

1999-D

091301229

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES**



**CAMBIOS EN LOS NIVELES DEL RNA_m DE LAS SUBUNIDADES
DEL RECEPTOR NMDA EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES
DE RATAS ADULTAS DESPUES DEL TRATAMIENTO NEONATAL
CON GLUTAMATO MONOSODICO.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA :

MARIO EDUARDO FLORES SOTO

GUADALAJARA, JALISCO, AGOSTO DEL 2001

*B702
G. I
Ano 163505*



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. MARIO EDUARDO FLORES SOTO
P R E S E N T E .**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "CAMBIOS EN LOS NIVELES DEL RNAm DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR NMDA EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES DE RATAS ADULTAS, DESPUÉS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON GLUTAMATO MONOSÓDICO", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo el DR. CARLOS BEAS ZÁRATE y como asesora la M.C. MÓNICA ELISA UREÑA GUERRERO.

**A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 31 de julio del 2001

**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

Leticia Hernández López
**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. DR. CARLOS BEAS ZÁRATE. - Director del Trabajo
c.c.p. M.C. MÓNICA ELISA UREÑA GUERRERO.-Asesor del Trabajo
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

C. DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LOPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante:

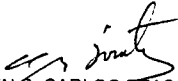
MARIO EDUARDO FLORES SOTO código 091301229 con el título: **CAMBIOS EN LOS NIVELES DEL RNAm DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR NMDA EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES DE RATAS ADULTAS DESPUES DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON GLUTAMATO MONOSODICO**, consideramos que ha quedado concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para la autorización de impresión y en su caso programación de fecha de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar ala presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO 19 DE JULIO DEL 2001

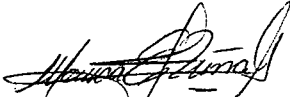
EL DIRECTOR DE TESIS


DR. EN C. CARLOS BEAS ZARATE
NOMBRE Y FIRMA




SECRETARIA ACADEMICA
DE LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

LA ASESORA


DR. EN C. MONICA ELISA UREÑA GUERRERO
NOMBRE Y FIRMA

SINODALES

1.- DR. EN C. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

2.- M. EN C. SILVIA JOSEFINA LOPEZ PEREZ
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

3.- DR. EN C. DANIEL ORTUÑO SAHAGUN
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

DEDICATORIA.

"PARA ALGUIEN MUY ESPECIAL"

Hace varios años llegó a mi vida una mujer que con su simpatía y ternura mi corazón se ganó.

Es una mujer buena llena de amor que esta dispuesta a compartir, todo lo que ella es.

Una amiga, fiel y desinteresada.

Ella transpira un dulce olor a alegría. Su bondad la hace tan especial que llega a destellar pasión una pasión buena, limpia y sincera.

Ella cuida mis sueños, mi alma y hasta mis pensamientos convirtiéndolo en mi "ÁNGEL GUARDIÁN".

Esa mujer eres tú Maria Guadalupe Gurrola que con tu amor y ternura has permitido que en mi florezca de nuevo el deseo de amar, de sentir y de ser feliz.

Me haces sentirme "ESPECIAL" tan especial como eres tú para mi, haces que mi vida tenga sentido y que de nuevo renazca en mi la alegría de vivir de compartir y de entregar mi amor.

Haces florecer en mi ser sentimientos limpios y sinceros que han llenado de grandeza mi vida y mi alma y mas por el regalo de vida que me vas a dar.....Mi HIJO.

Gracias por ser la mujer maravillosa que he estado esperando. Gracias...

El presente trabajo se realizo en el laboratorio de Neuroquímica de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) IMSS, bajo la dirección del Dr. en Cs. Carlos Beas Zárate y la asesoría de la M.C. Ureña Guerrero Mónica Elisa.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	9
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	19
DIAGRAMA EXPERIMENTAL	23
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	32
FIGURAS	34
BIBLIOGRAFÍA	51

LISTA DE ABREVIATURAS.

AMPA	Ácido 3-amino-4-hidroxi-5-metil-isoxasol propiónico
AMPC	Adenosina monofosfato ciclico
AP5	Ácido 2-amino-5-fosfonovalérico
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ⁺⁺	Ión Calcio
Cl ⁻	Ión Cloro
CPP	Ácido 3-(2-carboxi-piperazin-4-il)-propil-1- fosfónico
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GMS	Glutamato monosódico
[³ H]	Tritio
HPRT	Hipoxantina fosforribosil transferasa
IP ₃	trifosfato inositol
K ⁺	Ión Potasio
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NR1 y NR2A-D	Subunidades del R-NMDA
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
Mg ⁺⁺	Ión Magnesio

MK-801	Dizocilpina
μM	Micromolar
μL	Microlitro
mg	Miligramo
min	Minuto
mM	Milimolar
Na^+	Ión Sodio
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ONS	Oxido nítrico sintasa
R-AMPA	Receptor para AMPA
R-KA	Receptor para Kainato
R-mGlu	Receptores metabotrópicos glutamatérgicos
R-NMDA	Receptor para NMDA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsin	Inhibidor de las ribonucleasas
rpm	Revoluciones por minuto
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
Zn^{++}	Ión Zinc

R E S U M E N

El receptor glutamatérgico tipo-NMDA (R-NMDA) modula diversos eventos de plasticidad neuronal, durante todas las etapas del desarrollo del sistema nervioso central (SNC) de la rata. La administración sistémica de glutamato monosódico (GMS) a animales recién nacidos induce degeneración neuronal en regiones del SNC con inervación glutamatérgica, a través de la sobre-activación de los receptores glutamatérgicos. Recientemente se demostró que los niveles de expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del R-NMDA se elevan significativamente, en regiones como la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo de la rata adulta después del tratamiento neonatal con GMS. Así, en el presente trabajo se evaluó el efecto de dicho tratamiento sobre la expresión de las subunidades NR2C y NR2D que componen al R-NMDA. Los resultados demuestran que después del tratamiento neonatal de GMS la expresión de ambas subunidades se eleva en el cuerpo estriado y el hipocampo, en tanto que en la corteza cerebral parece mantenerse sin cambios. Debido a que se ha propuesto que los R-NMDA formados por asociaciones heteroméricas de las subunidades NR1 con NR2C y NR2D son menos sensibles al bloqueo por Mg^{++} , es probable que las modificaciones producidas en el cuerpo estriado y el hipocampo, después del tratamiento neonatal de GMS, podrían formar parte de los procesos de plasticidad neuronal que intentan mantener la eficiencia de disparo de las sinapsis glutamatérgicas, sin embargo, es posible que estas modificaciones también eleven la susceptibilidad neuronal a los efectos neuroexcitóticos del Glu.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso (SN), es un conjunto de elementos anatómicos funcionalmente conectados que se encargan de controlar el estado general del organismo para responder adecuadamente, a los estímulos que recibe, tanto del medio externo como del interno (1). Anatómicamente el SN se divide en:

1. **Sistema nervioso central (SNC)**, el cual representa el nivel integrativo y está constituido por el encéfalo (contenido en el cráneo) y la médula espinal (alojada en el conducto raquídeo) (1).
2. **Sistema nervioso autónomo (SNA)**, regula la actividad funcional inconsciente de los órganos internos, como procesos metabólicos secretores y contracciones de órganos dotados de músculo liso. El SNA se divide en dos: sistema simpático y parasimpático (1).
3. **Sistema nervioso periférico (SNP)**, constituido por los nervios craneales y espinales, los cuales son haces de fibras nerviosas que conducen información hacia el SNC (2).

El tejido nervioso se compone de tres tipos celulares fundamentales: las neuronas, las células de neuroglia (macroglia) y las células de microglia. La neurona constituye la unidad morfológica y funcional del SN, especializada en la generación, recepción, conducción y transmisión de los impulsos nerviosos. Las células de la neuroglia tienen un origen neuroectodérmico y están representadas por: 1) los astrocitos, que comparten funciones metabólicas con las neuronas; y 2) los oligodendrocitos, que forman la banda de mielina que recubre los axones de las neuronas del SNC (1). Las células de la microglia tienen un origen mesenquimatoso, forman parte del sistema retículo endotelial y tienen la capacidad de desplazarse y fagocitar (3).

Las neuronas se comunican entre sí, a través de contactos funcionales conocidos como sinapsis, las cuales de acuerdo a la naturaleza de la señal pueden ser de dos tipos: químicas o eléctricas (4). En las sinapsis químicas la propagación del impulso nervioso hacia la terminal axónica, promueve la liberación de una sustancia química, conocida como neurotransmisor, que difunde a través del espacio intersináptico para interactuar con receptores específicos de la membrana postsináptica, originando un cambio en su potencial de membrana

(Figura 1). Cuando el neurotransmisor es de naturaleza excitadora, la membrana se hace más permeable al Na^+ y se produce una despolarización celular, que promueve la generación de potenciales de acción; en tanto que cuando el transmisor es de naturaleza inhibitoria, se incrementa la permeabilidad de la membrana al Cl^- y se produce una hiperpolarización, la cual disminuye la posibilidad de disparo de la neurona (5,6).

Dentro del encéfalo algunas regiones cerebrales resultan de gran importancia debido a sus implicaciones funcionales y neuropatológicas, tal es el caso de la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo, cuyas características anatómicas serán descritas a continuación.

CORTEZA CEREBRAL

La corteza cerebral integra la información que recibe el organismo, tanto del mundo externo como del medio interno, incluyendo la información de los movimientos voluntarios, así como de las áreas de percepción sensorial (6).

Morfológicamente, dentro de la corteza cerebral pueden distinguirse varios tipos neuronales distribuidos en seis capas:

- I. **Capa molecular:** es la más externa, contiene fundamentalmente fibras nerviosas intracorticales y muy pocas células del tipo horizontales de Cajal.
- II. **Capa granular externa:** es densa y se compone principalmente de células granulares pequeñas.
- III. **Capa piramidal externa:** contiene células piramidales frecuentemente formadas en filas.
- IV. **Capa granular interna:** capa delgada de células granulares.
- V. **Capa piramidal interna:** contiene células piramidales escasas pero de mayor tamaño que las de la capa III.

