

EFFECTOS DE LA ISQUEMIA FOCAL SOBRE LA INTERACCION GLIA - NEURONA: UN ANALISIS BASADO EN LA EXPRESION DE TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO, LAS CELULAS GLIALES Y LAS INTERNEURONAS CORTICALES

Adriana Medina MD*, Martha I Escobar**

Resumen.

Las células gliales constituyen el mayor contingente celular del sistema nervioso central. En particular, la red astrocítica, conocida como el sincitio glial es un pilar fundamental en la conservación de la homeostasis del tejido neural. Las funciones del sincitio incluyen la recaptura de neurotransmisores en la hendidura sináptica, la preservación de los gradientes iónicos y la tarea de proveer las moléculas utilizadas como fuente energética para la función neuronal.

El presente artículo se enfoca en la relación entre la actividad neuronal y la regulación homeostática dada por las células gliales, especialmente el papel que ejercen estas células en la neurotransmisión glutamatérgica mediante la expresión de transportadores específicos y la influencia de la neurotransmisión gabaérgica en la función glial.

Abstract

Glial cells are the most numerous cellular population in the Central Nervous System. The astrocytic network, known as the glial syncytium is a major feature in the preservation of neural tissue homeostasis. The network function includes neurotransmitter uptake at the synaptic cleft, the maintenance of ionic gradients and the distribution of molecules for energy supply. This article focus on the relationship between neuronal activity and the neural homeostasis conservation by glial cells, specially the role of these cells in excitatory neurotransmission and the influence of gabaergic neurotransmission on glial function.

INTRODUCCIÓN

Durante la década de los 90, el concepto de excitotoxicidad, una forma de lesión neurológica común a varias patologías, se amplió y llegó a una aproximación mas clara de su fisiopatología tras la clonación molecular de las proteínas transportadoras para glutamato, conocidas como transportadores de Aminoácidos Excitatorios (EAATs)^{1,2}. Hasta entonces era conocido que los neurotransmisores aminoacídicos glutamato y aspartato, considerados como los principales neurotransmisores excitatorios del sistema nervioso central deben mantener un delicado equilibrio en su actividad, pues el exceso de la misma puede generar lesiones irreversibles que llevan a la muerte neuronal. En ese momento se reconocía ya el papel de las células

gliales como las encargadas de remover el glutamato de la hendidura sináptica, limitando su actividad en el tiempo y manteniendo los niveles sinápticos del neurotransmisor dentro de límites normales.

La clonación de los transportadores de glutamato y la descripción de sus características funcionales ha permitido entender en forma clara y precisa los mecanismos de remoción del glutamato sináptico, y se vislumbran así las posibles implicaciones patológicas que podría tener la alteración de los sistemas de transportadores como mecanismo generador de excitotoxicidad^{3,4}.

Para comprender la importancia del transporte glial de glutamato como un pilar de la homeostasis neuronal es necesario entender la profunda y compleja relación que existe entre las neuronas y las células gliales, sin la cual sería imposible la supervivencia del tejido nervioso. Este artículo se centra en esta relación y en la observación del efecto de las alteraciones del transporte glial de glutamato en una patología frecuente, la isquemia cerebral.

*Candidato a doctorado en Ciencias Biomédicas,

** Investigador Centro de Estudios Cerebrales, Facultad de Salud, Universidad del Valle.

La Importancia de la Interacción Glial en la actividad neuronal

Los contactos sinápticos están constituidos por tres elementos celulares: la neurona que libera el neurotransmisor, denominada neurona presináptica, la neurona que recibe el neurotransmisor y que posee receptores específicos para este, llamada neurona postsináptica, y un tercer elemento, la célula glial, la cual por medio de sus prolongaciones, denominadas pies astrofíticos envuelve la sinápsis, constituyéndose así cada sinápsis en una especie de micro cámara semiaislada, cuyos límites son la membrana presináptica, la postsináptica y la envoltura glial que la rodea. Esta organización restringe la libre difusión del neurotransmisor en el espacio extracelular, circunscribiendo su actividad a la hendidura sináptica y de esta forma se minimiza la cantidad de ruido en la señal neuronal¹. La envoltura sináptica tiene la capacidad de modular el pH y las concentraciones de iones, manteniendo un gradiente electroquímico óptimo para el funcionamiento de las neuronas, en parte gracias a la capacidad de los astrocitos de funcionar de modo sincitial. Los astrocitos establecen entre ellos una red celular constituida por uniones de tipo GAP, es decir, está dada por la presencia de proteínas con actividad de poros, los cuales permiten la difusión de moléculas pequeñas como iones, glutamato e IP₃². Así, la actividad generada en un astrocito constitutivo de una sinápsis se propaga a la red astrofítica circundante, permitiendo la difusión lejana de la señal. Los estudios de nuestro laboratorio utilizando marcadores gliales en un modelo de isquemia cerebral focal han demostrado que las alteraciones de la expresión inmunohistoquímica de

dichos marcadores en la corteza cerebral sigue un gradiente acorde con la disfunción neuronal, donde las láminas corticales mas afectadas presentan mayor alteración glial, mientras que la inmunoreactividad se recupera progresivamente al aproximarse a las láminas menos afectadas (figura 1)

