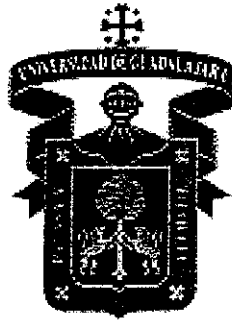


UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS.**

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES.



**Modulación de la expresión de la NCAM de 120 KDa y
residuos de ácido siálico por estradiol y progesterona, y
análisis de su capacidad de unión al RvPo.**

TESIS

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

LUIS FELIPE GARCÍA ANACLETO.

Las Agujas, Zapopan, Jalisco a 7 de Diciembre del 2009



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

1298/ C. C.BIOLOGÍA

C. Luis Felipe García Anacleto

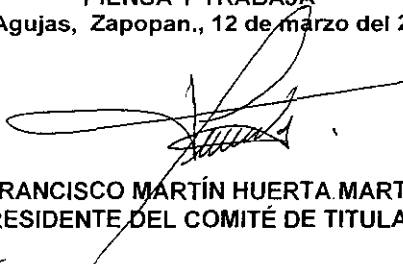
PRESENTE

Manifetamos 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: **“Modulación de la expresión de la PSA-NCAM de 120 KDa por estradiol y progesterona y análisis de su capacidad de unión al RvPo”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **Dr. Mario A. Ramírez Herrera** y como asesor/a (asesores) a **Dra. María L. Mendoza Magaña** y a la **Dra. Mónica Ayub Ayala.**

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

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
Las Agujas, Zapopan., 12 de marzo del 2008.



DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P.A. 

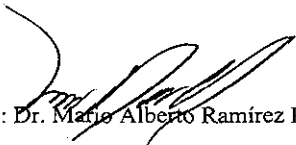
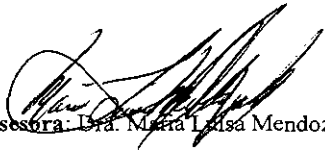
M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

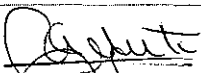
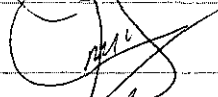


Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad "Tesis e informes", opción "Tesis" con el título: **"Modulación de la expresión de la NCAM de 120 KDa y residuos de ácido sialico por estradiol y progesterona, y análisis de su capacidad de union al RvPo"** que realizó el pasante **Luis Felipe García Anacleto** con número de código **B00002046** 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
 Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
 Km. 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Predio Las Agujas, Nextipac, Zapopan,
 Jalisco a 13 de Noviembre del 2009.

 
 Director: Dr. Mario Alberto Ramirez Herrera Asesora: Dra. Maria Luisa Mendoza Magaña.


 Asesora: Dra. Mónica Ayub Ayala.

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Alberto Morales Villagran.		20/nov/2009
Mtra. Rosa Maria Domínguez Arias.		20 nov/09
Mtra. Dolores Marina Barragán Reynaga.		24/nov/09
Dra. Mónica Ayub Ayala		24/Nov/09

7650


UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA
SALUD
LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGIA**

**Modulación de la expresión de la NCAM de 120 KDa
y residuos de ácido siálico por estradiol y
progesterona, y análisis de su capacidad de unión
al RvPo.**

Presentado por:

Luis Felipe García Anacleto.

Director:

Dr. Mario Alberto Ramírez Herrera.

Asesor:

Dra. María Luisa Mendoza Magaña.

Asesor interno:

Dra. Mónica Ayub Ayala.

INDICE.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	7
❖ Epidemiología del Rubulavirus porcino.....	7
1. Características y estructura viral.....	7
2. Clasificación.....	8
3. Patología del RvPo.....	9
❖ Identificación del receptor para el RvPo.....	10
❖ Moléculas de adhesión celular neuronal y polisialización.....	11
❖ Función de las hormonas esteroideas sexuales	13
❖ Neuroesteroides.....	15
❖ Mecanismos de acción de las hormonas esteroideas sexuales en el sistema nervioso central.....	15
❖ Neuroprotección.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	22
❖ Objetivo general.....	22
❖ Objetivos particulares.....	22
DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
❖ Hormonas utilizadas.....	24

❖ Formación de grupos y administración de las preparaciones hormonales.....	24
❖ Obtención de membranas.....	25
❖ Obtención de RvPo.....	25
❖ Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-page).....	26
❖ Análisis de la capacidad de unión del RvPo a las proteínas de las membranas neuronales de cerdos tratados con hormonas.....	26
❖ Análisis de la expresión de las moléculas NCAM de 120 KDa en cerebro de cerdo tratado con hormonas.....	27
❖ Análisis de la expresión de residuos de ácido siálico unidos en α 2-3 a lactosa en membranas neuronales de cerdo tratado con hormonas.....	28
MEDICIONES.....	30
ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	30
RESULTADOS.....	31
❖ Análisis de la capacidad de unión del RvPo a las proteínas de las membranas neuronales de cerdos tratados con hormonas.....	31
❖ Análisis de la expresión de las moléculas NCAM de 120 KDa en cerebro de cerdo tratado con hormonas.....	34
❖ Análisis de la expresión de residuos de ácido siálico unido en α 2-3 a lactosa en membranas neuronales de cerdo tratadas con hormonas.....	37
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	45
PERSPECTIVAS.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS.

E2	Estradiol
ePSA-NCAM	Moléculas de adhesión celular neuronal polisializadas tempranas
ERP	Elemento de respuesta a progesterona
FSH	Hormona folículo estimulante
GPF	Glucoproteína de fusión
HN	Hemaglutinina-neuraminidasa
L	Proteína de alto peso molecular
LH	Hormona luteinizante
M	Proteína de matriz
NCAM	Molécula de adhesión celular neuronal
NP	Núcleo proteína
P	Fosfoproteína
P4	Progesterona
PpLPM	Paramixovirus Porcino La Piedad, Michoacán
PSA	Acido polisialico
PSA-NCAM	Molécula de adhesión neuronal polisialisada
RE α	Receptor a estrógenos tipo alfa
RE β	Receptor a estrógenos tipo beta
RE β 1	Receptor a estrógenos beta tipo 1
RE β 2	Receptor a estrógenos beta tipo 2
RN	Cerdos recién nacidos
RNA _m	Acido Ribonucleico mensajero
RP	Receptor a progesterona
RP-A	Receptor clásico a progesterona tipo A
RP-B	Receptor clásico a progesterona tipo B
RvPo	Ruvulavirus porcino
SNC	Sistema nervioso central
SV5	Parainfluenza del simio 5
THP	3 α , 5 α -tetrahidroprogesterona
VOBPA	Ensayo de unión de proteínas a virus sobrepuesto
VPH	Virus de la parotiditis humana
VSOA	Virus del síndrome del ojo azul

INTRODUCCIÓN.

La susceptibilidad de los organismos superiores a las infecciones virales está inicialmente determinada por la existencia de moléculas receptoras apropiadas en la membrana de la célula hospedera. Los miembros de la familia *Paramixoviridae* son capaces de provocar infecciones en cerdos, principalmente en individuos jóvenes. La mayoría de estos virus requieren de moléculas glucoconjugadas que actúen como receptores en las células susceptibles.

El *Rubulavirus* porcino (RvPo) anteriormente conocido como el virus del síndrome del ojo azul (VSOA) ó paramixovirus porcino La Piedad, Michoacán (PpLPM) es la especie porcina del género *Rubulavirus*, que taxonómicamente se incluye en la subfamilia *Paramixovirinae*, perteneciente a la familia *Paramixoviridae*. Es un virus emergente que fue aislado en 1980 en granjas porcícolas del centro del país (Reyes-Leyva y cols., 2002).

Por otra parte, las sialogluproteínas de la membrana celular experimentan profundos cambios en la composición de carbohidratos durante la diferenciación celular, en el desarrollo y en la transformación de células cancerosas. Además, algunas de estas moléculas funcionan como receptores para virus. Todo esto sugiere que las sialoglucoproteínas desempeñan funciones clave en estos procesos biológicos y patológicos (Furukawa y cols., 1993).

Se han realizado estudios con el fin de identificar a la molécula receptora en la membrana celular. Experimentos realizados con células de la línea PK15 (de riñón de cerdo) y con células de la línea Vero (de riñón de mono verde africano) han demostrado que el RvPo es capaz de reconocer moléculas de la membrana celular que expresan un patrón de glucosilación terminal con ácido siálico unido α 2,3 sialil-lactosa (Reyes-Leyva y cols., 1993). En estudios *in vitro*, la infección por este virus ocurre tanto en neuronas como en células gliales y utiliza una sialoglucoproteína que se piensa es la isoforma de 120 KDa de la molécula de adhesión celular neuronal ó NCAM (Mendoza-Magaña y cols., 2007).

Las hormonas esteroideas sexuales, como el estradiol (E2), ejercen un efecto positivo sobre la expresión de las proteínas involucradas en los procesos de plasticidad neuronal en las células de la región del rafé dorsal de macacos. Por el contrario, la progesterona (P4) tiene un efecto contrario al del estradiol ya que se encontró que el RNAm de dichas proteínas disminuye por efecto de esta hormona (Reddy y cols., 2004).

En el presente trabajo se evaluó el efecto modulador del E2 y de la P4 sobre la unión del RvPo en proteínas membranales de células neuronales del hipotálamo, hipocampo, cerebelo y corteza cerebral de cerdo neonato *ex vivo*.

ANTECEDENTES.

Epidemiología del Rubulavirus porcino.

