

2005B-2009B

302452634

---

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

---



**Niveles de expresión del RNA mensajero de las  
subunidades  $\alpha$ 1-2,  $\beta$ 1-2 y  $\gamma$ 2 del receptor GABA<sub>A</sub> en el  
hipocampo de rata después del tratamiento neonatal con  
glutamato monosódico**

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE  
TESIS**

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

**PRESENTA**

**MARCO SAÚL PARTIDA VÁZQUEZ**

**Las Agujas, Zapopán, Jal., Diciembre de 2010**



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

COORD-BIO-130/2010.

C. MARCO SAÚL PARTIDA VÁZQUEZ  
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: "**Niveles de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha 1-2$ ,  $\beta 1-2$  y  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo de rata después del tratamiento neonatal con glutamato monosódico**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la **Dra. Mónica Elisa Ureña Guerrero** y como asesor a la **Dra. Martha Catalina Rivera Cervantes**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"  
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 21 de octubre del 2010.

  
DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA  
LICENCIATURA EN BIOLÓGICA

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

FORMA F

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.  
Presidente del Comité de Titulación.  
Licenciatura en Biología.  
CUCBA.  
Presente

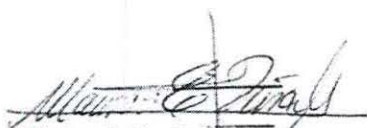
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis e informes, opción tesis con el título: "Niveles de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha$ 1-2,  $\beta$ 1-2 y  $\gamma$ 2 del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo de rata después del tratamiento neonatal con glutamato monosódico" que realizó el pasante Marco Saúl Partida Vázquez con número de código 302452634 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.

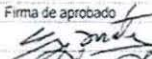
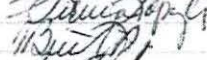


Atentamente  
Carretera a Nogales Km. 15, las Aguias, Zapopán, Jal., México.  
19 de noviembre del 2010



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

  
Mónica E. Ureña Guerrero.  
Directora del trabajo,

  
Martha C. Rivera Cervantes  
Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Carlos Beas Zárate		19-NOV-2010
Silvia Josefina López Pérez		20-NOV-2010
Jacinto Bañuelos Pineda		19-NOV-2010
Supl. Martha C. Rivera Cervante		19-NOV/2010

Este trabajo se realizo en el Laboratorio de Neurobiología Celular del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, bajo la dirección de la Dra. Mónica Elisa Ureña Guerrero y la asesoría de la Dra. Martha C. Rivera Cervantes.

## AGRADECIMENTOS

Al Programa Apoyo a la Mejora en las Condiciones de Producción de los Miembros del SNI y SNCA (PRO-SNI), Subprograma 2, de los años 2008 y 2009, de la Universidad de Guadalajara, que a través de los contratos No. 2660848 y No.2957592, me otorgó apoyo económico como Prestador de Servicios Técnicos, durante la realización de este trabajo.

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a las Doctoras Mónica Elisa Ureña Guerrero y Martha C. Rivera Cervantes por todo el apoyo que me han brindado, y por la dirección rigurosa de este trabajo.

Así mismo agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Neurobiología Celular por su apoyo personal y humano.

Gracias a mi familia, a mis padres, por todo el cariño y apoyo moral que siempre he recibido de ustedes y con el cual he logrado culminar mi esfuerzo, terminando así mi carrera profesional, que es para mi la mejor de las herencias

*“Un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales” (Anónimo).*

A todos, muchas gracias.

## ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPA	Ácido propiónico 3-amino-hidroxi-5-metil isoxazol
Asp	Ácido aspártico
ATP	Trifosfato de adenosina
BZs	Benzodiazepinas
ETL	Epilepsia de Lóbulo Temporal
Ca <sup>++</sup>	Ión calcio
[Ca <sup>++</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración intracelular del ión calcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Cl <sup>-</sup>	Ión cloruro
DTT	Ditiotreitol
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GABA-T	Transaminasa del GABA
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutámico
GMS	Glutamato Monosódico
K <sup>+</sup>	Ión potasio
KA	Ácido Kaínico
HNE	4-Hidroxinonenal
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
LP	Lipoperoxidación
Mg <sup>++</sup>	Ión Magnesio
M-MLV-RT	Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina de Moloney
Na <sup>+</sup>	Ión sodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico

O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical Superóxido
PLA2	Fosfolipasa A2
PKC	Proteína cinasa C
R-GABA <sub>A</sub>	Receptor para GABA de tipo A
R-GABA <sub>B</sub>	Receptor para GABA de tipo B
R-Glu	Receptor para Glutamato
R-Glum	Receptor para Glutamato de tipo metabotrópico
R-NMDA	Receptor para N-metil-D-aspartato
R-KA	Receptor al ácido kaínico
R-AMPA	Receptor al ácido propiónico 3-amino-hidroxi-5-metil isoxazol
RE	Retículo Endoplásmico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscripción
TM	Dominios Transmembranales
SN	Sistema Nervioso
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNC	Sistema Nervioso Central

## RESUMEN

La administración subcutánea de glutamato monosódico (GMS) a ratas recién nacidas induce varias alteraciones neuroquímicas en el cerebro, las cuales al parecer, se deben fundamentalmente a un proceso excitotóxico iniciado por la sobre activación de los receptores ionotrópicos sensibles a glutamato. Particularmente, las alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica, resultan de interés debido a que ésta es determinante en la maduración del sistema nervioso y en el control de la excitabilidad neuronal, además de que se modifica en diferentes padecimientos neurológicos. Así, en este trabajo se caracterizaron los efectos del tratamiento neonatal con GMS sobre el nivel de expresión del RNA mensajero de las principales subunidades del receptor para GABA de tipo A (R-GABA<sub>A</sub>) en el hipocampo de ratas adultas. Esta región cerebral es altamente susceptible al daño excitotóxico y también participa en la generación de crisis epileptiformes, así como en la consolidación de la memoria. Los RNA mensajeros estudiados fueron los correspondientes a las subunidades:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 2$ , a través de la técnica de RT-PCR (Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa; por sus siglas en inglés). Los resultados revelan que la exposición de ratas neonatas al tratamiento con GMS modifica diferencialmente la expresión del RNA mensajero de cada una de las subunidades estudiadas en el hipocampo de la rata adulta. Así, el nivel de expresión de los RNA mensajeros de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se aumentó en 70 y 30%, respectivamente; en tanto que el nivel de expresión de los RNA mensajeros de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  tuvieron una tendencia a disminuir, pero sin ser estadísticamente significativo; finalmente, el nivel de expresión de subunidad  $\gamma 2$  disminuyó en un 30%. Debido a que previamente se demostró que el tratamiento neonatal con GMS disminuye la densidad de células GABA-positivas en el hipocampo de ratas adultas, los resultados de este trabajo sugieren que las neuronas que sobreviven al daño producido por



dicho tratamiento, elevan la expresión del RNA mensajero de las subunidades que se relacionan con R-GABA<sub>A</sub> post-sinápticos con alta afinidad por el GABA ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), y disminuyen la expresión de la subunidad  $\gamma 2$ , que determina la potenciación de la inhibición GABAérgica por benzodiazepinas en dichos receptores. Así, ambos cambios podrían relacionarse con el aumento en la susceptibilidad a las crisis convulsivas inducidas por el antagonista del R-GABA<sub>A</sub>, bicuculina, observado por otros autores en la etapa adulta, después del tratamiento neonatal con GMS.

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	iv
Resumen.....	vi
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>5</b>
1. Neurotransmisión GABAérgica .....	5
2. Receptor GABA <sub>B</sub> .....	7
3. Receptor GABA <sub>A</sub> .....	8
4. Implicaciones funcionales de las modificaciones estructurales del R-GABA <sub>A</sub> .....	10
5. Neurotoxicidad por Glutamato.....	11
6. Administración sistémica de glutamato monosódico.....	14
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>16</b>
<b>IV. HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>V. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>18</b>
<b>VI. DIAGRAMA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>19</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
1. Extracción de RNA total.....	20
2. Síntesis de cDNA .....	21
3. Análisis de las muestras por PCR .....	22
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>IX. DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>X. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>XI. REFERENCIAS .....</b>	<b>33</b>

## INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso (SN) comprende tres niveles de organización funcional: el primero, representado por los receptores sensoriales, que perciben estímulos de diferente naturaleza y procedencia; el segundo, comprende a los centros nerviosos integradores, que se encargan de procesar información generada por dichos estímulos; y el tercero, comprende a las estructuras que envían las respuestas hacia los órganos efectores (López-Antúnez, 1983; Kandel et al., 2000).

