

1999-E

090634437

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

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



**EXPRESION DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR PARA KAINATO  
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:**

**CESAR SORIA FREGOZO**

**GUADALAJARA, JAL., JULIO DE 2001.**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. CESAR SORIA FREGOZO  
P R E S E N T E.-**

El Comité de Titulación ACEPTA el cambio de título del anteproyecto titulado "EXPRESION DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR PARA KAINATO EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES DE RATAS ADULTAS DESPUES DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON GLUTAMATO MONOSODICO" del cual es Director el DR. CARLOS BEAS ZARATE y como asesor a la M.C. MONICA ELISA UREÑA GUERRERO.

Agradeciendo de antemano, sus finas atenciones nos despedimos enviando un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, FEBRERO 16 DEL 2000.**

**DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LOPEZ  
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION**

*Alma Rosa Villalobos*  
**DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA  
SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACION**

**MERL/ARVA/bacg\***

C. DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LOPEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION  
DE LA DIVISION 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:

**CESAR SORIA FREGOZO** código **090634437** con el titulo: **EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR PARA KAINATO EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES DE RATAS ADULTAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON GLUTAMATO MONOSÓDICO**, 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.

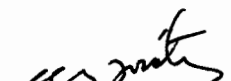
Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar ala presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO 28 DE JUNIO DEL 2001

EL DIRECTOR DE TESIS

LA ASESORA

  
DR. EN C. CARLOS BEAS ZARATE  
NOMBRE Y FIRMA

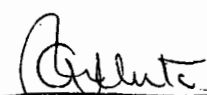


  
M. EN C. MONICA ELISA UREÑA GUERRERO  
NOMBRE Y FIRMA

SECRETARIA ACADEMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

SINODALES

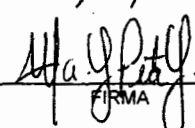
1.- DR. EN C. ALBERTO MORALES VILLAGRÁN  
NOMBRE COMPLETO

  
FIRMA

2.- M. EN C. MARTHA CATALINA RIVERA CERVANTES  
NOMBRE COMPLETO

  
FIRMA

3.- M. EN. C. MARIA LUISA PITA LOPEZ  
NOMBRE COMPLETO

  
FIRMA

1999-E

090634437

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y AMBIENTALES**



**EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR PARA  
KAINATO EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES DE  
RATAS ADULTAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO NEONATAL  
CON GLUTAMATO MONOSÓDICO**

**TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA**

**CESAR SORIA FREGOZO**

**GUADALAJARA, JAL. JULIO 2001**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis: Dr. Carlos Beas Zárate por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo.

A mi asesora: Mónica Elisa Ureña Guerrero, por toda la paciencia en la revisión del trabajo.

A mi jurado de tesis: Dr. Alberto Morales Villagran.

M. en C. Maria Luisa Pita López.

Dr. Graciela Gudiño Cabrera .

Y de manera muy especial a la M. en. C. Martha Catalina Rivera Cervantes por sus invaluables sugerencias para terminar el presente escrito.

A mis padres: María Elena Fregoso Hernández y Clemente Soria Santillán

A mi compañero y amigo Mario Eduardo Flores Soto por su invaluable apoyo en los momentos mas difíciles.

A Lizbeth Hernández Hernández por ser una excelente amiga y darme ánimos para terminar pronto.

A Maria Concepción López Lomeli por todo lo que hemos compartido y disfrutado de la vida, pero sobre todo por su invaluable amistad y apoyo.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la realización del presente trabajo.

**DEDICATORIAS****A MIS PADRES**

**POR CREER EN MI EN TODO MOMENTO  
Y POR EL APOYO BRINDADO.**

**A MIS HERMANOS**

**DE MANERA MUY ESPECIAL A VERÓNICA Y ARTURO QUE ME HAN  
PERMITIDO TENER UNA FORMACIÓN PROFESIONAL Y QUE EN TODO  
MOMENTO ME HAN ESTADO CONMIGO.**

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA DE LA DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. EN C. CARLOS BEAS ZÁRATE Y LA ASESORIA DE LA M. EN C. MÓNICA ELISA UREÑA GUERRERO.

**ÍNDICE**

Lista de abreviaturas .....	vi
Resumen .....	viii
Introducción.....	1
Antecedentes.....	12
Planteamiento del problema.....	16
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	20
Diagrama experimental.....	22
Materiales y métodos.....	24
Resultados.....	28
Discusión.....	30
Conclusión.....	36
Figuras.....	38
Bibliografía.....	59



## LISTA DE ABREVIATURAS.

AMPA	Ácido 3-amino-4-hidroxi-5-metil-isoxasol propiónico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP5	Ácido 2-amino-5-fosfonovalérico
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Cisteína
Ca <sup>++</sup>	Ión Calcio
CA3	Área CA3 del hipocampo
Cl <sup>-</sup>	Ión Cloro
CPP	Ácido 3-(2-carboxi-piperazin-4-il)-propil-1-fosfónico
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpircarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAc	Ácido desoxiribonucleico complementario
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GMS	Glutamato monosódico
[ <sup>3</sup> H]	Tritio
HPRT	Fosforribosil hipoxantina transferasa
I	Isoleucina
IP <sub>3</sub>	trifosfato de Inositol
Kb	Kilopares de bases
K <sup>+</sup>	Ión Potasio
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
R-NMDA	Receptor NMDA
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
Mg <sup>++</sup>	Ión Magnesio
MK-801	Dizocilpina
μM	Micromolar
μL	Microlitro
mg	Miligramo
min	Minuto
mM	Milimolar
Na <sup>+</sup>	Ión Sodio
ONS	Oxido nítrico sintasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Q	Glutamina
R	Arginina
R-AMPA	Receptor para AMPA

R-KA	Receptor para Kainato
R-mGlu	Receptores metabotrópicos glutamatérgicos
R-NMDA	Receptor para NMDA
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
RNA <sub>sin</sub>	Inhibidor de las ribonucleasas
r.p.m	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscriptasa
V	Valina
Y	Tirosina
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
Zn <sup>++</sup>	Ión Zinc

## RESUMEN

El efecto neuroexcitador que ejerce el Glutamato (Glu) depende de su interacción con receptores ionotrópicos o metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos glutamatérgicos se clasifican, de acuerdo a su afinidad por agonistas selectivos, en receptores para: N-metil-D-aspartato (R-NMDA), ácido 3-amino-4-hidroxi-5-metil-isoxasol propiónico (R-AMPA) y Kainato (R-KA). La sobreactivación de los receptores glutamatérgicos, principalmente los de tipo ionotrópicos conduce a la muerte neuronal, a través de mecanismos asociados con diversas enfermedades neurodegenerativa.

La exposición prolongada de los receptores a su agonista modifica el número de sitios de unión para el agonista, la afinidad del receptor por su agonista y el tipo de subunidades que componen al receptor.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la administración sistémica de glutamato monosódico (GMS) a ratas recién nacidas incrementa la unión de glutamato y kainato en la corteza cerebral de la rata a los sesenta días de edad. Además, este tratamiento modifica los patrones de expresión del RNAm de las subunidades proteínicas que componen al receptor NMDA. Las subunidades proteínicas KA1, KA2, GluR5, GluR6 y GluR7 que conforman al R-KA se expresan de forma diferencial durante el desarrollo del sistema nervioso en todas las regiones cerebrales. Por lo que, en el presente trabajo se determinó el efecto del tratamiento neonatal de GMS (4mg/g de peso corporal, vía subcutánea, los días 1, 3, 5 y 7 después del nacimiento) sobre los patrones de expresión de las subunidades GluR5 y GluR6 del R-KA en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo de ratas adultas.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento neonatal con GMS eleva la expresión del RNAm de GluR5 en la corteza cerebral y el hipocampo, región en la cual también se eleva la expresión de GluR6. Esto sugiere que el tratamiento neonatal con GMS puede modificar la composición de los R-KA, así como su funcionalidad en ambas regiones cerebrales.

# **INTRODUCCIÓN**

El Sistema Nervioso (SN) es un conjunto de estructuras funcionalmente especializadas, a través de las cuales el organismo responde adecuadamente a los estímulos que recibe, tanto del medio externo como del interno. Por lo que la posibilidad de adaptación al ambiente y por lo tanto, la supervivencia dependen de su funcionalidad (López-Antúnez, 1986).

Los elementos básicos que componen al tejido nervioso son: 1) células nerviosas (neuronas), 2) células intersticiales (astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann y células satélite) y 3) elementos del tejido conjuntivo (fibroblastos, microglia, vasos sanguíneos y líquido extracelular). Las neuronas y células intersticiales derivan del ectodermo embrionario, mientras que los elementos del tejido conjuntivo derivan del mesodermo (Noback y col., 1980).

Anatómicamente, el SN se divide en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP) (Figura 1). El SNC está formado por la médula espinal y el cerebro, el cual a su vez incluye varias estructuras anatómicas, como el bulbo raquídeo o médula oblongada, el puente de Varolio o protuberancia anular, el cerebelo, el mesencéfalo, el diencefalo y los hemisferios cerebrales, conformados por: la corteza cerebral, la formación hipocámpal, la amígdala y los ganglios basales. En su conjunto, estas estructuras regulan los comportamientos más elaborados del organismo (Martín, 1998).

Por otro lado, el SNP comprende una parte somática y otra autónoma, ambas controladas por el SNC. La parte somática contiene neuronas sensoriales que inervan piel, músculos y articulaciones, para detectar todos los estímulos. La parte autónoma contiene neuronas que inervan glándulas y musculatura lisa de vísceras y vasos sanguíneos. El sistema nervioso autónomo se subdivide a su vez en dos componentes: simpático y parasimpático, que regula las funciones corporales de acuerdo con el estado interno del organismo (Martín, 1998).

## **ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA CORTEZA CEREBRAL**

La corteza cerebral es una capa de sustancia gris que forma parte de los hemisferios cerebrales; y de ella dependen las interpretaciones que llegan del mundo externo y del medio interno, la iniciación de movimientos voluntarios, así como las respuestas motoras y conductuales a la percepción sensorial (Chusid, 1987; Gilman y col., 1994; Kandel y col., 1998).

Las neuronas corticales se distribuyen en seis capas horizontales que desde el exterior hasta la parte más profunda se conocen como:

- I. **Capa molecular.** Contiene numerosas fibras nerviosas de paso y a las células horizontales de Cajal.
- II. **Capa granular externa.** Compuesta de células granulares, células estrelladas y algunas células piramidales pequeñas.
- III. **Capa piramidal externa.** Consta de las células piramidales de tamaño mediano y algunas grandes en la zona profunda.
- IV. **Capa granular interna.** Incluye a las células granulares de Golgi tipo II y algunas piramidales de tamaño pequeño.
- V. **Capa piramidal interna.** Consta de células piramidales grandes, las cuales en el área motora reciben el nombre de células gigantes de Betz y conducen impulsos a las motoneuronas localizadas en la médula espinal.
- VI. **Capa poliforme o multiforme.** Incluye células de diferentes morfologías (triangulares, poligonales, periformes, redondas, etc.), pero principalmente a células fusiformes (López-Antúnez, 1986) (Figura 2).

### **Aferencias corticales**

La mayor parte de la información que llega a la corteza cerebral proviene del tálamo (aferencias tálamo-corticales), además de una gran cantidad de fibras interhemisféricas y de asociación cortical.

### **Eferencias corticales**

Las fibras eferentes pueden terminar en otras regiones de la corteza cerebral del mismo hemisferio (fibras de asociación intrínsecas) o del hemisferio opuesto (fibras interhemisféricas), así como, en diferentes regiones subcorticales (fibras de proyección) (Martín, 1998; Kandel y col., 1998).

### **ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL CUERPO ESTRIADO**

En un corte antero-posterior de los hemisferios cerebrales pueden observarse, entre la corteza cerebral y el tálamo, a un grupo de núcleos conocidos como ganglios basales, dentro de los cuales se incluye al cuerpo estriado, el núcleo amigdalino y 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 es base importante de los procesos de aprendizaje (Kandel y col., 1998; Gilman y col., 1994).

### **Aferencias estriatales**

1. Cortico-estriatales: fibras que proceden de todas las áreas corticales y finalizan en el estriado.
2. Tálamo-estriatales: fibras procedentes de los núcleos intralaminares, especialmente de los núcleos centromediano y parafascicular.
3. Nigro-estriatales: contienen fibras que se proyectan a todo el estriado a través de axones muy finos.

### **Eferencias estriatales**

La mayoría de las proyecciones eferentes convergen en el globo pálido, al cual llegan fibras tanto del caudado como del putamen (Alcaraz, 2000; Kandel y col., 1998).

## **ANATOMIA Y FISIOLÓGÍA DEL HIPOCAMPO**

Dentro de los hemisferios cerebrales existen dos estructuras subcorticales, la formación hipocampal y la amígdala, que en conjunto forman parte del sistema límbico. La formación hipocampal consta de tres componentes el hipocampo, el giro dentado y el giro hipocampal. El hipocampo es una elevación curva de sustancia gris que se extiende a todo lo largo del asta inferior del ventrículo lateral (Martín, 1998).

La corteza del giro hipocampal tiene 6 capas, las cuales al continuarse hacia el hipocampo se distribuyen gradualmente, para dar origen a una disposición de 3 capas, que se describen a continuación:

1. **Capa molecular:** incluye fibras nerviosas y neuronas pequeñas dispersas.
2. **Capa piramidal:** formada por neuronas piramidales grandes.
3. **Capa polimórfica interna:** con una estructura similar a la de la capa polimórfica de la corteza cerebral.

