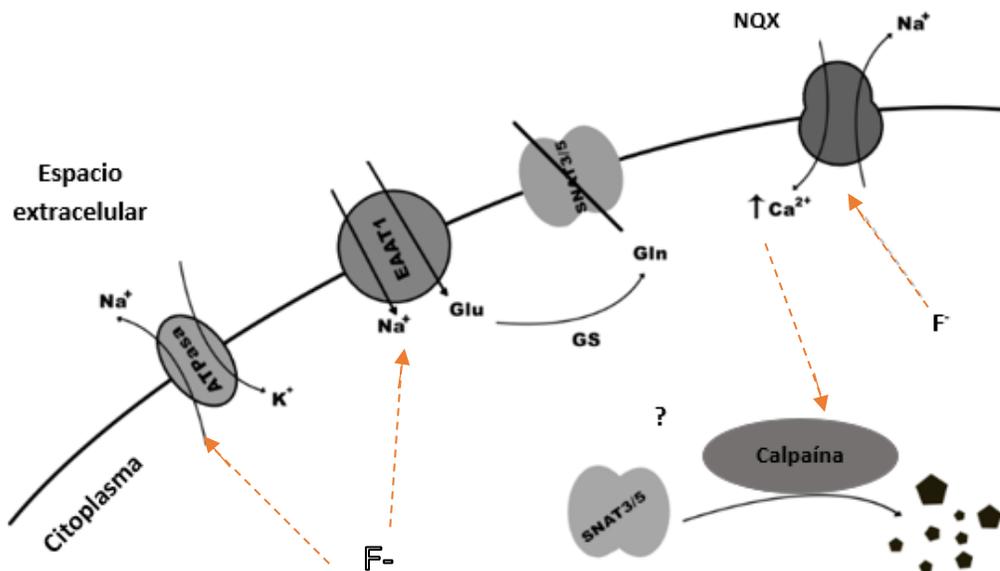


Figura 23. La actividad de transporte de Gln en células gliales de Müller es afectada por el F^- . La actividad del intercambiador sodio calcio (NQX) es afectada por la exposición a F^- en células MIO-M1, produciendo un posible aumento en los niveles de calcio intracelular. Es probable que la exposición afecte a la ATPasa Na^+/K^+ y al transportador EAAT1, lo que produciría incremento en el sodio intracelular. Debido a que los efectos son producidos a tiempos cortos de exposición la degradación de las proteínas se considera como plausible.

5. CONCLUSIONES

La expresión de los transportadores del sistema N, SNAT3 y SNAT5 que están expresados en las células de la línea celular de Müller de origen humano MIO-M1, son afectados por la exposición a F^- 500 μ M.

El transporte de Gln disminuye significativamente en las células expuestas a F^- 500 μ M, comparadas con las células control.

La afectación en los transportadores SNAT3 y SNAT5 por exposición a F^- 500 μ M, está involucrada a la actividad del intercambiador NQX.

Debido a que ambos transportadores tienen un papel importante en la liberación de Gln a los espacios extracelulares para su utilización como precursor de Glu y GABA, concluimos que la exposición a F^- en SNC podría afectar al ciclo glutamato/glutamina.

6. PERSPECTIVAS

Establecer el efecto de la exposición a F^- sobre el transportador EAAT1 en las células MIO-M1 mediante captura de [3 H]-Aspartato. Y el efecto que la exposición a F^- tiene en la colocalización de la ATPasa Na^+-K^+ Y EAAT1.

Estudiar la posible activación de enzimas calpaínas por exposición a F^- en el modelo celular MIO-M1. Y el efecto que el quelante de Ca^{2+} BAPTA y el bloqueador de NQX KBR, junto con la exposición a F^- tienen en la expresión de SNAT3 y SNAT5.

Establecer un paradigma de aprendizaje para un modelo murino, sensible a la detección de daños en aprendizaje y memoria por la exposición a F^- .

Establecer un modelo *in vitro*, que permita el análisis de las respuestas electrofisiológicas generadas por estimulación eléctrica y el efecto de la exposición a F^- en las respuestas registradas en las células.

7. REFERENCIAS

1. Featherstone DE. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. *ACS Chem Neurosci*. 2010;1(1):4–12.
2. Burger PM, Mehl E, Cameron PL, Maycox PR, Baumert M, Lottspeich F, et al. Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron*. 1989;3(6):715–20.
3. Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(9):748–55.
4. Bauer DE, Jackson JG, Genda EN, Montoya MM, Yudkoff M, Robinson MB. The glutamate transporter, GLAST, participates in a macromolecular complex that supports glutamate metabolism. *Neurochem Int* [Internet]. 2012;61(4):566–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.01.013>
5. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: Glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res*. 1999;57(4):417–28.
6. Pardo B, Contreras L, Satrústegui J. De novo Synthesis of Glial Glutamate and Glutamine in Young Mice Requires Aspartate Provided by the Neuronal Mitochondrial Aspartate-Glutamate Carrier Aralar/AGC1. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4(October):1–5.
7. Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC. Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. 2014;13–30.
8. Walls AB, Waagepetersen HS, Bak LK, Schousboe A, Sonnewald U. The Glutamine–Glutamate/GABA Cycle: Function, Regional Differences in Glutamate and GABA Production and Effects of Interference with GABA Metabolism. *Neurochem Res*. 2014;40(2):402–9.
9. Martínez-Lozada Z, Ortega A. Glutamatergic transmission: A matter of three.

Neural Plast. 2015;2015.

10. Hollmann M. Cloned Glutamate Receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17(1):31–108.
11. Hoda Badr, Cindy L. Carmack, Deborah A. Kashy, Massimo Cristofanilli and TAR. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone.* 2011;23(1):1–7.
12. Chen PE, Geballe MT, Katz E, Erreger K, Livesey MR, O'toole KK, et al. Modulation of glycine potency in rat recombinant NMDA receptors containing chimeric NR2A/2D subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol.* 2008;586(1):227–45.
13. Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, et al. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res.* 2014;63(SUPPL.).
14. Berger AJ, Dieudonné S, Ascher P. Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. *J Neurophysiol.* 1998;80(6):3336–40.
15. Martina M, Gorfinkel Y, Halman S, Lowe JA, Periyalwar P, Schmidt CJ, et al. Glycine transporter type 1 blockade changes NMDA receptor-mediated responses and LTP in hippocampal CA1 pyramidal cells by altering extracellular glycine levels. *J Physiol.* 2004;557(2):489–500.
16. Erreger K, Geballe MT, Kristensen A, Chen PE, Hansen KB, Lee CJ, et al. Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Mol Pharmacol.* 2007;72(4):907–20.
17. Erreger K, Dravid SM, Banke TG, Wyllie DJA, Traynelis SF. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J Physiol.* 2005;563(2):345–58.

18. Palmer CL, Cotton L, Henley JM. The molecular pharmacology and cell biology of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev.* 2005;57(2):253–77.
19. Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, et al. Flip and flop: A cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* (80-). 1990;249(4976):1580–5.
20. Koike M, Tsukada S, Tsuzuki K, Kijima H, Ozawa S. Regulation of kinetic properties of GluR2 AMPA receptor channels by alternative splicing. *J Neurosci.* 2000;20(6):2166–74.
21. Greger IH, Watson JF, Cull-Candy SG. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* [Internet]. 2017;94(4):713–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.009>
22. Freudenberg F, Celikel T, Reif A. The role of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors in depression: Central mediators of pathophysiology and antidepressant activity? *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2015;52:193–206. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.03.005>
23. Rubio ME, Matsui K, Fukazawa Y, Kamasawa N, Harada H, Itakura M, et al. The number and distribution of AMPA receptor channels containing fast kinetic GluA3 and GluA4 subunits at auditory nerve synapses depend on the target cells. *Brain Struct Funct.* 2017;222(8):3375–93.
24. Yadav R, Dravid SM, Yuan H, Traynelis SF. AMPA receptors: Molecular biology and pharmacology [Internet]. *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. Elsevier; 2016. 311–318 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02325-7>
25. Ceprian M, Fulton D. Glial cell AMPA Receptors in nervous system health, injury and disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10).

26. Wright A, Vissel B. The essential role of AMPA receptor GluA2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Front Mol Neurosci*. 2012;5(APRIL):1–13.
27. Gan Q, Salussolia CL, Wollmuth LP. Assembly of AMPA receptors: Mechanisms and regulation. *J Physiol*. 2015;593(1):39–48.
28. Polenghi A, Nieus T, Guazzi S, Gorostiza P, Petrini EM, Barberis A. Kainate Receptor Activation Shapes Short-Term Synaptic Plasticity by Controlling Receptor Lateral Mobility at Glutamatergic Synapses. *Cell Rep* [Internet]. 2020;31(10):107735. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107735>
29. Fisahn A, Contractor A, Traub RD, Buhl EH, Heinemann SF, McBain CJ. Distinct roles for the kainate receptor subunits GluR5 and GluR6 in kainate-induced hippocampal gamma oscillations. *J Neurosci*. 2004;24(43):9658–68.
30. Lerma J, Morales M, Vicente MA, Herreras O. Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. *Trends Neurosci* [Internet]. 1997;20(1):9–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)20055-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236(96)20055-4)
31. Cossart R, Tyzio R, Dinocourt C, Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y, et al. Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. *Neuron*. 2001;29(2):497–508.
32. Ortega A, Eshhar N, Teichberg VI. Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience*. 1991;41(2–3):335–49.
33. Slevin JT, Coyle JT. Ontogeny of Receptor Binding Sites for [3H]Glutamic Acid and [3H]Kainic Acid in the Rat Cerebellum. *J Neurochem*. 1981;37(2):531–3.
34. Gregor P, Mano I, Maoz I, McKeown M, Teichberg VI. Molecular structure of the chick cerebellar kainate-binding subunit of a putative glutamate receptor.

- Nature. 1989;342(6250):689–92.
35. Grosche J, Matyash V, Möller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H. Microdomains for neuron-glia interaction: Parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci*. 1999;2(2):139–43.
 36. Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, et al. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* [Internet]. 2011;60(7–8):1017–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.022>
 37. Levitz J, Habrian C, Bharill S, Fu Z, Vafabakhsh R, Isacoff EY. Mechanism of Assembly and Cooperativity of Homomeric and Heteromeric Metabotropic Glutamate Receptors. *Neuron* [Internet]. 2016;92(1):143–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.036>
 38. Ribeiro FM, Vieira LB, Pires RGW, Olmo RP, Ferguson SSG. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res* [Internet]. 2017;115:179–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.013>
 39. Crupi R, Impellizzeri D, Cuzzocrea S. Role of metabotropic glutamate receptors in neurological disorders. *Front Mol Neurosci*. 2019;12(February):1–11.
 40. Zhou Y, Danbolt NC. GABA and glutamate transporters in brain. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4(November):1–15.
 41. Lee A, Anderson AR, Stevens MG, Beasley S, Barnett NL, Pow D V. Excitatory amino acid transporter 5 is widely expressed in peripheral tissues. *Eur J Histochem*. 2013;57(1):66–71.
 42. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):4155–60.

43. Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: A major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res.* 1997;291(1):19–31.
44. Rose EM, Koo JCP, Antflick JE, Ahmed SM, Angers S, Hampson DR. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J Neurosci.* 2009;29(25):8143–55.
45. Zerangue N, Kavanaugh MP. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature.* 1996;383(6601):634–7.
46. Grewer C, Gameiro A, Zhang Z, Tao Z, Braams S, Rauen T. Glutamate forward and reverse transport: From molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life.* 2008;60(9):609–19.
47. Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, Nakatomi R, Yamada K, Kondo T, et al. Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(32):12161–6.
48. Hoye ML, Regan MR, Jensen LA, Lake AM, Reddy L V., Vidensky S, et al. Motor neuron-derived microRNAs cause astrocyte dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2018;141(9):2561–75.
49. Rothstein J, Dykes-Hoberg M, Pardo C, Bristol L, Jin L, Kuncl R, et al. Antisense knockout of glutamate transporters reveals a predominant role for astroglial glutamate transport in excitotoxicity and clearance of extracellular glutamate. *Neuron* [Internet]. 1996;16:675–86. Available from: [papers2://publication/uuid/327F682D-2D03-48C7-A0E6-A57E2CD92157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14511111/)
50. Rimmele TS, Rosenberg PA. GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem Int.* 2016;98:19–28.
51. Takayasu Y, Iino M, Takatsuru Y, Tanaka K, Ozawa S. Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell synapses. *Acta Physiol.* 2009;197(1):1–12.

52. Lehre KP, Danbolt NC. The number of glutamate transport subtype molecules at glutamatergic synapses: Chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci*. 1998;18(21):8751–7.
53. Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*. 1994;13(3):713–25.
54. Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI. An [Na⁺ + K⁺]coupled l-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience*. 1992;51(2):295–310.
55. Sicot G, Servais L, Dinca DM, Leroy A, Prigogine C, Medja F, et al. Downregulation of the Glial GLT1 Glutamate Transporter and Purkinje Cell Dysfunction in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy. *Cell Rep*. 2017;19(13):2718–29.
56. Su TZ, Campbell GW, Oxender DL. Glutamine transport in cerebellar granule cells in culture. *Brain Res*. 1997;757(1):69–78.
57. Zielińska M, Dąbrowska K, Hadera MG, Sonnewald U, Albrecht J. System N transporters are critical for glutamine release and modulate metabolic fluxes of glucose and acetate in cultured cortical astrocytes: Changes induced by ammonia. *J Neurochem*. 2016;136(2):329–38.
58. Pratik K. Mutha, Robert L. Sainburg KYH. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
59. Mearow KM, Mill JF, Vitkovic L. The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain. *Mol Brain Res*. 1989;6(4):223–32.
60. Linser P, Moscona AA. Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: Localization in Muller fibers and dependence on cell interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(12):6476–80.

61. Miyake T, Kitamura T. Glutamine synthetase immunoreactivity in two types of mouse brain glial cells. *Brain Res.* 1992;586(1):53–60.
62. Rothstein JD, Tabakoff B. Alteration of aspartate release after glutamine synthetase inhibition. *Fed Proc.* 1984;43(3).
63. Tani H, Dulla CG, Farzampour Z, Taylor-Weiner A, Huguenard JR, Reimer RJ. A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release. *Neuron* [Internet]. 2014;81(4):888–900. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.026>
64. Holten AT, Gundersen V. Glutamine as a precursor for transmitter glutamate, aspartate and GABA in the cerebellum: A role for phosphate-activated glutaminase. *J Neurochem.* 2008;104(4):1032–42.
65. Dolgodilina E, Imobersteg S, Laczko E, Welt T, Verrey F, Makrides V. Brain interstitial fluid glutamine homeostasis is controlled by blood-brain barrier SLC7A5/LAT1 amino acid transporter. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(11):1929–41.
66. Yahyaoui R, Pérez-Frías J. Amino acid transport defects in human inherited metabolic disorders. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1).
67. Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, Copenhagen DR, et al. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell.* 1999;99(7):769–80.
68. Barker G, Ellory J. The identification of neutral amino acid transport systems. *Exp Physiol.* 1990;75(1):3–26.
69. Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: Structure/function relationships and relevance to human health. *Front Chem.* 2014;2(August):1–23.
70. Nagaraja TN, Brookes N. Glutamine Transport in Mouse Cerebral

- Astrocytes. *J Neurochem.* 2002;66(4):1665–74.
71. Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2004;447(5):784–95.
 72. Bussolati O, Dall’Asta V, Franchi-Gazzola R, Sala R, Rotoli BM, Visigalli R, et al. The role of system A for neutral amino acid transport in the regulation of cell volume. *Mol Membr Biol.* 2001;18(1):27–38.
 73. Hägglund MGA, Sreedharan S, Nilsson VCO, Shaik JHA, Almkvist IM, Bäcklin S, et al. Identification of SLC38A7 (SNAT7) protein as a glutamine transporter expressed in neurons. *J Biol Chem.* 2011;286(23):20500–11.
 74. Fei YJ, Sugawara M, Nakanishi T, Huang W, Wang H, Prasad PD, et al. Primary structure genomic organization, and functional and electrogenic characteristics of human system N 1, a Na⁺ - and H⁺ -coupled glutamine transporter. *J Biol Chem.* 2000;275(31):23707–17.
 75. Lister A, Bourgeois S, Imenez Silva PH, Rubio-Aliaga I, Marbet P, Walsh J, et al. NRF2 regulates the glutamine transporter Slc38a3 (SNAT3) in kidney in response to metabolic acidosis. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–13.
 76. Boulland JL, Rafiki A, Levy LM, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA. Highly differential expression of SN1, a bidirectional glutamine transporter, in astroglia and endothelium in the developing rat brain. *Glia.* 2003;41(3):260–75.
 77. Chan K, Busque SM, Sailer M, Stoeger C, Bröer S, Daniel H, et al. Loss of function mutation of the Slc38a3 glutamine transporter reveals its critical role for amino acid metabolism in the liver, brain, and kidney. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2016;468(2):213–27.
 78. Dong W, Todd AC, Bröer A, Hulme SR, Bröer S, Billups B. PKC-mediated modulation of astrocyte SNAT3 glutamine transporter function at synapses in

situ. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1–13.