VI. **Capa fusiforme:** compuesta por células fusiformes irregulares cuyos axones penetran en la sustancia blanca adyacente (7,8).

Las regiones corticales que cuentan con las seis capas celulares bien representadas se consideran Neocorteza, en tanto que las regiones donde no se encuentran todas las capas corresponden a la Allocorteza (6).

CUERPO ESTRIADO.

Los ganglios basales son masas de sustancia gris situados profundamente dentro de los hemisferios cerebrales que incluyen al cuerpo estriado, al núcleo amigdalino y a la sustancia negra. A su vez, el cuerpo estriado está formado por el núcleo caudado, el putamen y el globo pálido, este último conocido también como núcleo lentiforme. El cuerpo estriado interviene en la regulación del tono y la postura, en la estabilización y coordinación del movimiento; y en procesos de aprendizaje (8).

En el neostriado, representado por el putamen y el núcleo caudado, se distinguen seis tipos de neuronas: neuronas espinosas medianas, neuronas medianas de axón largo, neuronas lisas medianas, neuronas con dendritas varicosas, neuronas gigantes y neuronas pequeñas (7).

HIPOCAMPO.

El sistema límbico comprende algunas estructuras prosencefálicas, conectadas anatómicamente. Interviene en los aspectos emocionales de la conducta, como la agresividad, la emoción, la sumisión, el comportamiento sexual y el placer, así como en la memoria y el aprendizaje (9).

Los componentes corticales del sistema límbico son los polos temporales y las circunvoluciones orbitarias del cíngulo, las parahipocampales y el hipocampo o formación hipocámpal (9). El hipocampo es el límite interno del lóbulo temporal, es una allocorteza especializada en tres capas con extensas conexiones aferentes y eferentes, dirigidas principalmente hacia el cuerpo mamilar, a través del tracto del

trígono, que contiene una gran cantidad de acetilcolina, dopamina, serotonina y noradrenalina (9).

NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATERGICA

El glutamato (Glu) es un aminoácido neurotransmisor que se distribuye de manera ubicua en el SNC y ocupa una posición central en el metabolismo del cerebro (10). Es considerado el principal neurotransmisor excitador dentro del SNC y es especialmente abundante en regiones como la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado (10). La actividad excitadora del Glu se demostró inicialmente en el músculo de crustáceos y posteriormente, en el cerebro de mamíferos al estudiar los efectos de su administración tópica (10,11). Se localiza en interneuronas corticales, fibras corticales eferentes hacia el cuerpo estriado, en las vías hipocampales (intrínsecas y extrínsecas) (Figura 2) y en la médula espinal (12).

La barrera hematoencefálica es impermeable al paso de Glu en la dirección sangre-cerebro, por lo que el Glu debe sintetizarse dentro del cerebro, a partir de ornitina, α -cetoglutarato o glutamina. Las células gliales desempeñan una función importante en la interconversión de Glu a Glutamina (Gln), recapturan el Glu del espacio intersticial y lo convierten en Gln por acción de la glutamina sintetasa. La Gln es secretada por las células gliales y recapturada por las neuronas glutamatérgicas, donde la glutaminasa la convierte nuevamente en Glu (13).

Dentro de las terminales nerviosas glutamatérgicas, el Glu se transporta al interior de las vesículas sinápticas, a través de un proceso dependiente de ATP (13) (Figura 1).

La propagación del impulso nervioso hacia la terminal axónica, promueve la liberación del Glu, a través de dos mecanismos diferentes: uno independiente de la concentración intracelular de Ca^{++} , por co-transporte reverso de la recaptura de Na^+ , desde el citoplasma hacia el espacio intersináptico; y otro, dependiente de la concentración intracelular de Ca^{++} , desde las vesículas sinápticas, a través de un proceso de exocitosis (13). Cuando la vesícula sináptica alcanza la membrana

presináptica se fusiona con ella y libera el contenido de Glu hacia el espacio intersináptico (13).

El exceso de Glu liberado al espacio intersináptico, se remueve a través de un mecanismo de recaptura dependiente de Na^+ , esta dependencia es absoluta ya que se requieren de dos iones Na^+ por cada molécula de Glu (14) (Figura 1).

Receptores a Glu

El efecto excitador del Glu sobre la célula postsináptica depende de su interacción con receptores específicos, los cuales pueden ser de dos tipos generales: metabotrópicos o ionotrópicos (15).

Los **receptores metabotrópicos glutamatérgicos** (R-mGlu) interaccionan con proteínas G que regulan diferentes vías de señalización intracelular. Dentro del SN existen, por lo menos 8 subtipos de R-mGlu, los tipos 1 y 5 estimulan la activación de la fosfolipasa C y la producción de inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), en tanto que los tipos 2-4 y 6-8 inhiben a la adenilato ciclasa y disminuyen los niveles de AMPc (16) (Figura 3).

Por otra parte, los **receptores ionotrópicos glutamatérgicos** actúan como canales iónicos activados por ligando; permiten la entrada de Na^+ y Ca^{++} ; y la salida de K^+ ; y se clasifican de acuerdo con su afinidad por agonistas específicos en receptores: para N-Metil-D-Aspartato (R-NMDA), para ácido propiónico 3-amino-4-hidroxi-5-metil isoxasol (R-AMPA) y para ácido kaínico (R-KA) (15). Estructuralmente, son complejos macromoleculares oligoméricos formados por 5 subunidades polipeptídicas, de las cuales existen múltiples variantes de empalme y de expresión, que al combinarse alternativamente, permiten la estructuración de receptores funcionalmente diferentes con afinidad por el mismo agonista selectivo (15,17) (Figura 3).

El R-NMDA

El receptor NMDA ha sido objeto de numerosos estudios, debido a su implicación funcional en diferentes procesos de plasticidad neuronal, así como en el establecimiento de algunas alteraciones neurológicas (18).

Este receptor se caracteriza por tener una conductancia elevada para Ca^{++} y Na^+ , además de poseer múltiples sitios de regulación farmacológica, entre los que destacan: el sitio de unión para Glu; el sitio de unión para el co-agonista Glicina (Gly); sitios de unión para poliaminas; sitios sensibles al estado redox; el sitio de modulación positiva sensible a Zn^{++} ; y los sitios sensibles al bloqueo por Mg^{++} y MK-801, presentes en el interior del canal del receptor (18) (Figura 3A).

Estudios moleculares han demostrado que la estructura del R-NMDA es producto de la combinación heteromérica de al menos, dos tipos de subunidades: las NR1 y las NR2 (18). Recientemente, se ha caracterizado una nueva subunidad para el R-NMDA conocida como NR3 o NR-L, la cual se expresa durante los primeros días del desarrollo del SNC. Aunque la función de la subunidad NR3 no se ha caracterizado completamente, los trabajos con ratones "knockout" para esta subunidad, indican que podría estar involucrada en el desarrollo de las espinas dendríticas (19).

La subunidad NR1 puede presentarse como producto de diferentes variantes de empalme o de modificación postranscripcional, posee una región extracelular con varios sitios de glucosilación en el extremo N-terminal y cuatro dominios transmembranales (TMI-IV) (20). Una característica distintiva de esta subunidad, en comparación con las de los receptores AMPA/KA, es la presencia de un residuo de Asparagina en lugar de una Gln en el dominio TMII (inmerso en la membrana a manera de horquilla), que regula la permeabilidad al Ca^{++} y la sensibilidad al bloqueo por Mg^{++} , determinando así, las características funcionales del receptor (20). Este segmento determinante también está presente en las subunidades NR2 (21). Los estudios de expresión de la subunidad NR1, en ovocitos de *Xenopus sp*, han demostrado que puede formar receptores homoméricos funcionales. Sin embargo, cuando se ensambla con las subunidades NR2, las corrientes activadas por Glu o NMDA se incrementan en varios órdenes de magnitud, por lo que parece ser que la entidad heteromérica funciona con mejor eficiencia. Es importante señalar que los homómeros de las subunidades NR2 no forman receptores funcionales, por lo que estas subunidades pueden considerarse sólo como moduladoras (22).

La subunidad NR2 también es un polipéptido con cuatro dominios transmembranales, de la cual se conocen cuatro tipos diferentes NR2A-D. Estudios electrofisiológicos demuestran que los canales de las subunidades recombinantes NR1-NR2C y NR1-NR2D son poco sensibles al bloqueo por Mg^{++} y se inactivan lentamente, en cambio los recombinantes NR1-NR2A y NR1-NR2B son altamente sensibles a este bloqueo y su inactivación es rápida (23, 24,25).

Distribución del receptor NMDA.

El receptor NMDA se distribuye prácticamente en todo el SNC, pero es más abundante en la corteza cerebral, los ganglios basales, el hipocampo y en estructuras relacionadas con los sistemas sensoriales (26).

Cada uno de los subtipos de las subunidades que componen al R-NMDA presentan un patrón de expresión temporal y espacial particulares, los cuales pueden sobreponerse durante el desarrollo (26). En el cerebro de la rata, la subunidad NR1 se expresa desde la etapa embrionaria hasta la edad adulta, en tanto que las subunidades NR2A y NR2C, se comienzan a expresar abundantemente hasta después del nacimiento (26,27). En términos generales, tanto la subunidad NR2A como la NR1 se expresa ampliamente en todo el SNC, lo que sugiere la existencia predominante de un R-NMDA heteromérico NR1-NR2A, en la mayoría de las regiones cerebrales de la rata (26). En cambio, la subunidad NR2C se expresa abundantemente en cerebelo, tálamo y bulbo olfatorio; y de forma moderada en cuerpo estriado e hipocampo (26, 27) (Figura 4).

Con respecto a las subunidades NR2B y NR2D, se conoce que se expresan predominantemente durante la etapa embrionaria de la rata, en la cual la subunidad NR2B es abundante en corteza cerebral, cuerpo estriado, bulbo olfatorio y tálamo; y la NR2D en estructuras diencefálicas, del cerebro medio y del tallo cerebral (Figura 5) (28). Sin embargo, la subunidad NR2D también se expresa moderadamente durante el desarrollo postnatal de la rata en globo pálido, tálamo y tallo cerebral (28) (Figura 5), así como en corteza cerebral, hipocampo, bulbo olfatorio y cerebelo (29).

