

EFFECTOS DEL GLUTAMATO EN EL CEREBRO

*Sonia Luz Albarracín C.
Leonardo R. Lareo*

1. INTRODUCCIÓN

La neurotransmisión en el sistema nervioso central (SNC) está mediada por una estrecha interacción entre las neuronas y la glía, especialmente evidente en las sinapsis excitatorias en las que el L-glutamato es el neurotransmisor predominante (Volterra & Meldolesi, 2005). Así, el glutamato se encuentra involucrado en las principales funciones del cerebro, en los procesos cognoscitivos del aprendizaje y la consolidación de la memoria, y en el desarrollo de la plasticidad sináptica. Consecuentemente, la desregulación en la homeostasis del glutamato se ha relacionado con diferentes desórdenes como la depresión, la esquizofrenia y con algunas enfermedades neurodegenerativas debido a que causa desequilibrio entre el glutamato sináptico y glial (Billard, 2018; Bliim *et al.*, 2019).

El glutamato, como neurotransmisor, proviene metabólicamente de los esqueletos de carbono de la glucosa y de la glutamina que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE). Por lo tanto, requieren un permanente suministro glial. Así, tanto neuronas, como astrocitos y oligodendrocitos manifiestan una “dependencia” de sustratos, que son sintetizados, capturados o liberados en estos tipos de células. Este mecanismo se conoce como “compartimentación celular”, que

en este contexto favorece la funcionalidad de todos los procesos asociados a la comunicación sináptica. Por ejemplo, la glutamina está presente tanto en plasma (500-750 μM) como en líquido cefalorraquídeo (LCR) (Stanley & Prusiner, 1981) y es un metabolito importante ya que favorece la síntesis de aminoácidos y por tanto de proteínas. Además, puede ser usada durante la oxidación para la producción de ATP y para aumentar el reservorio de precursores para la síntesis de neurotransmisores como el aspartato, el glutamato y el ácido γ -amino butírico (GABA). En contraste, el glutamato es menos abundante extracelularmente y la relación de concentraciones glutamato/glutamina en el plasma es de 1/50.

La concentración aproximada de glutamato en el cerebro es del orden de 5 a 10 mM (Arrubla *et al.*, 2017) y la de glutamina es 7 mM. Aunque puede ser más alta en los somas o pericariones de las mismas neuronas donde la concentración es del orden de 38 mM, según estudios neuroquímicos y cuantitativos ultraestructurales (Christensen & Fonnum, 1991a). Esta diferencia pone de manifiesto la relación dinámica entre la producción de glutamato a partir de glutamina como un mecanismo fundamental para la fisiología celular. Este proceso que se conoce como el ciclo glutamato-GABA-glutamina y en el cerebro constituye un paradigma fundamental para entender la compartimentación entre las neuronas y la glía (Welbourne *et al.*, 2001; Simão *et al.*, 2016).

El mantenimiento del reservorio de glutamato en el cerebro constituye un punto del que penden delicados mecanismos a nivel celular y molecular. Así, el glutamato puede ser sometido a diferentes procesos metabólicos para la síntesis o la degradación en diversas reacciones de transaminación y deaminación oxidativa que favorecen la incorporación de esqueletos de carbono para la producción de ATP (Welbourne *et al.*, 2001). Metabolitos como α -cetoglutarato, piroglutamato, GABA y γ -glutamil péptidos se originan de esta forma en el SNC. Sin embargo, la conversión de glutamina para la producción de glutamato es funcionalmente una de las más importantes (Stanley & Prusiner, 1981).

El glutamato contenido en el cerebro se puede encontrar en cuatro compartimentos diferentes: a) en los terminales glutamatérgicos (40%); b) en los terminales GABAérgicos (10%) donde se requiere como precursor de GABA; c) en los astrocitos para la síntesis de glutamina (30%); y d) en un compartimento multicelular en el que es usado para el metabolismo energético (20%). Una disminución del glutamato disponible para mantener la función de las sinapsis glutamatérgicas o GABAérgicas podría resultar en un daño en el acople excitación/inhibición; es decir, en el balance glutamato/GABA. Del mismo modo, una pérdida de la función astrocítica que impida la capacidad para metabolizar el

reservorio de glutamato extracelular puede disminuir la detoxificación de iones amonio (NH_4^+) (Cooper, 1993). Estos dos escenarios demuestran que debe existir un fino balance en la dinámica de la actividad metabólica en cada uno de estos compartimentos. A fin de garantizar la funcionalidad de cada sistema, ya que, si se trastorna, puede disparar un sin número de alteraciones y estados patológicos.

De esta forma, el metabolismo del glutamato en el cerebro tiene en cuenta dos aspectos fundamentales: el primero se relaciona con el control de la concentración extracelular del neurotransmisor en el espacio sináptico debido a que la sobre-estimulación de los receptores ionotrópicos, especialmente de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), produce eventualmente daño neuronal, fenómeno conocido como excitotoxicidad (Tanović & Alfaro, 2006); y el segundo aspecto se vincula con el delicado balance en la producción de iones de amonio (NH_4^+), cuyos excesos también resultan en efectos deletéreos en el SNC. Para mantener este fino mecanismo en condiciones óptimas, existen dos estrategias principales que le permiten al cerebro reducir estos riesgos y prevenir el daño neuronal: (i) estrategia mediada por la función selectiva de la BHE, que limita el transporte de glutamato de la sangre al cerebro, y (ii) la estrategia de compartimentación metabólica entre las neuronas y la glía. En ese sentido, el presente capítulo se centra en las principales características del mecanismo de compartimentación celular.

2. TERMINALES GLUTAMATÉRGICOS

La transmisión glutamatérgica ha sido descrita en diversas regiones del sistema nervioso e incluye conexiones córticocorticales, ipsilaterales y contralaterales, proyecciones corticales hacia la amígdala, tubérculo olfatorio, el putamen, núcleo caudado, tálamo, colículos superior e inferior, área tegmental, *sustancia nigra*, núcleo rojo y médula espinal. Además de la corteza entorrinal, que participa en la neurobiología hipocampal y en conexiones que incluyen al septum, subiculum, cuerpo mamilar e hipotálamo, así como también en la corteza visual, retina y cerebelo (Billard, 2018; Bliim *et al.*, 2019). Su escala de acción se encuentra en el orden de milisegundos y la activación de los receptores de glutamato juega un papel importante en los cambios duraderos que involucran al fenotipo neuronal y el desarrollo en el SNC. Ya que los patrones de actividad sináptica excitatoria son requeridos para el control fino de las conexiones sinápticas y la generación de mapas topográficos en las redes neurales (Kalb & Fox, 1997).

El glutamato proviene metabólicamente de la glucosa, de la glutamina y del lactato. Los dos primeros precursores atraviesan la BHE y son utilizados por neuronas y astrocitos. Debido a la gran demanda energética, las

neuronas oxidan totalmente la glucosa primero en el citosol con la producción de piruvato, luego este α -cetoácido es transportado a la matriz mitocondrial donde es descarboxilado y oxidado hasta acetil-coenzimaA (Acetil-CoA) por la acción del complejo piruvato deshidrogenasa. Posteriormente, el Acetil-CoA y el oxalacetato se condensan para iniciar las reacciones del ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT). Una vez en el ciclo, se forman diferentes intermediarios como citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato y malato hasta que finalmente se regenera una molécula de oxalacetato. Al final se producen 2CO_2 y 1ATP , $3\text{NADH}^+\text{H}^+$ y 1FADH_2 por cada Acetil-CoA que ingresa al ciclo (Magistretti & Allaman, 2018).

Sin embargo, en condiciones de alta actividad neuronal, se ha evidenciado el papel del lactato derivado del glucógeno astrocitario y el transporte de este hacia las neuronas donde es utilizado como sustrato metabólico (Calì *et al.*, 2019; Magistretti & Allaman, 2018). Algunos estudios muestran que durante los procesos de potenciación a largo plazo (PLP), responsables del aprendizaje y la formación de la memoria, en estas condiciones el lactato es el metabolito energético preferido, más que la glucosa (Magistretti & Allaman, 2018).

El glutamato como neurotransmisor es acumulado en vesículas donde se encuentra en altas concentraciones (100 mM) y es liberado del terminal presináptico por exocitosis Ca^{+2} dependiente. En el terminal postsináptico, los receptores de glutamato (GluR) que se expresan prácticamente en todas las células neuronales, interactúan con el neurotransmisor. Esta familia está constituida por receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) y los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR). Los iGluR han sido clasificados en tres poblaciones diferentes, cada una definida por la activación selectiva con diferentes análogos estructurales del glutamato. Así, la familia iGluR está constituida por receptores activados por N-metil-D-aspartato (NMDA) de los cuales se conoce su estructura cuaternaria y los receptores activados por ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) y por ácido kaínico (KAIN). Los receptores iGluR neuronales tienen asociados canales catiónicos selectivos que permiten aumentar las corrientes de entrada de Ca^{2+} y Na^+ , mientras que el K^+ efluye a través del mismo canal (Billard, 2018; Bliim *et al.*, 2019; Chen & Gouaux, 2019).

3. TERMINALES GABAÉRGICOS

La enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (E.C. 4.1.1.15) convierte el glutamato en GABA (ácido γ -amino butírico), el neurotransmisor cerebral con mayor actividad inhibitoria. Los circuitos inhibitorios son diversos, aunque no

se conocen totalmente los aspectos de la biología celular implicada en su funcionamiento. En este sentido, la caracterización funcional de distintos subtipos de neuronas inhibitorias no ha sido suficiente para explicar cómo la neurotransmisión GABAérgica regula la actividad sináptica de manera tan relevante. Diversos mecanismos emergentes modulan la neurotransmisión GABAérgica de forma dinámica desde el terminal presináptico o el postsináptico. En este sentido, estas sinapsis contribuyen al desarrollo y la maduración de los circuitos hasta lograr el equilibrio excitación/inhibición. Adicionalmente, las interacciones entre las vías celulares, la difusión lateral de proteínas entre las sinapsis y el transportador de cloruro funcionan en las sinapsis excitadoras e inhibitorias y facilitan las adaptaciones inhibitorias de las sinapsis (Maffei *et al.*, 2017).