Funcional y estructuralmente, el SN se divide en: 1) Sistema Nervioso Central (SNC): muestra simetría bilateral y se compone de las siguientes estructuras: médula espinal, médula oblonga, puente de Varolio, cerebelo, cerebro medio, diencéfalo y hemisferios cerebrales, dichas estructuras se encargan del procesamiento de la información y la generación de respuestas ante los estímulos. 2) Sistema Nervioso Periférico (SNP): se divide en somático y autónomo; y la división somática, incluye las neuronas sensoriales que inervan la piel, músculos y articulaciones, en tanto que la división autónoma, controla la sensación visceral, la actividad motora de vísceras, músculo liso y glándulas (Kandel et al., 2000).

El tejido nervioso comprende varios tipos de elementos celulares, donde las células neuronales y gliales, constituyen una entidad neuroquímica y fisiológicamente determinante para el funcionamiento normal del SN. Las neuronas son células altamente especializadas en generar, transmitir y recibir señales. Una neurona consta de un cuerpo celular o soma; un número variable de dendritas que emanan del cuerpo celular y se ramifican sobre cierto volumen de materia gris y difieren en tamaño y forma dependiendo del tipo neural; y un solo axón, que es una ramificación generalmente de mayor longitud que las dendritas, que participa en la transmisión del impulso nervioso y el establecimiento de contactos sinápticos con otras neuronas (Hof et al., 1999).

La transmisión de información entre las neuronas es esencial y sucede en zonas especializadas que establecen contactos denominados sinapsis, las cuales pueden ser: eléctricas o químicas. Las sinapsis eléctricas entre las neuronas se establecen a través de uniones comunicantes, la transmisión de la información es rápida, son sinapsis que modulan respuestas estereotipadas y se establecen primordialmente para generar señales simples. En las sinapsis químicas, las respuestas que se generan son variables y complejas, además de amplificadas. Esta transmisión depende de un neurotransmisor, que es una sustancia química que se une a receptores específicos de la membrana de la célula post-sináptica (Kandel et al., 2000).

En términos generales, la neurotransmisión sináptica mediada por neurotransmisores puede ser excitadora o inhibitoria. Así, los aminoácidos dicarboxílicos como el Glutamato (Glu) y el Aspartato (Asp) generan una respuesta despolarizante excitadora al activar receptores ionotrópicos que permiten la entrada de sodio y calcio a la célula post-sináptica. En tanto que aminoácidos neutros como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y la glicina se comportan como neurotransmisores inhibitorios, que promueven la hiperpolarización de la membrana neuronal (Stone, 1995; Erecinska y Silver, 1990; Fagg y Foster, 1983). En la actualidad, se reconoce plenamente, que el Glu es el principal neurotransmisor excitador en el SNC de mamíferos y se estima que más del 70% de las sinapsis excitadoras utilizan como neurotransmisor al Glu. Los antecedentes que sustentan su función como neurotransmisor datan de hace más de medio siglo (Hayashi, 1954). Posteriormente, se demostró que el Glu se almacena en la presinapsis en vesículas sinápticas, que se libera en un proceso dependiente de la activación de canales de  $Ca^{++}$  (fibras nerviosas glutamatergicas) y que existen mecanismos de captura de alta afinidad para el Glu, tanto en la membrana presináptica, como en la de las células gliales (Erecinska y Silver, 1990; Fagg y Foster, 1983; Greenamyre, 1986; Stone, 1995; Danysz et al., 1995).

