

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS**  
**BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**

---



*EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL R-NMDA, BAJO  
CONDICIONES DE EXCITOTOXICIDAD, EN EL HIPOCAMPO Y  
CORTEZA CEREBRAL DE RATA, A LOS 14 DIAS PN.*

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA  
MODALIDAD DE:**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**ROLANDO CASTAÑEDA ARELLANO**

**Las Agujas, Zapopan, Jal. Diciembre de 2008**



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

1360/ C. C. BIOLOGÍA

C. Rolando Castañeda Arellano

PRESENTE

Manifiestamos 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 : “**Expresión de las subunidades de R-NMDA bajo condiciones de excitotoxicidad, en hipocampo y corteza de rata a los 14 días PN**” para obtener la Licenciatura en Biología.

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

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

**ATENTAMENTE**  
**“PIENSA Y TRABAJA”**  
Las Agujas, Zapopan., 29 de julio del 2008.

**DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**M en C. GLORIA PARADA BARRERA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

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: "**Expresión de las subunidades de R-NMDA bajo condiciones de excitotoxicidad, en hipocampo y corteza de rata a los 14 días PN**" que realizó el/la pasante **Rolando Castañeda Arellano** con número de código **399306475** 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**

**Las Agujas, Zapopan., 14 de noviembre del 2008**



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



**Dr. Mario Flores Soto**  
 Asesor(es)

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Carlos Ben Zúñiga		
Silvia J. López Pérez		27-Nov-08
Graciela Guadalupe Coban		28 Nov 08
Supl. Alfredo Feria Velasco		27-Nov-08

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología Celular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), bajo la dirección de la Dra. en Cs. Martha C. Rivera Cervantes y la asesoría de Dr. en Cs. Mario Flores Soto.

*Este trabajo lo dedico especialmente a mis padres por brindarme toda su paciencia y comprensión en el transcurso de mi carrera, así como su apoyo incondicional sin el cual no sería posible mi formación.*

*A mis sobrinos Víctor y Yasid que amo y adoro.*

## AGRADECIMIENTOS

---

*A la Dra. Martha C. Rivera Cervantes por permitirme estar en su laboratorio y darme su apoyo necesario que me ayudó a la realización de mi tesis que con su paciencia y dedicación me permitieron salir adelante.*

*Al Dr. Mario Eduardo Flores Soto por dedicar parte de su tiempo en este trabajo.*

*Agradezco especialmente a mis hermanos, Felipe, Rubén y Adrián por estar conmigo en todo momento.*

*A mis amigos que me brindaron su amistad incondicional y que forman parte de mi vida tanto los que están aquí como en el extranjero, el cual me han llenado de felicidad.*

*A todos los compañeros del laboratorio con los que trabajé y que compartí una buena relación.*

*A Irene G. Aguilar García por estar a mi lado y ofrecerme su apoyo incondicional que necesito para seguir adelante.*

## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco a las instituciones que apoyaron para hacer posible mi trabajo.

A la Universidad de Guadalajara por los apoyos que me brindó durante la realización de este trabajo, como en el caso de Becario de Ayudantes de Investigación. (PAY- SIN 2006- B)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado al proyecto (48002), el cual ayudó en la realización de este trabajo.

## INDICE

Lista de Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	x
I. Introducción.....	1
<i>1.1 Receptor a AMPA</i>	
<i>1.2 Receptor a Kainato</i>	
<i>1.3 Receptor a NMDA</i>	
<i>1.4 Excitotoxicidad</i>	
II. Antecedentes.....	14
III. Planteamiento del problema.....	19
IV. Hipótesis.....	21
V. Objetivo general.....	23
VI. Objetivos particulares.....	25
VII. Metodología.....	27
<i>7.1 Reactivos utilizados</i>	
<i>7.2 Preparación de los animales</i>	
<i>7.3 Obtención de las muestras</i>	
<i>7.4 Extracción de RNAtotal por el método de isotiocianato de guanidina</i>	
<i>7.5 Formación de DNAc utilizando transcriptasa reversa</i>	
<i>7.6 Normalización de la <math>\beta</math>-actina en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	
<i>7.7 Técnica de Western Blot</i>	
VIII. Diagrama experimental.....	34

IX. Resultados.....	36
9.1 Cambios en la expresión de la proteína y RNAm de la subunidad NR1 inducida por GMS.	
9.2 Cambios en la expresión de la proteína y RNAm de la subunidad NR2A inducida por GMS.	
9.3 Cambios en la expresión de la proteína y RNAm de la subunidad NR2B inducida por GMS.	
9.4 Cambios en la expresión de la proteína y RNAm de la subunidad NR2C inducida por GMS.	
9.5 Expresión del RNAm de la Subunidad NR2D	
X. Discusión.....	46
XI. Conclusiones.....	52
XII. Bibliografía.....	54
XIII. Apéndice.....	62

## ABREVIATURAS

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
ATP	Trifosfato de adenosina
BHE	Barrera hematoencefálica
°C	Grados centígrado
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
CTR	Región carboxilo terminal
DIV	Días <i>in vitro</i>
E	Embrionario
Glu	Glutamato
GMS	Glutamato monosódico
µg	Microgramo
h	Hora
K <sup>+</sup>	Ión potasio
µl	Microlitro
Mg <sup>2+</sup>	Ión magnesio
mg	Miligramo
min	Minutos
µM	Micromolar
Na <sup>2+</sup>	Ión sodio
NTR	Región amino terminal
p.c.	Peso corporal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PN	Posnatal
R-AMPA	Receptores a ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol
R-Glu	Receptores a glutamato
R-Glu <sub>i</sub>	Receptores a glutamato ionotrópicos
R-Glu <sub>m</sub>	Receptores metabotrópicos glutamatérgicos
R-KA	Receptores a ácido kainico
RNAM	Ácido ribonucleico mensajero
R-NMDA	Receptores a N-metil-D-aspartato

rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TMD	Dominio transmembranal

## **RESUMEN.**

La sobreactivación de los R-NMDA juega un papel importante en la muerte celular excitotóxica en una variedad de condiciones como la hipoxia e isquemia, así como en diversas enfermedades neurodegenerativas. Para evaluar si la administración subcutánea de glutamato monosódico en ratas neonatas, los días 1, 3, 5, 7 de edad posnatal, afecta la expresión de las diferentes subunidades del R-NMDA, en el hipocampo y corteza cerebral regiones altamente susceptibles al daño excitotóxico; se llevó a cabo un análisis por Western Blot y RT-PCR para llevar a cabo un análisis semicuantitativo de la expresión proteica y de los productos de la transcripción en los cerebros de ratas de 14 días de edad posnatal. Los resultados revelan que la exposición temprana de GMS en ratas neonatales afecta diferencialmente la expresión del RNAm de las subunidades del R-NMDA en la corteza cerebral e hipocampo. En particular en la corteza cerebral de ratas tratadas, solo se observó un incremento en el RNAm de la subunidad NR2B al compararlo con el control, mientras que en el hipocampo la administración de GMS resultó en un incremento del RNAm de las subunidades NR1, NR2B y NR2C. La expresión del RNAm de la subunidad NR2A no se afectó por el tratamiento de GMS en ninguna de las regiones examinadas. Esta expresión diferencial de las subunidades del R-NMDA siguiente de una exposición de glutamato monosódico puede ser considerado como una respuesta adaptativa al aumento patológico de L-glutamato en el cerebro durante un periodo temprano de vida.

# I. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso (SN) se divide funcionalmente y estructuralmente en: *Sistema nervioso central* (SNC) el cual es estructura bilateral y esencialmente simétrica, que se puede dividir en siete partes principales: médula espinal, médula oblongada, puente de Varolio, cerebelo, cerebro medio, diecencéfalo, y los hemisferios cerebrales; estas estructuras se encargan del procesamiento de la información y la generación de una respuesta ante un estímulo; mientras que el *sistema nervioso periférico* (SNP) se divide en somático y autónomo; la división somática incluye las neuronas sensoriales que inervan la piel, músculos y articulaciones, la división autónoma controla la sensación visceral, así como el control motor de vísceras, músculo liso, y glándulas exócrinas (Kandel E y col., 2000).

La corteza cerebral es responsable de las operaciones para ejecutar habilidades cognitivas — en particular la materia gris que cubre a los hemisferios izquierdo y derecho. La corteza presenta circunvoluciones y surcos que separan las regiones elevadas (giros) y esta dividida en cuatro importantes lóbulos debajo de los huesos craneales: frontal, parietal, temporal y occipital. Cada lóbulo esta especializado en diferentes funciones: el lóbulo frontal se encarga de planear la acción y el control del movimiento, el lóbulo parietal de sensaciones somáticas y la relación de imagen del cuerpo con el espacio, el lóbulo occipital de la visión y el lóbulo temporal de la audición; además, algunas áreas de la corteza, se relacionan primordialmente con procesos de información sensorial o comandos motores (Kandel E y Siegelbaum S 2000).

Por otra parte, una región que es igual de importante, a la corteza cerebral, para procesos como el aprendizaje y la memoria, es sin duda el hipocampo. Es un área de la allocorteza, oculta en la parte inferior del lóbulo temporal, donde ocupa una localización medial; presenta un red de contactos desde y hacia diversas áreas corticales.

Varios tipos de elementos celulares son integrados anatómica, bioquímica y fisiológicamente para el funcionamiento normal del sistema nervioso: principalmente las células neuronales y gliales. La neurona es el elemento principal de la comunicación y sus propiedades fisiológicas dependen también de las células gliales. La glía presenta tres tipos de

células en el (SNC): oligodendrocitos, astrocitos y macroglía, en el (SNP) la células de Schwann son el componente principal.

Las neuronas son altamente polarizadas con diferentes dominios celulares que favorecen su función, tres dominios pueden ser definidos: (1) el cuerpo celular, (2) un número variable de dendritas que emanan del cuerpo celular y se ramifican sobre cierto volumen de materia gris y que difiere en tamaño y forma, dependiendo del tipo neuronal y (3) un solo axón, que es una ramificación generalmente de mayor longitud que las dendritas; esta estructura permite la formación de contactos sinápticos (Hof P y col., 1999).

El sitio en el que una célula neuronal se comunica con otra se llama sinapsis, y la transmisión sináptica es el principal fundamento de la función del sistema nervioso, todas las neuronas suelen usar una de las dos formas básicas de transmisión sináptica: eléctrica o química.

Las sinapsis eléctricas son rápidas y modulan una respuesta estereotipada, se establecen primordialmente para generar señales simples, no producen acciones inhibitorias, ni cambios a largo plazo (Kandel E, 2000).

En contraste, en la neurotransmisión química se generan respuestas variables y complejas, no hay continuidad estructural entre las neuronas presináptica y posináptica; el establecimiento de este tipo de comunicación intercelular involucra por lo menos cinco eventos:

- 1) Biosíntesis del neurotransmisor en la neurona presináptica.
- 2) Almacenamiento del neurotransmisor o su precursor ó ambos en la terminal nerviosa.
- 3) Descarga del neurotransmisor en el espacio intersináptico.
- 4) Unión y reconocimiento del neurotransmisor por los receptores específicos.
- 5) Inactivación y terminación de la acción del transmisor descargado (Zucker R y col., 1999).

Consecuentemente la transmisión sináptica, de tipo químico, implica la descarga de un neurotransmisor desde la neurona presináptica, los cuales están almacenados en vesículas que contienen varios miles de moléculas de un transmisor específico. A la llegada del potencial de acción a la terminal presináptica se activan canales sensibles a voltaje que permean el ion calcio

(Ca<sup>2+</sup>), el aumento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> provoca la fusión de la vesícula con la membrana presináptica descargando el neurotransmisor en la hendidura sináptica, por exocitosis, el neurotransmisor interacciona con un receptor específico en la membrana de la célula posináptica, conduciendo a la generación de una respuesta intracelular (Kandel E, 2000).

El ácido glutámico (Glu) es el principal neurotransmisor en la respuesta sináptica excitatoria, del sistema nervioso central (SNC), es un aminoácido no-esencial que no cruza la barrera hematoencefálica (BHE), el glutamato es sintetizado y metabolizado por la acción de dos enzimas: la glutaminasa y la glutamato sintetasa que se localizan tanto en neuronas como en células de la glía; se almacena en vesículas sinápticas en un proceso dependiente de trifosfato de adenosina (ATP). Por lo que, la liberación del Glu depende de la estimulación nerviosa, despolarización y presencia de Ca<sup>2+</sup> en la terminal sináptica (Dingledine y McBain, 1999).

