
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y
AGROPECUARIAS



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN
LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN MAPK, EN UN MODELO DE
EXCITOTOXICIDAD INDUCIDO POR GMS EN RATAS
NEONATAS.**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Irene Guadalupe Aguilar García.

Las Agujas, Zapopan, Jal., Noviembre de 2008



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1389/ C. C. BIOLOGÍA

C. IRENE GUADALUPE AGUILAR GARCIA

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción Tesis con el título : "Análisis de la expresión de genes involucrados en la vía de señalización MAPK en un modelo de **exitotoxicidad** inducida por glutamato monosódico en ratas neonatales" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo la **Dra. Martha Rivera Cervantes** y como asesor el **Dr. Mario Eduardo Flores Soto**.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Las Agujas, Zapopan., 13 de noviembre del 2008.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

P.A. -

M en C. GLÓRIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis e informes, opción tesis con el título: "Análisis de la expresión de genes involucrados en la vía de señalización MAPK en un modelo de excitotoxicidad inducida por glutamato monosódico en ratas neonatales" que realizó el/la pasante Irene Guadalupe Aguilar García con número de código 399255692 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
 Las Agujas, Zapopan., 14 de noviembre del 2008

Dra. Martha C. Rivera Cervantes
 Director/a del trabajo

Dr. Mario Flores Soto
 Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Carlos Ben Zriate		14-NOV-08
Asistente:	Asistente	19-Nov-2008
Graciela Guadino Cabrera		20 NOV 2008
Supl. Silvia Josefina López Pérez		24 NOV 08

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología Celular, del Departamento de Biología Celular y Molecular, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.
Bajo la dirección de la Dra. en Cs. Martha Catalina Rivera Cervantes.
El comité tutorial integrado por: Dra. Anne Santerre, Dr. Carlos Beas Zárate, Dra. Graciela Gudiño Cabrera.

Dedico este trabajo de manera muy especial a mis padres por estar siempre conmigo.

A esa persona especial (el sabe quien es)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Martha Catalina Rivera Cervantes por dedicarme su tiempo, por su apoyo, por su paciencia, por su amistad, porque sin ella no hubiera sido posible este trabajo y por su gran calidad humana.

Agradezco al Dr. Mario Eduardo Flores Soto por sus sugerencias y su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis compañeros Rolando Castañeda Arellano y Nancy Franco Ramírez por su apoyo.

A Rolando Castañeda por estar conmigo cuando más lo necesitaba.

“Si el cerebro humano fuera tan simple que lo pudiéramos comprender, seríamos tan simples que no lo podríamos comprender”

Emerson

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las instituciones que me apoyaron para hacer posible este trabajo de tesis.

Agradezco a la Universidad de Guadalajara por los apoyos obtenidos durante la realización de este trabajo, tales como Becario de Ayudantes de Investigación. (PITAI-2007-2/ subprograma B)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado al proyecto U 48002, sin el cual no hubiera sido posible realizar este trabajo.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
1.1 SISTEMA NERVIOSO	2
1.2 NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATERGICA	3
1.2.1RECEPTOR A NMDA	4
1.2.2RECEPTOR A AMPA	5
1.2.3RECEPTOR A KAINATO	6
1.3MECANISMOS CELULARES DE EXCITOTOXICIDAD	6
ANTECEDENTES	10
2.1MODELOS DE EXCITOTOXICIDAD	11
2.2PROTEINAS CINASAS ACTIVADAS POR MITOGENOS	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	24
DISEÑO EXPERIMENTAL	26
METODOLOGÍA	28
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y TRATAMIENTOS	29
3.2 PREPARACION DE LA MUESTRA	29
3.3 EXTRACCION DE ACIDO RIBONUCLEINCO TOTAL	29
3.4 DETERMINACION DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DEL RNA	30
3.5MICROARREGLOS	31
3.5.1 RESUMEN DEL METODO DE RT2-PCR ARRAY FIRST STRAND KIT.	31
3.6 TECNICA DE WESTERN BLOT	35
3.7 ANALISIS ESTADISTICO	36
RESULTADOS	37
4.1EXPRESION DE GENES POR MICROARREGLOS	38
4.2 PERFIL DE EXPRESION GENICA	40
4.3 PERFIL GENERAL DE LA EXPRESION DE LAS MAPK	41
4.5 ANALISIS DE WESTERN BLOT PARA LA PROTEINA CREB	42
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIÓN	49
BIBLIOGRAFÍA	51
APÉNDICES	57

ABREVIATURAS:

ABC	<i>Complejo avidina biotina</i>
AMPA	<i>Ácido δ-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxasol</i>
AMPc	<i>Adenosin monofosfato cíclico</i>
AP1	<i>Activador de la proteína 1</i>
BDNF	<i>Factor neurotrófico derivado del cerebro</i>
Ca ⁺⁺	<i>Ión calcio</i>
[Ca ⁺⁺] _i	<i>Calcio libre intracelular</i>
CBP	<i>Proteína de unión a Creb</i>
cDNA	<i>Ácido desoxiribonucleico complementario</i>
c-fos	<i>FBJ oncogen homólogo de osteo-sarcoma viral</i>
CRE	<i>Elemento de respuesta a Creb</i>
CREB	<i>Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc</i>
DAB	<i>Diaminobenzidina</i>
DNA	<i>Ácido desoxiribonucleico</i>
e.p	<i>Edad posnatal</i>
ERK	<i>Cinasas reguladas por señal extracelular</i>
g	<i>Gramos</i>
GLU	<i>Glutamato</i>
Glyi	<i>Glicina</i>
GMS	<i>Glutamato monosódico.</i>

<i>h</i>	<i>Horas</i>
<i>i.p</i>	<i>Intraperitoneal</i>
<i>K⁺</i>	<i>Ión potasio</i>
<i>KA</i>	<i>Ácido Kaínico</i>
<i>LP</i>	<i>Lipoperoxidación</i>
<i>MAPK</i>	<i>Proteínas cinasas activadas por mitógenos</i>
<i>MAPKKK</i>	<i>MAPK cinasa cinasa</i>
<i>MAPKK</i>	<i>MAPK cinasa</i>
<i>MAPK</i>	<i>MAP cinasa</i>
<i>mg</i>	<i>Miligramos</i>
<i>min</i>	<i>Minutos</i>
<i>Na⁺</i>	<i>Ión sódio</i>
<i>NGF</i>	<i>Factor de crecimineto nervioso</i>
<i>NMDA</i>	<i>N-Métil-D-Aspartato</i>
<i>NR1</i>	<i>Subunidad NMDAR1</i>
<i>NR2</i>	<i>Subunidad NMDAR2</i>
<i>p.c</i>	<i>Peso corporal</i>
<i>Pro</i>	<i>Prolina</i>
<i>p SER 133</i>	<i>Serina 133 foforilada</i>
<i>R-Glu</i>	<i>Receptores a glutamato</i>
<i>R-GLU_i</i>	<i>Receptores ionotrópicos glutamatérgicos</i>
<i>R-GLU_m</i>	<i>Receptores metabotrópicos glutamatérgico</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido ribonucléico</i>

<i>RNA_m</i>	<i>Ácido ribonucleico mensajero</i>
<i>rpm</i>	<i>Revoluciones por minuto</i>
<i>SAPK</i>	<i>Proteínas cinasas activadas por estrés</i>
<i>s.c</i>	<i>Subcutânea</i>
<i>SDS</i>	<i>Duodecil sulfato de sódio</i>
<i>SNC</i>	<i>Sistema nervioso central</i>
<i>Thr</i>	<i>Treonina</i>
<i>Tyr</i>	<i>Tirosina</i>

RESUMEN

Se ha demostrado en diversos estudios que el GMS induce muerte neuronal de tipo necrótica y apoptótica, en particular la apoptosis involucra la activación de la vía de señalización MAPK. Esta vía de señalización, promueve la activación de genes tempranos, que bajo condiciones excitotóxicas produce cambios en el perfil de expresión de factores de transcripción y por consecuencia alteraciones en la expresión génica.

A pesar de que existen evidencias que muestran la participación de esta vía de señalización, no se conoce la activación secuencial precisa en un evento excitotóxico.

En este trabajo se evaluó el perfil de expresión génica a través de microarreglos específicos para MAPKs en hipocampo de ratas tratadas con GMS a una dosis de 4mg/g de peso los días 1, 3, 5, 7 por vía subcutánea.

Los resultados muestran que el GMS induce cambios en el perfil de expresión génica en respuesta al Glu, ya que se observan cambios en los niveles de expresión de diversos genes, que participan en la vía de las MAPKs con respecto a lo encontrado en los animales del grupo control.

Los resultados de microarreglos muestran un cambio en 34 de los 89 genes evaluados. Se encontraron 10 genes modificados significativamente en su expresión a las 126 h, 18 genes a las 144h, 9 genes a las 174h y 10 genes a las 192h. Además se valoró la presencia de la proteína CREB a los 6 y 8 días de e.p, los resultados de western blot muestran una disminución significativa del 45.18% de la presencia de la proteína a los 6 días de e.p a diferencia de lo encontrado a los 8 días de e.p que no muestra diferencias estadísticamente significativas.

Estos resultados sugieren que la neurotoxicidad inducida por GMS provoca muerte neuronal asociada a la activación de la vía de señalización MAPK. Así mismo esta activación promueve cambios en el perfil génico que se manifiestan en el hipocampo de ratas en nuestro modelo de estudio.

INTRODUCCIÓN

SISTEMA NERVIOSO:

Desde un punto de vista anatómico el sistema nervioso se divide en, sistema nervioso central, (SNC) y sistema nervioso periférico. El SNC: Se encarga de procesar e integrar la información, incluye al encéfalo y a la médula espinal. El sistema nervioso periférico: incluye todas las partes del sistema nervioso que están fuera de las estructuras óseas que forman el cráneo y la columna vertebral, son las ramificaciones nerviosas a lo largo del cuerpo que reciben información sensorial o que transmiten información motora. Dentro del SNC se sitúa el hipocampo esta estructura subcortical forma parte del sistema límbico. La formación hipocampal está situada en la superficie media del lóbulo temporal. Le llega información de la corteza y a su vez envía señales neuronales al hipotálamo y el área septum a través del fórnix. Una de las principales funciones del hipocampo es la consolidación del aprendizaje y la memoria.

El tejido nervioso está constituido básicamente por dos tipos de células: neuronas y células gliales. Tanto desde el punto de vista anatómico como bioquímico las neuronas son células especializadas en captar, integrar, conducir, transmitir y procesar la información. Una neurona está constituida por el soma o cuerpo neuronal, prolongaciones cortas llamadas dendritas y una prolongación generalmente más larga llamada axón, por donde viajan los impulsos, lo que permite la comunicación entre neuronas a través de una sinapsis, la cual puede ser de tipo química o eléctrica (Kandel E 2001).