79. Ogretmen B. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2019;176(3):139–48.
80. Albrecht J. I-Glutamate stimulates the efflux of newly taken up glutamine from astroglia but not from synaptosomes of the rat. *Neuropharmacology.* 1989;28(8):885–7.
81. Uwechue NM, Marx MC, Chevy Q, Billups B. Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *J Physiol.* 2012;590(10):2317–31.
82. Bröer A, Deitmer JW, Bröer S. Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate. *Glia.* 2004;48(4):298–310.
83. Martínez-Lozada Z, Guillem AM, Flores-Méndez M, Hernández-Kelly LC, Vela C, Meza E, et al. GLAST/EAAT1-induced Glutamine release via SNAT3 in Bergmann glial cells: Evidence of a functional and physical coupling. *J Neurochem.* 2013;125(4):545–54.
84. Nakanishi T, Sugawara M, Huang W, Martindale RG, Leibach FH, Ganapathy ME, et al. Structure, function, and tissue expression pattern of human SN2, a subtype of the amino acid transport system N. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281(5):1343–8.
85. Baird FE, Beattie KJ, Hyde AR, Ganapathy V, Rennie MJ, Taylor PM. Bidirectional substrate fluxes through the System N (SNAT5) glutamine transporter may determine net glutamine flux in rat liver. *J Physiol.* 2004;559(2):367–81.
86. Cubelos B, González-González IM, Giménez C, Zafra F. Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia.* 2005;49(2):230–44.
87. Rodríguez A, Ortega A, Berumen LC, García-Alcocer MG, Giménez C, Zafra

- F. Expression of the System N transporter (SNAT5/SN2) during development indicates its plausible role in glutamatergic neurotransmission. *Neurochem Int.* 2014;73(1):166–71.
88. Umapathy NS, Dun Y, Martin PM, Duplantier JN, Roon P, Prasad P, et al. Expression and function of system N glutamine transporters (SN1/SN2 or SNAT3/SNAT5) in retinal ganglion cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(11):5151–60.
89. Menchini RJ, Chaudhry FA. Multifaceted regulation of the system A transporter Slc38a2 suggests nanoscale regulation of amino acid metabolism and cellular signaling. *Neuropharmacology [Internet].* 2019;161:107789. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107789>
90. Ge Y, Gu Y, Wang J, Zhang Z. Membrane topology of rat sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2). *Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet].* 2018;1860(7):1460–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.04.005>
91. Hatanaka T, Huang W, Wang H, Sugawara M, Prasad PD, Leibach FH, et al. Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2000;1467(1):1–6.
92. Mandò C, Tabano S, Pileri P, Colapietro P, Marino MA, Avagliano L, et al. SNAT2 expression and regulation in human growth-restricted placentas. *Pediatr Res.* 2013;74(2):104–10.
93. González-González IM, Cubelos B, Giménez C, Zafra F. Immunohistochemical localization of the amino acid transporter SNAT2 in the rat brain. *Neuroscience.* 2005;130(1):61–73.
94. López A, Torres N, Ortiz V, Alemán G, Hernández-Pando R, Tovar AR. Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland. *Am J Physiol -*

- Endocrinol Metab. 2006;291(5):1059–66.
95. Rae C, Hare N, Bubb WA, McEwan SR, Bröer A, McQuillan JA, et al. Inhibition of glutamine transport depletes glutamate and GABA neurotransmitter pools: Further evidence for metabolic compartmentation. *J Neurochem.* 2003;85(2):503–14.
 96. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem.* 2006;98(3):641–53.
 97. Siciliano JC, Greengard P, Girault JA, Snyder GL, Greengard P, Fienberg AA, et al. *Kandel rev Science* 01. 2015;294(November 2001):1030–8.
 98. Pittenger C, Kandel E. A genetic switch for long-term memory. *Comptes Rendus l'Academie des Sci - Ser III.* 1998;321(2–3):91–6.
 99. McDonald AJ, Mott DD. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *J Neurosci Res.* 2017;95(3):797–820.
 100. Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AHM. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol.* 1989;33(3):161–253.
 101. Mattson MP, Lee RE, Adams ME, Guthrie PB, Kater SB. Interactions between entorhinal axons and target hippocampal neurons: A role for glutamate in the development of hippocampal circuitry. *Neuron.* 1988;1(9):865–76.
 102. Bergles DE, Roberts JDB, Somogyi P, Jahr CE. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature.* 2000;405(6783):187–91.
 103. During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet.*

- 1993;341(8861):1607–10.
104. Herman MA, Jahr CE. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J Neurosci.* 2007;27(36):9736–41.
 105. Neves G, Cooke SF, Bliss TVP. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):65–75.
 106. Sánchez-González D. Óxido nítrico en el sistema nervioso central. *Neuronas nitrérgicas.* 2004.
 107. Ventura R, Harris KM. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci.* 1999;19(16):6897–906.
 108. Liang SL. The glutamine-glutamate cycle regulates synaptic glutamate release in the ventrolateral ventromedial nucleus of the hypothalamus of perinatal female rats. *J Neuroendocrinol.* 2018;30(11):0–3.
 109. Liang SL, Carlson GC, Coulter DA. Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. *J Neurosci.* 2006;26(33):8537–48.
 110. O'Dowd BS, Ng KT, Robinson SR. Distribution of glutamine synthetase in the chick forebrain: implications for passive avoidance memory formation. *J Hirnforsch.* 1997;38(2):147–52.
 111. Doi T, Ueda Y, Takaki M, Willmore LJ. Differential molecular regulation of glutamate in kindling resistant rats. *Brain Res.* 2011 Feb;1375:1–6.
 112. Zielke HR, Collins RMJ, Baab PJ, Huang Y, Zielke CL, Tildon JT. Compartmentation of [14C]glutamate and [14C]glutamine oxidative metabolism in the rat hippocampus as determined by microdialysis. *J Neurochem.* 1998 Sep;71(3):1315–20.
 113. Acosta GB, Fernández MA, Roselló DM, Tomaro ML, Balestrasse K,

- Lemberg A. Glutamine synthetase activity and glutamate uptake in hippocampus and frontal cortex in portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol.* 2009 Jun;15(23):2893–9.
114. Petroff OAC, Errante LD, Rothman DL, Kim JH, Spencer DD. Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. *Epilepsia.* 2002;43(7):703–10.
115. Fan S, Xian X, Li L, Yao X, Hu Y, Zhang M, et al. Ceftriaxone Improves Cognitive Function and Upregulates GLT-1-Related Glutamate-Glutamine Cycle in APP/PS1 Mice. *J Alzheimers Dis.* 2018;66(4):1731–43.
116. Thielen J-W, Hong D, Rohani Rankouhi S, Wiltfang J, Fernández G, Norris DG, et al. The increase in medial prefrontal glutamate/glutamine concentration during memory encoding is associated with better memory performance and stronger functional connectivity in the human medial prefrontal-thalamus-hippocampus network. *Hum Brain Mapp.* 2018 Jun;39(6):2381–90.
117. Roostaei T, Nazeri A, Sahraian MA, Minagar A. The human cerebellum: A review of physiologic neuroanatomy. *Neurol Clin.* 2014;32(4):859–69.
118. Hawkes R. The Ferdinando Rossi Memorial Lecture: Zones and Stripes—Pattern Formation in the Cerebellum. *Cerebellum.* 2018;17(1):12–6.
119. Keeler JD. A dynamical system view of cerebellar function. *Phys D Nonlinear Phenom.* 1990;42(1–3):396–410.
120. Peters J, Van der Smagt P. Searching a scalable approach to cerebellar based control. *Appl Intell.* 2002;17(1):11–33.
121. Zang Y, De Schutter E. Climbing Fibers Provide Graded Error Signals in Cerebellar Learning. *Front Syst Neurosci.* 2019;13(September):1–11.
122. Wagner MJ, Kim TH, Savall J, Schnitzer MJ, Luo L. Cerebellar granule cells encode the expectation of reward. *Nature [Internet].* 2017;544(7648):96–100.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature21726>

123. Fortier PA, Kalaska JF, Smith AM. Cerebellar neuronal activity related to whole-arm reaching movements in the monkey. *J Neurophysiol.* 1989;62(1):198–211.
124. Bastian AJ, Thach WT. Cerebellar outflow lesions: A comparison of movement deficits resulting from lesions at the levels of the cerebellum and thalamus. *Ann Neurol.* 1995;38(6):881–92.
125. Dichgans J. Quantification of postural sway in normals and patients with cerebellar diseases. 1984;134–42.
126. Stoodley CJ. The cerebellum and cognition: Evidence from functional imaging studies. *Cerebellum.* 2012;11(2):352–65.
127. Buffo A, Rossi F. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2013;109:42–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.08.001>
128. Saab AS, Neumeyer A, Jahn HM, Cupido A, Šimek AAM, Boele HJ, et al. Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. *Science (80-)*. 2012;337(6095):749–53.
129. Tzingounis A V., Wadiche JI. Glutamate transporters: Confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(12):935–47.
130. López-Bayghen E, Rosas S, Castelán F, Ortega A. Cerebellar Bergmann glia: An important model to study neuron-glia interactions. *Neuron Glia Biol.* 2007;3(2):155–67.
131. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25(4):397–424.

132. Bringmann A, Pannicke T, Reichenbach A, Skatchkov SN. Ca²⁺ channel-mediated currents in retinal glial (Müller) cells of the toad (*Bufo marinus*). *Neurosci Lett*. 2000;281(2–3):155–8.
133. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2016;51:1–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>
134. Derouiche A, Rauen T. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: Evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res*. 1995;42(1):131–43.
135. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells. *Glia*. 2013;61(5):651–78.
136. Pow D V., Robinson SR. Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. *Neuroscience*. 1994;60(2):355–66.
137. Barnett NL, Pow D V., Robinson SR. Inhibition of Müller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light. *Glia*. 2000;30(1):64–73.
138. DeNoble VJ. Vinpocetine enhances retrieval of a step-through passive avoidance response in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1987;26(1):183–6.
139. Yoshida K, Gi M, Fujioka M, Teramoto I, Wanibuchi H. Long-term administration of excess zinc impairs learning and memory in aged mice. *J Toxicol Sci*. 2019;44(10):681–91.
140. Sohanaki H, Baluchnejadmojarad T, Nikbakht F, Roghani M. Pelargonidin improves passive avoidance task performance in a rat amyloid beta₂₅₋₃₅ model of Alzheimer's disease via estrogen receptor independent pathways. *Acta Med Iran*. 2016;54(4):245–50.

141. Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Javadi A, Ganjvar M. The effects of rutin on a passive avoidance test in rats. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2010;34(1):204–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.11.006>
142. Halberstadt. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2017;176(5):139–48.
143. Torres-García ME, Medina AC, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. Differential effects of inactivation of discrete regions of medial prefrontal cortex on memory consolidation of moderate and intense inhibitory avoidance training. *Front Pharmacol*. 2017;8(NOV):1–10.
144. Izquierdo I, Furini CRG, Myskiw JC. Fear memory. *Physiol Rev*. 2016;96(2):695–750.
145. Ballini C, Corte L Della, Pazzagli M, Colivicchi MA, Pepeu G, Tipton KF, et al. Extracellular levels of brain aspartate, glutamate and GABA during an inhibitory avoidance response in the rat. *J Neurochem*. 2008;106(3):1035–43.
146. Ohno M, Watanabe S. Interactive processing between glutamatergic and cholinergic systems involved in inhibitory avoidance learning of rats. *Eur J Pharmacol*. 1996;312(2):145–7.
147. Quillfeldt A. Sequential Role. 1997;9(November 1996):786–93.
148. Bianchin M, Da Silva RC, Schmitz PK, Medina JH, Izquierdo I. Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. Vol. 5, *Behavioural Pharmacology*. 1994. p. 356–9.
149. Paratcha G, Furman M, Bevilaqua L, Cammarota M, Vianna M, De Stein ML, et al. Involvement of hippocampal PKC β I isoform in the early phase of memory formation of an inhibitory avoidance learning. *Brain Res*.

2000;855(2):199–205.

150. Schmedt Auf Der Günne J, Mangstl M, Kraus F. Occurrence of difluorine F₂ in nature-in situ proof and quantification by NMR spectroscopy. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(31):7847–9.
151. Boyle DR. *the Geochemistry of Fluorine and Its.* 1976;(June).
152. Pickering WF. The mobility of soluble fluoride in soils. *Environ Pollution Ser B, Chem Phys.* 1985;9(4):281–308.
153. Kimambo V, Bhattacharya P, Mtalo F, Mtamba J, Ahmad A. Fluoride occurrence in groundwater systems at global scale and status of defluoridation – State of the art. *Groundw Sustain Dev* [Internet]. 2019;9(March):100223. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2019.100223>
154. Cantoral A, Luna-Villa LC, Mantilla-Rodriguez AA, Mercado A, Lippert F, Liu Y, et al. Fluoride Content in Foods and Beverages From Mexico City Markets and Supermarkets. *Food Nutr Bull.* 2019;40(4):514–31.
155. Taves DR. Dietary intake of fluoride ashed (total fluoride) v . unashed (inorganic fluoride) analysis of individual foods . *Br J Nutr.* 1983;49(3):295–301.
156. Bashir S. *Nutrition in.* 2001;28(3):629–45.
157. Farkas CS. Potentialeffectoffoodprocessingonthefluoridecontentofinfantfoods. 1974;2:399–405.
158. Beltrán-Valladares PR, Cocom-Tun H, Casanova-Rosado JF, Vallejos-Sánchez AA, Medina-Solís CE, Maupomé G. Prevalencia de fluorosis dental y fuentes adicionales de exposición a fluoruro como factores de riesgo a fluorosis dental en escolares de Campeche, México. *Rev Investig Clin.* 2005;57(4):532–9.

159. Den Besten PK. Dental fluorosis: its use as a biomarker. *Adv Dent Res.* 1994;8(1):105–10.
160. Whitford GM, Reynolds KE, Pashley DH. Fluoride tissue distribution: short term kinetics. *J Dent Res.* 1977;56(Spec. B).
161. Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res.* 1994;8(1):5–14.
162. Hu YH, Wu SS. Fluoride in cerebrospinal fluid of patients with fluorosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1988;51(12):1591–3.
163. Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1995 Mar 1;17(2):169–77.
164. Whitford GM. Fluoride metabolism and excretion in children. *J Public Health Dent.* 1999;59(4):224–8.
165. Inkielewicz I, Krechniak J. Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. *Fluoride.* 2003;36(4):263–6.
166. Roholm H. Lewis K & Co. L. Chemical technology and engineering. *Chem Ind.* 1937;(prcfticc 1):1701.
167. Xiang Q, Liang Y, Chen L, Wang C, Chen B, Chen X, et al. Effect of fluoride in drinking water on children's intelligence. *Fluoride.* 2003;36(2):84–94.
168. Lu Y, Sun ZR, Wu LN, Wang X, Lu W, Liu SS. Effect of high-fluoride water on intelligence in children. *Fluoride.* 2000;33(2):74–8.
169. Trivedi MH, Verma RJ, Chinoy NJ, Patel RS, Sathawara NG. Effect of high fluoride water on intelligence of school children in India. *Fluoride.* 2007;40(3):178–83.
170. Rocha-Amador D, Navarro ME, Carrizales L, Morales R, Calderón J. Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cad Saude Publica.* 2007;23(SUPPL. 4):579–87.

171. Seraj B, Shahrabi M, Shadfar M, Ahmadi R, Fallahzadeh M, Eslamlu HF, et al. Effect of high water fluoride concentration on the intellectual development of children in makoo/iran. *J Dent (Tehran)* [Internet]. 2012;9(3):221–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23119131><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3484826>
172. Karimzade S, Aghaei M, Mahvi AH. Investigation of intelligence quotient in 9-12-year-old children exposed to high- and low-drinking water fluoride in West Azerbaijan Province, Iran. *Fluoride*. 2014;47(1):9–14.
173. Shah SD, Chinoy NJ. Adverse effects of fluoride and/or arsenic on the cerebral hemisphere of mice and recovery by some antidotes. *Fluoride*. 2004;37(3):162–71.
174. Ding Y, YanhuiGao, Sun H, Han H, Wang W, Ji X, et al. The relationships between low levels of urine fluoride on children's intelligence, dental fluorosis in endemic fluorosis areas in Hulunbuir, Inner Mongolia, China. *J Hazard Mater* [Internet]. 2011;186(2–3):1942–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.097>
175. Chouhan S, Lomash V, Flora SJS. Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats. *J Appl Toxicol*. 2010;30(1):63–73.
176. Sun Y, Ke L, Zheng X, Li T, Ouyang W, Zhang Z. Effects of Different Levels of Calcium Intake on Brain Cell Apoptosis in Fluorosis Rat Offspring and Its Molecular Mechanism. *Biol Trace Elem Res*. 2017 Apr;176(2):355–66.
177. Shashi A. Histopathological investigation of fluoride-induced neurotoxicity in rabbits. *Fluoride*. 2003;36(2):95–105.
178. Agustina F, Sofro ZM, Partadiredja G. Subchronic Administration of High-Dose Sodium Fluoride Causes Deficits in Cerebellar Purkinje Cells But Not Motor Coordination of Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2019 Apr;188(2):424–33.