Durante el desarrollo la neurotransmisión glutamatérgica participa en la sinaptogénesis, crecimiento y proliferación neural (Komuro y Rakic, 1993; Pearse y col., 1987). Además tiene un papel importante en la plasticidad sináptica, en particular en el establecimiento de un proceso fisiológico denominado potenciación a largo plazo (LTP), que se considera como sustrato celular del aprendizaje y la memoria (Sakimura y col., 1995).

La acción del Glu depende de su interacción con dos tipos de receptores específicos: los formados por canales iónicos y que se activan por ligando, llamados ionotrópicos; y los que se acoplan a proteínas G denominados metabotrópicos (Dingledine y McBain, 1999) (Fig. 1).

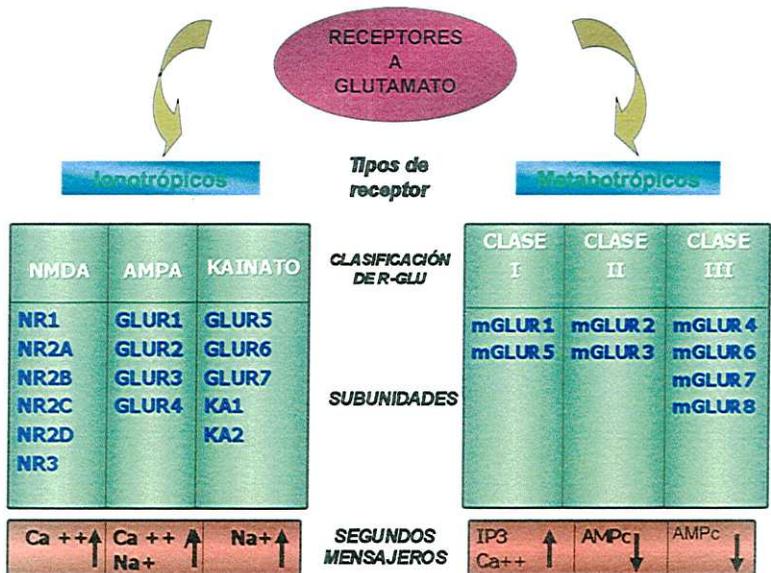
Los receptores metabotrópicos promueven la síntesis de segundos mensajeros, a través de la activación de proteínas G, se han descrito por lo menos ocho tipos de receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mR-Glu), en el SN; que se clasifican de acuerdo a la homología de sus secuencias aminoácídicas, a la afinidad por agonistas farmacológicos y a las vías de transducción de señales a las que se acoplan (Dingledine y McBain, 1999).

Los receptores ionotrópicos (R-Glu;) son canales iónicos activados por ligando que se abren tras la interacción del neurotransmisor (Lodish H y col.,

2000), la apertura del poro permite la entrada de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$  y la salida de  $\text{K}^+$  (Madden DR, 2002).

De acuerdo a su afinidad a agonistas específicos los receptores ionotrópicos glutamatérgicos se clasifican como: N-Metil-D-Aspartato (R-NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol (R-AMPA) y ácido kaínico (R-KA).

Los R-Glu<sub>i</sub> se forman por ensamblajes hetero-oligoméricos de subunidades proteicas integrales de membrana (Madden DR, 2002). Una subunidad típica de los R-Glu<sub>i</sub> consiste en una región amino terminal (NTR), un dominio de unión a ligando (S1, S2), tres dominios transmembranales (TMD), un asa re-entrante de poro y una región carboxilo terminal (CTR) (Mcfeeters RL y Oswald RE, 2004). Existen varios reportes que sugieren la expresión diferencial de los receptores a glutamato, tanto durante el desarrollo como en las diferentes regiones del SNC (Lujan R y col., 2005).



R. Dingledine y C. J. McBain, En G. J. Siegel, B. W. Agranoff, y M. E. Uhler. Basic Neurochemistry, (Modificado)

Fig. 1. Clasificación de los Receptores a Glutamato

## 1.1 Receptores a AMPA

Los R-AMPA están constituidos por combinaciones de las subunidades GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4, las cuales constituyen un receptor por ensamble heterooligomérico (Keinanen K y col., 1990). Los procesos de empalme alternativo del pre-RNAm, de cada una de los transcritos del gen para las subunidades, resultan en la formación de dos variantes, llamadas *flip* y *flop*, que difieren en su respuesta a agonistas específicos (Dingledine R y col., 1999).

Los receptores nativos, en general, constituyen canales iónicos permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y casi se les puede considerar impermeables al  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, los canales recombinantes homoméricos o heteroméricos formados con las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4 son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que, los canales ensamblados por al menos una subunidad GluR2 son prácticamente impermeables al  $\text{Ca}^{2+}$ . Lo anterior es consecuencia de que en los transcritos primarios de GluR2, el nucleótido adenina en el codón CAG, que codifica para una glutamina (Q), en el segundo segmento transmembranal (TMD2), es sustituido por el codón CIG, que codifica para una arginina (R), en el sitio denominado Q/R, lo que disminuye notablemente la permeabilidad del receptor al  $\text{Ca}^{2+}$  (Dingledine R y col., 1999).

## 1.2 Receptor a Kainato.

A la fecha, se han identificado por clonación cinco subunidades para la constitución de los receptores a Kainato, denominadas: GluR5, GluR6 y GluR7 que pueden ensamblarse entre sí para producir canales funcionales o constituir ensambles con las subunidades KA1 y KA2 (Lerma J, 2003). El pre-RNAm de los R-KA se procesa por empalme alternativo, lo que genera las isoformas GluR5a-d, GluR6 y GluR6-2, así como la GluR7a y 7b. Estas subunidades se pueden dividir en dos grupos en base a su homología en sus secuencias, y en la afinidad por [ $^3\text{H}$ ] kainato (Hollman, M y Heinemann S, 1994). Mientras que el RNAm de las subunidades GluR5 y GluR6 se modifica también por edición en el sitio llamado Q/R presente en el segmento TMD2. La subunidad GluR6 sufre además otras modificaciones en el segmento TMD1 en los sitios conocidos como I/V (isoleucina/valina) e Y/C (tirosina/cisteína) (Lerma J, 2003).

La expresión diferencial de las isoformas para los subunidades de los R-KA también es regulada durante el desarrollo del SNC (Bernard A y Kherstchatsky M, 1994). Una de las propiedades fisiológicas más sobresalientes de los receptores recombinantes a kainato es que provoca una rápida respuesta; por lo tanto las propiedades funcionales y farmacológicas dependen de la combinación de subunidades que constituyen a un receptor funcional (Bettler B y Mülle C, 1995). La expresión de GluR5 se limita principalmente al subiculum, región CA1 del hipocampo y a una capa de células de Purkinje del cerebelo; GluR6 es encontrado en altos niveles sobre todo en el giro dentado y la región CA3 del hipocampo, así como en el putamen, caudado y células granulares del cerebelo; GluR7 muestra relativamente un bajo nivel en el patrón de distribución; mientras que la subunidad KA1 se expresa en niveles altos en la amígdala y en la formación hipocámpal, y KA2 se encuentra distribuido en todo el SNC (Seeburg PH, 1993).

### **1.3 Receptor a NMDA.**

Los R-NMDA poseen alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y su activación es dependiente de despolarización de la membrana, y de la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular. Se han identificado tres subunidades diferentes presentes en los R-NMDA funcionales: la NR1, NR2 de las cuales existen 4 subtipos denominados NR2A-D y NR3 (NR3A y 3B) que modifican las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas del R-NMDA (Iwayama y col., 2005) (Fig. 2).

Las subunidades del R-NMDA tienen diversas variantes producidas por empalme alternativo, aunque su relevancia funcional es aun poco conocida. La subunidad NR2D puede ser modificada por empalme alternativo de la región 3' del pre-RNAm, para producir una isoforma con un inserto de 33 aminoácidos en la región carboxilo terminal (CTR) de la proteína. A su vez, la subunidad NR3A puede tener un inserto de 20 aminoácidos extra en el CTR. Las subunidades NR2B, NR2C y NR2D también tienen sitios de empalme alternativo en sus regiones 5'-no traducida del pre-RNAm (Cull-Candy SG y Lesziewicz DN, 2004).

Los receptores recombinantes homoméricos para NR1 poseen las características farmacológicas de un R-NMDA nativo, debido a que todos los sitios de unión a agonistas y moduladores son codificados por este único gen; aunque las corrientes catiónicas inducidas por su agonista son muy pequeñas en los receptores homoméricos para NR1, pero se incrementan más de 100 veces por la co-expresión de alguna de las subunidades NR2, esto sugiere que la mayoría de los R-NMDA nativos son heteroméricos.

Debido a que los R-NMDA heteroméricos recombinantes muestran diferentes propiedades dependiendo de cuál de las cuatro subunidades NR2 se encuentre ensamblada con NR1, las subunidades NR2 se pueden considerar como reguladoras, mientras que la subunidad NR1 es fundamental en la formación de R-NMDA funcional (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993).

Las diferentes subunidades del R-NMDA muestran varias distribuciones en el sistema nervioso y durante el desarrollo. La subunidad NR2B, NR2D, NR3A, durante el desarrollo posnatal son abundantes pero disminuyen sobre todo durante la maduración neuronal, mientras que la subunidad NR2A y NR2C son abundantes generalmente en las neuronas maduras (Oshima S y col., 2002). Durante el desarrollo se establece un cambio en la prevalencia de la subunidad NR2B, la cual es predominante en las primeras etapas y conforme va declinando su expresión se incrementa la de la subunidad NR2A, lo que se ha estudiado extensivamente, estableciéndose que esto ocurre en todas las diferentes áreas del cerebro; por ejemplo estudios de microscopía electrónica en la región CA1 del hipocampo demuestra que el marcaje sináptico para NR2B es mayor en el día 2 posnatal y muestra una gradual disminución alrededor del día 35 PN (Petrália RS y col., 2005). Por otra parte, el marcaje de la subunidad NR2A en la sinapsis es muy bajo en el día 2 PN y se incrementa alrededor de 12 veces en el día 35 PN, confirmado este hecho con el análisis por Western Blot (Sans N y col., 2000).

El estudio sistematizado de la función del R-NMDA revela cambios durante el desarrollo a través del análisis de preparaciones de diferentes tipos celulares (Monyer H y col., 1999), por ejemplo, un estudio en rebanadas de hipocampo de ratas, establece un cambio conformacional del

R-NMDA, en donde es evidente la sustitución de la subunidad NR2B por la NR2A en la segunda semana de vida posnatal, este estudio se basa en el análisis del incremento de la amplitud de la corriente posináptica excitadora mediada por el R-NMDA, así como cambios en la sensibilidad de varios agentes farmacológicos (Cathala L y col., 2000). Además se determinó una cinética lenta en el día 40 de edad PN, lo que sugiere que se da un incremento en la expresión de las subunidades NR1/NR2C durante la maduración neuronal. Antes de presentarse esta cinética de activación lenta, en el fin de la tercera semana de edad posnatal, se observó una reducción en la sensibilidad al  $Mg^{2+}$ , sugiriendo que los R-NMDA contienen en su conformación funcional, a este tiempo, que incluye a la subunidad NR2A (para una rápida cinética de activación) y a la subunidad NR2C (para la reducida sensibilidad al  $Mg^{2+}$ ) (Fu Z y col., 2005)

Los R-NMDA que presentan una baja sensibilidad al  $Mg^{2+}$  generan potenciales posinápticos excitatorios (EPSPs) que no dependen de un cambio en el potencial transmembranal; (Monyer y col., 1999).

La eliminación sináptica es uno de los mecanismos importantes para el establecimiento de redes neuronales maduras. La expresión diferencial de los R-NMDA en etapas tempranas del desarrollo puede modular la sinaptogénesis o el refinamiento de la sinapsis (Colonnese MT y col., 2005). La señalización mediada por el R-NMDA puede regular el crecimiento axonal, a través de mecanismos de señalización retrograda, con los que se modula el crecimiento y la focalización de las ramificaciones neuronales (Lee LJ y col., 2005).