En la sinapsis química diversas moléculas, denominadas neurotransmisores, permiten la comunicación interneuronal; un neurotransmisor es una sustancia química que cuando se libera de la terminal nerviosa, al llegar un potencial de acción, produce un cambio momentáneo del potencial eléctrico transmembranal (Kandel E 2001). Los

neurotransmisores estimulan o inhiben la actividad de neuronas adyacentes u órganos efectores, como músculos y glándulas.

NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

El ácido l-glutámico es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro, médula espinal y retina de los vertebrados, es un aminoácido no esencial que no cruza la barrera hematoencefálica, se sintetiza en la mitocondria de la neurona a partir de glucosa y por varios precursores.

El efecto excitador del glutamato (Glu) depende de la interacción con dos tipos de receptores, los metabotrópicos y ionotrópicos (Dingledine y McBain, 1999).

Los receptores metabotrópicos (R-Glu_m), activan proteínas G, que promueven la síntesis de segundos mensajeros; son glicoproteínas integrales y se han descrito por lo menos 8 tipos, que se conocen como R-Glu_m 1-8. Los genes para estos receptores codifican para una proteína, la cual cruza siete veces la membrana, y se clasifican dentro de tres clases funcionales en base a la homología en la secuencia de aminoácidos, agonistas farmacológicos y vías de transducción de señales, a las que se acoplan (Dingledine y McBain, 1999).

Los receptores ionotrópicos glutamatérgicos (R-Glu_i) son aquellos que operan a través de la activación de canales iónicos, la apertura del poro acuoso permite la entrada de Na⁺ y/o Ca⁺⁺ y la salida de K⁺. El efecto neto del flujo de iones a través de la membrana es una rápida despolarización de la célula nerviosa. Los R-Glu_i se clasifican de acuerdo con su afinidad a agonistas específicos como: N-Metil-D-Aspartato (R-NMDA), ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (R-AMPA) y ácido kainico (R-KA). Los R-Glu_i se conforman por la agregación de diferentes subunidades proteicas, algunas de las cuales se modifican después de la transcripción por diferentes procesos: como el empalme alternativo y la edición del RNA_m que provoca la sustitución de un aminoácido por otro.

Receptor a NMDA

El R-NMDA es una proteína canal que presenta una conductancia notablemente alta al Ca^{++} (Choi, 1995). Otra característica del R-NMDA es que la activación del canal requiere, además del Glu, la presencia de un co-agonista la glicina (*Gly*), sin embargo, en el SNC la concentración de *Gly* que existe en el medio extracelular ($1\mu\text{M}$) es suficiente para que el Glu pueda actuar como único activador de este receptor. Los R-NMDA son complejos proteicos formados por diferentes combinaciones de varias subunidades: la subunidad NMDAR1 (NR1), de la que se han identificado 8 variantes, y la subunidad NMDAR2 (NR2), de la cual existen cuatro subtipos, denominados NR2A, B, C y D; la presencia de las diferentes subunidades NR2 determina las propiedades electrofisiológicas del R-NMDA (Nakanishi, 1992; Rodríguez y López, 1997).

Los R-NMDA se distribuyen prácticamente en todo el SNC durante toda la vida del individuo; los estudios electrofisiológicos y el uso de radioligandos indican que las características fisiológicas y la presencia de un tipo particular de conformación del R-NMDA varían en las diferentes regiones del SNC.

RECEPTOR A NMDA

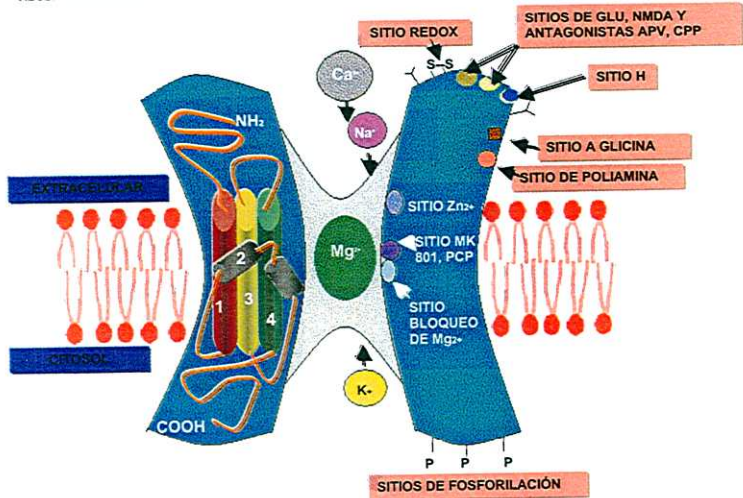


Figura 1 Imagen representativa del receptor NMDA. Esta imagen muestra los sitios de regulación farmacológica y el sitio de unión al Zn^{2+} y el canal iónico bloqueado por Mg^{2+} , así como sitios de unión a glicina, poliaminas etcétera.

Receptor a AMPA

Estos receptores regulan la neurotransmisión excitadora rápida en la mayoría de las sinapsis en el SNC. Las subunidades proteicas que conforman al R-AMPA son identificadas como: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4, la combinación homomérica o heteromérica de estas subunidades genera receptores con diferente afinidad por el AMPA y características electrofisiológicas y farmacológicas distintas (Bleakman y Lodge, 1998).

Los R-AMPA son permeables a Na^{+} y K^{+} y se les puede considerar impermeables al Ca^{2+} . Los canales recombinantes homoméricos o heteroméricos formados por las subunidades GluR1, GluR3 o GluR4 son

permeables a Ca^{++} , mientras que los ensamblados con al menos una subunidad GluR2, son prácticamente impermeables a Ca^{++} .

Receptor a KAINATO

Las subunidades que conforman al receptor para kainato (R-KA) son heterómeros proteicos formados por las subunidades: GluR5, GluR6 y GluR7, así como la KA1 y KA2 (Bleakman y Lodge, 1998). Las subunidades GluR5 y GluR6, se modifican por procesos postranscripcionales y cada una puede generar dos variantes: GluR5 (1 y 2) y GluR7 (a y b) (Dingledine y McBain, 1999).

La demostración de la existencia de receptores para aminoácidos excitadores y su participación en la transducción de señales en neuronas, ha contribuido de manera importante al estudio de la neurofisiología molecular. Varios estudios sugieren que un incremento en la neurotransmisión excitadora y la acumulación de Ca^{++} intracelular, pueden contribuir a una pérdida neuronal selectiva. Los aminoácidos excitatorios como el Glu son neurotóxicos, en altas concentraciones (Kure y col., 1991). La excitotoxicidad se asocia a diversos estados patológicos del SNC como la epilepsia, hipoxia/isquemia, trauma encefálico, así como padecimientos crónico-neurodegenerativos como: la enfermedad de Huntington, Alzheimer y Parkinson.

MECANISMOS CELULARES DE EXCITOTOXICIDAD

La excitotoxicidad se debe a la sobreactivación de los R-Glu, se ha descrito como un proceso de muerte celular que se caracteriza por la acumulación de altas concentraciones de Ca^{++} libre intracelular [Ca^{++}]_i, sobrepasando los mecanismos de regulación de alta afinidad como la bomba de Ca^{++} , lo que promueve la activación descontrolada de múltiples sistemas enzimáticos dependientes de Ca^{++} , así como diferentes cascadas de señalización que promueven el daño neuronal, como podría ser la lipoperoxidación (LP) de las membranas celulares (Mattson, 2000).

El daño celular por excitotoxicidad es un proceso de muerte, que puede ser necrótica, apoptótica o un continuo entre apoptosis y necrosis, que se relaciona con la estirpe y el tipo celular que se expone al daño, así como con la densidad de los R-Glu (Olney, 2003). Cada tipo de muerte neuronal presenta diferentes características tanto morfológicas como bioquímicas; la necrosis por ejemplo es causada por un evento traumático o tóxico, las células presentan hinchamiento debido a un desbalance osmótico, existe daño a los organelos incluyendo la mitocondria, todo esto conduce al rompimiento de la membrana y a la liberación del contenido celular provocando inflamación del tejido circundante (Ferrer y col., 2001; Olney 2003).

Por otro lado, la muerte celular apoptótica se ha identificado tanto en procesos fisiológicos como patológicos, ya que se presenta durante la maduración ontogenética y etapas posnatales de los organismos, así como cuando un tejido particular sufre un proceso daño. En este proceso la célula mantiene la integridad de su membrana (Evan G, 1998) hasta que se elimina por fagocitosis (Strange R, 1992). Debido a que la apoptosis requiere de la activación de genes específicos para que se lleve a cabo este tipo de muerte celular, también se le ha llamado muerte celular programada. Las características de este tipo de muerte celular son: cambios en la membrana plasmática (disminución del tamaño, aislamiento del resto de las células que la limitan, forma redondeada); en la mitocondria (aporta la ruta ejecutora de la apoptosis en un sitio de regulación mediante las proteínas de la familia Bcl2, producción de especies reactivas de oxígeno, liberación de citocromo c, abatimiento parcial del potencial transmembrana, formación del poro de transición por las proteínas de la familia Bcl-2); en el núcleo (aumento en la densidad de la cromatina que comienza formando parches alrededor de la envoltura nuclear y terminan dando lugar a una o varias esferas densas en las últimas etapas (cuerpos apoptóticos), los cambios iniciales se acompañan de una reducción del tamaño del núcleo y la fragmentación del ADN que es llevada a cabo por endonucleasas) (Martin y col., 1998).

La apoptosis involucra la activación de cascadas de señalización intracelular que modifican la transcripción génica. Una de las principales vías es la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK); esta es una vía muy utilizada por las células eucariontes para la transducción de señales extracelulares a respuestas intracelulares. Cada una de estas vías de señalización esta compuesta, por lo menos, por tres enzimas que son secuencialmente activadas por fosforilación, una MAPK cinasa cinasa (MAPKKK); una MAPK cinasa (MAPKK) y la MAPK propiamente dicha (Robinson y Cobb, 1997), de estas se han descrito 3 tipos que incluyen las cinasas reguladas por señal extracelular (ERK); las proteínas cinasas activadas por estrés (SAPK), las cuales se dividen en las cinasas c-jun NH₂-terminal (JNK/SAPK) y la vía p38 (p38/SAPK).

La actividad de estas enzimas se ha asociado a procesos como: la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (John y col., 2007). Una característica común de todos los grupos de MAPK es la fosforilación de residuos de treonina (Thr) y tirosina (Tyr). Además las MAPK presentan una secuencia de aminoácidos en el asa de activación de Thr-X-Tyr, en la cual el residuo X varia dependiendo de las diferentes MAPK's. El aminoácido X es un ácido glutámico (Glu), una prolina (Pro) y una glicina (Gly) para la ERK, JNK y p38, respectivamente.