El efecto excitador que ejerce el Glu depende de su interacción con dos tipos de receptores: los metabotrópicos y los ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos sensibles a Glu, se acoplan a mecanismos de transducción de señales, que permiten la modulación de los niveles de segundos mensajeros como el AMPc y el IP3, estos receptores se componen por una sola proteína que cruza siete veces la membrana plasmática, y en la actualidad se han descrito 8 subtipos, denominados R-Glu<sub>m</sub>1-8 (Gereau y Swanson, 2008).

Por otra parte, los receptores ionotrópicos sensibles a Glu, se clasifican de acuerdo con su afinidad por agonistas específicos en: receptores sensibles a N-metil-D-aspartato (R-NMDA), a ácido kaínico (R-KA) y a ácido propiónico 3-amino-hidroxi-5-metil isoxazol (R-AMPA); este tipo de receptores, desde el punto de vista molecular, se conforman por combinaciones heteroméricas de diferentes subunidades proteicas; y al activarse elevan la conductancia de cationes como el K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup>, a través de la membrana post-sináptica, lo que determina su efecto despolarizante (Collingridge y Singer, 1990; Mody y McDonald, 1995; Greenamyre, 1986; Danysz et al., 1995; Schoepp y Conn, 1993; Koroshetz y Moskowitz, 1996; Wisden y Seeburg, 1993; Dingledine et al., 1999; Alexander et al., 2001).

Por otro lado, entre 1950 y 1965, diversos estudios demostraron que el GABA es una sustancia neurotransmisora que produce inhibición neuronal en la etapa adulta. Los efectos del GABA dependen de su interacción con dos tipos de receptores farmacológica y molecularmente diferentes: los receptores para GABA de tipo A (R-GABA<sub>A</sub>), que son ionotrópicos; y los de tipo B (R-GABA<sub>B</sub>), que son metabotrópicos. El R-GABA<sub>A</sub> fue el primero en identificarse farmacológicamente, como sensible al agonista selectivo muscimol, y a los antagonistas bicuculina y picrotoxina, además, puede ser modulado por benzodiazepinas (BZs), barbitúricos y otros depresores del SNC. La activación de este receptor aumenta la conductancia a Cl<sup>-</sup> y produce en la etapa adulta, hiperpolarización neuronal (Macdonald y Olsen, 1994). El R-GABA<sub>B</sub> además de activarse por GABA, es sensible a su agonista selectivo baclofen pero

insensible a los ligandos típicos del R-GABA<sub>A</sub>. La activación de este receptor promueve la activación de efectores intracelulares que regulan la activación de los canales de K<sup>+</sup> o de Ca<sup>++</sup> dependientes de voltaje (Bowery et al., 2002).

En la actualidad, se acepta que la homeostasis de la actividad neuronal depende en gran medida, del equilibrio dinámico entre la neurotransmisión glutamatérgica y la GABAérgica (Fagg y Foster, 1983; Erecinska y Silver, 1990). Así, cuando la concentración intracerebral de Glu se eleva significativamente, puede producir degeneración excitotóxica, al sobre activar a sus receptores (Olney, 1971; Choi, 1988; Martin et al., 1998; Obrenovitch et al., 2000), condición que puede promover la generación de crisis convulsivas, así como la activación de diferentes vías de señalización intracelular que producen la muerte celular. La administración de glutamato monosódico (GMS) a animales recién nacidos promueve la muerte neuronal en varias regiones cerebrales, como la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo (Beas-Zárate et al., 2001; Ureña-Guerrero et al., 2009; López-Pérez et al., 2005). Las neuronas GABAérgicas son abundantes en estas regiones cerebrales y particularmente en el hipocampo su densidad se disminuye después del tratamiento neonatal con GMS (Ureña-Guerrero et al., 2009), por lo que la expresión de las subunidades que componen a los R-GABA<sub>A</sub> podría modificarse como parte de los mecanismos neuronales que intentan compensar dicha pérdida neuronal. Dicha hipótesis, se evalúa en este trabajo, debido a las repercusiones funcionales que las modificaciones en composición de los R-GABA<sub>A</sub> podrían tener sobre el control de la excitabilidad neuronal y en el desarrollo de diversas neuropatologías.