Por otra parte, es conocido que la principal fuente energética del sistema nervioso es el metabolismo de la glucosa, y en este sentido se reconocen dos posibilidades: una, en la cual ciertos grupos neuronales poseen la capacidad de metabolizar completamente la glucosa, y otra, la mas frecuente, en la cual la glucosa sanguínea es captada por los pies chupadores de los astrocitos, de manera que estos realizan el paso metabólico de la glucosa a ácido láctico y luego lo transfieren a las neuronas para su utilización como fuente energética³. Existen indicios experimentales de una coordinación entre el ciclo de la neurotransmisión glutamatérgica y la captación glial de glucosa, donde se sugiere que se sigue una estequiometría 1:1⁴. La recaptura del glutamato por la glía es un proceso que depende del cotransporte de sodio y del contratransporte de potasio, y esto debe ser de nuevo contrabalanceado por la bomba Na/K ATPasa, la cual requiere para su funcionamiento de 2 ATP, lo que obliga a la captación y glicólisis inicial de una molécula de glucosa, dejando como residuo una molécula de lactato que pasa entonces a la neurona para ser utilizada como fuente de energía. Este principio puede ser la base de técnicas imagenológicas como la resonancia magnética funcional, en la cual se ve macroscópicamente como la actividad neuronal genera un aumento del metabolismo local del tejido.

El transporte Glial de glutamato como regulador de la homeostasis neuronal

El glutamato es un neurotransmisor excitatorio, y su actividad a través de receptores ionotróficos del tipo NMDA, algunos subtipos de AMPA y de los receptores metabotróficos del tipo mGluR 1 y 5 genera el incremento paroxístico de los niveles de calcio intracelular¹, lo cual en condiciones normales genera la activación de una gran cantidad de señales intracelulares importantes, como la síntesis de óxido nítrico² y la producción de derivados del ácido araquidónico³, y promueve además los procesos de plasticidad neuronal sináptica y estructural mediante la generación de mensajeros retrógrados que median la generación de fenómenos de potenciación a largo plazo (LTP)⁴ y la creación y modificación de espinas dendríticas, generando así el espacio para la aparición y consolidación de nuevas sinapsis (para revisión ver Medina, Escobar 2002⁵).

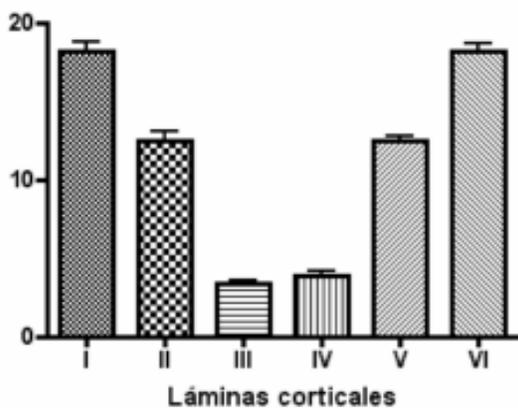


Figura 1. Distribución de la inmunoreactividad para GFAP en la corteza cerebral contralateral a un foco isquémico 72 horas después de la isquemia. Obsérvese el gradiente de distribución en el cual el número de células marcadas es menor en las láminas intermedias, las cuales se consideran las mas afectadas, y se normaliza al alejarse hacia las láminas externas.

Para mantener la actividad neuronal dentro de los parámetros normales, los niveles de glutamato sináptico deben permanecer bajo ciertos límites que van desde 0,6 uM en reposo hasta 1uM en el momento de la actividad. El mecanismo de control mas importante es la recaptura del glutamato por la glía, la cual se encarga de remover la mayor parte del neurotransmisor, seguido de la recaptura por la neurona y una mínima parte que se difunde por fuera del espacio sináptico¹³.

La recaptura del glutamato es llevada a cabo por una familia de proteínas de membrana denominadas Transportadores De Aminoácidos Excitatorios (Excitatory Aminoacid Transporters, EAAT). Este conjunto de transportadores son estructuralmente distintos a los transportadores para otros neurotransmisores, y los cinco miembros de la familia poseen algunas diferencias entre sí^{6,7}. El siguiente listado resume las características principales de estas proteínas.