## SITIOS DE REGULACIÓN FARMACOLÓGICA

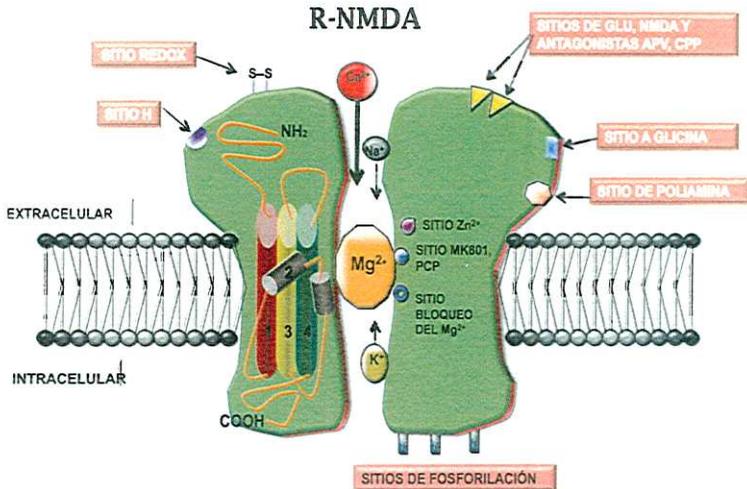


Fig. 2 Esquema del R-NMDA

### 1.4 Excitotoxicidad.

En diferentes estudios se ha sugerido que un aumento en la neurotransmisión excitadora y la consecuente acumulación de Ca<sup>2+</sup> intracelular, pueden ocasionar una pérdida neuronal selectiva (Andine y col., 1991); los aminoácidos excitadores como el Glu son neurotóxicos en altas concentraciones (Kure y col., 1991), esto conduce a daño neuronal excitotóxico, que puede desencadenar un proceso necrótico (Gwang y col., 1997; Ferrer y col., 1995; Lesort y col., 1997), apoptótico (Filipkowinski y col., 1994; Ferrer y col., 1995; Ankarcrona y col., 1996; Lesort y col., 1997), ó un proceso continuo entre necrosis y apoptosis (Portera-Cailliau y col., 1997).

La necrosis se caracteriza por el hinchamiento celular, daño a los organelos intracelulares incluyendo a la mitocondria y un rápido colapso en la homeostasis celular. Mientras que en la apoptosis se origina una disminución en el volumen celular, ondulamiento de la membrana, picnosis nuclear, así como la condensación cromatínica, fragmentación del DNA y la expresión de genes específicos que modulan el proceso de muerte (Beilharz y col., 1995).

La excitotoxicidad es aun más complicada por el hecho de que la ejecución de un programa de muerte puede diferir según el tipo neuronal expuesto al daño (Nicotera y col., 1999), así como la composición de receptores individuales que pueden ser un factor decisivo en el tipo de muerte (Portera-Cailliau y col., 1997b). Lo anterior se asocia con el grado de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  que se ha probado puede inducir un cambio en la forma de muerte de apoptosis a necrosis (Gwag y col., 1995).

La excitotoxicidad es un proceso inducido por la sobre-activación de R-Glu, particularmente los de tipo ionotrópico (Olney, 1969; Olney, 1978), implicando al Glu en la muerte neuronal como consecuencia del incremento en la concentración de calcio libre intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (Choi, 1990; Choi, 1995; Rothman y Olney., 1986; Siesjo y Bengtsson, 1989), el cual promueve la lipo-peroxidación (LP) de las membranas: citoplasmática, del retículo endoplásmico (RE) y de la mitocondria (Mattson y col., 2000). Esta LP se debe básicamente a la sobre-producción de óxido nítrico (NO) y de radicales superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), los cuales a su vez favorecen la producción de peroxinitritos; además del 4-hidroxinonenal (HNE) que altera la actividad de los transportadores de membrana y de canales iónicos, particularmente cuando los lípidos de las membranas son peroxidados (Fig. 3) (Mattson y col., 2000).

También la LP induce daño a la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , a los transportadores de glucosa y de Glu, como parte del proceso excitotóxico, perturbando la homeostasis iónica tanto del RE como de la mitocondria, comprometiendo la producción y por lo tanto el abastecimiento de ATP (Mattson y col., 2000). El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  desencadena otros mecanismos de señalización que eventualmente podrían favorecer la muerte celular por apoptosis, entre estos esta la activación de diferentes enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como proteasas, nucleasas y fosfolipasas (Mattson y col., 2000; Chakranoti y col., 1999) (Fig. 3).

Por otra parte, se ha establecido claramente que el fenómeno de daño celular excitotóxico se correlaciona con la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (Mapks) (Kawasaki y col., 1997); argumentos que establecen una estrecha relación entre la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y la sobrevivencia celular (Chakraboti y col., 1999); de tal forma que el fenómeno

de excitotoxicidad se ha asociado a diferentes estados patológicos del SNC, entre los que están: la epilepsia (Khor y Heinemann, 1989), hipoxia/isquemia (Siesjo y Bengtsson, 1989) y el trauma encefálico (Faden y col., 1989). Además se le implica en padecimientos crónicos neurodegenerativos, tales como: la enfermedad de Huntington (Young y col., 1988), Alzheimer (Greenamyre y col., 1985) y el Parkinson (Turski y col., 1991), entre otras. Además estudios clínicos en humanos, y farmacológicos en roedores demostraron que la concentración extracelular de Glu se eleva a niveles tóxicos en un proceso isquémico (Benveniste y col., 1984; Hagberg y col., 1985; Bullock y col., 1995; Davalos y col., 1997). La privación de oxígeno y glucosa promueve la disminución del almacén energético dentro de los compartimentos neuronales y gliales, afectando el metabolismo celular, las bombas iónicas y la capacidad de las células para mantener el potencial de membrana en reposo. Consecuentemente, las células se despolarizan generándose potenciales de acción que disparan la liberación de Glu de las terminales presinápticas. El Glu estimula de forma excesiva a sus receptores posinápticos, induciendo un ingreso incontrolado de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a las neuronas (Dugan y Choi, 1999).

El incremento sostenido de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induce la generación de radicales libres que promueven la peroxidación de lípidos de la membrana, la síntesis de óxido nítrico, que puede actuar como retromensajero e induce un efecto excitotóxico por aumento en la liberación de Glu (Almeida y col., 1998). Así mismo se activan enzimas involucradas en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Choi, 1995). Eventualmente todos estos mecanismos contribuyen al daño irreversible del tejido neuronal (Dugan y Choi, 1999; Nicotera y col., 1992).

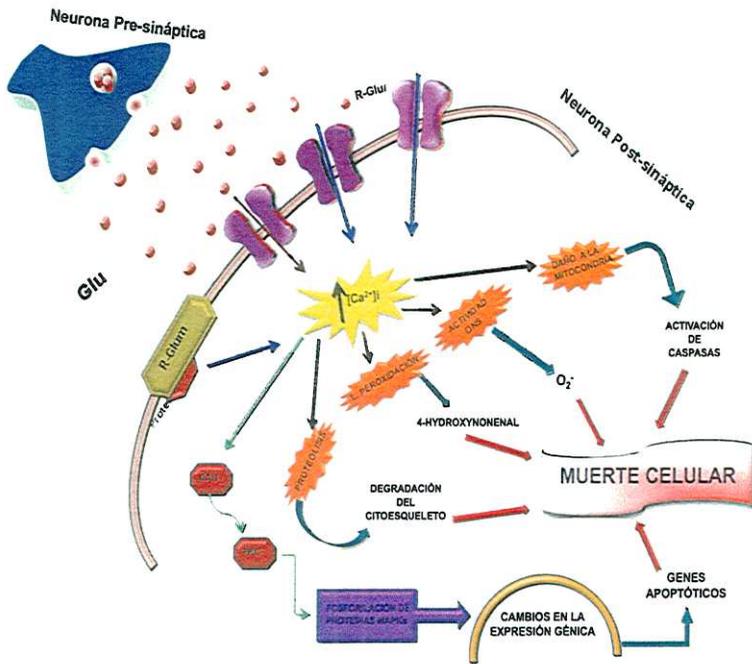


Fig. 3. Diagrama simplificado que muestra algunos mecanismos involucrados en excitotoxicidad y la muerte celular.

# **II.**

# **ANTECEDENTES**

Los análisis sistematizados que han permitido identificar las subunidades que constituyen el R-NMDA con diferentes distribuciones y propiedades implica que estos receptores son heterogéneos en sus características farmacológicas y fisiológicas; y que existe tanto una variación regional como temporal de las diferentes subunidades (Laurie y col., 1997).

Estudios, por hibridación *in situ*, en el SNC de ratas han mostrado que la expresión de la subunidad NR1 es constante durante el desarrollo prenatal y hasta la tercera semana de vida posnatal; y disminuye ligeramente en la etapa adulta, sugiriendo que las formas de empalme alternativo pueden generar las diferencias regionales en las propiedades de las subunidades del R-NMDA durante el desarrollo y en la etapa adulta del SNC (Laurie DJ y Seeburg PH, 1994); mientras que las subunidades NR2A y NR2C se expresan en la corteza cerebral, el hipocampo, las células de Purkinje, el mesencéfalo y el diencefalo desde la etapa neonatal (Laurie DJ y Seeburg PH, 1994)

La expresión funcional de los receptores conformados por NR1/NR2B aparecen antes de que las células establezcan sus terminales presinápticas, lo cual sugiere que están regulados por mecanismos intrínsecos, independientemente de la presencia de axones en crecimiento, con lo que cumplen un papel importante durante la consolidación sináptica (Li JH y col., 1998). Los incrementos en la expresión temporal de las subunidades de R-NMDA coinciden con las etapas de plasticidad sináptica y tiempos críticos durante el desarrollo (Ritter LM y col., 2002, Takai H y col., 2003).

Por otra parte estudios *in vivo* han mostrado que la expresión de la subunidad NR3A y NR3B se detecta desde el día 15 de la etapa embrionaria (E15) en el cerebro completo de rata, mientras que la subunidad NR3A predomina en la etapa adulta en el diencefalo, cerebelo y bulbo olfatorio (Sun L y col., 1998).

Estudios realizados en cultivos de células progenitoras de hipocampo, basados en el método del gradiente de densidad de Percoll, dieron lugar a la formación de esferas en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos a los 12 días *in vitro* (DIV), donde se observó la expresión constitutiva de las subunidades NR1, NR2A, y NR2B en las neuroesferas a los días 4-12 DIV; además la exposición por un periodo breve (5 min) al NMDA indujo la

expresión de proteínas como: c-Fos, Fos-B, Fra-2 y c-Jun, evaluado 2 h después de los 12 DIV; estos resultados sugieren que los R-NMDA se pueden expresar en células progenitoras antes de la diferenciación, para desempeñar un papel crucial en la consolidación y la diferenciación en las neuronas del hipocampo (Kitayama T y col., 2004).

El daño excitotóxico a neuronas resulta de la activación excesiva de corrientes iónicas, debidas a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  a través de canales modulados por Glu (Choi, 1987; Limbrick y col., 1995).

Estudios realizados en cultivos primarios de neuronas cerebrales han demostrado que la muerte neuronal inducida por Glu se regula por dos mecanismos diferentes:

- I) Un componente dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  e independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- II) Un componente dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rothman, 1985; Choi, 1987; Dessi y col., 1994).

Los estudios de excitotoxicidad utilizando neuronas en cultivo, se preparan generalmente a partir de cerebros embrionarios de 8 días, una fase donde existe un cambio rápido en la distribución y composición de las subunidades de los R-Glu (Watanabe y col., 1992; Monyer y col., 1994; Sheng y col., 1994), lo cual puede influir marcadamente en la vulnerabilidad de las neuronas a la exposición del Glu. Otro parámetro que influye en la susceptibilidad al daño es el tiempo durante el cual las células se mantienen en condiciones de cultivo, antes de inducir el daño, ya que el daño neurotóxico es más severo cuando el tiempo de cultivo es mayor (Choi y col., 1987; Favaron y col., 1988; Frandsen y Shousboe, 1990), esta característica puede deberse a la expresión de diferentes subtipos de R-Glu (Frandsen y Schousboe, 1990). La exposición de cultivos primarios de células granulares cerebelares de rata a  $50\mu\text{M}$  de Glu, en medio libre de  $\text{Mg}^{2+}$  durante 15 min, produce muerte neuronal la cual inicia 2-3 h después del tratamiento, y 24 h después entre el 80 y el 85% de las células mueren (Manev y col., 1989).