Investigaciones a nivel farmacológico, molecular y genético muestran que las sinapsis GABAérgicas son fundamentales en el desarrollo del cerebro y median procesos de plasticidad sináptica (Fazzari *et al.*, 2010). Se han descrito múltiples funciones durante el desarrollo de las sinapsis GABAérgicas entre las que se destacan el modular el posicionamiento de las neuronas en el tejido para lograr la diferenciación de las células, establecer la morfología y la forma de los contactos sinápticos con otras neuronas, así como participar en el refinamiento de las conexiones para hacer parte de la compleja red de neurotransmisión.

De manera interesante, en los últimos años se ha reportado que neuronas en el área tegmental ventral (ATV) y en la habénula coliberan glutamato y GABA. Lo anterior sugiere un papel complejo en la regulación de estas neuronas durante la neurotransmisión en estas regiones específicas (Yoo *et al.*, 2016; Zimmermann *et al.*, 2015; Shabel *et al.*, 2014). Estos recientes hallazgos evidencian la importancia de mantener el acople excitación/inhibición, lo que pone de manifiesto que estas dos actividades interdependientes favorecen el balance del que dependen tanto la funcionalidad celular como la de los circuitos neuronales previniendo los mecanismos de excitotoxicidad (Fazzari *et al.*, 2010).

4. COMPARTIMENTO GLIAL

Las células gliales del SNC (astrocitos tipo I, II y oligodendrocitos) cumplen funciones esenciales como el mantenimiento de la homeostasis iónica (especialmente de potasio), compartimentación metabólica, regulación de la inflamación, secreción de moléculas tróficas y sirven de guía y ayudan a la migración de las neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso. Además, ejercen una actividad moduladora sobre la comunicación neuronal al eliminar neurotransmisores, proveer sus precursores y mantener concentraciones en el medio extracelular, lo

que permite la protección de las neuronas contra la neurotoxicidad por exceso de glutamato y NH_4^+ (Albrecht *et al.*, 2007).

Las células gliales, durante mucho tiempo, han sido consideradas como células no excitables y por tanto, actrices secundarias en los procesos de neurotransmisión. Sin embargo, diversos estudios realizados a partir de los años 2000 han motivado el reconocimiento de su papel protagónico en la funcionalidad del SNC. Así se han acuñado entonces, nuevos conceptos como la “gliotransmisión”, proceso en el que se liberan moléculas de los astrocitos a las células vecinas que inducen señales intra y extracelulares. En este sentido, se habla también de “gliotransmisores” para las moléculas involucradas. Sin embargo, los astrocitos no pueden generar potenciales de acción; el mecanismo excitatorio está determinado químicamente y es evidenciado por cambios en las concentraciones intracelulares de Ca^{+2} , llamadas “oscilaciones de Ca^{+2} ” que se propagan de célula a célula modulando la neurotransmisión (Bezzi & Volterra, 2001; Volterra & Meldolesi, 2005; Orellana & Stehberg, 2014).

Recientemente, se ha encontrado que en diferentes sinapsis, tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP), diversos neurotransmisores como glutamato, GABA, noradrenalina, acetilcolina, dopamina y adenosina están implicados en la activación sináptica glial durante la neurotransmisión (Orellana & Stehberg, 2014). Así, por ejemplo, los astrocitos hipocampales expresan receptores específicos para glutamato que, por mecanismos de señalización mediados por hidrólisis de fosfolípidos de membrana, generan inositol 1,4,5-trifosfato ($\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$), favorecen la elevación intracelular de la concentración de Ca^{+2} , y provocan “oscilaciones de Ca^{+2} ” que se dispersan célula a célula a través de uniones estrechas (Figura 9.1) (Mayorquin *et al.*, 2018). La propagación de estas “ondas de Ca^{+2} ” pone de manifiesto un mecanismo de señalización glial que favorece actividades de neuromodulación (Bezzi & Volterra, 2001). Durante el disparo neuronal intenso, la liberación de neurotransmisores como el glutamato y GABA inducen elevaciones de la concentración intracelular de calcio $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células gliales, que a su vez provoca la liberación de moléculas que impactan en la excitabilidad neuronal, la transmisión sináptica y la plasticidad (Bazargani & Attwell, 2016). Adicionalmente, producto de otros tipos de señales, la glía puede producir “gliotransmisores” como NO, ATP, glutamato, prostaglandinas, entre otros, o puede ejercer funciones de neuromodulación con la liberación de moléculas como D-serina (Volterra & Meldolesi, 2005).

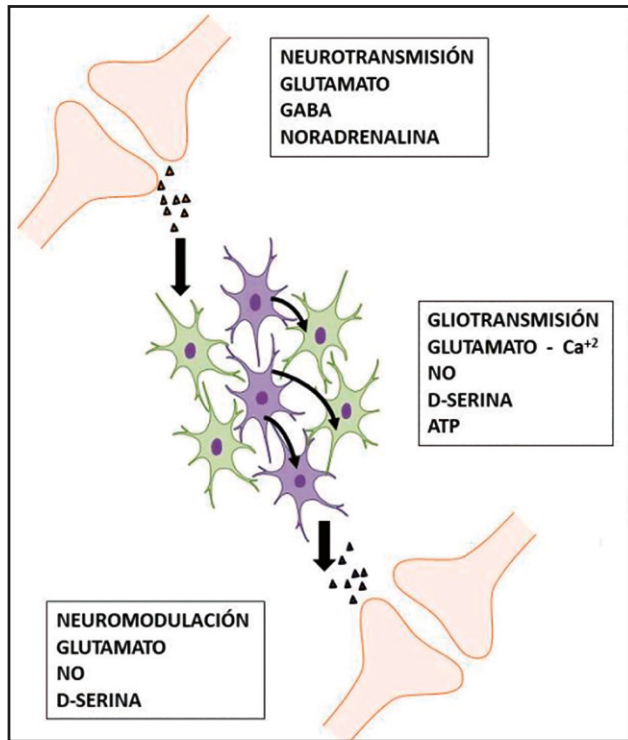


Figura 9.1 – Efecto neuromodulatorio de los gliotransmisores a través de la señalización mediada por ondas de calcio a través de uniones estrechas.

Fuente: figura adaptada de ppt- toolkit-Neuroscience;
<https://www.motifolio.com/neuroscience-all.html>.

Es así que el mecanismo de gliotransmisión puede coordinar redes de neuronas y sinapsis de unas regiones a otras. Debido a que las señales de Ca^{2+} astrocíticas evocadas localmente por sinapsis activas pueden expandirse intracelularmente desde su fuente original hacia diferentes células, esto implica que la señal viaja a lo largo de los procesos astrocíticos y desencadena la liberación de gliotransmisores en áreas distantes, regulando otras sinapsis y circuitos distantes (Araque *et al.*, 2014; Sahlender *et al.*, 2014).

Se ha reportado que astrocitos involucrados en el mismo circuito pueden liberar diferentes tipos de gliotransmisores y modular de esta forma la transmisión sináptica en múltiples formas. Sin embargo, la identificación del contexto de estas acciones regulatorias y sus múltiples respuestas es un desafío en la investigación en neurociencia para tratar de entender cómo operan en condiciones fisiológicas (Araque *et al.*, 2014).

5. SINAPSIS TRIPARTITA

Debido a las múltiples evidencias que reportan la existencia de una regulación dinámica y bidireccional entre los circuitos neuronales y los dominios astrocíticos, en los últimos años se ha establecido el concepto de la “sinapsis tripartita”. Este representa una visión integradora de la fisiología sináptica y considera a los astrocitos como protagonistas activos que regulan la transferencia de información entre las neuronas. De hecho, el término “sinapsis tripartita” fue acuñado para enfatizar la regulación del espacio extracelular alrededor de las sinapsis por los astrocitos, ya sea a través de la depuración de los neurotransmisores o la entrega de moléculas señalizadoras a los *loci* sinápticos, extrasinápticos o perisinápticos. Lo anterior produce un mecanismo de retroalimentación, una modulación homosináptica, o una acción heterosináptica de avance, que podría impactar los circuitos neuronales (Araque *et al.*, 2014; Farhy-Tselnicker & Allen, 2018).

En este sentido, este nuevo elemento en la neurotransmisión favorece la modulación de la comunicación entre neuronas. Sin embargo, la eficiencia de este proceso, depende de dos factores: la rápida liberación del neurotransmisor de la neurona presináptica y las bajas concentraciones del neurotransmisor en la sinapsis. Es decir, que se involucran procesos de síntesis, liberación y recaptura del neurotransmisor para mantener la eficiencia de este proceso (Daikhin & Yudkoff, 2000).

Se ha reportado que la concentración de glutamato en la sinapsis es del orden de 2-5 $\mu\text{mol/L}$ y puede elevarse después de la despolarización en un rango de 50-100 $\mu\text{mol/L}$. Así, el glutamato debe ser removido rápidamente de la sinapsis empleando tres sistemas: a) tomado por neuronas postsinápticas, b) tomado por neuronas presinápticas, y c) removido por astrocitos en la “sinapsis tripartita” (Daikhin & Yudkoff, 2000). Estos tres sistemas involucran mecanismos de compartimentación metabólica para el glutamato que ponen de manifiesto la participación activa de una gran familia de transportadores de alta afinidad para neurotransmisores excitatorios (EAAT). EAAT-1 y EAAT-2 se expresan en grandes áreas del cerebro como lóbulo frontal, corteza e hipocampo. Es decir; estas zonas particularmente activas en sinapsis glutamatérgicas cuentan con un efectivo sistema de remoción de glutamato. EAAT-3 se expresa en terminales nerviosos, pero no es considerado un mecanismo de transporte de glutamato importante. EAAT-4 es un transportador neuronal limitado a células de purkinje y EAAT-5 se expresa en retina (Hayashi, 2018).