- EAAT 1 o GLAST (Glutamate/Aspartate Transporter), es un transportador de localización glial, principalmente en el cerebelo.
- EAAT 2 o GLT 1 (Glutamate Transporter 1), también glial, es el mas abundante en el telencéfalo, incluyendo la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo, donde lleva a cabo la recaptura de cerca del 95% del glutamato sináptico. Se expresa también en la microglia, y se ha planteado la posibilidad de que la pérdida de la capacidad de estas células para mantener la homeostasis del glutamato como un factor agravante en entidades como la enfermedad de Alzheimer⁸.
- EAAT 3 o EAAC 1 (Excitatory Aminoacid Carrier 1), es de localización neuronal postsináptica, principalmente en la corteza cerebral.
- EAAT 4, transportador neuronal presente en el cerebelo.
- EAAT 5, descrito tanto en neuronas como en células gliales de la retina.

Se ha demostrado que la función de los transportadores está bajo la influencia de los diversos sistemas de neurotransmisores y de otros neuromoduladores, por ejemplo se ha descrito que la recaptura de glutamato aumenta en la presencia de agonistas alfa adrenérgicos, mientras que la activación de beta adrenoreceptores la disminuye ligeramente. Así mismo la estimulación de los

receptores para endotelinas, disminuye en gran proporción la recaptura de glutamato en cultivos de astrocitos⁹. Dado que los diferentes eventos cerebrovasculares, en especial las hemorragias subaracnoideas desencadenan el aumento en la liberación de endotelinas¹⁰, este puede ser un factor que induzca o mantenga la excitotoxicidad característica de estos sucesos.

Los transportadores para glutamato trabajan de acuerdo con gradientes electroquímicos, de manera que el glutamato ingresa a la célula acompañado de 2 o 3 iones Na⁺, y en cambio sale un ion K⁺; además es necesaria la interacción de protones (H⁺), lo cual indica la importancia del pH del medio y de los gradientes iónicos en la conservación de la actividad de los transportadores, por lo que esta puede verse afectada en sucesos que alteren alguno de estos parámetros, como ocurre en la isquemia cerebral.

El comportamiento Glial después de una lesión

Cuando el sistema nervioso central es sometido a diversas formas de injuria, en el foco de la lesión ocurre una modificación patológica en la composición celular del tejido, caracterizada entre otras cosas por un aumento en el número de astrocitos¹.

El fenómeno de proliferación glial, también conocido como gliosis, es una respuesta común a muchas lesiones del sistema nervioso central, incluyendo la isquemia, la epilepsia, el trauma craneoencefálico y raquimedular, la esclerosis lateral amiotrófica² y las enfermedades priónicas³ entre otras, por lo que este hecho ha sido ampliamente documentado. Los astrocitos reactivos presentan un aspecto hipertrófico, con un rápido incremento en la tasa de mitosis que genera una gran proliferación, la cual puede ser observada plenamente 72 horas después de una lesión aguda. Sin embargo, los estudios utilizando técnicas de inmunohistoquímica permiten ampliar la visión acerca de la gliosis reactiva mas allá de las descripciones obtenidas con técnicas de histología convencional. El uso de anticuerpos contra la proteína glial fibrilar (GFAP), un componente del citoesqueleto de los astrocitos en el modelo de isquemia focal muestra como 72 horas después de la lesión ocurre notorio incremento del número de astrocitos marcados. Este aumento en el número de células, así como las diferencias morfológicas que presentan los astrocitos reactivos a las 72 horas post lesión puede ser indicativo de una alteración en la expresión de la proteína glial fibrilar, como puede observarse en la figura 2.

El citoesqueleto es un elemento fundamental para la función de cualquier tipo de célula, por lo tanto los cambios en la expresión de GFAP que ocurren después de la lesión pueden ser un indicio de la existencia de diferencias funcionales entre los astrocitos reactivos y los astrocitos normales. Los cambios en la conformación de la red glial, así como la modificación en la disposición de los pies de los astrocitos puede indicar incompatibilidad en su función de conformar la envoltura glial, favoreciendo la pérdida de la homeostasis tisular y perjudicando el proceso de neurotransmisión.

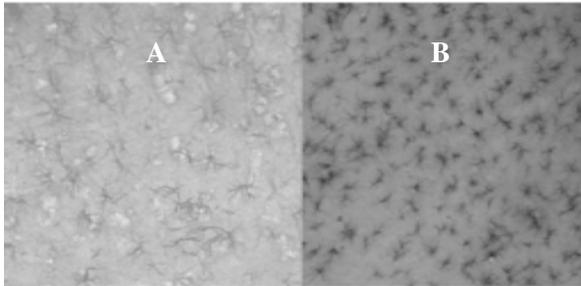


Figura 2. A. Astrocitos normales de la lámina III de la corteza cerebral de rata marcados para GFAP. Se observa un número adecuado de cuerpos celulares con procesos largos y bien definidos. B. Astrocitos de la lámina III de la corteza cerebral 72 horas después de un procedimiento de inducción quirúrgica isquemia cerebral focal. Se advierte un gran incremento en el número de cuerpos celulares marcados para GFAP, además de una notoria diferencia en el aspecto de los procesos astrocíticos, los cuales se ven cortos y pocos definidos. (10X).