## ANTECEDENTES

### Neurotransmisión GABAérgica

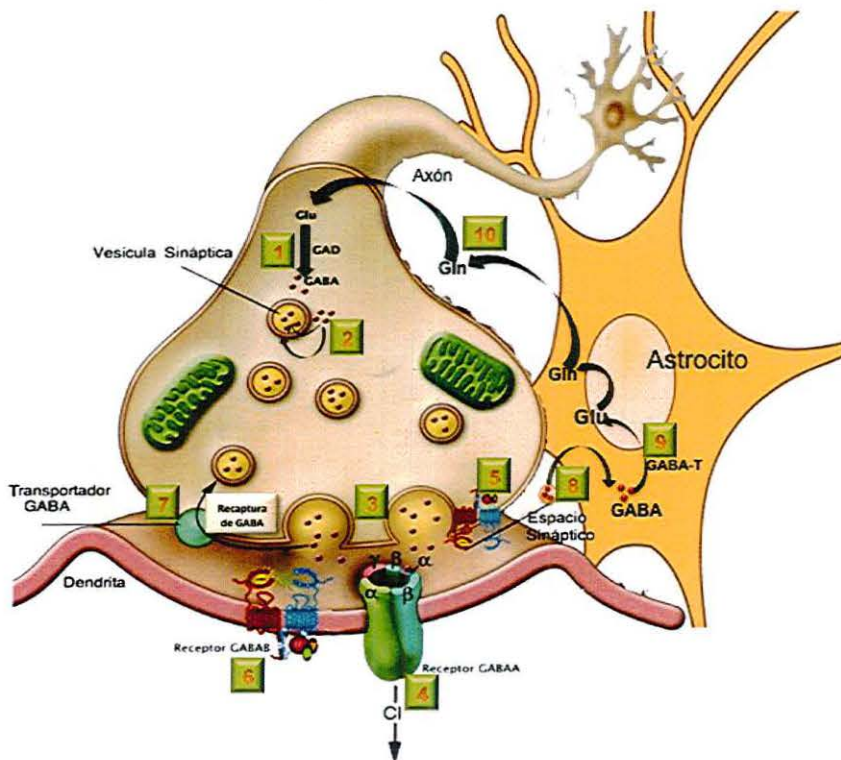
La glucosa es el principal precursor para la producción de GABA *in vivo*, aunque el piruvato y otros aminoácidos también pueden actuar como precursores. La primera etapa en la síntesis del GABA es la transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato por la transaminasa del GABA (GABA-T) en ácido L-Glu (Kandel et al., 2000). La descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) entonces, cataliza la descarboxilación del Glu para formar GABA (Erlander y Tobin, 1991) (Figura 1).

El GABA tiene una amplia distribución en el organismo, sin embargo, su concentración intracerebral es mayor (Tapia, 1983). En el SNC, el GABA se distribuye prácticamente en todas las regiones cerebrales y ejerce un control amplio sobre la excitabilidad neuronal, condiciones que lo definen como el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC de mamíferos (Wu, 1983)

Las neuronas GABAérgicas son de morfología variable (estrelladas, en canasta, de Purkinje, etc.), todas sintetizan GABA, pero se diferencian a través del estudio de sus aferencias sinápticas, así como por su contenido de neuropéptidos como la somatostatina y el neuropéptido Y, o de proteínas secuestradoras de calcio como la parvalbumina, calcineurina y calbindina (Retaux et al., 1992). En el hipocampo, las células en canasta que inervan a las neuronas piramidales, liberan GABA, lo mismo que múltiples interneuronas hipocámpicas, corticales, del bulbo olfatorio y de médula espinal (Tapia, 1983; Wu, 1983; Ribak y Roberts, 1990). Así, en algunas regiones como la corteza cerebral, los ganglios basales, el hipocampo y el cerebelo la densidad de neuronas GABAérgicas es muy alta, y llega a constituir hasta el 50% de la población neuronal (Tapia, 1983; Wu, 1983; Ribak y Roberts, 1990; Retaux et al., 1992; Feldum et al., 1993).