El Rubulavirus porcino (RvPo) antes llamado virus del síndrome del ojo azul (VSOA) ó paramixovirus porcino La Piedad, Michoacán (PpLPM) es el agente etiológico del síndrome del ojo azul porcino. Fue aislado e identificado a partir de cerebro y otros tejidos de cerdos infectados en brotes naturales ocurridos en granjas porcícolas de la región del Bajío en la década de 1980. Los brotes se diseminaron en 16 estados del centro y del noroeste de la república. Esta enfermedad solo ha ocurrido de manera natural en México (Santos-López y cols., 2004), aunque se han identificado nuevas especies patógenas del género *Rubulavirus* en diferentes partes del mundo (Reyes-Leyva y cols., 2002; Heinen y cols., 1998; Chua y cols., 2000).

Características y estructura viral.

Los viriones del RvPo son pleomórficos, casi esféricos y miden entre 180 y 300 nm de diámetro (Santos-López G. y cols., 2004). Presentan una cápside helicoidal que está constituida por la unión de la núcleo proteína (NP) con el ARN, en ella están unidas las proteínas de alto peso molecular (L) y la fosfoproteína (P), las cuales son responsables de la formación de un complejo con actividad de polimerasa de ARN. La cápside se encuentra rodeada por una envoltura lipoprotéica, la cual presenta en su cara interna y en estrecha relación con la cápside, una proteína denominada de matriz (M) y hacia el exterior dos glicoproteínas, una llamada proteína de fusión (GPF) y la otra es la

hemaglutinina-neuraminidasa (HN), las cuales miden entre 8 y 12 nm (Santos López G. y cols., 2004).

La HN es la responsable del reconocimiento de receptores en la membrana celular. Las moléculas receptoras celulares requieren de la expresión de oligosacáridos con configuración de dímeros o polímeros de ácido siálico unidos en α 2,3 a lactosa. Estos se encuentran localizados en las porciones terminales de glucolípidos y glucoproteínas membranales. El reconocimiento del receptor involucra la hidrólisis de los residuos de ácido siálico y a la activación de la GPF (Reyes-Leyva y cols., 2004; Ramírez-Mendoza y cols., 1999; Sundqvist y cols., 1990).

La GPF activada por el reconocimiento del receptor induce la fusión entre la envoltura viral con la membrana celular. La GPF es responsable de la lisis de eritrocitos y la formación de sincitios en los cultivos celulares, rasgos característicos de los *paramixovirus* (Reyes-Leyva y cols., 2004; Santos-López y cols., 2004; Sundqvist y cols., 1990).

Clasificación.

El Rubulavirus porcino es un virus de origen desconocido. Los estudios filogenéticos revelan una similitud estructural, genética y funcional con los virus de la parotiditis humana (VPH), parainfluenza humana 2 y 4, y parainfluenza del simio 5 (SV5) (Santos-López y cols., 2004). El virus posee un ancestro común a todos los *Paramixovirus* y se ha

descartado que sea una mutación de cualquier otro *Paramixovirus* ya identificado. Este virus fue clasificado como la especie porcina del género *Rubulavirus*, en la subfamilia *Paramyxovirinae*, de la familia *Paramyxoviridae*, en el orden de los *Mononegavirales* (Reyes-Leyva y cols., 2004; Santos-López y cols., 2004).

Patología del RvPo.

Los cerdos pueden contraer la infección al estar en contacto con microgotas expelidas por cerdos infectados, si la gota es muy grande puede quedar atrapada en la mucosa oronasal condicionando la infección a la existencia de células susceptibles en esta estructura; en caso contrario las gotas pueden ingresar al interior del pulmón y depositarse en los conductos aéreos inferiores.

En cerdos infectados por vía intranasal se ha observado que el virus se multiplica progresivamente en la mucosa nasofaríngea y el tejido linfático asociado; posteriormente se disemina vía aérea a los pulmones y bronquios donde se replica abundantemente para después diseminarse por vía sanguínea al resto del organismo. La infección en el sistema nervioso central (SNC) parece darse a través de las terminaciones del nervio olfatorio en la mucosa nasal (Ramírez-Herrera y cols., 1997; Reyes-Leyva y cols., 2004).

Las manifestaciones clínicas causadas por el RvPo varían de acuerdo a la edad y al sexo del animal, se presentan en forma progresiva, aguda y generalmente mortal en los cerdos neonatos. El virus ataca

preferentemente el sistema nervioso central neonatal y resulta fatal en el 90% de los casos en los que se observa (Reyes-Leyva y cols., 2004; Santos-López y cols., 2004). En machos adultos el RvPo causa lesiones en el aparato reproductor particularmente en el epidídimo y en el testículo. Las lesiones se caracterizan por inflamación, edema, degeneración hidrópica, hemorragias, necrosis, ausencia total del tejido epitelial, lesiones granulomatosas y necrosis del epidídimo (Ramírez-Mendoza y cols., 1999). Dichas lesiones están asociadas con la generación de epididimitis, orquitis, atrofia testicular y esterilidad (Santos-López y cols., 2004). Mientras que las hembras presentan abortos, aumento de mortinatos e infertilidad (Reyes-Leyva y cols., 2004). Los animales infectados de ambos géneros presentan fiebre de 40°C y anorexia (Ramírez-Mendoza y cols., 1999).

La opacidad corneal que caracteriza a la enfermedad se presenta solamente del 1 al 10% de los animales infectados de cualquier edad. (Santos-López y cols., 2004; Ramírez-Mendoza y cols., 1999).

Identificación del receptor para el RvPo.

En estudios previos identificamos al receptor neuronal para el RvPo como la isoforma de 120 KDa de la NCAM en membranas neuronales de cerdo neonato (Mendoza-Magaña L., 2001). Esta molécula es una sialoglicoproteína que pierde su capacidad de unión y de infección cuando se eliminan enzimáticamente sus residuos de ácido siálico (Mendoza-Magaña L., 2001). Además, en estudios *in vitro* hemos estudiado el efecto de E2, P4 y dexametasona. El efecto de P4 *in vitro* es aparentemente neuroprotector en células hipotalámicas e

hipocampales de cerdo neonato, mientras que el efecto de E2 parece favorecer la infección de dichas células. Por su parte, la dexametasona presenta un efecto bifásico dependiente de concentración, ya que en concentraciones de 3 a 5 mM parece ser neuroprotector mientras que a concentraciones más bajas o más altas no presenta dicho efecto (Mendoza-Magaña y cols.; 2007a).

Moléculas de adhesión celular neuronal y polisialización.

Las moléculas de adhesión celular neuronal (NCAMs) en el SNC tienen funciones importantes en el establecimiento de conectividad sináptica durante el desarrollo embrionario ya que están involucradas en la plasticidad sináptica del individuo adulto (Cremer y cols., 1998). Las NCAMs son moléculas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y presentan isoformas que resultan de modificaciones durante el proceso de transcripción (Charles y cols., 2000). Se conocen 3 isoformas de la NCAM: la de 180, 140 y 120 KDa (Kiss y cols., 1994). Las NCAMs actúan como un ligando homofilico en la interacción de neuronas con una amplia variedad de células mediante un mecanismo homofilico independiente de Ca^{2+} (Eberhardt y cols., 1986; Kiss y cols., 1994).

La expresión de las diferentes isoformas de NCAM se regula durante el desarrollo siendo capaces de colocar grandes homopolímeros de ácido siálico α 2,8 ligados, unidos por una cadena oligosacárida N-ligada al quinto dominio de la Ig (Charles y cols., 2000). En el cerebro embrionario, la NCAM se encuentra enriquecida en ácido polisialico

(PSA). La PSA-NCAM gradualmente es reemplazada, en la mayoría de las regiones cerebrales durante los periodos perinatal y postnatal tempranos, por NCAM menos sializada (140 y 180 KDa). Sin embargo, la expresión de la PSA-NCAM persiste en las áreas cerebrales adultas que fisiológicamente experimentan cambios neuronales o gliales, como es el caso del sistema hipotálamo-neurohipofisario, núcleo arcuato y eminencia media, entre otras (García-Segura y cols., 1995). En el cerebro adulto, la PSA-NCAM se expresa continuamente en hipotálamo, hipocampo y bulbo olfatorio adulto, donde la formación de sinapsis y generación neural persiste aún en la etapa adulta (Angata y cols., 2004).

Las NCAM's poseen estructuras di y oligo sializadas que son expresadas en el cerebro embrionario del cerdo. Las sialoglicoproteínas frecuentemente terminan en cadenas oligosacáridas con más de 3 residuos de ácido siálico α 2,8 ligado (Sato y cols., 2000). El PSA está constituido de largas cadenas de ácido siálico lo cual convierte a NCAM en una molécula negativamente cargada. Aparentemente, la acción de PSA-NCAM puede ser el interferir con las propiedades adhesivas de la NCAM promoviendo con ello la remodelación de las membranas sinápticas (Muller y cols., 2000). Los residuos de ácido polisialico de las NCAM también sirven generalmente como reguladores negativos de las interacciones célula-célula (Charles y cols., 2000). Los residuos de ácido siálico participan en diversas funciones como: adhesión y diferenciación celular, transducción de señales y expresión de antígenos de superficie (Sato y cols., 2000).

En los estudios realizados por Sato y cols. (2000) se describe que existe una mayor cantidad de residuos de ácido siálico unido en α 2,3 a lactosa durante la etapa prenatal y neonatal temprana en las células neuronales del cerdo. En contraste, la expresión de este tipo de residuos en la NCAM se encuentra disminuida en la edad adulta. La isoforma de 120 KDa se expresa en los cerdos de etapa prenatal y neonatal, mientras que las isoformas de 140 y 180 KDa, que se encuentran menos sializadas persisten en el cerebro del cerdo adulto. Esto sugiere que dicha disminución de la expresión de ácido siálico ocurre gradualmente durante el desarrollo (Sato y cols., 2000).

Función de las hormonas esteroideas sexuales.