De la misma manera y a través del mecanismo de compartimentación en las sinapsis inhibitorias, GABA es captado y metabolizado por astrocitos, gracias a la presencia de eficientes transportadores de alta afinidad (Sellstrom & Hamberger, 1977; Ramaharobandro *et al.*, 1982). En este sentido, se han descrito cuatro transportadores de alta afinidad para el GABA: GAT-1, GAT-3, GAT-B y XT1, todos Na^+/Cl^- dependientes, asociados con terminaciones nerviosas del SNC o asociados a células gliales (Mestikawy *et al.*, 1994). En condiciones normales, la concentración intraglial de GABA es aproximadamente 1 mM mientras que el extracelular es 1 μM . Esto quiere decir que estas células capturan activamente el exceso de GABA (Sellstrom & Hamberger, 1977). Parece ser que la afinidad del transportador del GABA es dependiente de la maduración cerebral, tanto en neuronas como en la glía. El valor de la constante de afinidad (K_M) del transportador de GABA es de 5,5 μM en neuronas y de 13 μM en astrocitos (González, 1985).

Aunque se pensó que el transportador neuronal de GABA estaba localizado exclusivamente en las terminaciones axónicas, se ha demostrado que dicho transportador se encuentra también en el pericarión neuronal. Tanto en neuronas como en astrocitos el aumento de las concentraciones de potasio extracelular estimula la liberación de GABA al medio, lo que establece un modelo bidireccional para el transportador de GABA. Una absorción óptima de GABA requiere de concentraciones intra y extracelulares de sodio y potasio las cuales dependen del potencial de membrana (Sellstrom & Hamberger, 1977; Christensen & Fonnum, 1991b).

6. CICLO GLUTAMATO-GABA-GLUTAMINA EN EL CEREBRO

En este paradigma de la sinapsis tripartita, cobra importancia el ciclo glutamato-GABA-glutamina. Este ciclo promueve la rápida remoción de glutamato y GABA de las sinapsis manteniendo una baja concentración de neurotransmisores y transformando estas moléculas en un sustrato no neuroactivo, la glutamina (Sidoryk-Wegrzynowicz & Aschner, 2013; Simão *et al.*, 2016; Hertz & Rothman, 2017; Hayashi, 2018). Es decir, los astrocitos sirven como “transportadores” de glutamato y GABA de regreso a las neuronas. Adicionalmente, la glutamina puede ser usada como combustible o precursor de otras moléculas. Por esta razón en el cerebro, el tráfico de glutamato, GABA y glutamina es crítico para el mantenimiento metabólico y el reservorio de neurotransmisores. El glutamato es liberado por las neuronas en un proceso Ca^{+2} dependiente que involucra la fusión de vesículas y su exceso puede ser tomado por los astrocitos en un proceso Na^+

dependiente y convertido en glutamina o en α -cetoglutarato (Simão *et al.*, 2016; Hertz & Rothman, 2017; Hayashi, 2018).

Esta actividad metabólica compartimentada entre neuronas y astrocitos también es importante ya que inactiva los iones NH_4^+ que son producto normal del metabolismo de estos neurotransmisores (Figura 9.2). No obstante, en el SNC son un importante agente neurotóxico, por lo cual es necesario removerlos de las sinapsis. En los tejidos, las sales de amonio y el amoníaco libre (NH_3) están en equilibrio, a pH 7,4 predomina en un 98,3% la forma protonada (NH_4^+ , o catión amonio). Sin embargo, el término “amonio” designa tanto a la forma libre como a la protonada. En condiciones fisiológicas, la forma no protonada atraviesa por difusión las membranas incluyendo la BHE (Cooper, 1993).

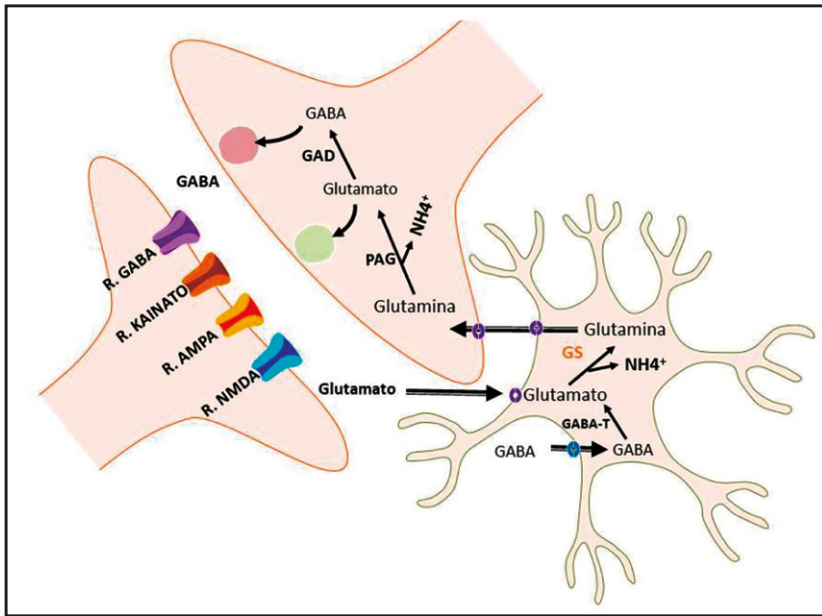


Figura 9.2 – Ciclo Glutamato-GABA-Glutamina en la sinapsis tripartita. Se evidencia la compartimentación metabólica de los neurotransmisores a fin de mantener la concentración extracelular disminuida y la eliminación de iones amonio de manera eficiente.

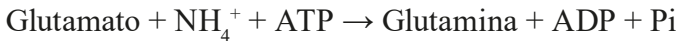
Fuente: figura adaptada de ppt- toolkit-Neuroscience;
<https://www.motifolio.com/neuroscience-all.html>.

En este sentido, el ciclo glutamato-GABA-glutamina se puede entender también como un movimiento de amonio del terminal sináptico a los astrocitos operado enzimáticamente y mantenido por tres mecanismos de transporte de NH_4^+ : a) difusión de NH_4^+ , b) antiporte acoplado a un mecanismo de lanzadera

de aminoácidos ramificados y a cetoácidos ramificados, y c) antiporte acoplado a la lanzadera alanina-lactato (Maciejewski & Rothman, 2008).

6.1 Principales enzimas del ciclo glutamato-GABA-glutamina

La conversión del glutamato a glutamina ocurre en presencia de ATP y el NH_4^+ proveniente de la sangre o del metabolismo cerebral. Esta reacción es catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS) y se muestra a continuación:



La glutamina sintetasa (GS) (E.C. 6.3.1.2) es una enzima presente en todas las especies y en casi todos los tejidos y cataliza la conversión del glutamato a glutamina en presencia de ATP (Meister, 1985; Daikhin & Yudkoff, 2000). GS está involucrada en el balance metabólico y el reciclaje de aminoácidos para el normal funcionamiento del cerebro. Clásicamente, esta enzima ha sido reportada exclusivamente en los astrocitos (Svenneby & Torgner, 1987) y la actividad de la GS está relacionada con la maduración de estas células (Caldani *et al.*, 1982).

En el adulto, la inmunoreactividad de la GS está asociada con procesos astrocíticos alrededor de las sinapsis excitatorias (Derouiche & Frotscher, 1991; Miyake & Kitamura, 1992). Se ha sugerido que los niveles extracelulares de glutamato pueden regular la distribución de GS. Lo anterior evidencia la gran importancia de estos mecanismos de compartimentación metabólica (Derouiche & Frotscher, 1991). La vida media de la enzima es relativamente corta (13-22 horas) y los niveles de GS son altamente regulados. La expresión de GS y la actividad son modulados por hormonas como insulina, hormona tiroidea, hormonas corticoesteroides (Suárez *et al.*, 2002).

La formación de glutamina en astrocitos a partir del glutamato liberado en las sinapsis es la base para el ciclo de la glutamina (Figura 9.3). La compartimentación de GS en astrocitos es consistente con la misión de reciclar glutamato, manteniendo el tráfico funcional y la ausencia de GS en neuronas es consistente con la neurotransmisión excitatoria en condiciones normales (Maciejewski & Rothman, 2008). Sin embargo, en condiciones patológicas como en la enfermedad de Alzheimer (EA), por ejemplo, se ha encontrado esta enzima en neuronas piramidales de las capas 5 y 6 (Walton & Dodd, 2007). Esta expresión alterada en condiciones patológicas muestra que el reciclaje de neurotransmisores en la sinapsis es crítico para mantener la baja concentración del glutamato. Por lo tanto,

GS podría funcionar como mecanismo de protección contra la sobreestimulación de receptores, que genera excitotoxicidad en estas condiciones.

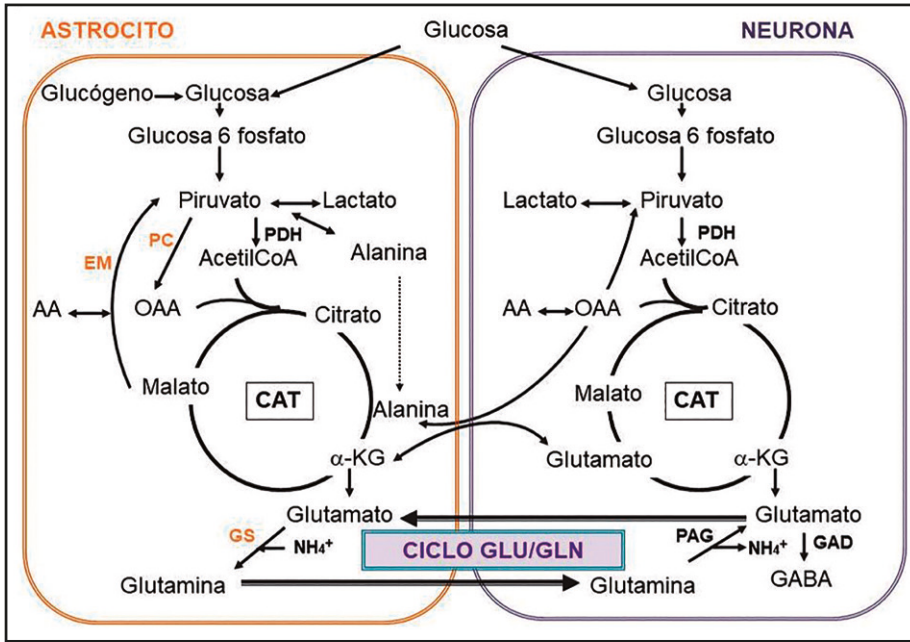
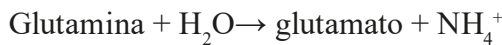


Figura 9.3 – Compartimentación metabólica entre neuronas y astrocitos. Se destacan las principales rutas metabólicas en estas células y el ciclo Glutamato-GABA-Glutamina.