La vía ERK es el primer grupo de las MAPK que se identificó en mamíferos, se activa por mitógenos y factores de crecimiento, regulan la proliferación celular y participan en respuesta a promotores tumorales y en el control del ciclo celular. La participación de la ERK/MAPK en el proceso de protección de la muerte neuronal se postula a través de la activación de proteínas anti-apoptóticas (Harper y LoGrasso 2001).

La vía JNK fue identificada originalmente como una proteína cinasa activada por estrés en respuesta a varios estímulos como: daño osmótico y radiaciones; modula la actividad transcripcional de c-Jun por fosforilación en residuos de serina y son codificadas por tres genes JNK1, JNK2 y JNK3 (Mielke y col.,1999).

La vía p38 se activa, al igual que la JNK, en respuesta a diversos tipos de estrés como el osmótico; es activada por lipopolisacáridos y por luz ultravioleta. Se conocen cuatro tipos de cinasas de p38 codificadas por diferentes genes; p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ ; los activadores directos de la p38 son: MKK6, MKK4, MKK3 Y MKK3-b, los cuales fosforilan p38 residuos de Thr y Tyr, en el asa de activación (Raingeaud y col., 1996).

La MAPK es una de las principales vías involucradas en el proceso de daño neuronal y como se mencionó anteriormente la activación de estas cascadas de señalización están directamente relacionadas con la regulación de la transcripción de genes que podrían estar modulando, tanto procesos de división, sobrevivencia o muerte celular. Entre los factores de transcripción que se ha probado son regulados por la activación de las MAPK están: c-fos (FB) oncogen homólogo de osteosarcoma viral murino), CREB (proteína de elemento de respuesta de unión a AMPc), que es un factor de transcripción de respuesta temprana, a su vez la fosforilación de CREB estimula la transcripción de genes importantes, como Fos y Jun. (Bozon y col., 2002)

ANTECEDENTES

MODELOS DE EXCITOTOXICIDAD

La muerte celular provocada por la sobreactivación de los (R-Glu) fue descrita, por Olney, como excitotoxicidad (Olney, 1969). La excitotoxicidad es un evento común en diversos estados patológicos del SNC entre los que se incluyen la hipoxia e isquemia cerebral, trauma encefálico así como padecimientos crónicos degenerativos como el Parkinson, Huntington y Alzheimer (Nishizawa, 2001).

Varios estudios sugieren que un incremento en la neurotransmisión excitadora y la acumulación de Ca^{++} intracelular, pueden contribuir a la pérdida neuronal selectiva. Los aminoácidos que regulan la respuesta excitadora en el SNC como el Glu en altas concentraciones son neurotóxicos. La excitotoxicidad se ha demostrado por la administración de análogos de Glu, como el ácido kaínico, el ácido quisquálico y el ácido domóico (Olney, 1990). La muerte celular excitotóxica se ha descrito como un proceso de daño necrótico, apoptótico (Olney, 2003), o como un continuo entre la necrosis y la apoptosis.

PROTEINAS CINASAS ACTIVADAS POR MITOGENOS

La muerte apoptótica involucra la activación de cascadas de señalización intracelular como las MAPK (Kawasaki y col., 1997; Cao y col., 2004). Las MAPK es una de las vías más utilizadas por las células eucariotas para la transducción de señales extracelulares a respuestas intracelulares (Herlaar y Brown, 1999). Entre algunas de las funciones de las MAPKs esta la regulación de la expresión génica, a través de la modulación de la actividad de diversos factores de transcripción ya sea por fosforilación y activación directa de dichos factores o a través de la regulación de su expresión (Su y Karin, 1996).

Los primeros estudios acerca de la participación de las vías de señalización intracelular MAPK en la muerte neuronal excitotóxica fueron realizados en condiciones *in vitro*, con la línea celular PC12, que fueron

tratadas con el factor de crecimiento nervioso (NGF) y expuestas al efecto de excitotoxicidad por Glu, los resultados mostraron una activación sostenida de la vía ERK y una inhibición de JNK/SAPK y p38/SAPK. (Kaplan y Miller, 2000; Kummer y col., 1997), reportaron que la vía p38/SAPK se activa en ausencia de NGF y que el tipo de muerte que mostraban las células correspondía a la muerte apoptótica, asimismo observaron que el inhibidor de la vía p38 (PD169316) presentó un efecto protector sobre la muerte neuronal (Kummer y col., en 1997).

En un estudio realizado por (Kawasaki y col., 1997 se evaluó la actividad de la vía p38 bajo condiciones de excitotoxicidad, en este trabajo se utilizaron cultivos de células granulares cerebelares, tratadas con glutamato monosódico (GMS), en este trabajo se observó un aumento de la actividad de p38, el cual se probó que era dependiente de Ca^{++} extracelular y además que su nivel de activación se correlaciona directamente con el número de células con características de muerte tipo apoptótica.

Otros estudios en cultivos de neuronas de hipocampo y de corteza cerebral han propuesto que gran parte de la muerte celular es mediada a través de la activación de los R-NMDA, los cuales regulan la entrada masiva de Ca^{++} (Choi, 1992).

Los primeros estudios de neurotoxicidad por Glu realizados en condiciones *in vivo* fueron en modelos de administración sistémica y de aplicación de agonistas glutamatérgicos, en donde se administraron dosis de Glu de 4 a 8 mg/g de peso corporal p.c, a ratones neonatos y adultos, y se observó que después del tratamiento, los roedores presentaron lesiones de tipo necrótica en la retina, además se mostró un incremento en las lesiones respecto a los adultos (Lucas y Newhouse., 1957). Olney en 1969 administró dosis de 0.5 hasta 4 mg/g de p.c. de GMS, por vía sistémica a ratones de 9 días de edad posnatal (e.p), y observó que después de 48 h existían lesiones caracterizadas por edema, necrosis neuronal y destrucción de las células del hipotálamo e hipocampo (Olney, 1969). Trabajos posteriores han demostrado el mismo proceso de daño celular a través de la administración

de GMS en diferentes especies de mamíferos como: ratas, conejos y primates (Olney, 1990).

Por otra parte, en un modelo de excitotoxicidad en donde se administran 4 dosis de GMS, en la etapa neonatal por vía subcutánea, se han observado células con características de daño de tipo apoptótico en el hipocampo, corteza cerebral y estriado (Lucas y Newhouse, 1957; Olney, 1990 Limin y col., 1998), así como modificaciones en la remodelación sináptica y dendrítica del hipocampo; procesos asociados a una reducción significativa en el peso corporal y cerebral, tanto en el desarrollo posnatal temprano como en la etapa adulta (Olney, 1969; Ureña-Guerrero y col., 2003; Beas-Zárate y col., 2002). Mientras que los estudios de biología molecular, en este mismo modelo, sugieren que la susceptibilidad a la excitotoxicidad es dependiente de la presencia y tipo de receptores a glutamato que se expresen en una edad y región específica, ya que se ha encontrado que el GMS, induce cambios en la expresión de las subunidades GluR5, GluR6, KA1 y KA2 de los R-KA, en diferentes regiones del cerebro (Beas Zárate y col., 2007). De igual forma se ha registrado un incremento en los niveles de expresión de las subunidades del receptor NMDA: NR1, NR2 A-D de ratas adultas (Beas-Zárate y col., 2001; Beas-Zárate y col., 2002; Rivera-Cervantes y col., 2008) y de NR1 en corteza cerebral e hipocampo de ratas de 8-14 días de e.p., lo anterior sugiere que los cambios en los niveles de expresión del RNAm y la proteína de las diferentes subunidades que constituyen los R-Glu, se asocian con los cambios morfológicos de daño celular inducidos por excitotoxicidad, sin embargo el papel funcional que se derivará de estas modificaciones moleculares, queda por dilucidar.

Así mismo, en un modelo de isquemia global se evaluó la expresión, activación y distribución de JNK/SAPK, p38/SAPK y ERK, en el hipocampo de gerbil a través del análisis de proteínas por western blot e inmunohistoquímica; los resultados obtenidos muestran la activación de JNK y p38 después de 15 min de la reperusión, en la región CA1 del hipocampo y, por otro lado se encontró un aumento de la activación de JNK y p38 en la región CA3 del hipocampo, que se mantuvo por 6 h, y se observó una

disminución gradual hasta las 72 h después de la reperusión. Además se evaluó el efecto del inhibidor de la vía p38, SB203580 y el inhibidor de la vía ERK, PD98059, se observó un efecto protector al administrar el inhibidor de la vía p38, a diferencia del inhibidor de ERK que no protege a las neuronas del hipocampo de la muerte celular, bajo el modelo de isquemia global en gerbos. Estos resultados indican que la vía p38 juega un papel fundamental durante el proceso de muerte apoptótica inducida por isquemia cerebral en gerbil (Sugino y col., 2000).

El daño celular por excitotoxicidad es un proceso de muerte que puede ser necrótica o apoptótica, o como un evento continuo entre la apoptosis y la necrosis que depende, de factores tales como: la intensidad del estímulo, así como la expresión diferencial de las subunidades de los R-Glu durante el desarrollo (Ankarkona y col., 1995; Portera-Cailliau y col., 1997).

Se ha sugerido que el daño neuronal inducido por la sobreactivación de los R-NMDA, esta determinado en principio por la entrada masiva de Ca^{++} a la célula a través de este canal-receptor. La relevancia de este fenómeno determina, entre otras cosas, un incremento en la concentración citoplasmática de Ca^{++} libre lo que está estrechamente relacionado con la activación de enzimas proteolíticas y lipolíticas, así como con alteraciones mitocondriales y por lo tanto en metabolismo energético; lo anterior resulta en la activación y ejecución de procesos de muerte neuronal (Gibbons y col., 1993).

La muerte celular de tipo apoptótica esta asociada a la activación de vías de señalización intracelular como son las MAPK (Bahr y col., 2002). Entre las funciones asociadas a la activación de la vía de las MAPK esta la transducción de señales desde la superficie celular al núcleo, particularmente la activación de estas conlleva a la regulación de la expresión de genes específicos que, en varios modelos experimentales de daño neuronal, cambian su patrón de expresión según el tipo y la intensidad del estímulo desencadenante (Schaeffer y Weber, 1999).

Así mismo, se ha demostrado la activación de la vía p38/SAPK a través del uso del inhibidor SB203580, en un modelo de excitotoxicidad en la corteza cerebral por la administración neonatal de GMS en ratas. En este trabajo se evaluó la presencia de ATF2 bifosforilado, sustrato específico de la vía p38, bajo condiciones excitotóxicas y después del pre tratamiento con el inhibidor, los resultados obtenidos sugirieron la participación de esta vía de señalización en el proceso excitotóxico, ya que se incrementaron los niveles de la proteína fosforilada con respecto al control; además la administración del inhibidor, previo al GMS, evitó la fosforilación de dicho sustrato (Rivera y col., 2004).