Los sistemas nervioso y endocrino coordinan de forma conjunta las funciones de todos los aparatos o sistemas fisiológicos de los organismos superiores. El sistema nervioso controla las actividades corporales mediante impulsos nerviosos que conducen a la liberación de neurotransmisores, mientras que el sistema endocrino controla actividades corporales por medio de la liberación de hormonas (Tortora y Grabowski., 2002).

Las hormonas esteroideas se producen en células especializadas confinadas a las glándulas gonadales y suprarrenales. Estas glándulas secretan las hormonas en el torrente sanguíneo que las distribuye hacia todas las células del organismo. Las hormonas son capaces de modificar el metabolismo, regular el crecimiento y desarrollo e influir en los procesos reproductivos (Tortora y Grabowski., 2002).

El ciclo reproductivo de los mamíferos en general involucra una compleja interacción de diversos sistemas y órganos. Los testículos y los ovarios, son glándulas endocrinas fundamentales para la función reproductora masculina y femenina respectivamente y funcionan bajo la influencia de las hormonas hipofisarias folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH). Los testículos sintetizan la testosterona en las células de Leydig a partir del colesterol; la testosterona es el principal andrógeno y éste se difunde de las células de Leydig al líquido intersticial y de ahí a la sangre. Entre las funciones que desempeña la testosterona está la masculinización del aparato reproductor y el descenso testicular durante el estado prenatal; así como fomentar el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos (Tortora y Grabowski., 2002).

Las hormonas FSH y LH ejercen sus efectos sobre los ovarios y éstos en respuesta sintetizan y secretan estrógenos y progesterona, dichos esteroides son sintetizados a partir del colesterol. Entre las funciones que realizan los estrógenos se encuentran el fomentar el desarrollo y conservación de los órganos sexuales femeninos, así como promover el desarrollo de características sexuales femeninas. Inducen modificaciones fisiológicas como la disminución de la colesterolemia y aumentan el anabolismo proteico. Por su parte, la progesterona se produce principalmente en las células del cuerpo lúteo y en conjunto con los estrógenos prepara el endometrio para la implantación del óvulo fecundado y a las glándulas mamarias para la secreción de la leche (Tortora y Grabowski., 2002).

Neuroesteroides.

Los esteroides sintetizados en el SNC y el SNP se denominan neuroesteroides y éstos pueden ser sintetizados por diferentes tipos celulares como oligodendrocitos, células de Schwann, astrocitos y neuronas (Yi Hu y cols., 1987; Plassart-Schiess y Baulieu., 2002). Estas células sintetizan una variedad de esteroides en el SNC independientemente de la actividad glandular endocrina periférica (Baulieu E., 1997). La síntesis de los neuroesteroides puede darse por dos vías, se puede lograr a partir de precursores de las hormonas sexuales esteroideas, como la pregnenolona o la dihidroepiandrosterona, o pueden ser sintetizados *de novo* por segmentación de las cadenas laterales del colesterol mediante actividad de la enzima P-450_{scc} en la membrana mitocondrial interna (Plassart-Schiess y Baulieu., 2002).

Mecanismos de acción de las hormonas esteroideas sexuales en el sistema nervioso central.

Se han descrito dos mecanismos de acción de las hormonas esteroideas: la acción genómica esteroidea y la acción no genómica. El mecanismo clásico de acción de las hormonas sexuales, también llamado de acción genómica es a través de la interacción de las hormonas con sus receptores intracelulares. Los receptores de estrógeno α y β , el receptor de andrógenos y los receptores de progesterona A y B. Estos receptores son factores nucleares de transcripción que al unirse al ácido desoxirribonucleico regulan la

transcripción de genes específicos. Los efectos de las hormonas en células blanco son detectables en lapsos que pueden variar desde 1h hasta días. De esta manera, las hormonas sexuales incrementan o disminuyen la síntesis de determinadas proteínas. Además de los receptores intracelulares, la existencia de receptores membranales está bien documentada (Falkenstein y cols., 2000).

Por otra parte, el mecanismo de acción no genómico está caracterizado por su insensibilidad a los factores inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas, además de su rápido tiempo de respuesta, que varía de segundos a minutos. Estos efectos rápidos son mediados por receptores con propiedades farmacológicas distintas a las de los receptores esteroideogénicos intracelulares (Falkenstein y cols., 2000).

Durante la etapa prenatal tardía como en la etapa postnatal temprana, las hormonas esteroideas sexuales influyen sobre la supervivencia, diferenciación y conectividad de poblaciones neuronales tanto en el cerebro como en la médula espinal. En etapas tempranas del desarrollo perinatal, el sistema nervioso posee un alto grado de plasticidad y algunos de los efectos ejercidos por las hormonas pueden llegar a ser permanentes (McEwen y Alves., 1999).

Neuroprotección.

La neuroprotección comprende un conjunto de mecanismos fisiológicos y bioquímicos que favorecen la supervivencia neuronal. Los agentes neuroprotectores incluyen una gran variedad de compuestos naturales

y sintéticos que modulan algunos de los mecanismos involucrados en la muerte neuronal (Fiszman M., 2003).

El posible efecto neuroprotector de los estrógenos ha ganado creciente atención durante los últimos años ya que su eficacia ha sido demostrada en muchos modelos de neurodegeneración y daño isquémico en modelos *in vivo* e *in vitro* y así mismo se ha demostrado también que son capaces de reducir el daño neuronal causado por factores como la hipoxia, aminoácidos excitadores, aniones superóxido y peróxido de hidrógeno. Los efectos protectores ejercidos por los estrógenos pueden ser mediados al menos en parte por la habilidad de éstos para alterar la producción de radicales libres y/o sus efectos sobre las células (McEwen y Alves., 1999).

En este contexto, existen diversos estudios que demuestran que los niveles elevados de estrógeno están relacionados positivamente con el mejoramiento de la memoria a corto plazo y que cuando los niveles de estrógeno caen a consecuencia de la edad, hay una declinación temporal en los procesos de consolidación de la memoria (Smith y McMahan., 2005).

En años recientes se ha descubierto que el estradiol mejora la plasticidad sináptica y ejerce acciones neurotróficas y neuroprotectoras (Rau W. Shane y cols., 2003). Entre los efectos benéficos del estradiol se encuentran el mejorar el aprendizaje como resultado de una marcada plasticidad inducida por hormonas en las sinapsis CA3-CA1 (Smith y McMahan, 2005). Sin embargo las propiedades

neuroprotectoras también se han atribuido a sus precursores: la pregnenolona, la dehidroepiandrosterona y la testosterona (Azcoitia y cols., 2003).

La progesterona (P4) ejerce sus efectos a través del receptor a progesterona (RP), el cual es un factor de transcripción nuclear que actúa a través de elementos de respuesta a P4 (ERP) en la región promotora del gen blanco para regular la transcripción de genes. Existen dos isoformas del receptor clásico a progesterona: RP-A y RP-B (Singh M., 2006).

La P4 y sus derivados sulfatados modulan la síntesis y la liberación de diversos neurotransmisores y neuropéptidos para dar respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos específicos.

Uno de los derivados de P4, la 3 α , 5 α -tetrahydroprogesterona (THP), ejerce sus efectos sobre la proliferación de células progenitoras de oligodendrocitos en la etapa fetal. Se ha encontrado que tanto la P4 como la THP son capaces de estimular la proliferación de células progenitoras oligodendrocíticas e inducir la expresión de moléculas de adhesión neuronal polisializadas tempranas (ePSA-NCAM). La proliferación de células ePSA-NCAM involucra una señalización neuroesteroidea y de GABA. Por lo tanto, se sugiere que la THP es importante en el desarrollo del SNC. Por lo que la expresión de las moléculas NCAM en las células neuronales embrionarias y fetales es fundamental, además se cree que existe una vía de señalización neurona-glia (Gago y cols., 2004; García-Segura y cols., 1995). Con

base a lo anterior resulta importante realizar este estudio ya que tanto E2 como P4 podrían inducir modificaciones en las moléculas membranales de cerebro de cerdo neonato que como consecuencia podrían impedir, limitar o exacerbar la infección viral.

JUSTIFICACIÓN.

El potencial neuroprotector de las hormonas esteroideas ha sido recientemente objeto de investigación. Las investigaciones se han centrado en identificar los mecanismos mediante los cuales estas ejercen efectos neuroprotectores en diferentes modelos experimentales de daño como excitotoxicidad, radicales oxidantes o shock isquémico, entre otros. En menor proporción se ha estudiado su potencial efecto neuroprotector ante infecciones virales. Siendo el reconocimiento de moléculas receptoras en membrana de células hospederas el evento limitante para el establecimiento de una infección viral, resulta pertinente evaluar el efecto de estradiol o progesterona sobre la expresión del receptor para el *Rubulavirus Porcino* en células neuronales de cerdos recién nacidos expuestos experimentalmente a dichas hormonas. La infección por el *Rubulavirus Porcino* en cerdos recién nacidos resulta en una panencefalitis que provoca alta mortalidad en los brotes infecciosos que ocurren en granjas porcinas mexicanas. Además, es necesario analizar el efecto modulador de las hormonas E2 y P4 sobre la expresión de la NCAM-120 (receptor para el *Rubulavirus*) y del glucotopo α 2,3 sialil-lactosa en diversas regiones del cerebro de cerdo neonato *in vivo*. Este estudio permitirá analizar *ex vivo* si dichas modificaciones pueden impedir, limitar o exacerbar la capacidad de unión del RvPo.

HIPÓTESIS.

La P4 y el E2 son capaces de modular *in vivo* la expresión de la molécula NCAM de 120 KDa y de los residuos de ácido siálico modificando con ello la capacidad de unión del RvPo a su receptor.

OBJETIVOS.