Fuente: figura adaptada de ppt-toolkit-Neuroscience;
<https://www.motifolio.com/neuroscience-all.html>.

Considerando otro elemento del compartimento multicelular para el ciclo glutamato-GABA-glutamina, en las neuronas se expresan otras enzimas como glutaminasa activada por fosfato (PAG) (E.C. 3.5.1.2), enzima mitocondrial que cataliza la reacción no reversible:



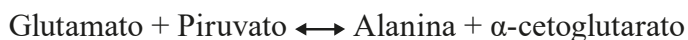
El fosfato inorgánico es derivado de la hidrólisis de ATP y el K_M característico de la enzima es muy bajo para su sustrato, lo que le confiere una alta afinidad por la glutamina. La PAG también inicia el catabolismo de la glutamina, el cual es muy importante para los procesos biogénicos celulares (Kovacevic & McGivan, 1983).

La glutamina es transportada a la neurona mediante dos mecanismos, uno Na^+ dependiente y otro Na^+ independiente (Daikhin & Yudkoff, 2000). La enzima es activada por fosfato y por ácidos carboxílicos e inhibida por glutamato, amonio y protones. La PAG está presente tanto en astrocitos como en neuronas, pero es principalmente activa en neuronas, lo que favorece la síntesis en terminales presinápticos y es consecuente con la compartimentación en condiciones normales (Maciejewski & Rothman, 2008). Así, la PAG produce glutamato y NH_4^+ en neuronas y GS utiliza glutamato y NH_4^+ en astrocitos.

El transporte de glutamato de los terminales sinápticos y el transporte de glutamina del astrocito son procesos dependientes de ATP. Adicionalmente, las reacciones catalizadas por GS y PAG también son ATP dependientes, por lo que el balance energético celular resulta crítico en el acople del ciclo glutamato-GABA-glutamina con los sustratos necesarios para su mantenimiento, que, en el cerebro, son dependientes de glucosa (Maciejewski & Rothman, 2008).

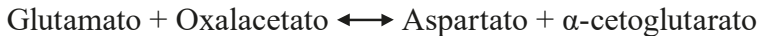
El tráfico de glutamato en las sinapsis para la neurotransmisión es fundamental para el funcionamiento del cerebro, debido a que la gran mayoría de las sinapsis son glutamatérgicas y median funciones vitales como el aprendizaje, la formación de memoria, reconocimiento espacial y funciones superiores de la conciencia. Adicionalmente, tanto neuronas como astrocitos pueden utilizar oxidativamente el glutamato por la acción de glutamato deshidrogenasa NAD(P)^+ (E.C. 1.4.1.2-4), ruta potencialmente importante para la entrada de esqueletos de carbonos al CAT. En los astrocitos, ácidos como citrato y malato, generados en esta ruta o por la actividad de la enzima málica (EC 1.1.1.40), podrían ser exportados principalmente para ser utilizados por las neuronas como esqueletos de carbono precursores de glutamato y permitir, así, el mantenimiento del ciclo glutamato/glutamina (Maciejewski & Rothman, 2008). Debido a que en el cerebro, no procede la aminación reductiva del α -cetoglutarato para producir glutamato, excepto bajo condiciones de hiperamonemia (Cooper *et al.*, 1979), la formación de glutamato puede ocurrir por transaminación con aminoácidos como la alanina, reacción catalizada por alanina aminotransferasa (EC 2.6.1.2).

La alanina también puede ser producida en los astrocitos a partir de piruvato por transaminación o por oxidación parcial de la glucosa en la glucólisis, como se ha demostrado en cultivo de neuronas (Peng *et al.*, 1991) y en cerebro *in vivo* (Bakkellund *et al.*, 1993).



La formación de alanina a partir de piruvato por transaminación con glutamato, está en equilibrio por la transaminación entre alanina y α -cetoglutarato para producir piruvato, que es oxidado en el CAT, y glutamato (Peng *et al.*, 1994). El donador de grupos amino para las transaminaciones con α -cetoglutarato puede ser también un aminoácido ramificado como valina, leucina o isoleucina, todos ellos aminoácidos esenciales que atraviesan fácilmente la BHE (Smith *et al.*, 1987).

El destino del glutamato no es solo aumentar el reservorio de neurotransmisores en la célula presináptica; la conversión del glutamato hasta α -cetoglutarato es una transaminación en la que interviene también la aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1), reacción que favorece el equilibrio hacia la formación de aspartato (Erecinska *et al.*, 1990).



Por deaminación reductiva catalizada por glutamato deshidrogenasa NAD(P)^+ se favorece la utilización de esqueletos de carbono provenientes del glutamato con producción de α -cetoglutarato como combustible vía CAT (McKenna *et al.*, 1996).



También es importante la acción de la enzima piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1) (enzima glial) que favorece la carboxilación del piruvato en los astrocitos con la producción de oxalacetato. Esto aumenta la concentración de los intermediarios del CAT y, por tanto, la concentración de α -cetoglutarato que mediante una transaminación con alanina conduce a la producción de glutamato (Figura 9.3). De esta forma, los intermediarios del ciclo son precursores para la síntesis de neurotransmisores, en este caso glutamato, y también para oxidación y producción de ATP (Hertz *et al.*, 1999).

Todas estas reacciones favorecen la incorporación de los esqueletos de carbono, provenientes del glutamato al CAT en forma de α -cetoglutarato y, por acción del complejo multienzimático α -cetoglutarato deshidrogenasa, produce succinil coenzima A (succinil-CoA) (Hertz *et al.*, 1999). Se ha observado que el glutamato convertido en α -cetoglutarato puede ser completamente oxidado a CO_2 y agua en los astrocitos (Schousboe *et al.*, 1993) y en cerebro intacto de rata

(Pascual *et al.*, 1998). El α -cetoglutarato puede abandonar la matriz mitocondrial a través de su conversión a malato en el CAT a través de un transportador de dicarboxilato que se expresa en la membrana interna mitocondrial y, una vez en el citosol, es convertido en piruvato en una reacción catalizada por la enzima málica que se encuentra expresada solamente en la glía. El piruvato puede ser reintroducido al CAT para su completa oxidación hasta CO_2 y agua (McKenna *et al.*, 1996; Simão *et al.*, 2016; Magistretti & Allaman, 2018)

6.2 Regulación del ciclo glutamato-GABA-glutamina

Este ciclo requiere de un metabolismo altamente regulado, a fin de que tanto la síntesis de glutamina como su degradación no se conviertan en un ciclo inútil. Debido a que la síntesis de glutamina catalizada por GS es ATP dependiente, la regulación del consumo energético resulta también vital para la célula, así como la interrelación de los dos procesos. Sin embargo, es poco lo que se conoce de los mecanismos regulatorios en mamíferos y particularmente en SNC, pero se posee amplia información sobre estos mecanismos en bacterias.

Procariontes y eucariontes expresan formas diferentes de GS. Los procariontes expresan GS tipo I (GSI), mientras que eucariontes expresan GS tipo II (GSII). La GS de origen bacteriano consiste en un complejo enzimático de 12 subunidades, mientras que para las GS eucarióticas se han reportado complejos de 8 a 10 subunidades organizadas en dos tetrámeros o pentámeros, respectivamente. Investigaciones sobre GS II han sido realizadas en los siguientes tejidos: hígado de rata (Meister, 1985), músculo esquelético de rata y conejo (Meister, 1985), cerebro de cerdo (Jaenicke & Berson, 1977), cerebro de oveja (Maurizi *et al.*, 1987) y cerebro humano (Tumani *et al.*, 1999; Boksha *et al.*, 2002).

Con relación a la regulación de la actividad enzimática, existen reportes de la inhibición de GSII por ADP en músculo esquelético de rata; mientras que en cerebro e hígado no se presenta este tipo de regulación (Meister, 1985). Los sitios de interacción alostérica para GSII que han sido propuestos son para arseniato, glutamato y dos iones Mn^{+2} por subunidad. Otros iones que afectan la actividad de GSII son el ion Cl^- y para la GS de cerebro de oveja se han reportado cuatro Mn^{+2} unidos fuertemente por octámero (Sidoryk-Wegrzynowicz & Aschner, 2013). En contraste con GS de cerebro de bovino en que se han reportado 16 Mn^{+2} por octámero, pero no fuertemente unidos (Maurizi *et al.*, 1987). En este sentido, se ha demostrado que la exposición a Mn^{+2} causa transporte aberrante de glutamato en astrocitos, lo que lleva a elevadas concentraciones de glutamato extracelular. Además, Mn^{+2} provoca una regulación negativa de la expresión y

actividad de GS. Estos cambios pueden desencadenar el agotamiento de la síntesis de glutamina en la glía con la disminución y, por tanto, el desbalance del ciclo afectando las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas (Sidoryk-Wegrzynowicz & Aschner, 2013).

Por otra parte, todas las GSII han perdido la secuencia de adenilación y no exhiben este mecanismo regulatorio como en el caso de las GSI y no se inhiben por acumulación de productos finales (Eisenberg *et al.*, 2000). En cuanto a la regulación de la expresión génica de la GS, se ha reportado que está determinada por hormonas como insulina e hidrocortisona que pueden inducir cambios en las tasas de biosíntesis de la enzima (Meister, 1985).