179. Bhatnagar M, Rao P, Sushma J, Bhatnagar R. Neurotoxicity of fluoride: neurodegeneration in hippocampus of female mice. *Indian J Exp Biol*. 2002 May;40(5):546–54.
180. Yuan J, Li Q, Niu R, Wang J. Fluoride exposure decreased learning ability and the expressions of the insulin receptor in male mouse hippocampus and olfactory bulb. *Chemosphere*. 2019;224:71–6.
181. Niu R, Sun Z, Cheng Z, Li Z, Wang J. Decreased learning ability and low hippocampus glutamate in offspring rats exposed to fluoride and lead. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;28(2):254–8.
182. Wu C, Gu X, Ge Y, Zhang J, Wang J. Effects of high fluoride and arsenic on brain biochemical indexes and learning-memory in rats. *Fluoride*. 2006;39(4):274–9.
183. Flores-Méndez M, Ramírez D, Alamillo N, Hernández-Kelly LC, Del Razo LM, Ortega A. Fluoride exposure regulates the elongation phase of protein synthesis in cultured Bergmann glia cells. *Toxicol Lett*. 2014;229(1):126–33.
184. Yan L, Liu S, Wang C, Wang F, Song Y, Yan N, et al. JNK and NADPH Oxidase Involved in Fluoride-Induced Oxidative Stress in BV-2 Microglia Cells. Ahmad M, editor. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013;2013:895975. Available from: <https://doi.org/10.1155/2013/895975>
185. Increasing BY. $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$. 1987;38:169–76.
186. Waugh DT. Fluoride exposure induces inhibition of sodium-and potassium-activated adenosine triphosphatase (Na^+ , K^+ -atpase) enzyme activity: Molecular mechanisms and implications for public health. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(8).
187. Bashash M, Thomas D, Hu H, Martinez-Mier EA, Sanchez BN, Basu N, et al. Prenatal fluoride exposure and cognitive outcomes in children at 4 and 6–12 years of age in Mexico. *Environ Health Perspect*. 2017;125(9):1–12.

188. Society I. FLUORIDE. 1994;27(3).
189. Fluoride D, Systematic NA, Choi AL, Sun G, Zhang Y, Grandjean P. Review. 2020;1362(10):1362–8.
190. Sciences A. Allied Sciences &. J Med. 2011;1(1):30–5.
191. Jiang S, Su J, Yao S, Zhang Y, Cao F, Wang F, et al. Fluoride and arsenic exposure impairs learning and memory and decreases mGluR5 expression in the hippocampus and cortex in rats. PLoS One. 2014;9(4):1–10.
192. McPherson CA, Zhang G, Gilliam R, Brar SS, Wilson R, Brix A, et al. An Evaluation of Neurotoxicity Following Fluoride Exposure from Gestational Through Adult Ages in Long-Evans Hooded Rats. Neurotox Res. 2018;34(4):781–98.
193. Quiroz C, Martínez I, Quirarte GL, Morales T, Díaz-Cintra S, Prado-Alcalá RA. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. Exp Brain Res. 2003;153(3):400–2.
194. Chlubek D. Fluoride and oxidative stress. Fluoride. 2003;36(4):217–28.
195. Shuhua X, Ziyou L, Ling Y, Fei W, Sun G. A role of fluoride on free radical generation and oxidative stress in Bv-2 microglia cells. Mediators Inflamm. 2012;2012.
196. Dec K, Łukomska A, Skonieczna-żydecka K, Jakubczyk K, Tarnowski M, Lubkowska A, et al. Chronic exposure to fluoride affects GSH level and NOX4 expression in rat model of this element of neurotoxicity. Biomolecules. 2020;10(3):1–14.
197. Chirumari K, Reddy PK. Dose-dependent effects of fluoride on neurochemical milieu in the hippocampus and neocortex of rat brain. Fluoride. 2007;40(2):101–10.

198. Kravtsova V V, Kravtsov O V. [Inactivation of Na⁺, K⁺ -ATPase from cattle brain by sodium fluoride]. *Ukr biokhimichniy zhurnal* (1999) [Internet]. 2004;76(1):39—47. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/15909416>
199. Xu B, Xu Z, Xia T, He P, Gao P, He W, et al. Effects of the Fas/Fas-L pathway on fluoride-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Environ Toxicol.* 2011 Feb;26(1):86–92.
200. Yang L, Jin P, Wang X, Zhou Q, Lin X, Xi S. Fluoride activates microglia, secretes inflammatory factors and influences synaptic neuron plasticity in the hippocampus of rats. *Neurotoxicology* [Internet]. 2018;69:108–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.09.006>
201. Sun Z, Zhang Y, Xue X, Niu R, Wang J. Maternal fluoride exposure during gestation and lactation decreased learning and memory ability, and glutamate receptor mRNA expressions of mouse pups. *Hum Exp Toxicol.* 2018;37(1):87–93.
202. Bartos M, Gumilar F, Gallegos CE, Bras C, Dominguez S, Cancela LM, et al. Effects of Perinatal Fluoride Exposure on Short- and Long-Term Memory, Brain Antioxidant Status, and Glutamate Metabolism of Young Rat Pups. *Int J Toxicol.* 2019;38(5):405–14.
203. Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res.* 2003;140(1–2):1–47.
204. Danbolt NC, Furness DN, Zhou Y. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochem Int* [Internet]. 2016;98:29–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.009>
205. Lehre KP, Davanger S, Danbolt NC. Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina. *Brain Res.* 1997;744(1):129–37.
206. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of

fluoride toxicity. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2010;188(2):319–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.011>

207. Czarnowski W, Stolarska K, Brzezinska B, Krechniak J. Fluoride in urine, hair and nails of phosphate fertilizer workers. *Fluoride*. 1996;29(3):163–5.

ANEXO 1

Experimentos adicionales.

Materiales y métodos utilizados en el estudio *in vivo*

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar macho recién destetadas de aproximadamente 21 días de nacidas con un peso de 70 ± 9 g. Fueron colocadas en cajas de polipropileno con encamado de aserrín, a una temperatura controlada entre 20 y 22°C y humedad relativa de 40-60%, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. El agua y la comida estuvieron disponibles en las cajas a lo largo del periodo de exposición.

Exposición subcrónica a fluoruro

Las ratas estuvieron en un periodo de aclimatación de una semana, después del cual fueron divididas de manera aleatoria en tres grupos de cinco ratas cada uno. Uno de los grupos fue el grupo control, sin exposición al tóxico y los dos restantes fueron los grupos expuestos a diferentes concentraciones de F^- . La exposición fue por vía oral a concentraciones de 15 y 50 ppm de NaF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) disueltos en el agua de bebida. El tiempo de exposición fue de 40 días. El grupo control no expuesto, tuvo acceso a agua de bebida con una concentración de F^- no mayor a 0.5ppm. El agua a la que tuvo acceso el grupo control fue de la misma procedencia que la utilizada para realizar la disolución de NaF de los grupos tratados. Después de los 40 días de administración, los animales fueron sometidos a la prueba de memoria de evitación pasiva, después de la prueba, los animales fueron sacrificados y se extrajeron el cerebelo y el hipocampo, y otras regiones cerebrales, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso para los análisis de expresión de proteínas y cuantificación de mRNA por RT-PCR.

Evitación pasiva como paradigma de aprendizaje

El entrenamiento y la prueba de aprendizaje fueron llevados a cabo en una caja de acrílico opaco compuesta de dos compartimentos del mismo tamaño cada uno (30 x 30 x 30 cm), separados por

una puerta tipo guillotina. Cada compartimento tenía una tapa de acrílico transparente. El piso de un compartimento era desmontable, hecho de acrílico y tenía forma de rejilla compuesta de barras de 6 mm de diámetro cada una, y separadas por 1.5 cm entre centro a centro de cada barra. En el segundo compartimento, el compartimento de shock, el piso estaba formado por dos láminas de acero inoxidable que formaban una V, el piso tenía una pendiente en cada lado, y en la parte media de este compartimento, las láminas de acero estaban separadas una de la otra por 1.5 cm. Cuando las ratas entraban a este compartimento estaban en contacto con ambas secciones del piso. El piso estaba conectado a una unidad de corriente y por tanto podía ser electrificado. El compartimento de shock no tenía iluminación y sus paredes fueron forradas para evitar el paso de luz. En el centro de la tapa del compartimento de suelo en forma de rejilla fue colocada una bombilla de 10 W, este fue el compartimento iluminado. Las latencias para cruzar de un compartimento a otro fueron registradas. La caja de condicionamiento fue colocada dentro de un cuarto oscuro a prueba de sonido.

Durante el entrenamiento las ratas fueron colocadas en el compartimento iluminado, con suelo en forma de rejilla, 20 s después, la puerta con forma de guillotina fue abierta y la latencia para cruzar y colocar sus cuatro patas en el compartimento de shock fue registrada, esta es la latencia de adquisición. La puerta en forma de guillotina fue cerrada y las ratas recibieron un shock eléctrico, el shock aplicado fue de 2 mA, durante cinco segundos. Después de los cinco segundos la puerta fue reabierta, permitiendo a las ratas escapar al compartimento contiguo, iluminado. La compuerta fue cerrada nuevamente después del escape y las ratas fueron dejadas 30 s en la caja antes de ser retiradas. Las pruebas fueron realizadas entre las once de la mañana a las dos de la tarde. Un día después del entrenamiento cada rata fue probada para la retención. La prueba de retención fue llevada a cabo igual que la prueba de entrenamiento, pero no se aplicó corriente eléctrica al piso del compartimento de shock.

Extractos de proteínas cerebelares e hipocampales

El hipocampo y cerebelo fueron extraídos y el tejido homogeneizado en cinco volúmenes de solución tampón fría de ácido etilendiaminotetraacético-fluoruro de fenilmetilsulfonilo (EDTA-PMSF). Los homogeneizados se centrifugaron a 13 000 rpm por veinte minutos para separar proteínas solubles de proteínas insolubles. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue solubilizado en solución de dodecilsulfato de sodio/solución amortiguadora de fosfatos (SDS/NaPi),

después de la solubilización, los extractos se centrifugaron a 13 000 rpm por 20 minutos y se cuantificaron las proteínas disueltas, con el método de Bradford. Se procedió posteriormente a desnaturalizar las proteínas con buffer de carga, y aproximadamente 50 µg de proteína fueron separadas utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) con posterior electro transferencia a membranas de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa fueron teñidas con Ponceau S para confirmar la transferencia de proteínas y el contenido de proteína en cada condición, el colorante fue retirado por lavado con PBS. Las membranas fueron incubadas por dos horas con solución salina tamponada con Tris (TBS), compuesta de 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, PH 7.6, con leche descremada al 5% y Tween 20 al 0.1% para bloquear el exceso de sitios de unión a proteína no específicos. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios anti-SNAT2 y anti-SNAT3 por doce horas a 4°C, y con anticuerpos secundarios por dos horas a temperatura ambiente. La inmunoreactividad fue detectada por quimioluminiscencia con un sistema de imágenes MicroChemi DNR Bio-Imaging. La densitometría fue llevada a cabo con el programa Image J64 y los datos fueron analizados con el programa Prisma 5 GraphPad.

Extracción de mRNA de cerebelo e hipocampo

El RNA total fue aislado de tejido de cerebelo e hipocampo de ratas entrenadas y no entrenadas en la prueba de evitación pasiva. Y ratas expuestas a F⁻. El RNA fue extraído usando el reactivo TRIZOL (Sigma). Cada muestra fue analizada por duplicado. La transcripción reversa en tiempo real (qRT-PCR) fue llevada a cabo por un método de un solo paso usando el kit KAPA SYBR FAST One-Step qRT-

PCR (Kapa Biosystems). Las muestras fueron sujetas a PCR cuantitativa qPCR (Applied Biosystems). La temperatura de disociación utilizada fue de 80°C y se obtuvo amplificación para slc38a2 a un CT de 29 y para slc38a3 a un CT de 30.

Resultados obtenidos de los experimentos *in vivo*

Efecto de la exposición subcrónica a F⁻ en el aprendizaje de evitación pasiva

No hubo diferencia entre el grupo de no exposición (0 ppm de F⁻) y los grupos expuestos a 15 y 50 ppm de F⁻ en las latencias de retención (Latencia tiempo en segundos) medidas 24 horas después del entrenamiento (adquisición). La intensidad de la descarga eléctrica usada en el entrenamiento fue de 2.0 mA, $p=0.29$. **Figura 1A.**

En los controles usados para la prueba, no hubo diferencia entre el grupo de no exposición (0 ppm de F⁻) y los grupos expuestos a 15 y 50 ppm de F⁻ en las latencias de retención (Latencia tiempo en segundos) medidas 24 horas después de la adquisición en los grupos usados como controles de la prueba, en estos no se aplicó descarga eléctrica durante la adquisición. $p=0.10$. **Figura 1B.**

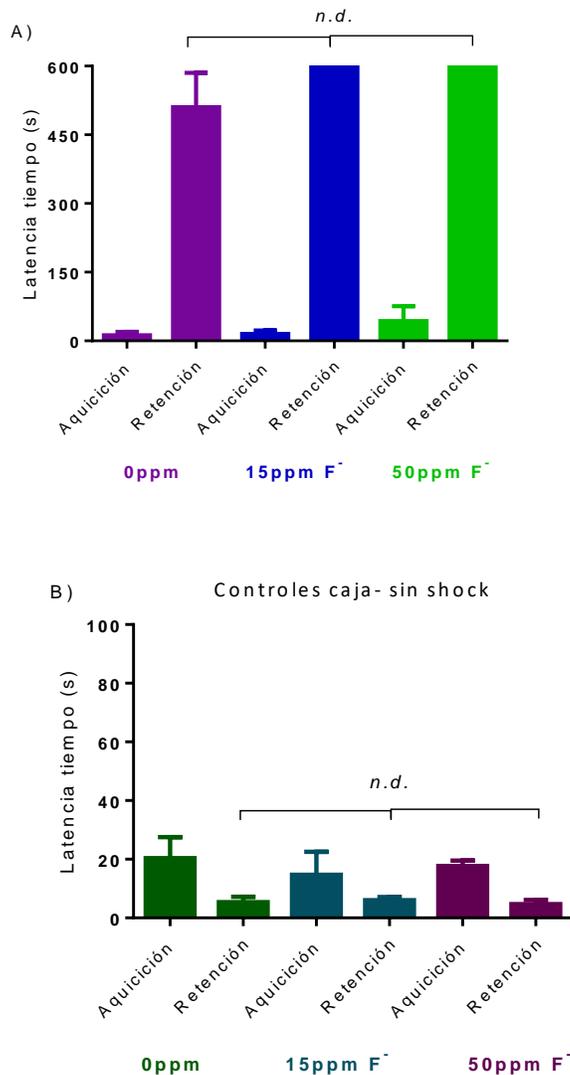


Figura 1. La exposición subcrónica a 15 y 50 ppm de F⁻ no afecta el aprendizaje. **A)** Los valores están expresados como la media \pm SEM, de la latencia de entrada del compartimento iluminado al compartimento de shock de grupos de ratas entrenadas en la prueba de evitación pasiva (N=3). En el día de entrenamiento (adquisición) al cruzar al compartimento oscuro las ratas recibieron un shock de 2 mA. **B)** Media (\pm SEM) de la latencia de entrada del compartimento iluminado al compartimento oscuro de grupos de ratas control en la prueba de evitación pasiva (N=3). En el día de adquisición al cruzar al compartimento oscuro, las ratas control no recibieron shock eléctrico. La adquisición corresponde al día 1 y la retención fue medida a las 24 horas después de la adquisición. La prueba ANOVA fue utilizada para comparar los datos, seguida de la prueba de Bartlett, *P<0.05, *n.d.* no diferencia.

Efecto de la prueba de evitación pasiva en la expresión de los transportadores SNAT3 y SNAT2 en cerebelo.

Los resultados de las inmunodetecciones para SNAT3 y SNAT2 de cerebelo de ratas entrenadas y no entrenada en la prueba de evitación pasiva, se muestran en la **Figura 2**. Los anticuerpos detectaron una banda a 55 KDa. La prueba ANOVA mostró que no hubo diferencia significativa en la expresión de las proteínas entre los tres grupos analizados. Las gráficas representan la media \pm DE, de tres mediciones por condición. Las muestras designadas con las siglas CN correspondieron a ratas que no fueron entrenadas ni expuestas a la caja de entrenamiento, esas ratas permanecieron sin manipulación y fungieron como controles. Las muestras designadas con las siglas CC, correspondieron a ratas que fueron expuestas a la caja de entrenamiento, pero no recibieron descarga eléctrica, y las muestras designadas con las siglas CE correspondieron a muestras de ratas entrenadas.