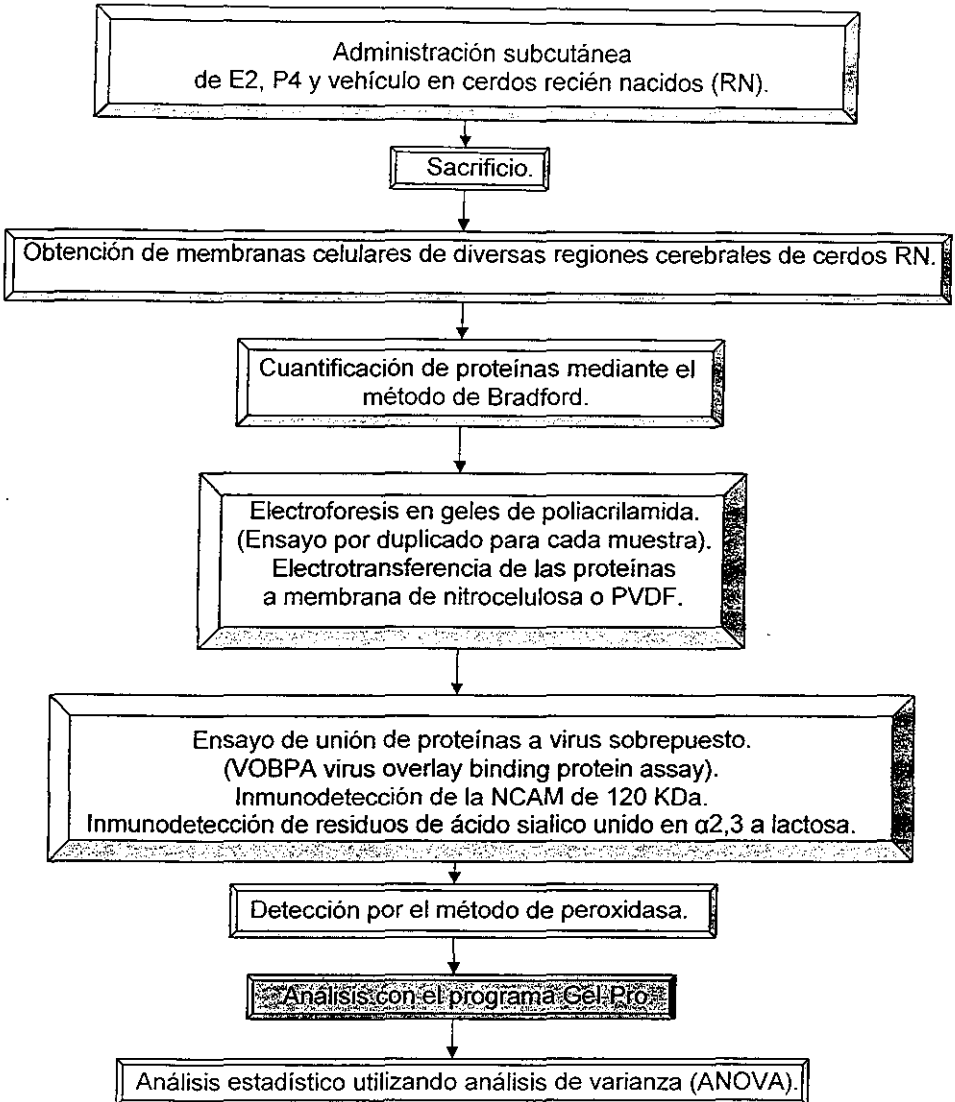
Objetivo general.

Analizar el efecto modulador de la P4 y del E2 sobre la expresión de la molécula NCAM de 120 KDa y la capacidad de unión del RvPo a ésta proteína membranal de neuronas de las regiones de hipocampo, hipotálamo, cerebelo y corteza cerebral de cerdo neonato tratadas con las hormonas antes mencionadas.

Objetivos particulares.

1. Analizar la capacidad de unión del RvPo a las glucoproteínas de cerebro de cerdo tratado con E2 y P4.
2. Analizar y cuantificar la expresión de las moléculas NCAM de 120 KDa en cerebro de cerdo neonato tratado con E2 o con P4 en diferentes regiones de cerebro de cerdo.
3. Analizar la expresión de residuos de ácido siálico unido en α 2,3 a lactosa, en membranas neuronales de cerdo pre-tratadas con E2 y P4.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL.



MATERIALES Y MÉTODOS.

Hormonas utilizadas.

- 17- β Estradiol (E2, Sigma-Aldrich, E-8875)
- Progesterona (P4, Sigma-Aldrich, P-0130)

Formación de grupos y administración de las preparaciones hormonales.

Se obtuvieron cerdos recién nacidos de granjas libres de la enfermedad. Se formaron tres grupos de 2 cerdos por grupo, dos grupos experimentales y uno control. A los grupos experimentales se les administraron las hormonas subcutáneamente a razón de una administración (dosis) por día durante tres días continuos. Las soluciones inyectables de E2 y P4 se disolvieron en 0.5ml de aceite de sésamo. E2 se preparó a una concentración de 1 mg/día; mientras que P4 se preparó a una concentración de 1.81 mg/día. Al grupo control se le administró 0.5ml de aceite de sésamo por día durante tres días continuos.

Al finalizar el tratamiento los cerdos fueron sacrificados por decapitación previamente anestesiados y se les extrajo el cerebro para obtener muestras de tejido de corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo e hipocampo, las cuales fueron procesadas para obtener las membranas neuronales.

Obtención de membranas.

La obtención de membranas se realizó por medio del método descrito por Jin y cols. (1994) y modificado por Mendoza Magaña L. (2001).

Las muestras de tejido nervioso se homogeneizaron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) al 0.1M, pH 7.2, con anti-proteasas (EDTA al 0.01M, fosforamidón 1ng/ml, leupeptina, aprotinina y bestatina 1µg/ml). Las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 1,600 g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los núcleos y restos celulares. Posteriormente, los sobrenadantes se colectaron y se centrifugaron a 25,000 g durante 3.5 horas a 4°C. Los sedimentos (fracción membranal) se resuspendieron en solución amortiguadora de Tris salina (TBS) al 0.015M y pH 7.4 con anti-proteasas (Jin y cols., 1994). La concentración de proteína fue determinada usando el método de Bradford (Freshney I., 1987).

Obtención de RvPo.

Se utilizó virus cultivado previamente en células de la línea PK-15 (riñón de cerdo), en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 5µg/ml de estreptomycin y 15U/ml de penicilina (Sundqvist y cols. 1990); cuya concentración se determinó por medio de la técnica de hemaglutinación, y a su vez la determinación de la concentración de proteínas virales se realizó por espectrofotometría a una longitud de 280 nm. Para el análisis por el método de unión de proteína a virus sobrepuesto (**VOBPA**, virus

overlay binding protein assay) se utilizó una concentración de 30µg/ml de proteína viral.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se realizó esta técnica con el fin separar las proteínas de las membranas neuronales de cerdos tratados con hormonas y controles. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 7.5% en condiciones no reductoras, utilizando el sistema de electroforesis vertical Mini-Protean 3 de BIO-RAD; se utilizaron marcadores moleculares preteñidos de 204 a 48 KDa (BIO-RAD). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-Protein utilizando el módulo para transferencia aplicando 35 volts por 3.5 horas.

Análisis de la capacidad de unión del RvPo a las proteínas de las membranas neuronales de cerdos tratados con hormonas.

Para analizar la capacidad de unión del RvPo a las membranas neuronales de los cerdos tratados con hormonas y controles, se utilizó la antes mencionada técnica **VOBPA** (Gershoni y cols., 1986; Jin y cols., 1994; Gastka y cols., 1996). Después de la separación electroforética y de la electrotransferencia de proteínas, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche descremada al 5% con 0.02% de azida de sodio durante 18 horas a 4°C y se lavaron 4 veces con PBS. Después las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas por 18 horas a 4°C con el RvPo (30µg/ml). Al término de la incubación se retiró el virus y se realizaron 4 lavados con PBS y 2 con 0.01% de

Triton X-100 en TBS (TTBS) durante 10 minutos. Posteriormente se incubaron las membranas con el anticuerpo anti-RvPo 1:100 diluido en albumina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS, dirigido contra las proteínas HN y F a 4°C por 18 horas. Al término de la incubación se retiró el anticuerpo, se lavaron con PBS y TTBS, después se incubaron con suero normal de cabra al 10% por 18 horas a 4°C. Para detectar la unión del RvPo se realizó una incubación durante dos horas con anti-IgG de ratón hecho en cabra (1:4000) marcado con peroxidasa diluido en PBS al 0.01M, con 3% de albúmina sérica bovina y 0.01% de Tritón X-100; después se realizaron 4 lavados con PBS y 2 con TTBS de 10 minutos cada uno. La inmunoreactividad fue visualizada utilizando la solución de revelado de DAB la cual consiste de 6 mg de diaminobenzidina en 9ml de Tris-HCl 10mM pH 7.4, con 1ml de cloruro de calcio al 0.03% y 10µl de peróxido de hidrógeno, tras revelarse la reacción fue detenida con agua bidestilada.

Análisis de la expresión de las moléculas NCAM de 120 KDa en cerebro de cerdo tratado con hormonas.

El siguiente estudio se llevó a cabo con el fin de determinar si los tratamientos hormonales fueron capaces de modificar la expresión de las NCAM en las membranas neuronales de cerdo. Las proteínas fueron separadas electroforéticamente y transferidas a una membrana de nitrocelulosa como se describió anteriormente. Después las membranas fueron bloqueadas de la forma ya descrita, al término se lavaron 4 veces con PBS. Después las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-NCAM (1:100) diluido en PBS y adicionado con

BSA al 3% y se incubaron durante 18 horas a 4°C. A continuación se les realizaron los lavaron ya descritos. Después se incubaron durante 18 horas con suero normal de cabra al 10%. Posteriormente, las membranas fueron lavadas y se incubaron con anti-IgG de ratón (1:400) marcado con biotina por 2 horas. Al término de la incubación las membranas se lavaron y se sometieron a incubación con Extravidina (1:1000) por 1 hora. Al término las membranas fueron lavadas y la inmunoreactividad fue visualizada con solución reveladora de DAB como se describió anteriormente (Mendoza-Magaña L., 2001).