Los efectos neuronales del GABA dependen de su interacción con receptores específicos, los cuales se han clasificado en dos tipos, conocidos como

receptores para GABA de tipo A (R-GABA<sub>A</sub>), que son ionotrópicos y de tipo B (R-GABA<sub>B</sub>), que son metabotrópicos (Tabla 1). Esta clasificación se basa en la respuesta farmacológica de los receptores a diferentes agonistas, de tal forma que aquellos que son sensibles a la activación por muscimol y al bloqueo por bicuculina se consideran R-GABA<sub>A</sub>, mientras que los que no son bloqueados por bicuculina, pero se activan en presencia de baclofen se consideran R-GABA<sub>B</sub> (Bormann, 1988; Burt y Kamatchi, 1991).



**Figura 1.** Sinapsis GABAérgica. 1) Síntesis de GABA; 2) Transporte vesicular de GABA; 3) Liberación de GABA por exocitosis; 4) Interacción del GABA con el R-GABA<sub>A</sub>; 5) y 6) interacción del GABA con el R-GABA<sub>B</sub> pre- y postsináptico, respectivamente; 7) Recaptura neuronal de GABA; 8) Recaptura astroglial de GABA; 9) Degradación bioquímica del GABA por la transaminasa del GABA (GABA-T); 10) Transporte de glutamina (Gln) desde la astrocita hacia la neurona presináptica. Esquema elaborado a partir de Kandel et al., 2000.



## Receptor GABA<sub>B</sub>

El R-GABA<sub>B</sub> es de tipo metabotrópico y regula directamente los canales de Ca<sup>++</sup> e indirectamente los canales de K<sup>+</sup>, a través de la activación de proteínas G y la producción de segundos mensajeros. La interacción del GABA con este receptor promueve la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2), que produce ácido araquidónico (AA), el cual activa a la proteína cinasa C (PKC), que fosforila a los canales de Ca<sup>++</sup> inactivándolos, para disminuir la liberación de neurotransmisores. Las corrientes de K<sup>+</sup> se afectan como consecuencia del cierre de los canales de calcio (Bormann, 1988). Los R-GABA<sub>B</sub> se encuentran tanto a nivel pre-sináptico como post-sináptico, donde participan en la modulación de la actividad de otros receptores, incluyendo a los R-GABA<sub>A</sub> (Kardos, 1999; Hahner et al., 1991).

**Tabla 1.** Tipos de receptores para GABA y subunidades que los componen.

TIPOS DE RECEPTOR	
Ionotrópicos	Metabotrópicos
GABA <sub>A</sub>	GABA <sub>B</sub>
Subunidades	
α1-6	GABA <sub>B1a-e</sub>
β1-3	GABA <sub>B2</sub>
γ1-3	
δ1	
ε1	
θ1	
π1	
ρ1-3	

Molecularmente, se han identificado dos tipos de subunidades, GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub>; y para la proteína GABA<sub>B1</sub> se conocen al menos cinco variantes de edición (GABA<sub>B1a-e</sub>) (Tabla1) (Lujan et al., 2005). Algunos trabajos, sugieren que la activación del R-GABA<sub>B</sub> depende de un proceso de heterodimerización (Bowery et al., 2002).

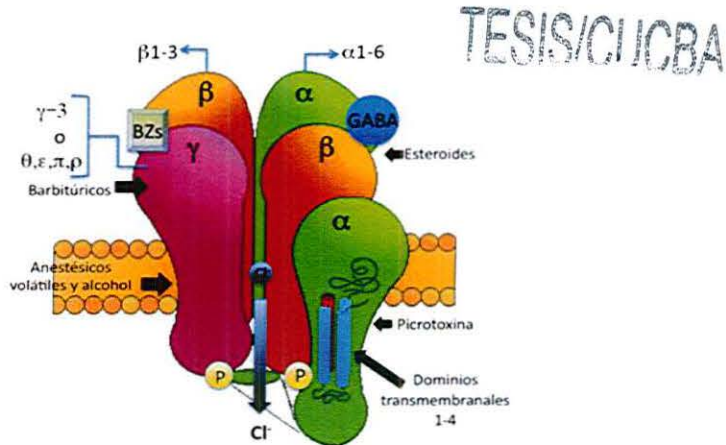
### **Receptor GABA<sub>A</sub>**

El R-GABA<sub>A</sub> es miembro de una familia de canales iónicos activados por ligando, es decir cuentan con un canal iónico acoplado a su estructura, el cual permite la difusión facilitada de Cl<sup>-</sup> como consecuencia de su interacción con el GABA (Borman, 1988). Además estos receptores poseen sitios de unión sensibles a benzodiazepinas (BZs), barbitúricos, esteroides, anestésicos, convulsionantes y anticonvulsionantes (Burt y Kamatchi, 1991).