Por otro lado se observó muerte neuronal apoptótica en el cerebro de ratones adultos, después del tratamiento con ácido domoico. Se evaluó el perfil de expresión génica a través de la técnica de microarreglos, después de los 30, 60 y 240 min post-tratamiento, se observaron cambios significativos en la expresión de genes como Map3k6, Fos, Egr, Jun y MapK13 se evaluó la participación de las MAPKs en este proceso de daño excitotóxico, con un análogo de glutamato (Ryan y col., 2005).

Como previamente se ha dicho, la activación de las MAPKs modula la transcripción de genes específicos, entre ellos Fos y CREB. El producto del gen CREB parece estar implicado con la neuroprotección y en el establecimiento de diferentes formas de plasticidad sináptica que se asocian con el aprendizaje y la memoria (Kano y col., 1995). Cuando CREB se modifica por fosforilación se considera un tercer mensajero, una vez fosforilado, facilita el acople a la proteína de unión a CREB (CBP). El complejo CREB-CBP permite el ensamblaje con el elemento de respuesta a CREB (CRE); el cual se encuentra adosado directamente al ADN. En estas circunstancias actúan enzimas que inician la transcripción génica y la formación del RNA_m. El elemento transcripcional CREB al ensamblarse con el elemento CRE tiene la capacidad de activar genes de respuesta rápida (Arango, 2002). Entre los genes de la familia fos que son regulados por CREB a través de CRE están c-fos, Fra-1, Fra-2 y fos B; y de la familia Jun (c-Jun, Jun-B y Jun- D) la proteína Fos o la proteína Jun que resulta de la

transcripción de estos genes forma homodímeros (fos-fos o jun- jun) o heterodímeros (fos-jun), que forman parte de la estructura transcripcional denominada complejo activador de la proteína 1 (AP1) (Reith, 2001). El complejo AP-1, a su vez, tiene la capacidad de regular la transcripción de genes de expresión tardía (Reith, 2001).

Estos antecedentes muestran evidencias experimentales de eventos relacionados con la activación de las MAPK, que anteceden a la muerte neuronal por apoptosis.

Por lo anterior, en este trabajo se evaluó la participación de la vía de señalización MAPK, en un modelo de excitotoxicidad inducida por la administración subcutánea (s.c) a ratas neonatales de GMS, con el propósito de conocer la activación secuencial precisa de esta vía de señalización, bajo las condiciones de excitotoxicidad previamente descritas y en ausencia de eventos multifactoriales relacionados con otros procesos, como es el caso de modelos de isquemia e hipoxia cerebral.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La excitotoxicidad induce muerte celular apoptótica que involucra la activación de la vía de las MAPK, a su vez esta vía promueve la activación de factores de transcripción modulando la expresión de genes específicos. Diversos estudios muestra que bajo este fenómeno se modifican algunos de los componentes de esta vía de señalización. Por lo anterior se hace necesario evaluar la cascada de señalización de las MAPK, bajo condiciones de excitotoxicidad, en el SNC lo que nos permitirá proponer un esquema del proceso de daño celular que se establece en diferentes fenómenos patológicos, que tienen como componente principal la excitotoxicidad, así como establecer una relación de los genes involucrados en el proceso de muerte celular.

HIPÓTESIS

La sobre activación de receptores a glutamato, inducida por la administración de GMS en ratas neonatales, activa la vía MAPK modulando la expresión de factores de transcripción, que a su vez modifican la expresión de genes relacionados con el daño neuronal, tales como CREB y C- Fos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el perfil de expresión génica, en el hipocampo de ratas bajo el efecto del GMS, administrado por vía subcutánea en edad neonatal, y validar la expresión proteica de uno de los genes modificados bajo las condiciones de excitotoxicidad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I) Valorar el perfil de expresión génica en hipocampo de ratas tratadas con GMS, por medio de la técnica de microarreglos específicos para MAPK.
- II) Validar la expresión proteica, del factor de transcripción CREB a los 6 y 8 días e edad posnatal en el hipocampo de ratas, bajo el efecto del GMS.

DISEÑO EXPERIMENTAL

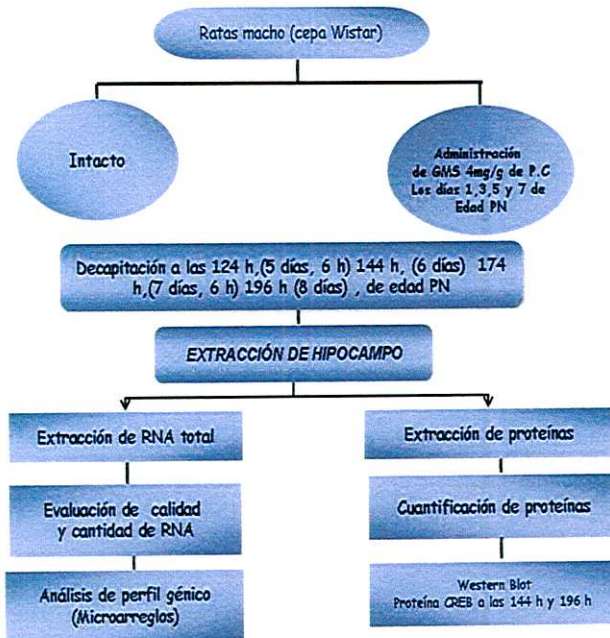


Figura 2 Diagrama general de trabajo en donde se muestran los diferentes grupos de estudio. La dosis de GMS que se utilizó fue de 4mg/g de p.

METODOLOGÍA

MATERIAL BIOLÓGICO Y TRATAMIENTOS

INTEGRACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

Se utilizaron ratas macho (*rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, recién nacidas. Las camadas se ajustaron a 8 animales por caja y se mantuvieron en condiciones de bioterio: ciclos luz-oscuridad 12X12h, temperatura de 22 +/- 2 °C y humedad relativa 50 +/- 4%. Las madres tuvieron libre acceso al agua y alimento comercial en pastilla para roedores, el aseo y las condiciones de cuidado, alimentación, limpieza, ventilación y tratamiento de animales de laboratorio fueron cuidadosamente observadas, de acuerdo con la Ley General de Salud (Leyes y códigos de México) para la protección de animales, NOM 064, 1999 ZOO, lo cual está de acuerdo con la guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de los animales de laboratorios de los Estados Unidos de América.

Durante y después del tratamiento, los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio hasta el día del sacrificio, se separaron en dos grupos, de acuerdo al diseño experimental de excitotoxicidad:

- *Control*: animales intactos
- *Experimental*: animales tratados con una dosis de GMS, 4mg/g de peso corporal, vía subcutánea los días 1, 3, 5 y 7 postnatales.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El cerebro se obtuvo por decapitación, a las 126, 144, 174, 196 h, de edad posnatal en condiciones de asepsia y se procedió a disecar el hipocampo. Los tejidos se mantuvieron a -80°C, en un ultra congelador marca REVCO (model UCT1386-3-A39), hasta el día del experimento.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLÉICO TOTAL

Para la extracción del RNA total se utilizó el kit (*PureLink Micro-to-Midi total RNA Purification System*, Invitrogen 12183-018). Se siguieron las indicaciones del kit. El kit se basa en la extracción y degradación de la estructura celular por medio del uso de tiocianato de guanidina y la extracción selectiva de RNA por medio de columnas. El hipocampo se

homogeneizó con la solución de lisis y 2-mercaptoetanol (M6250 SIGMA), posteriormente el homogenado se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf y se le adiciona un volumen 1:1 con etanol al 70%, el contenido se transfirió a las columnas y se centrifugó a 13,000 rpm por min, hasta colocar el amortiguador de lavado, por último el precipitado se colocó en 40 μ l de agua libre de RNAsas, se centrifugó por 3 min y se almacenó a -80°C .

DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DEL RNA

La determinación de la concentración del RNA por muestra, se evaluó por espectrofotometría, por medio de la absorbancia con la relación 260/280 nm, lo que permitió calcular la concentración de RNA en la muestra. Las preparaciones puras presentan valores entre 1.7 a 2.0, unidades de absorbancia.

La integridad del RNA se determinó a través del análisis de un gel de agarosa, el cual se preparó con 49 ml de agua y 0.55 g de agarosa, colocando 2 μ l de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml. En el análisis del gel se observaron tres bandas que corresponden a las subunidades del RNA ribosomal 28S y 18S, y al RNA de transferencia.

MICROARREGLOS

La RT-PCR es el método más sensible y confiable para el análisis de expresión génica. La "RT² Profiler PCR array" toma ventaja del funcionamiento de RT-PCR al combinarlo con la capacidad de la técnica de microarreglos para detectar la expresión de varios genes simultáneamente, el "RT² Profiler PCR arrays" está diseñado para analizar un panel de genes relacionados con un estado de enfermedad o vía biológica. La técnica inicia por la transcripción reversa de las muestras de RNA a cDNA, el modelo para la reacción en cadena de polimeraza, usando por el RT² PCR Array first strand kit fue el *GeArray Q Series Mouse MAP Kinase Signaling Pathways Genes Array*; (PCR Array Catolog #APRNI-06).

El servicio se realizó en Scientist (Manager Microarray Service core), SuperArray Bioscience Corporation ,7320 Exective Way, Suite 101. Frederick, MD 21704. A través de Probitex. (productos y equipos biotecnológicos) Xochitl # 120 col. Azteca San Nicolás de los Garza, N.L.Mexico c.p. 66480.

Resumen del método de rt² pcr array first strand kit.

Se aisló el RNA de las muestras: (5 ng de RNA total, aunque se recomienda hasta 1 mg, tratado con DNAsa).

Preparación de cDNAs a partir del RNA: usa un RT² PCR array first strand kit



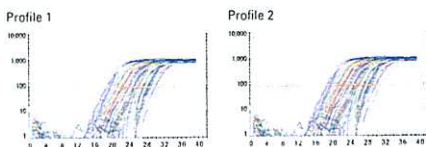
Se agregó cDNA a la mezcla de reacción para RT² real-time PCR:RT², la mezcla contiene SYBR green (PA011) y colorante de referencia



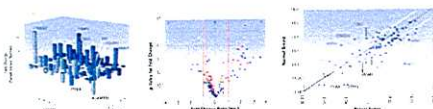
Se colocó una alicuota por pozo a la placa del microarreglos: cada arreglo de PCR perfila la expresión de 84 genes específicos de vías más controles



Se realizó el corrimiento del ciclaje para la amplificación:



Análisis de los cambios en la expresión génica:



Nota: Las muestras deben encontrarse bajo las normas de seguridad y pureza para RNA total.

1. Preparar la mezcla X.
 - a) Por cada muestra del RNA se combina lo siguiente en un tubo de PCR estéril.

RNA TOTAL	5.0 ng a 5.0 μ g
P2 (Primer & la mezcla del control externo)	1.0 μ l
H ₂ O libre de RNAsas, un volumen final	10.0 μ l

- b) Se mezclaron los volúmenes suavemente con un pipettor, seguido de una centrifugación breve.
- c) Se colocó la mezcla en el termociclador a 70° C por 3 min.
- d) Se enfrió la muestra por un minuto.