Se ha descrito en cultivos de células granulares cerebelares y en cultivos corticales, que con la utilización de un bloqueador del transportador a glutamato, y que la estimulación con  $100\mu\text{M}$  de NMDA o glutamato,

respectivamente, se reduce la expresión del RNAm y la proteína de distintas subunidades del R-NMDA, como consecuencia de la excitotoxicidad (Ceberes y col., 2001; Gascon y col., 2005). Altas cantidades de Glu deben de ser aplicadas al cerebro para alterar la función cerebral e inducir daño neuronal por ejemplo: se requiere la administración directa de 500nM de Glu, durante 5 min, para inducir degeneración neuronal local retardada en el estriado (Olney y DeGubareff, 1978).

El primer reporte *in vivo* de la acción neurotóxica del Glu fue por Lucas y Newhouse (1957), quienes reportaron lesiones necróticas en la retina por efecto de la administración sistémica de altas dosis de L-Glu desde 4 a 8 mg de Glu/g de peso corporal (p.c.), en ratones neonatos y en menor grado en adultos (Lucas y Newhouse, 1957). Subsecuentemente, Olney (1969) demostró que después de la inyección única subcutánea de GMS (dosis desde 0.5 hasta 4mg/g de p.c.) a ratones de 9 días de EP, sacrificados 48 h después (Olney, 1969). En otros trabajos se ha demostrado el mismo proceso de daño celular con GMS en ratas, conejos e incluso primates (Olney, 1990). Las características morfológicas de la excitotoxicidad en muchos tipos neuronales incluyen inflamación somatodendrítica, condensación cromatínica y el daño a organelos, en estos modelos de excitotoxicidad (Olney, 1990).

Hu L., y col., 1998 administraron una dosis única de GMS, en ratones de 7 EP vía subcutánea (s.c.), a diferentes concentraciones desde 0.1 a 4 mg/g de p.c. y evaluaron los cambios en la concentración de Glu en plasma, así como los efectos del GMS sobre morfología celular en núcleo arcuato, 5 h después del tratamiento. También, se observó una mayor vulnerabilidad al Glu asociada al incremento en el nivel de expresión de la subunidad NR2C, la cual determina una disminución en la sensibilidad al  $Mg^{2+}$ , en los R-NMDA formados con esta subunidad (Limin y col., 1998).

Recientemente en estudios *in vivo* se ha propuesto que los R-NMDA que contienen las subunidades NR2A y NR2C están asociados a distintas cascadas intracelulares de señalización y participan en diferentes condiciones patológicas (Krapivinsky y col., 2003; Liu y col., 2004; Kim y col., 2005). Además en un estudio en el que se evaluó en ratones transgénicos, que sobre- expresan la subunidad NR2D, el desarrollo de crisis con

"*kindling*" los ratones transgénicos muestran una marcada reducción en el desarrollo del *kindling* (Bengzon y col., 1999).

Estudios en los que se han evaluado las características biofísicas y farmacológicas del receptor, sugieren que los cambios en la expresión de las subunidades que constituyen el R-NMDA en condiciones patológicas pueden tener impacto crítico en la respuesta neuronal; ya que las diferentes subunidades confieren a los receptores diferencias en sus propiedades cinéticas, sensibilidad a distintos ligandos, permeabilidad a iones divalentes, así como la interacción con proteínas intracelulares. Sin embargo, continúa siendo un desafío importante el establecer el significado de esta heterogeneidad tanto en condiciones normales como patológicas (Cull-Candy y col., 2001).

Existen evidencias que los receptores NMDA, AMPA y Kainato están involucrados de una manera diferencial en la excitotoxicidad, en diferentes estados patológicos.

En otros estudios utilizando modelos de excitotoxicidad con la administración de 4 dosis de GMS, vía subcutánea en etapa neonatal, se reportó un incremento en la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, en hipocampo y estriado a los 60 días y solo se observó un aumento en la expresión de NR1 en corteza cerebral entre los 8-12 días PN; sugiriendo que el incremento en los niveles de Glu en el cerebro, así como la sobre-activación de sus receptores posinápticos conducen al establecimiento de mecanismos determinantes en el daño o en la sobrevivencia neuronal (Beas-Zárate C y col., 2001; Rivera y col., 2004).

En eventos de daño como trauma agudo, accidente cerebro-vascular y convulsiones, asociado al incremento en la concentración de glutamato extracelular, actuando a través de la activación del R-NMDA, es una de los principales mecanismos celulares que modulan la muerte neuronal (Lee y col., 1999; Dirnagl y col., 1999). En particular durante las etapas del desarrollo cerebral se ha reportado una alta susceptibilidad a la neurotoxicidad, producida por análogos a L-glutamato, durante este periodo de crecimiento crítico, dado que durante esta etapa se producen eventos como la sinaptogénesis, el crecimiento y la proliferación neural (Mc Donald and Johnston 1990; Mitani y col., 1998).

**III.**  
**PLANTEAMIENTO**  
**DEL PROBLEMA**

La excitotoxicidad induce la activación de señales de daño que llevan a la célula a la muerte, lo que implica cambios en la expresión de genes específicos tanto genes que favorecen la muerte, como los que la inhiben, el balance entre estos eventos determina el destino final de las células bajo estas condiciones; si la administración de GMS en etapa neonatal induce cambios en la expresión de las subunidades al R-Glu en ratas de edad adulta, estos cambios podrían modificar la conformación de los R-Glu, manifestándose propiedades farmacológicas o fisiológicas que podrían favorecer o evitar los procesos de daño neuronal, disparados por la excitotoxicidad

Por lo que resulta interesante evaluar la participación de los receptores a glutamato, a través de los cambios de expresión de las subunidades que los constituyan después de inducir toxicidad por la administración neonatal de GMS, en ratas.

Una posible explicación de la susceptibilidad al daño neuronal por GMS, administrado en etapa posnatal temprana, podría inducir un incremento en la expresión de R-Glu con características que los hicieran mas permeables al  $Ca^{2+}$ , dado que tras la inducción del daño, se ha evaluado tanto en corteza como en hipocampo la susceptibilidad neuronal al daño excitotóxico, particularmente en este modelo. Para probar esta idea en nuestro modelo, se pretende evaluar la presencia de las subunidades que constituyen el R-NMDA.

# **IV. HIPÓTESIS**

La excitotoxicidad por glutamato induce cambios de la expresión génica que modulan la muerte neuronal, luego entonces la toxicidad inducida por la administración de glutamato monosódico provoca un incremento en la expresión de las subunidades del R-NMDA que modulan a la alta la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ .

# **V. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión de las subunidades del R-NMDA en el hipocampo y corteza cerebral a los 14 días PN; bajo condiciones de excitotoxicidad.

# **VI. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Determinar los cambios en la expresión del gen para las subunidades NR1 y NR2 A-D, bajo condiciones de excitotoxicidad.
- 2) Evaluar la presencia de la proteína de las subunidades, que constituyen el R-NMDA, bajo condiciones de excitotoxicidad.

# **VII.**

# **METODOLOGÍA**

## 7.1 Reactivos utilizados

Los reactivos que se utilizaron como: glutamato monosódico (G-1626), fosfato de sodio monobásico (S-3139), fosfato de sodio dibásico (S-3264), cloruro de sodio (S-3014), cloroformo (C-2432), isopropanol (I-9516), dietilpirocarbonato (D-5758), tris base (T-6791), EDTA (E-5134), procaina (P-9879), citrato de sodio (s-4641), azida de sodio (S-2002), una mezcla de inhibidores de proteasas (1697-498-ROCHE®), albúmina sérica (A-2153) y la diaminobenzidina (D5905-Sigma Chemical®) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. EUA). Otros reactivos de uso común se adquirieron de diferentes compañías: etanol absoluto (9014-02, BAKER), xilol (9049-02 BAKER), resina sintética (87987, HYCEL).

Los reactivos como: ácido bórico (15583-024), trizol (15596-026, retrotranscriptasa reversa (28-025-013), desoxinucleotidos trifosfatados (10297-018), ditiotreitól (Y00147), random primers (48190-011), RNA sin (10777-019), amortiguador para PCR (Y02028), cloruro de magnesio (T02016), Taq polimerasa (18038-042), marcador de peso molecular de 100 pb (15628-019), agarosa (9012-36-6), bromuro de etidio (15585-011) y las secuencias de los primers fueron proporcionados por el proveedor ACCESOLAB S.A de C.V., de la marca Invitrogen®.

Mientras que el suero normal de cabra (cat. S-1000), el anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra (BA-1000), el kit ABC estándar (PK-6100), Vectashield (H-1500), AMCA (CI-2000), fueron utilizados de la marca VECTOR® y los anticuerpos anti-NR1, NR2A y NR2B (Chemicon, Temacula, CA), proporcionados por CTR SCIENTIFIC®: NR1 [1:1000(MAB363-Chemicon)], NR2A [1:1000(AB1555-Chemicon)], NR2B [1:1000(AB1557-Chemicon)] y NR2C [1:1000(AB1592P-Chemicon)]

## 7.2 Preparación de los animales

Se utilizaron ratas macho (cepa Wistar) de 14 días de edad PN, las cuales se criaron con la madre hasta la edad de sacrificio; el número de ratas recién nacidas se ajustó a 8 machos por caja, manteniéndose en condiciones de bioterio con ciclos luz-oscuridad 12x12 h, con una

temperatura de 24°C a 25°C y humedad relativa del 40%, con libre acceso al agua y al alimento hasta la edad de sacrificio.

El cuidado y manejo de animales estuvieron de conformidad con las leyes mexicanas de salud general y sus correspondientes capítulos (1987) y las pautas de salud de los institutos nacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH publicación No. 80.23, revisada 1996). Fueron hechos todos los esfuerzos para utilizar el menor número de animales y su sufrimiento.

Para evaluar los posibles cambios en la expresión molecular de los R-NMDA, en el hipocampo y corteza cerebral, en el modelo de excitotoxicidad por GMS se utilizaron dos grupos:

- Grupo I Animales intactos (grupo control)
- Grupo II Animales tratados con GMS con una dosis de (4mg/g de p.c.) vía subcutánea los días 1, 3, 5 y 7 de edad posnatal, tomado de Beas-Zárate y col., 2002.

### **7.3 Obtención de las muestras**

Tanto los animales control, como a los que se les administró GMS, se sacrificaron por decapitación, a los 14 días PN, utilizando material de disección previamente esterilizado en condiciones asépticas, se extrajo el encéfalo, y se obtuvo dos rebanadas de 4 mm de grosor aproximadamente, una fue de la parte anterior del cerebro, la zona de corteza motora anterior, y otra sección posterior en la que se extrajo la región del hipocampo. Posteriormente los tejidos cerebrales fueron pesados y almacenados a -70°C, hasta el día de la extracción del ácido ribonucleico total (RNA total).

### **7.4 Extracción de RNAtotal por el método de isotiocianato de guanidina**

Para la extracción del RNA total se utilizó el método de isotiocianato de guanidina (trizol) (Chomczynski y Sacchi 1987), después de obtener el tejido cerebral (corteza cerebral e hipocampo) se homogenizó con 500 µl de trizol por cada 50 mg de tejido. Continuando con una incubación de 5-8 min a 4°C, a la muestra se le adicionó cloroformo frío y centrifugó a 12,000 rpm durante 19 min, a 4°C.

Se separaron las dos fases (fenol-cloroformo/acuosa), a la fase acuosa se le adicionó un volumen igual de isopropanol frío (4°C), manteniéndose en reposo por 24 h a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron bajo las condiciones anteriores, durante 19 min.

El RNA precipitado se lavó con etanol al 75% dos veces, y al final se resuspendió con 30-50 µl de agua (dependiendo del tamaño de la pastilla) tratada previamente con dietilpircarbonato (DEPC) al 0.1%.

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 1.8 a 2.0.

### **7.5 Formación de DNAc utilizando transcriptasa reversa**

Para la síntesis del DNAc (retrotranscripción) 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 retro-transcripción (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 por último a 95°C durante 10 min. Se les adicionó agua estéril y se conservaron a -20°C hasta su utilización para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción: Taq DNA polimerasa (1 U/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 identificar la presencia del RNA que codifica para cada una de las subunidades del R-NMDA. Simultáneamente se utilizó la expresión del gen para b-actina, como gen constitutivo (control metodológico).