Transporte Glial de glutamato en el área lesionada

En los últimos años, las alteraciones en la expresión y función de los transportadores de glutamato ha sido planteada como un pilar fundamental en el desarrollo de muchas entidades agudas y crónicas del sistema nervioso central^{1,2,3}. En el modelo de isquemia cerebral focal la aplicación de anticuerpos contra el transportador glial GLT1 reveló una disminución significativa de la expresión de este en el foco isquémico 24 horas después de la injuria, y permanece por debajo de los niveles normales a las 72 horas⁴, como se muestra en la figura 3, tabla 1. La disminución de la inmunoreactividad para GLT1 resulta aún mas impresionante si se tiene en cuenta que en ese mismo periodo de tiempo se genera el proceso de gliosis reactiva, por lo cual la relación entre el número de células marcadas para GFAP y el total de células inmunoreactivas para GLT1 pasa de una proporción normal aproximada de 4:1 a una proporción de 8:1 después de 72 horas de la lesión.

Considerando que el transportador GLT1 se encarga de cerca del 95% de la recaptura de glutamato en la corteza cerebral normal, esta drástica disminución en su inmunoreactividad puede actuar como un factor contribuyente a la perpetuación de la lesión neurológica que conduce a la muerte neuronal necrótica y apoptótica en el foco isquémico.

	Control	24 horas	72 horas
GFAP	46.24+/-11.78	1.22+/-2.42*	80.20+/-24.4*
GLT1	12.7+/-1.82	5.9+/-1.37*	10.17+/-1.62*

Tabla 1. Expresión de GFAP y GLT1 en corteza cerebral de sujetos normales, y en la región del foco isquémico 24 y 72 horas después de la injuria. Datos expresados como promedio +/- SD.

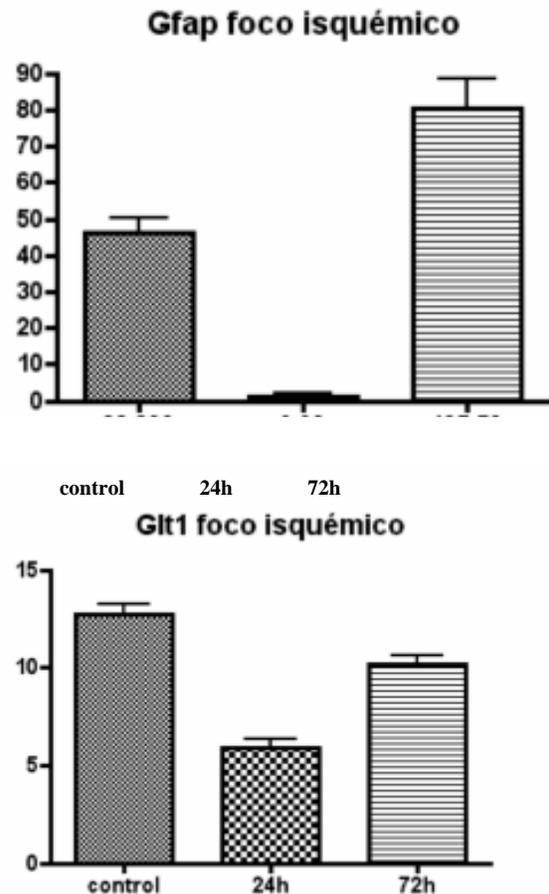


Figura 3. comparación entre la distribución de (A) GFAP y (B) GLT1 en la corteza cerebral normal y en el foco isquémico 24 y 72 horas después de la lesión. Se observa la disminución en la expresión de ambos marcadores a las 24 horas, con un incremento significativo de GFAP a las 72 horas. En ese mismo período GLT1 presenta una recuperación moderada, pero su expresión no alcanza niveles normales y permanece muy por debajo de la expresión de GFAP.