El giro dentado también tiene 3 capas pero la capa piramidal es reemplazada por una capa de células granulares, neuronas redondas u ovals pequeñas que se disponen de forma compacta y cuyos axones establecen contactos sinápticos con las dendritas de las células piramidales del hipocampo (Martín,1998). Los circuitos hipocampales son esenciales para consolidar la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo y para la memoria espacial (Martín,1998; Kandel y col., 1998).

### **Aferencias hipocampales**

La terminales nerviosas que llegan al hipocampo provienen de la corteza entorrinal adyacente, la circunvolución del cuerpo calloso, la corteza orbitaria, la amígdala, áreas del lóbulo temporal, núcleos septales e hipotalámicos y del hipocampo contralateral. A través de estas conexiones, el hipocampo tiene acceso a casi todos los tipos de información sensorial.



### **Eferencias hipocampales**

Las neuronas eferentes son principalmente piramidales del hipocampo y del subículo que proyectan sus axones a través del fónix hasta la corteza entorrinal y la amígdala (Martín, 1998; Gilman y col., 1994).

### **COMUNICACIÓN INTERNEURONAL**

Las neuronas se comunican entre sí, a través de contactos funcionales, conocidos como sinapsis, donde la neurona que transmite la información es presináptica y la neurona que la recibe es postsináptica (Martín, 1998).

Los contactos sinápticos pueden ser de dos tipos: eléctricos, cuando el impulso nervioso se transmite directamente de una neurona a otra, a través de conexiones; y químicos, cuando el impulso nervioso induce la liberación del neurotransmisor desde la neurona presináptica hacia el espacio intersináptico (Stratton, 1984). El neurotransmisor es una molécula mensajera que se almacena dentro de las terminales presinápticas y que cuenta con receptores específicos en la membrana plasmática de las células postsinápticas. La interacción del neurotransmisor con sus receptores específicos modifica la permeabilidad iónica de la célula postsináptica y por lo tanto, su excitabilidad (Kandel y col., 1998; Newsholme y col., 1986). Cuando la interacción del neurotransmisor con sus receptores específicos produce despolarización de la membrana, se dice que se trata de un neurotransmisor excitador, en cambio cuando se presenta una hiperpolarización de la membrana, se dice que se trata de un neurotransmisor inhibitorio (Kandel y col., 1998).

### **EL GLUTAMATO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

El Glutamato (Glu) es un aminoácido no esencial, que además de formar parte de las proteínas, actúa como el principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos (Dingledine y col., 1993). Aunque ha sido difícil establecer las vías de neurotransmisión glutamatérgica, se ha propuesto que el Glu está implicado en las conexiones descendentes de la corteza cerebral hacia el hipocampo (tanto ipsilaterales, como contralaterales); así como en las

conexiones que existen entre la corteza cerebral y diversos núcleos hipotalámicos, talámicos y troncoencefálicos. Además, las células granulares del cerebelo, las terminales de aferentes primarias y las que comunican los bulbos olfatorios con la corteza cerebral olfatoria son glutamatérgicas (Tresguerran. 1995) ( Figura 3).

Dentro del SNC, las neuronas glutamatérgicas sintetizan Glu, a partir de la glucosa o de otros precursores, a través de diferentes rutas metabólicas. Una de ellas, al parecer la más importante para el Glu neurotransmisor, consiste en la formación de Glu a partir de Glutamina (Gln) por acción de la Glutaminasa (Dingledine y col., 1993). Las células gliales desempeñan una función importante en la interconversión de Glu a Gln, ya que capturan el Glu del espacio intersticial y lo convierten en Gln por acción de la sintetasa de glutamina. Posteriormente, la Gln glial se secreta y las neuronas glutamatérgicas la capturan para que la glutaminasa, la convierta en Glu (Magnusson y col., 1986). Dentro de las terminales nerviosas glutamatérgicas, el Glu neurotransmisor se transporta al interior de las vesículas sinápticas a través de un proceso dependiente de ATP (Robinson y col., 1987) (Figura 4).

El Glu neurotransmisor se libera de la terminal presináptica a través de dos mecanismos diferentes: el primero, independiente de la concentración intracelular de  $Ca^{++}$ , por cotransporte reverso de la captura de sodio  $Na^+$ , desde el citoplasma hacia el espacio intersináptico a través de la membrana celular; y el segundo, a través de la exocitosis de vesículas sinápticas del neurotransmisor, la cual se estimula al elevarse la concentración intracelular de  $Ca^{++}$  (Kauppinen y col., 1988).

Después de liberarse hacia el espacio intersináptico, el Glu interactúa con receptores específicos para ejercer su efecto excitador y posteriormente, su presencia se elimina a través de mecanismos de captura de alta y baja afinidad. Tanto los receptores como los transportadores para Glu, pueden estar presentes en la terminal presináptica, en la neurona postsináptica o en las células gliales (Gallo y col., 2000; Steinauser y col., 1996).

## RECEPTORES GLUTAMATERGICOS

En general, los neurotransmisores pueden interactuar con dos tipos de receptores, conocidos como: *ionotrópicos* cuando al activarse permiten el paso de iones a través de un poro incluido en la estructura del receptor; y *metabotrópicos* cuando al activarse modulan la síntesis de segundos mensajeros a través de su interacción con proteínas G (Moriyoshi y col., 1991; Masu y col., 1993). El Glu se caracteriza por contar con ambos tipos de receptores. Así, los receptores ionotrópicos glutamatérgicos se clasifican, de acuerdo con su afinidad por agonistas selectivos, en receptores para: NMDA (N-metil-D-Aspartato), AMPA (Acido 3-amino-4-hidroxi-5-metil-isoxazol propiónico) y KA (Kainato) (Lipton y col., 1994; Monaghan y col., 1989) (Figura 5).

Estructuralmente, los receptores ionotrópicos glutamatérgicos son complejos macromoleculares oligoméricos formados por 4 o 5 subunidades polipeptídicas, cada una con cuatro dominios hidrofóbicos, conocidos como M1-4, de los cuales M1, M3 y M4 atraviesan la membrana, mientras que M2 entra a la membrana y regresa al citoplasma sin tocar la cara extracelular, así el grupo amino terminal es extracelular y carboxilo terminal es intracelular (Nakanishi, 1992; Barinaga, 1995) (Figura 6).

Estudios recientes proponen una diversidad funcional y estructural enorme para los receptores ionotrópicos glutamatérgicos, producto de la expresión y combinación variable de las diferentes subunidades proteínicas que los componen (Hollman y col., 1994). En términos generales, algunas de estas subunidades pueden modificarse por procesos postranscripcionales de edición que al combinarse alternativamente, originan receptores glutamatérgicos con características funcionales diferentes (Nakanishi, 1990; James y col., 1996).

### Receptores para NMDA

El receptor NMDA (R-NMDA) posee un canal iónico altamente permeable a  $Ca^{++}$  y  $Na^{+}$ , que para activarse requiere de la eliminación del bloqueo

dependiente de voltaje, que ejerce el magnesio ( $Mg^{++}$ ) dentro del canal, por lo que se considera un receptor sensible a voltaje (Masu, 1993). Este receptor también se caracteriza por tener una elevada permeabilidad al  $Ca^{++}$  y contar con múltiples sitios de regulación farmacológica, tales como los sitios de unión para: 1)el transmisor, sus agonistas y antagonistas competitivos; 2)glicina (coagonista); 3)MK801 (dizocilpina) y fenciclidina (bloqueadores del canal iónico); 4) $Mg^{++}$  (bloqueador del canal iónico); 5)Zinc ( $Zn^{++}$ ; modulación positiva del canal); y 6)poliaminas (modulación positiva o negativa, dependiendo del compuesto y de la concentración del mismo). Además, este receptor también posee dominios extracelulares sensibles a los cambios de pH (sitio REDOX) (Sakurada y col.,1993).

Molecularmente, el R-NMDA es un complejo proteínico que puede estar formado por la combinación de las subunidades NR1 y NR2A-D, donde NR1 determina la existencia de un canal funcional y NR2A-D las propiedades farmacológicas del mismo (Money y col., 1994) (Figura 7). La subunidad NR1 se expresa ampliamente en las neuronas del cerebro de la rata, desde la etapa embrionaria hasta la edad adulta, mientras que la expresión de NR2A-D parece ser específica para cada una de las estructuras cerebrales y etapas del desarrollo (Masu, 1993).

### **Receptores para AMPA**

Las subunidades proteínicas que conforman al receptor AMPA (R-AMPA) son identificadas como: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4. La combinación homomérica o heteromérica de estas subunidades genera receptores con una afinidad de unión elevada para el AMPA y con baja afinidad para KA (Bleakman, y col., 1998). Aunque se consideró por mucho tiempo, que este receptor tenía, igual que el R-NMDA, una estructura pentamérica, recientemente se sugirió que puede poseer una estructura tetramérica (Mano y col., 1998). Las subunidades que conforman al R-AMPA son editadas a partir de un RNAm con un residuo aminoacídico de glutamina (Q) en el segundo segmento transmembranal (M2). Sin embargo, GluR2 puede editarse en dos

isoformas, con glutamina ó con arginina (R) en la misma posición del segmento M2. La presencia GluR2 con glutamina en el segmento M2 eleva la permeabilidad del canal del R-AMPA al ión  $Ca^{++}$  (Jeremy y col., 1994; Burnashev, 1996).

Las subunidades GluR2, GluR3 y GluR4 se expresan en dos isoformas, conocidas como variantes "flip" o "flop" para el segmento transmembranal M4. Las isoformas "flip" tardan determina una variable en la constante de tiempo de desensibilización del canal y se expresan principalmente en etapas tempranas del desarrollo cerebral, contribuyendo al establecimiento de los contactos sinápticos, en tanto que las variantes "flop" se expresan mayormente en la edad adulta (Bleakman y col., 1998).

### **Receptores para Kainato**

El ácido kaínico (KA), análogo glutamatérgico altamente epileptogénico y excitotóxico, posee receptores específicos con alta afinidad de unión para el [ $^3H$ ]-KA en diferentes regiones cerebrales de la rata. Las subunidades que conforman al receptor para kaínico (R-KA) son: GluR5, GluR6, GluR7 y las proteínas KA1 y KA2 (Jeremy y col., 1994; Chittajallu y col., 1999) (Figura 5).

Las subunidades GluR5 y GluR7 se modifican a través de procesos postranscripcionales, generando así dos variantes de ambas subunidades (GluR5<sub>1-2</sub>, GluR7<sub>a-b</sub>) (Chittajallu y col., 1999). Adicionalmente, las subunidades GluR5 y GluR6, de manera semejante a GluR2, pueden editarse con un residuo aminoacídico de glutamina (Q) o arginina (R), siendo la Q quien facilita la entrada de  $Ca^{++}$ , a través del canal del R-KA (Chittajallu y col., 1999). La edición de GluR5(R) y GluR6(R) durante el desarrollo del SNC de la rata, se eleva hacia la etapa adulta (Bernard y col., 1994; Paschen y col., 1994). Además, GluR6 puede presentar modificaciones de edición en el primer segmento transmembranal, donde un residuo de Isoleucina se cambia por Valina (I/V) y un residuo de Tirosina por Cisteína (Y/C), siendo predominante la isoforma GluR6 (R/V/C) en el adulto (Chittajallu y col., 1999). Por otro lado, las subunidades GluR5, GluR6 y GluR7 pueden ensamblarse de forma homomérica o en

combinación heteromérica con KA1 o KA2 para formar canales iónicos funcionales con una elevada afinidad por KA (Bernard y col., 1994; Bleakman y col., 1998)

### **Distribución del Receptor para Kainato (R-KA)**

Los RNAm que codifican para las subunidades del R-KA están presentes desde la etapa embrionaria hasta la etapa adulta y cuentan con una distribución amplia dentro del SNC de la rata (Wuellner y col., 1997; Wisden y Seeburg., 1993). Durante el desarrollo embrionario de los hemisferios cerebrales, aproximadamente hacia el día 14, se observa una cantidad moderada del RNAm para la subunidad KA2, la cual se expresa de manera invariable durante todo el desarrollo posnatal hasta la edad adulta (Bahn y col., 1994). En el día 19 del desarrollo embrionario, las subunidades GluR5, GluR6 y GluR7 se expresan significativamente en las capas corticales II, III y IV, sin embargo, su expresión disminuye de forma gradual hasta llegar a la edad adulta (Bahn y col., 1994). En relación con la subunidad GluR7, se ha señalado que su expresión permanece sin cambios significativos a lo largo de todo el desarrollo cortical del cerebro de la rata (Bahn y col., 1994) (Figura 7).