Análisis de la expresión de residuos de ácido siálico unidos en α 2,3 a lactosa en membranas neuronales de cerdo tratadas con hormonas.

El siguiente estudio se llevó a cabo con el fin de determinar si el pretratamiento hormonal fue capaz de modificar la expresión de los residuos de ácido siálico unido en α 2,3 a lactosa en las membranas neuronales de cerebro de cerdo.

Las proteínas fueron separadas electroforéticamente y transferidas a una membrana PVDF aplicando 35 volts por 3.5 horas. A continuación se les realizó un proceso de deslipidación; en primera instancia las membranas fueron incubadas en una solución de Hidróxido de sodio al 0.01M durante 30 minutos, después se les realizaron lavados consecutivos en soluciones de cloroformo/metanol 2:1 y en seguida 1:2 por 15 minutos cada uno, finalizando con un lavado ligero de 2-3

minutos en metanol absoluto. Las membranas fueron bloqueadas como se describió anteriormente y después se les realizaron lavados. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-GD3 (1:100) que reconoce residuos de ácido siálico unido en α 2,3 a lactosa, durante 18 horas a 4°C. Al término de la incubación se lavaron y se incubaron durante 18 horas con suero normal de cabra al 10%, después las membranas fueron lavadas. Enseguida las membranas se incubaron con anti-ratón marcado con biotina (1:400) por 2 horas, después se les realizaron lavados. Posteriormente se incubaron con Extravidina-peroxidasa (1:1000) por 1 hora. Al término las membranas se lavaron nuevamente. La inmunoreactividad fue visualizada con solución reveladora de DAB como se describió anteriormente (Mendoza-Magaña L., 2001).

Mediciones.

Se realizaron mediciones de la densidad óptica máxima (DOmax) en todos los grupos control, así como en todos los grupos con tratamiento hormonal y en los incubados con RvPo. Esta determinación fue obtenida de cada una de las bandas de proteína con el programa computacional Gel-Pro de Media Cybernetics.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de las mediciones de DOmax fueron utilizados para el análisis estadístico utilizando Análisis de Varianza (ANOVA) y como pruebas pos-hoc se aplicaron la prueba de Bonferroni y la T3 de Dunnett.

RESULTADOS.

Análisis de la capacidad de unión del RvPo a las proteínas de las membranas neuronales de cerdos tratados con hormonas.

Para analizar la capacidad de unión del RvPo a las membranas neuronales de los cerdos tratados con hormonas se utilizó la técnica de ensayo de unión a proteínas con virus sobrepuesto. En la figura 1 se muestra la capacidad de unión del RvPo a las membranas neuronales de distintas regiones de cerebro de cerdos tratados con E2 o P4 así como los controles.

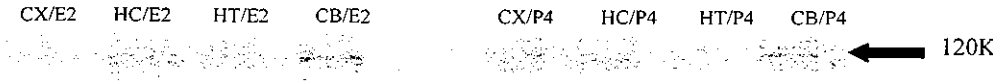
Los resultados de nuestros experimentos muestran una notable disminución en la capacidad de unión del RVPO a las membranas neuronales tratadas con E2 y P4. Sin embargo el mayor efecto se observó en las regiones tratadas con P4. En el grupo control que recibió el vehículo (aceite de sésamo) se encontró en corteza cerebral una DO_{max} de 0.80144 ± 0.09331 ; en hipocampo se encontró 1.08313 ± 0.13497 ; en hipotálamo fue de 1.29264 ± 0.15601 ; y en cerebelo 1.08604 ± 0.14364 .

En los cerdos tratados con E2 se detectó una disminución en la unión de virus. En la corteza cerebral se tuvo una DO_{max} de 0.41349 ± 0.10874 . En el hipocampo encontramos una DO_{max} de $0.40884 \pm .09469$. En el hipotálamo encontramos una DO_{max} de 0.53355 ± 0.14960 . En el cerebelo se obtuvo una DO_{max} de 0.44337 ± 0.15831 . En todas las regiones hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparado contra el grupo control.

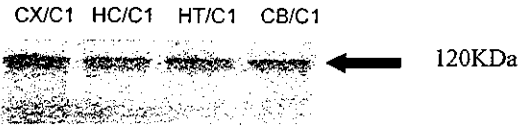
En las regiones cerebrales de cerdos tratados con P4 se detectó que hubo disminución en la unión del virus aún mayor. En la corteza cerebral se registró una DO_{max} de 0.20837 ± 0.02693 . En el hipocampo se obtuvo una DO_{max} de 0.20235 ± 0.02463 . En el hipotálamo se registró una DO_{max} de 0.21039 ± 0.00889 . En el cerebelo se encontró una DO_{max} de 0.29133 ± 0.02884 , en todos los casos se tuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

A

Experimentales.



Control.



B

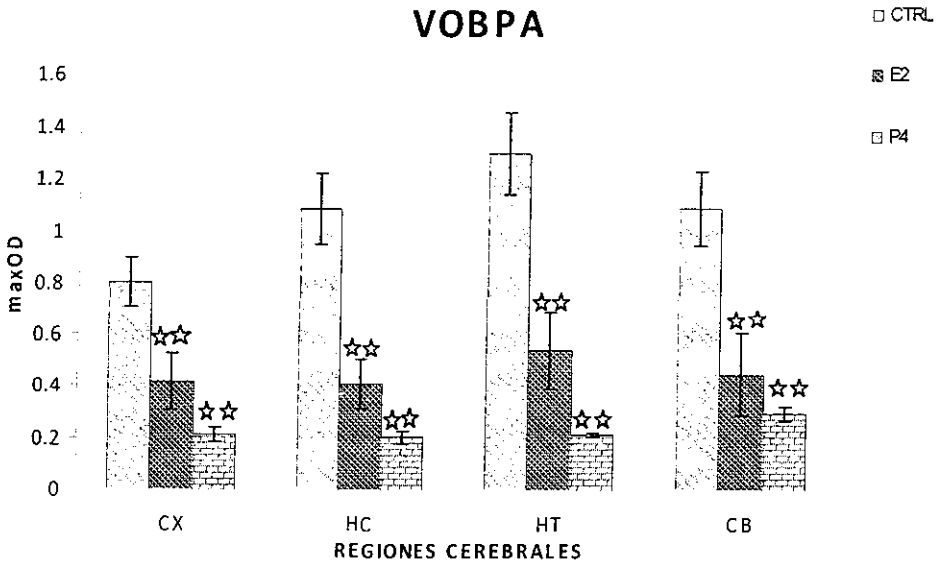


FIGURA 1

Análisis de la expresión de las moléculas NCAM de 120 KDa en cerebro de cerdo tratado con hormonas.

El siguiente estudio se llevó a cabo con el fin de determinar si los tratamientos hormonales fueron capaces de modificar la expresión de las NCAMs en las membranas neuronales de cerdo.

En la figura 2 se muestra que el efecto modulador de E2 y P4 sobre la expresión de las NCAM de distintas regiones de cerebro de cerdo no se detectó.

Los resultados de nuestros experimentos muestran variabilidad en todos los casos. Solamente las regiones hipocampo, hipotálamo y cerebelo mostraron una tendencia a disminuir la expresión de las NCAM's. La corteza cerebral fue la única región que bajo el tratamiento con E2 incrementó la intensidad de expresión por arriba del nivel del control. Además, las menores intensidades de detección de NCAM bajo el efecto de E2 fueron observadas en el hipocampo, hipotálamo y cerebelo, que bajo efecto de P4 no se modificó significativamente.

En el grupo control de vehículo se encontró en la corteza cerebral una DOmax de 0.43345 ± 0.14853 . En el hipocampo se encontró de 0.42718 ± 0.12398 . En el hipotálamo fue de 0.45632 ± 0.13807 . Finalmente, en el cerebelo fue de 0.43586 ± 0.13495 .

En los cerdos tratados con E2 se detectó una DOmax en la corteza cerebral de 0.55030 ± 0.12318 . En el hipocampo se encontró una

DOmax de 0.25570 ± 0.06002 . En el hipotálamo se determinó una DOmax de 0.18264 ± 0.03829 . En el cerebelo se encontró una DOmax de 0.11447 ± 0.02914 . En todos los casos el análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa con respecto al control.

En los cerdos tratados con P4 se detectó en la corteza cerebral una DOmax de 0.16186 ± 0.01930 . En el hipocampo se detectó una DOmax de 0.22535 ± 0.05361 . En el hipotálamo se registró una DOmax de 0.28109 ± 0.04520 . En el cerebelo se registró una DOmax de 0.26215 ± 0.06407 . La P4 no indujo cambios en la expresión de NCAM por lo que no hubo diferencia significativa respecto al control.

A

Experimentales.

CX/E2 HC/E2 HT/E2 CB/E2 CX/P4 HC/P4 HT/P4 CB/P4



Control.