Similar a otros miembros de esta superfamilia de receptores, los R-GABA<sub>A</sub> se componen por 5 subunidades (Sieghart et al., 2002). Todas ellas con un dominio extracelular N-terminal largo, cuatro dominios transmembranales (TM1-4), un bucle extracelular grande entre los dominios TM3 y TM4 (Barnard et al., 1988) y un extremo C-terminal extracelular. El dominio TM2 forma el revestimiento del canal iónico, con una posible contribución de TM1 (Figura 2) (Corringer et al., 2000; Sine y Engel, 2006; Jacob, et al., 2008).

Aunque el R-GABA<sub>A</sub> puede conformarse por combinaciones diferentes de hasta 19 subunidades: 6 $\alpha$ , 4 $\beta$ , 3 $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  y 3 $\rho$  (Tabla 1) (Barnard et al., 1998); la combinación más común es:  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\gamma$ 2 (Farrant y Nusser, 2005; Ben-Ari et al., 2007) (Tabla 2). Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se alternan entre sí, y la subunidad  $\gamma$  completa el pentámero. La unión del neurotransmisor GABA en este receptor ocurre precisamente en la interfase entre la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$  (Figura 2), por lo que se requieren dos moléculas de GABA para inducir la apertura del canal, a lo que típicamente sigue una entrada rápida de Cl<sup>-</sup> a la célula, que da origen a la hiperpolarización de la membrana y por lo tanto, a un fenómeno de inhibición en la etapa adulta. El R-GABA<sub>A</sub> además, es

susceptible a las benzodiazepinas, las cuales se unen en la interfase entre las subunidades  $\alpha 1$ , 2, 3 o 5 y la subunidad  $\gamma$ , lo que refuerza la entrada de  $\text{Cl}^-$  inducido por GABA (Farrant y Nusser, 2005; Brumback y Staley, 2008; Jacob, et al., 2008).



**Figura 2.** Representación esquemática del RGABA<sub>A</sub>, mostrando su estructura pentamérica y los sitios de reconocimiento para sus diferentes ligandos. Esquema elaborado con base en Farrant y Nusser, 2005.

**Tabla 2.** Distribución regional y propiedades farmacológicas de las subunidades del R-GABA<sub>A</sub> más abundante en el cerebro.

SUBUNIDAD	DISTRIBUCIÓN REGIONAL PREFERENCIAL	PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS ESPECÍFICAS
$\alpha 1$	Corteza cerebelar y cerebral, tálamo y globo pálido	Acción sedante, anestésica y anticonvulsinante de las benzodiazepinas
$\alpha 2$	Hipocampo, núcleo amigdalino y estriado	Acción ansiolítico y miorrelajante (a mayor dosis) de las benzodiazepinas
$\beta 1$	Hipocampo	Salicilidina y salicilhidrazida como inhibidor selectivo
$\beta 2$	Tálamo	Acción anestésica de etanomidato
$\gamma 2$	Ubicuo en el cerebro	No específicas

Modificada de Guido y Stephen, 2007.

Aunque la mayoría de los R-GABA<sub>A</sub> son heterómeros, se han identificado receptores  $\rho$  homoméricos, que contienen únicamente combinaciones de las subunidades  $\rho$ 1-3 (Barnard et al., 1998; Johnston, 2002), que originan un R-GABA<sub>A</sub> que exhibe un perfil farmacológico particular, insensible a bicuculina, picrotoxina y benzodiazepinas, pero sensible al ácido cis-4-aminocrotónico (Johnston, 2002; Bormann, 2000). Esta selectividad llevó inicialmente a designarlo como sitios de GABA<sub>C</sub>, pero su caracterización subsecuente reveló que es un subtipo del R-GABA<sub>A</sub> (Enna y Möhler, 2007).