2. Preparación el cocktail RT

MEZCLA DE RACION RT	PARA 1 REACCION
BC(5X RT Buffer)	4µl
H2O libre RNAasas	4µl
RI (inhibidor RNasa)	1µl
G38 (RT Mezcla enzimática II)	1µl

3. Síntesis de cDNA:

- Se agregó 10µl del mezcla de reacción de RT a cada 10 µl de la mezcla X.
- Se mezcló suavemente y se incubó, a 37°C por 60 min.
- Se calentó a 95°C por 5 min. Para degradar el RNA e inactivar la transcriptasa reversa.
- Se agregó 91µl de ddH₂O a cada 20µl de la síntesis de reacción de cDNA. Mezclar bien.
- Se mantuvo el producto de la reacción de RT (cDNA) en hielo hasta la siguiente etapa o almacenarlo toda la noche a -20°C.

PREPARACION DEL MEZCLA EXPERIMENTAL PARA LA RT-PCR

Mezclar los siguientes componentes en un tubo de 5 ml

Mezcla principal 2X Super-Array PCR	1275 µl
Diluida la síntesis de reacción de cDNA	102 µl
ddH ₂ O	1173 µl
Volúmen total	2550 µl

PROCESO DE LA RT-PCR

Se utilizó un programa de ciclaje de dos etapas.

CICLOS	DURACION	TEMPERATURA
1	10 minutos ¹	95° C
40	15 segundos	95° C
	1 minuto ²	60° C

1.- La etapa de 10 min. A 95 °C se requirió para activar la Hot Start DNA polimerasa.

2.-Se detectó y registró la fluorescencia SYBR GREEN de cada pozo, durante cada ciclo.

e.-Se calculó el ciclo umbral (Ct) para cada pozo usando el software del instrumento. Se exportan los resultados del valor del ciclo umbral para todos los pozos al banco de Excel y se utilizó un sistema de análisis, *DATA Template Excel File*.

ANÁLISIS DE DATOS: DEL MÉTODO $\Delta\Delta Ct$

El análisis de datos por EXCEL-based PCR-Array, automáticamente realiza los siguientes cálculos e interpretación de los resultados de los pozos control, incluyendo una lista de genes y datos del ciclo umbral del instrumento de amplificación en tiempo real. Este DATA ANALYSIS Template presenta los resultados en un formato tabular, un lote disperso, un perfil tridimensional (cuando los duplicados están incluidos).

1. Cuando el valor de Ct reportado es mayor que 35 se consideró positivo. Mientras que cuando este valor de Ct es igual a 35 es considerado negativo.
2. Se examinarán los valores del ciclo umbral de los pozos control.
A) Control del DNA genómico (GDC):
Calcular $\Delta Ct = Ct^{GDC} - Ct^{AVG\ HKG}$ o $(Ct^{H6} - \text{promedio } (Ct^{H1,H2,H3,H4,H5}))$.
Si el valor es mayor que 10, entonces el nivel de contaminación de DNA es bastante bajo, lo que no afecta el resultado del perfil de expresión de genes.
Si el valor es menor a 10 entonces la contaminación del DNA es evidente.

TECNICA DE WESTEN BLOT

Evaluación de los niveles de expresión de la proteína CREB a través de la técnica de Westen Blot.

Ratas macho de la cepa Wistar, se sacrificaron a las 144 h y 196 h de e.p; el hipocampo fue rápidamente removido y congelado a -80°C . El tejido se sometió a homogenización por sonicación a una frecuencia de 39 Watts en el sonicador (Sonics Vibra-Cell Model CV188 # de serie 6696) en buffer de lisis: 920 μl de regulador lisis 10 mM (Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 0.5 mM orthovanadato de sodio, 2 mM pirofosfato de sodio) + 80 μl de un coctel de inhibidor de proteasas (1 tableta "complete" (1697498-Roche) en 2 ml H_2O) en hielo. Las muestras se incubaron en hielo por 30 min y se centrifugaron a 13,000 rpm por 30 min a 4°C . La concentración de proteínas se estimó siguiendo el método de Lowry (1951), usando suero de albúmina de bovino como marcador. 50 μg de proteína, de cada muestra, tanto de animales controles como experimentales, se separaron por electroforesis en un gel de SDS-polyacrylamida al 10% y se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueo con leche libre de grasa [10% (Svelty)] en Amortiguador-Tris salino (BTS) con 0.25% Tween-20 por 24 h. La membrana se incubó utilizado como anticuerpo primario CREB IgG (238466 Calbichen) phosphodetect (pSER¹³³) en una dilución 1:500 (AB5166-Chemicon) por 24 h, hecho en conejo y dirigido a rata, para determinar los niveles de expresión de la proteína Creb. Después se realizaron 5 lavados en amortiguador tris salino con 0.05% Tween-20 (BTTS), las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario: biotinylated, hecho en cabra, anti-conejo IgG 1:1000 (BA1000-Vector Laboratories) por 24 h. Después se realizaron lavados con BTTS, las membranas se incubaron con el complejo avidina biotina -ABC Elite kit (PK6101- Vector Laboratories) por 1 h. Después se realizaron tres lavados con BTTS, para ser revelados con diaminobenzidina (D5905-Sigma Chemical); la "n" experimental para este análisis fue de 3. El análisis se realizó tomando una fotografía digital de la membrana y se utilizó un sistema de foto documentación, (programa Quantity one 4.6.2.) Kodak Digital Science 1D Image Analysis.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba T student, se consideraron las diferencias estadísticamente significativas con un valor de "p" <0.05.

RESULTADOS

EXPRESIÓN DE GENES POR MICROARREGLOS

Los resultados muestran que el tratamiento con Glu a ratas neonatas modificó de manera significativa la expresión de diversos genes involucrados con el proceso de muerte neuronal, en el hipocampo de ratas en todas las edades evaluadas (126, 144, 174 y 192 h, de e.p). En la Tabla 1 incluida en el apendice 1 se muestran todos los genes que componen el microarreglo específico, utilizado en este estudio, para MAPK.

De los 89 genes que comprende el microarreglo se encontraron significativamente modificados en su expresión 36 genes que representan el 40.4% del total de genes evaluados en el estudio

Perfil de Expresión Génica

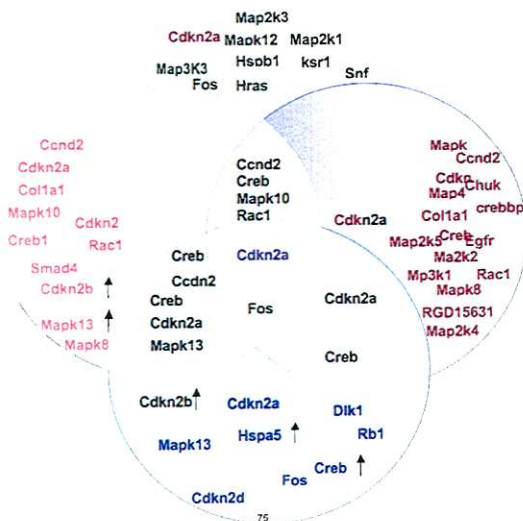


Figura 3 El diagrama de Venn muestra los genes modificados significativamente tanto a la alta y a la baja, asociados con activación la vía MAPK en el hipocampo de ratas neonatales tratadas con GMS. Se muestran los 4 conjuntos correspondientes a los tiempos evaluados que corresponden a 126, 144, 174 y 192 h, así mismo los conjuntos muestran las intersecciones y combinaciones en los niveles de expresión de estos grupos evaluados.

En el diagrama de Venn se muestran cuatro conjuntos que corresponden a las diferentes horas evaluadas de esta manera se puede observar que 10 genes se modificarán en los animales de 126 h de edad posnatal (Cdkn2a, Fos, Hras, Hspb1, Ksr1_predicted, Map2k1, Map2k3, Snf_predicted, Mapk12, Map3k3). Todos estos genes resultaron disminuidos en su expresión, por efecto del GMS, con respecto al control. A las 144 h encontramos menor expresión de 17 genes (Ccd2, Cdkn2a, Chuk_predicted, Col1a1, Creb1, Crebbp, Egfr, Map2k2, Map2k4, Map2k5, Map3k1, Map4k1_predicted, Mapk10, Mapk8ip, Pak1, Rac1, RGD1563119_predicted), en los hipocampos de las ratas con GMS, al compararlos con el grupo control. Mientras que, a las 174 h de e.p.,

encontramos también disminuidos en su expresión 9 genes (Cdkn2a, Cdkn2d, Dik1, Fos y Mapk13) y 5 se modificaron a la alta (Ccnd2, Creb1, Hspa5, Rb1), en el grupo de GMS con respecto al control. Por último, la expresión de genes en animales de 196 h de edad posnatal, se modificó por efecto de la administración de GMS, tanto a la alta como a la baja: se encontró que los genes smad4, Ccnd2, Cdkn2a, Col1a1, Creb1, Mapk10, Mapk8, Rac; disminuyen en su expresión, mientras que Cdkn2b y Mapk13 incrementa de forma estadísticamente significativa con respecto al control.

PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA

Tabla 2 Resumen del porcentaje de genes modificados, en las diferentes horas de edad posnatal evaluadas.

PORCENTAJE DE GENES MODIFICADOS				
	126 horas	144 horas	174 horas	196 horas
% EXPRESIÓN DE GENES A LA ALTA	24.72%	14.60%	70.80%	28.08%
% DE EXPRESIÓN DE GENES A LA BAJA	75.28%	85.4%	29.2%	71.92%

PERFIL GENERAL DE LA EXPRESIÓN DE LAS MAPK

Tabla 3 Se muestran los genes modificados significativamente, y el nivel que ocupan en los diferentes componentes de la cascada de señalización MAPK.