ANTECEDENTES

El Glu es considerado el principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos, sin embargo, cuando sus niveles extracelulares se elevan significativamente, puede producir daño neuronal (30). La primera demostración de los efectos tóxicos del Glu, proviene de la década de 1950, cuando Lucas y Newhouse utilizaron la administración sistémica de Glu como tratamiento para la distrofia retiniana, promoviendo la degeneración irreversible de las neuronas de la capa interna de la retina inmadura de ratón (30). Estudios posteriores realizados por Lucas y Newhouse en 1957 revelaron que las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo y las áreas circunventriculares de ratón son también vulnerables a los efectos citotóxicos del Glu (31,32). Los efectos neurotóxicos del Glu se han demostrado en una gran variedad de preparaciones neuronales de diferentes especies animales.

En 1971, Olney propuso que el daño neuronal inducido por Glu, se debía a una despolarización neuronal sostenida, producida por la sobre-activación de los receptores glutamatérgicos, dándole el nombre de **daño neuronal excitotóxico** (31,32). La sobre-activación de los receptores glutamatérgicos, eleva excesivamente la concentración intracelular de Ca^{++} , lo cual promueve la activación de diferentes procesos implicados en la muerte neuronal, entre ellos: **1)** la generación de radicales libres que induce la lipoperoxidación de los lípidos membranales (33); **2)** la síntesis de óxido nítrico, molécula que puede actuar como retromensajero y potenciar la liberación de Glu incrementando su efecto excitotóxico (34); **3)** la activación inespecífica de múltiples cadenas enzimáticas, condición que alteraría las vías de señalización intracelular y favorecería la proteólisis del contenido citoplasmático (33); y **4)** alteraciones mitocondriales relacionadas con disminuciones en el metabolismo energético, lo cual promovería la generación de radicales libres (35). De esta forma, la sobre-activación de receptores Glutamatergicos se ha implicado en algunos desórdenes neurológicos como isquemia cerebral (40), trauma y epilepsia, así como en enfermedades crónicas neurodegenerativas como el Parkinson (36), la corea de Huntington (37) y la demencia tipo Alzheimer (38), enfermedades que se caracterizan por presentar daño y disminución selectiva de neuronas.

Por otro lado, se conoce que los patrones de expresión de las diferentes subunidades que componen los receptores glutamatérgicos se modifican significativamente en diversas condiciones neuropatológicas, por lo que representan un factor importante en la regulación de dichas alteraciones. En este sentido, Resink y col. (39) demostraron que en cultivo de células granulares cerebelares de ratas de 30 días de edad, el NMDA induce una disminución en los niveles del RNAm y de la proteína de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del R-NMDA, respuesta que pudiera funcionar como un mecanismo neuroprotector, ya que a pesar de la exposición al NMDA no existe muerte neuronal (39).

Por otro lado, se ha demostrado que el daño neuronal hipóxico producido en células corticales e hipocampales de ratas adultas incrementa la expresión del RNAm de la subunidad NR2C del receptor NMDA, por lo que un incremento promovería la existencia de receptores tipo NMDA (NR2C) con una mayor permeabilidad para el Ca^{++} (40).

En pacientes con la enfermedad de Huntington existe una disminución en el número de neuronas de la capa VI de la corteza frontal, así como una incremento en la unión de [^3H]-Glu al R-NMDA, lo que sugiere la existencia de cambios en la expresión de estos receptores durante el desarrollo de esta enfermedad (41, 42). Se conoce que tanto la degeneración neocortical inducida por agonistas glutamatérgicos, como en la observada en pacientes con la enfermedad de Huntington, existe una disminución del 90% en los sitios de unión para [^3H]-AMPA y [^3H]-Kainato en la capa V y VI de la corteza cerebral (41).

Uno de los modelos ampliamente utilizado para el estudio de los mecanismos implicados en el daño neuronal excitotóxico consiste en la administración sistémica (subcutánea o intraperitoneal) del ácido glutámico en forma de sal monosódica (GMS) a ratas recién nacidas (31). En nuestro laboratorio, dicho modelo se ha utilizado para caracterizar la susceptibilidad que tienen los sistemas de neurotransmisión colinérgico y GABAérgico, al efecto excitotóxico del Glu en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo de la rata. Los resultados demostraron que la administración de GMS a animales recién nacidos produce cambios en la actividad de la enzima que sintetiza a la

acetilcolina y el número de receptores muscarínicos, así como en la densidad de células GABAérgicas (43,44). Además se demostró que la administración de GMS también induce cambios en la unión de [3 H]-KA y [3 H]-Glu, así como cambios en la expresión del RNAm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del R-NMDA en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo (44,46).

Por lo que, el presente trabajo se diseñó para determinar el efecto que tiene la administración sistémica de GMS a animales recién nacidos sobre la expresión de las subunidades NR2C y NR2D del receptor NMDA en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado a los 60 días de edad, lo que permitirá caracterizar mejor los mecanismos involucrados en la vulnerabilidad y el daño neuronal producido por Glu, en regiones altamente susceptibles a degenerar en diferentes patologías del SNC.

JUSTIFICACIÓN

El Glu es considerado el principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos, sin embargo, cuando los niveles extracelulares de Glu se elevan excesivamente, puede producir daño neuronal, a través de un proceso conocido como excitotoxicidad. Los efectos del Glu son mediados por la activación de diferentes tipos de receptores específicos, de los cuales el R-NMDA resulta de mayor importancia, debido a sus implicaciones funcionales en los procesos de memoria y aprendizaje; a que está presente en todas las regiones cerebrales y etapas del desarrollo del SNC; y a la capacidad del NMDA para inducir daño neuronal en diversas preparaciones neuronales. Este receptor se compone de combinaciones heteroméricas de las subunidades NR1 y NR2A-D, las cuales se combinan alternativamente, formando complejos con afinidad por el mismo agonista pero funcionalmente diferentes. Los niveles de expresión de las subunidades del receptor NMDA se modifican a consecuencia de diversas alteraciones neuropatológicas, incluyendo el daño excitotóxico. Uno de los modelos más utilizados para el estudio de la excitotoxicidad, consiste en la administración de glutamato monosódico (GMS) a animales recién nacidos. Recientemente, se demostró que la administración neonatal de GMS, modifica los niveles de expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo, pero se desconocía el efecto de dicho tratamiento sobre la expresión de las subunidades NR2C y NR2D. Conocimiento que sería de gran importancia, debido a que los R-NMDA heteroméricos que incluyen a estas subunidades, son menos sensibles al bloqueo ejercido por Mg^{++} y por lo tanto, más susceptibles a los efectos tóxicos del Glu. Debido a esto en el presente trabajo se evaluarán los niveles de expresión de las subunidades NR2C y NR2D en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo de ratas adultas después del tratamiento neonatal con GMS.

HIPÓTESIS

Si el daño neuronal excitotóxico modifica los niveles del RNAm de las subunidades que componen a los receptores glutamatérgicos, luego entonces el tratamiento neonatal con GMS modificará los niveles de expresión del RNAm de las subunidades NR2C y NR2D del receptor a Glu tipo NMDA.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar mediante la técnica de RT-PCR los cambios en los niveles del RNAm de las subunidades NR2C y NR2D, que componen al receptor NMDA en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo en la rata adulta, después del tratamiento neonatal con GMS.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar mediante la técnica de RT-PCR los niveles del RNAm de las subunidades NR2C y NR2D en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado de ratas intactas de 60 días de edad (Grupo Testigo).
- 2.- Determinar mediante la técnica de RT-PCR los niveles del RNAm de las subunidades NR2C y NR2D en las mismas regiones cerebrales de ratas adultas (60 días de edad), después del tratamiento neonatal con GMS (Grupo Experimental).

MATERIALES
Y
MÉTODOS

Preparación de animales.

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas recién nacidas de la cepa Wistar, las cuales fueron divididas en dos grupos de trabajo:

Grupo testigo: animales intactos que no recibieron ningún tratamiento.

Grupo experimental: animales que recibieron 4 mg de GMS por gramo de peso corporal, via subcutánea, los días 1, 3, 5 y 7 de edad posnatal.

Obtención del tejido.

Después del tratamiento, los animales se mantuvieron en condiciones de bioferio hasta los 60 días de edad, en que fueron sacrificados por decapitación. Se extrajo el cerebro en condiciones asépticas y se disecaron las regiones cerebrales a estudiar: corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo. Los tejidos se pesaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido hasta el día de su utilización para la extracción del ácido ribonucleico total (RNA total).

Obtención y cuantificación del RNA total.

La extracción del RNA total se realizó mediante el método de isotiocianato de guanidina (47), el cual se describe a continuación. El tejido (50 mg) se homogeniza en 500 μ L de trizol, se le adiciona 100 μ L de cloroformo y se centrifuga 12,000 rpm durante 19 min a 4°C, se toma el sobrenadante y se le agrega un volumen igual de isopropanol (0-4°C), se incuba de 10 a 15 min a 4°C y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones. Posteriormente, el RNA precipitado se lava con etanol al 75% en agua tratada previamente con 0.1% de dietil pirocarbonato (agua DEPC) y se disuelve en un volumen total de 20-80 μ L de agua DEPC.

Determinación espectrofotométrica de la cantidad y calidad del RNA.

La cantidad y calidad del RNA extraído, se evaluo a través del índice de absorbancia de 260/280 nm. Considerándose óptimas aquellas muestras cuyo índice de absorbancia fuera de 1.8 a 2.0.

Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Para la síntesis del DNAc (retrotranscripción) se utilizó la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Molovney. Se tomaron 2 μ g de RNA de

cada muestra, se adicionó agua estéril para un volumen total de 6 μ L y se incubó durante 10 min a 70°C. Inmediatamente después se incubó en un baño de hielo con agitación continua durante 5 min. Posteriormente, se adicionó la mezcla de retrotranscripción (Tris-HCl 50 mM pH 8.3; Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) 2.5 mM; Ditiotreitól 10 mM; Iniciadores aleatorios 1 mg/ μ L; Inhibidores de RNAasas (RNAsin) 1U/ μ L) y la transcriptasa reversa (200 U/ μ L) para luego incubarse a 37°C durante una hora y a 95°C durante 10 min, se les adicionó agua estéril y se conservaron a -20°C hasta su utilización para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la PCR, se utilizó la siguiente mezcla de reacción: Taq DNA polimerasa (1 U/ μ L), 1 μ L de DNAC, dNTPs (10 mM), MgCl₂ (50 mM), Tris-HCl 50 mM pH 8.0, agua estéril y los oligonucleótidos sentido y antisentido para cada subunidad proteínica del receptor NMDA (Tabla 1). Simultáneamente se utilizó la enzima HPRT (Hipoxantina-fosforribosil-transferasa) como gen constitutivo (control metodológico).

Los ciclos de temperatura se realizaron en un termociclador automático. La amplificación para la subunidad NR2C y para el gen de HPRT se realizó en 28 ciclos y para la subunidad NR2D en 26 ciclos, constando cada ciclo de un paso de desnaturalización del DNA a 94°C por 5 min alineación e hibridación de los iniciadores a 60°C por un minuto y extensión de los iniciadores a 72°C por 1.5 min. A estos ciclos se les agregó un ciclo inicial de 5 min a 94°C y uno final de 5 min a 72°C grados centígrados.

TABLA 1. Secuencias de Oligonucleótidos utilizados para la PCR

Gen	Secuencia	Producto Amplificado (pb)
NMDAR2C Sentido	5'-ACATGAAGTATCCGTATGG-3'	526
Antisentido	3'-GTTCTGGTTGTAGCTGACAG-5'	
NMDAR2D Sentido	5'-AGGTGTTCTATCAGCGTG-3'	536
Antisentido	3'-TGTAGCTGTGCATGTTTCAG-5'	
HPRT Sentido	5'-TCCCAGCGTCGTGATTAGTG-3'	608
Antisentido	3'-GGCTTTTCCACTTTCGCTGA-5'	

Los productos amplificados de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Los gels se fotografiaron con película polaroid 665 en exposición a la luz UV, y el negativo de la fotografía se utilizó para hacer el análisis densitométrico en un espectrofotómetro Beckman DU650. Los valores de densidad óptica para las diversas subunidades se normalizaron contra la expresión del RNAm del gen constitutivo para HPRT. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de absorbancia.

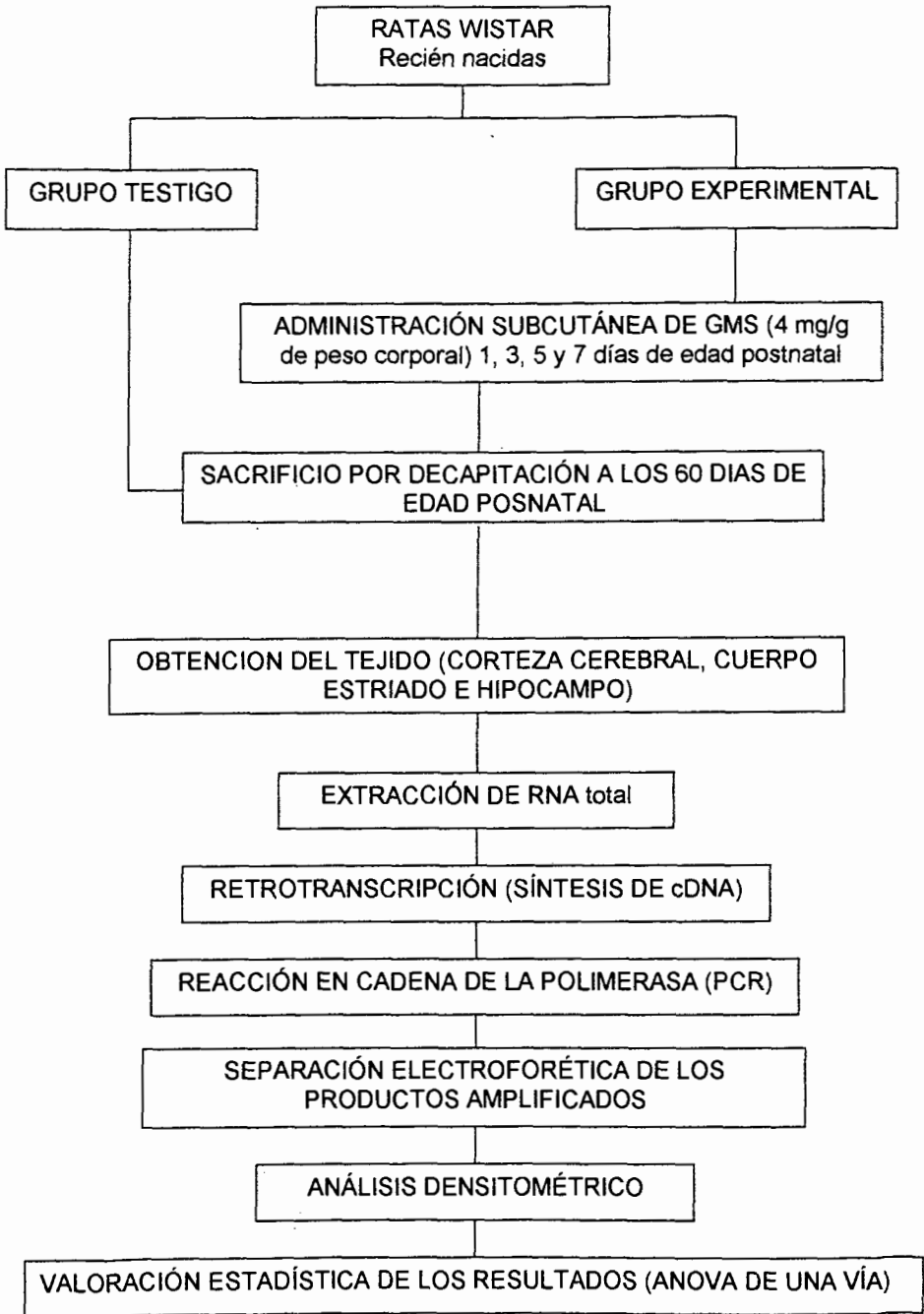
Los resultados obtenidos se procesaron mediante la prueba de análisis de varianza ANOVA de una vía y se expresaron como el promedio de 3 experimentos por triplicado, considerándose significativamente diferentes aquellos con una $p < 0.05$.

Normalización de la HPRT en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La concentración de RNA total es variable en cada muestra debido al proceso de extracción como en los niveles de expresión intracelular del RNA. Con esta base, se decidió normalizar los niveles de expresión de las subunidades NR2C y NR2D utilizando el gen constitutivo de la enzima Hipoxantina-fosforribosil-transferasa, para lo cual se fijaron los ciclos y se agregó RNA total a la mezcla de reacción en la PCR hasta alcanzar un nivel de expresión de este gen semejante en todas las muestras, tanto testigo como experimentales. De esta forma, se utilizó la misma cantidad de cDNA en la mezcla de reacción en la PCR para determinar los niveles de expresión de los genes correspondientes a NR2C y NR2D.

DIAGRAMA

EXPERIMENTAL



RESULTADOS

La administración neonatal de GMS no modifico los niveles de RNAm de las subunidades estudiadas en la corteza cèbral de animales adultos, observándose únicamente una ligera disminución del 5% en los niveles de expresión del RNAm de la subunidad NR2C, la cual no es estadísticamente significativa con respecto al grupo testigo (Fig. 7 y Fig. 8). Sin embargo, en el cuerpo estriado se observa un aumento en los niveles del RNAm, tanto para la subunidad NR2C del 28% (Fig. 7), como para la NR2D del 47% a los 60 días de edad (Fig. 8), después de la administración de GMS. Por otro lado, en el hipocampo de ratas adultas se observa que dicho tratamiento produce un aumento altamente significativo en la expresión de ambas subunidades, de alrededor del 134% para NR2C y del 115% para NR2D (Fig. 7 y Fig. 8).

DISCUSIÓN

La participación de los receptores glutamatérgicos en los procesos de memoria y aprendizaje, así como en el establecimiento de algunas alteraciones neurológicas ha conducido al estudio de la composición molecular de dichos receptores. La activación del R-NMDA modula diferentes eventos de plasticidad neuronal asociados al desarrollo del SNC, tales como la diferenciación, el establecimiento de sinapsis, el crecimiento neuronal (axonal y dendrítico), la remodelación sináptica y la migración neuronal, por lo que resulta de gran importancia para el establecimiento de la citoarquitectura y conectividad sináptica definitivas (48). Por otro lado, también se ha demostrado que la activación del R-NMDA por diversos agonistas glutamatérgicos produce muerte neuronal en diferentes preparaciones experimentales (38). De esta forma, la sobre-activación de los R-NMDA en etapas tempranas del desarrollo neuronal, podría modificar no sólo el establecimiento de circuitos neuronales, sino también favorecer el desarrollo de diferentes condiciones neuropatológicas en la edad adulta. Así, el presente trabajo se realizó con el propósito de analizar el efecto que tiene la administración neonatal de GMS sobre los niveles de expresión del RNAm de las subunidades NR2C y NR2D del R-NMDA en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo de ratas adultas.

La toxicidad o daño inducido por agonistas a Glu es mayor cuando se coexpresan las subunidades NR1-NR2C y NR1-NR2D (25). En este sentido, existen estudios electrofisiológicos que demuestran que la combinación NR1-NR2C y NR1-NR2D muestran una reducida sensibilidad al bloqueo por Mg^{++} , comparado con los receptores NR1-NR2A y NR1-NR2B (49,50). Además el tiempo de cierre de estos heterómeros (NR1-NR2C y NR1-NR2D) es más lenta (25). Así, la combinación de estas subunidades resulta ser de gran importancia para la funcionalidad del receptor. Debido a que un incremento en la toxicidad se podría relacionar con un aumento en la permeabilidad al Ca^{++} a través de estos receptores, que promovería la activación de diferentes procesos implicados en la muerte neuronal (51).