La secuencia de los oligonucleótidos, el tamaño del producto de la PCR y el número de acceso al Genbank, para identificar la secuencia del gen que codifica para las subunidades son los siguientes:

**NR1**, 5'- TACTACTGCCAACTTGGCAGCTTT -3' (oligonucleótido sentido localizado en la posición 2, 079) y 5'-CATGAAGACCCCTGCCATGTT-3' (oligonucleótido antisentido localizado en la posición 2,594), el producto de la PCR fue de 516 pares de bases y el número de acceso de esta secuencia en el Genbank es NM 17010.

**NR2A**, 5'- GAC TAC AGC CTG GAG GC AAG-3' (oligonucleótido sentido localizado en la posición 942) y 5'-AGGTGAACCTTCACAGTTCTG-3' (oligonucleótido antisentido localizado en la posición 1,493), el producto de la PCR es de 572 pares de bases y el número de acceso de esta secuencia en el Genbank es NM\_012573.31.

**NR2B**, 5'-GGATCTACCAGTCTAACATG -3' (oligonucleótido sentido localizado en la posición 1,333) y 5'-GATAGTTAGTGATCCCCTG-3' (oligonucleótido antisentido localizado en la posición 1,876), el producto de la PCR es de 563 pares de bases y el número de acceso de esta secuencia en el Genbank es NM\_012574.1.

**NR2C**, 5'-ACATGAAGTATCCAGTATGG -3' (oligonucleótido sentido localizado en la posición 1703) y 5'-GTTCTGGTTGTAGCTGACAG-3' (oligonucleótido antisentido localizado en la posición 2297) y el producto de la PCR es de 624 pares de bases y el número de acceso de esta secuencia en el Genbank es NM\_012575.

**NR2D**, 5'-AGGTGTTCTATCAGCGTG-3' (oligonucleótido sentido localizado en la posición 2310) y 5'-TGTAGCTGTGCATGTCAG -3' (oligonucleótido antisentido localizado en la posición 2910), el producto de la PCR es de 618 pares de bases y el número de acceso de esta secuencia en el Genbank es NM\_022797.

**b-actina**, 5'- CACCACAGCTGAGAGGGAAATCGTGCGTGA -3' (oligonucleótido sentido localizado en la posición 603), 5'- ATTTGCGGTGCACGATGGAGGGGCCGGACT-3' (oligonucleótido antisentido localizado en la posición 1120), el producto de la PCR es de 518 pares de bases y el número de acceso de esta secuencia en el Genbank es NM\_31144.

A las reacciones de amplificación se les adicionó aceite mineral para evitar su evaporación y las condiciones del termociclador (Techne TC-312) consistieron de una primera etapa a 95 °C por 5 minutos. Cada ciclo consistió de 95 °C por un minuto, 60 °C por 1 minuto y 72 °C por 1.5 minutos, con una etapa final de extensión a 72 °C por 5 minutos.

Los productos amplificados de la PCR, se corrieron en una cámara horizontal de electroforesis (Gibco BRL Horizon 58), junto con un marcador de peso molecular de 100 pb en un gel de agarosa al 1.5 %, que contenía bromuro de etidio 0.5 mg/ml; por 45 min a 60 volts (fuente de poder EC-105, Apparatus Corporation) en amortiguador TBE 1X. El gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (VILDER-LOURMAT) y se utilizó el sistema de foto-documentación Kodak Digital Science 1D Image Anaysis Software, para realizar la cuantificación de las bandas correspondientes. Los valores de densidad óptica para las diversas subunidades se normalizaron contra la expresión del RNAm del gen constitutivo para B-actina. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de absorbancia.

Los resultados obtenidos se procesaron mediante la prueba de análisis de varianza ANOVA de una vía y se expresaron como el promedio de 4 experimentos por duplicado, considerándose significativamente diferentes aquellos con una  $p < 0.05$ .

#### **7.6 Normalización de la $\beta$ -actina en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La concentración de RNA total es variable en cada muestra, esto debido al proceso de extracción así como a los niveles de expresión intracelular del RNA. Con esta base, se decidió normalizar los niveles de expresión de las subunidades NR1, NR2A-D utilizando el gen constitutivo de la proteína  $\beta$ -actina. Para esto se fijaron los ciclos y se agregó RNA total a la mezcla de reacción en la PCR hasta alcanzar un nivel de expresión de este gen semejante en todas las muestras, tanto testigo como experimentales.

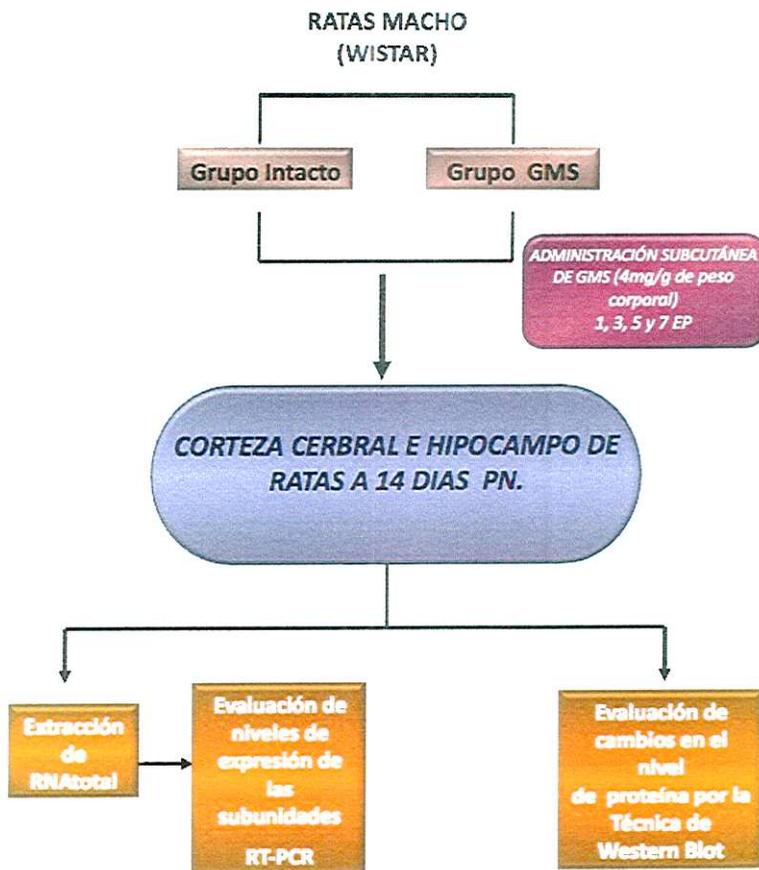
De esta forma se utilizó la misma cantidad de cDNA en la mezcla de reacción en la PCR para determinar los niveles de expresión de los genes correspondientes a las subunidades NR1 y NR2A-D.

### 7.7 Técnica de Western Blot

Ratas macho de la cepa Wistar se sacrificaron a los 14 días de EP y la corteza e hipocampo fueron rápidamente removidos y congelados a -95°C. El tejido se sometió a sonicación 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 cóctel inhibidor de proteasas (1 Tablet complete (1697498-Roche) en 2 ml H<sub>2</sub>O) 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 patrón, 50µg de proteína se separaron por electroforesis en un gel de SDS-polyacrylamida al 10% y se transfirieron a 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 hr.

La membrana se incubó con anti-NR1 o anti NR2A-D (Conejo); utilizado como anticuerpo primario para NR1 [1:1000(MAB363-Chemicon)], NR2A [1:1000(AB1555-Chemicon)], NR2B [1:1000(AB1557-Chemicon)] y NR2C [1:1000(AB1592P-Chemicon)] por 24 hr. Después se realizaron 5 lavados en amortiguador tris salino con 0.05% Tween-20 (BTTS), las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario: IgG biotinilada de cabra anti-conejo [1:1000 (BA1000-Vector Laboratories)] por 24 hrs. Después se realizaron 5 lavados con BTTS. Las membranas se incubaron con el complejo abidina- biotina- ABC Elite kit (PK6101- Vector Laboratories) por 1 hr. Después se realizaron tres lavados con BTTS, para ser revelados con diaminobenzidina (D5905-Sigma Chemical). El análisis se realizó tomando una fotografía digital de la membrana y utilizando un sistema de fotodocumentación, *Kodak Digital Science 1D Image Analysis*, se procede al análisis de las bandas de expresión de la proteína utilizando la herramienta de intensidad neta por el área de la banda.

# **VIII. DIAGRAMA EXPERIMENTAL**



# **IX. RESULTADOS**

### 9.1 Cambios en la expresión de la proteína y RNAm de la subunidad NR1 inducida por GMS.

La RT-PCR, evaluada a los 14 días de edad PN, del hipocampo de cerebro de ratas tratadas con GMS nos reveló un aumento en el nivel de expresión del RNAm de la subunidad NR1 en un 100% comparado con el control. Similarmente, la expresión de la proteína correspondiente también se vio elevada como una consecuencia al tratamiento con GMS, pero solo en un 40%, esto revelado por el análisis de Western Blot (Fig. 4 A).

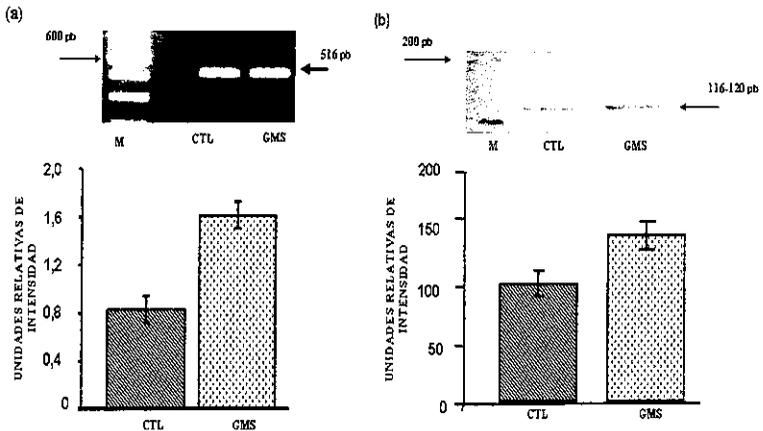
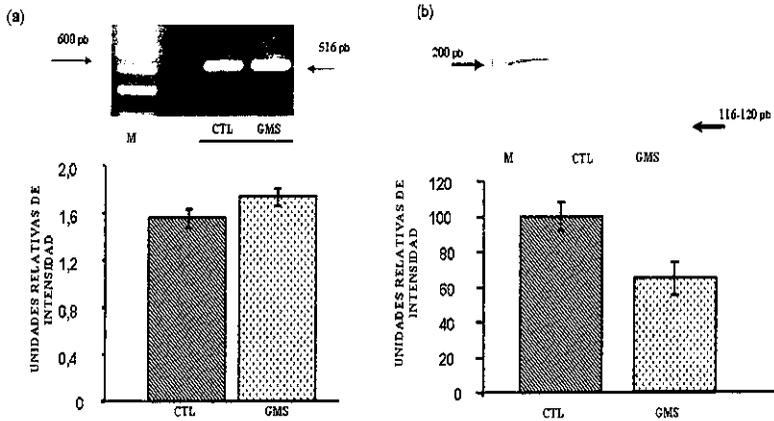


Figura 4 A. Expresión de la subunidad NR1 en el hipocampo.

Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de la subunidad NR1 del R-NMDA a los 14 días de EP. El panel a) expresa la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión del RNAm (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). El panel b) expresa la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión de la proteína (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). (M: Marcador de peso molecular; CTL: Control; GMS: Glutamato monosódico).

En contraste, en la corteza cerebral no se afectó el nivel de transcrito para la subunidad NR1, en esta misma edad, por el tratamiento con GMS, pero si se observó un menor nivel de expresión de la proteína de alrededor del 35% en comparación con el control (Fig. 4 B).