COMPONENTE DENTRO DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN	CLASIFICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN POR MAPK		
	Genes modificados de la vía		
	ERK	JNK	p38
MAPKKK	<i>Raf1</i> <i>Map2k1</i>	<i>Rac1</i> <i>Map4k1</i> <i>Map3k1</i> <i>Map3k3</i>	<i>Map2k1</i>
MAPKK	<i>Map2k2</i>	<i>Map2k4</i> <i>Mapk8ip</i>	
MAPK		<i>Mapk8</i>	RDG1563119 <i>Mapk13</i>
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	<i>Creb</i> <i>Fos</i>	<i>Egfr1</i> <i>Creb1</i>	<i>Creb</i>

ANÁLISIS DE WESTERN BLOT PARA LA PROTEÍNA CREB

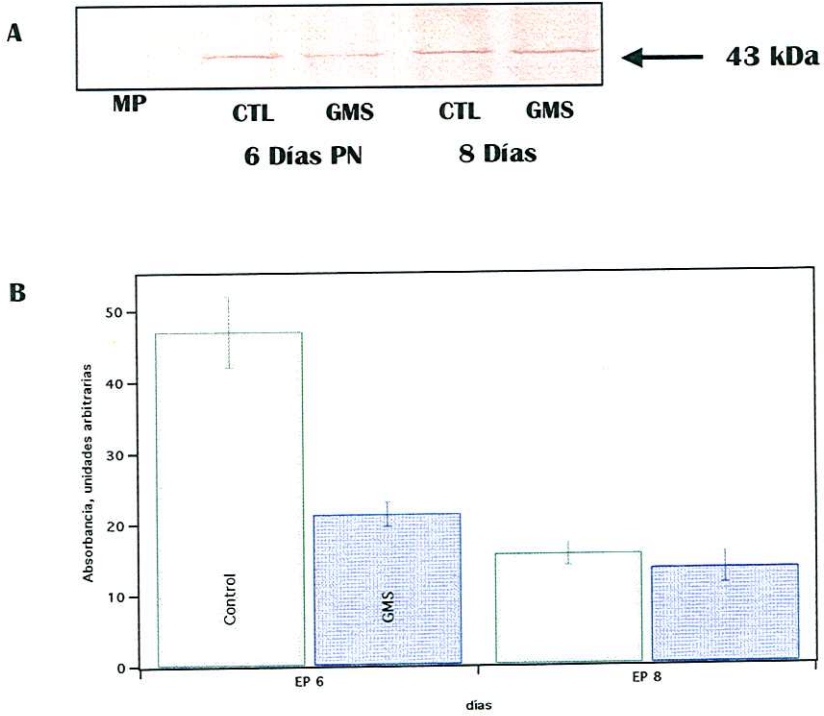


Figura 4 Grafica que muestra los niveles de expresión de la proteína CREB en el hipocampo de ratas tratadas con GMS. El panel (A) muestra la expresión de CREB por western blota los 6 y 8 días. El panel (B) muestra el promedio \pm desviación estandar de tres experimentos por duplicado de grupos controles como experimentales a los 6 y 8 días de edad posnatal. $p < .05$ control vs GMS.

DISCUSIÓN

La excitotoxicidad inducida por GMS se debe a la sobreactivación de los receptores a Glu, que provoca muerte de tipo necrótica (Ferrer y col., 1995) y apoptótica (Ankarkona y col., 1996); estos procesos están involucrados en diversos padecimientos crónico neurodegenerativos como el Alzheimer, Huntington y Parkinson (Nishizawa, 2001).

Durante el proceso de muerte celular apoptótica se activan diversas vías de señalización, una de ellas la de las Mapk (Chaparro-Huerta y col., 2008). Promueven la activación de factores de transcripción, que modulan este proceso.

Los resultados de este trabajo indican que durante la excitotoxicidad, mediada por Glu, se activa la vía de señalización de las Mapk presentando una participación importante la vía la familia de las proteínas JNK, ya que el análisis de microrreglos muestra cambios en diversos componentes de esta vía de señalización, lo que indica que la vía JNK esta contribuyendo de manera relevante en el proceso de muerte neuronal. En otros trabajos se ha demostrado que la estimulación de JNK induce diferentes eventos pro-apoptóticos (Yang y col., 1997).

Además algunos estudios como el realizado por (Kawasaki y col., 1997) muestra la participación de la vía p38 en condiciones de excitotoxicidad con GMS en células granulares cerebelares en cultivo. En nuestro grupo de trabajo se llevó a cabo un estudio que confirma la activación de la vía p38 bajo condiciones de excitotoxicidad inducida por la aplicación de GMS, en ratas de edad neonatal, a través del análisis por western blot de la proteína ATF2 bifosforilada (ATF2^{PP}), sustrato de esta vía; además se administró un inhibidor específico para p38, el SB203580, antes del tratamiento con GMS; con el cual se observó una menor expresión de ATF2^{PP} (Rivera y col., 2004). El papel de la vía JNK y p38 aún es controversial, (Xia y col.,1995) demostraron que la activación de JNK y p38, así como la inhibición de la vía ERK, son críticas en la inducción de la apoptosis en células PC12 (Xia y col., 1995). La ausencia de apoptosis neuronal después del tratamiento con ácido kaínico ha sido reportada en ratones knock out para la vía JNK3 (Yang y col., 1997), estos datos se

correlacionan con diversos modelos de isquemia e hipoxia en los que se hace evidente la participación de esta vía de señalización en los procesos de muerte por apoptosis (Beilharz, 1995; Sugino y col., 2000). (Olney, 2003) utilizó un modelo de hipoxia/isquemia, mediante la oclusión unilateral de la arteria carótida, seguida de un periodo global de hipoxia, en ratas de 7 días de EP, con el propósito de evaluar el tipo de muerte neuronal y de encontrar una relación entre la excitotoxicidad y la apoptosis, este trabajo demuestra que el mecanismo inicial de daño en el proceso de neurodegeneración presenta características de daño celular excitotóxico, y sugiere que esto conlleva a la activación de diversas vías de señalización, como las Mapk, a través de la modificación en la expresión de diferentes componentes de esta vía. Se ha determinado en diversos modelos de isquemia que los niveles de Glu se elevan bajo esta condición, lo que induce la sobreactivación de R-Glu, estableciéndose los mecanismos celulares del daño excitotóxico. Otro estudio que confirma la relación entre la activación de las MAPK con la muerte celular en el SNC, demuestra la activación de la vía JNK y p38, 15 minutos pos-isquemia en la región CA1 y CA3 del hipocampo y relaciona este evento previo a la muerte celular en estas regiones (Sugino y col., 2000).

También se ha observado concordancia entre la respuesta transcripcional inducida por Glu y los datos en la literatura respecto a la expresión génica en modelos de isquemia-reperfusión. Además, en un estudio se compararon los cambios en la expresión de 8000 genes a las 24 h después del shock isquémico, hemorragia intracerebral, crisis por kainato, hipoglucemia e hipoxia en la rata y demostraron que la mayoría de los genes que se modificaron en el modelo de isquemia, también se encuentran en el modelo de crisis inducidas por kainato, lo cual establece una relación, por lo menos de tipo molecular en los procesos de daño celular establecidos en ambos modelos (Tang y col., 2002).

Las modificaciones en la expresión de los genes evaluados en un modelo de excitotoxicidad por DA y en uno de isquemia se caracterizan por la respuesta de las familias de factores de transcripción tales como Fos, Egr y Creb, (Ryan y col., 2005) estos datos concuerdan con lo reportado en el

presente trabajo en donde se observa en particular un incremento significativo en la expresión de *creb*.

En un estudio de microarreglos se mostró que 25 de 6000 genes evaluados disminuyen su expresión en el hipocampo de ratones después de la isquemia-reperfusión; se han reportado coincidentes en la disminución en la expresión de algunos de estos genes, como *c-fos*, *Egfr*, tanto en modelos de isquemia (Nagata y col 2004) como de excitotoxicidad por DA (Ryan y col., 2005). y por *Glu* en el presente trabajo; a pesar de que el estudio de Ryan se llevó a cabo en el cerebro completo, mientras que el de Nagata únicamente en el hipocampo.

Por otra parte, en modelos de isquemia se han identificado modificaciones a la alta en la expresión de genes, que pertenecen a la familia de las proteínas de shock térmico (*hsp*), como el *Hsp70* y de *Hspb1* (Nagata y col., 2004); el papel de *Hspb1* aún no es completamente claro, sin embargo esta relacionada con respuesta al estrés celular.

En estudios de excitotoxicidad con kainato se ha reportado la sobre expresión de *Hsps*, otro miembro de la familia *hsp*; y la disminución de este mismo gen en respuesta a la intoxicación por AD, en el cerebro de ratones (Ryan y col., 2005). En el presente trabajo la condición de intoxicación por GMS en etapa neonatal, induce una disminución significativa en la expresión de genes como *hspb1*. El producto de la expresión de este gen se relaciona con la respuesta al estrés celular, sin embargo sería necesario evaluar los niveles de proteínas codificadas por estos genes, para valorar el papel que desempeñan en el proceso de daño, ya que en este trabajo solo se evaluó la expresión del gen.

Los genes de respuesta temprana (GRT), modificados tras la activación de los miembros de la familia de la MAPK, presentan un patrón diferencial de expresión en el SNC en función de los estímulos inductores y de las estructuras implicadas. Procesos patológicos como las crisis epilépticas, la isquemia cerebral y los traumatismos cerebrales causan la inducción de los GRT (Hunghe y Dragunow, 1995).

En el análisis de microarreglos se encontraron modificaciones en los niveles de expresión de diferentes GRT, particularmente aquellos asociados a funciones reguladoras de la transcripción, por ejemplo se encontró que la administración de GMS modifica la expresión de c-fos, un factor de transcripción el cual participa, entre otras cosas, en la regulación del ciclo celular, además está implicado en el desarrollo y plasticidad neuronal (Bozon y col., 2002). Algunos estudios muestran que la estimulación de los R-Glu induce la activación y modificación de c-fos (Bozon y col., 2002). En otros trabajos se ha encontrado que la expresión de c-fos depende de un incremento en la concentración de calcio libre, a través de la activación de vías de señalización, entre ellas las MAPKs (Peng y Ramsdell, 1996). Además en el trabajo de Ryan del 2005, el tratamiento con ácido domoico induce la sobre-expresión de c-fos, en el cerebro completo de ratones adultos (Ryan y col., 2005); mientras que en el presente estudio la expresión de c-fos disminuye. Las diferencias encontradas entre ambos modelos de excitotoxicidad podrían deberse a que la evaluación de los niveles de expresión de los genes es a diferentes tiempos de inducido el proceso de daño, de igual manera sería necesario valorar los niveles de la proteína para c-fos, para identificar el posible papel que desempeña este factor, en el proceso de daño neuronal.

Por otro lado Creb es un factor de transcripción que pertenece a la familia CREB/ATF. Creb es responsable de la regulación de la transcripción de genes como c-fos y c-jun, las proteínas fos y jun resultantes, forman heterodímeros que constituyen un complejo regulador transcripcional, denominado AP-1 (activador de la proteína 1) (Reith, 2001). El complejo AP-1, a su vez, regula la expresión de genes de respuesta tardía importantes en la determinación del destino de las neuronas bajo condiciones de excitotoxicidad (Behrens y col., 1999), eventos celulares facilitados bajo esta condición como es el incremento en los niveles de AMPc y de Ca⁺⁺ intracelular facilitan la activación por fosforilación de Creb, y esto se ha asociado a la activación de la vía JNK, p38 y ERK (Mayer, 2008). El GMS

aplicado en la etapa neonatal indujo la disminución en la expresión del gen Creb a las 144 y 196 h, y un aumento a las 174 h de e.p. Entre los genes regulados por Creb, están los que constituyen el factor de transcripción AP1 (c-fos y c-jun), por lo que la fosforilación de Creb, activa genes de expresión rápida y, como consecuencia genes de expresión tardía que, entre algunos de ellos, están factores tróficos como el factor nervioso derivado del cerebro (BDNF) y el Factor 2 de crecimiento fibroblástico (FGF2), los cuales promueven la sobrevivencia de neuronas y glia, estimulan la neurogénesis e intervienen en la remodelación de las espinas dendríticas (Reith, 2001).