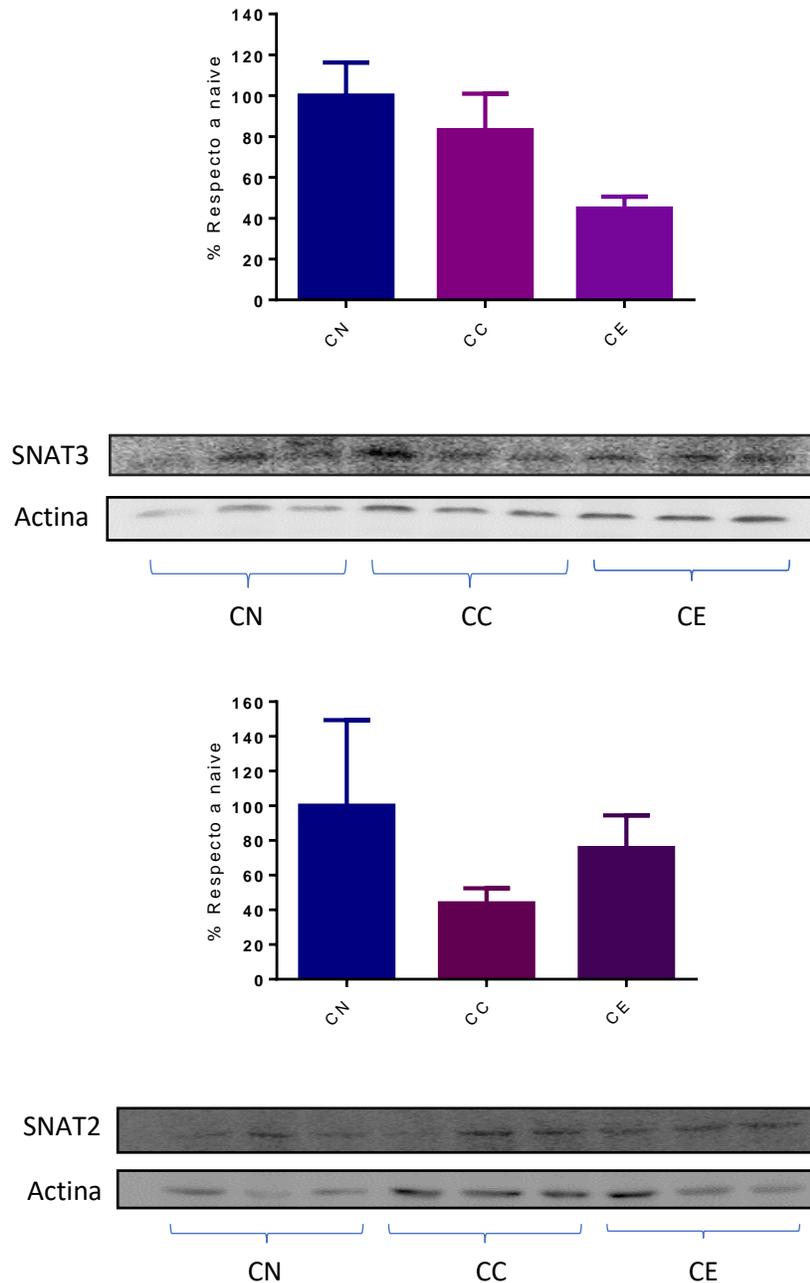


Figura 2. El entrenamiento de evitación pasiva no modifica la expresión de SNAT3 y SNAT2 de cerebelo de rata. Detección de extractos de tejido. n= 3 controles sin exposición a caja de prueba. n= 3 controles caja. n=3 evitación pasiva. ANOVA, Kruskal-Wallis test (*P<0.05). P=0.05 para SNAT3. P = 0.51 para SNAT2. Conclusión: No existen diferencias significativas en la expresión de las proteínas SNAT3 y SNAT2 en el cerebelo, entre animales sin exposición a caja, control caja y los entrenados en la prueba de evitación pasiva. Medidas a las 24 horas después del entrenamiento y noventa minutos después de la evocación.

Efecto de la prueba de evitación pasiva en la expresión de los transportadores SNAT3 y SNAT2 en cerebelo

Se evaluó la expresión de SNAT3 y SNAT2 a partir de tejido procedente de cerebelo. Se compararon dos grupos, correspondientes a tejido de ratas control y tejido de ratas entrenadas, que recibieron entrenamiento y que aprendieron a evitar el compartimento de descarga eléctrica. Los resultados de las inmunodetecciones para SNAT3 y SNAT2 se muestran en la **Figura 3**. Los anticuerpos detectaron una banda a 55 KDa y se utilizó la tinción de Ponceau para normalizar los datos. Las gráficas representan la media \pm DE, de cinco mediciones por condición. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre medias de expresión de SNAT3 entre los dos grupos analizados. Y para el caso de SNAT2 no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias correspondientes a los dos grupos.

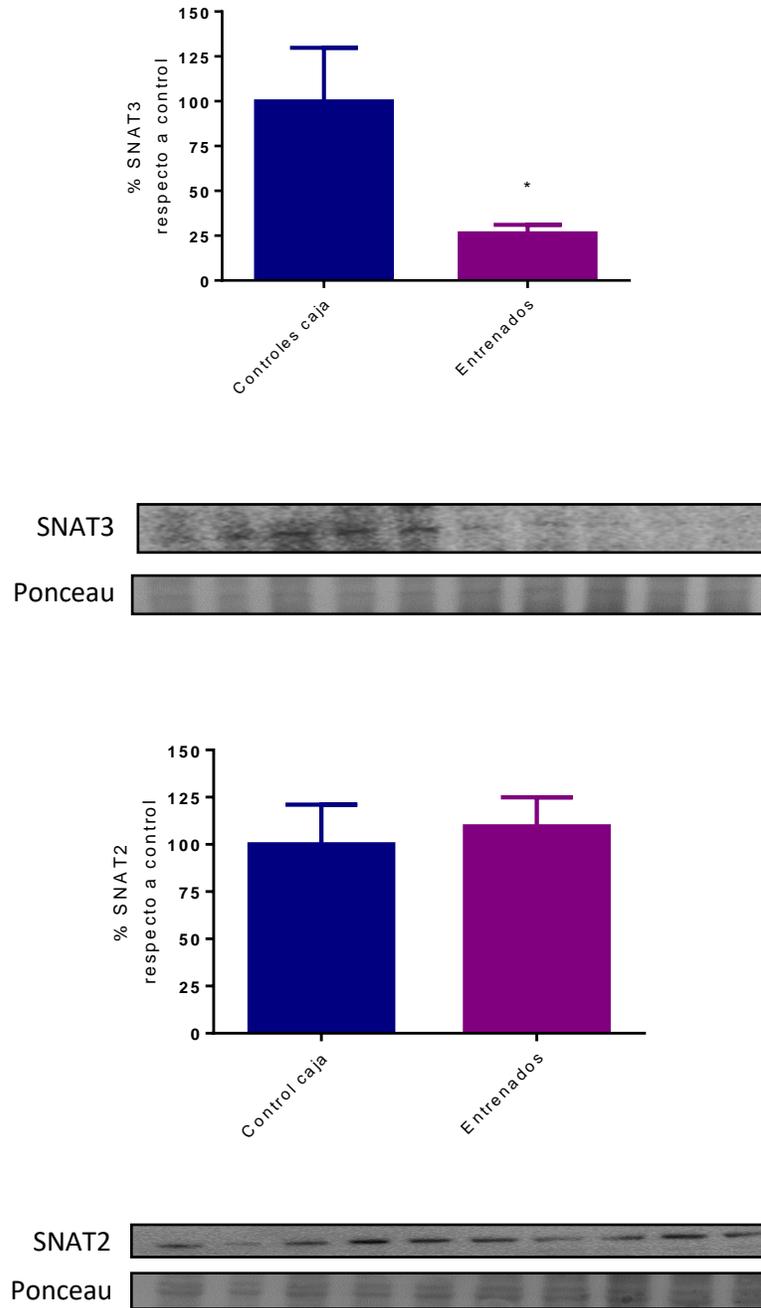


Figura 3. La expresión de la proteína SNAT3 disminuye en cerebelo después de la prueba de evitación pasiva. La detección se realizó a partir de extractos de tejido medidas a las 24 horas después del entrenamiento y noventa minutos después de la evocación. n=5 controles. n= 5 prueba. Se utilizó la prueba T no pareada para comparar los grupos. Se muestran la media \pm SEM, (*P <0.05) P=0.0407 para SNAT3, P=0.723 para SNAT2. La expresión de SNAT3 disminuye significativamente en el cerebelo con el aprendizaje de evitación pasiva. No existen diferencias significativas en la expresión de la proteína SNAT2 entre animales entrenados y no entrenados.

Efecto de la prueba de evitación pasiva en la expresión de los transportadores SNAT3 y SNAT2 en hipocampo

Se evaluó la expresión de SNAT3 y SNAT2 a partir de tejido procedente de hipocampo. Se compararon dos grupos, correspondientes a tejido de ratas control y tejido de ratas entrenadas, que recibieron entrenamiento y que aprendieron a evitar el compartimento de descarga eléctrica. Los resultados de las inmunodetecciones para SNAT3 y SNAT2 se muestran en la **Figura 4**. Los anticuerpos detectaron una banda a 55 KDa y se utilizó la tinción de Ponceau para normalizar los datos. Las gráficas representan la media \pm DE, de cuatro mediciones por condición. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre medias de expresión de SNAT3 entre los dos grupos analizados. Y para el caso de SNAT2 no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias correspondientes a los dos grupos.

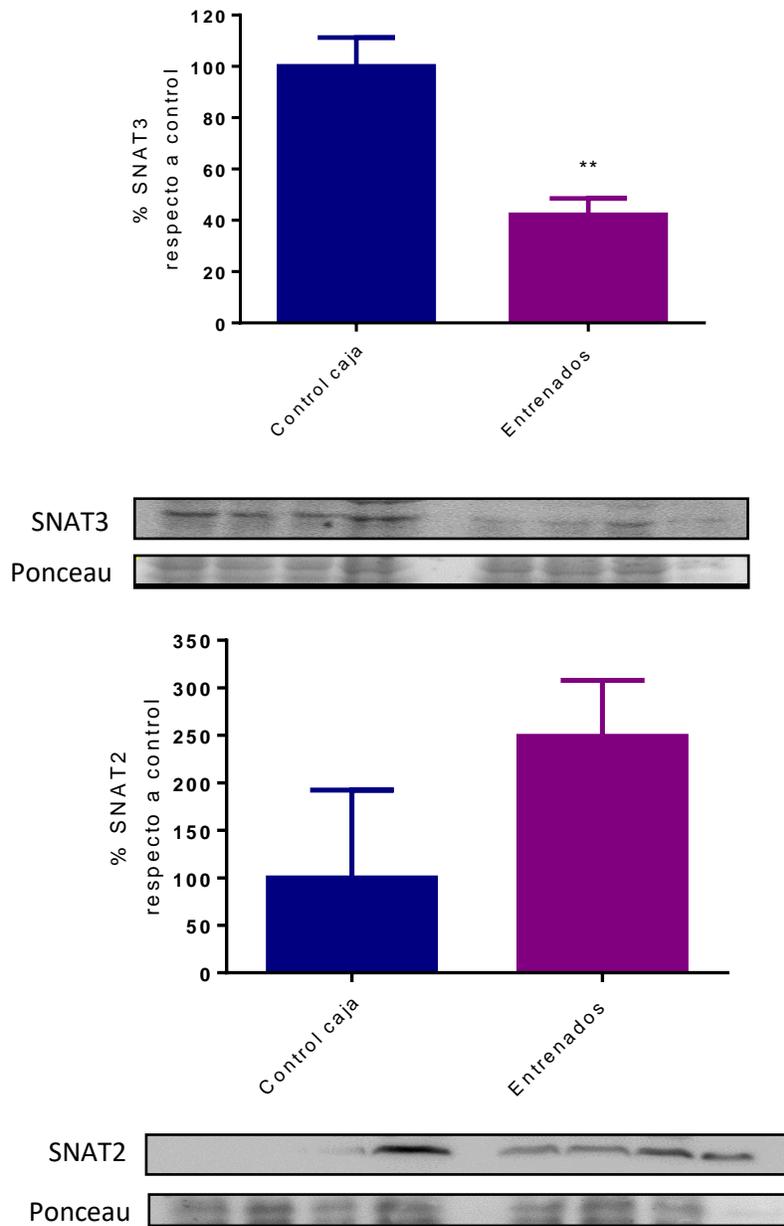


Figura 4. La expresión de la proteína SNAT3 disminuye en hipocampo después de la prueba de evitación pasiva. Se realizó la detección a partir de extractos de tejido después de prueba de evitación pasiva, 24 horas después del entrenamiento y noventa min después de la evocación. $n=4$ controles. $n= 4$ prueba. Se utilizó la prueba T no pareada para comparar los grupos. Las barras en los gráficos muestran la media \pm SEM, ($*P < 0.05$) $P=0.0042$ para SNAT3, $P=0.222$ para SNAT2. La expresión de SNAT3 disminuye significativamente en el hipocampo con el aprendizaje de evitación pasiva. No existen diferencias significativas en la expresión de la proteína SNAT2 entre animales entrenados y no entrenados.

Efecto de la prueba de evitación pasiva en la expresión de los transportadores SNAT3 y SNAT2 en corteza prefrontal

A continuación, se presentan inmunodetecciones realizadas a partir de extractos proteínicos de corteza prefrontal. Se evaluó la expresión de SNAT3 y SNAT2. Se compararon dos grupos, correspondientes a tejido de ratas control y tejido de ratas entrenadas. Los resultados de las inmunodetecciones para SNAT3 y SNAT2 se muestran en la **Figura 5**. Los anticuerpos detectaron una banda a 55 KDa y se utilizó actina para normalizar los datos. Las gráficas representan la media \pm DE, de cinco mediciones por condición. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre medias en la expresión de SNAT3 y SNAT2 de los dos grupos analizados.

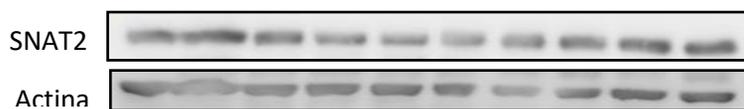
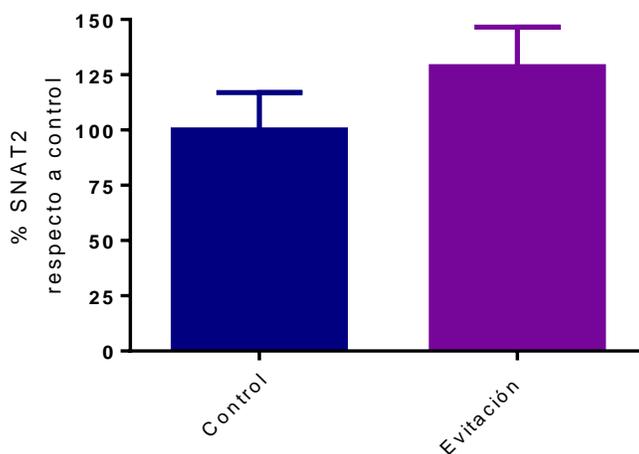
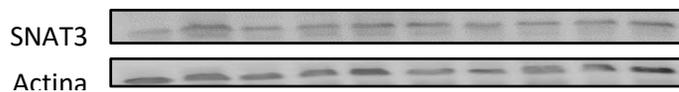
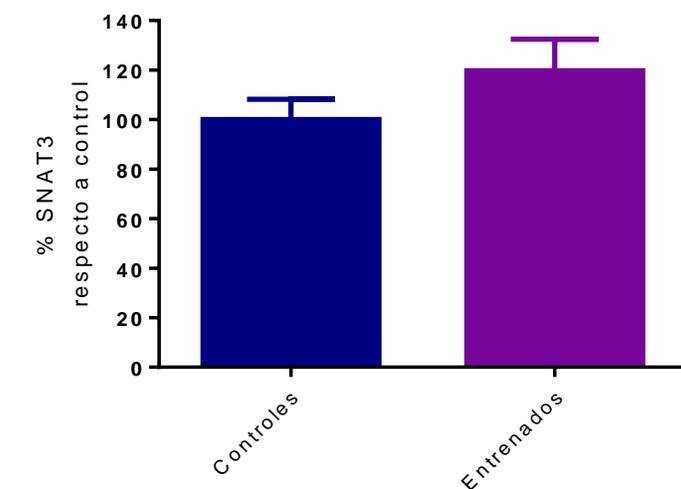


Figura 5. La expresión de SNAT3 y SNAT2 no es modificada en corteza prefrontal después de la prueba de evitación pasiva. La detección fue realizada a partir de extractos de tejido después del entrenamiento y noventa min después de la evocación. n=5 controles. n= 5 prueba. Se utilizó la prueba T no pareada para comparar los grupos. Se muestran la media \pm SEM, (*P <0.05) P=0.226 para SNAT3, P=0.285 para SNAT2. No existen diferencias significativas en la expresión de las proteínas SNAT3 y SNAT2 entre animales entrenados y no entrenados.

Efecto de la prueba de evitación pasiva en la expresión de los transportadores SNAT3 y SNAT2 en el cuerpo estriado

A continuación, se presentan inmunodetecciones realizadas a partir de extractos proteínicos de cuerpo estriado. Se evaluó la expresión de SNAT3 y SNAT2. Se compararon dos grupos, correspondientes a tejido de ratas control y tejido de ratas entrenadas. Los resultados de las inmunodetecciones para SNAT3 y SNAT2 se muestran en la **Figura 6**. Los anticuerpos detectaron una banda a 55 KDa y se utilizó actina para normalizar los datos. Las gráficas representan la media \pm DE, de cinco mediciones por condición. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre medias en la expresión de SNAT2. Y no hubo diferencia estadísticamente significativa entre medias en la expresión de SNAT3.