CX/C1 HC/C1 HT/C1 CB/C1

CX/C2 HC/C2 HT/C2 CB/C2



B

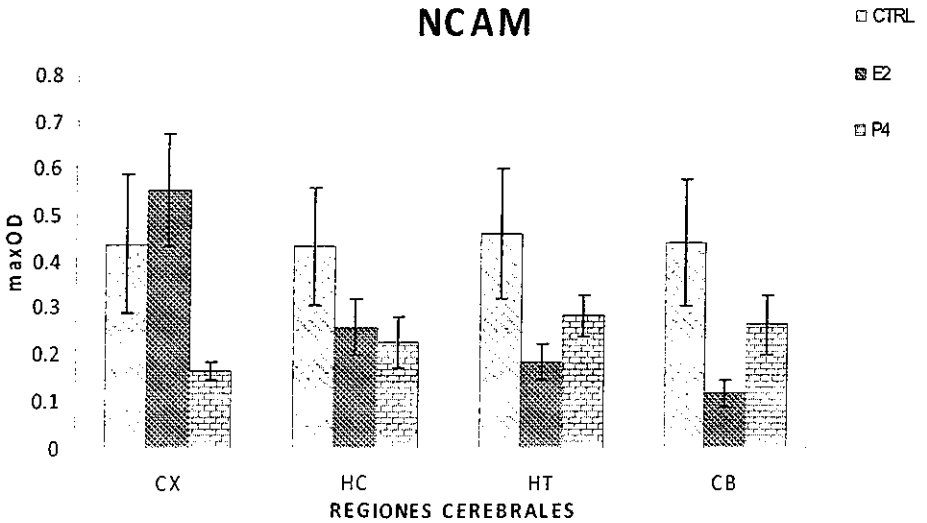


FIGURA 2

Análisis de la expresión de residuos de ácido siálico unidos en α 2,3 a lactosa en membranas neuronales de cerdo pretratadas con hormonas.

El siguiente estudio se llevó a cabo con el fin de determinar si el tratamiento hormonal fue capaz de modificar la expresión de los residuos de ácido siálico unido en α 2,3 a lactosa en las membranas neuronales de cerebro de cerdo. En la figura 3 se muestra el efecto modulador de E2 y P4 sobre la expresión de dichos residuos en distintas regiones de cerebro de cerdo.

Los resultados de nuestros experimentos muestran una gran variabilidad en todas las regiones tratadas y controles. Bajo el efecto de E2, la corteza, el hipocampo y el hipotálamo fueron capaces de incrementar la expresión de residuos de ácido siálico unido en α 2-3 a lactosa en niveles superiores a los expresados por el control.

En el grupo control que recibió el vehículo se encontró en la corteza cerebral una DO_{max} de 0.2578 ± 0.0878 . En el hipocampo se encontró una DO_{max} de 0.5174 ± 0.0766 . En el hipotálamo se registró una DO_{max} de 0.1845 ± 0.0440 y en el cerebelo se determinó una DO_{max} de 0.4252 ± 0.1021 .

En los cerdos tratados con E2 se detectó un incremento de la expresión ácido siálico unido en α 2-3 a lactosa en la corteza cerebral con una DO_{max} de 0.4889 ± 0.0463 con diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control. En el hipocampo se registró una DO_{max} de 0.5784 ± 0.0488 sin diferencia significativa. En el hipotálamo se

detectó una DO_{max} de 0.2513 ± 0.0235 sin diferencia significativa. Finalmente, en el cerebelo se registró una disminución con una DO_{max} de 0.1620 ± 0.0180 con diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

En las regiones tratadas con P4 se registró en la corteza cerebral una DO_{max} de 0.2069 ± 0.0226 sin diferencia significativa. En el hipocampo se registró una DO_{max} de 0.2245 ± 0.0269 con una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control. En el hipotálamo se registró una DO_{max} de 0.2242 ± 0.0277 y en el cerebelo se detectó una DO_{max} de 0.3574 ± 0.0337 , en ambos casos sin diferencia significativa respecto al control.

A

Experimentales

CX/E2 HC/E2 HT/E2 CB/E2 CX/P4 HC/P4 HT/P4 CB/P4

120KDa

Control.

CX/C1 HC/C1 HT/C1 CB/C1 CX/C2 HC/C2 HT/C2 CB/C2



B

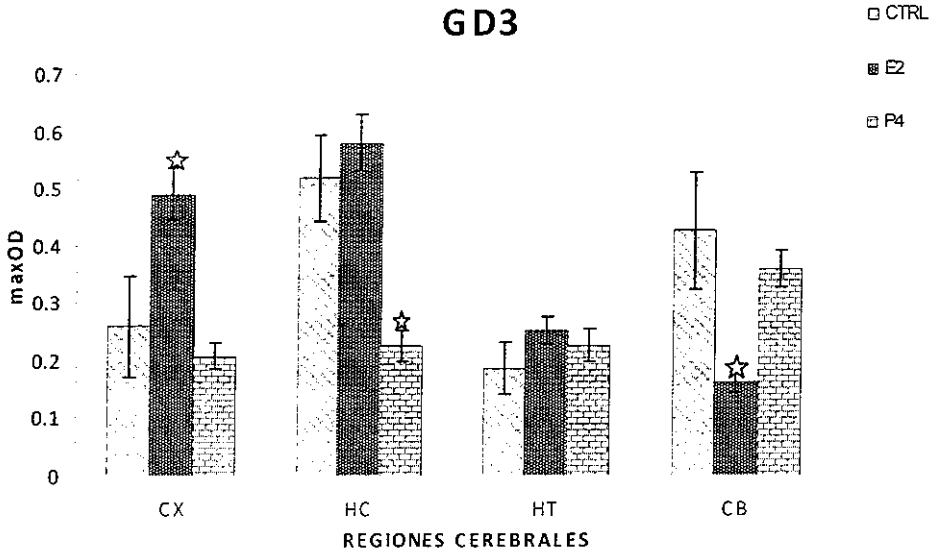


FIGURA 3

DISCUSIÓN.

El análisis de VOBPA realizado con las proteínas de membrana neuronal de cerdos neonatos tratados con E2 mostró que la proteína receptora NCAM de 120 KDa presentó una capacidad de unión para el RvPo significativamente disminuida. Además, el tratamiento con P4 mostró que la NCAM-120 también disminuyó su capacidad para unir al RvPo, con un efecto aún más evidente que el tratamiento con E2.

Los resultados sobre el efecto de E2 en la NCAM-120, que condujo a la disminución de la unión del RvPo en experimentos *ex vivo*, contrastan con los obtenidos en los experimentos *in-vitro*. Ya que, el E2 incrementó la infección (Mendoza-Magaña y cols., 2006). Los resultados de E2 *ex-vivo* en cerebro de cerdos neonatos, quizás se deben a que E2 promueve la expresión de receptores a P4, por ende la P4 sintetizada *in situ* encuentra una mayor cantidad de receptores disponibles. Por lo tanto, es probable que en realidad estemos ante el efecto de P4 y no de E2 (McEwen y Alves., 1999).

Por su parte, el tratamiento de los cerdos con P4 provocó que el receptor para el RvPo disminuyera su unión. Este resultado corrobora los hallazgos obtenidos en los experimentos de infección experimental *in vitro* en células neuronales de cerdos neonatos expuestos a P4 (Mendoza-Magaña y cols., 2004; Mendoza-Magaña y cols., 2007a). Recientemente se documentó que la P4 es capaz de provocar efectos a nivel de membrana alterando la estabilidad de microdominios de membrana (Furukawa y Kurokawa, 2008; Wray y Noble, 2008; Placzek

y cols., 2008) y en virtud de que también recientemente se reportó que la NCAM-120 se localiza en microdominios de membrana (Leshchyns'ka y cols; 2003) es probable también que la capacidad de unión del RvPo se vea disminuida por alteraciones conformacionales en la NCAM-120 inducidos por el desarreglo de microdominios. Por lo tanto, no es posible descartar un efecto adicional de P4 directamente a nivel de membrana.

Los efectos de ambas hormonas en las membranas neuronales de cerdo neonato tratados parecen ejercer un efecto modulador que regula a la baja la expresión de la NCAM 120. También es probable que provoquen un cambio conformacional del receptor que resulta en la disminución de la calidad de la NCAM 120 como receptor para el RvPo. El efecto de P4 a nivel de membrana celular podría ocurrir alterando la conformación NCAM 120 que se encuentra en microdominios de membrana, ya que los efectos no-genómicos de la P4 incluyen la modificación de dichos microdominios (Leshchyns'ka y cols; 2003 y Furukawa y Kurokawa; 2008). No obstante, es necesario realizar experimentos *in vivo* para analizar si este efecto de P4 favorece o no al establecimiento de la infección.

El análisis de la expresión de la NCAM 120 realizado en proteínas de membrana neuronal de cerdo neonato tratados con E2 y P4 mostró que no hubo una diferencia significativa entre ninguna de las estructuras cerebrales bajo estudio comparado contra sus respectivos controles. Sin embargo las gráficas obtenidas muestran que en las regiones de hipocampo, hipotálamo y cerebelo existe una tendencia del efecto tanto

de E2 como de P4 para disminuir la expresión de las NCAM. Para asegurar que el efecto de E2 y P4 es consistente se requiere de incrementar el número de animales experimentales para disminuir la dispersión de los resultados. Esto podría también explicarse por el efecto sensibilizador de E2 que incrementa la expresión del RP que a su vez se activa por la P4 sintetizada *in situ*.

Solamente las células neuronales de la corteza cerebral de cerdos tratados con E2 mostraron una expresión proteica normal de NCAM que podría explicarse por una pobre expresión del RP en las células de corteza cerebral. Por lo que se sabe, los receptores a estrógenos existentes en la corteza cerebral son los tipos RE β 1 y 2, siendo el RE β -2 el más ampliamente distribuido, sin embargo, este es de baja afinidad en animales adultos (McEwen y cols. 1999). Sin embargo, se ha documentado que en el cerebro de rata neonatal la expresión del RP ocurre por estimulación del RE α y no del RE β (Wagner y cols., 2001). Probablemente, en cerdos neonatos el incremento de la expresión de NCAM 120 se deba a que E2 no estimuló a las células corticales para expresión del RP, consecuentemente se quedó intacto el efecto de E2 dando lugar a una expresión sostenida de NCAM.