7. GLUTAMINA Y METABOLISMO OXIDATIVO EN EL CEREBRO

El metabolismo energético del cerebro depende exclusivamente de la utilización de la glucosa y la oxidación completa de la molécula en la mitocondria, por lo cual el cerebro es especialmente susceptible al daño oxidativo debido a la alta producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la presencia de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares y la relativamente baja defensa antioxidante. Las EROs participan en el daño causado entre otros por los procesos neurodegenerativos, incluyendo muerte celular, desórdenes motores y lesiones. De otro lado, las disfunciones por deficiencias en la defensa antioxidante han sido asociadas con casi todas las patologías neurodegenerativas (Matés *et al.*, 1999).

La glutamina juega un papel importante en el control antioxidante y la respuesta celular redox. En la enfermedad de Alzheimer (EA), el péptido β -amiloide (PBA) y la apolipoproteína E (APOE) contribuyen a potenciar los eventos de estrés oxidativo que disparan apoptosis (Fadeel *et al.*, 1999). La glutamina, como precursor de glutatión, ayuda a elevar los niveles que protegen contra los efectos deletéreos de las ERO (Amores-Sánchez & Medina, 1999).

El radical óxido nítrico (NO), por ejemplo, es una ERO producida en organismos superiores por la oxidación de uno de los nitrógenos del guanidino terminal de la L-arginina por la óxido nítrico sintasa. Dependiendo del microambiente, NO puede ser convertido en otras especies reactivas de nitrógeno (ERN) como son el catión nitrosonio (NO^+), dióxido de nitrógeno (NO_2) o el peroxinitrito (ONOO^-) (Droge, 2002; Belzer & Hanani, 2019).

Diferentes trabajos han demostrado que el NO funciona como un neurotransmisor involucrado en la regulación neuroendocrina (Belzer & Hanani,

2019). Así, neuronas que sintetizan NO están presentes en los núcleos hipotalámicos estrechamente asociados con neuronas productoras de hormonas hipotalámicas liberadoras de hormonas hipofisarias, como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GH-RH) y de hormonas adenohipofisarias como la prolactina (PRL) (Aguan *et al.*, 1996).

El óxido nítrico es sintetizado por una familia de enzimas conocida como óxido nítrico sintasa (NOS), de la que se han identificado tres isoformas. Una isoforma neuronal (nNOS o NOS1) de donde originalmente se clonó, aunque también esté presente en riñón y músculo esquelético (Droge, 2002). NOS1 juega un rol fisiológico importante a nivel neuronal en la liberación de neurotransmisores, el desarrollo neuronal, la regeneración, la plasticidad sináptica y la regulación de la expresión de genes. Sin embargo, la desregulación de esta enzima se ha relacionado con una gran variedad de desórdenes como EA y enfermedad de Parkinson (EP), en los que se evidencia una excesiva producción de NO en lesiones cerebrales, donde se comporta como un mediador de la neurotoxicidad (Droge, 2002).

Adicionalmente, en el cerebro GS es modulada por NMDA y NO. Así, el bloqueo de los receptores o de la actividad de NOS *in vivo* incrementa la actividad de GS y el contenido de glutamina en el cerebro, lo que indica que una activación de los receptores NMDA y NOS mantienen una inhibición de GS. Esto es debido a que la activación de NOS está mediada por los receptores NMDA que son responsables solo en parte por la inhibición de la enzima. Otras fuentes de NO pueden contribuir a la inhibición de la GS por efecto de modificaciones covalentes reversibles sobre la enzima como nitración de residuos de tirosina, lo que hace a la enzima menos eficiente (Rodrigo & Felipe, 2007).

8. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL DESBALANCE DEL CICLO GLUTAMATO-GABA-GLUTAMINA

El conocimiento de que las actividades cerebrales involucran una gran interacción entre las neuronas y la glía, abre todo un universo al entendimiento de diferentes patologías. Alteraciones en la glía disparan o potencian gran impacto en las actividades en las redes neuronales y, en muchos casos, podrían favorecer las primeras manifestaciones celulares y bioquímicas que, posteriormente, lleven a procesos de neurodegeneración. Se sabe que procesos inflamatorios y de activación glial “astrocitosis” producen profundas alteraciones estructurales

entre las interacciones neurona-astrocitos (Pekny & Nilsson, 2005; Maragakis & Rothstein, 2006).

Adicionalmente, las funciones normales del cerebro requieren un balance entre la energía requerida para las actividades y el suministro de nutrientes lo cual, en el SNC, es principalmente dependiente de glucosa. Datos recientes indican que estos dos procesos están altamente acoplados y que el reciclaje de glutamato por los astrocitos resulta ser un proceso crucial en este acople. Así, la utilización de glucosa por los astrocitos es principalmente a través de la glucólisis, lo que conduce a la producción de lactato. Posteriormente, este lactato se exporta a las neuronas donde es usado para el metabolismo oxidativo o para la síntesis de neurotransmisores (Poitry *et al.*, 2000). En contraste, el glutamato liberado de las neuronas es captado por los astrocitos e incluido en el ciclo glutamato-GABA-glutamina.

Con estas observaciones se propone un modelo en el que se plantea que el consumo de glucosa del astrocito está acoplado a la captura de glutamato en estas células. El modelo propone que el consumo de energía glía-neurona está potenciado en función de la actividad sináptica (Pellerin & Magistretti, 1994; Pellerin & Magistretti, 2012). Estudios de resonancia magnética nuclear ^{13}C (NMR) en corteza de ratas y en humanos confirman una relación estequiométrica 1:1 del consumo de glucosa y el reciclaje de glutamato (Shen *et al.*, 1999).

Lo anterior implica que en condiciones de insuficiencia energética se espera encontrar alteraciones a nivel del ciclo glutamato-GABA-glutamina. En este sentido, la modulación de la actividad de GS y de otras enzimas en el cerebro resulta importante y cualquier alteración o saturación deriva en consecuencias potencialmente patológicas. En las siguientes patologías se muestran algunas evidencias que sustentan esta afirmación.

8.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa de demencia más frecuente en la población anciana; representa entre un 50% y 80% del total de las demencias. Su forma de presentación se caracteriza por la aparición de trastornos mentales tales como ideas de persecución, alteración de la memoria, desorientación temporo-espacial, problemas de comprensión del lenguaje, disminución de la memoria y conversación inconexa (Villemagne *et al.*, 2013). Suele aparecer después de los 50 años de edad y no se acompaña de alteraciones en la marcha, coordinación de movimientos o alteraciones en los reflejos. A nivel molecular, se reconoce que en los estados avanzados de EA se encuentran

agregados del péptido β -amiloide (PBA) que se forma por clivajes secuenciales de una glicoproteína precursora transmembranal. El PBA es un péptido de 42 aminoácidos y constituye el núcleo de las placas seniles (placas de Alzheimer o placas neuríticas) (Querfurth & LaFerla, 2010). Las alteraciones en su procesamiento metabólico y la posterior acumulación son algunas de las características en los estados avanzados de la EA.

Durante años, ha prevalecido la hipótesis de que el glutamato es el principal responsable de los procesos de patogénesis debido a que se ha encontrado elevada la concentración extracelular de este neurotransmisor en pacientes con diagnóstico de EA (Le Prince *et al.*, 1995). Un estudio con pacientes que presentaban deterioro cognitivo o posible EA encontró que los niveles de glutamato y glutamina aumentan en el líquido cefalorraquídeo (LCR), por lo que se pueden considerar biomarcadores adicionales para el deterioro cognitivo preclínico o de las etapas tempranas de la demencia (Madeira *et al.*, 2018). Otro trabajo comparó los niveles de glutamato, glutamina y GABA en personas sanas jóvenes y mayores encontrando que estos pueden disminuir simultáneamente con la edad. Aunque estos niveles disminuyen predominantemente durante la enfermedad en pacientes que presentan deterioro cognitivo y en pacientes diagnosticados con EA. Estos estudios sugieren que puede encontrarse afectado el equilibrio excitación/inhibición en EA, lo cual podría contribuir a la patogénesis (Huang *et al.*, 2017).

Debido a que el aumento extracelular de glutamato provoca efecto “tóxico” sobre las neuronas, dado principalmente por sobreestimulación de los receptores de glutamato, particularmente los NMDA, se desencadenan una serie de eventos que son disparados por el aumento intracelular de Ca^{+2} y generan muerte celular. A este mecanismo se le conoce como “excitotoxicidad por glutamato” (Boksha, 2004). Pese a todo este conocimiento, aún no está claro qué componentes del sistema glutamatérgico se encuentran alterados. Adicionalmente, el exceso de glutamato no solo tiene efectos sobre las neuronas; los astrocitos abundantes en los terminales glutamatérgicos también se ven afectados, ya que el aumento de la concentración del glutamato provoca turgencia y finalmente lisis celular (Chen *et al.*, 2000).

El rápido aumento extracelular de glutamato provoca excitotoxicidad en pocos minutos. De esta forma, la pérdida repentina del suministro de energía debido al cierre del flujo de sangre al cerebro conduce a una ruptura de los potenciales de membrana neuronales y astrogliales, ya que el mantenimiento de estos depende de la energía. En las neuronas, la posterior despolarización de la

membrana conduce a la liberación vesicular de glutamato. Además del agotamiento de energía y la interrupción de la homeostasis iónica también se inhibe la actividad de los EAAT en los astrocitos e, incluso, puede inducir una inversión en su acción, lo que conduce a la liberación de glutamato no vesicular (Lewerenz & Maher, 2015).