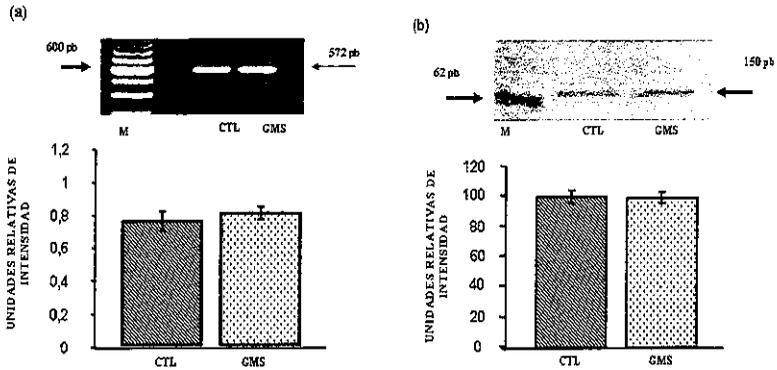


**Figura 4 B. Expresión de la subunidad NR1 en la corteza cerebral**

Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de la subunidad NR1 del R-NMDA a los 14 días de EP. El panel a) expresa la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión del RNAm (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). El panel b) expresa la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión de la proteína (\*  $p < 0.001$  GMS vs Control). (M: Marcador de peso molecular; CTL: Control; GMS: Glutamato monosódico).

## 9.2 Cambios en la expresión de la proteína y RNAm de la subunidad NR2A inducida por GMS.

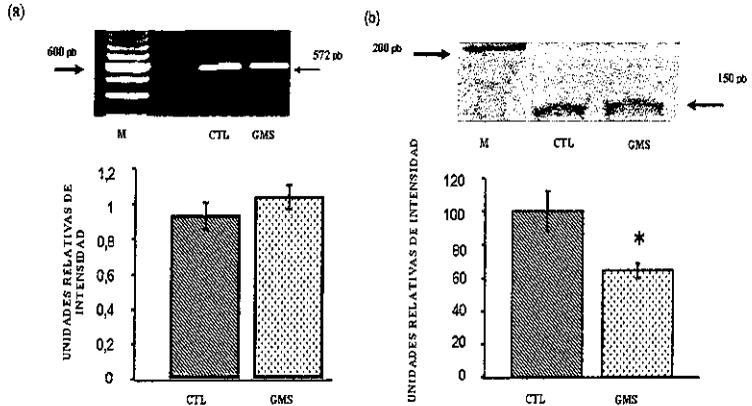
El nivel de expresión analizado de la subunidad NR2A, de hipocampo a los 14 días de edad PN, por la administración de GMS no presentó cambios estadísticamente significativos al compararlos con el control, de igual forma los resultados de la evaluación del nivel de expresión de la proteína, en esta misma región (Fig. 5 A).



**Figura 5 A. Expresión de la subunidad NR2A en el hipocampo**

Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de la subunidad NR2A del receptor NMDA a los 14 días de EP. El panel a) se muestra el gráfico de la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión del RNAm (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). El panel b) se grafica la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión de la proteína (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). (M: Marcador de peso molecular; CTL: Control; GMS: Glutamato monosódico).

Por otra parte, la corteza cerebral tampoco presentó cambios significativos en la expresión del RNAm, mientras que resultó en una disminución del 30% en la expresión de la proteína, comparada con el control (Fig. 5 B).



**Figura 5 B. Expresión de la subunidad NR2A en la corteza cerebral**

Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de la subunidad NR2A del receptor NMDA a los 14 días de EP. El panel a) se muestra el gráfico de la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión del RNAm (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). El panel b) se grafica la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión de la proteína (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). (M: Marcador de peso molecular; CTL: Control; GMS: Glutamato monosódico).

### 9.3 Cambios en la expresión de la proteína y RNAm de la subunidad NR2B inducida por GMS.

La administración de 4mg/g p.c de GMS indujo un incremento importante de cerca del 260% en la expresión del RNAm de la subunidad NR2B, al día 14 de edad PN, esto en la formación hipocampal, al compararlo con los controles de la misma edad, esto revelado por la RT-PCR. Mientras que el análisis de Western Biot no reveló ninguna diferencia, en el nivel del producto de transcripción, con respecto al control (Fig. 6 A).

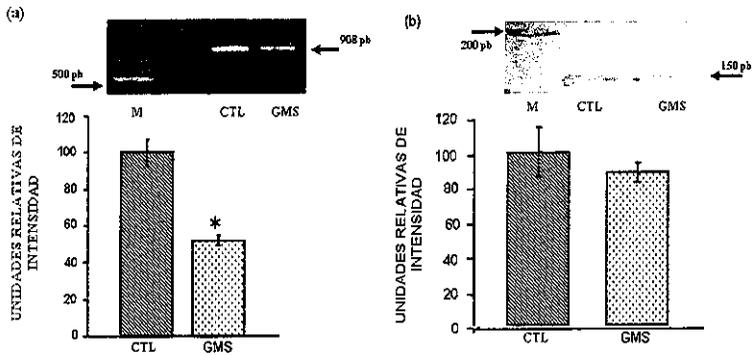
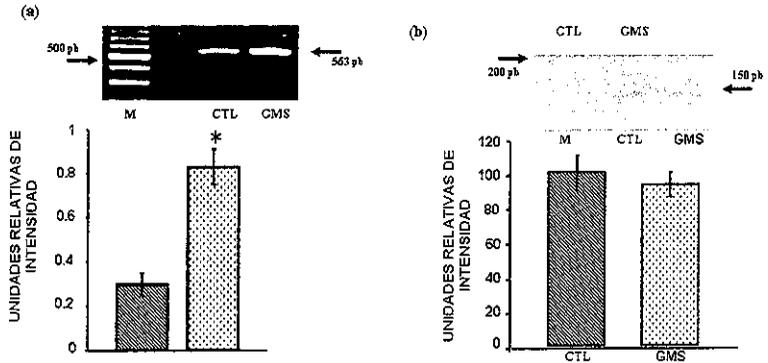


Figura 6 A. Expresión de la subunidad NR2B en el hipocampo

Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de la subunidad NR2B del receptor NMDA a los 14 días de EP. El panel a) expresa la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión del RNAm (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). El panel b) expresa la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión de la proteína (\*  $p < 0.001$  GMS vs Control). (M: Marcador de peso molecular; CTL: Control; GMS: Glutamato monosódico).

En la corteza cerebral el nivel de RNAm, para NR2B, disminuyó en un 50%, con respecto al control. Sin embargo, el análisis de Western Blot no reveló ningún cambio en la expresión de la subunidad NR2B (Fig. 6 B).

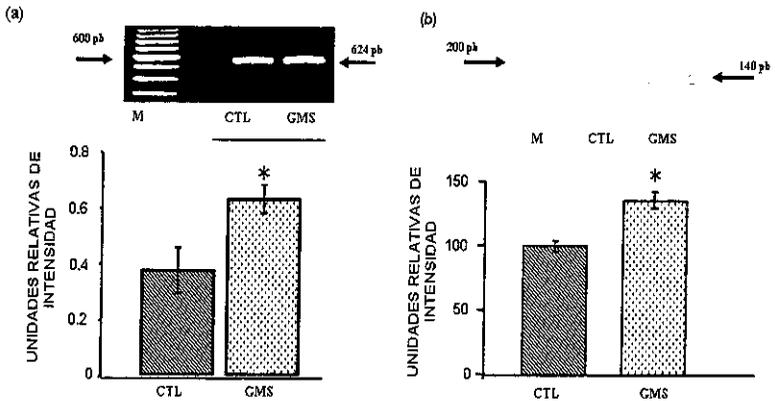


**Figura 6 B. Expresión de la subunidad NR2B en la corteza cerebral**

Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de la subunidad NR2B del receptor NMDA a los 14 días de EP. El panel a) expresa la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión del RNAm (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). El panel b) expresa la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión de la proteína (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). (M: Marcador de peso molecular; CTL: Control; GMS: Glutamato monosódico).

#### 9.4 Cambios en la expresión de la proteína y RNAm de la subunidad NR2C inducida por GMS.

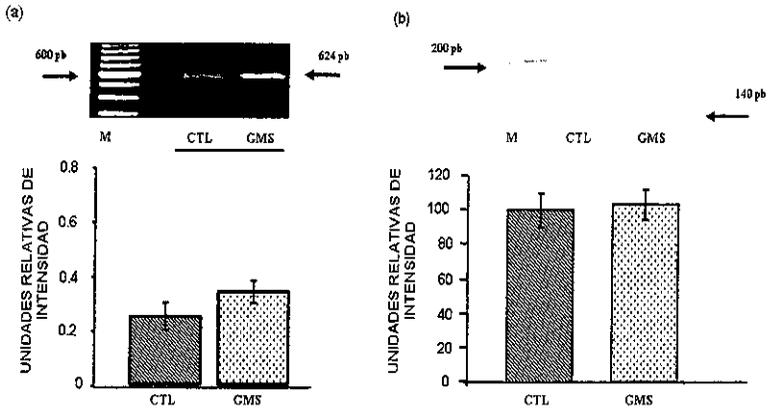
El nivel del RNAm de la subunidad NR2C en el hipocampo a los 14 días de edad PN, expuestos a la administración sistémica de GMS, se elevó en un 40% comparado con los controles correspondientes, además se observó un aumento en el nivel de expresión proteica en un 30% en la misma región (Fig. 7 A).



**Figura 7 A. Expresión de la subunidad NR2C en el hipocampo**

Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de la subunidad NR2C del receptor NMDA a los 14 días de EP. El panel a) expresa la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión del RNAm (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). En el panel b) se grafica la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión de la proteína (\* $p < 0.001$  GMS vs Control). (M: Marcador de peso molecular; CTL: Control; GMS: Glutamato monosódico).

Por otra parte, en la corteza cerebral no se afectó el nivel de transcripción, del grupo tratado con GMS con respecto al control; de la misma forma, en cuanto a la expresión de la proteína NR2C no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la corteza cerebral de ambos grupos de estudio (Fig. 7B).



**Figura 7 B. Expresión de la subunidad NR2C en la corteza cerebral**

Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de la subunidad NR2C del receptor NMDA a los 14 días de EP. El panel a) expresa la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión del RNAm ( $*p < 0.001$  GMS vs Control). En el panel b) se grafica la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos por duplicado de los niveles de expresión de la proteína ( $*p < 0.001$  GMS vs Control). (MW: Marcador de peso molecular; CTL: Control; GMS: Glutamate monosódico).

### **9.5 Expresión del RNAm de la Subunidad NR2D**

Utilizando la técnica de RT-PCR, no fueron detectados niveles en la expresión del RNAm para la subunidad NR2D, ni en el hipocampo, ni en la corteza cerebral de las ratas de 14 días de edad PN, en ninguno de los grupos de estudio evaluados.

# **X. DISCUSIÓN**

Se ha sugerido que la sobreactivación de los R-NMDA juega un papel fundamental en la muerte neuronal excitotóxica en varias condiciones patológicas como la epilepsia y la hipoxia-isquemia (Lynch and Guttman, 1992; Lipton and Rosenberg, 1994; Lee y col., 1999; Dirnagl y col 1999; Olney 1986). Sin embargo, la continua estimulación de los R-NMDA también pueden tener consecuencias en las funciones y propiedades del receptor. Así, el propósito de este estudio fue tratar de responder a la pregunta de si un incremento sustancial en el nivel de L-glutamato, como el observado en diferentes situaciones patológicas, en el cerebro neonatal de rata podría afectar la composición del R-NMDA a través de modificaciones en la expresión de las subunidades que constituyen dicho receptor.

Así, en este trabajo reportamos que la administración de 4 dosis de glutamato monosódico a ratas en edad neonatal, induce modificaciones en la expresión del RNAm, para algunas de las subunidades de R-NMDA en la corteza cerebral e hipocampo. En la corteza cerebral de ratas tratadas con GMS se observó una disminución en la expresión del RNAm de la subunidad NR2B comparada con el control correspondiente. Sin embargo, en el hipocampo la administración neonatal de GMS resultó en un incremento en los niveles del RNAm de las subunidades NR1, NR2B y NR2C. Es importante mencionar que la expresión del RNAm de la subunidad NR2A no se afectó por el tratamiento de GMS de las regiones examinadas.

La expresión diferencial, evidenciada bajo las condiciones de excitotoxicidad por la aplicación de GMS, de las subunidades que constituyen

el R-NMDA, puede ser considerada como una respuesta adaptativa al incremento sustancial de L-glutamato en el cerebro.

En estudios previos, con este mismo modelo de excitotoxicidad, se ha demostrado, un incremento en la expresión del RNAm para las subunidades NR1 y NR2A, en el estriado e hipocampo, con respecto al control, en ratas de 60 días de edad posnatal (Beas-Zárate y col., 2001), además, en la corteza cerebral también se han evaluado los efectos del GMS sobre la expresión del RNAm de la subunidad NR1, en diferentes edades y se ha observado que se induce un incremento particularmente a los 8 y 10 días de edad posnatal (Rivera-Cervantes y col., 2004).