Característicamente, se ha observado que al nacimiento existe una expresión elevada de todas las subunidades del R-KA en los ganglios basales del cerebro de la rata, la cual disminuye hacia el día 20 de edad posnatal (Wuellner y col., 1997). En la edad adulta, las subunidades KA2 y GluR6 se expresan significativamente en: el cuerpo estriado, el núcleo accumbens, el subtálamo y la sustancia negra compacta; y en bajos niveles en la sustancia negra reticulada (Wuellner y col., 1997; Herb y col., 1992). En tanto que la GluR7 es mayor en la sustancia negra compacta, comparada con lo observado en el cuerpo estriado, globo pálido y sustancia negra reticulada, donde es escasa en la edad adulta (Wuellner y col., 1997; Jeremy y col., 1994). Las subunidades KA1 y GluR5 no se expresan en ninguna estructura de los ganglios basales (Wuellner y col., 1997). Aunque trabajos recientes a través de técnicas inmunohistoquímicas han demostrado que la expresión de las

subunidades del R-KA están presente desde el primer días de edad posnatal, incluso antes de que los contactos sinápticos definitivos se establezcan, dichas subunidades ya son fisiológicamente estables (Nansen y col., 2000). Así mismo, se ha observado que en el globo pálido existe una expresión transitoria de GluR5 y KA1 entre el día 1 y 10 de edad posnatal (Wuellner y col., 1997) (Figura 7).

Durante el desarrollo embrionario de la formación hipocampal, hacia el día 14 se observa una expresión difusa de los RNAm de las subunidades del R-KA (Bahn y col., 1994). En tanto que, la unión de [ $^3$ H]-KA se eleva después de la segunda semana de nacimiento, alcanzando valores máximos hacia el día 30, etapa en la cual se establecen los contactos sinápticos definitivos (Bahn y col., 1994). Por otro lado la expresión del RNAm de la subunidad KA1 permanece constante durante el desarrollo posnatal con una marcada expresión en células piramidales del área CA3 y en las granulares del giro dentado del hipocampo en la edad adulta (Bahn y col., 1994). En cambio, la expresión del RNAm de GluR6 se incrementa de forma retardada respecto a las otras subunidades y es mayor en el área CA3 del adulto. La subunidad GluR5 se expresa en el subículo y en el área CA1 con un pico de expresión muy claro desde el primer día de edad posnatal hasta el quinto día, después de lo cual su expresión disminuye de forma constante hasta la etapa adulta, donde sus niveles son muy bajos (Jeremy y col., 1994; Bahn y col., 1994)(Figura 7).



# ANTECEDENTES



El Glu es considerado el principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos (Fonnum, 1984), sin embargo, cuando sus niveles extracelulares se elevan significativamente, puede producir daño neuronal (James y col., 1996).

En la década de 1950 Hayashi demostró que la aplicación Glu en la corteza cerebral motora produce convulsiones tónico-clónicas generalizadas (Hayashi, 1952). Posteriormente, Lucas y Newhouse en 1957, al estudiar los posibles efectos terapéuticos del Glu en contra de la atrofia retiniana, reportaron degeneración de las neuronas de la capa interna de la retina de ratones neonatos después de la administración sistémica de Glu (Lucas y Newhouse, 1957). Olney en 1969 demostró que no sólo la retina, sino también, el núcleo arcuato hipotalámico y otras áreas circunventriculares, que poseían una barrera hematoencefálica deficiente, eran vulnerables al efecto excitotóxico de la administración sistémica de Glu en roedores neonatos (Olney, 1969). Así, en 1978, Olney propuso el término de "excitotoxicidad" (Olney, 1978), para referirse a la muerte neuronal inducida por una liberación excesiva de Glu y la sobre-activación de sus receptores. Evidencias experimentales sugieren que el daño neuronal excitotóxico producido por Glu puede estar involucrado en diferentes estados patológicos del SNC, tales como el trauma cerebral, el daño neuronal hipóxico/isquémico y la epilepsia (Coyle y col., 1976). Además, también se ha sugerido su participación en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Greenamyre y col., 1989), la enfermedad de Parkinson (Mattson, 1990; Turski y col., 1991), la corea de Huntington (McGeer y col., 1976) y la esclerosis lateral amiotrófica (Rothstein y col., 1992).

La activación excesiva de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos promueve la entrada masiva de  $Ca^{++}$  a las neuronas (Choi, 1988), el cual activa diferentes mecanismos intracelulares que conducen a la muerte celular vía necrosis o apoptosis (Choi, 1988; Choi, 1995). Entre estos eventos se encuentran: 1) la generación de radicales libres, que promueve la peroxidación de los lípidos de membrana; 2) la síntesis de óxido nítrico, que pueden actuar como retromensajero y potenciar el efecto excitotóxico al aumentar la liberación

de Glu (Almeida y col., 1998); 3) la activación de cadenas enzimáticas involucradas en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Choi, 1995); 4) el desacoplamiento del transporte de electrones en la mitocondria, con la subsecuente producción de radicales libres, la liberación del citocromo C y la interrupción de la cadena respiratoria (Banasiak y col., 2000).

La farmacología y la fisiopatología de los R-KA es mucho menos conocida que la de los R-NMDA y R-AMPA, de cualquier forma se considera que los R-KA pueden ser permeables a  $Ca^{++}$  en combinaciones específicas de ciertas subunidades (Ino y col., 1990), por otro lado, diversos estudios de excitotoxicidad, indican que la activación excesiva de los R-KA está involucrada en la muerte neuronal excitotóxica (Jensen y col., 1999).

La administración intraperitoneal de ácido kaínico a ratas adultas altera la expresión de algunas subunidades de los receptores para GABA y para AMPA, como resultado de la excitotoxicidad (Friedman y col., 1994). En este sentido, también se demostró que el *status epilepticus* inducido por KA provoca una disminución en la expresión del RNAm y de la proteína de la subunidad GluR2 (Q) del R-AMPA en el hipocampo lo que conduce a la muerte neuronal debido a la formación de R-AMPA altamente permeables al  $Ca^{++}$  (Sonja y col., 2000).

Durante el establecimiento del "Kindling hipocampal" la expresión del RNAm aumenta la expresión de la subunidad KA2 del R-KA se eleva significativamente en el hipocampo (Kamphuis, y col., 1995).

Por otro lado, también se demostró que la edición de las subunidades GluR5 (Q/R) y GluR6 (Q/R) del R-KA se modifican después de la isquemia cerebral transitoria, condición en la que se han reportado un aumento en los niveles extracelulares de Glu (Paschen y col., 1996). Lo anterior sugiere que la liberación excesiva de Glu puede modificar la expresión de sus propios receptores, por lo que probablemente cambios en la expresión de los R-KA podrían estar relacionados con la generación de crisis convulsivas y con el daño neuronal excitotóxico.

Para caracterizar adecuadamente, los mecanismos implicados en la muerte neuronal excitotóxica se han implementado diversos modelos

experimentales, uno de los cuales consiste en la administración sistémica del ácido glutámico en forma de sal monosódica (GMS) a ratas recién nacidas. En nuestro laboratorio, a través de la utilización de ese modelo se ha demostrado la susceptibilidad de las neuronas colinérgicas (Ortuño-Sahagun y col., 1997) y GABAérgicas (Beas-Zárate y col., 1998; Ureña-Guerrero, 1999) a los efectos excitotóxicos del Glu en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo durante el desarrollo posnatal de la rata. Además, se ha observado que la administración de GMS a ratas recién nacidas induce cambios en la unión de [ $^3$ H]-Glu y de [ $^3$ H]-KA en corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo de la rata después del tratamiento (Valdivia-Ramírez, 1997; Flores-Mendoza, 1997). Por otro lado, también se han observado cambios en la expresión de las subunidades NMDAR-1, NMDAR2A y NMDAR2B del R-NMDA en las mismas regiones de ratas adultas después del tratamiento neonatal con GMS (Beas-Zárate y col., 2001). Sin embargo, se desconocen los efectos de dicho tratamiento sobre la expresión del R-KA.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se decidió evaluar el efecto que tiene la administración sistémica de GMS a animales recién nacidos sobre la expresión de las subunidades GluR5 y GluR6 del R-KA en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo de ratas adultas, lo que permitirá ampliar el conocimiento que se tiene acerca de los mecanismos involucrados en el daño neuronal producido por el Glu.

**PLANTEAMIENTO  
DEL  
PROBLEMA**

El Glu es considerado el principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos, sin embargo, posee propiedades tóxicas cuando se acumula en concentraciones elevadas dentro del espacio intersináptico. El efecto neurotóxico del Glu se debe a una despolarización neuronal sostenida, producida por la sobre-activación de los receptores glutamatérgicos, que promueve la entrada masiva de  $Ca^{++}$  a la célula postsináptica activando diferentes vías de señalización intracelular que conducen a la muerte neuronal. Aunque todos los análogos de Glu pueden inducir daño, las neuronas son mucho más susceptibles a los efectos epileptogénicos y degenerativos del ácido kaínico. Los receptores para kaínico (R-KA) promueven la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{++}$  y están ampliamente distribuidos en el SNC, desde la etapa embrionaria hasta la etapa adulta. El daño neuronal producido por Glu conocido como neuroexcitotóxico, se relaciona con cambios en la expresión y fisiología de los receptores para diferentes neurotransmisores. Sin embargo, no se conoce si la exposición neuronal a concentraciones elevadas de Glu durante la edad neonatal, modifica los niveles de expresión del RNAm de las subunidades del R-KA.

Por tanto, en el presente trabajo se evaluó la expresión del RNAm de las subunidades GluR5 y GluR6 del R-KA en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo de ratas adultas después del tratamiento neonatal con GMS. Los resultados de este trabajo permitirán comprender mejor algunos de los eventos asociados a la muerte neuronal que se presenta en diversos padecimientos neurológicos.

# HIPÓTESIS

El aumento en la concentración extracelular de Glu que produce la administración sistémica de glutamato monosódico a animales recién nacidos, elevará la expresión de las subunidades GluR5 y GluR6 del R-KA en diferentes regiones cerebrales en la etapa adulta, como parte de los procesos asociados a la neurodegeneración excitotóxica.

# OBJETIVOS



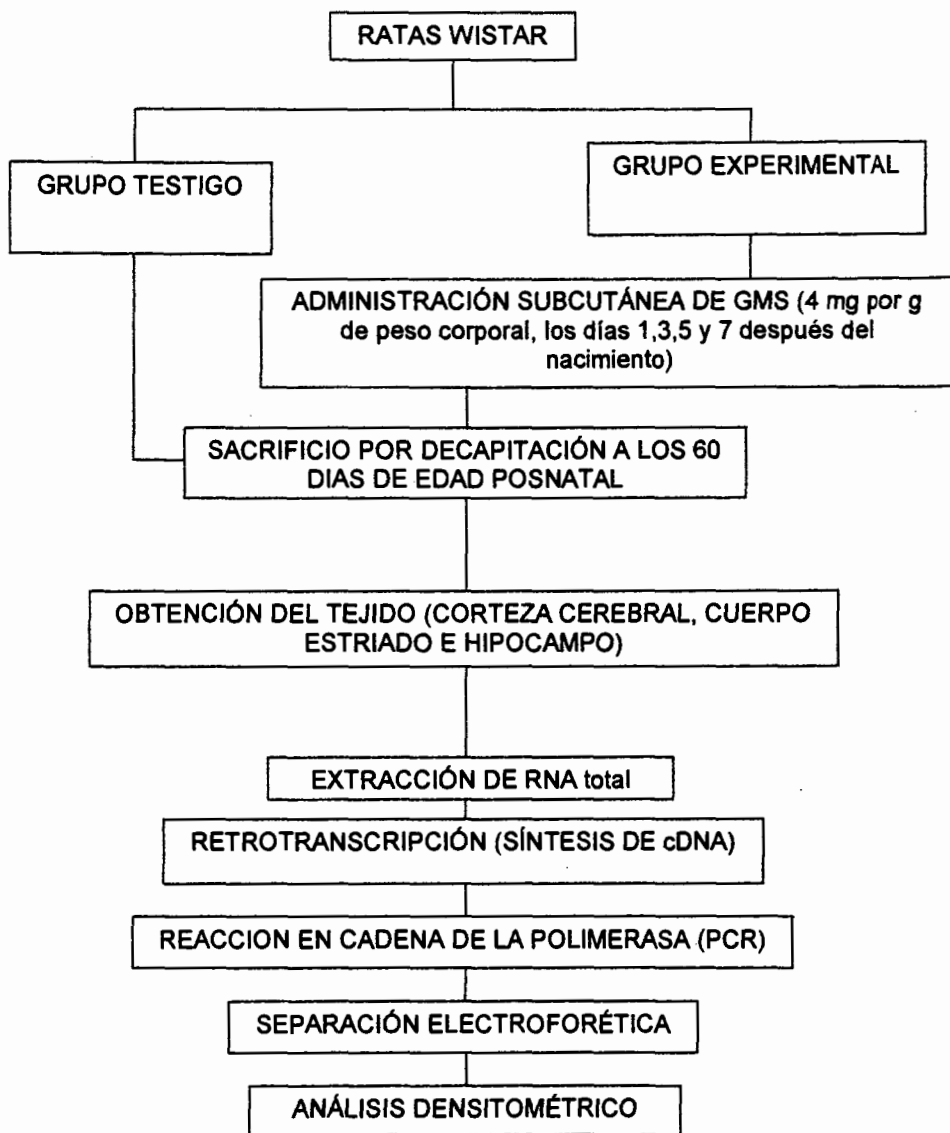
## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los cambios de expresión de las subunidades del R-KA en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo de ratas adultas después de haber sido tratadas neonatalmente con GMS.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

Determinar el efecto de la administración sistémica de GMS en etapas tempranas del desarrollo, sobre los niveles de expresión de las subunidades **GluR5** y **GluR6** del R-KA en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo de ratas adultas.