Bajo este contexto, se espera que las patologías en el SNC resulten de los cambios en el sistema glutamatérgico a dos diferentes niveles principalmente: a) en la distribución y la expresión de diferentes transportadores, receptores y enzimas, lo que lleva a diferencias en la regulación, y b) afectación en las rutas implicadas en el metabolismo del glutamato para la síntesis o inactivación. Diversas enzimas como PAG y GS se han reportado alteradas en la EA. En particular, se ha encontrado disminuida drásticamente la expresión de PAG en neuronas corticales de pacientes con EA y el número de neuronas que expresan otras enzimas como glutamato deshidrogenasa también ha sido reportada (Akiyama *et al.*, 1989). En este mismo sentido, se ha detectado una baja actividad de los transportadores para glutamato tipo GLT1 (Procter *et al.*, 1988). Otros estudios histológicos *postmortem* de pacientes con EA revelan un decrecimiento en la expresión y en la actividad de la GS (Le Prince *et al.*, 1995). Estas observaciones son consistentes con que alteraciones en diferentes componentes del sistema glutamatérgico llevan a cambios deletéreos en el contexto funcional y, como consecuencia, conducirían al escenario perfecto para disparar eventos moleculares que llevan a la neurodegeneración típica de estas patologías.

Adicionalmente, se ha reportado que la pérdida de actividad de la GS puede estar relacionada con la formación de radicales libres (Aksenov *et al.*, 1997) o por susceptibilidad de la enzima a la presencia de los mismos y se ha sugerido un daño estructural que sería responsable por la pérdida de actividad de la GS. La sensibilidad de la GS a la inactivación por agentes oxidantes, que modifican su actividad generalmente, se ha usado como una medida del daño del tejido cerebral (Aksenov *et al.*, 1997). Los resultados usando un modelo de ratón triple-transgénico (3xTg-AD) indican que la disminución en la expresión de GS puede subyacer a una disminución gradual en la vía vital de conversión de glutamato a glutamina dependiente de astrocitos, que a su vez puede comprometer la homeostasis del glutamato. Esto puede conducir a fallas en la conectividad sináptica, la cognición y favorecer la pérdida de memoria (Kulijewicz-Nawrot *et al.*, 2013).

El mantenimiento del nivel de glutamato depende del acople de los procesos de captura y transporte, en contraposición con los mecanismos metabólicos

de producción e interconversión. En este sentido, las observaciones evidencian un decrecimiento de la expresión de la GS en astrocitos y una expresión alterada en neuronas piramidales en todos los casos de pacientes estudiados (Robinson, 2001; Walton & Dodd, 2007; Fernandes *et al.*, 2011). Estos resultados indican una alteración en el ciclo glutamato/glutamina en pacientes con EA. La expresión alterada de la enzima podría obedecer a un mecanismo de compensación del sistema para contrarrestar el efecto adverso, a fin de “inactivar” intracelularmente el glutamato en un compartimento diferente y operar parcialmente el sistema.

También, usando modelos *in vitro*, se ha demostrado la interacción de GS con el fragmento PBA 1-40 y el fragmento PBA 25-35, resultando en la inactivación oxidativa de la GS y en el incremento de la formación de radicales libres con el aumento de la neurotoxicidad por efecto del péptido (Butterfield *et al.*, 1997; Canevari *et al.*, 2004). Estas observaciones sugieren que existe una relación entre la interacción de la enzima con PBA y la formación de la placa amiloide, que podría evidenciarse con el compromiso en la toxicidad por glutamato y amonio. Se ha reportado también que los PBA facilitan la formación de radicales libres reactivos (Butterfield *et al.*, 1997; Butterfield *et al.*, 2007) y se ha propuesto que estos radicales libres derivados de PBA pueden dañar las proteínas celulares al causar modificaciones por oxidación. Posibles mecanismos que pueden explicar este efecto neurotóxico de los PBA son potenciar el estrés oxidativo, alterar la actividad de enzimas del metabolismo intermediario y favorecer la disfunción mitocondrial (Atamna & Frey, 2007). Existen reportes de otros estudios *in vitro* en los que se ha puesto en evidencia que los PBA 1-40 sintéticos interactúan con la GS y la inactivan, induciendo oxidación en la enzima pura (Butterfield *et al.*, 2007).

Otros trabajos muestran que en condiciones normales como el envejecimiento, hay disminución de la actividad de GS con incremento de las concentraciones de amonio y glutamato extracelular (Huang *et al.*, 2017). Pacientes con EA muestran niveles aún más bajos de actividad de la enzima, especialmente en las vecindades de las placas seniles y los depósitos amiloides característicos de la enfermedad en los que predomina la presencia de PBA. Adicionalmente, se ha observado expresión neuronal de la enzima (Robinson, 2001). Todos estos cambios intracelulares muy tempranos podrían ser un indicativo de daño tisular. Además, se ha reportado que la GS está presente en fluido cerebro espinal (FCE), lo que sugiere cambios en la compartimentación, la expresión de la GS y metabolismo alterado o disfuncional del glutamato (Tumani *et al.*, 1999).

8.2 La enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) (o corea de Huntington), es un trastorno progresivo que ocasiona neurodegeneración en el cerebro y fue descrita inicialmente en 1872 por George Huntington, un médico estadounidense. Pacientes con este trastorno presentan pérdida progresiva de la función mental, cambios de personalidad y pérdida de las funciones cognitivas como el juicio y el lenguaje. También desarrollan movimientos faciales y corporales espasmódicos rápidos anormales. De hecho, el término corea indica “danza” y se refiere a estos movimientos atípicos que se desarrollan durante la enfermedad. En las formas juveniles de la enfermedad los pacientes presentan distonía y signos evidentes de que se afecta la función cognitiva y psiquiátrica (Chesselet, 2001). Un rasgo característico de esta patología es la presencia de agregados de una proteína de 350 KDa llamada huntingtina que presenta una expansión de poliglutaminas en la región N-terminal (más de 37 glutaminas). Este fragmento determina la acumulación de la proteína en el núcleo afectando la regulación transcripcional y el desencadenamiento de la neuropatología (Havel *et al.*, 2009).

En la EH, aunque los mecanismos de patogénesis aún no han sido bien entendidos, el común denominador parece ser una alteración en el ciclo glutamato-GABA-glutamina. En estudios con ratones transgénicos para la enfermedad y con un ratón R6/2, se ha identificado que el mecanismo de excitotoxicidad se encuentra asociado a esta entidad neurodegenerativa y en este caso compromete la actividad de los transportadores de glutamato. Algunos reportes de la literatura respaldan la opinión de que en la EH existe una redistribución de los receptores de NMDA, especialmente la subunidad NR2B, que podrían sobreactivar vías de señalización que fomentan la neurodegeneración. Sin embargo, no existen evidencias consistentes de que los niveles de glutamato cerebral extracelular aumenten considerablemente en la enfermedad (Lewerenz & Maher, 2015). Así mismo, fue observado un incremento en los niveles extracelulares de glutamina como producto de la actividad disminuida de GS en las células gliales o por un decrecimiento de la capacidad de captura del neurotransmisor por las células neuronales. Aunque la utilización de glutamina puede estar alterada debido a una deficiencia en la actividad de la PAG, en este estudio no se encontraron cambios en la expresión (Behrens *et al.*, 2002). Sin embargo, se sabe que, en pacientes con EH, se ha observado poca actividad de PAG (Butterworth *et al.*, 1985).

La actividad de la GS ha sido medida en áreas de cerebros *postmortem* de pacientes con EH y se ha encontrado reducida en corteza frontal, corteza temporal, putamen y cerebelo. Estos resultados sugieren que en las áreas en

donde se presenta reducción de la actividad GS existe un déficit funcional (Carter, 1982).

En un estudio usando modelos de ratón específicos para neuronas, astrocitos o en ambas poblaciones del circuito de ganglios basales se expresó un fragmento de huntingtina. Así, se demostró que los astrocitos se ven menos afectados por la huntingtina en comparación con las neuronas, en particular en lo que respecta a la agregación. Además, se observó una contribución más indirecta de los astrocitos en comparación con las neuronas en varios mecanismos fisiopatológicos como la astrogliosis y la disfunción neuronal (Meunier *et al.*, 2016).

8.3 Enfermedad de Parkinson (EP)

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita inicialmente por el médico James Parkinson, en 1817, a quien se le debe el nombre. Al principio, el Dr. Parkinson la llamó *Parálisis Agitans*, lo cual define los síntomas de la enfermedad, es decir la asociación de lentitud con movimientos anormales. La EP es un desorden del sistema nervioso central en el que se presentan pérdida del control motor, temblor, bradiquinesia, rigidez muscular e inestabilidad postural (Hayes, 2019). La EP puede iniciarse desde la segunda década de la vida hasta finales de la misma, con un pico máximo de prevalencia entre la quinta y la sexta década de la vida. Se puede decir que es un mito el que la EP sea exclusiva de la vejez, dado que puede presentarse EP juvenil e infantil. La característica más importante desde el punto de vista de la patogénesis es la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta* por la formación de inclusiones anormales de proteína que se conocen como cuerpos de Lewy, compuestos principalmente de la α -sinucleína y la proteína parkina (Hayes, 2019).

La EP está asociada con muerte de neuronas, especialmente dopaminérgicas, aunque los mecanismos que causan esta degeneración aún no son totalmente entendidos. Existe evidencia indirecta que sugiere que los mecanismos de la actividad excitatoria del glutamato podrían regular la patogénesis de la EP (Meredith *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2016). La sobreestimulación de las neuronas glutamatérgicas y el efecto benéfico observado con sustancias antiglutamatérgicas, en modelos animales, sugieren que el exceso de glutamato puede contribuir en la patofisiología de la EP. Asimismo, se ha encontrado reducida la actividad de la GS en pacientes con EP en comparación con pacientes control de las mismas edades. Estos resultados implican una desregulación en el ciclo glutamato/glutamina manifestada en la alteración de la enzima en pacientes con EP (Meredith *et al.*, 2009).

Como se mencionó previamente, la neurotransmisión excitatoria consume importantes cantidades de ATP, principalmente para los sistemas de transporte. Estudios que utilizan cultivo de neuronas dopaminérgicas de humano y rata sometidas a altas concentraciones de glutamato muestran que se favorece la activación de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) con la consecuente producción de α -cetoglutarato. Así, este puede ser usado para mantener las demandas energéticas propias de los mecanismos transportadores de glutamato, la actividad de GS y PAG, todas ATP dependientes. En la patogénesis de EP, la actividad de GDH neuronal podría constituir una fuente adicional de energía metabólica (Plaitakis & Shashidharan, 2000).