Comportamiento Glial y Transporte de Glutamato En Regiones Exofocales

Como se comentó previamente, la proliferación glial reactiva en el foco de una lesión neurológica es un hecho bien conocido. Sin embargo, el comportamiento de las células gliales en las regiones alejadas del foco pero conectadas sinápticamente con este es materia de interés reciente^{5,6}. Por esta razón, nuestro grupo ha estudiado extensamente el comportamiento de los diferentes tipos neuronales y de las células gliales en la corteza cerebral del hemisferio contralateral a un foco isquémico generado mediante oclusión de la arteria cerebral media^{7,8}. Seleccionamos la lámina III de la corteza cerebral contralateral al foco de la isquemia como ejemplo de alteración neuronal, ya que si bien todas las láminas de la corteza contralateral a la lesión se ven afectadas y presentan diferencias con el control normal, los cambios más radicales se encuentran en las láminas intermedias, y en especial en la lámina III.

Influencia de la conectividad cortical en la distribución de los cambios celulares en isquemia cerebral.

La distribución de los cambios neuronales y gliales de la corteza cerebral después de una injuria sigue un patrón relacionado con las conexiones sinápticas de las diferentes láminas de la corteza.

Las neuronas de la corteza cerebral pueden clasificarse en dos tipos principales: neuronas piramidales y neuronas no piramidales.

Las neuronas piramidales constituyen la mayor parte de los cuerpos neuronales localizados en la neocorteza (alrededor del 70%), y utilizan el glutamato como neurotransmisor. Se caracterizan por poseer un soma triangular, sus dendritas se originan en la base del triángulo (dendritas basales) o en el ápex del mismo (dendrita apical). El axón se proyecta desde la base del triángulo en dirección inferior en relación al cuerpo de la neurona. Estos procesos axonales son largos, y son los únicos axones que abandonan la sustancia gris de la corteza para dirigirse a las estructuras subcorticales, (fibras de proyección) a otras regiones de la corteza en el mismo hemisferio (fibras asociativas) o en el hemisferio contralateral (fibras comisurales)¹. (Figura 4)

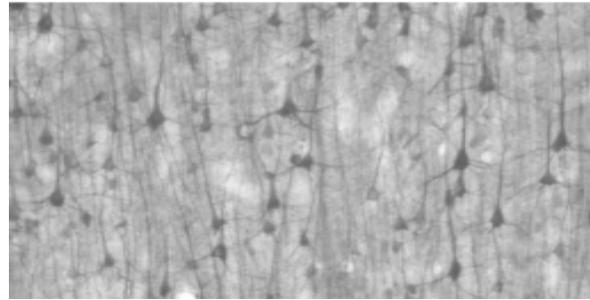


Figura 4. Neuronas piramidales de la corteza cerebral humana marcadas con el anticuerpo anti MAP 2. Obsérvese la forma del soma y la distribución característica de las dendritas. (10X).

Las neuronas no piramidales de la corteza cerebral son de diversa morfología, generalmente bipolares o multipolares, y casi todas utilizan el GABA como neurotransmisor, excepto las células granulares espinosas de la lámina IV que son glutamatérgicas. Las neuronas gabaérgicas de la corteza cerebral poseen una característica funcional que facilita su estudio inmunohistoquímico, y es la capacidad de expresar proteínas atrapadoras de calcio citoplasmáticas, a saber parvalbúmina, calbindina y calretinina². En la corteza cerebral, a diferencia de otras estructuras subcorticales, estas proteínas se expresan en forma segregada en diferentes subpoblaciones neuronales, de manera que permiten identificar la localización y el estado funcional de estas poblaciones. La parvalbúmina se expresa primordialmente en las células en cesta y células en candelabro de la corteza cerebral, las cuales se localizan cerca de los cuerpos y conos axonales de las neuronas piramidales respectivamente con los cuales establecen sus contactos sinápticos, y se encuentran en las láminas II a V de la corteza cerebral³. Estas neuronas gabaérgicas positivas para parvalbúmina constituyen el principal circuito inhibitorio intracortical debido a su localización estratégica en relación a las neuronas piramidales excitatorias; además, estas neuronas son el blanco principal de las aferencias comisurales procedentes de la corteza contralateral por la vía del cuerpo calloso, por lo que la excitación glutamatérgica proveniente del hemisferio opuesto es vital para la activación de este sistema inhibitorio⁴.

Las neuronas positivas para calbindina son neuronas no piramidales en su mayoría bipolares y bifenestradas, las cuales generan circuitos inhibitorios intracorticales verticales que afectan las dendritas piramidales y que realizan contactos sinápticos también con otras interneuronas gabaérgicas⁵.

Relación entre el comportamiento neuronal y la función Glial

en la corteza contralateral al foco isquémico.