Estudios de hibridación in situ demuestran que el RNAm de la subunidad NR2C se expresa principalmente en el cerebelo, el tálamo y el bulbo olfatorio

durante la etapa postnatal y en menor proporción en la corteza cerebral, cuerpo estriado y en algunas poblaciones celulares del hipocampo (25,27). En este sentido los resultados obtenidos muestran que la expresión del RNAm de la subunidad NR2C en animales intactos es prácticamente homogénea en las tres regiones estudiadas.

El RNAm de la subunidad NR2D se expresa predominantemente durante la etapa embrionaria de la rata, en las estructuras del diencéfalicas, mesencefálicas y el tallo cerebral; y escasamente en otras regiones cerebrales como son la corteza cerebral, la formación hipocámpica y el cerebelo de la rata en etapas tempranas del desarrollo (28,26). Los resultados muestran que la expresión del RNAm de la subunidad NR2D en el grupo intacto es menor en la corteza cerebral en comparación con el cuerpo estriado y el hipocampo.

Por otro lado el tratamiento neonatal de GMS no modificó los niveles de expresión del RNAm de las subunidades NR2C y NR2D del receptor NMDA en la corteza cerebral en comparación con el grupo testigo (Figuras 7 y 8). Al respecto, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento neonatal con GMS aumenta los niveles de RNAm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA en la corteza cerebral a los 60 días de edad postnatal (46), cuya expresión en esta región cerebral es alta en comparación con las subunidades NR2C y NR2D (26,28,29). Por lo tanto, el efecto del GMS puede ser mediado por los receptores NR1, NR2A y NR2B debido a que los niveles de expresión de estas subunidades son altos en esta región cerebral en comparación con la de las subunidades NR2C y NR2D. Estos resultados a su vez no descartan la posibilidad de que el efecto que induce el GMS podría estar mediado por los receptores del tipo No-NMDA ó tipo metabotrópico debido a que existen una serie de estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* que sugieren que algunas de las subunidades de estos receptores se expresan en gran proporción en la corteza cerebral en comparación con las subunidades NR2C y NR2D (52,53).

Además, los resultados del presente trabajo muestran un aumento en la expresión del RNAm de las subunidades NR2C y NR2D en el hipocampo y el cuerpo estriado de ratas adultas después del tratamiento neonatalmente con

GMS, respecto al grupo testigo (Fig 7 y 8). Este incremento podría asociarse con la muerte celular (gliosis) observada a los 14 días de edad posnatal (40% reducción en el número neuronal) como un mecanismo compensatorio del daño inducido por el GMS (Datos no publicados). Ya que como anteriormente se ha mencionado estas subunidades están implicadas en los mecanismos de reestructuración neuronal, aunque esto en etapas tempranas del desarrollo embrionario cuando los procesos de establecimiento sináptico aun no están completamente establecidos. Así una sobre-expresión de estas subunidades en neuronas sobrevivientes podría favorecer el re-establecimiento de conexiones sinápticas compensatorias como una respuesta plástica del cerebro tal y como ocurre durante el desarrollo (54).

En otros trabajos se ha demostrado que una alteración de los circuitos neuronales genera una pérdida de aferencias, esto también se observa en pacientes con esclerosis hipocámpal, así como en ratas tratadas con ácido kaínico, lo que conduce a una respuesta compensatoria entre los sistemas adyacentes y las neuronas presentes, aumentándose la expresión de las subunidades del receptor NMDA, en neuronas intactas que no han sufrido daño alguno (55). Estos resultados sugieren que tras el daño y muerte neuronal, se da el establecimiento de conexiones sinápticas compensatorias con un mayor incremento en la expresión de estas subunidades en las regiones involucradas, fenómeno conocido como "up-regulation" (56).

Estos resultados en conjunto no descartan la posibilidad de que el efecto inducido por el GMS podría estar mediado por receptores ionotrópicos y metabotrópicos, debido a que existen una serie de estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* que sugieren que la estimulación excesiva de los receptores para Glu pueden dañar o destruir neuronas (52). Asimismo, diversas evidencias experimentales demuestran que las células gliales expresan varios receptores a Glu después de un período hipóxico, por lo cual no se descarta la posibilidad, que el efecto que induce el GMS podría estar mediado por los receptores a Glu presentes en las células gliales (53).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto y con los resultados obtenidos en el presente trabajo, resulta difícil precisar las implicaciones fisiopatológicas y el significado que podría tener un incremento en los niveles de expresión del RNAm de las subunidades NR2C y NR2D después de la administración neonatal de GMS. Sin embargo, este incremento podría estar asociado a cambios en la excitabilidad de las neuronas, por lo que será necesario continuar con experimentos adicionales para profundizar y ampliar el conocimiento al respecto.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento neonatal con GMS no modifica los niveles de expresión del RNAm de las subunidades NR2C y NR2D del receptor NMDA en la corteza cerebral de ratas a los 60 días de edad posnatal.
2. El tratamiento neonatal con GMS aumenta los niveles de expresión del RNAm de las subunidades NR2C y NR2D del receptor NMDA en el cuerpo estriado y el hipocampo de ratas a los 60 días de edad posnatal.
3. El incremento en la expresión de las subunidades NR2C y NR2D que se observa en el cuerpo estriado y el hipocampo después del tratamiento neonatal con GMS podría ser parte de la respuesta plástica del cerebro para promover la re-estructuración neuronal.

FIGURAS

FIGURA 1

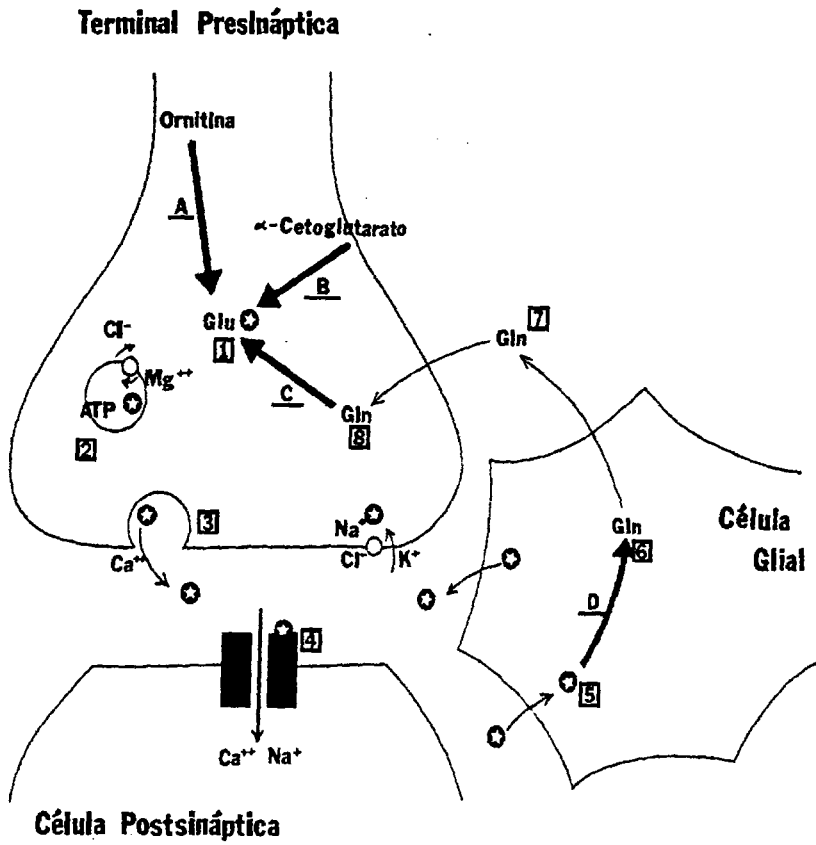
SINAPSIS GLUTAMATERGICA.

Procesos:

- 1) Síntesis de Glu.
- 2) Transporte de Glu al interior de las vesículas sinápticas.
- 3) Liberación del Glu.
- 4) Interacción del Glu con los receptores ionotrópicos.
- 5) Recaptura del Glu hacia las células astrocitarias.
- 6) Interconversión del Glu a glutamina, por acción de la glutamina sintetasa dentro del astrocito.
- 7) Liberación de la glutamina por las células gliales y recaptura por las neuronas glutamatérgicas.
- 8) Interconversión de la glutamina a Glu por acción de la enzima glutaminasa, dentro de la terminal nerviosa.

Enzimas:

- A) Ornitina amino transferasa
- B) Deshidrogenasa del ácido glutámico
- C) Glutaminasa
- D) Glutamina sintetasa

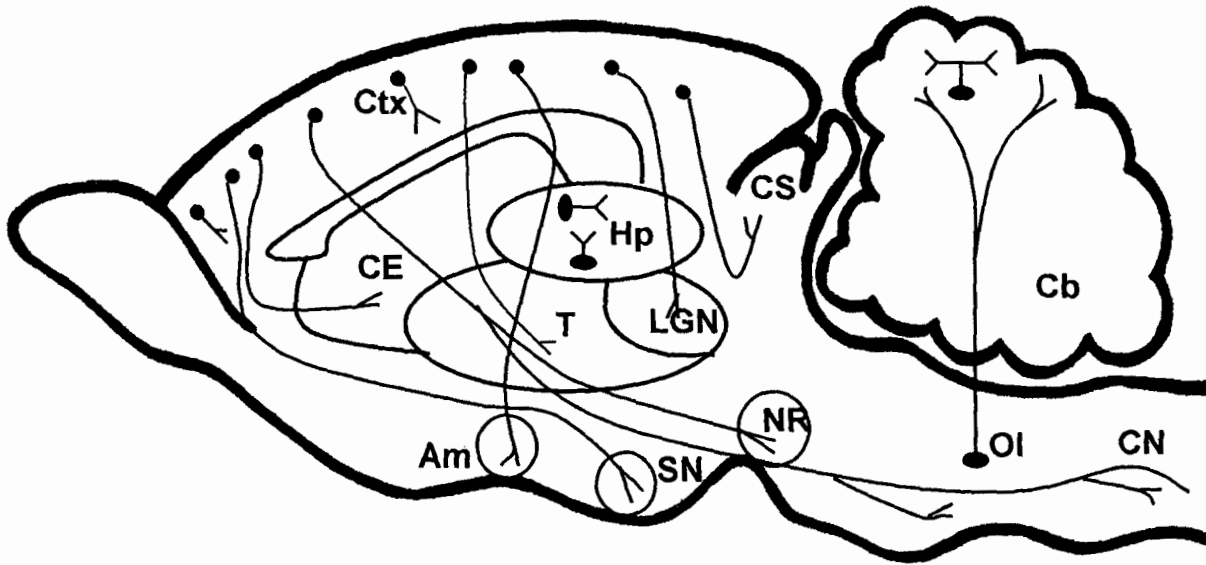


Tomada de Ureña-Guerrero M.E. (1994).