Sin embargo, otros estudios han mostrado que la disminución de la expresión de los EAATs en la sustancia *nigra* o la administración de inhibidores provocan los efectos neurodegenerativos asociados con la enfermedad. Esta es una evidencia sólida que confirma que la disminución de la expresión de EAATs contribuye al proceso de patogénesis en la EP. De la misma forma, se ha demostrado que los fármacos o tratamientos que promueven la expresión y función de las EAATs atenúan la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra* y el estriado, mejorando las características del trastorno en cuanto a signos conductuales y a las capacidades cognitivas en modelos animales con EP (Assous *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016).

9. CONSIDERACIONES FINALES

El glutamato en el sistema nervioso central es el aminoácido excitatorio más importante y participa en las principales funciones superiores y de la conciencia. Metabólicamente, proviene de la glucosa y de la glutamina que atraviesan la BHE. Sin embargo, debido a su importancia en la fisiología del cerebro, se pueden considerar cuatro grandes compartimentos en los que se encuentra: a) las sinapsis glutamatérgicas, b) las sinapsis GABAérgicas, c) el compartimento glial y d) un reservorio multicelular en el que participan diferentes tipos de enzimas. Esto significa que el glutamato participa en todas las actividades cerebrales, directa o indirectamente. Adicionalmente, si se presentan alteraciones a nivel estructural o funcional en cualquier punto de estos cuatro compartimentos, se pueden generar trastornos que conducen a procesos que potencian el escenario para que a nivel molecular se presenten manifestaciones patológicas.

En las enfermedades neurodegenerativas, particularmente, existen evidencias que confirman que alteraciones en el ciclo glutamato-GABA-glutamina generadas por cambios relacionados con la expresión de genes producto

del envejecimiento, pueden potenciar los mecanismos de excitotoxicidad característicos de estas entidades patológicas. Por esta razón en los últimos años la comunidad de neurocientíficos se ha dedicado a entender cómo el glutamato participa en las actividades metabólicas, de señalización y transporte en diferentes condiciones. El reto consiste en entender en qué situaciones se pueden generar cambios que alteren el normal metabolismo del glutamato en el cerebro, a fin de buscar alternativas terapéuticas para contrarrestarlos antes de que los efectos sean irreversibles.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAN, K. *et al.* “Evidence for a physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase”. *Neuroendocrinol.* 64(6): 449-455, 1996.

AKIYAMA, H. *et al.* “Loss of glutaminase-positive cortical neurons in Alzheimer’s disease”. *Neurochem Res.* 14(4): 353-358, 1989.

AKSENOV, M. *et al.* “Oxidative modification of glutamine synthetase by amyloide beta peptide”. *Free Rad Res.* 27(3): 267-281, 1997.

ALBRECHT, J. *et al.* “Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction”. *Front Biosci.* 12: 332-343, 2007.

AMORES-SÁNCHEZ, M. I. & MEDINA, M. A. “Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress”. *Mol Genet Metab.* 67(2): 100-105, 1999.

ARAQUE, A. *et al.* “Gliotransmitters travel in time and space”. *Neuron.* 81(4): 728-739, 2014.

ARRUBLA, J. *et al.* “Microstructural and functional correlates of glutamate concentration in the posterior cingulate cortex”. *J Neurosci Res.* 95(9): 1796-1808, 2017.

ASSOUS, M. *et al.* “Progressive Parkinsonism by acute dysfunction of excitatory amino acid transporters in the rat substantia nigra”. *Neurobiol Dis.* 65: 69-81, 2014.

ATAMNA, H. & FREY, W. “Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer’s disease”. *Mitochondrion.* 7(5): 297-310, 2007.

BAKKELUND, A. H.; FONNUM, F. & PAULSEN, R. E. “Evidence using in vivo microdialysis that aminotransferase activities are important in the regulation of the pools of transmitter amino acids”. *Neurochem Res.* 18: 411-415, 1993.

BAZARGANI, N. & ATTWELL, D. “Astrocyte calcium signaling: the third wave”. *Nat Neurosci.* 19(2): 182-189, 2016.

BEHRENS, P. F. *et al.* “Impaired glutamate transport and glutamate–glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation”. *Brain.* 125(8): 1908-1922, 2002.

BELZER, V. & HANANI, M. “Nitric oxide as a messenger between neurons and satellite glial cells in dorsal root ganglia”. *Glia.* 67(7): 1296-1307, 2019.

BEZZI, P. & VOLTERRA, A. “A neuron–glia signalling network in the active brain”. *Curr Opin Neurobiol.* 11(3): 387-394, 2001.

BILLARD, J. M. “Changes in serine racemase-dependent modulation of NMDA receptor: impact on physiological and pathological brain aging”. *Front Mol Biosci.* 5:106, 2018.

BLIIM, N. *et al.* “Early transcriptome changes in response to chemical long-term potentiation induced via activation of synaptic NMDA receptors in mouse hippocampal neurons”. *Genomics.* 111(6):1676-1686, 2019.

BOKSHA IS. “Coupling between neuronal and glial cells via glutamate metabolism in brain of healthy persons and patients with mental disorders”. *Biochemistry (Mosc).* 69(7): 705-719, 2004.

BOKSHA, I. S. *et al.* “Glutamine synthetase isolated from human brain: octameric structure and homology of partial primary structure with human liver glutamine synthetase”. *Biochemistry (Mosc).* 67(9): 1012-1020, 2002.

BUTTERFIELD, D. A, *et al.* “Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: relevance to Alzheimer’s disease”. *J Neurochem.* 68(6): 2451-2457, 1997.

BUTTERFIELD, D. A. *et al.* “Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment”. *Free Radic Biol Med.* 43(5): 658-677, 2007.

BUTTERWORTH, J.; YATES, C. M. & REYNOLDS, G. P. “Distribution of phosphateactivated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydroge-

- nase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases". *J Neurol Sci.* 67(2):161-171, 1985.
- CALDANI, M. *et al.* "Glutamine synthetase activity during mouse brain development. *Experientia*". 38(10):1199-202, 1982.
- CALÌ, C.; TUFFENBERGER, A. & e MAGISTRETTI, P. "The strategic location of glycogen and lactate: from body energy reserve to brain plasticity". *Front Cell Neurosci.* 13: 82, 2019.
- CANEVARI, L.; ABRAMOV, A. & DUCHEN, M. "Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress". *Neurochem Res.* 29(3): 637-650, 2004.
- CARTER, C. J. "Glutamine synthetase activity in Huntington's disease". *Life Sci.* 31(11): 1151-1159, 1982.
- CHEN, S. & GOUAUX, E. "Structure and mechanism of AMPA receptor - auxiliary protein complexes". *Curr Opin Struct Biol.* 54: 104-111, 2019.
- CHEN, C. J.; LIAO, S. L. & KUO, J. S. "Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes". *J Neurochem.* 75(4): 1557-1565, 2000.
- CHESSELET, M (ed.). *Molecular mechanism of neurodegenerative disease.* New Jersey, Humana Press, 2001, p. 410.
- CHRISTENSEN, H. & FONNUM, F. "Uptake of glycine, GABA and glutamate by synaptic vesicles isolated from different regions of rat CNS". *Neurosci Lett.* 129(2): 217-220, 1991a.
- CHRISTENSEN, H. & FONNUM, F. "The ontogeny of the uptake systems for glycine, GABA and glutamate in synaptic vesicles isolated from rat spinal cord-medulla". *Brain Res Dev Brain Res.* 64(1-2): 155-159, 1991b.
- COOPER, A. J. *et al.* "The metabolic fate of ¹³N-labeled ammonia in rat brain". *J Biol Chem.* 254(12): 4982-4992, 1979.
- COOPER, A. J. "Ammonia metabolism in mammals: interorgan relationships". *Adv Exp Med Biol.* 341: 21-37, 1993.
- DAIKHIN, E. T. & YUDKOFF, M. "Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and Glia". *J Nutr.* 130 (4S Suppl):1026S-1031S, 2000.

DEROUICHE, A. & FROTSCHER, M. “Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase: evidence for transmitter degradation”. *Brain Res.* 552(2): 346-350, 1991.

DROGE W. “Free radicals in the physiological control of cell function”. *Physiol Rev.* 82(1): 47-95, 2002.

EISENBERG, D. *et al.* “Structure-function relationships of glutamine synthetases”. *Biochim Biophys Acta.* 1477(1-2): 122-145, 2000.

ERECINSKA, M. *et al.* “Neuronal glutamine utilization: glutamine/glutamate homeostasis in synaptosomes”. *J Neurochem.* 54(6): 2057-2069, 1990.

FADEEL, B.; ZHIVOTOVSKY, B. & ORRENIUS, S. “All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators”. *FASEB J.* 13(13): 1647-1657, 1999.

FARHY-TSELNICKER, I. & ALLEN, N. J. “Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development”. *Neural Dev.* 13(1): 7, 2018.

FAZZARI, P. *et al.* “Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling”. *Nature.* 464(7293): 1376-1380, 2010.

FERNANDES, S. P. *et al.* “Inactivation of astrocytic glutamine synthetase by hydrogen peroxide requires iron”. *Neurosci Lett.* 490: 27-30, 2011.

GONZÁLEZ, M. “Ciclo del GABA en el cerebro: su misión en la transmisión nerviosa”. In: *Curso monográfico sobre Neuroquímica.* Madrid, Editorial de la Universidad Complutense, 1985, pp. 251-273.

HAVEL, L. S.; LI, S. & LI, XJ. “Nuclear accumulation of polyglutamine disease proteins and neuropathology”. *Mol Brain.* 2:21, 2009.

HAYASHI, M. K. “Structure-function relationship of transporters in the glutamate-glutamine cycle of the central nervous system”. *Int J Mol Sci.* 19(4):1177, 2018.