**DIAGRAMA  
EXPERIMENTAL**



**MATERIALES**  
**Y**  
**MÉTODOS**

### **Tratamiento de los animales**

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas de la cepa Wistar recién nacidas, que se dividieron en dos grupos:

*Grupo testigo:* animales intactos que no recibieron ningún tratamiento.

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

### **Obtención del tejido**

Después del tratamiento, los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio (libre acceso al agua y alimento; períodos de luz-obscuridad 12X12 h; y temperatura ambiente de 23 a 25°C) hasta los sesenta días de edad, en que fueron sacrificados por decapitación. Se extrajo el cerebro en condiciones asépticas y utilizando material previamente estéril 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 (RNA) total.

### **Obtención y cuantificación del RNA total.**

La extracción del RNA total se realizó mediante el método de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987), el cual se describe a continuación. El tejido (50 mg) se homogeneizó en 500 µL de trizol, se le adicionaron 100 µL de cloroformo y se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 19 min a 4°C, se tomó el sobrenadante y se le agregó un volumen igual de isopropanol (0-4°C), se incubó de 10 a 15 min a 4°C y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Posteriormente, el RNA precipitado se lavó con etanol al 75% en agua tratada previamente con 0.1% de di-etil-pirocarbonato (agua DEPC) y se disolvió en un volumen total de 20-80 µL de agua DEPC.

### **Determinación espectrofotométrica de la cantidad y calidad del RNA.**

La cantidad y calidad del RNA extraído, se evaluó a través del índice de absorbancia de 260/280 nm. Considerándose óptimas aquellas muestras cuyo índice de absorbancia fuera de 1.7 a 2.0 (Maniatis y col., 1987).

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

Para la síntesis del DNAc se utilizó la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Molovney. Se tomaron 2 µg de RNA de cada muestra, se adicionó agua estéril para un volumen total de 6 µL 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; Ditiotretitol 10 mM; Iniciadores aleatorios 1 mg/µL; Inhibidores de RNAasas (RNAsin) 1U/µL) y la transcriptasa reversa (200 U/µL) 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).

La mezcla de reacción utilizada para la PCR consistió en: Taq DNA polimerasa (1 U/µL), 1 µL de DNAc, dNTPs (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (50 mM), Tris-HCl 50 mM pH 8.0, agua estéril y los oligonucleótidos sentido y antisentido para cada subunidad proteínica del receptor para KA (Gonoi y col., 1994) (Cuadro 1). La PCR se realizó en un termociclador automático, que se programó con un ciclo inicial de 5 min a 94°C, seguido por los ciclos de amplificación adecuados para cada gen (Cuadro 1) y un ciclo final de 5 min a 72°C. Cada ciclo de amplificación se compone de: una desnaturalización del DNA a 94°C por 1 min, la alineación e hibridación de los iniciadores a 60°C por 1 min y la extensión de los iniciadores a 72°C por 1.5 min. Simultáneamente se utilizó la expresión del gen para HPRT (Hipoxantina-fosforibosil-transferasa) como gen constitutivo (control metodológico) (Delgado-Rizo y col., 1998).

Los productos amplificados de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se fotografiaron con película polaroid 665 en exposición a la luz UV y sobre el negativo de la fotografía se realizó el análisis densitométrico de las bandas con un espectrofotómetro Beckman DU650. Los valores de densidad óptica para las diversas subunidades fueron calculados y normalizados contra la expresión del gen constitutivo (HPRT) (Figura 9). Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de absorbancia.

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, utilizando el programa de cómputo BIostat y se consideraron significativamente diferentes aquellos con una  $p < 0.05$ .

**CUADRO 1**  
**SECUENCIAS DE LOS INICIADORES UTILIZADOS PARA LA PCR**

GEN	SECUENCIA	PRODUCTO DE AMPLIFICACION (pb)	CICLOS DE AMPLIFICACION
GluR5	Sentido 5'-AGTTCCACACATTCAGACTC-3'	534	26
	Antisentido 3'-CGCAATGGCTACCATGTACA-5'		
GluR6	Sentido 5'-ACAGAGAATACCCAAGTCTC-3'	582	24
	Antisentido 3'-CCAAGGATTGTAGAATAACT-5'		
HPRT	Sentido 5'-TCCCAGCGTCGTGATTAGTG-3'	608	28
	Antisentido 3'-AGTCGCTTTACCCCTTTTCGC-5'		

# RESULTADOS



Los resultados del presente trabajo muestran que en el grupo testigo el RNAm para la GluR5 se expresa homogéneamente en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo de ratas adultas (Figura 8), en tanto que, la expresión de GluR6 es ligeramente mayor en el cuerpo estriado, en relación con lo observado en corteza cerebral e hipocampo (Figura 9).

El tratamiento neonatal con GMS aumentó la expresión del RNAm de GluR5 en la corteza cerebral (>50%) y el hipocampo (>100%) (Figura 8), en tanto que la expresión de GluR6 sólo se elevó significativamente en el hipocampo (>100%) (Figura 9). En el cuerpo estriado de ratas tratadas neonatalmente con GMS también se observó un ligero aumento en los niveles de expresión del RNAm de GluR5 (27%) y GluR6 (24%) pero este cambio no fue estadísticamente significativo al compararse con el grupo testigo (Figura 8 y 9).

# DISCUSIÓN

Los R-KA están implicados en la transmisión sináptica excitadora rápida mediada por KA y su activación parece relacionarse con diferentes procesos de plasticidad neuronal, epilepsia y daño neuronal excitotóxico (Monaghan y col., 1989; Coyle y Schwarcz 1976; Sommer y col., 1992). Este tipo de daño se debe a una activación excesiva de todos los tipos de receptores glutamatérgicos y está relacionado con cambios en los niveles de expresión de las subunidades que componen a dichos receptores (Jensen y col., 1999). Por otro lado, se sabe que las subunidades GluR5 (R) y GluR6 (R) son impermeables al calcio (Bernard y col., 1994) y que en el SNC de la rata ambas subunidades predominan en la edad adulta (Paschen y col., 1994).

El tratamiento neonatal de GMS produce pérdida neuronal en diferentes regiones cerebrales (Beas-Zárate, y col., 2001), por lo que en este trabajo se analizaron los niveles de expresión de las subunidades GluR5 y GluR6 en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo de ratas adultas después del tratamiento neonatal con GMS.

Las subunidades del R-KA se expresan desde la etapa embrionaria hasta la edad adulta de forma diferencial en cada una de las etapas y regiones cerebrales (Bahn y col., 1994). Particularmente, la expresión del RNAm para las subunidades GluR5 y GluR6 tiende a disminuir hacia la etapa adulta de manera prácticamente homogénea en todas las regiones cerebrales de la rata (Bahn y col., 1994; Jeremy y col., 1994), aunque se ha reportado que la expresión de GluR6 suele ser mayor en el cuerpo estriado de ratas en la edad adultas (Wuellner y col., 1997). Descripciones que concuerdan parcialmente con lo encontrado en el presente trabajo en el grupo testigo, ya que debido a la técnica utilizada y a la edad analizada (60 días de edad posnatal) resulta difícil comparar los niveles de expresión de GluR5 y GluR6 con los diferentes datos mostrados.

Los resultados del presente trabajo indican que el tratamiento neonatal con GMS eleva la expresión del RNAm de GluR5 en todas las regiones cerebrales estudiadas, sin embargo, este aumento sólo fue significativo para la corteza cerebral (>50%) y el hipocampo (>100%), en tanto que la expresión de

GluR6 sólo se elevó en el hipocampo (>100%). En este sentido, diferentes evidencias experimentales han demostrado que durante la isquemia cerebral transitoria la edición del RNAm para GluR5 (R) y GluR6 (R) es modificada en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo, particularmente la edición de GluR6 (R) se disminuye (Paschen y col., 1994) por lo que estas modificaciones podrían cambiar las propiedades fisiológicas del R-KA siendo este más permeable al calcio el cual puede conducir a la pérdida neuronal selectiva. Además, se ha observado que cultivos de neuronas corticales expuestos a la toxicidad del KA la viabilidad celular se disminuye y la expresión proteínica de subunidades GluR6, GluR7 y KA2 no se incrementan, señalando que otras subunidades son las que podrían estar mediando el efecto tóxico del KA debido a la muerte neuronal observada (Friedman y col., 1994). De este modo, las subunidades GluR5 y GluR6 determinantes para la permeabilidad al calcio podrían estar mediando el efecto neuroexcitotóxico del KA.

Por otro lado, se ha encontrado que en cerebros de pacientes con esquizofrenia existe un incremento en la unión de [<sup>3</sup>H]-KA en corteza prefrontal y una disminución en el RNAm que codifica para la subunidad KA2, así como un incremento en la subunidad GluR7 (Meador-Woodruff y col., 2001). En este sentido, se ha señalado que un incremento o una disminución en la expresión del RNAm de las subunidades del R-KA cambia las propiedades farmacológicas y por ende la fisiología del R-KA (Meador-Woodruff y col., 2001). Así, se ha observado que la sobre-expresión de GluR6 (R) en el hipocampo de ratas adultas provoca cambios en la excitabilidad neuronal, incrementando la hiperexcitabilidad (Telfeian y col., 2000). Así mismo, se ha demostrado que ratones deficientes del gen para la subunidad GluR6 en hipocampo, son resistentes a desarrollar crisis convulsivas inducidas por el KA (Mulle y col., 1998), sugiriendo que esta subunidad está directamente implicada en la generación de las crisis convulsivas.

Por otro lado, se ha demostrado que la administración intraperitoneal de ácido kaínico a ratas adultas altera la expresión de algunas subunidades de los receptores para GABA y para AMPA/KA, como resultado de la excitotoxicidad

(Friedman y col., 1994). En este sentido, se ha demostrado que el *status epilepticus* inducido por KA provoca una disminución en la expresión del RNAm y de la proteína de la subunidad GluR2 (Q) del R-AMPA en el hipocampo lo que conduce a la muerte neuronal debido a la formación de R-AMPA altamente permeables al  $Ca^{++}$  (Sonja y col., 2000). Además, recientemente se ha demostrado que el tratamiento neonatal con GMS provoca alteraciones morfológicas de células gliales tras la pérdida neuronal en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo (Beas-Zárate y col., 2001) y una disminución de células GABAérgicas (Ureña-Guerrero, 1999) así como, un incremento del RNAm de las subunidades NMDAR-1, NMDAR2A y NMDAR2B del R-NMDA en las mismas regiones de ratas adultas (Beas-Zárate y col., 2001). Por lo que, la sobreactivación de los R-Glu, generada por el tratamiento neonatal con GMS podría alterar la migración neuronal y promover la muerte neuronal. Por otro lado, se ha sugerido que tras el daño y muerte neuronal, se da el establecimiento de conexiones sinápticas compensatorias con un mayor incremento en la expresión de los R-KA fenómeno conocido como "up regulation" como una respuesta plástica del cerebro (Geddens y col., 1985). Aunque se ha señalado, que durante el desarrollo normal del cerebro el incremento del RNAm del R-KA, que se inicia en la primera semana de vida, se asocia con los procesos de regresión axonal y muerte neuronal que suceden durante la sinaptogénesis para el establecimiento de sinapsis definitivas (Bahn y col., 1994). Por lo que estos procesos podrían iniciarse erróneamente debido al tratamiento neonatal con GMS. Además, bajo el mismo tratamiento neonatal con GMS los patrones de unión de [ $^3H$ ]-Glu (Valdivia-Ramírez, 1997) y [ $^3H$ ]-KA (Flores-Mendoza, 1997) se ven modificados en diferentes regiones cerebrales durante el desarrollo posnatal. Estas modificaciones, podrían elevar la susceptibilidad de diferentes tipos neuronales al efecto excitotóxico del GMS, pero también podrían ejercer algún efecto neuroprotector. En este sentido, se ha señalado que hipocampo es una región cerebral vulnerable a la excitotoxicidad inducida por ciertos agonistas glutamatérgicos, particularmente células piramidales del área CA3 (Nadler y col., 1978). Indicando que las

subunidades GluR5 y GluR6 del R-KA se localizan en Interneuronas GABAérgicas tanto pre como posinápticamente en el área CA1 y CA3 del hipocampo y que la subunidad GluR5 regula la transmisión sináptica excitadora (Vignes y col., 1998) e inhibitoria (Clarke y col., 1997), mediante la liberación de Glu o la inhibición de GABA a través de la estimulación de R-KA de terminales presinápticas (Coyle 1983); la inhibición en la liberación de GABA puede incrementar la excitabilidad neuronal. De esta forma, el incremento observado en el RNAm de las subunidades GluR5 y GluR6 en el hipocampo debido al tratamiento neonatal con GMS en la edad adulta podría estar asociado a un mecanismo neuroprotectivo debido a la pérdida de neuronas GABAérgicas (Ureña-Guerrero, 1999) en esta región, ya que se ha sugerido que después del daño isquémico las neuronas que lograron sobrevivir o que son menos susceptibles al daño pueden expresar mayor número de receptores (Paschen y col., 1994). Sin embargo, hay evidencias experimentales que indican que la administración de KA promueve la pérdida de neuronas GABAérgica e incrementa la hiperexcitabilidad en el área CA1 del hipocampo debido a una disminución en la transmisión sináptica inhibitoria (Rodríguez-Moreno y col., 2000), fenómeno asociado con el desarrollo de las crisis (Fisher y Alger, 1984). Por otro lado, recientemente se ha confirmado la presencia de R-Glu en células de la astrogliá y microgliá (Gallo y col., 2000) y que el tratamiento neonatal con GMS provoca un incremento en el número de células gliales (Beas-Zárate y col., 2001), por lo que es posible que, el incremento observado en la expresión del RNAm de GluR5 y GluR6 se deba a un incremento de células gliales. A través de la técnica utilizada en este trabajo resulta imposible trabajar solo con neuronas, por lo que es necesario realizar un estudio de RT-PCR con células únicas.