En el cerebelo hubo mayor respuesta a P4 probablemente debido a que las células de Purkinje poseen una amplia variedad de enzimas esteroideogénicas. Estas se encargan de la síntesis de P4 y de alopregnanolona especialmente durante la etapa neonatal para mantener los procesos de desarrollo dendrítico, espinogénesis y sinaptogénesis del circuito neural cerebelar (Tsutsui K., 2008).

E2 actúa dentro de la misma célula en importantes eventos en el desarrollo de las células de Purkinje y en consecuencia se inicia un ciclo de retroalimentación hormonal que controla el desarrollo del cerebelo. Tanto E2 como P4 poseen la capacidad de unirse a sus respectivos receptores y funcionar como factores de transcripción controlando con ello la expresión de muchas proteínas, entre ellas las NCAM (Tsutsui K., 2008).

Nuestros resultados muestran que debido probablemente a la esteroidogénesis *in situ*, la concentración de P4 se mantuvo en niveles fisiológicos, que operó además con un incremento en su concentración dada por el tratamiento, manteniendo con ello un ambiente hormonal abundante en P4, que no fue capaz de provocar disminución en la expresión de NCAM. Sin embargo, en el caso del efecto de E2, su administración derivó probablemente, en el incremento de la expresión del RP, con lo cual la P4 sintetizada *in situ* fue capaz de provocar la disminución de la expresión de NCAM.

Guerra-Araiza y cols. (2003) documentaron que la expresión del RP en el hipotálamo es incrementada por E2 de forma natural mientras que P4 es capaz de contrarrestar dicho incremento. Esto apoya nuestros resultados que muestran que el hipotálamo es sensible a P4 modificando la expresión de NCAM y del glucotopo α 2,3 sialil-lactosa. En el hipotálamo se expresan dos isoformas de RP; una isoforma de tamaño completo llamada RP-B y una isoforma truncada en su sitio *N*-terminal llamada RP-A de 86 KDa, ambas derivadas del mismo gene. La expresión de ARNm de los RP's varía de acuerdo al ciclo estral, a la

región cerebral, al sexo y etapa del desarrollo (Guerra-Araiza y cols., 2003, Wagner y cols, 2001).

Con respecto a la presencia de α 2,3 sialil-lactosa en la NCAM, en los experimentos realizados para este trabajo, detectamos que E2 y P4 inducen cambios sobre la expresión del patrón de glucosilación terminal. Siendo este glucotipe un factor importante para la unión de la NCAM 120 con el RvPo, el análisis de los efectos de E2 y P4 podría explicar los cambios en la inmunodetección del mismo y que afecta la capacidad de unión de NCAM 120 con el RvPo. Nuestros resultados muestran que E2 provocó un incremento importante en la expresión de α 2,3 sialil-lactosa en células de la corteza cerebral. Mientras que en hipocampo y en hipotálamo la expresión del glucotipe no fue modificada por E2. Por el contrario, en el cerebelo E2 provocó una disminución en la expresión del glucotipe, quizás debido a la abundancia de RP y de la capacidad de síntesis de P4 en el cerebelo.

En la corteza cerebral encontramos que E2 mantuvo o promovió la incorporación del glucotipe α 2,3 sialil-lactosa en la NCAM 120. Sin embargo, esto no impidió que E2 ejerciera un efecto inhibitorio para la unión del RvPo. Por lo tanto, es probable que otros mecanismos estén modificando la calidad de la NCAM como receptor para RvPo. Los resultados mostraron que el tratamiento con P4 en cerdos neonatos no modificó la expresión del glucotipe en el cerebelo, región en donde su expresión es abundante de forma natural durante la etapa neonatal y además fue favorecida por los efectos de la P4 exógena sobre las células de Purkinje como se discutió anteriormente (Tsutsui K., 2008).

CONCLUSIONES.

1. El efecto de E2 y P4 en membranas de cerdo neonato provocaron una disminución significativa en la capacidad de unión del RvPo a su receptor mostrando con ello su probable potencial neuroprotector durante la infección *in vivo*.
2. La expresión de NCAM-120 no fue modificada por E2 ni P4 en las regiones cerebrales de cerdo neonato bajo estudio, pero sí mostraron una tendencia de su regulación a la baja. Para determinar si esta tendencia pudiera resultar significativa será necesario realizar experimentos utilizando un mayor número de animales.
3. En membranas de células neuronales de corteza cerebral E2 fue capaz de mantener un nivel de expresión de NCAM-120 alto, a su vez en corteza cerebral e hipocampo fue capaz de promover la incorporación de una mayor cantidad de residuos α 2,3 sialil-lactosa, sin embargo la capacidad de unión de RvPo disminuyó significativamente.
4. Resulta pertinente explorar el efecto de P4 sobre la estabilidad de microdominios de membrana, su efecto en la conformación de NCAM-120 y si estos cambios contribuyen a la escasa o nula unión del RvPo.

PERSPECTIVAS.

El análisis de los datos existentes en la literatura actual en contraposición con nuestros resultados, arroja una cuestión importante a considerar respecto a los posibles efectos de un tratamiento hormonal en los futuros experimentos *in-vivo*; la dosis hormonal óptima puede estar influenciada por el género del animal, tipo de daño experimental, vía de administración del tratamiento, estado hormonal del animal, parámetros estimados, tipo de vehículo utilizado y variación biológica en el metabolismo de las hormonas de acuerdo a la especie. Por lo tanto, se vuelven necesarios experimentos con mayor número de variables en cuanto a dosificación y estatus hormonal, género y edades de los animales experimentales.

Además, los efectos tanto de E2 como de P4 sobre la expresión de NCAM en experimentos *ex-vivo* e *in-vivo* tendrán que ser complementados con el empleo de los antagonistas del RP y RE.

BIBLIOGRAFIA.

1.- Angata K., Chan D., Thibault J., Fukuda M.; 2004; Molecular dissection of the ST8Sia IV polysialyltransferase. Distinct domains are required for neural cell adhesion molecule recognition and polysialylation.; **J. Biol Chem.** ; Vol: 279; No: 24; Pps: 25883-25890.

2.- Azcoitia Iñigo, Sierra Amanda, Veiga Sergio, García Segura Luis Miguel; 2003; Aromatase Expression by Reactive Astroglia Is Neuroprotective; **Annals of the New York Academy of Sciences.**; Vol:1007;No:1;Pps:298-305.

3.- Baulieu E. E.; 1997; Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system; **Recent Prog. Horm; Res;** Vol: 52; Pps:1-32.

4.- Charles P., Hernández M. P., Stankoff B., Aigrot M. S., Colin C., Rougon G., Zalc B., Lubetzki C.; 2000; Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule; **Proc. Natl. Acad. Sci.** ; Vol. 97 ; No. 13; Pps. 7585-7590.

5.- Chua K. B., Bellini W. J., Rota P. A. ; 2000 ; Nipah virus, a recently emergent deadly paramyxovirus; **Science**; Vol: 288; Pps: 1432-1435.

6.- Ciriza Iratxe, Carrero Paloma, Frye Cheryl A., García Segura Luis M.; 2006; Reduced Metabolites Mediate Neuroprotective Effects of Progesterone in the Adult Rat Hippocampus. The Synthetic Progesterin

Medroxyprogesterone Acetate (Provera) Is Not Neuroprotective;
Journal of Neurobiology; Vol: 66; Pps: 916-928.

7.- Cremer Harold, Chazal Genevieve, Carleton Alan, Goridis Christo, Vincent Jean-Didier, Lledo Pierre-Marie.; 1998; Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice; **Proc. Natl. Acad. Sci.** ; Vol. 95; Pps. 13242–13247.

8.- Falkenstein Elizabeth, Tillmann Hanns-Christian, Christ Michael, Feuring Martin, Wehling Martin; 2000; Multiple actions of steroid hormones- A focus on rapid, non genomic effects; **Pharmacological Reviews**; Vol:52; Pps: 513-555.

9.- Fiszman ML; 2003; Neuroprotección y factores neurotróficos;
Revista Neurológica; Vol:28; Pps:6-10.

10.- Freshney I. R.; 1987; Quantification and experimental design. En: **Culture of animal Cells. A manual of basic technique.**; **Ed: Wiley-Liss.**; Eds: Alan R. Liss.; Chap: 18; Pps: 227-244.

11.- Furukawa Keiko, Akagit Tsuyoshi, Nagata Yasuhiko, Yamada Yasuaki, Shimotohnot Kunitada, Cheung Nai-Kong V., Shiku Hiroshi, Furukawa Koichi; 1993; GD2 ganglioside on human T-lymphotropic virus type I-infected T cells: Possible activation of β -1,4-N acetylgalactosaminyltransferase gene by p40taX; **Proc. Natl. Acad. Sci. Medical Sciences.**; Vol: 90; Pps: 1972-1976.

- 12.- Furukawa Tetsushi, Kurokawa Junko.; 2008; Non-Genomic regulation of cardiac Ion Channels by sex hormones; **Cardiovascular and haematological disorders-drug targets**; Vol: 8; Pps: 245-251.
- 13.- Gago N, El-Etr M, Sananes N, Cadepond F, Samuel D, Avellana-Adalid V, Baron-Van Evercooren A, Schumacher M.; 2004; 3alpha,5alpha-Tetrahydroprogesterone (allopregnanolone) and gamma-aminobutyric acid: autocrine/paracrine interactions in the control of neonatal PSA-NCAM+ progenitor proliferation; **J Neurosci Res.**; Vol: 78; No: 6; Pps:770-83.
- 14.- Garcia Segura Luis M., Cañas Benito, Parducz Árpád, Rougon Geneviève, Theodosia Dionysia, Naftolin Frederick, Torres Alemán Ignacio; 1995; Estradiol promotion of changes in the morphology of astroglia growing in culture depends on the expression of polysialic acid of neural membranes; **GLIA**; Vol: 13; No: 3; Pps: 209 – 216.
- 15.- Gastka M, Horvath J, Lentz T; 1996; Rabies Virus Binding to the Nicotinic Acetylcholine Receptor α subunit Demonstrated by Virus Overlay Protein Binding Assay; **J. Gen. Virol.**; Vol: 77; Pps: 2437-2440.
- 16.- Gershoni J.M., Lapidó M, Zakai N, Loiter A; 1986; Protein Blot Analysis of virus receptor indication and characterization of the Sendai virus receptor; **Biochem Biophysics Acta**; Vol:856; Pps: 19-26.