Se ha establecido ampliamente, en estudios de hibridación *in situ* y de biología molecular que durante el desarrollo postnatal normal, de la rata, se presenta la expresión diferencial, tanto espacial como temporal, de la composición de las subunidades que constituyen el R-NMDA (Sans y col., 2000 and Liu y col., 2004; Sheng y col., 1994; Cull-Candy y col., 2001), lo que determina mecanismos de ajuste en la actividad del R-NMDA en acorde a las necesidades fisiológicas en una región particular del cerebro y la fase de desarrollo específica (Ishii y col., 1993; Sakimura y col., 1995; Takahashi y col., 1996). Por otra parte, se ha mostrado que durante un periodo crítico del desarrollo postnatal temprano, el cerebro es particularmente susceptible a la excitotoxicidad mediado a través de los R-NMDA (Mitani y col., 1998).

Los R-NMDA usualmente están compuestos de dos subunidades NR1 y por lo menos una de las subunidades NR2. En el hipocampo de rata adulta, las subunidades NR2A y NR2B son predominantes (Wenzel y col., 1997).

La muerte neuronal inducida por GMS en el hipocampo se acompaña por el incremento en la expresión del RNAm de las subunidades NR1, NR2B y NR2C, sugiriendo que las neuronas que sobreviven al daño expresan R-NMDA que difieren en la composición de la subunidad de aquellos expresados durante el desarrollo posnatal normal. Este hallazgo se puede considerar como una respuesta adaptativa a la estimulación intensificada y patológica de los R-NMDA, bajo estas condiciones durante la etapa neonatal. Los cambios en la composición de las subunidades del R-NMDA pueden indicar alteraciones en las propiedades funcionales de los receptores recientemente expresados, por ejemplo mostrando cambios en la sensibilidad, así como en la afinidad al agonista endógeno, el L-glutamato. Los cambios consistentes en la composición del R-NMDA, predominantemente de las subunidades NR1/NR2B a NR1/NR2A durante el desarrollo, también se acompañan por modificaciones en la cinética de la respuesta postsináptica excitadora mediada por los R-NMDA (Barth and Malenka, 2001; Lu y col., 2001).

La exposición aguda a NMDA en el hipocampo de rata, en diferentes etapas del desarrollo postnatal, demostró cambios en la composición de las subunidades del R-NMDA (Zhou and Baudry, 2006). Algunos autores sugieren que una baja en la expresión de las subunidades, en particular NR1 exhibe una respuesta de protección de algunas neuronas a la excitotoxicidad inducida por altas concentraciones de agonistas a R-Glu (Gascon y col., 2005; Cebers y col 2001)

Los datos obtenidos por el análisis de Western Blot y por la RT-PCR en los cambios inducidos por el tratamiento con GMS de las subunidades no correspondieron en general con la modificación en su expresión.

El tratamiento neonatal con GMS incrementó la expresión del RNAm y la proteína de las subunidades NR1, NR2B y NR2C con respecto al control en el hipocampo.

En este sentido, diferentes evidencias experimentales han demostrado que las modificaciones en los niveles de Glu extracelular inducen cambios en los niveles de expresión de las subunidades que constituyen los R-NMDA (Limin y col., 1998, Cebers y col., 2001). Dado que, la subunidad NR1 es indispensable en la formación de R-NMDA funcionales y su nivel de expresión podría determinar la conformación y por lo tanto la abundancia del R-NMDA (Seeburg, 1993); los resultados obtenidos sugieren que el incremento en la formación de R-NMDA podría llevar la acumulación de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  en el espacio intracelular, esto constituye un componente importante en el proceso de daño neuronal mediado por la aplicación neonatal de GMS.

Además, los cambios en los niveles de expresión de las subunidades NR2A y NR2D, por efecto de la aplicación de GMS, no fueron significativos en el hipocampo. De esta forma, podríamos deducir que bajo condiciones de excitotoxicidad se promueve la formación de R-NMDA heteroméricos NR1/NR2B que favorecería la formación de un mayor número de receptores NMDA, con características fisiológicas que facilitan su activación, como las que confiere la presencia de la subunidad NR2B, en el receptor.

Las evidencias experimentales sugieren que la actividad funcional, así como la abundancia, de R-NMDA parece estar regulado por mecanismos dependientes de actividad (Fiedels y Nelson, 1992; Didier y col., 1994; Resink y col., 1995).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto y con los resultados que se obtuvieron en este trabajo, resulta difícil precisar las implicaciones fisiopatológicas y el significado que podría tener los cambios en la expresión de los niveles del RNAm y la proteína de las subunidades NR1, NR2B, NR2C; después de la administración neonatal de GMS. Sin embargo estos cambios en la expresión podrían estar asociados a modificaciones en la excitabilidad de las neuronas, por lo que será necesario continuar con experimentos adicionales para profundizar y ampliar el conocimiento al respecto.

# **XI.**

# **CONCLUSIONES**

1. El tratamiento neonatal con GMS no modifica los niveles de expresión del RNAm y la proteína de las subunidades NR2A del R-NMDA en el hipocampo de rata a los 14 días de edad PN.
2. El tratamiento neonatal con GMS aumenta los niveles de expresión tanto del RNAm como de la proteína para las subunidades NR1, NR2B y NR2C en el hipocampo.
3. En la corteza cerebral disminuyó el nivel de expresión del RNAm para la subunidad NR2B, y la proteína de las subunidades NR1 y NR2A.
4. La subunidad NR1 es indispensable en la formación del R-NMDA funcional y su nivel de expresión podría determinar la conformación y por lo tanto la abundancia del receptor; la presencia de al menos una subunidad NR2B, dentro de un R-NMDA funcional, le confiere una mayor afinidad por el ligando endógeno, el Glu; los resultados del presente trabajo permiten proponer que el GMS favorece la formación de R-NMDA, con características fisiológicas que facilitan su activación.
5. Por lo tanto, la expresión diferencial de las subunidades del receptor, seguida de la exposición a GMS, puede representar un mecanismo por el cual la célula responde a una alteración en la transmisión sináptica.

**XII.**  
**BIBLIOGRAFIA**

ANDINE P, ORWAR O, JAKOBSON I, SANDBERG M, HAGBERG H. Changes in extracellular aminoacids and spontaneous neuronal activity during ischemic and extended reflow in the CA1 of the rat hippocampus. *J Neurochem* 57:222-229, 1991.

ANKARKONA M, ZHIVOTOVSKY B, HOLMSTROM T. Lamin and beta-tubulin fragmentation precedes chromatin degradation in glutamate induced neuronal apoptosis. *Neuroreport* 7:2659-2665, 1996.

BEAS-ZARATE C, RIVERA-HUIZAR SV, MARTÍNEZ-CONTRERAS A, FERIA-VELASCO A, ARMENDARIZ-BORUNDA J. Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. *Neurochem Int* 39:1-10, 2001.

BEAS-ZÁRATE, C., M.E., FLORES SOTO, AND J. ARMENDARIZ-BORUNDA. NMDAR-2C and 2D subunits gene expression is induced in brain by neonatal exposure of monosodium L-glutamate to adult rats. *Neuroscience Letters*, 32(1-2), 9-12, 2002.

BEILHARZ EJ, WILLIAMS CE, DRAGUNOW M, SIRIMANNE ES, GLUCKMAN PD. 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, 1995.

BENGZON, J., OKABE, S., LINDVALL, O., MCKAY, R. Suppression of epileptogenesis by modification of N-methyl d-aspartate receptor subunit composition. *European Journal of Neuroscience* 11, 916-922, 1999.

BERNARD A, KHRESTCHATISKY M. Assessing the extent of RNA editing in the TMII regions of GluR5 and GluR6 kainate receptors during rat brain development. *J Neurochem*. May;62(5):2057-60, 1994.

BETTLER B AND MULLE C. *Neuropharmacology* 34, 123-139, 1995

CATHALA L, MISRA C, CULL-CANDY S. Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. *J Neurosci* 20: 5899- 5905, 2000.

CEBERS, G., CEBERE, A., KOVÁCS, A.D., HÖGBERG, H., MOREIRA, T., LILJEQUIST, S. Increased ambient glutamate concentration alters the expression of NMDA receptor subunits in cerebellar granule neurons. *Neurochemistry International*, 39(2):151-60, 2001.

COLONNESE MT, ZHAO JP, CONSTANTINE-PATON M: NMDA receptor currents suppress synapse formation on sprouting axons in vivo. *J Neurosci*, 25(5):1291-1303, 2005.

- CULL-CANDY, S., BRICKLEY, S., FARRANT, M. NMDA-Receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 327–335, 2001.
- CULL-CANDY SG, LESZKIEWICZ DN: Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE*, 2004(255):re16, 2004.
- CHOI DW. Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J Neurosci* 10:2493-2501, 1990.
- CHOI DW. Calcium: still center stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18:58-60, 1995.
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step of isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytic Biochem* 162:156-159, 1987.
- DiDIER M, MIENVILLE JM, SOUBRIE P, BOCKAERT J, BERMAN S, BURSZTAJN S, PIN JP. Plasticity of NMDA receptor expression during mouse cerebellar granule cell development. *Eur J Neurosci* 6: 1536-1543, 1994.
- DINGLELINE R, MCBAIN C. Glutamate and aspartate . In: Siegel GJ, Agranoff BW, Uhler ME, editors. *Basic neurochemistry*. Philadelphia: Lippincott Raven press. P 315-333, 1999.
- DINGLELINE R, BORGES K, BOWIE D, TRAYNELIS SF: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, 51(1):7-61, 1999.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C., MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neuroscience* 22, 391–397, 1999.
- FADEN AI, DEMEDIUK P, PANTER SS, VINK R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244:798-800, 1989.
- FERRER I, MARTIN F, SERRANO T, REIRIZ J, PEREZ-NAVARRO E, ALBERCH J, MACAYA A, PLANAS AM. Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins. *Acta Neuropathol* 90:504-510, 1995.
- FIELDS RD, NELSON PG. Activity-dependent development of the vertebrate central nervous system. *Inter Rev Neurobiol* 34: 133-214, 1992
- FILIPKOWSKI RK, HETMAN M, KAMINSKA B, KACZMAREK L. DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *Neuroreport* 5:1538-40, 1994.

FU Z, LOGAN SM, VICINI S. Deletion of the NR2A subunit prevents developmental changes of NMDA-mEPSCs in cultured mouse cerebellar granule neurons. *J Physiol* 563: 867- 881, 2005.

GASCÓN, S., DEOGRACIAS, R., SOBRADO, M., RODA, J.M., RENART, J., RODRÍGUEZ-PEÑA, A., DÍAZ-GUERRA, M. Transcription of the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *Journal Biological Chemistry*, 280(41):35018-27, 2005.

GONOI T, MIZUNO N, INAGAKI N, KUROMI H, SEINO Y, MIYAZAKI J, SEINO S. Functional neuronal ionotropic glutamate receptors are expressed in the non-neuronal cell line Min6. *J Biol Chem*. 269(25):16989-92, 1994.

GREENAMYRE JT, PENNEY JB, YOUNG AB, D'AMATO CJ, HICKS SP, SHOULSON I. Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Science* 227:1496-1499, 1985.

GWAG BJ, KOH JK, DEMARO JA, YING HS, JACQUIN M, CHOI DW. Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. *Neuroscience* 77:393-401, 1997.

HOF P, TRAPP B, JEAN DE VELLIS, CLAUDIO L, COLMAN D. The cellular components of nervous tissue. *Fundamental Neuroscience*. Editors: Zigmond M, Bloom F, Roberts J, Landis S, Squire L. pp 41-70. London. Academic press. 1999a.

HOLLMANN M, HEINEMANN S: Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17:31-108, 1994.

ISHII, T., MORIYOSHI, K., SUGIHARA, H., SAKURADA, K., KATDATANI, H., YOKOI, M., AKASAWA, C.M., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N., MASU, M., Molecular characterization of the family of the N-Methyl-D- aspartate receptor subunits. *Journal of Biological Chemistry* 268, 2836–2843, 1993.

IWAYAMA Y, HASHIMOTO K, NAKAJIMA M, TOYOTA T, YAMADA K y cols.: Analysis of correlation between serum D-serine levels and functional promoter polymorphisms of GRIN2A and GRIN2B genes. *Neurosci Lett*, 394(2):101-104, 2005.