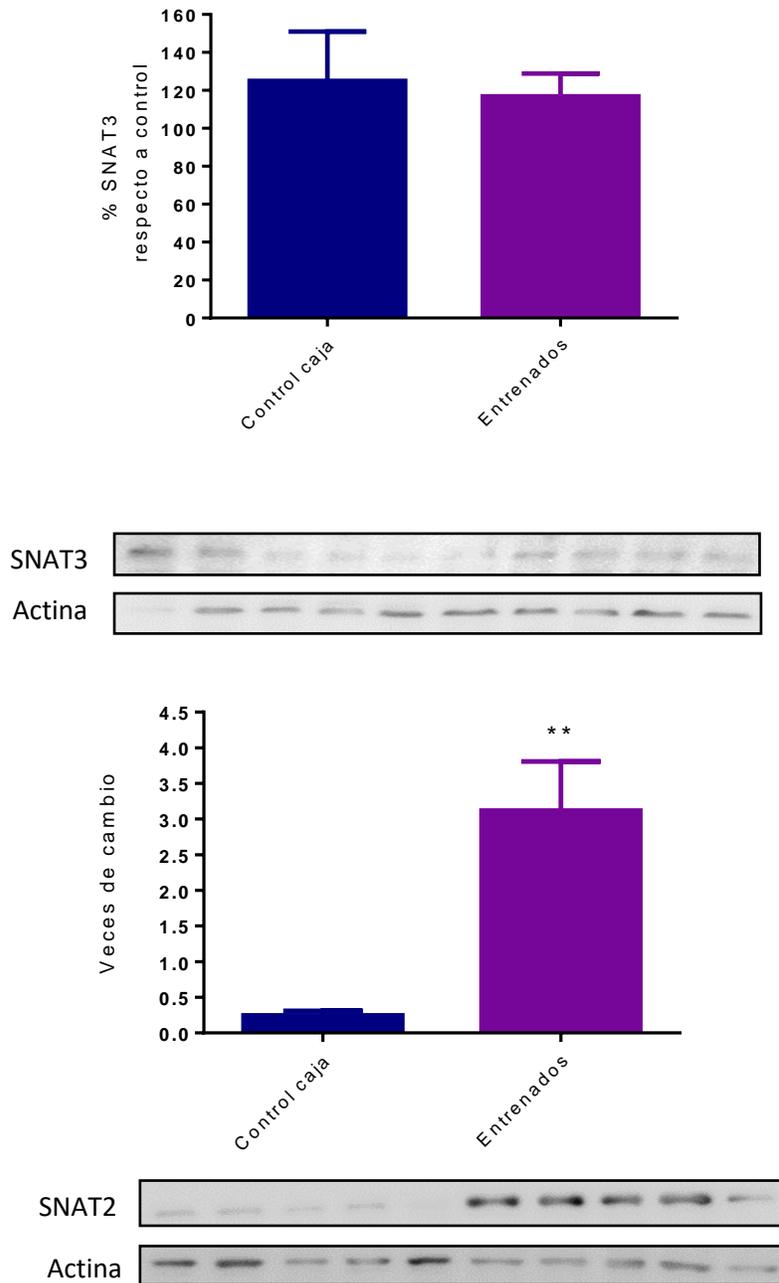


Figura 6. La expresión de la proteína SNAT2 aumenta en cuerpo estriado después de la prueba de evitación pasiva. Se realizó la detección a partir de extractos de tejido después de prueba, 24 horas después del entrenamiento y noventa min después de la evocación. n=5 controles. n= 5 prueba. Se utilizó la prueba T no pareada para comparar los grupos. Se muestran la media \pm SEM, (*P <0.05) P=0.226 para SNAT3, P=0.003 para SNAT2. La expresión de SNAT2 aumenta significativamente en el cuerpo estriado con el aprendizaje de evitación pasiva. Y no hubo diferencia estadísticamente significativa entre medias en la expresión de SNAT3.

Efecto de la prueba de evitación pasiva en la expresión de los transportadores SNAT3 y SNAT2 en la amígdala

A continuación, se presentan inmunodetecciones realizadas a partir de extractos proteínicos de amígdala. Se evaluó la expresión de SNAT3 y SNAT2. Se compararon dos grupos de muestras, correspondientes a tejido de ratas control y tejido de ratas entrenadas. Los resultados de las inmunodetecciones para SNAT3 y SNAT2 se muestran en la **Figura 7**. Los anticuerpos detectaron una banda a 55 KDa y se utilizó actina para normalizar los datos. Las gráficas representan la media \pm DE, de cinco mediciones por condición. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre medias en la expresión de SNAT3. Y no hubo diferencia estadísticamente significativa entre medias en la expresión de SNAT2.

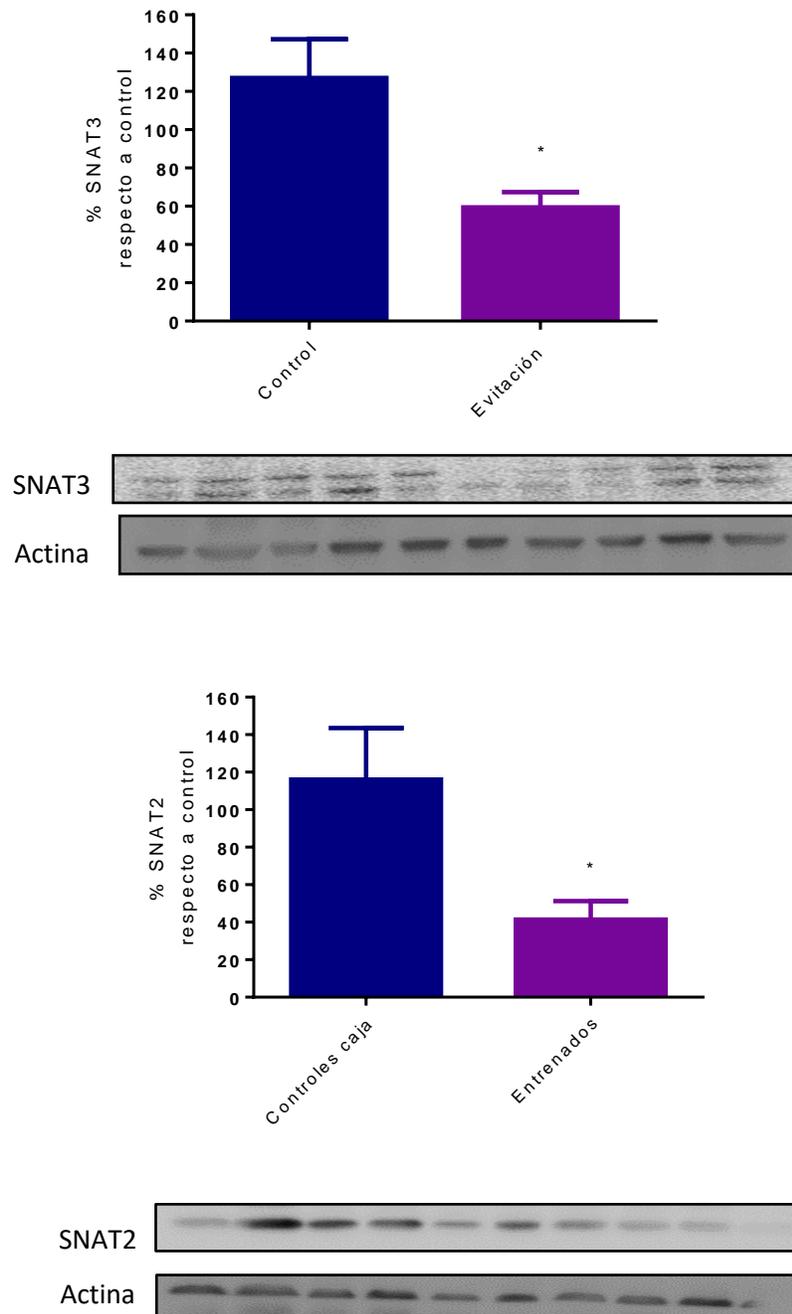


Figura 7. La expresión de la proteína SNAT3 disminuye en amígdala después de la prueba de evitación pasiva. Se realizó la detección a partir de extractos de tejido después de prueba de evitación pasiva, 24 horas después del entrenamiento y noventa min después de la evocación n=5 controles. n= 5 prueba. Se utilizó la prueba T no pareada para comparar los grupos. Se muestran la media \pm SEM, (*P <0.05) P=0.017 para SNAT3, P=0.043 para SNAT2. La expresión de SNAT3 disminuye significativamente en el hipocampo con el aprendizaje de evitación pasiva. No existen diferencias significativas en la expresión de la proteína SNAT2 entre animales entrenados y no entrenados.

Efecto de la exposición a fluoruro en la expresión de los transportadores SNAT2 en hipocampo

Se evaluó la expresión de SNAT2 a partir de tejido procedente de hipocampo de ratas expuestas 40 días a 0, 15 y 50 ppm de F⁻. Se compararon los tres grupos. Los resultados de la inmunodetección para SNAT3 y SNAT2 se muestran en la **Figura 8**. Los anticuerpos detectaron una banda a 55 KDa y se utilizó actina para normalizar los datos. Las gráficas representan la media ± DE, de tres mediciones por condición. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre medias en la expresión de SNAT2 entre los dos grupos analizados.

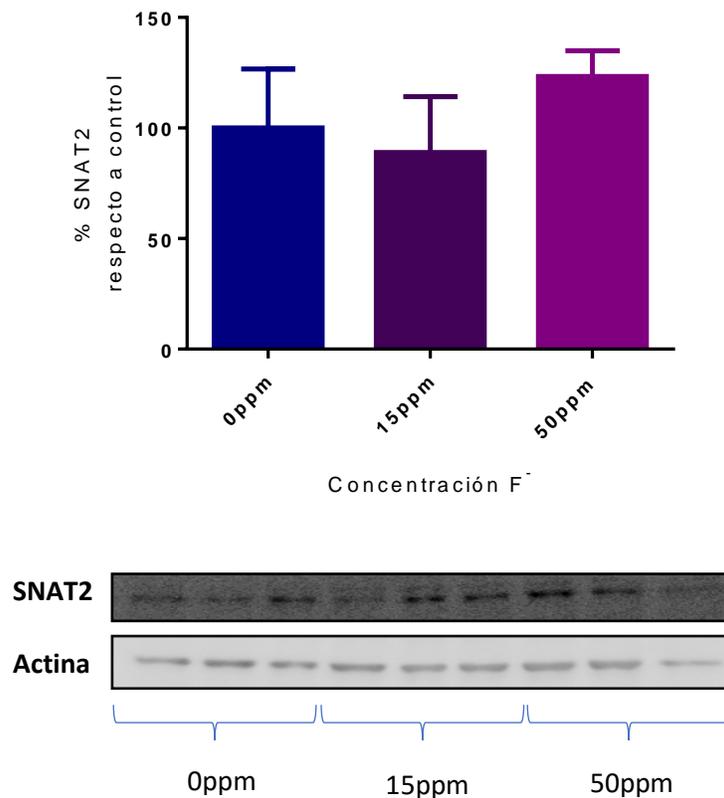


Figura 8. Inmunodetección para SNAT2 de hipocampo. Detección en tejido. n= 3 controles caja 0ppm. n= 3 control caja 15ppm. n=3 control caja 50ppm. ANOVA, Kurskal-Wallis test. P = 0.06. **Conclusión:** No existen diferencias significativas en la expresión de la proteína SNAT2 en el hipocampo, entre animales expuestos y no expuestos a fluoruro. La extracción de tejido se llevó a cabo a las 24 horas después del entrenamiento y noventa min después de la evocación.

Efecto de la exposición a fluoruro en la expresión génica de *slc38a2* y *slc38a3* en tejidos cerebrales

Los resultados de las detecciones para *slc38a2* y *slc38a3* de hipocampo y cerebelo de ratas expuestas y no expuestas a F^- , se muestran en la **Figura 9**. La prueba ANOVA mostró que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión de los genes entre los grupos.

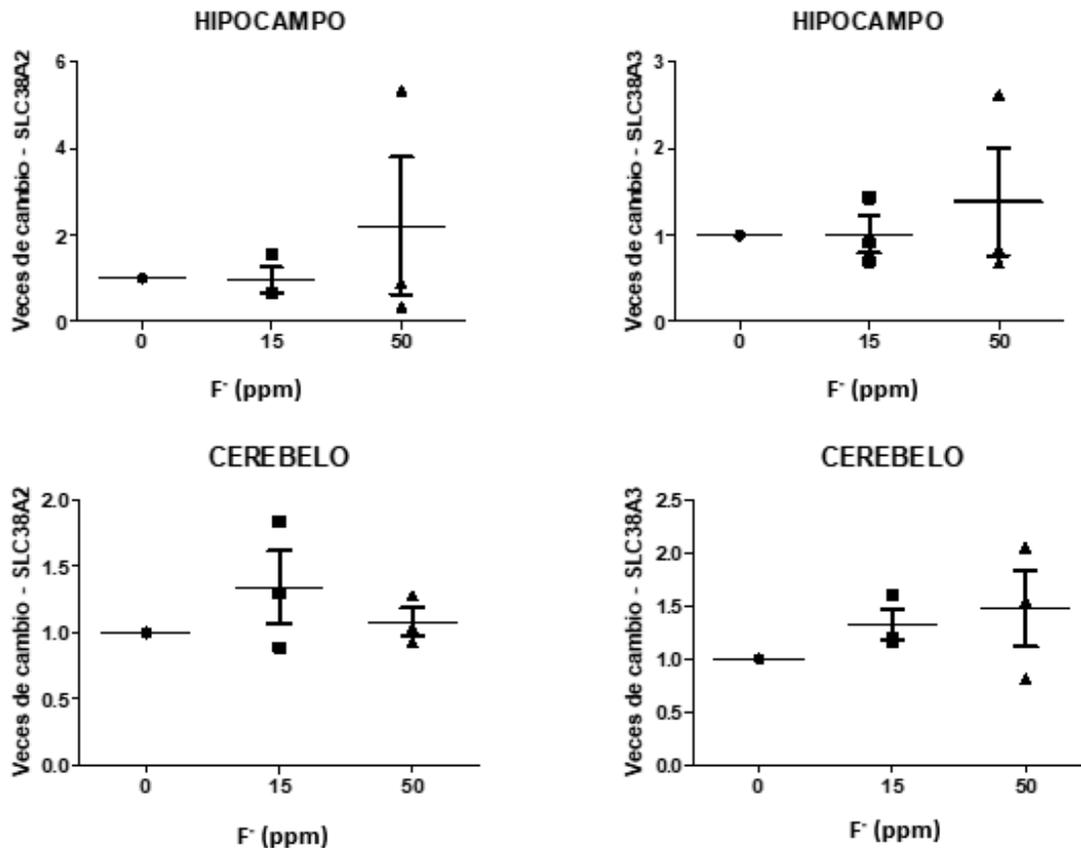


Figura 9. La expresión de *slc38a2* y *slc38a3* en cerebelo e hipocampo de ratas Wistar no es modificada por la exposición a F^- . Los datos presentados se encuentran expresados como veces de cambio relativos a la expresión en ratas control no expuestas, utilizando la media geométrica de actina y GAPDH como referencia $n=3$. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía. Las diferencias entre los grupos no resultaron ser estadísticamente significativas.

Efecto del aprendizaje de evitación pasiva en la expresión génica de *slc38a2* y *slc38a3* en tejidos cerebrales

Los resultados de las detecciones para *slc38a2* y *slc38a3* de hipocampo y cerebelo de ratas control y ratas entrenadas en la prueba de evitación pasiva, se muestran en la **Figura 10**. La prueba ANOVA mostró que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión de los genes entre los grupos.

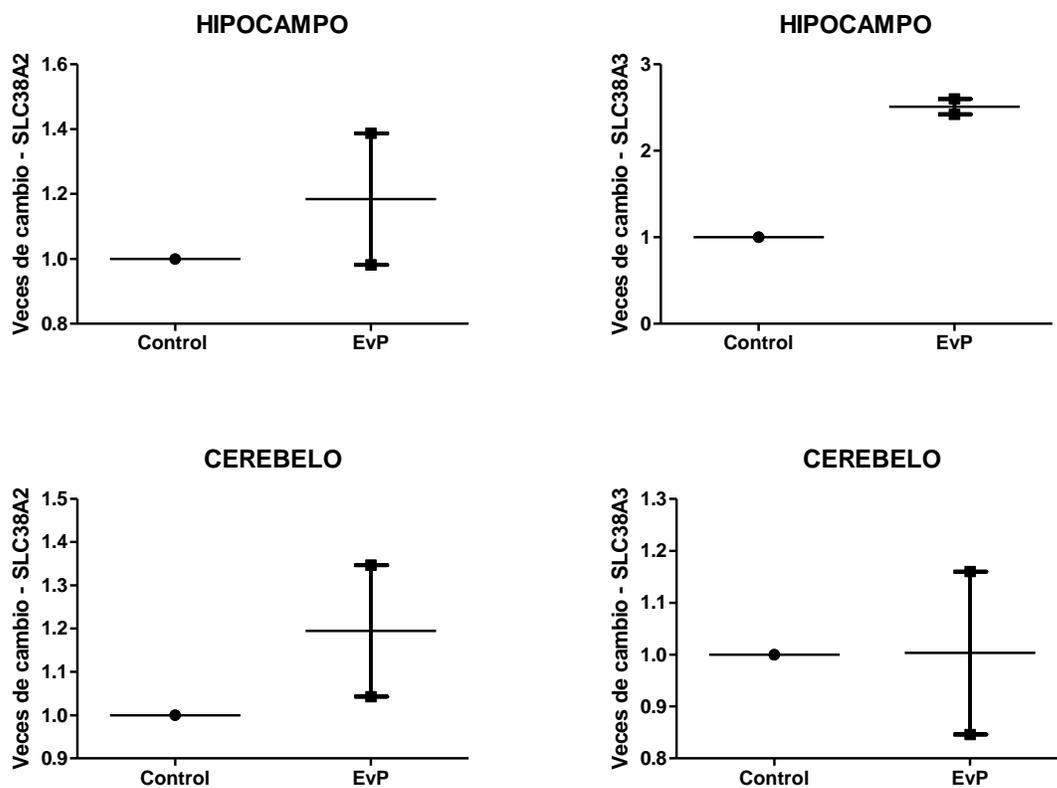


Figura 10. La expresión de *slc38a2* y *slc38a3* en cerebelo e hipocampo de ratas Wistar no es modificada por el aprendizaje de evitación pasiva. Los datos presentados se encuentran expresados como veces de cambio relativos a la expresión génica en ratas control no entrenadas, utilizando la media geométrica de actina y GAPDH como referencia n=3. Las diferencias entre los grupos no resultaron ser estadísticamente significativas.