En el modelo de isquemia cerebral focal por obstrucción de la arteria cerebral media es clara la existencia de cambios en la expresión de las proteínas atrapadoras de calcio parvalbúmina y calbindina en la lámina III de la corteza cerebral a las 24 y 72 horas después de la injuria (figura 5). Para el caso de la parvalbúmina, ocurre un notorio incremento de la inmunoreactividad desde las primeras horas de la injuria. Este cambio puede indicar una respuesta reactiva a un incremento en los niveles de glutamato y al consecuente aumento de los niveles de calcio citoplasmático en estas células. Por otra parte, la inmunoreactividad para calbindina también se ve alterada; inicialmente se presenta una disminución del número de células marcadas, seguido de una modesta recuperación tras la cual los niveles permanecen por debajo de los límites normales. La diferencia entre las respuestas de los dos tipos celulares es probablemente debida a las diferencias en su conectividad. Si bien ambos grupos celulares corresponden a neuronas gabaérgicas, las células parvalbúmina positivas se relacionan primordialmente con los sistemas de proyección glutamatérgicos comisurales, mientras que las células calbindina positivas forman parte de los circuitos inhibitorios intracorticales ipsilaterales, y sus relaciones se establecen principalmente con otras células inhibitorias y con los procesos dendríticos de las neuronas piramidales.

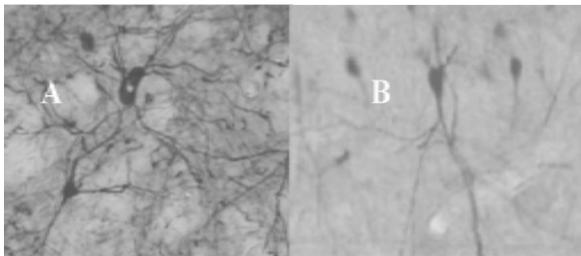


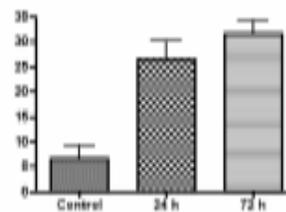
Figura 5.

A. Neuronas positivas para parvalbúmina.
B. Neuronas positivas para calbindina. (40X).

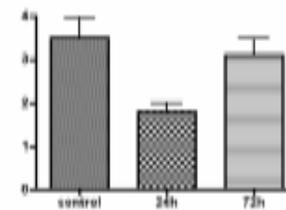
Otros autores han descrito la existencia de una relación directa entre el ambiente gabaérgico y la expresión de proteínas gliales en el telencéfalo¹. Si bien la distribución y densidad de los astrocitos en el sistema nervioso central no varía mucho de una región a otra, (por ejemplo, si se compara la densidad numérica de astrocitos entre dos regiones como el hipocampo e hipotálamo y la

neocorteza y el estriado, la relación es inferior a 2). sin embargo, si se compara el contenido de GFAP, la relación es superior a 10. Estas diferencias parecen estar relacionadas con la señalización gabaérgica en estas zonas, específicamente, con el número de terminales gabaérgicas presentes. Así mismo, en el modelo de isquemia focal, la inmunoreactividad a GFAP (y por lo tanto la función glial) parece estar más afectada en las láminas que sufren la mayor alteración de la función gabaérgica, como por ejemplo la lámina III, la cual pierde en un alto grado la estimulación comisural transcallosa sobre las neuronas en cesta, generando una disminución considerable de la inhibición gabaérgica horizontal de esta lámina y de los sectores adyacentes a ella. En condiciones patológicas, este modelo de interrelación entre las neuronas gabaérgicas y las células gliales se vería severamente afectado, pues se crea un círculo vicioso en el cual la pérdida de la función gabaérgica genera la alteración de la expresión de proteínas gliales tales como GFAP y el transportador GLT1, lo que a su vez disminuye la recaptura de glutamato y afecta la homeostasis de la neurotransmisión excitatoria en el sector comprometido, incrementando la posibilidad de injuria neuronal aún en las áreas que no fueron afectadas directamente por la noxa (Figura 6, tabla 2).

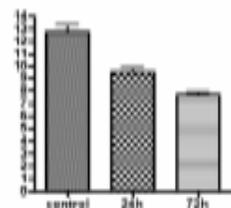
A. Parvalbúmina, lámina III contralateral



B. Calbindina, lámina III contralateral



C. GLT1, lámina III contralateral



D.GFAP, lámina III contralateral

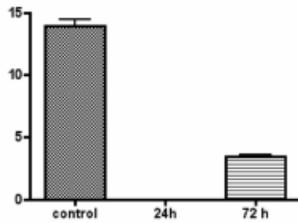


Figura 6. Distribución de la inmunoreactividad a (A)parvoalbúmina, (B)calbindina, (C)Glt1 y (D)GFAP en la lámina III de la corteza cerebral de rata normal y contralateral a un foco isquémico 24 y 72 horas después de inducir la isquemia. Obsérvese la variación en el número de células marcadas para los cuatro anticuerpos.