F I G U R A 2**VIAS DE NEUROTRANSMISION GLUTAMATERGICA.**

El esquema muestra las inervaciones glutamatergicas de la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo en el cerebro de la rata.

Am	Amígdala
Cb	Cerebelo
CE	Cuerpo estriado
NC	Núcleo cuneato
CS	Núcleo superior
Ctx	Corteza
Hp	Hipocampo
NGL	Núcleo geniculado lateral
NR	Núcleo rojo
OI	Oliva inferior
SN	Sustancia negra
T	Tálamo



Tomada de Ureña-Guerrero M.E. (1999).

FIGURA 3

ESQUEMA DE LOS RECEPTORES A GLUTAMATO Y LOS SITIOS DE REGULACION QUE POSEEN.

1.- RECEPTOR NMDA

MK-801	(Dizocilpina)
NMDA	(N-metil-D-Aspartato)
Zn ⁺⁺	(Zinc)
PA	(Poliaminas)
Mg ⁺⁺	(Magnesio)
Gly	(Glicina)

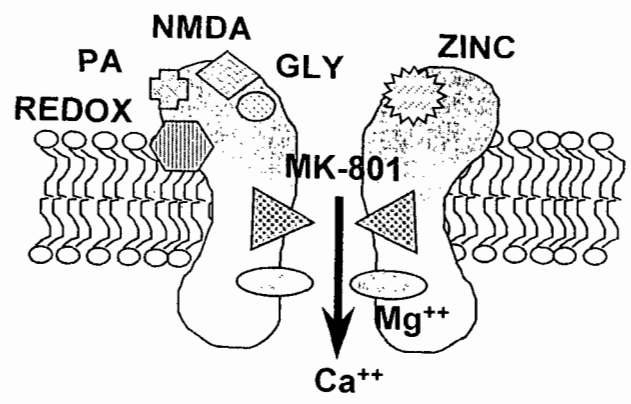
2.- RECEPTOR A KAINATO

Glu	(Glutamato)
KA	(Kainato)
Na ⁺	(Sodio)
Ca ⁺⁺	(Calcio)

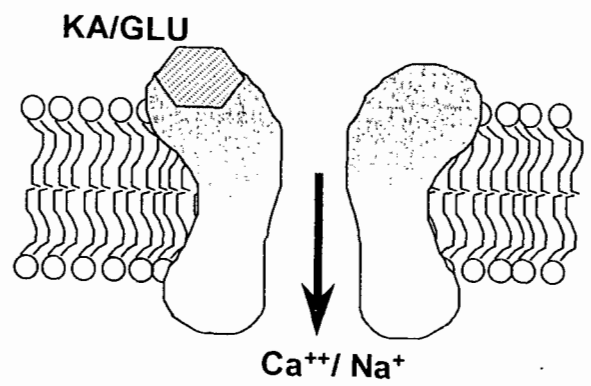
3.- RECEPTOR AMPA

AMPA	(Ácido 3-amino-4-hidroxi-5-metil-isoxasol propiónico)
KA	(Kainato)
Na ⁺	(Sodio)
Ca ⁺⁺	(Calcio)

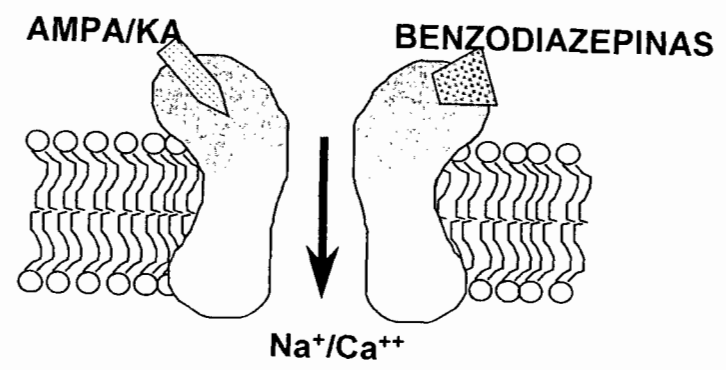
1.-RECEPTOR NMDA



2.-RECEPTOR A KAINATO

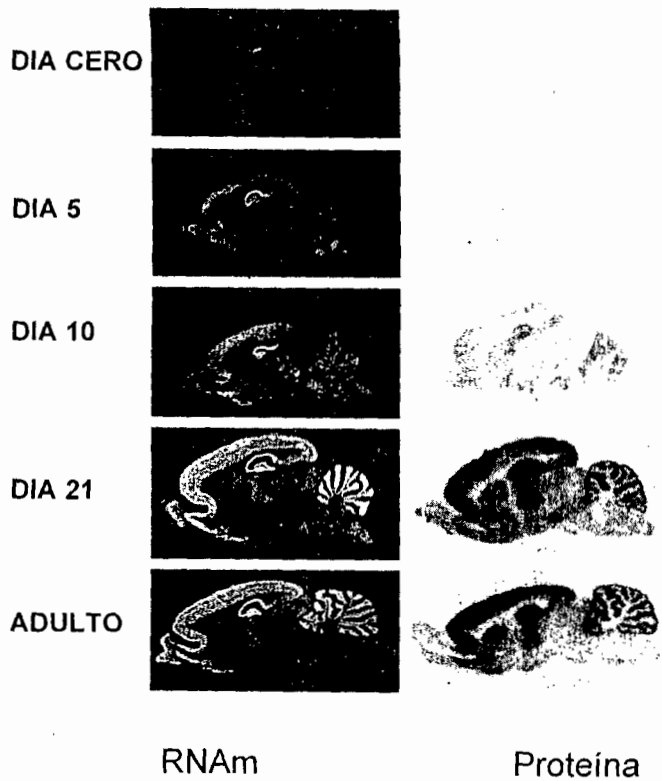


3.-RECEPTOR AMPA

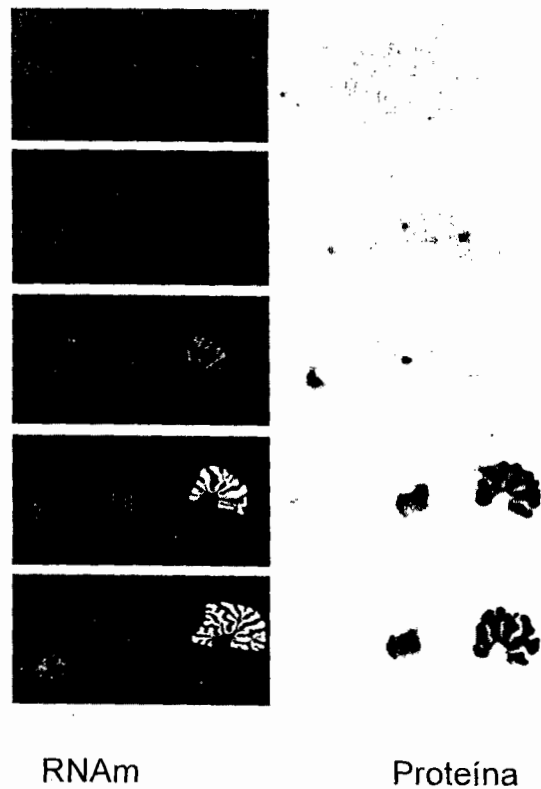


F I G U R A 4

LAS IMÁGENES MUESTRAN LOS PATRONES DE EXPRESION DEL RNAm Y DE LA PROTEÍNA DE LAS SUBUNIDADES NR2A Y NR2C DEL RECEPTOR NMDA (27).



NR2A



NR2C

F I G U R A 5

LAS IMÁGENES MUESTRAN LOS PATRONES DE EXPRESION DEL RNAm Y DE LA PROTEINA DE LAS SUBUNIDADES NR2B Y NR2D DEL RECEPTOR NMDA (27).

DIA CERO



DIA 5



DIA 10



DIA 21



ADULTO



RNAm

Proteína

Proteína

NR2B

NR2D

F I G U R A 6

DIAGRAMA QUE MUESTRA LOS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A LA
NEUROTOXICIDAD DE LOS AMINOÁCIDOS EXCITADORES.