ANEXO 2

Publicación científica.



Fluoride Exposure Affects Glutamine Uptake in Müller Glia Cells

Ana L. García-López¹ · Jeanett Hernández-Castillo¹ · Luisa C. Hernández-Kelly¹ · Tatiana N. Olivares-Bañuelos² · Arturo Ortega¹ 

Received: 22 May 2020 / Revised: 21 July 2020 / Accepted: 27 July 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Fluoride, a pollutant present in contaminated ground water, oral care products, food, and pesticides, has deleterious effects in the structure and function of the central nervous system. Among the established neurological defects described in the exposed population, a reduced score in intelligence quotient tests in children of contaminated areas has gained attention over the past years. Maternal fluoride exposure during gestation decreases learning and memory abilities that correlate with a significant diminution of glutamate receptors expression. Since the involvement of glia cells in the maintenance and regulation of glutamatergic synapses is well-documented, in this contribution, we characterized the effect of fluoride exposure in the regulation of glia glutamine transporters. To this end, we used the Müller glia cell line, Mio-M1, and through the use of [³H]L-Glutamine uptake experiments and a Western blot approach, we demonstrate here the functional expression of system N of glutamine transporters, SNAT3 and SNAT5, in this model of human retina radial glia cells. Furthermore, these transporters interact with the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1, in an activity-dependent manner. Fluoride treatment reduces glutamine uptake and cell membrane [³H]glutamine surface binding, in good correlation with a decrease in SNAT3 and 5 protein levels. These results demonstrate that glia cells respond to the presence of fluoride reducing glutamine mobilization and by these means decreases glutamate turnover suggesting a disruption of glutamatergic transmission.

Keywords Fluoride · Müller glia cells · Glutamine transporters · Glutamate/glutamine shuttle

Introduction

Human population is constantly exposed to fluoride (F⁻), an important environmental pollutant present in contaminated ground water in combination with other elements such as arsenic (As) (Mondal and Chattopadhyay 2019). Other sources of exposure are dental products, pesticides, and food. It has been estimated that F⁻ concentrations ranging from 3 to 16 mg/kg are lethal to infants, while a 16–64 mg/kg range is deleterious for adults. The maximal level of F⁻ concentration in drinking water has been set to 1.5 mg/L in most

countries, and although the beneficial effects of F⁻ in the prevention of tooth decay is out of question, nowadays the discussion has shifted to a sustained increase in F⁻ deposition in the body; this accumulation leads to the disease known as fluorosis. It has been assumed that this disorder affects teeth and skeletal muscles, but since F⁻ also accumulates in the liver, kidney, pancreas, and central nervous system (CNS), it damages these tissues (National Research Council 2006). Within the encephalon, F⁻ exposure is linked to functional and structural disruptions due to changes in the protein repertoire triggered by this element (Zhou et al. 2017). It alters the global translation process at the elongation phase of protein synthesis in glia cells (Flores-Méndez et al. 2016). In this scenario, chronic F⁻ exposure has been associated to cognitive deficits and a reduced intelligence quotient (IQ) (Ding et al. 2011). Of relevance is the fact that F⁻ treatment results in degeneration of cerebellar Purkinje neurons and radial glia associated to its synapses (Chouhan et al. 2010).

Glutamate (Glu) is the main excitatory amino acid in the vertebrate brain. It exerts its actions through the activation of specific membrane receptors. Its extracellular levels have to be tightly regulated in order to avoid an excitotoxic insult that

✉ Arturo Ortega
aortega@cinvestav.mx

¹ Laboratorio de Neurotoxicología, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Apartado Postal 14-740, 07360 Ciudad de México, Mexico

² Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada 22860, Baja California, Mexico

would lead to the overactivation of its receptors. A family of Glu transporters, particularly enriched in glial cells, are responsible of the removal of this amino acid from the synaptic cleft (Olivares-Bañuelos et al. 2019). Glia cells in the CNS are as abundant as neurons and even outnumber them in particular brain structures (von Bartheld et al. 2016). The role of these cells in synaptic function has started to emerge in the last decades, at least for glutamatergic transmission. Glia-mediated removal of Glu from the synaptic space is needed for a proper and efficient neuronal communication which, in turn, is critically supported by an efficient transmitter recycling. Glu transporters, known as excitatory amino acid transporters (EAAT), efficiently remove this neurotransmitter preventing an overstimulation of Glu receptors and the associated neuronal death via excitotoxicity. Although EAATs are expressed in glia and neurons, glial transporters account for more than 90% of Glu uptake activity in the brain (Danbolt 2001). EAAT1 and EAAT2 are the glial transporters; nevertheless, EAAT2 has also been detected in neurons (Zhou and Danbolt 2013). A differential pattern of exposure of these transporters has been reported in the adult brain, EAAT1 is widely expressed in the cerebellum and the retina, while EAAT2 is abundantly expressed in all the other brain structures. Once the amino acid is internalized into glia cells, it is rapidly metabolized to glutamine (Gln) through the glia-enriched enzyme Gln synthetase. Gln is then released to the vicinity of presynaptic terminals through the reversed function of the neutral amino acid transporters of the N family (SNAT3 and SNAT5) to be taken up by neurons via SNAT1 or SNAT2 members of the A family of neutral amino acid transporters, completing the so-called glutamate/glutamine shuttle (Dienel 2019). Disruption of this cycle interferes with glutamatergic transmission (Billups et al. 2013).

Within the retina, EAAT1 is the main Glu transporter, and it is highly enriched in Müller glia cells (MGC), a type of radial glia that spans the whole retina in which it completely engulfs glutamatergic synapses in a similar fashion as cerebellar Bergmann glia cells (Bringmann et al. 2006; Reichenbach et al. 2010). A functional and metabolic coupling of these cells with all their neighboring neurons has been described (Reichenbach and Bringmann 2013; Olivares-Bañuelos et al. 2019). Taking into consideration the pivotal role of system N Gln transporters for the proper Glu turnover and hence glutamatergic transmission, in this contribution, through the use of a human Müller cell line, the Mio-M1 cells, we describe the expression of SNAT3 and SNAT5 and their interaction with EAAT1. Furthermore, we report the effect of F^- exposure in the function of these transporters. A decrease in [3H]Gln uptake that correlates with a diminished SNAT3 and SNAT5 expression was found. These results strengthen the notion that glia cells are target of F^- exposure and by these means affect Glu-mediated neurotransmission.

Materials and Methods

Materials

Tissue culture reagents were obtained from GE Healthcare (Carlsbad, CA, USA). [3H]-L-Gln (specific activity 50 Ci/mmol) was from PerkinElmer (Boston, MA, USA). The MTT assay was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-SNAT3 (#ab211516) was from Abcam (Cambridge, UK), and anti-SNAT5 (sc-50680) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). The monoclonal anti-actin antibody was a generous gift from Prof. Manuel Hernández (Cinvestav, Mexico City). Secondary antibodies were from Abcam. Horseradish peroxidase-linked secondary antibodies and the enhanced chemiluminescence reagent (ECL) were obtained from GE Healthcare (Carlsbad, CA, USA). All other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Cell Culture and Stimulation Protocol

MIO-M1 cells were cultured in DMEM with high glucose and Glutamax I [Gibco BRL, Cat. 31966-047], containing 10% bovine fetal serum [Gibco], penicillin, and streptomycin. Cell passages were carried once a week by seeding approximately 5×10^5 cells in a 25 cm² flask and fed every 3–4 days. Cells were detached with Trypsin-EDTA 10X (5.0 g/L trypsin, 2.0 g/L EDTA, and 8.5 g/L NaCl) [Gibco BRL, Cat. 354000-027]. After removal of culture medium, 0.05% Trypsin-EDTA was added, and cells were incubated at 37 °C for 2–3 min, until cells detached without losing adherent characteristics. The reaction was stopped by addition of 10% FBS in DMEM. The cells were separated by low-speed centrifugation, and the cell pellet was suspended in DMEM plus 10% FBS. Cells were then seeded and incubated at 37 °C until reaching confluence.

All the pharmacological treatments were carried out in an assay buffer solution (25 mM Hepes-Tris, 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 33.3 mM glucose, and 1 mM NaHPO₄, pH = 7.4).

Staining Procedures

Mio-M1 cells were grown on poly-L-lysine-treated (0.01 mg/mL) coverslips and fixed by exposure for 10 min to 4% paraformaldehyde and washed twice with phosphate buffer saline (PBS) containing 0.5% Triton X-100. Non-specific binding was prevented by incubation with 1% bovine serum albumin (blocking solution) in PBS for 1 h. The cells were exposed to the primary antibodies (anti-SNAT3 or anti-SNAT5) for 2 h at 25 °C. The coverslips were washed with PBS/Triton X-100 and incubated with fluorescent-labeled secondary antibodies. Preparations were mounted with Fluoroshield/DAPI and

examined under a fluorescence microscopy (Zeiss Axioskop 40 immunofluorescence microscope and the AxioVision software; Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY). Alternatively, images were acquired with a confocal laser system (TCS-SP5, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

Cell Viability Assay

Cell viability was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Mio-M1 cells were seeded in 24-well plates (1×10^6 cells/well) and maintained as mentioned above. Subsequently, the cultures were treated with NaF or vehicle in complete DMEM medium for the indicated time. After treatment, 20 μ L of MTT solution (5 mg/mL) were added to each well, and plates were incubated for 4 h at 37 °C. Next, the culture media was discarded, and 50 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, MO, USA) were added to each well to dissolve the crystals formed by MTT reagent (Sigma-Aldrich, MO, USA). Absorbance was measured with a microplate reader (BioTek Instruments, VT, USA) at 570 nm, using a reference wavelength of 630 nm. Experiments were performed in quadruplicates in three independent cultures.

[³H]L-Gln Uptake

Mio-M1 monolayers were washed to remove non-adherent cells with solution A containing 25 mM HEPES-Tris, 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 33.3 mM glucose, and 1 mM NaH₂PO₄ at pH 7.4. When indicated, NaCl was replaced by lithium chloride/or choline chloride. [³H]L-Gln uptake experiments were initiated at $t = 0$ by the addition of solution A containing 0.5 μ Ci/mL of [³H]L-Gln and 0.2 mM L-Gln. The reaction was stopped by aspirating the radioactive medium, and the monolayers were washed within 15 s with 0.5 mL of ice-cold solution A. Michaelis-Menten analyses were determined with 0.5, 1.5, 3, 5, 7.5, and 10 mM concentrations of L-Gln. The monolayers were then exposed for 2 h to 0.5 mL of 1 M NaOH and the radioactivity determined via scintillation counting. Protein content was determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad, CA, USA). Radioactivity was corrected for protein levels and calculated as [³H]L-Gln pmol/mg protein min⁻¹. Robust nonlinear regression was used to fit a model to the experimental data and estimate the parameters of Michaelis-Menten equation. A minimum of three experiments in quadruplicates was performed for each condition.

[³H]L-Gln Binding

Mio-M1 monolayers were washed to remove non-adherent cells with solution A. [³H]L-Gln binding was initiated at $t = 0$ and 4 °C by the addition of ice-cold solution A containing

0.8 μ Ci/mL of [³H]L-Gln and 0.2 mM L-Gln or 5 mM L-Gln. The reaction was stopped after 30 min of incubation (4 °C) by aspirating the radioactive medium. The monolayers were washed within 15 s with 0.5 mL of ice-cold solution A and exposed for 2 h to 0.5 mL of 1 M NaOH. The radioactivity was determined by scintillation counting, corrected for protein levels, and calculated as [³H]L-Gln pmol/(mg protein min⁻¹). The specific binding was obtained by subtraction of radioactivity obtained at 5 mM L-Gln + 0.8 μ Ci/mL of [³H]L-Gln to that obtained at 0.2 mM + 0.8 μ Ci/mL of [³H]L-Gln.

Immunoprecipitation and Western Blots

Cells from confluent monolayers were harvested with PBS containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/mL aprotinin, 1 mg/mL leupeptin). Cell suspensions were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/mL aprotinin, 1 mg/mL leupeptin, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, pH 7.4). Cell lysates were pre-absorbed with 15 μ L of protein G coupled to Sepharose 4B for 25 min at 4 °C. The cleared lysates (1 mg protein) were incubated with agarose coupled anti-SNAT3 or anti-SNAT5 or anti-EAAT1 antibodies for 10 h at 4 °C and then immunoblotted.

For Western blots, immunoprecipitates or cell lysates were denatured in Laemmli's sample buffer, and equal amounts of protein (approximately 50 μ g as determined by the Bradford method) were resolved through 10% SDS-PAGE slab gels and then electroblotted to nitrocellulose membranes. Blots were stained with Ponceau S stain to confirm that protein content was equal in all lanes. Membranes were soaked in PBS to remove the Ponceau S and incubated in TBS containing 5% dried skimmed milk and 0.1% Tween 20 for 2 h to block the excess of non-specific protein binding sites. Membranes were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies as indicated in each figure, followed by the respective secondary antibodies incubation for 2 h at room temperature. Immunoreactive polypeptides were detected by chemiluminescence with a MicroChemi DNR Bio-Imaging System imager. Densitometry analyses were performed with Image J64 application (Schneider et al. 2012) and data analyzed with Prism 5 GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

Statistical Analysis

The mean and SEM were determined for each set of data. Nonparametric Kruskal-Wallis was used followed by Dunn's post hoc, unless otherwise specified. Extra sum-of-squares F test was used for statistical analysis of transport kinetic experiments. A probability of 0.05 or less was

considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software (La Jolla, CA, USA).

Results

Mio-M1 Cells Express Functional Neutral Amino Acid Transporters of the N Family

Radial glia cells in the adult CNS completely wrap glutamatergic and GABAergic synapses (Somogyi et al. 1989; Bringmann et al. 2000; Buffo and Rossi 2013) in sharp contrast to astrocytes in other brain structures such as cerebral cortex. In this scenario, radial glia cells are a good example of a tight glia/neuronal coupling in terms of the proper and efficient function of glutamatergic and GABAergic transmission, simply due to their recognized involvement in neurotransmitter recycling, through the GABA/Glu/Gln shuttle (Hertz and Rothman 2017). Neutral amino acid transporters of the N family have been implicated in this coupling since these proteins are capable to function in reverse mode, enabling them to release Gln. In this context, our first approach consisted in the pharmacological characterization of [³H]L-Gln uptake activity in our culture system: the Mio-M1 cell line. The results are presented in Fig. 1a. Taking into consideration that besides system N, system A, ASC, and L are the most relevant Gln transporters (Leke and Schousboe 2016), a pharmacological approach was used to gain insight into the differential contributions of these carriers to Gln uptake in Mio-M1 cells. Since it is known that system N is more efficient than the other carriers to transport L-Gln when Na⁺ is substituted by Li⁺, we decided to use a LiCl-containing solution. In such scenario, 60% of the Gln uptake activity remains. Additionally, we made amino acid competition experiments, and we used MeAIB, an inhibitor of system A, and alanine as a competitor for systems Asc, A, and N; we used the mix of leucine and threonine as competitors for systems Asc and L. As shown in Fig. 1a, a 40% reduction of [³H]L-glutamine is present in LiCl solution. When MeAIB (system A inhibitor) is used, 50% of the transport is blocked, and when used in combination of Leu (competitor for the L transporter) and Thr (competitor for the ASC transporter), approximately 30% of the [³H]L-Gln transport remains, suggesting that this amount of Gln is transported through system N (SNAT3 and 5). Apparently 27% of the transport is system A-mediated, and 24% Gln is taken up via ASC.

A biochemical evidence of the expression of system N subtype of neutral amino acid transporters was sought through the use of anti-SNAT3 and anti-SNAT5 antibodies. The characteristic 55 kDa polypeptide bands corresponding to SNAT3 and 5 are present in our culture system (Fig. 1b). Furthermore, immunocytochemical experiments demonstrated a mostly

cytoplasmic localization, in line with the rather long half-life of transporter proteins (Fig. 1c) (Pochini et al. 2014).

Coupling of Glu and Gln Transporters in Mio-M1 Cells

Taking into consideration the pivotal role of system N transporters in Glu turnover and the reported functional and physical coupling between SNAT3 and GLAST in primary cultures of chick Bergmann glia cells (Martínez-Lozada et al. 2013), we decided to evaluate if such a biochemical association would take place in Mio-M1 cells. As depicted in Fig. 2, the exposure to a fixed 1 mM Glu concentration for 30 min leads to the coimmunoprecipitation of GLAST/EAAT1 with SNAT3 (Fig. 2a) and with SNAT5 (Fig. 2b), in fully concordance with the reported SNAT/GLAST interaction in cerebellar radial glia cell.