Lámina III	control	24h	72h
Parvoalbúmina	4.588+/-2.399	12.76+/-2.437*	15.76+/-1.562*
Calbindina	3.5+/-1.434	1.8+/-0.6325*	3.1+/-1.197
GLT1	12.7+/-1.829	9.5+/-1.179*	7.7+/-0.6749*
GFAP	13.9+/-1.66	0.0+/-0.0*	3.4+/-0.516*

Tabla 2. comparación del número de células marcadas para parvoalbúmina, calbindina, GLT1 y GFAP en la lámina III de la corteza cerebral contralateral a un foco isquémico. Datos expresados como promedio +/- SD.

CONCLUSIONES

Es un hecho claro que existe una estrecha relación entre la actividad de las células gliales y la homeostasis neuronal, lo cual es necesario para preservar adecuadamente el proceso de la neurotransmisión y la función neurológica en general. Cuando ocurre una injuria en el sistema nervioso central, el daño celular se extiende mas allá del foco de la lesión debido a la comunicación sináptica directa entre la zona afectada y otras áreas distantes. En este artículo hemos discutido como la propagación transináptica de la noxa, especialmente la pérdida de la homeostasis gabaérgica induce la alteración de la función glial, y especialmente de la recaptura de glutamato, generando un círculo vicioso de hiperexcitabilidad que contribuye a la perpetuación temporal y a la propagación espacial de la disfunción neuronal.

AGRADECIMIENTOS.

Las autoras agradecen al Dr Hernán Pimienta J, Director del Centro de Estudios Cerebrales por la revisión crítica del presente manuscrito. Los resultados

presentados en este proyectos son parte del proyecto CAMBIOS EN LA EXPRESION DE TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN ISQUEMIA POR OBSTRUCCION DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA. Código 1106-04-11990 Colciencias- Universidad del Valle.

REFERENCIAS

- 1 Pines, G Danbolt NC. Bjet al. Cloning and Expression of a Rat Brain L-Glutamate Transporter. Nature 1992. 360. pp 464-467.
- 2 Kanai, Y. Hediger, M. Primary Structure and Functional Characterization of High Affinity Glutamate Transporter. Nature 1992. 360. pp 467-471
- 3 Danbolt, N.C. Glutamate Uptake. Progress in Neurobiology 65 (2001) 1-105
- 4 Takanshi, M. Billups, B. Rossi, D. Sarantis, M. Hamman, M. Attwell, D. The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. Journal of Experimental Biology 1997 Jan 200 (pt2) 401-9.
- 5 Zonta M, Carmignoto G. Glutamate –Mediate Astrocyte - Neuron Communication in Brain Physiology and Pathology. In The Neuronal Enviroment : Brain Homeostasis in Health and Disease. W Waltz, Editor. Humana Press Inc, Totowa, NJ.
- 6 Carmignoto, G. Reciprocal Communication Systems Between Astrocytes and Neurons. Progress in Neurobiology 2000. 62: 561-581.
- 7 Ottersen, O.P. Storm-Matisen, J. Glutamate. Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol 18. Elsevier, 2000.
- 8 Sibson, N. Dhankar, A. Mason, G. Rothman, D. Behar, K. Shulman, R. Stoichiometric Coupling of Brain Glucose Metabolism and Glutamatergic Neuronal Activity. PNAS Vol 95, pp 316-321, Jan 1998.
- 9 Ayala, J. Sanchez, J. Palacios, M. Quevedo, J. Escobar, M. Cruz, S. Neuronas Glutamatergicas y Excitotoxicidad. En Sistema Nervioso. Segunda Edición. Editorial Universidad del Valle, 1998.
- 10 Sasaki, M. Dawson, V. Dawson, T. The NO Signaling Pathway in the Brain. In Cerebral Signal Transduction: From First to Fourth Messengers. Reith,M.E.A . Humana Press Inc, Totowa, NJ. Pp 151-173.
- 11 Reith, M.E. From First to Fourth Messengers in the Brain. In Cerebral Signal Transduction: From First to Fourth Messengers. Reith,M.E.A . Humana Press Inc, Totowa, NJ. Pp 3-23.
- 12 Buonomano, D. Cortical plasticity: from synapses to maps. Annual Review Neuroscience, 1998, 21: 149-186
- 13 Medina, A. Escobar, M.I. Sistema Glutamatergico Primera Parte: Sinaptología, Homeostasis y Muerte Celular. Revista Colombiana de Psiquiatría 2002; 31 (3): 193-218.