Por otro lado, el tratamiento neonatal con GMS no modificó los niveles de expresión del RNAm de las subunidades GluR5 y GluR6 del cuerpo estriado. En este sentido, se ha visto que al tercer día de edad posnatal los patrones de expresión de las subunidades del R-KA en la rata maduran tempranamente (Nansen y col., 2000), incluso antes del establecimiento de las sinapsis

definitivas. Esto sugiere que, al menos las subunidades analizadas en este trabajo no son modificadas por el efecto del tratamiento neonatal con GMS. Lo que indica que el Glu u otros agonistas podría desarrollar su efecto a través de otros receptores, particularmente de tipo NMDA; y también, se ha observado que en la enfermedad de Alzheimer hay una pérdida de aferencias córtico estriatales y consecuentemente una alteración del circuito neuronal, en el cual la densidad de los receptores para KA no se ve alterada en el estriado (Ulas y col., 1994). Hechos que apoya la escasa movilidad de este receptor en el cuerpo estriado.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo es posible observar que elevadas concentraciones de Glu en edad temprana del SNC, modifica la expresión y posiblemente el ensamblaje del R-KA, principalmente en el hipocampo y la corteza cerebral, lo que significaría un posible cambio en las propiedades fisiológicas del propio receptor y cuyas implicaciones podrían ir desde cambios en la remodelación sináptica hasta la susceptibilidad para el desarrollo de procesos neurodegenerativos y muerte neuronal. Tal como se ha demostrado previamente con este modelo (González-Burgos y col., 2001). Sin embargo, estudios adicionales serán necesarios para esclarecer y precisar estas implicaciones, por lo que se continuará con estudios de electrofisiología e inmunocitoquímica que permitan profundizar y ampliar el conocimiento de este receptor, así como esclarecer esta hipótesis.

# CONCLUSIONES

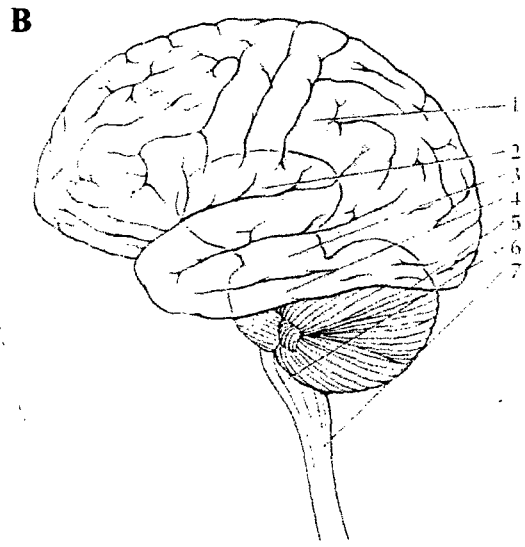


1. El tratamiento neonatal con GMS incrementa la expresión del RNAm de GluR5 en la corteza cerebral y el hipocampo, en tanto que la expresión de GluR6 la incrementa solo en hipocampo. El incremento en la expresión de ambas subunidades, podría modificar la conformación y propiedades del R-KA que implicarían cambios en la excitabilidad de algunas neuronas de estas regiones en la edad adulta.
2. El tratamiento neonatal con GMS no tiene efecto sobre la expresión del RNAm de las subunidades GluR5 y GluR6 en el cuerpo estriado en la edad adulta de la rata. Lo cual puede deberse a que dicha regio debido a su temprana maduración es menos vulnerable al GMS.
3. El incremento en la expresión del RNAm para la GluR5 y GluR6 bajo el tratamiento neonatal con GMS podría por un lado, elevar la susceptibilidad de las neuronas al efecto excitotóxico del GMS o bien ejercer algún efecto neuroprotector, por lo que son necesarios más estudios para caracterizar las consecuencias fisiológicas de dicho incremento.

# FIGURAS

**FIGURA 1****DIVISIÓN ANATÓMICA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

**A.** Localización anatómica del Sistema Nervioso Central en Humanos. **B.** Hay siete divisiones principales del SNC: (1) hemisferios cerebrales, (2) diencefalo, (3) mesencefalo, (4) protuberancia, (5) cerebelo, (6) bulbo raquídeo y (7) médula espinal. El mesencefalo, la protuberancia y el bulbo raquídeo forman el tronco encefálico.

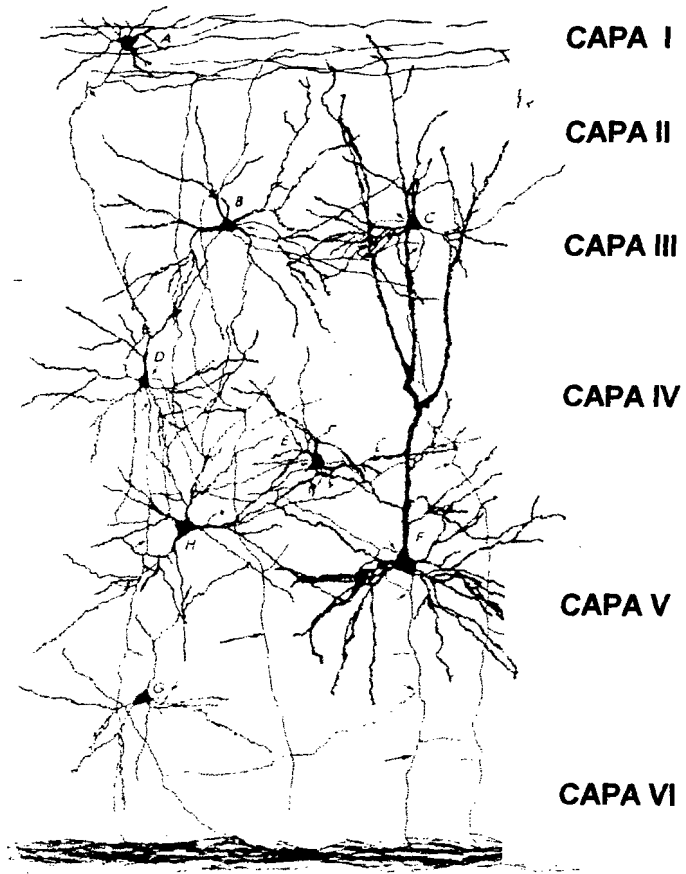


Martin J. H. (1998)

**FIGURA 2**  
**DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS NERVIOSAS QUE**  
**CONSTITUYEN A LA CORTEZA CEREBRAL.**

- |                               |                             |
|-------------------------------|-----------------------------|
| A) Célula horizontal de Cajal | E) Célula granular interna  |
| B) Célula estrellada          | F) Célula piramidal gigante |
| C) Célula piramidal pequeña   | G) Célula poligonal         |
| D) Célula piramidal mediana   | H) Célula de Martinotti     |

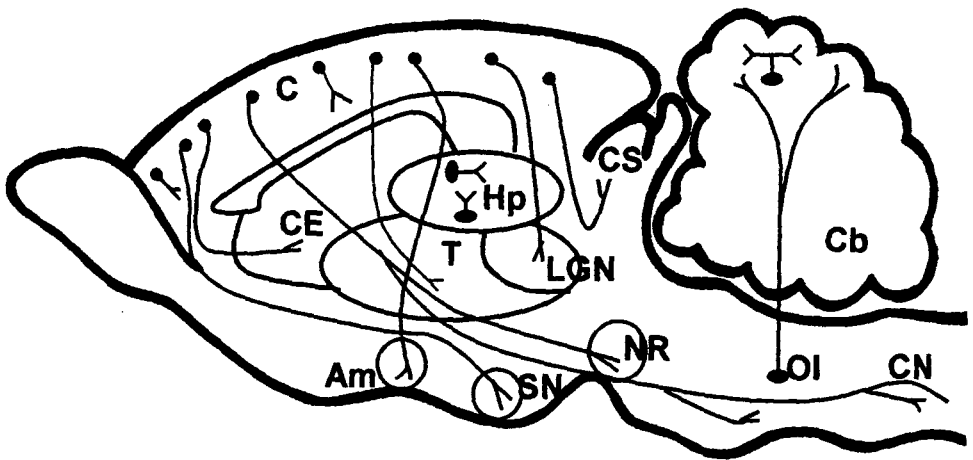




Feria-Velasco A. y Tapia Arizmendi G. (1986)

**FIGURA 3**  
**PRINCIPALES VÍAS DE NEUROTRANSMISIÓN**  
**GLUTAMATÉRGICA EN EL CEREBRO DE LA RATA ADULTA**

- (C) Corteza cerebral
- (CE) Cuerpo estriado
- (AM) Amígdala
- (CB) Cerebelo
- (NC) Núcleo caudado
- (CS) Colículo superior
- (Hp) Hipocampo
- (NGL) Núcleo reticulado lateral
- (NR) Núcleo rojo
- (OI) Oliva inferior
- (SN) Sustancia negra
- (T) Tálamo



Ureña-Guerrero M.E. Tesis de Maestría. (1999)

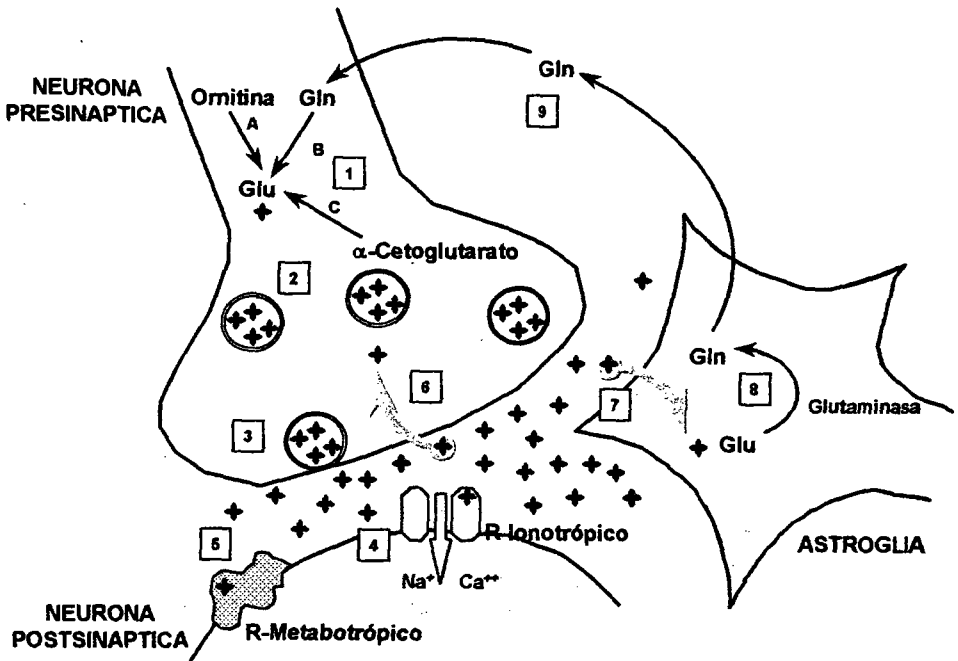


## FIGURA 4

### SINAPSIS GLUTAMATERGICA

- 1) Síntesis de Glu
  - A. Ornitin amino transferasa
  - B. Glutamina sintetasa
  - C. Deshidrogenasa del Glu
  
- 2) Transporte de Glu hacia las vesículas sinápticas
- 3) Liberación exocítica de Glu
- 4) Interacción del Glu con receptores ionotrópicos
- 5) Interacción del Glu con receptores metabotrópicos
- 6) Recaptura neuronal de Glu
- 7) Recaptura astrogliial de Glu
- 8) Degradación bioquímica del Glu dentro de los astrocitos
- 9) Transporte de Gln desde el astrocito hacia la terminal glutamatérgica.

Nota: en el esquema se muestran receptores postsinápticos, sin embargo, también se han descrito a nivel presináptico.



Ureña-Guerrero M.E. Tesis de Maestría. (1999)

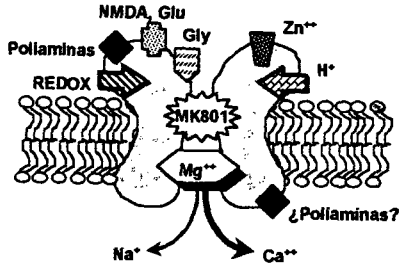
## **FIGURA 5**

### **TIPOS DE RECEPTORES A GLUTAMATO**

Esquema que muestra los mecanismos celulares activados por la interacción de Glu con sus receptores ionotrópicos (A, B y C) y metabotrópicos (D), así como los tipos y subtipos de subunidades que pueden conformar a dichos receptores. En el caso del R-NMDA se muestran los múltiples sitios de modulación y bloqueo de la corriente iónica activada por este receptor.