HAYES, M. T. “Parkinson’s Disease and Parkinsonism”. *Am J Med.* 132(7): 802-807, 2019.

HERTZ, L. *et al.* “Astrocytes: glutamate producers for neurons”. *J Neurosci Res.* 57(4): 417-428, 1999.

- HERTZ, L. & ROTHMAN, D. L. "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(1): 17, 2017.
- HUANG, D. *et al.* "Glutamate-glutamine and GABA in brain of normal aged and patients with cognitive impairment". *Eur Radiol*. 27(7): 2698-2705, 2017.
- JAENICKE, L. & BERSON, W. "Glutamine synthetase from pig brain: binding of adenosine triphosphate". *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 358(7): 883-889, 1977.
- KALB, R. & FOX, A. "Synchronized overproduction of AMPA, kainate, and NMDA glutamate receptors during human spinal cord development". *J Comp Neurol*. 384(2): 200-210, 1997.
- KOVACEVIC, Z. & MCGIVAN, J. D. "Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance". *Physiol Rev*. 63(2): 547-605, 1983.
- KULIJEWICZ-NAWROT, M. *et al.* "Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex". *ASN Neuro*. 5(4): 273-282, 2013.
- LE PRINCE, G. *et al.* "Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type". *Neurochem Res*. 20: 859-862, 1995.
- LEWERENZ, J. & MAHER, P. "Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-what is the evidence?". *Front Neurosci*. 9: 469, 2015.
- MACIEJEWSKI, P. K. & ROTHMAN, D. L. "Proposed cycles for functional glutamate trafficking in synaptic neurotransmission". *Neurochem Int*. 52: 809-825, 2008.
- MADEIRA, C. *et al.* "Elevated glutamate and glutamine levels in the cerebrospinal fluid of patients with probable Alzheimer's disease and depression". *Front Psychiatry*. 9:561, 2018.
- MAFFEI, A. *et al.* "Emerging Mechanisms Underlying Dynamics of GABAergic Synapses". *J Neurosci*. 37(45):10792-10799, 2017.
- MAGISTRETTI, P. J. & ALLAMAN, I. "Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule". *Nat Rev Neurosci*. 19(4):235-249, 2018.

- MARAGAKIS, N. J. & ROTHSTEIN, J. D. “Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease”. *Nat Clin Pract Neurol.* 2(12): 679-689, 2006.
- MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C. & NÚÑEZ DE CASTRO, I. “Antioxidant enzymes and human diseases”. *Clin. Biochem.* 32(8): 595-603, 1999.
- MAURIZI, M. R.; PINKOFSKY, H. B. & GINSBURG, A. “ADP, chloride ion, and metal ion binding to bovine brain glutamine synthetase”. *Biochemistry.* 26(16): 5023-5031, 1987.
- MAYORQUIN, L. C. *et al.* “Connexin-mediated functional and metabolic coupling between astrocytes and neurons”. *Front Mol Neurosci.* 11:118, 2018.
- MCKENNA, M. *et al.* “Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes”. *J.Neurochem.* 66(1): 386-393, 1996.
- MEISTER, A. “Glutamine synthetase from mammalian tissues”. *Methods Enzymol.* 113: 185-199, 1985.
- MEREDITH, G. E. *et al.* “Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson’s disease”. *Exp Neurol.* 219(1): 334-40, 2009.
- MESTIKAWY, S. *et al.* “Characterization of an atypical member of the Na⁺/Cl⁻-dependent transporter family: chromosomal localization and distribution in GABAergic and glutamatergic neurons in the rat brain”. *J Neurochem.* 62:445-455, 1994.
- MEUNIER, C. *et al.* “Astrocytes are key but indirect contributors to the development of the symptomatology and pathophysiology of Huntington’s disease”. *Glia.* 64(11): 1841-1856, 2016.
- MIYAKE, T. & KITAMURA, T. “Glutamine synthetase immunoreactivity in two types of mouse brain glial cells”. *Brain Res.* 586(1): 53-60, 1992.
- ORELLANA, J. A. & STEHBERG, J. “Hemichannels: new roles in astroglial function”. *Front Physiol.* 5:193, 2014.
- PASCUAL, J. M. *et al.* “Glutamate, glutamine, and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats”. *Stroke.* 29(5): 1048-1056, 1998.

- PEKNY, M. & NILSSON, M. "Astrocyte activation and reactive gliosis". *Glia*. 50(4): 427-434, 2005.
- PELLERIN, L. & MAGISTRETTI, P. J. "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization". *Proc Natl Acad Sci*. 91(22):10625-10629, 1994.
- PELLERIN, L. & MAGISTRETTI, P. J. "Sweet sixteen for ANLS". *J Cereb Blood Flow Metab*. 32(7): 1152-1166, 2012.
- PENG, L.; SCHOUSBOE, A. & HERTZ, L. "Utilization of α -ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamate in cultured cerebellar granule cells". *Neurochem Res*. 16(1): 29-34, 1991.
- PENG, L.; ZHANG, X. & HERTZ, L. "High extracellular potassium concentrations stimulate oxidative metabolism in a glutamatergic neuronal culture and glycolysis in cultured astrocytes, but have no stimulatory effect in GABAergic neuronal culture". *Brain Res*. 663(1): 168-172, 1994.
- PLAITAKIS, A. & SHASHIDHARAN, P. "Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease". *J Neurol*. 247(Suppl 2): 1125-1135, 2000.
- POITRY, S. *et al.* "Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial Muller cells". *J Neurosci*. 20(5): 1809-1821, 2000.
- PROCTER, A. W. *et al.* "Evidence of glutamatergic denervation and possible abnormal metabolism in Alzheimer's disease". *J Neurochem*. 50(3): 790-802, 1988.
- QUERFURTH, H. W. & LAFERLA, F. M. "Alzheimer's disease". *N Engl J Med*. 362: 329-344, 2010.
- RAMAHAROBANDRO, N. *et al.* "Glutamine and glutamate transport in cultured neuronal and glial cells". *Brain Res*. 244(1): 113-121, 1982.
- ROBINSON, S. R. "Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease". *J Neurosci Res*. 66(5): 972-980, 2001.
- RODRIGO, R. & FELIPO, V. "Control of brain glutamine synthesis by NMDA receptors". *Frontiers in Bioscience*. 12: 883-890, 2007.

SAHLENDER, D. A.; SAVTCHOUK, I. & VOLTERRA, A. “What do we know about gliotransmitter release from astrocytes?”. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369(1654): 20130592, 2014.

SCHOUSBOE, A. *et al.* “Glutamate and glutamine metabolism and compartmentation in astrocytes”. *Dev Neurosci.* 15 (3-5): 359-366, 1993.

SHABEL, J., *et al.* “GABA/glutamate co-release controls habenula output and is modified by antidepressant treatment”. *Science.* 345(6203): 1494-1498, 2014.

SELLSTROM, A. & HAMBERGER, A. “Potassium-stimulated g-aminobutyric acid release from neurons and glia”. *Brain Res.* 119: 189-198, 1977.

SHEN, J. *et al.* “Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR”. *Proc Natl Acad Sci.* 96(14): 8235-8240, 1999.

SIDORYK-WEGRZYNOWICZ, M. & ASCHNER, M. “Manganese toxicity in the central nervous system: the glutamine/glutamate- γ -aminobutyric acid cycle”. *J Intern Med.* 273(5): 466-477, 2013.

SIMÃO, D. *et al.* “Functional metabolic interactions of human neuron-astrocyte 3D in vitro networks”. *Sci Rep.* 6: 33285, 2016.

SMITH, Q. R. *et al.* “Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain-barrier”. *J. Neurochem.* 49(5): 1651-1658, 1987.

STANLEY, B. & PRUSINER, M. D. “Disorders of glutamate: metabolism and neurological dysfunction”. *Ann Rev Med.* 32: 521-542, 1981.

SUÁREZ, I. *et al.* “Reduced glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase expression in astrocytes and Bergmann glial cells in the rat cerebellum caused by delta(9)-tetrahydrocannabinol administration during development”. *Dev Neurosci.* 24(4): 300-312, 2002.

SVENNEBY, G. & TORGNER, I. A. “Localization and function of glutamine synthetase and glutaminase”. *Biochem Soc Trans.* 15(2): 213-215, 1987.

TANOVIĆ, A. & ALFARO, A. “Glutamate-related excitotoxicity neuroprotection with memantine, an uncompetitive antagonist of NMDA-glutamate receptor, in Alzheimer’s disease and vascular dementia”. *Rev Neurol.* 42(10): 607-616, 2006.

TUMANI, H. *et al.* “Glutamine synthetase in cerebrospinal fluid, serum, and brain: a diagnostic marker for Alzheimer disease?”. *Arch. Neurol.* 56:1241-1246, 1999.

VILLEMAGNE, V. L. *et al.* “Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer’s disease: a prospective cohort study”. *Lancet Neurol.* 2(4): 357-367, 2013.

VOLTERRA, A. & MELDOLESI, J. “Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues”. *Nat Rev Neurosci.* 6(8): 626-640, 2005.

WALTON, H. S. & DODD, P. R. “Glutamate–glutamine cycling in Alzheimer’s disease”. *Neurochem Int.* 50(7-8): 1052-1066, 2007.

WELBOURNE, T. *et al.* “The glutamine/glutamate couplet and cellular function”. *News Physiol Sci.* 16: 157-160, 2001.

YOO, J. H. *et al.* “Ventral tegmental area glutamate neurons co-release GABA and promote positive reinforcement”. *Nat Commun.* 7: 13697, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* “Recent advance in the relationship between excitatory amino acid transporters and Parkinson’s disease”. *Neural Plast.* 2016: 8941327, 2016.

ZIMMERMANN, J.; HERMAN, M. A. & ROSENMUND, C. “Co-release of glutamate and GABA from single vesicles in GABAergic neurons exogenously expressing VGLUT3”. *Front Synaptic Neurosci.* 7: 16, 2015.