AMINOÁCIDOS EXCITADORES

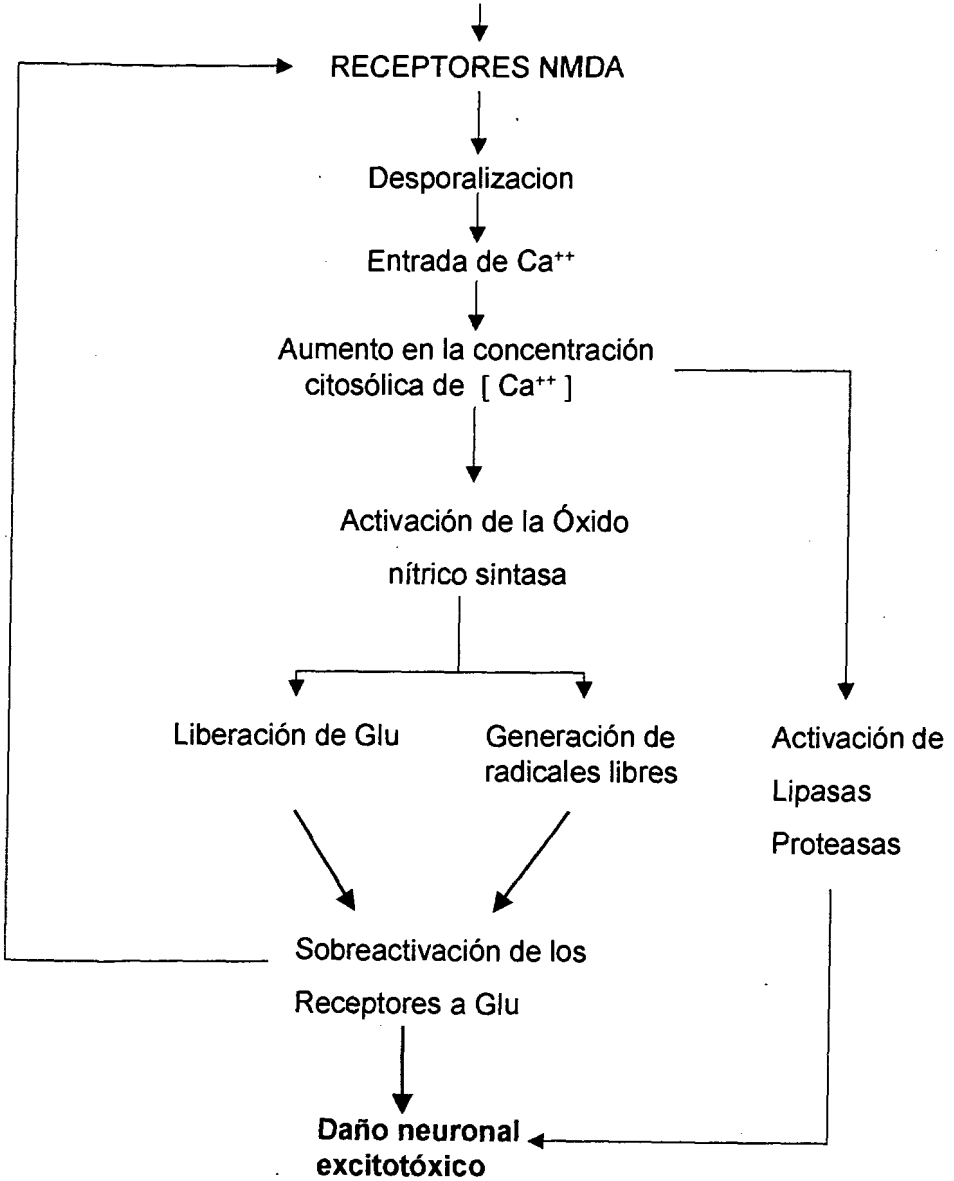


FIGURA 7

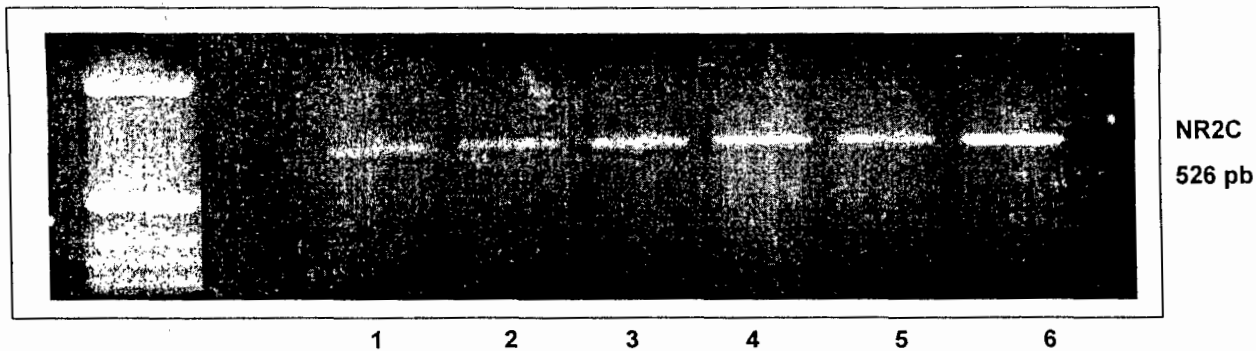
Efecto del tratamiento neonatal con glutamato monosodico (GMS) sobre los niveles de expresión del RNAm de la subunidad NR2C del receptor NMDA. (a) La figura muestra los productos amplificados por PCR correspondientes a la subunidad NR2C en la corteza cerebral (1 testigo, 2 experimental), el cuerpo estriado (3 testigo, 4 experimental) y el hipocampo (5 testigo y 6 experimental). (b) Los resultados expresan la media \pm error estándar de tres experimentos por triplicado.

Las diferencias estadísticamente significativos fueron:

★ $p < 0.05$ con respecto a su control.

EXPRESION DE LA SUBUNIDAD NR2C

a



b

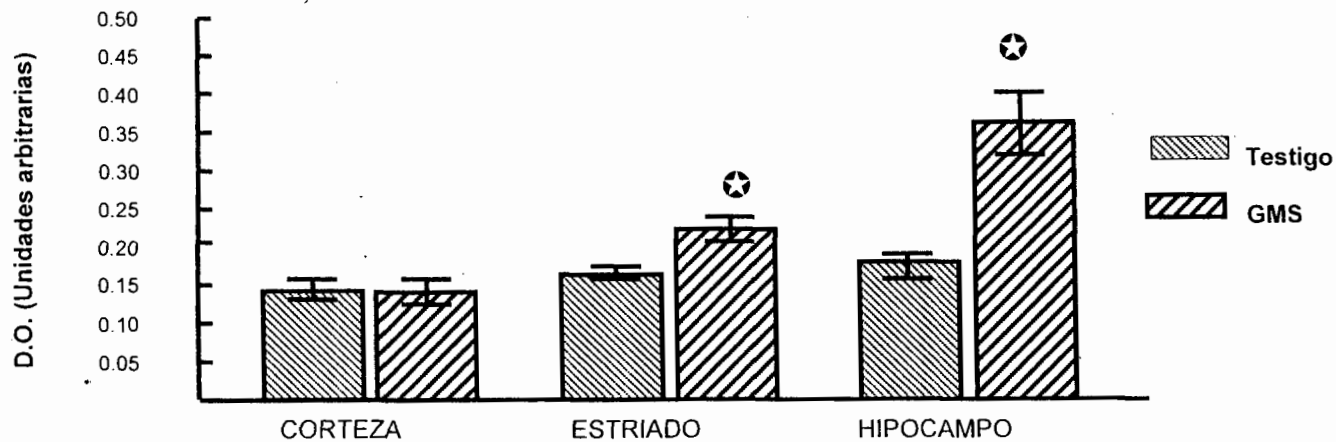


FIGURA 8

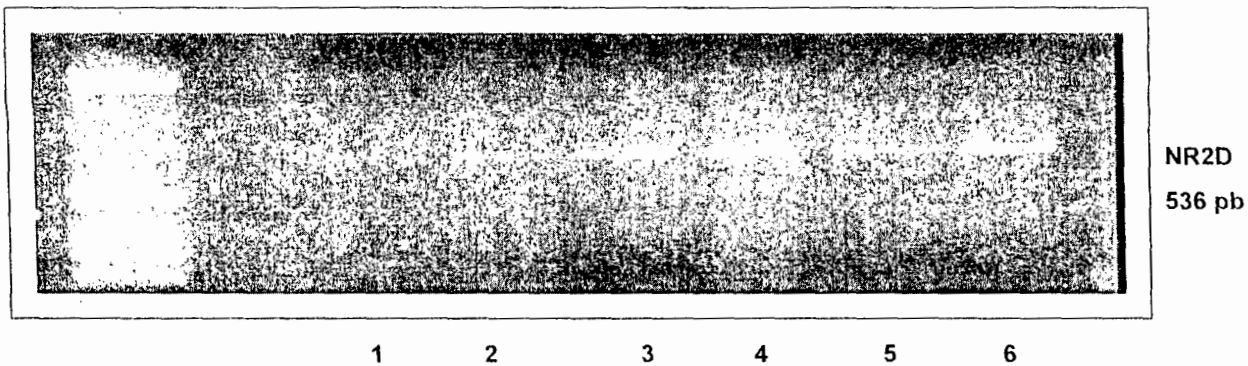
Efecto del Glutamato monosodico (GMS) sobre los niveles de expresión del RNAm de la subunidad NR2D del receptor NMDA. (a) La figura muestra los productos amplificados por PCR correspondientes a la subunidad NR2D en la corteza cerebral (1 testigo, 2 experimental), el cuerpo estriado (3 testigo, 4 experimental) y el hipocampo (5 testigo y 6 experimental) de ratas adultas después del tratamiento neonatal con GMS a dosis de 4 mg/g de peso corporal. (b) Los resultados expresan la media \pm error estándar de tres experimentos por triplicado.

Las diferencias estadísticamente significativos fueron:

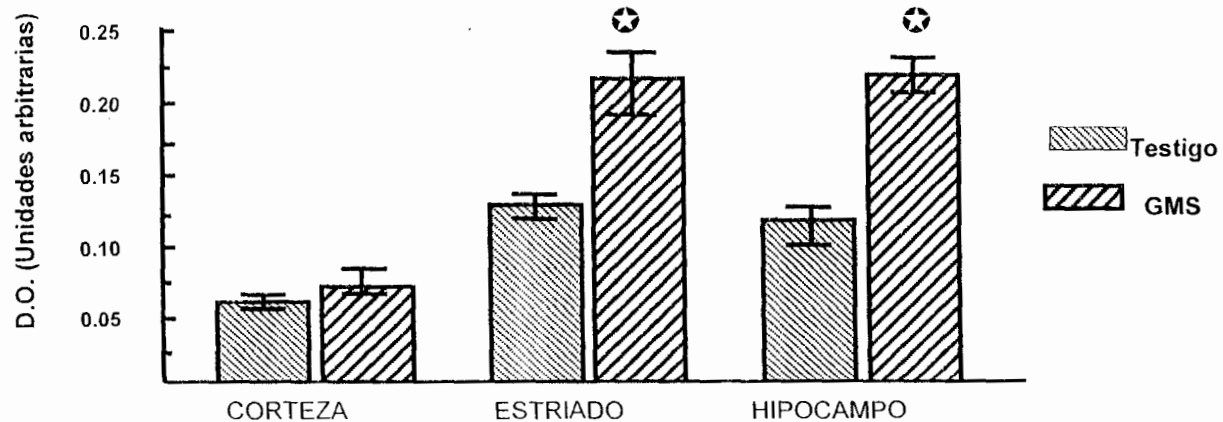
★ $p < 0.05$ con respecto a su control.