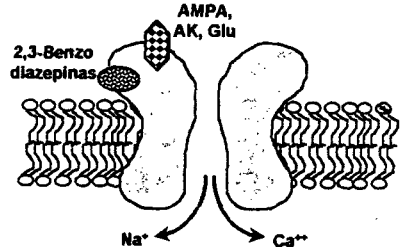
### A. Receptor NMDA

SUBUNIDADES: NR1A-H Y NR2A-D



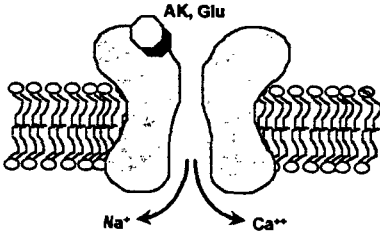
### B. Receptor AMPA/AK

SUBUNIDADES: GluR1-4

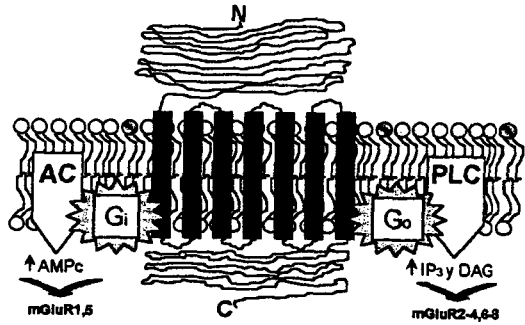


### C. Receptor AK

SUBUNIDADES: GluR5-7 y KA1-2



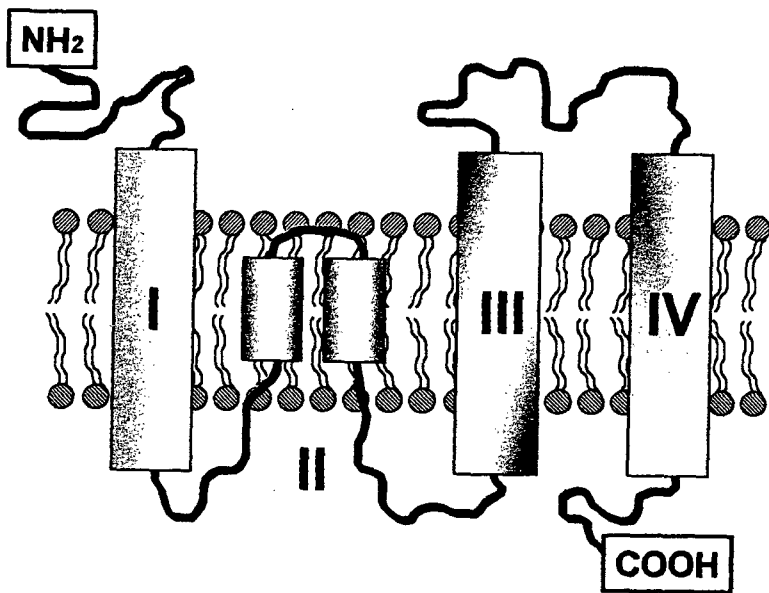
### D. Receptor metabotrópico



## FIGURA 6

### **DOMINIOS TRANSMEMBRANALES DE LAS SUBUNIDADES PROTÉICAS QUE COMPONEN LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS GLUTAMATÉRGICOS**

Las subunidades proteicas de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos poseen cuatro dominios transmembranales los cuales se han denominado M1-M4 de los cuales solo el M1, M3 y M4 son transmembranales mientras que el MII no cruza la membrana, así el grupo amino terminal (NH<sub>2</sub>) y carboxilo terminal son intracelular.



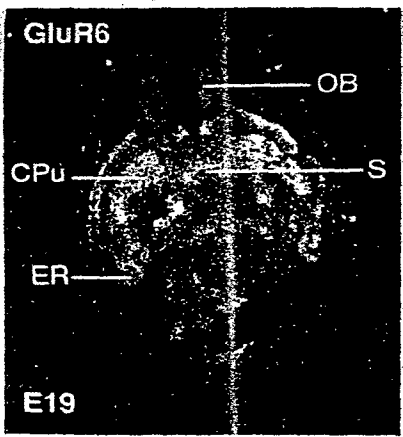
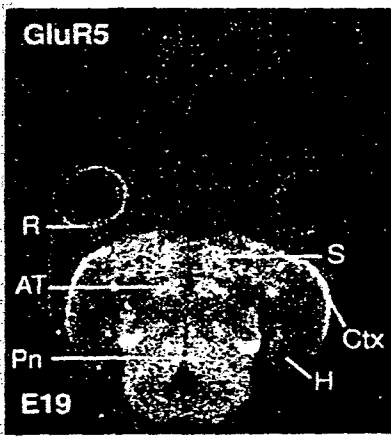
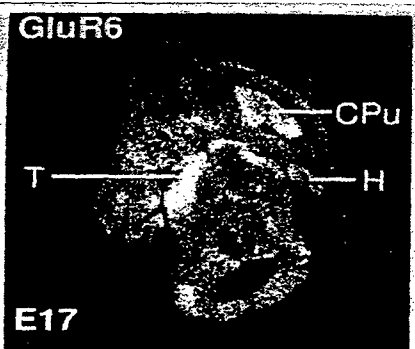
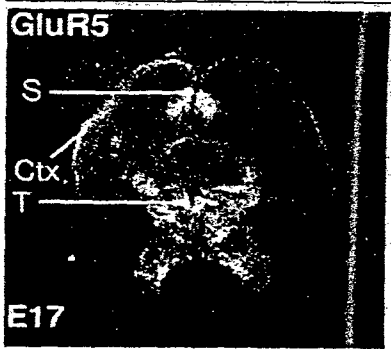
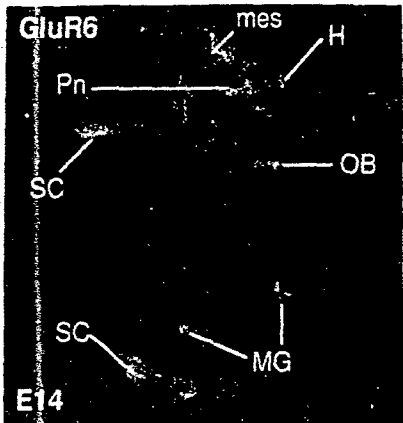
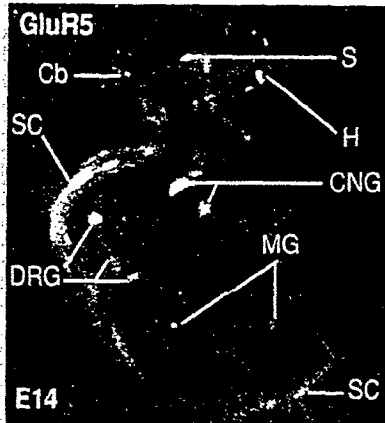
Ureña-Guerrero M.E. Tesis de Maestría. (1999)

**FIGURA 7**  
**DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBUNIDADES GluR5 Y GluR6 DEL**  
**R-KA A TRAVÉS DEL DESARROLLO DEL SISTEMA**  
**NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA**

**Abreviaturas:**

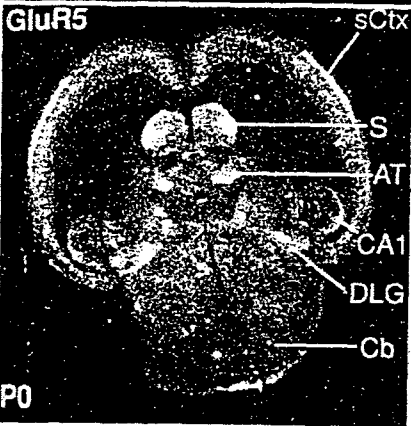
Ad	Adulto
Bulbo olfatorio	OB
Cerebelo	Cb
Cíngulo	Cg
Cordón espinal	SC
Corteza entorrinal	ER
Corteza sensorial	sCtx
Estriado	St
E14	Día 14 de etapa embrionaria
E17	Día 17 de etapa embrionaria
E17	Día 19 de etapa embrionaria
Ganglio de los nervios craneales	CNG
Giro dentado	DG
Hipocampo	H
Mesencéfalo	mes
Neocorteza	Ctx
Núcleo geniculado lateral dorsal	DLG
P0	Día posnatal 1
P12	Día posnatal 12
P5	Día posnatal 5
Putamen	Cpu
Raíz del ganglio dorsal	DRG
Región CA1 del Hipocampo	CA1
Región CA3 del Hipocampo	CA3
Septum	S
Tálamo anterior	AT
Telencéfalo	Te

(Bahn S., Volk B., y Wisden. W. (1994). Kainate Receptor Gene Expression in the Developing Rat Brain. *Neurosci.* 14 (9); 5525-5547)