Fluoride Exposure Downregulates [³H]Gln Uptake

As already mentioned, in glia cells that surround glutamatergic synapses, a tight coupling between Glu uptake, Gln synthesis, and release plays a fundamental role in the continuity of transmission via this excitatory amino acid (Oliva-Bañuelos et al. 2019). The functional activity of system N Gln transporters is assayed through a [³H]Gln uptake assay or a [³H]Gln release technique since these proteins are capable to function also in reverse mode. In fact, we and others have been able to demonstrate that the increase in [Na]_i that results from the GLAST-mediated Glu uptake is the driving force needed for Gln efflux (Martínez-Lozada et al. 2013; Todd et al. 2017). Therefore, preincubation with a GLAST/EAAT1 ligand such as D-aspartate at a concentration in the range of GLAST/EAAT1 K_M (50 μM) would reduce Na⁺-dependent Gln uptake, simply because the driving force needed by the Gln transporters has been vanished by GLAST/EAAT1. Therefore, this preincubation with D-aspartate was used as a control in [³H]Gln uptake experiments. We explored the effect of a preincubation with a 500 μM F⁻ concentration in the Mio-M1 Gln uptake activity. The results are shown in Fig. 3a, and a 22% reduction in the activity was found, similar to the D-aspartate effect. To rule out an F⁻-triggered cytotoxic scenario, we decided to measure the cell viability upon the exposure to this halogen. To this end, we used the MTT assay, and as shown in Fig. 3b, F⁻ exposure does not affect cell viability. At this stage, the decrease in Gln uptake upon F⁻ could be the result of a reduction of Gln transporters in the plasma membrane or due to a change in the transporter affinity towards its ligand. To gain insight into these two possibilities, we decided to perform kinetic (Michaelis-Menten) experiments. A clear reduction in V_{max} is present in both total and system N (Li⁺)-mediated Gln transport (Fig. 3c and d).

To support this data, we performed [³H]Gln binding experiments in control and exposed cells, as shown in

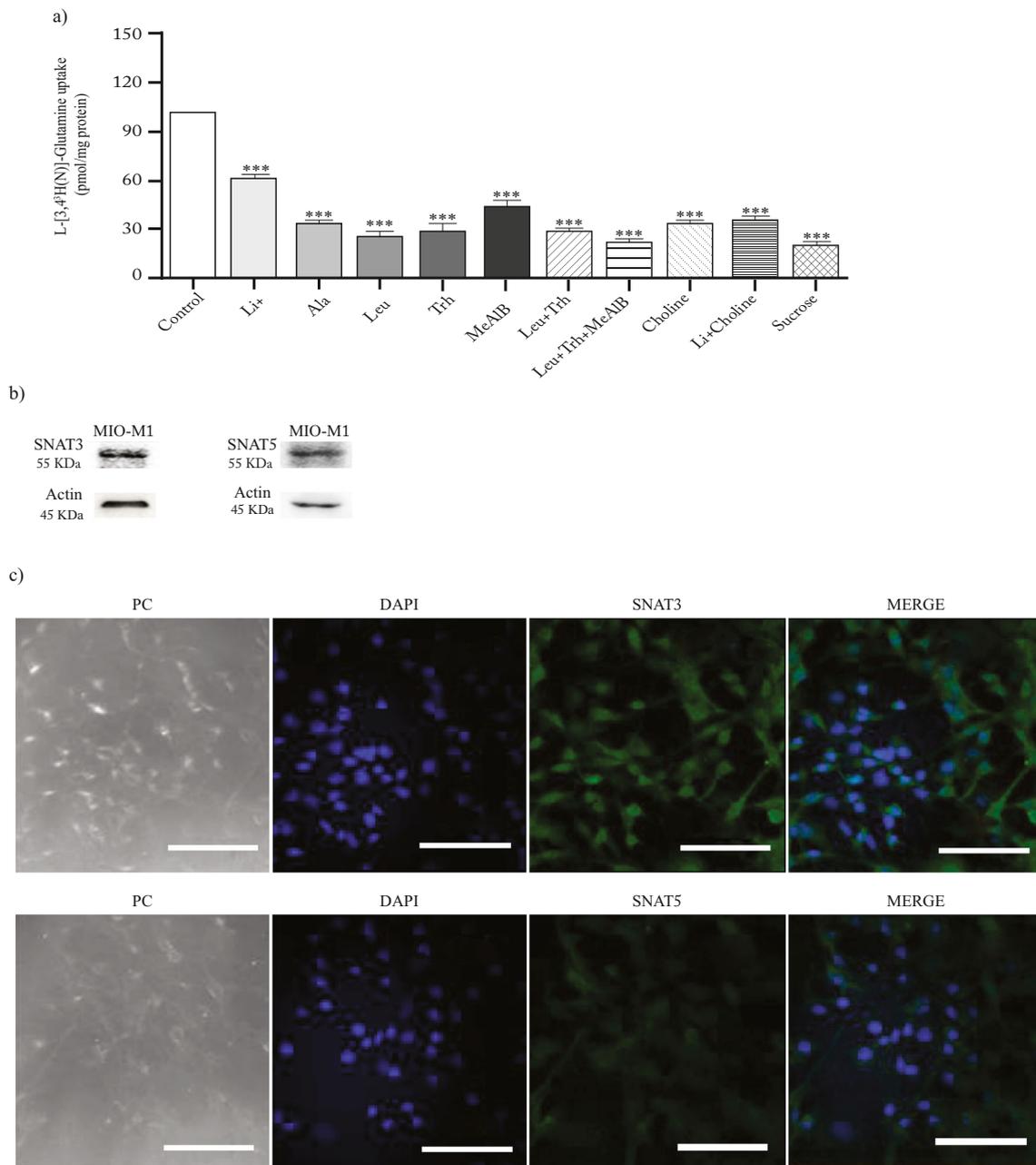


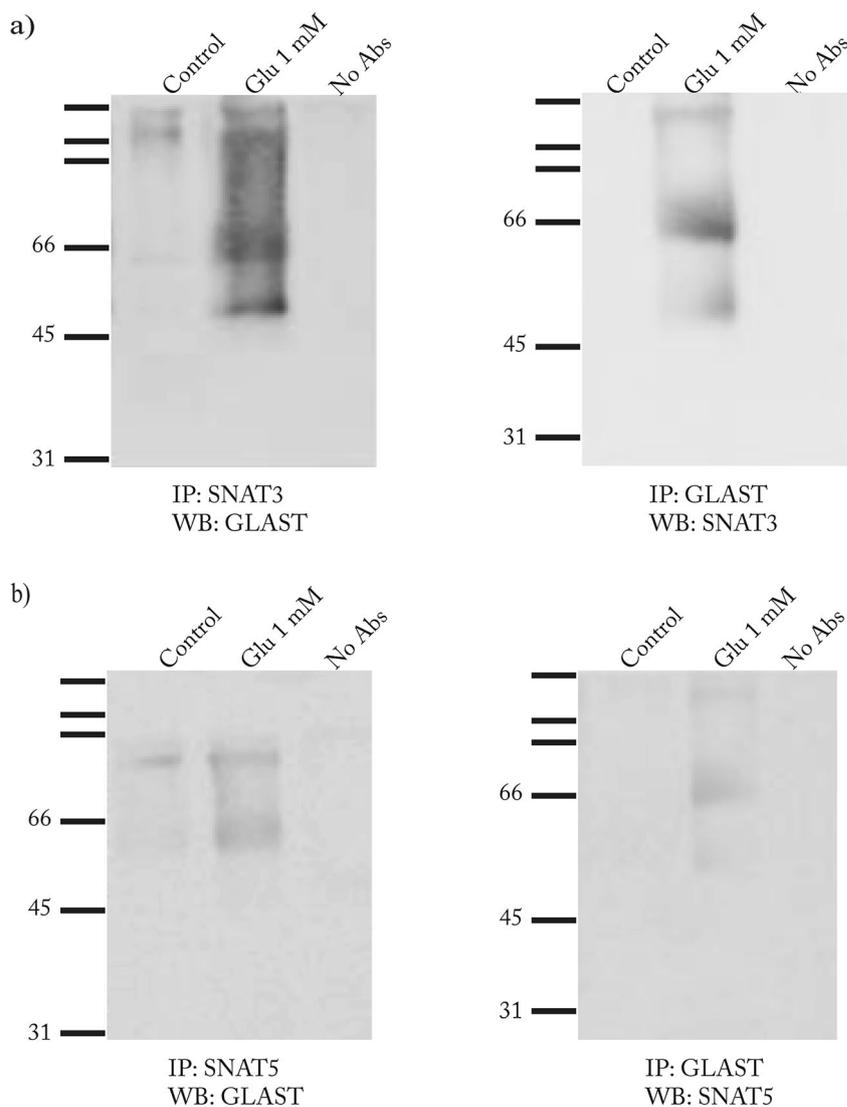
Fig. 1 Mio-M1 cells express functional neutral amino acid transporters of the N family. **a** Pharmacological characterization of L-[3,4³H(N)]-glutamine uptake activity in Mio-M1 cells. Confluent Mio-M1 cells were stimulated with Ala, Leu, Thr, and MeAIB, and the [³H]L-Gln uptake assay was performed for 30 min. Results are the mean ± SEM of three independent experiments in quadruplicates. Statistical analysis was performed comparing against non-stimulated cells using a nonparametric Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test (****P* < 0.001). **b** Expression of system N subtype of neutral amino acid transporters in

Mio-M1 cells. Cleared lysates of these cells (1 mg protein) were incubated with agarose coupled anti-SNAT3, anti-SNAT5, or anti-actin antibodies for 10 h and then immunoblotted. A representative blot of four determinations is shown. **c** Cellular localization of SNAT3 and SNAT5 in Mio-M1 cultures. Fixed Mio-M1 cells were incubated with either an anti-SNAT3 or anti-SNAT5 antibody in a dilution 1:100. Cell staining with anti-SNAT3 or anti-SNAT5 antibodies (green) is shown. Phase contrast (PC) microphotograph of Mio-M1 morphology, DAPI counter-stained nucleus (blue), and merged images are also shown. Scale bar 50 μm

Fig. 4a, and a clear reduction in specific [³H]Gln binding was detected in F⁻-exposed cells. To challenge the possibility that at least part of this reduction might represent a decrease in system N protein levels, a Western blot

approach was used. The results are presented in Fig. 4b and c. A time-dependent reduction in SNAT3 (Fig. 4b) and SNAT 5 (Fig. 4c) immunoreactivity was found after F⁻ exposure.

Fig. 2 Activity-dependent Glu and Gln transporters physical interaction in Mio-M1 cells. Mio-M1 cells were exposed to a fixed 1 mM Glu concentration for 30 min, and the coimmunoprecipitation of GLAST/EAAT1 was done with SNAT3 and vice versa (**a**). The same protocol was used to establish the EAAT1/SNAT5 coupling (**b**) antibodies. A representative blot of four determinations is shown



Finally, taking into consideration our previous findings in Bergmann glia cells concerning the fact that F^- exposure downregulates the elongation phase of protein synthesis in a Ca^{2+} -dependent manner and that this effect involves the activation of the Na^+/Ca^{2+} exchanger (Flores-Méndez et al. 2014), we decided to explore if the reduction in $[^3H]Gln$ influx detected after F^- exposure might involve the Na^+/Ca^{2+} exchanger. To this end, we pre-treated the cells with KBR, an established blocker of this exchanger. The results are shown in Fig. 5. The reduction of $[^3H]Gln$ influx triggered by F^- is abolished by the exchange blocker, and accordingly, the recorded reduction in Gln entry upon F^- is abolished by a preincubation with the Ca^{2+} chelator BAPTA (Fig. 5), suggesting that the effect of exposure to this halogen involves an increase in $[Ca^{2+}]_i$ as we have demonstrated in cerebellar Bergmann glia cells (Flores-Méndez et al. 2014). Clearly, more experiments are needed to gain insight into the

molecular basis of F^- toxicity in the CNS in general and in particular in glia cells.

Discussion

The neurotoxic effects of F^- are far from being completely established, although a consensus of the deleterious effect of the exposure to this element in the development and function of the CNS has been present in the last decade (Chouhan and Flora 2010; Bartos et al. 2018; Grandjean 2019; Saeed et al. 2020). Nevertheless, few studies have focused on the effect of F^- in glia cells, although the involvement of microglia cells as mediators of neurotoxic effects has been suggested (Yan et al. 2013; Yang et al. 2018). A convergence point of the in vivo and in vitro studies of F^- exposure is glutamatergic neurotransmission. The role of the major excitatory amino acid in

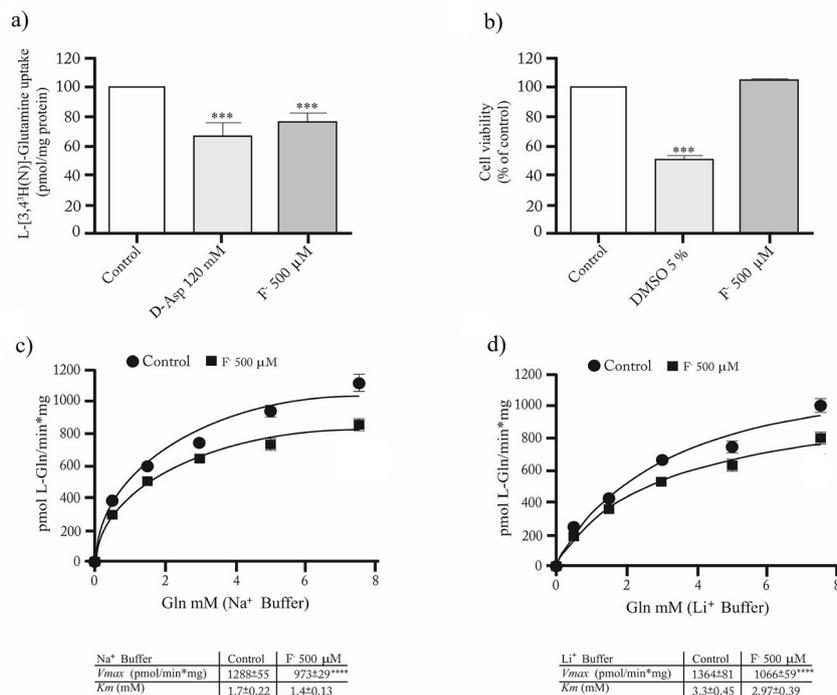


Fig. 3 F⁻ exposure decreases [³H]Gln uptake. [³H] Gln transport is saturable and inhibited by fluoride in Mio-M1 cells. Mio-M1 cells were preincubated with a 500 μM F⁻ concentration to quantify Gln uptake activity (**a**) and their cell viability by MTT assays (**b**). Michaelis-Menten kinetic experiments were carried out to establish the K_M and V_{max} constants (**c**). Preincubation with D-aspartate was used as a control for [³H]Gln uptake, and DMSO 5% cell incubation was the control in

viability analysis. For all panels, three independent experiments in quadruplicate ± SEM are graphed for each data point. On panels **a** and **b**, statistical analysis was performed using a nonparametric Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test; ****P* < 0.001. On panels **c** and **d**, statistical analysis was performed using extra sum-of-squares F test, and best fit values differ between data sets (control vs F) for V_{max}; *P* < 0.0001

development and proper brain function is undebatable, as the now widely accepted participation of astrocytes in the regulation and function of glutamatergic synapses in what now is known as the tripartite synapse has attracted much attention (Gonçalves et al. 2018; Cresto et al. 2019; Olivares-Bañuelos et al. 2019). Basically, astrocytes wrapping glutamatergic synapses are responsible for the proper recycling of the neurotransmitter since in these cells, the vast majority of the brain Glu uptake activity takes place in the brain (Danbolt et al. 2016). Moreover, an energetic coupling in these synapses and their surrounding radial glia cells has also been characterized. This metabolic coupling is known as the astrocyte neuronal lactate shuttle (Pellerin and Magistretti 2012). In this context, our group has been actively working in the signal transactions triggered by the Glu removal through EAAT1/GLAST and its crucial role in Glu turnover and process in which system N Gln transporters, namely, SNAT3 and SNAT5, participate (reviewed in Martínez-Lozada and Ortega 2015).