CREB regula algunos aspectos entre los que se incluyen excitación neuronal (Moore y col., 1996) desarrollo (Imaki y col., 1994) y plasticidad sináptica a largo plazo (Silva y col., 1998). Evidencias recientes sugieren que CREB también podría estar implicado en procesos de neuroprotección, y por lo tanto explica la vulnerabilidad selectiva del hipocampo a la lesión cerebral (West y col., 2002). Las áreas del hipocampo muestran distintas formas de muerte celular en respuesta al tipo de daño inducido, en particular después de crisis prolongadas y episodios hipóxico/isquémico las células piramidales de la región CA1, sufren apoptosis después de estos tipos de daño, mientras que las células del giro dentado permanecen resistentes al daño (Hungnes P, Dragunow y col., 1995).

CONCLUSIÓN

La administración de GMS modifica el perfil de expresión de genes asociados, con la activación de MAPK tales como Fos, Cdkn2a, Egfr; estos cambios son muy similares a los observados en modelos de intoxicación con ácido domoico y de daño cerebral por isquemia-reperfusión. Entre los genes modificados bajo el efecto del GMS, se encuentran algunos implicados en la regulación del ciclo y daño celular, eventos que constituyen componentes esenciales de procesos fisiológicos como plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria.

BIBLIOGRAFÍA

Ankarkona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. (1995). Glutamate induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 15:961-973

Ankarkona M, Zhivotovsky B, Holmstrom T. (1996). Lamin and beta-tubulin fragmentation precedes chromatin degradation in glutamate induced neural apoptosis. *Neuroreport* 7:2659-2664.

Arango C, Gomez-Restrepo C, Hernández G, Rojas A, Santacruz H, Uribe M. (2002). Aspectos moleculares y funcionales de los receptores, los neurotransmisores, los neuromoduladores y las hormonas. In *Fundamentos de psiquiatría clínica: niños, adolescentes y adultos*. Gomez-Restrepo C, Hernandez G, Rojas A, Santacruz, Uribe M, Editoris. Bogota: *Centro Editorial Javeriano (CEJA)* 45-59.

Bahr B, Bendiske J, Brow B, Munirathinam S, Caba E, Udin M, Urwyler S, Sauter A, Rogers G. (2002). Survival signaling and selective neuroprotection through glutamatergic transmission. *Experimental Neurol*. 174:37-47

Beas-Zárate C, Rivera-Huizar SV, Martínez-Contreras A, Fera-Velasco A, Armendariz-Borunda J. (2001). Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. *Neurochemistry*. 20:1-10

Beas-Zárate C, Pérez-Vega M, González-Burgos I. (2002). Neonatal exposure to monosodium L-glutamate induces loss of neurons and cytoarchitectural alterations in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats. *Brain Res* 952: 275-281

Beas-Zárate C, Ureña-Guerrero ME, Flores-Soto M, Armendariz-Borunda J, Ortuño-Sahagún D. (2007). The expression and binding of kainate receptors is modified in different brain regions by glutamate neurotoxicity during postnatal rat development. *Neurosci* 25:53-61

Behrens MM, Strasser U, Koh JY, Gway BJ, Choi DW. (1999). Prevention of neuronal apoptosis by phorbol ester induced activation of protein kinase C: blockade of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience* 94:917-27.

Beilharz J Erika, Williams E. Chris, Dragunow Mike, Sirimanne S Ernest, Gluckman D Peter. (1995). Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Brain Res Mol Brain Res*. 29:1-14

Bleakman D, Lodge D. (1998). Neuropharmacology of AMPA and Kainate receptors. *Neuropharmacology* 37:1187-204.

Bozon B, Davis S, Laroche S (2002) Regulated transcription of the immediate-early gene *Zif268*: mechanisms and gene dosage-dependent function in synaptic and memory formation. *Hippocampus* 12:570-577.

Cao Jiong, Semenova M. Maria, Solovyan T. Victor, Han Jiahuai, Coffey T. Eleanor, Courtney J. Michael. (2004). Disting requirements for p38 α and c-jun N-terminal Kinase Stress-activated protein kinase in differrent forms of apoptotic neuronal death. *J. Biol. Chem* 279:35903-13

Chaparro-Huerta V, Flores-Soto ME, Gudiño-Cabrera G, Rivera-Cervantes MC, Bitzer-Quintero OK, Beas-Zárate C. (2008). Role of p38 MAPK and pro-inflammatory cytokines expresión in glutamate induced neuronal death of neonatal rats. *Int. J. Dev. Neurosci* 5:487-495.

Choi DW. (1992). Excitotoxic cell death. *Journal Neurobiological* 23:1261-76

Choi DW. (1995). Calcium: Still center satge in hypoxic-isquemic neuronal death. *Trends Neurociencia* 18: 58-60

Dingledine R, McBain CJ. (1999). Glutamate and aspartate .En: *Neurochemistry* Editores: Siegel JG, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. pp315-333 Lippincott-Raven Press, PH.

Evan G, Littlewood T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* 1317-1322.

Ferrer I, Martin, Serrano, T, Reiriz, J, Perez-Navarro, E, Alberch J, Mayaca, A, Planas, A. (1995). Both apoptosis and necrosis occur followin intrastrial administration of excitotoxins. *Acta Neurophatol* 90:504-510.

Ferrer I, Blanco R, Carmona M. (2001). Differential expretion of active, phosphorylation-depent MAPkinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates following quinolic acid exitotoxicity in the rat. *Molecular Brain Reserch*. 34:48-58.

Gibbons SJ, Brorson, J.R., Bleackman, D., Cards, P. S. and Miller, R. J. (1993). Calcium influx and neuronal degeneration. *Science* 679:22-33.

Harper SJ, LoGrasso P. (2001). Signalling for survival death in neurons. The role of stress-activated kinases , JNK and p38. *Cell signal* 5:299-310.

Herlaar E, Brown Z. (1999). p38 MAPK signaling cascades in inflammatory disease. *Molecular Medicine Today* 10:439-447

Hunghes P, Dragunow M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system *Pharmacol Rev*. 133-178.

Imaki J, Yoshida K, Yamashita K. (1994). A developmental study of cicycAMP-response element bindig protein (CREB) by in situ hybridation histochemistry and immunocytochemistry in the ratneocortex. *Brain Res*. 651:269-74.

Irving Elaine , Bamford. (2002). Role of Mitogen-and Stress-Activated Kinases in ischemic Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 22:631-647.

Wang, Q. John, Fibuch E. Eugene, Mao Limin. (2007). Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *Journal of Neurochemistry*, 100:1-11.

- Kandel E, Stegelbaum S, Overview of synaptic transmission principles of neural science. Editors: Kandel E, Schwartz J, Jessell T. pp. 175-183 U.S.A Mc Graw-hill 2000.
- Kano T, Suzuki Y, Shibuya M, Kiuchi K, Hagiwara M.(1995). Cocaine-induced CREB phosphorylation and C-fos expression are suppressed in parkinsonism model mice . *Neuroreport*16:2197-2000.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiology* 3: 381-391.
- Kawasaki H., Morooka t., Shimohama S., Kimura J., Hirano T., C.,Gotoh Y., Nishida E. (1997). Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *The Journal of Biological Chemistry*.272:18518-18521.
- Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA (1997) Apoptosis induced by withdrawal of tropic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase *J. Biolo Chem* 272:20490-200494.
- Kure S, Tominaga T, Tada K, Narisawa K. (1991). Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. *Biochem Biophys*.179: 39-45.
- Limin , Fernstrom JD, Goldsmith PC. (1998). Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injure in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. *Neuroendocrinology*. 68: 77-83
- Lucas DR, Newhouse JP. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Archives of ophthalmology* .58:193-201
- Martin JL Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kisch JR, Sieberand FE, Portera-Cailliau C. (1998). Neurodegeneration in excitotoxicidad, global cerebral ischemia, and target deprivation:a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 281-309.
- Mattson, M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Cell Biol*, 1:120-129.
- Mayer SI, Willars GB, Nishida E, Thiel G. (2008). Elk-1, CREB, and MKP-1 regulate Egr-1 expression in gonadotropin-releasing hormone stimulated gonadotrophs. *J Cell Biochem. (Epub ahead of print)*
- Mielke K, Damm A,Yang DD, Herdegen T.(1999). Selective expression of JNK isoforms and stress-specific JNK activity in diferent neural cell lines. *Molecular Brain Reserch* 91:128-137.
- Moore AN, Waxham MN, Dash PR. (1996). Neuronal activity increases the phosphorilation of the transvription factor cAMP response element-binding protein (Creb) in rat hippocampus and cortex . *J. Biol. Chem* 271:14214-20.
- Nagata T, Takahashi Y, Sugahara M, Murata A, NishidaY, IshikawaK, Asai S (2004) Profiling of genesassociated with transcriptional responses in mouse. hippocampus after. *Brain Res Mol Brain Res* 121:1-11

- Nakanishi S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
- Nishizawa Y. (2001) Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life science* 385:369-381
- Olney JW. (1969). Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721
- Olney JW. (1990). Excitotoxin-mediated neuron death in youth and old age. *Prog Brain Reserch* 86:37-51.
- Olney JW. (2003). Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Current Opin Pharmacol.* 3:101-109
- Peng YG, Ramsdell JS (1996) Brain Fos induction is a sensitive biomarker for the lowest observed neuroexcitatory effects of domoic acid. *Fundam Appl Toxicol* 31:162-168.
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. (1997). Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *Journal of comparative neurology* 378: 70-87.
- Raingeud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1996) MKK3-and MKK6- regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 3:1247-1255
- Reith M. (2001). Cerebral Signal transduction: from first to fourth messengers. *Human Press* 292.
- Rivera-Cervantes MC, Segura-Torres J, Feria-Velasco A, Armendáriz-Borunda J, Beas-Zarate C. (2004). NMDA and AMPA Receptor Expression and Cortical Neuronal Death Are Associated With p38 in glutamate-Induced Excitotoxicity in vivo. *Journal of Neuroscience Research* 76:678-687.
- Rivera-Cervantes MC, Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Reyes-Gómez J, Feria-Velasco A, Schliebs R, Beas-Zárate C. (2008). Changes in hippocampal NMDA-R subunit composition induced by exposure of neonatal rats to l-glutamate. *Int.J.Dev. Neurosci* Epub ahead of print.
- Robinson MJ, Cobb M. (1997). Mitogen- activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biology.* 9:180-186.
- Rodríguez A., Lopez M. (1997) Características farmacológicas de las subunidades de los receptores de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). *Salud Mental.* 20:39-47.
- Ryan J. C., Morey J.S., Ramsdell., Van Dolah F.M. (2005). Acute phase gene expression in mice exposed to the marine neurotoxin domoic acid. *Neuroscience* 136:1121-1132.