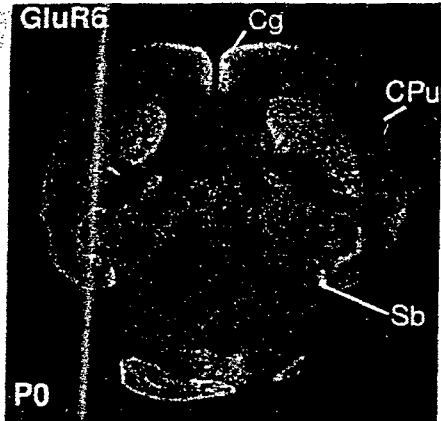


GluR5



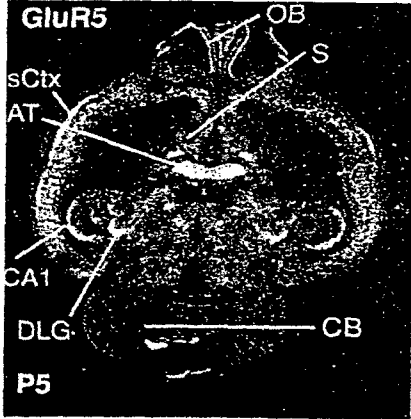
P0

GluR6



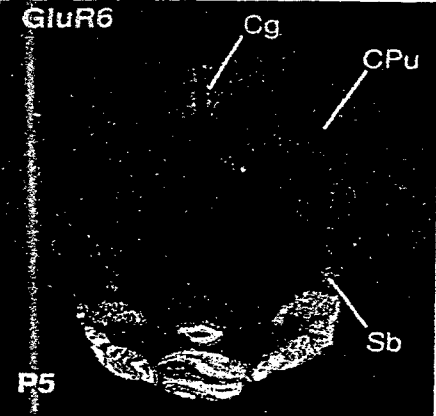
P0

GluR5



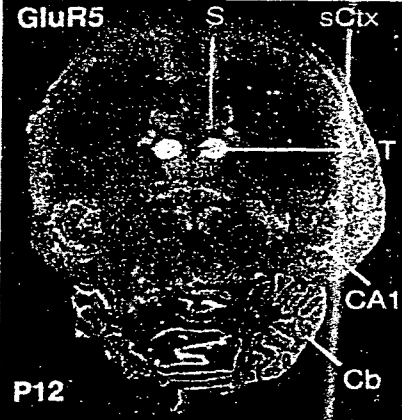
P5

GluR6



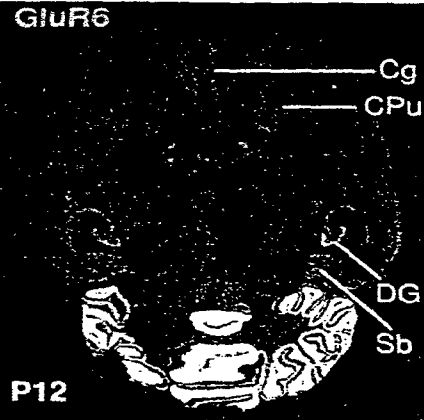
P5

GluR5



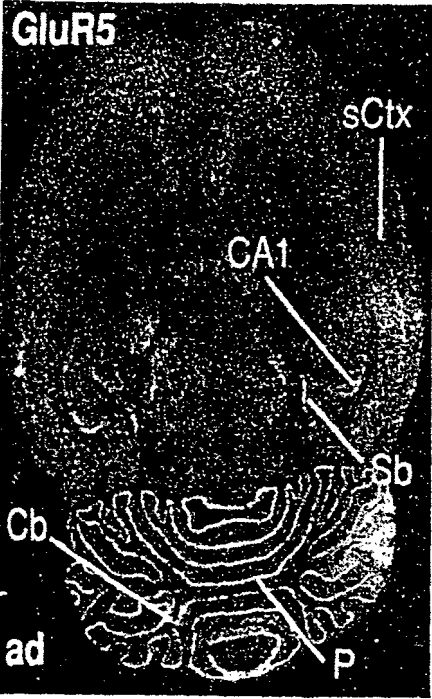
P12

GluR6

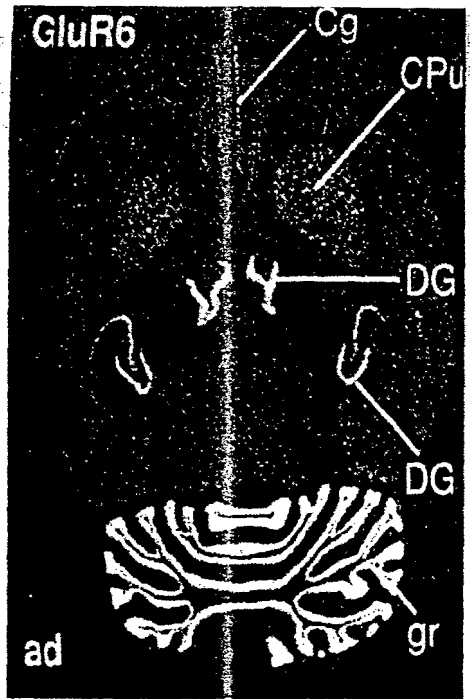


P12

GluR5



GluR6



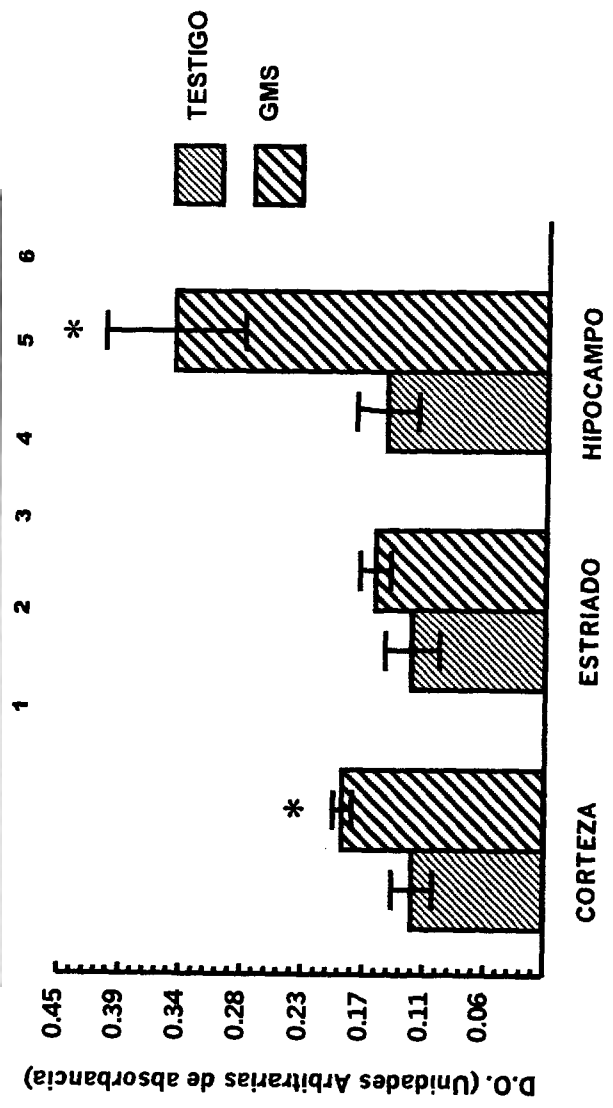
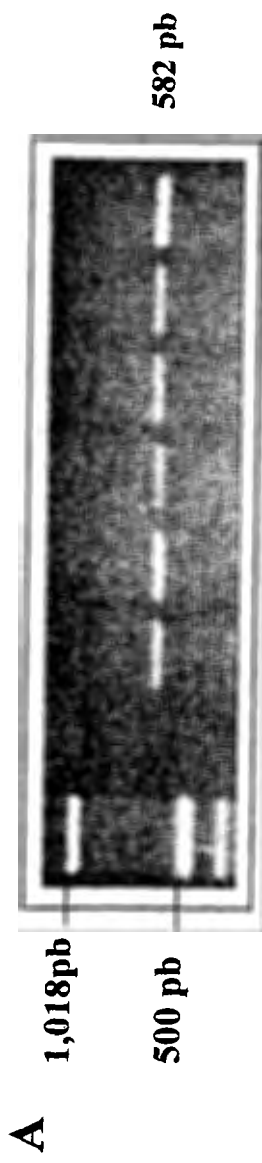
## F I G U R A 8

### EFEECTO DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON GMS SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RNAm PARA LA SUBUNIDAD GluR5 EN LA EDAD ADULTA DE LA RATA

- A)** Imagen de los productos amplificados por PCR para la subunidad GluR5 del receptor para KA en corteza cerebral (1 Testigo, 2 Experimental), cuerpo estriado (3 Testigo, 4 Experimental) e hipocampo (5 Testigo, 6 Experimental) de ratas adultas.
- B)** Gráfica que muestra las densidades ópticas (D.O) de los productos amplificados, cuyos valores son expresados en unidades arbitrarias.

Los resultados expresan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado. Las diferencias estadísticamente significativas fueron:

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

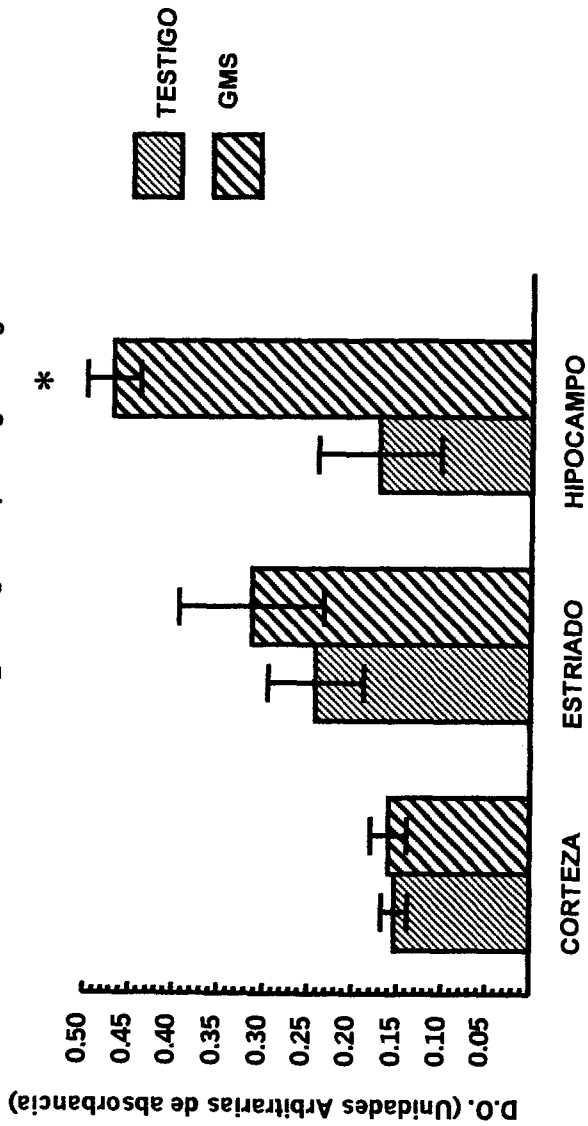
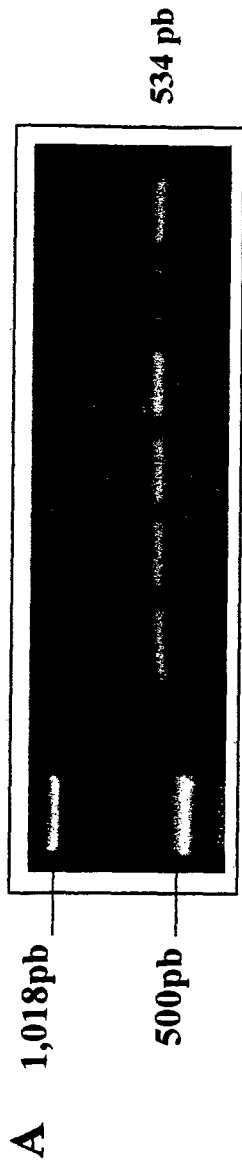


**F I G U R A 9****EFFECTO DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON GMS SOBRE  
LA EXPRESIÓN DEL RNAm PARA LA SUBUNIDAD GluR6  
EN LA EDAD ADULTA DE LA RATA**

- A)** Imagen de los productos amplificados por PCR para la subunidad GluR6 del receptor para KA en corteza cerebral (1 Testigo, 2 Experimental), cuerpo estriado (3 Testigo, 4 Experimental) e hipocampo (5 Testigo, 6 Experimental) de ratas adultas.
- B)** Gráfica que muestra las densidades ópticas (D.O) de los productos amplificados, cuyos valores son expresados en unidades arbitrarias.

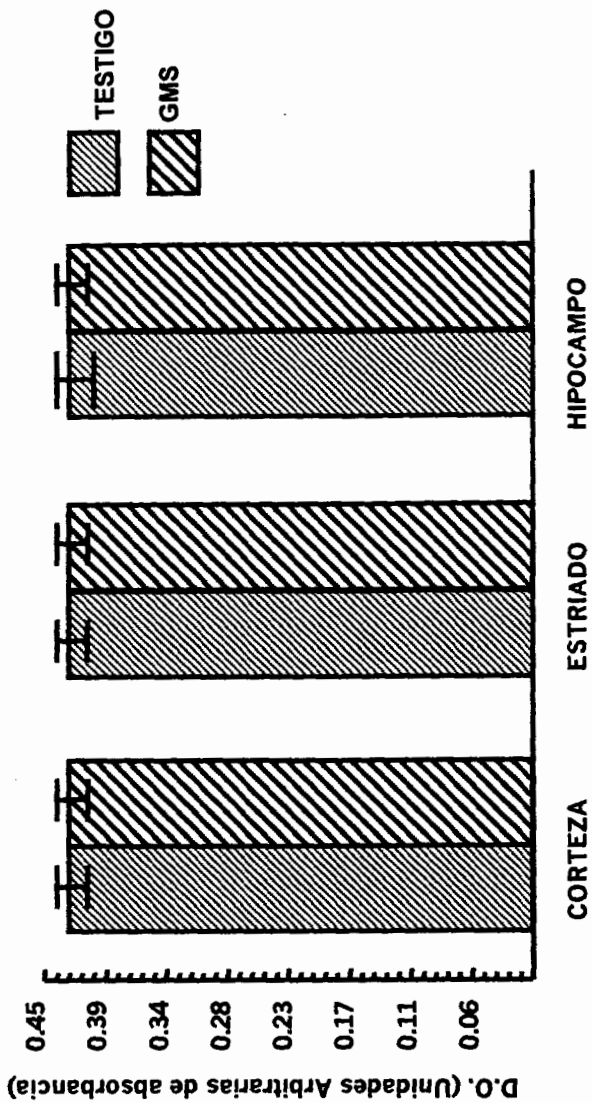
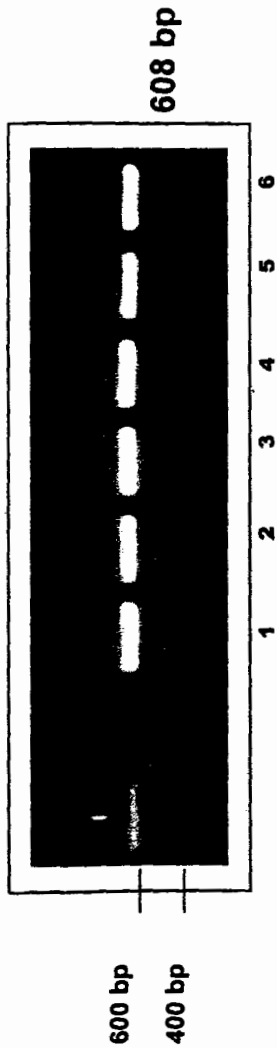
Los resultados expresan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado. Las diferencias estadísticamente significativas fueron:

⊛  $p < 0,05$  con respecto a su control.



**F I G U R A 10****EXPRESIÓN DEL RNAm DEL GEN HPRT DESPUÉS DEL  
TRATAMIENTO NEONATAL CON GMS EN DIFERENTES  
REGIONES CEREBRALES DE LA RATA EN LA EDAD  
ADULTA**

- A)** La imagen ilustra los productos amplificados por PCR para la el Gen de HPRT en corteza cerebral (1Testigo, 2 Experimental), cuerpo estriado (3 Testigo,4 Experimental) e hipocampo (5 Testigo, 6 Experimental) de ratas adultas de ratas adultas utilizado como control para PCR de las dos subunidades amplificadas del Receptor para KA.
- B)** Gráfica que muestra las densidades ópticas (D.O) de los productos amplificados, cuyos valores son expresados en unidades arbitrarias.

**A****B**



# **BIBLIOGRAFIA**

- Alcaraz V.M.** (2000). Estructura y función del sistema nervioso. U.de.G. México. p.p. 13-22.
- 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.
- Bahn S., Volk B. y Wisden, W.** (1994). Kainate Receptor Gene Expression in the Developing Rat Brain. *Neuroscience.* 14 (9): 5525-5547.
- Banasiak J.K., Xia Y. y Haddad G.G.** (2000) Mechanisms underlying hipoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology.* 62: 215-249.
- Barinaga M.** (1995) A new face for the glutamate receptor. *Science* 267:177-1778.
- Beas-Zárate C., Rivera-Huizar S.V., Martínez-Contreras A., Feria-Velasco, A. y Armendáriz-Borunda, J.** (2001). NMDA-receptor gene expression is differentially modulated by glutamate in rat brain regions. *Neurochem. Int.* 39(1):1-10.
- 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. Int.* 33: 217-232.
- Bernard A. y Khrestchatsky M.** (1994). Assessing the Extent of RNA Editing in the TMII Regions of GluR5 and GluR6 Kainate Receptors During Rat Development. *J. Neurochem.* 62:2057-2060.
- Bleakman D., y Lodge D.** (1998). Review Neuropharmacology of AMPA and Kainate receptors. *Neuropharmacology.* 37: 1187-1204.
- Burnashev N.** (1996). Calcium permeability of glutamate – gated channels in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 6:311-317.
- Campochiaro P y Coley J.T.** (1978). Ontogenic development of kainate neurotoxicity: correlates with glutametergic innervation. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 75(4): 2025-2029.
- Clarke V.R., Ballyk B.A., Hoo, K. H., Mandelzys. A., Pellizzari A., Bath C.P., Thomas J., Sharpe E.F., Davies C.H., Ornstein P.L., Schoepp D.D., Kamboj R.K., Collingridge G.L., Lodge D. y Bleakman D.** (1997). A hipocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature.* 389:599-603.