Given the fact that F⁻ exposure has been linked to cognitive deficits and that the pivotal involvement of glutamatergic transmission in learning and memory processes has long been reported (see Lutz and Castillo 2020 for a recent review), we decided to challenge the idea of glial cells and specifically

components of the Glu/Gln shuttle, as targets of the deleterious effect of F⁻ exposure. It should be noted that F⁻ permeates the blood-brain barrier; therefore, its concentrations in human cerebrospinal fluid approach those occurring in serum (Hu and Wu 1988). Interestingly, the analysis of serum and urine levels in exposed population has shown that F⁻ levels in these fluids are approximately equal to the F⁻ concentration in drinking water (National Research Council (USA) 2006). Therefore, since concentrations as high as 9.5 μg/mL have been reported in F⁻ endemic areas such as San Luis Potosí, México; Shanyin, China; and Pradesh, India (Rocha-Amador et al. 2007; Wang et al. 2007; Saxena et al. 2012), the 500 μM concentration used in this study is in fact more or less the concentration expected to be found in the cerebrospinal fluid of exposed population. This concentration is pathophysiological (Barbier et al. 2010). Previous results from our lab, using a primary cultures of chick cerebellar Bergmann glia cells, demonstrated that radial glia are sensitive to F⁻ exposure modifying their protein synthesis at the level of elongation through an increase [Ca²⁺]_i and the increase in eukaryotic elongation factor 2 phosphorylation, preventing ribosomal translocation halting the synthesis process (Flores-Méndez et al. 2014). With this in mind, in the present contribution, we first explored the possibility that a radial glia model of human origin

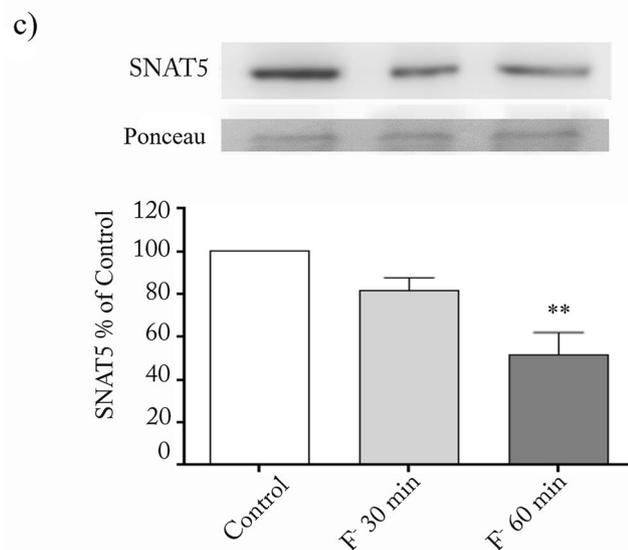
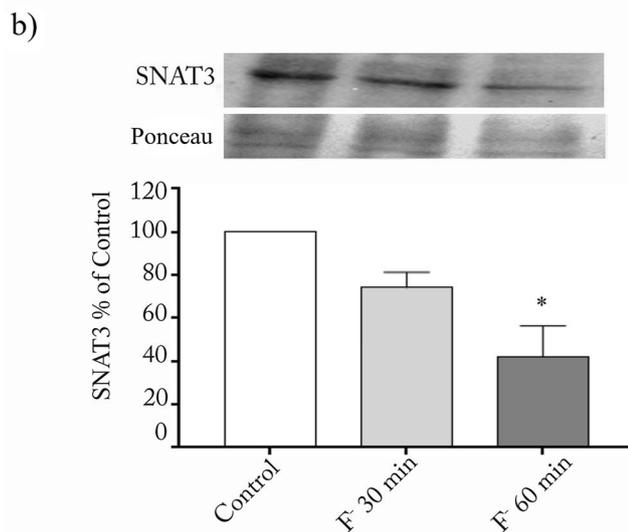
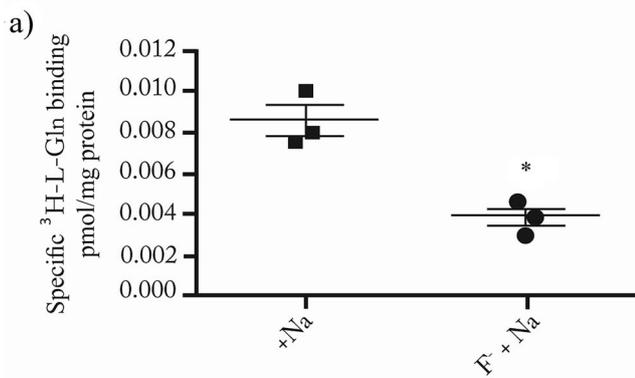


Fig. 4 Reduction of [³H]Gln binding and SNAT3/5 protein levels upon F⁻ treatment. **a** [³H]Gln binding experiments were carried out in either control or F⁻-exposed Mio-M1 cells. Statistical analysis was performed comparing against non-stimulated cells using unpaired *t* test (**P* < 0.05). **b** Monolayers of Mio-M1 cells were treated for 30 or 60 min with 500 μM F⁻, and cell protein extracts were prepared. Approximately 50 μg of protein per lane were analyzed via Western blot with anti-SNAT3 antibodies. **c** Mio-M1 cell protein extracts from control or fluoride-treated cells were analyzed via Western blot with anti-SNAT5 antibodies. On panels **b** and **c**, a representative blot of at least three independent experiments is presented on top of the graph. Graphs represent the statistical analysis performed comparing against non-stimulated cells using a nonparametric Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test (**P* < 0.01, ***P* < 0.001) of at least three independent experiments

since no Bergmann glia cell line of human origin is available. It should be noted that over the years, we have shown that these two cell types respond in a similar manner to Glu (reviewed in Martínez-Lozada and Ortega 2015). Moreover, we decided to go further and evaluated the functionality of Gln transporters in the context of F⁻ treatment. In line with a plausible disruption of proper Glu cycling in exposed population as part of the molecular basis of cognitive impairment, we report here the reduction in system N function in human Müller cells. A summary of our findings is provided in Fig. 6. F⁻ exposure leads to Ca²⁺ influx, which would activate the Na⁺/Ca²⁺ exchanger resulting in an increase in [Na⁺]_i, and by these means prevents Gln uptake due to the dissipation of the Na⁺ gradient needed for system N Gln transporters. Since it is clear that the F⁻ effect is intracellular, several questions remain to be answered: what is the actual route for F⁻ entry?

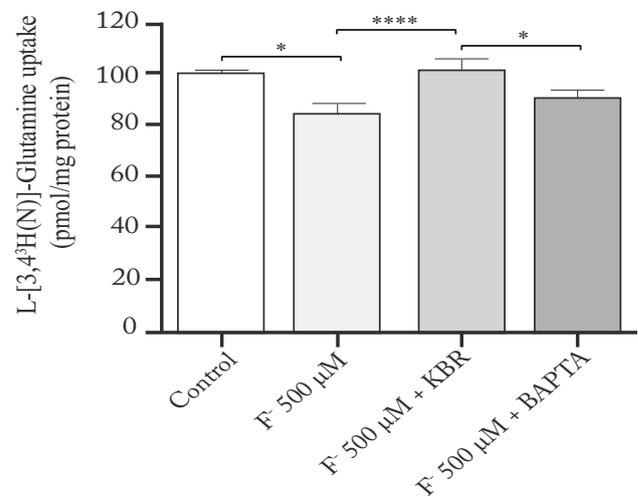
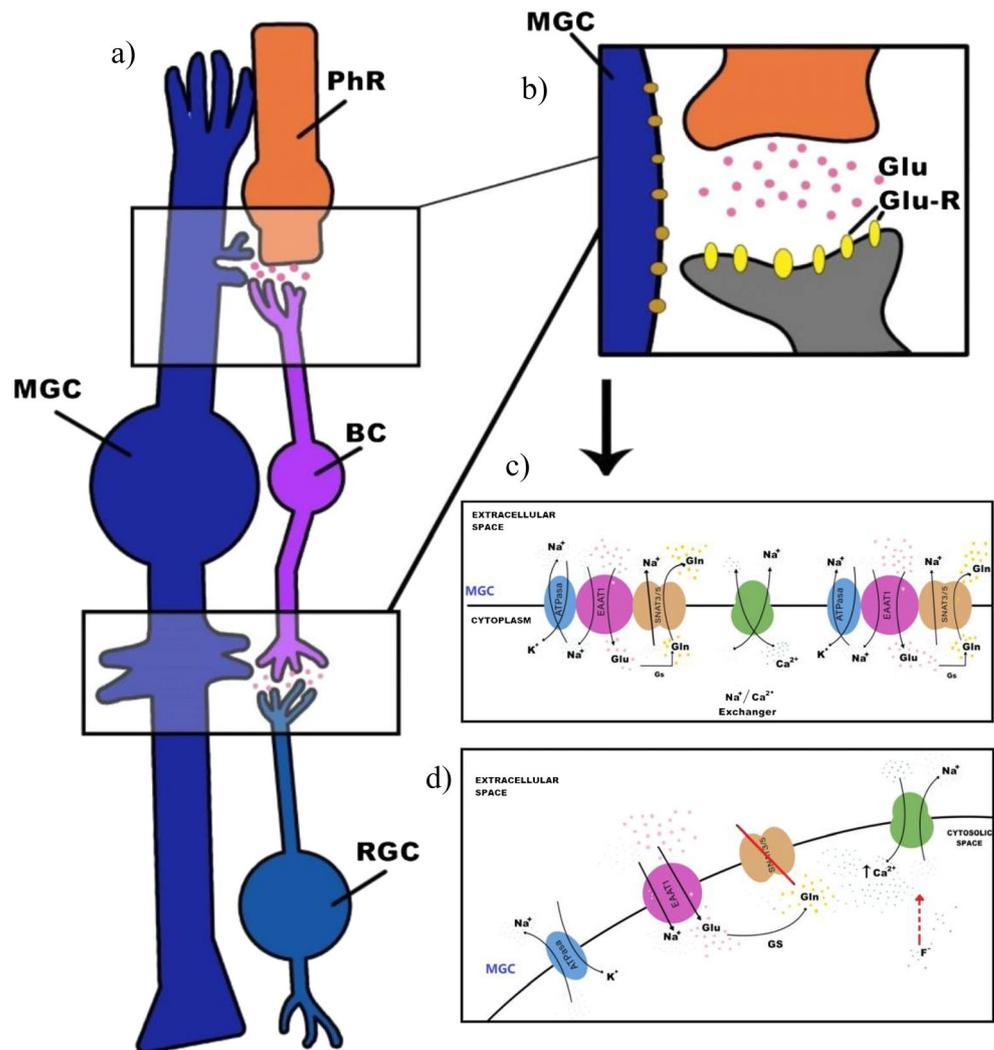


Fig. 5 The F⁻ effect involves the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in Mio-M1 cells. [³H]Gln influx was detected in Mio-M1 cells after a 500 μM F⁻ exposure. Cells were pre-treated with either KBR or BAPTA, blockers for the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, and [³H]Gln uptake assay was performed for 30 min. Results are the mean ± SEM of three independent experiments in quadruplicates. Statistical analysis was performed comparing against non-stimulated cells using a nonparametric Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test (**P* < 0.01, *****P* < 0.0001)

could be affected by the exposure to in vivo F⁻ concentrations. To this end, we used a retina radial glia cell line (Mio-M1),

Fig. 6 Summary of the plausible F^- action mechanisms in retinal Müller cells. Representation of a plausible F^- cascade of events that regulate Glu turnover in Mio-M1 cells. See text for details



Once inside, which are the direct targets of this element? Work in progress in our lab is aimed to the dissection of these molecular events.

Acknowledgments The technical assistance of Luis Cid and Blanca Ibarra is acknowledged.

Funding Information This work was funded by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt-México) to A.O. (255087). A.L.G.L. was supported by a Conacyt-México fellowship (#455449).

Data Availability The transparency document associated with this article can be found in the online version.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics Approval Not applicable.

Consent to Participate Not applicable.

Consent for Publication Not applicable.

Code Availability Not applicable.

References

- Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM (2010) Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact* 188:319–333. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.011>
- Bartos M, Gumilar F, Gallegos CE, Bras C, Dominguez S, Mónaco N, Esandi MC, Bouzat C, Cancela LM, Minetti A (2018) Alterations in the memory of rat offspring exposed to low levels of fluoride during gestation and lactation: involvement of the $\alpha 7$ nicotinic receptor and oxidative stress. *Reprod Toxicol* 81:108–114. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.07.078>
- Billups D, Marx MC, Mela I, Billups B (2013) Inducible presynaptic glutamine transport supports glutamatergic transmission at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* 33:17429–17434. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1466-13.2013>
- Bringmann A, Biedermann B, Faude F, Enzmann V, Reichenbach A (2000) Na⁽⁺⁾ currents through Ca⁽²⁺⁾ channels in human retinal glial (Müller) cells. *Curr Eye Res* 20:420–429

- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J et al (2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25:397–424. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.05.003>
- Buffo A, Rossi F (2013) Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol* 109:42–63
- Chouhan S, Flora SJS (2010) Arsenic and fluoride: two major ground water pollutants. *Indian J Exp Biol* 48:666–678
- Chouhan S, Lomash V, Flora SJS (2010) Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats. *J Appl Toxicol* 30:63–73. <https://doi.org/10.1002/jat.1474>
- Cresto N, Pillet LE, Billuart P, Rouach N (2019) Do astrocytes play a role in intellectual disabilities? *Trends Neurosci* 42:518–527. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.05.011>
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105
- Danbolt NCC, Furness DNN, Zhou Y (2016) Neuronal vs glial glutamate uptake: resolving the conundrum
- Dienel GA (2019) Brain glucose metabolism: integration of energetics with function. *Physiol Rev* 99:949–1045. <https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017>
- Ding Y, Yanhui Gao SH et al (2011) The relationships between low levels of urine fluoride on children's intelligence, dental fluorosis in endemic fluorosis areas in Hulunbuir, Inner Mongolia, China. *J Hazard Mater* 186:1942–1946. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.097>
- Flores-Méndez M, Ramírez D, Alamillo N, Hernández-Kelly LC, del Razo LM, Ortega A (2014) Fluoride exposure regulates the elongation phase of protein synthesis in cultured Bergmann glia cells. *Toxicol Lett* 229:126–133
- Flores-Méndez M, Mendez-Flores OG, Ortega A (2016) Glia plasma membrane transporters: key players in glutamatergic neurotransmission. *Neurochem Int* 98:46–55
- Gonçalves CA, Rodrigues L, Bobermin LD, Zanotto C, Vizuete A, Quincozes-Santos A, Souza DO, Leite MC (2018) Glycolysis-derived compounds from astrocytes that modulate synaptic communication. *Front Neurosci* 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01035>
- Grandjean P (2019) Developmental fluoride neurotoxicity: an updated review. *Environ Health* 18:110. <https://doi.org/10.1186/s12940-019-0551-x>
- Hertz L, Rothman D (2017) Glutamine-glutamate cycle flux is similar in cultured astrocytes and brain and both glutamate production and oxidation are mainly catalyzed by aspartate aminotransferase. *Biology (Basel)* 6:17
- Hu YH, Wu SS (1988) Fluoride in cerebrospinal fluid of patients with fluorosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51:1591–1593. <https://doi.org/10.1136/jnnp.51.12.1591>
- Leke R, Schousboe A (2016) The glutamine transporters and their role in the glutamate/GABA-glutamine cycle. In: *Advances in neurobiology*. Springer, Cham, pp 223–257
- Lutz S, Castillo PE (2020) Modulation of NMDA receptors by G-protein-coupled receptors: role in synaptic transmission, plasticity and beyond. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.019>
- Martínez-Lozada Z, Ortega A (2015) Glutamatergic transmission: a matter of three. *Neural Plast* 2015:1–11
- Martínez-Lozada Z, Guillem AM, Flores-Méndez M, Hernández-Kelly LC, Vela C, Meza E, Zepeda RC, Caba M, Rodríguez A, Ortega A (2013) GLAST/EAAT1-induced glutamine release via SNAT3 in Bergmann glial cells: evidence of a functional and physical coupling. *J Neurochem* 125:545–554
- Mondal P, Chattopadhyay A (2019) Environmental exposure of arsenic and fluoride and their combined toxicity: a recent update. *J Appl Toxicol* 39:391. <https://doi.org/10.1002/jat.3931>
- National Research Council (2006) Fluoride in drinking water: a scientific review of EPA's standards. The National Academies Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.17226/11571>
- Olivares-Bañuelos TN, Chí-Castañeda D, Ortega A (2019) Glutamate transporters: gene expression regulation and signaling properties. *Neuropharmacology* 161:107550. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.032>
- Pellerin L, Magistretti PJ (2012) Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1152–1166. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.149>
- Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C (2014) Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front Chem* 11:61
- Reichenbach A, Bringmann A (2013) New functions of Müller cells. *Glia* 61:651–678. <https://doi.org/10.1002/glia.22477>
- Reichenbach A, Derouiche A, Kirchhoff F (2010) Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res Rev* 63:11–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.003>
- Rocha-Amador D, Navarro ME, Carrizales L, Morales R, Calderón J (2007) Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cad Saude Publica* 23:S579–S587. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007001600018>
- Saeed M, Malik RN, Kamal A (2020) Fluorosis and cognitive development among children (6–14 years of age) in the endemic areas of the world: a review and critical analysis. *Environ Sci Pollut Res* 27:2566–2579. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06938-6>
- Saxena S, Sahay A, Goel P (2012) Effect of fluoride exposure on the intelligence of school children in Madhya Pradesh, India. *J Neurosci Rural Pract* 3: 144. <https://doi.org/10.4103/0976-3147.98213>
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
- Somogyi P, Takagi H, Richards JG, Mohler H (1989) Subcellular localization of benzodiazepine/GABAA receptors in the cerebellum of rat, cat, and monkey using monoclonal antibodies. *J Neurosci* 9:2197–2209
- Todd AC, Marx M-C, Hulme SR, Bröer S, Billups B (2017) SNAT3-mediated glutamine transport in perisynaptic astrocytes in situ is regulated by intracellular sodium. *Glia* 65:900–916
- von Bartheld CS, Bahney J,erculano-Houzel S (2016) The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: a review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol* 524:3865–3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- Wang SX, Wang ZH, Cheng XT, Li J, Sang ZP, Zhang XD, Han LL, Qiao XY, Wu ZM, Wang ZQ (2007) Arsenic and fluoride exposure in drinking water: Children's IQ and growth in Shanyin Country, Shanxi Province, China. *Environ Health Perspect* 115:643–647. <https://doi.org/10.1289/ehp.9270>
- Yan L, Liu S, Wang C, Wang F, Song Y, Yan N, Xi S, Liu Z, Sun G (2013) JNK and NADPH oxidase involved in fluoride-induced oxidative stress in BV-2 microglia cells. *Mediat Inflamm* 2013:1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/895975>
- Yang L, Jin P, Wang X, Zhou Q, Lin X, Xi S (2018) Fluoride activates microglia, secretes inflammatory factors and influences synaptic neuron plasticity in the hippocampus of rats. *Neurotoxicology* 69:108–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.09.006>
- Zhou Y, Danbolt NC (2013) GABA and glutamate transporters in brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:165. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00165>
- Zhou Z, Wang H, Zheng B, Han Z, Chen Y, Ma Y (2017) A rat experimental study of the relationship between fluoride exposure and sensitive biomarkers. *Biol Trace Elem Res* 180:100–109. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-0984-4>