Schaeffer, H.J. and Weber, M.J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 36:2435-2444.

Strange R, Feng L, Saurer S, Burkhardt A, Friis R. (2002). Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development* 22:49-58

Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-48.

Su B, Karin M. (1996). Mitogen- activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Current Opinion in immunology* 402-411.

Sugino T., Nosaki N., Takagi Y., Hattori I., Hashimoto N., Moriguchi T., Nishida E. (2000). Activation of mitogen-activated protein kinases alter transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *The Journal Neuroscience* 20:4506-4514.

Tang Y, Lu A, Aronow BJ, wagner KR, Sharp FR. (2000). Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia. *Eur J Neurosci* 20:1937-1952.

Ureña- Guerrero Mónica Elisa, López-Pérez Silvia Josefina , Beas-Zarate Carlos .(2002). Neonatal monosodium glutamate treatment modifies glutamic acid decarboxylase activity during rat brain postnatal development. *Neurochemistry International* 42:269-276.

West- E. Anne, Griffith and Michael E. Greenberg (2002). Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nature reviews, Neuroscience* vol 3 921-930.

Xia, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. (1995) opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis *Science* 270:1326-1331.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh J, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389:865-870

APENDICES

Apéndice 1.- TABLA 1

TOTAL DE GENES QUE COMPONEN EL MICROARREGLO

B09	Rn.185816	NM_001009719	Cdkn2d	Similar to cyclin-dependent kinase inhibitor 2D	MGC109660
B10	Rn.23019	XM_219857	Chuk_predicted	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase (predicted)	LOC309361
B11	Rn.2953	XM_213440	Col1a1	Procollagen, type 1, alpha 1	COL1A1
B12	Rn.90061	NM_031017	Creb1	CAMP responsive element binding protein 1	Creb
C01	Rn.108128	NM_133381	Crebbp	CREB binding protein	CBP/RSTS
C02	Rn.14547	NM_053744	Dlk1	Delta-like 1 homolog (Drosophila)	Pref-1/Zog
C03	Rn.72471	XM_230765	E2f1	E2F transcription factor 1	LOC296297
C04	Rn.37227	NM_031507	Egfr	Epidermal growth factor receptor	ERBB1/ErbB-1
C05	Rn.9096	NM_012551	Egr1	Early growth response 1	Krox-24/NGF1-A
C06	Rn.88756	NM_012555	Ets1	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	Ets-1/Ets onc
C07	Rn.164554	XM_239510	Ets2	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian) (mapped)	Ets2
C08	Rn.103750	NM_022197	Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	c-fos
C09	Rn.3360	NM_030846	Grb2	Growth factor receptor bound protein 2	MGC108668
C10	Rn.102180	XM_001062236	Hras	Harvey rat sarcoma viral (v-Ha-ras) oncogene homolog	HRAS1/c-H-ras
C11	Rn.11088	NM_013083	Hspa5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein)	BIP
C12	Rn.3841	NM_031970	Hspb1	Heat shock 27kDa protein 1	Hsp25/Hsp27
B08	Rn.63865	NM_131902	Cdkn2c	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	p18

E05	Rn.66100	XM_217804	Map3k4_predi cted	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 4 (predicted)	N/A
E06	Rn.137063	XM_214883	Map4k1_predi cted	Mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 1 (predicted)	N/A
E07	Rn.34914	NM_053842	Mapk1	Mitogen activated protein kinase 1	Erk2
E08	Rn.9911	NM_012806	Mapk10	Mitogen activated protein kinase 10	Jnk3/SAPKC
E09	Rn.45869	XM_001073684	LOC689314	Similar to mitogen- activated protein kinase 11	LOC362982
E10	Rn.162968	NM_021746	Mapk12	Mitogen-activated protein kinase 12	Sapk3
E11	Rn.6609	NM_019231	Mapk13	Mitogen activated protein kinase 13	Prkm13
E12	Rn.88085	NM_031020	Mapk14	Mitogen activated protein kinase 14	CSBP/CSPB1
F01	Rn.2592	NM_017347	Mapk3	Mitogen activated protein kinase 3	ERK1/Erk-1
F02	Rn.88457	NM_031622	Mapk6	Mitogen-activated protein kinase 6	ERK3
F03	Rn.202431	XM_340813	Mapk7	Mitogen-activated protein kinase 7	Bmk1/Erk5
F04	Rn.4090	XM_341399	Mapk8	Mitogen-activated protein kinase 8	JNK
F05	Rn.44266	NM_053777	Mapk8ip	Mitogen activated protein kinase 8 interacting protein	Jip-1/Mapk8ip1
F06	Rn.91464	XM_235565	Mapk8ip2	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	N/A
F07	Rn.16158	XM_220232	Mapk8ip3	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	JSAP1
F08	Rn.9910	NM_017322	Mapk9	Mitogen-activated protein kinase 9	SAPK
F09	Rn.6276	NM_178102	Mapkapk2	MAP kinase-activated protein kinase 2	Mapkapk2

H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
				activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4	
G04	Rn.162612	NM_080766	Nras	Neuroblastoma ras oncogene	Nras
G05	Rn.9149	NM_017198	Pak1	P21 (CDKN1A)-activated kinase 1	Pak1
G06	Rn.29157	NM_134366	Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Rac1
G07	Rn.33262	NM_012639	Raf1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	Raf1
G08	Rn.55115	XM_344434	Rb1	Retinoblastoma 1	Rb1
G09	Rn.2477	XM_574821	RGD1563119 _predicted	Similar to MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C) (predicted)	Mef2c
G10	Rn.145079	XM_232745	Sfn_predicted	Stratifin (predicted)	LOC313017
G11	Rn.9774	NM_019275	Smad4	MAD homolog 4 (Drosophila)	Madh4
G12	Rn.54443	NM_030989	Tp53	Tumor protein p53	Trp53/p53
H01	Rn.973	NM_001007604	Rplp1	Ribosomal protein, large, P1	MGC72935
H02	Rn.47	NM_012583	Hprt	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	Hgprtase/Hprt1
H03	Rn.92211	NM_173340	Rpl13a	Ribosomal protein L13A	Rpl13a
H04	Rn.107896	NM_017025	Ldha	Lactate dehydrogenase A	Ldh1
H05	Rn.94978	NM_031144	Actb	Actin, beta	Actx
H06	N/A	U26919	RGDC	Rat Genomic DNA Contamination	RGDC

APENDICE 2: (Preparación de soluciones para biología molecular).

Determinación de la calidad del RNA

La calidad del RNA fue determinada a través del análisis de un gel de agarosa

Preparación del gel de agarosa.

20 ml de agua destilada

.22gramos de agarosa

Disolver en microondas

tarar y agregar el peso del agua destilada

colocar μ l de bromuro de etidí 10 mg/ml

colocar 400 μ l de TAE(amortiguador base de tris, ácido acético y EDTA 1X) en 20 ml de agua.

PREPARACIÓN DE BUFFER DE CORRIDA

1 ml de TAE (50) (TRIS ACIDO ACETICO Y EDTA) llevarlo a 120 ml de agua destilada.

5 ml de TAE (TRIS ÁCIDO ACÉTICO Y EDTA) llevarlo a 250 ml de agua destilada.

EDTA: Ácido etiliclamino tetra acético

PRERPARACION DE TBE (1X)

(Amortiguador base de tris, ácido bórico y EDTA)

pesar

54 gr. de tris base

27.5 gr. de ácido bórico

4.656 gr. de EDTA

aforar en 1 litro de agua destilada

PREPACION DE DEPC

Preparar al 0.1%

Colocar en agua desionizada (HPLC)

Dejar en agitación toda la noche a 39°C

Esterilizar y después usar

AMORTIGUADOR DE LISIS:

Homogenizar cada muestra en 1 ml de buffer de lisis (920 μ l de regulador de lisis + 80 μ l de solución Complete)

Coctel de proteasas: Tabletas Complete

Tableta disuelta en 2 ml de agua o Buffer de fosfatos 100 mM pH 7.0

REGULADOR DE LISIS:

	STOCK	TOMAR
Tris base pH 7.5	1.0 M	1 ml
NaCl	5.0 M	3 ml
NaF	0.2 M	10 ml
Na ₃ VO ₄	10 mM	5 ml
NP ₄₀	-----	1 ml

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

REACTIVOS:

Reactivo "A" :Na₂CO₃ al 2 % en NaOH 1.0 N (5 gr. de Na₂CO₃ en 250 ml NaOH 0.1 N) (NaOH 0.1 N = 1 gr. de NaOH en 250 ml de H₂O).

Reactivo "B" : CuSO₄ al 0.5 % en Citrato de sodio al 1 %
(0.05 gr. de CuSO₄ en 10 ml de Citrato de sodio)
(Citrato de sodio 1%: 1 gr. de Citrato de Sodio en 100 ml H₂O)

Reactivo "C" :

50 ml de Reactivo "A" +1 ml de Reactivo "B".

Reactivo "D" 1 ml de reactivo FOLIN+ 1.3 ml de H₂O.

Procedimiento

- Diluir las muestras de acuerdo a su contenido esperado de proteínas.
- Tomar 20 µl de cada dilución.
- Agregar 2 ml de Reactivo "C" agitar y reposar 10 min.
- Agregar 200 µl de Reactivo "D"
Agitar y reposar 40 min. en oscuridad.
- Leer en absorbancia 700 nm.

PREPARACIÓN DEL GEL CONCENTRADOR Y GEL SEPARADOR:

GEL SEPARADOR:

10% (10ml).

H₂O₂.....4.0ml
Tris-HCL 1.5M pH 8.8.....2.5ml
Acrilamida-Bis.....3.3ml
SDS 10%.....100µl
Temed.....4µl

GEL CONCENTRADOR:

5% (3 ml)

H₂O₂.....2.1ml

Tris-HCL 0.5M pH 6.8.....38μl

Acrilamida-Bis.....500μl

SDS 10%.....30μl

Temed.....3μl

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Tomar el volúmen correspondiente a 50 μg de proteínas y mezclarlo en partes iguales con el buffer de muestra (solución desnaturizante Tris HCl 0.125 M, SDS 4%, Glicerol 20 % Mercaptoetanol 10 %, azul de bromofenol 0.1 %).

Buffer de muestra 2X (Tris-HCl 0.125 M, SDS 4 %, Glicerol 20 %, mercaptoetanol 10 %, pH 6.8).

ANTICUERPO PRIMARIO

(Anti CREB)

Dilución 1:5000

ANTICUERPO SECUNDARIO

(Anti Conejo)

1:1000

BIBLIOTECA CUCBA