- Coyle J.T y Schwarcz R.** (1976). Lesion of striatal neurons with Kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*. 263: 244-246.
- Coyle J.T.** (1983). Neurotoxic action of kainic acid. *J. Neurochem.* 41:1-11.
- Changhai C. y Mark L. M.** (1999). Heteromeric Kainate Receptors Formed by the Coassembly of GluR5, GluR6 and GluR7. *J Neurosci.* 19:8281-8291.
- Chittajallu R., Braithwaite S. P., Clarke V.R.J. y Henley J.M.** (1999). Kainate receptors: subunits synaptic localization and function. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:26-35.
- Choi D.W.** (1988). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trend Neurosci.* 11: 465-469
- Choi D.W.** (1995). Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 18: 58-60.
- Chomczynski P. y Sacchi N.** (1987). Single-Step of Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Chusid J.G.** (1987). Neuroanatomía correlativa y neurología funcional. Manual Moderno, México, p.p. 25.
- Delgado-Rizo V., Salazar A., Panduro A. y Armendáriz-Borunda J.** (1998). Treatment with anti-transforming growth factor  $\beta$  antibodies influences and altered pattern of cytokines gene expression in injured rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.*1442: 20-27.
- Dingledine R. y J. Mac Bain, C.** (1993). Excitatory amino acid Transmitters. En : Basic Neurochemistry. (Ed. Siegel J.G., Agranoff W B., Albers W R y Molinoff P B.). Lippincott-Raven, Press. USA. p.p. 367-387.
- Dubinsky J.M. y Rothman S.M.** (1991). Intracellular calcium concentration during "chemical Hypoxia" and excitotoxic neuronal injury. *J. Neurosci.* 11:2545-2551.
- Flores-Mendoza, C.** Tesis de licenciatura Q.F.B. (1997). Determinación de los receptores a Glutamato tipo Kainato en ratas tratadas con Glutamato Monosódico en edad temprana. U de G.
- Fonnum F.** (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurosci.* 42:1-11
- Friedman L.K., Pellegrini-Giampietro D.E., Sperber E.F., Bennett M.V.L., Moshé S.L y Zukin R.S.** (1994). Kainate-induced Status Epilepticus Alters

- Glutamate and GABA<sub>A</sub> Receptor Gene Expression in Adult Rat Hippocampus: An in situ Hybridization Study. *J. Neurosci.* 14(5): 2697-2707.
- Gallo V y Ghiani C.A.** (2000). Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol Sci.* 21:252-258.
- Geddes J.W., Monaghan D.T., y Cotman C. W.** (1985). Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer disease: an autoradiographic study. *J. Neurosci.* 14:6317-6324.
- Gilman S. y Winans S.S.** (1994). Lo esencial en Neuroanatomía y Neurofisiología de Manter y Gatz. Manual Moderno, México, p.p 4-5.
- Gonoi T., Mizuno N., Inagaki N., Kuromi H., Seino Y., Miyazaki, J., y Seino S.** (1994). Functional Neuronal Ionotropic Glutamate Receptors Are Expressed in the Non-Neuronal Cell Line MIN6. *J.Biol. Chem.* 269:16989-16992.
- González-Burgos., Pérez-Vega M.I y Beaz-Zarate C.** (2001). Neonatal exposure to monosodium glutamate induces cell death and dendritic hypotrophy in rat prefrontocortical pyramidal neurons. *Neurosci. Lett.* 297:69-72.
- Greenamyre J.T y Young A.B.** (1989). Excitatory amino acids and Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging.* 10:593-602.
- Hayashi T.** (1952). A physiological study of the epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn.J physiol.* 3:46-64
- Herb A., Burnashev N., Werner P., Sakmann B., Wisden W. y Seeburg P.H.** (1992). The KA<sub>-2</sub> Subunit of Excitatory Amino Acid Receptors Shows Widespread Expression in Brain and Forms Ion Channels with Distantly Related Subunits. *Neuron.* 8: 775-785.
- Hollmann M. y Heinemann S.** (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:31-108.
- Ino M, Ozawa S, y Tsuzuki, K.** (1990). Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 424:151-165.
- James G., Greene J., y Timothy G.** (1996). Bioenergetics and Glutamate Excitotoxicity. *Prog Neurobiol.* 48: 613-634.
- Jensen J. B., Schousboe, A. y Pickering, D. S.** (1999). Role of Desensitization and Subunit Expression for Kainate Receptor-Mediated Neurotoxicity in Murine Neocortical Cultures. *J. Neurosci. Res.* 55:208-217.

- Jeremy M.H.** (1994). Kainate-Binding Proteins: Phylogeny, Structures and possible functions. *Trens Pharmacol. Sci. Rev.* 15: 182-189.
- Kamphuis W., Hendriksen H., Diegenbach P.C. y Lopez da Silva F.H.** (1995). N-Metyl-D-Aspartate and Kainate receptors gene expression in hipocampal pyramidal and granular neurons in the Kindling model epileptogenesis. *Neuroscience* . 67(3):551-557.
- Kandel E.R., Schwartz J.H. y Jessell T.M** (1998). Neurociencia y conducta. Segunda edición. Prentice Hall, Madrid. p.p.123-131, 143-157, 567-588.
- Kauppinen R.A., McMahon, H.T. y Nicholls D.G.** (1988). Ca<sup>+2</sup>-dependent and Ca<sup>+2</sup>-independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca<sup>+2</sup> concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: possible relevance to hypoglycemia and anoxia. *Neuroscience* 27(1):175-182.
- Lipton S,A. y Rosenberg, P.A.** (1994). Excitatory Amino Acid as common Pathway for neurologic Disorders. *New England Med.* 330: 613-621.
- López-Antúnez L.** (1986). Anatomía funcional del sistema nervioso. Limusa, México. p.p. 27-34, 417-422.
- Lucas D.R. y Newhouse J.P.** (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate in the layer of the retina. *Arch. Ophthalmol. (Chicago).* 29:1297-1302.
- Magnusson K.R., Larson A.A., Madl J.E., Altschuler R.A. y Beitz, A.J.** (1986). Colocalization of fixative-modified glutamate and glutaminase in neurons of the spinal trigeminal nucleus of the rat: an immunohistochemical and immunoradiochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* 247:477-490.
- Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.** (1987). Commonly Used Techniques in Molecular Cloning ( Quantittation of DNA and RNA.). En: Molecular Cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbar Laboratory Press N.Y. Apendix E 5.
- Mano I. y Teichberg V. I.** (1998). A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor channel complex. *Neuroreport.* 9: 327-331.
- Mark P.M. y Kater S.B.** (1989). Excitatory and inhibitory neurotransmitters in the generation and degeneration of hipocampal neuroarchitecture. *Brain. Res.* 478:337-348.
- Martín J. H.** (1998). Introducción al sistema nervioso central. En: Neuroanatomía. Segunda edición. Pretince Hall, Madrid. p.p. 1-22.

- Masu M., Nakajima Y., Moriyoshi K., Ishii T., Akazawa Ch., y Nakanashi S.** (1993). Molecular Characterization of NMDA and Metabotropic Glutamate Receptors. *Ann. N.Y Acad. Sci.* 707:153-164.
- Mattson M.P.** (1990). Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and calcium influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron.* 4:105-117.
- McGeer E.G. y MacGeer P.L.** (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington s chorea by intrastrial injections of glutamic and kainic acid. *Nature.* 263:517-518.
- Meador-Woodruff J.H., Davis L.K. y Haroutunian V.** (2001). Abnormal Kainate Receptor Expression in prefrontal cortex in Schizophrenia. *Nueropsychopharmacology.* 24(5):545-552.
- 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.
- Monaghan D.T., Bridges R.J. y Cotman C. W.** (1989). The excitatory amino acid receptors: Their Classes, Pharmacology and Distinct Properties in the Function of Central Nervous System. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:365-402.
- Moriyoshi K. y Masu M.** (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* 354: 31-37.
- Mulle C., Sailer A., Pérez-Otaño, I., Dickinson-Anson H., Castillo P.E., Bureau I., Maron C., Gages F.H., Mann J.R., Bettler B. y Heinemann S.F.** (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate induced seizures in GluR6- deficient mice. *Nature.*392:601-604.
- Nadler J.V., Paerry B.W. y Cotman C.W.** (1978). Intraventricular Kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature.* 272:676-677.
- Nakanishi S.** (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implication for brain function. *Science* 258:597-603.
- Nansen E.A., Jokel E.S., Lobo M.K., Micevych P.E., Ariano M.A. y Levine M.S.** (2000). Stratial Ionotropic Glutamate Receptor Ontogeny in the Rat. *Dev Neurosci.* 22:329-340.
- Newsholme E.A. y Leech A.A.** (1986). Bioquímica Medica. Metabolismo de los neurotransmisores. Interamericana, México. p.p. 665-669.

- Noback C.R. y Demarest R.J.** (1980). Sistema Nervioso Humano. Fundamentos de Neurobiología. McGraw-Hill, México, p.p. 33-34.
- Olne J. W.** (1969). Brain lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. *Science*, 164:719-721.
- Olne J. W.** (1978). Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer, E.G, Olney, J.W, y McGeer P.L. (Eds.), Kainic acid as a tool in neurobiology. New York: Raven Press, New York, p.p. 91-121.
- Ortuño-Sahagun D., Beas-Zárate C., Adame-Gonzalez G. y Feria- Velasco A.** (1997). Effect of L-glutamate on cholinergic neurotransmission in various brain regions during the development of rats, when administered perinatally. *Neurochem. Int.* 31: 683-692.
- Paschen W., Dux E. y Djuricic B.** (1994) Developmental changes in the extent of RNA editing of glutamate receptor subunit GluR5 in rat brain. *Neurosci. Lett.* 174:109-112.
- Paschen W., Schmitt J. y Uto A.** (1996). RNA Editing of Glutamate Receptor Subunits GluR2, GluR5, and GluR6 in Transient Cerebral Ischemia in the Rat. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 16(4): 584-556.
- Robinson M.B. y Coyle J.T.** (1987). Glutamate and related acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application. *FASEB J.* 1:446-455
- Rothstein J.D., Hunter-Ensor M. y Sinor J.** (1992). Decreased glutamate transport by brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 326:464-468.
- Sakurada K., Masu M. y Nakanishi S.** (1993). Alteration of Ca<sup>++</sup> permeability and sensitivity to Mg<sup>++</sup> and channel blocker by a single acid substitution in the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 410-415.
- Sommer B., Burnashev N., Verdoorn T.A., Keinanen K., Sakmann B. y Seeburg P.H.** (1992) A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J.* 11:923-927.
- Sonja Y., Grooms T.Y., Michael V.L.B. y Zukin S.R.** (2000). Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:3631-3636.
- Steinauser C. y Gallo V.** (1996). News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.* 19:339-345.

- Stratton, D.B.** (1984). La sinapsis. En: Neurofisiología. Limusa, México, p.p. 91-112.
- Telfeian A.E., Federoff H.J., Leone P., During M.J y Williamson A.** (2000). Overexpression of GluR6 in Rat Hippocampus Produces Seizures and Spontaneous Nonsynaptic Bursting *in vitro*. *Neurobiol Dis.* 7:362-374.
- Tresguerran J.A.F.** (1995). Neurotransmisores y Neuromoduladores. En: Fisiología Humana. Interamericana, McGraw-Hill, USA, p.p. 67-78.
- Turski L., Bressler K., Retting K.J., Löschmann P.A. y Wachtel H.** (1991). Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-metyl-D-aspartate antagonists. *Nature.* 349:414-418.
- Ulas J., Weihmuller F.B., Brunner L.C., Joyce J.N., Marshall J.F. y Cotman C.W.** (1994). Selective Increase of NMDA-sensitive Glutamate Binding in the Stratum of Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease, and Mixed Parkinson's Disease/Alzheimer's Disease Patients: An Autoradiographic Study. *J. Neurosci* 14:6317-6324.
- Ureña-Guerrero M.E.** Tesis de Maestría. (1999). Densidad de células GABAérgicas, actividad y propiedades cinéticas de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15) en diferentes regiones del cerebro de rata después del tratamiento neonatal con glutamato monosódico (GMS). U de G.
- Valdivia-Ramírez G.** Tesis de licenciatura Q.F.B. (1997). Determinación de los receptores a glutamato durante el desarrollo de la corteza motora, hipocampo y cuerpo estriado de ratas tratadas con glutamato Monosódico en la edad temprana. U de G.
- Vignes M., Clarke V. R.J., Parry M.J., Bleakman D., Lodge D., Ornstein P.L y Collingridge G.L.** (1998). The GluR5 subtype of kainate receptor regulates excitatory synaptic transmission in areas CA1 y CA3 of the rat hippocampus. *Neuropharmacol.* 37:1269-1277.
- Wisden W. y Seeburg PH.** (1993). A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.* 13:3582-3592.
- Wuellner U., Standaert D.G., Testa C.M., Penney J.B. y Young A.B.** (1997). Differential expression of Kainate receptors in the basal ganglia of the developing and adult rat. *Brain Res.* 768: 215-223.