EXPRESION DE LA SUBUNIDAD NR2D

a



b



BIBLIOGRAFÍA

1. **Alcaraz V.M. (2000).** Estructura y función del sistema nervioso. U.de.G. México. p.p. 13-22.
2. **Bear F.M., Connors W.B. y Paradiso A.M. (1998).** Neuronas y Glia. En: Neurociencia. Explorando el cerebro. Masson, España. p.p. 24-45.
3. **López-Antúnez, L. (1986).** Anatomía funcional del sistema nervioso. Limusa. México. p.p. 27-34.
4. **Noback C.R. y Demarest W.M. (1956).** A study of thalamo-striate relations in the monkey. *Brain*. 79:1296-1297.
5. **Rivera A. y Ramón F. (1989).** Introducción a la electrofisiología. En: temas selectos de biología celular. SEP-COSNET-CINVESTAV, México D.F., p.p. 171-193.
6. **López-Antúnez L. (1996).** Anatomía funcional del sistema nervioso. Uthea, Noriega Editores. México. p.p. 525-665.
7. **Feria-Velasco A. y Tapia-Arizmendi G. (1986).** Estructura de los elementos tisulares centrales que intervienen en el fenómeno convulsivo. En: Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario. (Feria-Velasco A., Martínez M.D. y Rubio D.F. eds.). Trillas. México. p.p. 28-73.
8. **Gilman S. y Winans S.S. (1994).** Lo esencial en neuroanatomía y neurofisiología de Manter y Gatz. Manual moderno, México, p.p. 4-5
9. **Mateos-Gomez J.H. (1998).** Anatomía de los circuitos emocionales. *Arch. Neurocién.* 4: 187-190.
10. **Kravitz E.A., Kuffler S.W. y Potter D.D. (1963).** Gamma aminobutyric acid and other blocking compounds in crustacea II, peripheral nervous system. *J. Neurophysiol.* 26: 729-736.
11. **Cooper J.R., Bloom F.M. y Roth R.H. (1982).** Amino acids. En: The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University. p.p. 286-290.
12. **Fagg G.E. y Foster A.C. (1983).** Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience.* 9: 701-719.

13. **Katz B. y Miledi R. (1970).** Release of neurotransmitters and their interaction with receptors. *J. Physiol.* 203: 81-90.
14. **Mori H. y Mishina M. (1995).** Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology.* 34: 1219-1237.
15. **Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., Yamaguchi, S., Kawabata S. y M. Okada. (1998).** Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Rev.* 26: 230-235
16. **Conn P.J. y Pin J.P. (1997).** Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 205-237
17. **Laube B., Kuhse J. y Betz H. (1998).** Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J. Neurosci.* 18: 2954-2961.
18. **Hess S. D., Daggett L. P., Crona J., Deal C., Lu C.-C., Urrutia A., Chavez-Noriega L., Ellis S. B., Johnson E. y Velicelebi G. (1996).** Cloning and functional characterization of human heteromeric N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278: 808-816.
19. **Das S., Sasaki Y.F., Rothe T., Premkumar L.S., Takasu M., Crandall J.E., Dikkes P., Conner D.A., Rayudu P.V., Cheung W., Cheung H-S.V., Lipton S.A. y Nakanishi N. (1998).** Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature.* 393: 377-381.
20. **Zukin R. S. y Bennett M. L. V. (1995).** Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* 18: 306-313.
21. **Sakurada K., Masu M. y Nakanishi S. (1993).** Alteration of Ca^{++} permeability and sensitivity to Mg^{++} and channel blocker by a single acid substitution in the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 410-415.
22. **Ozawa S., Kamiya H. y Tsuzuki K. (1998).** Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54: 581-618.
23. **Money H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B. y Seeburg P.H.**

- (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 12: 529-540.
24. **Vicini S., Wang J. F., Li J. H., Zhu W. J., Wang Y. H., Luo J. H., Wolfe B. B. y Grayson D. R. (1998)**. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurophysiol.* 79: 555-566.
25. **Mitani A., Watanabe M. y Kataoka K. (1998)**. Functional change of NMDA receptor related to enhancement of susceptibility to neurotoxicity in the developing pontine nucleus. *J. Neurosci.* 18: 7941-7952
26. **Money H., Burnashev N. y Seeburg P. (1994)**. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 12: 529-540.
27. **Wenzel A., Fritschy J.M., Mohler Hanns. y Benke Dietmar. (1997)**. NMDA Receptor Heterogeneity During Postnatal Development of the Rat Brain: Differential Expression of the NR2A, NR2B, and NR2C Subunit Proteins. *J. Neurochem.* 68: 469-478.
28. **Wenzel A., Villa M., Mohler H. y Benke D. (1996)**. Developmental and Regional Expression of NMDA Receptor Subtypes Containing the NR2D Subunit in Rat Brain. *J. Neurochem.* 66:1240-1248.
29. **Wenzel A., Scheurer L., Fritschy J.M. y Benke D. (1995)**. Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B,2C and 2D in rat brain. *Neuroreport* 7:45-48.
30. **Lucas D.R. y Newhouse J.P. (1957)**. The toxic effect of sodium L-Glutamate in the layers of retina. *Arch. Ophthalmol.* 58: 193-201.
31. **Olney J. W. (1969)**. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 164: 719-721.
32. **Olney J. W. (1971)**. Glutamate induced neural necrosis in the infant mouse hypothalamus. *J. Neurophys. Exp. Neurol.*, 30:75-90.
33. **Nicholls D.G. y Ward M.W. (2000)**. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci.* 23:166-174.

34. Almeida, A., Heales, S.J.R., Bolaños, J.P. y Medina, J.M. (1998). Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res.* 790: 209-216.
35. Choi, D.W. (1995). Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 18, 58-60.
36. Turski L., Bressler K., Retting K.J. Loschmann P-A, Wachtel H. (1991). Protection of substantia nigra from MPP+neurotoxicity by N-methyl-D- aspartate antagonists. *Nature.* 249:414-418.
37. Young A.B., Greenamyre J.T., Hollingsworth Z, Albin R., D'Amato C, Shoulson I, Penney J.B. (1988). NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science.* 241:981-983
38. Dewar D., Chalmers D.T., Graham D.I. y McCulloch J. (1994). Glutamate metabotropic and AMPA binding sites are reduced in Alzheimer's disease: an autoradiographic study of the hippocampus. *Brain. Res.* 553. 58-64.
39. Resink A., Villa D. Benke., Hidaka H., Moler H. y Balázs R. (1996). Characterization of agonista-induced down-regulation of NMDA receptors in cerebelar granule cell cultures. *J. Neurochem.* 66: 369-377.
40. Pérez-Velázquez J.L. y Zhang L. (1994). In Vitro hypoxia induces expression of the NR2C subunit of the NMDA receptor in rat cortex and hippocampus. *J. Neurochem.* 63: 1171-1173.
41. Wagster M.V., Hedreen J.C. y Ross C.A. (1994). Selective loss of [³H]-kainic acid and [³H]-AMPA binding in layer VI of frontal cortex in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 127: 70-75.
42. Hedreen J.C. y Ross C.A. (1991). Neural loss in layer V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci. Lett.* 133. 257-261
43. Beas-Zárate C., Reinhart Schliebs., Ortuño-Sahagun D., Morales-Villagran A. y Feria-Velasco A. (1994). Effect of systemic monosodium L-glutamate on muscarinic cholinergic receptors in selected rat brain regions during development. *Archi. Med. Res.* 25:341-346.

44. **Beas-Zárate C., Sánchez-Ruiz M.Y., Ureña-Guerrero M.E. y Feria-Velasco A. (1998).** Effect of perinatal administration of monosodium L-glutamate to young rats on GABA release from various cerebral regions during development. *Neurochem. Intl.* 33: 217-232.
45. **Valdivia-Ramírez G. (1997).** Determinación de los receptores a glutamato durante el desarrollo de la corteza motora, hipocampo y estriado de ratas tratadas con glutamato monosódico en la edad temprana. Tesis de licenciatura. Q.F.B. U. de G.
46. **Beas-Zárate C., Rivera-Huizar S.V., Sánchez-Ruiz M.Y., Feria-Velasco A. y Armendáriz-Borunda J. (2001).** NMDA-receptor gene expression is differentially modulated by glutamate in rat brain regions. *Neurochem. Intl.* 39: 1-10
47. **Chomczynski P. y Sacchi N. (1987).** Single-Step of Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
48. **Komuro H. y Rakic P. (1993).** Modulation of neural migration by NMDA receptors. *Science.* 260: 95-97.
49. **Hess S.D., Daggett L.P., Deal C., Lu C.C., Johnson E.C. y Velicelebi, G. (1996).** Functional Characterization of Human N-Methyl-D-Aspartate Subtype 1A/2D Receptors. *J. Neurochem.* 70:1269-1279.
50. **Burnashev N., Zhou S., Neher E. y Sakmann B. (1995).** Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and Kainate receptor subtypes. *J. Physiol.* 485: 403-418.
51. **Wyllie D. J. A., Béhé P., Nassar M., Schoepfer R., y Colquhoun D. (1996).** Single-channel currents from recombinant NMDA NR1a/NR2D receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 263: 1079-1086.
52. **Schoepp D.D. y Conn J.P. (1996).** Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 13-20.
53. **Gottlieb M. y Matute C. (1997).** Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 Area following

- transient Forebrain Ischemia. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 17: 290-300.
54. **Blue M.E y Pamavelas J.G. (1983).** The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. *J. Neurocytol.* 12:697-712.
55. **Mikuni N., Babb T.L., Chakravarty D. y Hadam J. (1998).** NMDAR2 up-regulation precedes mossy fiber sprouting in kainate rat hippocampal epilepsy. *Neurosci Lett.* 255: 25-28.
56. **Uras J., Weihmuller F.B., Brunner L.C., Marshall J.F. y Cotman C.W. (1994).** Selective increase of NMDA-sensitive glutamate binding in the striatum of Parkinson's disease, Alzheimer's disease patients: an autoradiographic study. *J. Neurosci.* 14: 6317-6324.