- 14 Seal, RP. Amara, SG. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1999. 39: 431- 456.
- 15 Gegelavishi, G. Shousboe, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Molecular Pharmacology* 52: 6-15. 1997.
- 16 Barger, S. Basile, A. Activation of Microglia by Secreted Amyloid Precursor Protein Evokes Release of Glutamate by Cystine Exchange and Attenuates Synaptic Function. *J Neurochem* 2001 Feb;76(3):846-54
- 17 Gegelashvili, G. Dehenes, Y. Danbolt, N.C. Shousboe, A. The high affinity glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochemistry International*. 37 (2000) 163-170.
- 18 Pluta, R.M. Book, R.J. Afshar, J.K. Clouse, K. Bacic, M. Ehrenreich, H. Oldfield, E.H. 1997. Source and cause of endotelin 1 release into cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* 87;287-293.
- 19 Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 2000 Oct;25(9-10):1439-51
- 20 Winter CG, Saotome Y, Levison SW, Hirsh D. A Role for Ciliary Neurotrophic Factor as an Inducer of Reactive Gliosis, the Glial Response to Central Nervous System Injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 20; 92(13): 5865-5869.
- 21 Prusiner, S. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95 (23): 13363-13383
- 22 Vermuganti, L. Et al. Glial Glutamate Transporter GLT1 Down-regulation Precedes Delayed Neuronal Death in Gerbil Hippocampus Following Transient Global Cerebral Ischemia. *Neurochemistry International* 2000. 36:531-537.
- 23 Li, S. Mealing, G. Morley, P. Stys, P. Novel Injury Mechanism in Anoxia and Trauma of Spinal Cord White Matter: Glutamate Release Via Reverse Na⁺ Dependent Glutamate Transport. *Journal of Neuroscience*. 19 RC16:1-9. 1999.
- 24 Mathern, G. Mendoza, D. Lozada, A. Pretorius, J. Dehenes, Y. Danbolt, N. Et al. Hippocampal GABA and Glutamate Transporter Immunoreactivity in Patients with Temporal Lobe Epilepsy. *Neurology* 52: 453. 1999.
- 25 M.I. Escobar, A.M. Medina, H.J. Pimienta. Changes In The Expression Of The Glutamate Transporter Glt1 In The Cerebral Cortex After Focal Ischemia. Program No. 736.15. *2003 Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2003.
- 26 Witte, O. Stoll, G. Delayed and Remote Effects of Focal Cortical Infarctions: Secondary Damage and Reactive Plasticity. *Advances in Neurology* 1997. 73. 207-227.
- 27 Witte, O. Bidmon, HJ, Schiene, K. Redecker, C. Haggeman, G. Functional Differentiation of Multiple Perilesional Zones After Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2000. 20(8): 1149-65.
- 28 Medina, A. Arango, C. Escobar, M. Pimienta H. Cambios en la Expresión de Proteínas Atrapadoras de Calcio en Isquemia Cerebral: Implicaciones Clínicas. *Revista Salud UIS* 2002. 34(3) 179-187
- 29 Pimienta, H. Arango, C. Escobar, M. Pedroza, A. Respuesta Neurobiológica a la Lesión Cerebral Isquémica: Zona de Infarto, Zona de Penumbra y Regiones Exofocales. *Neurociencias en Colombia* 2000. 8,1:13-25.
- 30 Feldman, M. Morphology of the Neocortical Pyramidal Neuron. In *Cerebral Cortex Vol 1. Cellular Components of The Cerebral Cortex*. Edward Jones and Alan Peters, Editors. Plenum Press, New York, 1984
- 31 Hof, P. Glezer, I. Condé, F. Flagg, R. Rubin, M. Minchinsky, E. Vogt Weisenhorn, D. Cellular Distribution of the Calcium Binding Proteins Parvalbumin, Calbindin and Calretinin in the Neocortex of Mammals: Phylogenetic and Developmental Patterns. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 1999. 16, 77-116
- 32 Peters, A. Jones, E. Classification of Cortical Neurons. In *Cerebral Cortex Vol 1. Cellular Components of The Cerebral Cortex*. Edward Jones and Alan Peters, Editors. Plenum Press, New York, 1984
- 33 Somogyi, P et al. Synaptic Connections of Morphologically Identified and Physiologically Characterized Large Basket cells in the Striate Neocortex of Cat. *Neuroscience* 1983. 10: 261-294.
- 34 Fiaren, A. De Felipe J. Regidor, J. Non-Pyramidal Neurons: General Account. In *Cerebral Cortex Vol 1. Cellular Components of The Cerebral Cortex*. Edward Jones and Alan Peters, Editors. Plenum Press, New York, 1984.
- 35 Runquist, M. Alonso, G. Gabaergic Signalling Mediates the Morphological Organization of Astrocytes in the Adult Forebrain. *GLIA* 2003. 41:137-151