KANDEL E. The brain and Behavior. Principles of Neural Science. Editors: Kandel E, Schwartz J, Jessell T. pp 5-18. U.S.A. McGraw-Hill, 2000.

KANDEL E. SIEGELBAUM S. Overview of synaptic transmission. Principles of Neural Science. Editors: Kandel E, Schwartz J, Jessell T. pp 175-185. U.S.A. McGraw-Hill, 2000.

KEINANEN K, WISDEN W, SOMMER B, WERNER P, HERB A.: A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science*, 249(4968):556-560, 1990.

KIM MJ, DUNAH AW, WANG YT, SHENG M. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron*. 46(5):745-60, 2005.

KITAYAMA T, YONEYAMA M, TAMAKI K, YONEDA Y: Regulation of neuronal differentiation by N-methyl-D-aspartate receptors expressed in neural progenitor cells isolated from adult mouse hippocampus. *J Neurosci Res*, 76(5):599-612, 2004.

KOHR G, HEINEMANN U. Effects of NMDA antagonists on picrotoxin-low Mg and low Ca induced epileptogenesis and on evoked changes in extracellular Na and Ca concentrations in rat hippocampal slices. *Epilepsy Res* 4:187-200, 1989.

KOMURO H, RAKIC P: Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260(5104):95-97, 1993.

KRAPIVINSKY G, KRAPIVINSKY L, MANASIAN Y, IVANOV A, TYZIO R, PELLEGRINO C, BEN-ARI Y, CLAPHAM DE, MEDINA I. The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron*. 13;40(4):775-84, 2003

KURE S, TOMINAGA T, YOSHIMOTO T, TADA K, NARISAWA K. Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 179:39-45, 1991.

LAURIE DJ, SEEBURG PH: Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* 14(5 Pt 2):3180-3194, 1994.

LAURIE, D.J., BARTKE, I, SCHOEPFER, R., NAUJOKS, K., SEEBURG, P.H. Regional, developmental and interspecies expression of the four NMDAR2 subunits, examined using monoclonal antibodies. *Molecular Brain Research* 51, 23-32, 1997.

LEE, J.M., ZIPFEL, G.J., CHOI, D.W. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399, A7-A14, 1999.

LEE LJ, ERZURUMLU RS: Altered parcellation of neocortical somatosensory maps in N-methyl-D-aspartate receptor deficient mice. *J Comp Neurol*, 485(1):57-63, 2005.

LERMA J: Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci*, 4(6):481-495, 2003.

LESORT M, ESCLAIRE F, YARDIN C, HUGON J. NMDA induces apoptosis and necrosis in neuronal cultures. Increased APP immunoreactivity is linked to apoptotic cells. *Neurosci Lett* 221:213-216, 1997.

LI JH, WANG YH, WOLFE BB, KRUEGER KE, CORSI L. Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons. *Eur J Neurosci*, 10(5):1704-1715, 1998.

LIPTON, S.A., ROSENBERG, P.A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England Journal of Medicine* 330, 613–22.

LIU, Q., WONG-RILEY, M.T. Developmental changes in the expression of GABAA receptor subunits alpha1, alpha2, and alpha3 in the rat pre-Botzinger complex. *J Appl Physiol.*, 96(5):1825-31, 2004.

LODISH H, BERK A, ZIPURNISKY S, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL J. Neurotransmitter Receptors. *Molecular Cell Biology*. Editors: Lodish H, Berk A, Zipurnsky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J., pp 944-950. New York. Freeman and Company. 2000.

LOWRY O, ROSENBROUGH N, FARR A, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.

LUJAN R, SHIGEMOTO R, LOPEZ-BENDITO G: Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*, 130(3):567-580, 2005.

LUCAS DR, MADDEN DR. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3(2):91-101, 2002.

LYNCH, D.R., GUTTMANN, R.P. 2002. Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J. Pharmacol Exp Ther.*; 300(3):717-23.

MCDONALD, J.W., JOHNSTON, M.V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research Reviews* 15, 41–70, 1990.

MITANI, A., MASAHIKO, W., KATAOKA, K. Functional change of NMDA related to enhancement of susceptibility to neurotoxicity in the developing pontine nucleus. *Journal of Neuroscience* 18, 7941–7952, 1998.

MONYER H, JONAS P, ROSIER J. Molecular determinants controlling functional properties of AMPARs and NMDARs in the mammalian CNS. In: Jonas P, Monyer H, eds. *Ionotropic Glutamate Receptors in the CNS*. New York: Springer. 309- 339, 1999.

NAKANISHI S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603, 1992.

NICOTERA P, LEIST M, MANZO L. Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 20:46-51, 1999.

OLNEY JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721, 1969.

OLNEY JW. Neurotoxicity of excitatory aminoacids. In: Kainic acid as a tool in neurobiology. Editors: McGeer EG, Olney JW, McGeer PL, pp 95-121. New York. Raven Press (1978)

OLNEY JW, DeGUBAREFF T. Glutamate neurotoxicity and Huntington's Chorea. *Nature* 271: 557-559. (1978)

OSHIMA S, FUKAYA M, MASABUMI N. Early onset of NMDA receptor GluR épsilon 1 (NR2A) expression and its abundant postsynaptic localization in developing motoneurons of the mouse hypoglossal nucleus. *Neurosci Res* 43:239-250, 2002.

PEARSE IA, CAMBRAY-DEAKIN MA, BURGOYNE RD. Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett* 223:143-147, 1987.

PETRALIA RS, SANS N, WANG YX. Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 29: 436- 452, 2005.

PORTERA-CAILLIAU C, PRICE DL, MARTIN LJ. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J comp Neurol* 378:70-87 (1997a).

PORTERA-CAILLIAU C, PRICE DL, MARTIN LJ. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal death in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neural* 378:88-104 (1997b)

RESINK A, VILLA M, BENKE D, MOLER H, BALAZS R. Regulation of expression of NMDA receptor subunit in rat cerebellar granule cells: effects of chronic K<sup>+</sup>-induced depolarization and NMDA exposure. *J Neurochem*, 64: 558-565, 1995

RITTER LM, VAZQUEZ DM, MEADOR-WOODRUFF JH: Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*, 139(2):227-236, 2002.

RIVERA-CERVANTES, M., SEGURA-TORRES, J., FERIA-VELASCO, A., ARMENDARIZ-BORUNDA, J., BEAS-ZÁRATE, C., NMDA and AMPA receptors expression and cortical neuronal death are associated with p38 in glutamate-induced excitotoxicity in vivo. *Journal of Neuroscience Research* 76, 678–687, 2004.

ROTHMAN SM, OLNEY JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105-111, 1986.

- SAKIMURA K, KUTSUWADA T, ITO I, MANABE T, TAKAYAMA C, KUSHIYA E, YAGI T, AIZAWA S, INOUE Y, SUGIYAMA H, MISHINA M. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor  $\epsilon$ 1 subunit. *Nature* 373:151-155, 1995.
- SANS N, PETRALIA RS, WANG YX. A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20: 1260-1271, 2000.
- SEEBURG PH. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 16:359-365, 1993.
- SHENG, M., CUMMINGS, J., ROLDAN, L.A., JAN, Y.N., JAN, L.Y.,.. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368,144-147, 1994
- SIESJO BK, BENGTSSON F. Calcium fluxes, calcium antagonists, a calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:127-140, 1989.
- SUN L, MARGOLIS FL, SHIPLEY MT, LIDOW MS: Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS Lett*, 441(3):392-396, 1998.
- TAKAHASHI, T., FELDMEYER, D., SUZUKI, N., ONODERA, K., CULL-CANDY, S.G., SAKIMURA, K., MISHINA, M.,.. Functional correlation of NMDA receptor  $\epsilon$  subunits expression with the properties of single channel and synaptic currents in the developing cerebellum. *Journal of Neuroscience* 16, 4376-4382, 1996.
- TAKAI, H., KATAYAMA, K., UETSUKA, K., NAKAYAMA, H., DOI, K. Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. *Experimental and Molecular Pathology* 75, 89-94, 2003.
- TURSKI L, BRESSLER K, RETTING KJ, LOSCHMANN PA, WACHTEL H. Protection of substantia nigra from MPP<sup>+</sup> neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 249:414-418, 1991.
- WIDEN W, SEEBURG PH. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci.* 13(8):3582-98, 1993
- YOUNG AB, GREENAMYRE JT, HOLLINGSWORTH Z, ALBIN R, D'AMATO C, SHHOULSON I, PENNEY JB. NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 241:981-983, 1988.
- ZUCKER R, KULLMANN D, BENNETT M. Release of Neurotransmitters. *Fundamental Neuroscience*. Editors: Zigmond M, Bloom F, Roberts J, Landis S, Squire L. pp 155-192. London. Academic press. 1999.

# **XIII. APENDICE**

## Apéndice 1

### Preparación de soluciones para ensayos de RT-PCR

Para preparar el agua DEPC 0.1%, se adiciono 1 ml de dietilpirocarbonato por cada litro de agua.

#### Mezcla de reacción para cDNA:

• Amortiguador 5X para RT	4.0 $\mu$ l
• dNTPs 2.5 mM en mezcla	4.0 $\mu$ l
• DTT (directo del kit)	2.0 $\mu$ l
• Random primers (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
• RNAsin (1U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
• RT (200U/ $\mu$ l)	2.0 $\mu$ l
	<hr/>
	14.0 $\mu$ l por muestra

#### Mezcla de reacción para PCR:

• Agua estéril inyectable	26.0 $\mu$ l
• Iniciador sentido (3 $\mu$ M)	5.0 $\mu$ l
• Iniciador antisentido (3 $\mu$ M)	5.0 $\mu$ l
• dNTPs (2.5 Mm)	2.0 $\mu$ l
• Amortiguador 10X	5.0 $\mu$ l
• MgCl (50mM)	5.0 $\mu$ l
• Taq polimersa (1U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
	<hr/>
	49.0 $\mu$ l por muestra

La mezcla de reacción se prepara por separado y se pone 49  $\mu$ l de la mezcla + 1  $\mu$ l dela muestra de cDNA por cada ensayo.

#### Amortiguador TBE 10X

- Trizma base 0.89 M
- EDTA 0.025 M
- Ácido bórico 0.89 M

## Apéndice 2

### AMORTIGUADOR DE LISIS:

Homogenizar cada muestra en 1 ml de buffer de lisis (920  $\mu$ l de regulador de lisis + 80  $\mu$ 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 <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	10 mM	5 ml
NP <sub>40</sub>	-----	1 ml

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

### REACTIVOS:

Reactivo "A" :Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2 % en NaOH 1.0 N (5 gr. de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 250 ml NaOH 0.1 N ) (NaOH 0.1 N = 1 gr. de NaOH en 250 ml de H<sub>2</sub>O).

Reactivo "B" : CuSO<sub>4</sub> al 0.5 % en Citrato de sodio al 1 %  
(0.05 gr. de CuSO<sub>4</sub> en 10 ml de Citrato de sodio)  
(Citrato de sodio 1%: 1 gr. de Citrato de Sodio en 100 ml H<sub>2</sub>O)

Reactivo "C" :

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

Reactivo "D" 1 ml de reactivo FOLIN+ 1.3 ml de H<sub>2</sub>O.

### Procedimiento

- Diluir las muestras de acuerdo a su contenido esperado de proteínas.
- Tomar 20  $\mu$ l de cada dilución.
- Agregar 2 ml de Reactivo "C" agitar y reposar 10 min.
- Agregar 200  $\mu$ l 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).

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	4.0ml
Tris-HCL 1.5M pH 8.8.....	2.5ml
Acilamida-Bis.....	3.3ml
SDS 10%.....	100 $\mu$ l
Temed.....	4 $\mu$ l

#### GEL CONCENTRADOR:

5% (3 ml)

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	2.1ml
Tris-HCL 0.5M pH 6.8.....	38 $\mu$ l
Acilamida-Bis.....	500 $\mu$ l
SDS 10%.....	30 $\mu$ l
Temed.....	3 $\mu$ l

### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Tomar el volúmen correspondiente a 50 µg de proteínas y mezclarlo en partes iguales con el buffer de muestra (solución desnaturalizante 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 NR1), (Anti NR2A), (Anti NR2B), (Anti NR2C)

Dilución 1:1000

#### ANTICUERPO SECUNDARIO

(Anti Conejo)

1:1000

BIBLIOTECA CUCBA