- 17.- Guerra Araiza C., Villamar Cruz O., González Arenas A., Chavira R., Camacho Arroyo I.; 2003; Changes in Progesterone Receptor Isoforms Content in the Rat Brain During the Oestrus Cycle and After Oestradiol and Progesterone Treatments; **Journal of Neuroendocrinology**; Vol: 15; Pps: 984-990.
- 18.- Heinen E., Herbst W., Schmeer N.; 1998; Isolation of a cytopathogenic virus from a case of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and its characterization as a parainfluenza virus type 2; **Arch. Virol**; Vol: 143; Pps: 2233-2239.
- 19.- Jin Y, Pardoe I, Burness A, Michalak T; 1994; Identification and characterization of the cell surface 70-kilodalton sialoglycoprotein (s) as a candidate receptor for encephalomyocarditis virus on human nucleated cells; **Journal of Virology**; Vol: 68; No: 11; Pps: 7308-7319.
- 20.- Kiss JZ, Wang C, Olive S, Rougon G, Lang J, Baetens D, Harry D, Pralong WF; 1994; Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells; **EMBO J.** ;Vol.:13; No:22; Pps:5284-5292.
- 21.- Leshchyns'ka Iryna, Sytnyk Vladimir, Morrow Jon S. and Schachner Melitta; 2003; Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKC2 via I spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth; **The Journal of Cell Biology**, Vol: 161; No: 3; Pps: 625-639.

22.- Maier Eberhardt, Watanabe Michiko, Singer Marcus, Mcquarrie Irvine G., Sunshine Jeffrey, Rutishauser Urs.; 1986; Expression and function of neural cell adhesion molecule during limb regeneration; **Proc. Natl. Acad. Sci.**; Vol. 83, Pps. 8395-8399.

23.- McEwen S. Bruce and Alves E. Stephen; 1999; Estrogen Actions in the Central Nervous System; **Endocrine Reviews**; Vol: 20; No:3; Pps: 279–307.

24.- Universidad de Guadalajara.; CUCS.; Tesis Doctoral.; **Identificación de Moléculas Glucoprotéicas en las Membranas de Células Neuronales que unen al Rubulavirus Porcino de la Enfermedad del ojo Azul (RPEOA).**; Mendoza Magaña María Luisa.; México, Guadalajara.; 2001.

25.- Mendoza-Magaña M.L., Ramírez-Herrera M.A., Godoy-Martínez D.V., Dueñas-Jiménez J.M., Dueñas-Jiménez S.H.; **Progesterone decreases the Porcine Rubulavirus infection in cultured hypothalamic and hippocampal neurons**; Departamento de Fisiología y Departamento de Neurociencias; C.U.C.S.; Universidad de Guadalajara; **Proceedings of the Society For Neuroscience 34th Annual Meeting**, San Diego, California; USA; October; 2004.

26.- Mendoza-Magaña ML, Godoy-Martinez DV, Guerrero-Cazares H, Rodriguez-Peredo A, Duenas-Jimenez JM, Duenas-Jimenez SH, Ramirez-Herrera MA; **Differential effects of 17-β-Estradiol and Progesterone on PSA-NCAM modulation to induce neuroprotection**

against a neurotropic virus infection; Departamento de Fisiología y Departamento de Neurociencias; C.U.C.S.; Universidad de Guadalajara; **Proceedings of the Society For Neuroscience 36th Annual Meeting**; Atlanta, Georgia, USA; October; 2006.

27.- Mendoza-Magaña ML, Godoy-Martinez DV, Guerrero-Cazares H, Rodriguez-Peredo A, Duenas-Jimenez JM, Duenas-Jimenez SH, Ramirez-Herrera MA; 2007; Blue eye disease porcine rubulavirus (PoRv) infects pig neurons and glial cells using sialo-glycoprotein as receptor; **The Veterinary Journal.**; Vol:173; Pps:428-436.

28.- Mendoza Magaña ML, Dueñas Jiménez JM, Dueñas Jiménez SH, Ramírez Herrera MA; Modulación de infecciones virales en el sistema nervioso por efecto de hormonas esteroideas sexuales; Cap:35; Pps: 465-475; En: **Investigación en neurociencias: homenaje al Dr. Alfredo Feria Velasco**; Ruth de Celis; Ed: Bios-Médica; México; 2007a; 1ª Edición.

29.- Muller D., Djebbara-Hannas Z., Jourdain P., Vutskits L., Durbec P., Rougon G., and Kiss J. Z.; 2000; Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus; **Proc. Nati. Acad. Sci.**; Vol 97; No.8; Pps. 4315-4320.

30.- Placzek Ekaterina A., Okamoto Yasuo, Ueda Natsuo, Barker Erick L.; 2008; mechanisms for recycling and biosynthesis of endogenous

cannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol; Journal of Neurochemistry; Vol: 107; Pps: 987-1000.

31.- Plassart-Shiess E, Balieu EE; 2002; Neurosteroids: recent findings. Brain Research Rev. Vol: 37; Pps:133 -140.

32.- Ramírez-Herrera M. A., Mendoza-Magaña M. L., Dueñas S.H.; 1997; Experimental Infection of Swine and Cat Central Nervous Systems by the Pig Paramixovirus of the Blue Eye Disease; J. Vet. Med. B; Vol: 44; Pps: 461-476.

33.- Ramírez Mendoza H., Martínez Gamba R., Vizuet Arriaga O. T., Monroy Basilio J.; 1999.; Inoculación del virus de la enfermedad del ojo azul en verracos de la raza Pelón Mexicano; Vet. Mex.; Vol. 30; No.1; Pps: 1-6.

34.- Rau Shane W., Dubal Dena B., Böttner Martina, Gerhold Lynnette M., and Wise Phyllis M.; 2003; Estradiol Attenuates Programmed Cell Death after Stroke-Like Injury; The Journal of Neuroscience; Vol:23; No:36; Pps:11420 –11426.

35.- Reddy AP, Pau KYF, Bethea CL ;2004; Array analysis on the monkey raphe region reveals ovarian steroid effects on neuroprotective genes. Society for Neuroscience ; 34th Annual Meeting.

36.- Reyes-Leyva J, Hernández-Jáuregui P, Montañó LF, Zenteno E.; 1993; The porcine paramixovirus LPM specifically recognizes sialyl

(2,3) lactose containing □ structures; **Arch. Virol.**; Vol: 133; Pps:195-200.

37.- Reyes Leyva Julio., Santos Gerardo., Hernández Jesús., Espinosa Blanca., Borraz María del Tránsito., Ramírez Humberto., Vallejo Verónica., Zenteno Edgar; 2002; Mecanismos moleculares de la patogenia viral: Estudios con el *rubulavirus porcino*.; **Mensaje Bioquímico**.; Vol. 26.; Pps: 99-127.

38.- Santos López G., Hernández J., Borraz Argüello M.T. , Ramírez Mendoza H., Vallejo V. , Reyes Leyva J. ; 2004; Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino; **Archivos de medicina veterinaria**; Vol. 36; No. 2; Pps: 119-136.

39.- Sato Chihiro, Fukuoka Hideyuki, Ohta Kaoru, Matsuda Tsukasa, Koshino Rika, Kobayashi Kasukiyo, Troy Frederick A., Kitiyama Ken; 2000; Frequent Occurrence of Pre-existing α 2-8-Linked Disialic and Oligosialic Acids with Chain Lengths up to 7 Sia Residues in Mammalian Brain Glycoproteins; **J Biol. Chem**; Vol: 275; No: 20; Pps: 15422-15431.

40.- Singh M.; 2006; Progesterone-induced neuroprotection; **Endocrine**; Vol:29; No:2; Pps:271-4.

41.- Smith Caroline C., McMahon Lori L.; 2005; Estrogen-Induced Increase in the Magnitude of Long-Term Potentiation Occurs Only When the Ratio of NMDA Transmission to AMPA Transmission Is

- Increased; The Journal of Neuroscience; Vol: 25; No: 34; Pps:7780 – 7791.
- 42.- Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jaúregui P, Linné T, Moreno-López J.; 1990; The structural proteins of the porcine paramyxovirus (LPMV); J. Gen. Virol. Vol: 71; Pps: 609-613.
- 43.- Tortora Gerard J., Reynolds Grabowski Sandra; 2002; Principios de Anatomía y Fisiología.;Ed: Oxford University Press; 9na edición.
- 44.- Tsutsui Kazuyoshi; 2008; Minireview: Progesterone Biosynthesis and Action in the Developing Neuron; Endocrinology; Vol:149; No: 6; Pps: 2757-2761.
- 45.- Wagner CK, Pfau JL, De Vries GJ, Merchenthaler IJ.; 2001; Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor alpha expression.; J Neurobiol. ; Vol:47; No:3; Pps:176-82.
- 46.- Wray S. y Noble K; 2008; Sex hormones and excitation-contraction coupling in the uterus: the effects of oestrous and hormones; Journal of Neuroendocrinology; Vol: 20; Pps: 451-461.
- 47.- Yi Hu Zong, Bourreau Eliane, Jung-Testas Ingrid, Robel Paul, Baulieu Etienne-Emile; 1987 ; Neurosteroids: Oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone; Proc. Natl. Acad. Sci. Biochemistry.; Vol: 84; Pps: 8215-8219.