### **Implicaciones funcionales de las modificaciones estructurales del R-GABA<sub>A</sub>**

La composición diferencial del R-GABA<sub>A</sub>, en cuanto a las subunidades que pueden estructurarlo, modifica significativamente la funcionalidad del receptor: en caso de que el receptor se conforme de las subunidades  $\alpha$ 1, 2, 3 o 5 junto con las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  además de ser susceptibles a la modulación positiva de las benzodiazepinas, se localizan preferentemente a nivel sináptico y determinan la inhibición fásica que ejerce el GABA en el cerebro; en cambio, al conformarse por subunidades  $\alpha$ 4 o  $\alpha$ 6 junto con las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , son menos sensibles a las benzodiazepinas y se localizan preferentemente a nivel extra-sináptico, mediando la inhibición tónica (Olsen y Sieghart, 2008). La subunidad  $\gamma$ , puede ser reemplazada por las subunidades  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  y  $\rho$ 1-3 (Jacob et al., 2008). Particularmente, la subunidad  $\gamma$ 2 se ha relacionado tanto con la inhibición tónica como fásica en el hipocampo; y se considera como una subunidad crítica en el agrupamiento, tráfico y mantenimiento sináptico del receptor (Eugéne et al., 2007). Las mutaciones en la subunidad  $\gamma$ 2 del R-GABA<sub>A</sub> se asocian con la transmisión dominante autosomal de las crisis febriles (Baulac et al., 2001), así como, con síndromes epilépticos de crisis febriles (Eugéne et al., 2007) y generalizadas en humanos (Chiu et al., 2008). Además, la subunidad  $\alpha$ 1 también se ha asociado a epilepsias idiopáticas generalizadas (Enna y Moler, 2007).

## **Neurotoxicidad por Glutamato**

En 1957, R.D. Lucas y J.P. Newhouse, descubrieron casualmente el fenómeno de excitotoxicidad al observar que el consumo de glutamato monosódico por ratones lactantes provocaba la muerte de las neuronas de la retina. Una década después, Olney amplió este descubrimiento, mostrando que el GMS producía pérdida neuronal en varias regiones del cerebro. El daño estaba limitado a las células post-sinápticas, mientras que las terminales presinápticas permanecían intactas. Olney también examinó la potencia relativa de los agonistas glutamatérgicos y encontró que sus acciones neurotóxicas son paralelas a su capacidad de activar a los receptores glutamatérgicos postsinápticos. Además, los antagonistas glutamatérgicos fueron efectivos para bloquear los efectos neurotóxicos del Glu. A partir de esta evidencia, Olney postuló que el Glu destruye a las neuronas por un mecanismo similar a la neurotransmisión excitadora y acuñó el término "excitotoxicidad" para referirse a la muerte neuronal producida por la sobre activación de los receptores glutamatérgicos (Olney et al., 1971).

La excitotoxicidad mediada por Glu se ha asociado a diferentes estados patológicos del SNC, entre los que destacan: la epilepsia (Khor y Heinemann, 1989), hipoxia/isquemia (Siesjo y Bengtsson, 1989) y el trauma craneoencefálico (Faden et al., 1989). Además, se le ha implicado en padecimientos crónicos neurodegenerativos, tales como: la enfermedad de Huntington (Young et al., 1988), Alzheimer (Greenamyre et al., 1985) y el Parkinson (Turski et al., 1991), entre otras.

El estudio de los mecanismos disparadores del daño neuronal excitotóxico, así como de los eventos subsecuentes, ha ampliado el conocimiento sistematizado del proceso, aunque todavía hay varios aspectos por determinar. Así, se ha observado que exposiciones breves a Glu producen muerte neuronal aguda, con cambios neurodegenerativos inmediatos. En tanto que la exposición prolongada a Glu produce muerte neuronal retardada, la cual depende del flujo de  $Ca^{++}$  y requiere de varias horas para presentarse (Romano et al., 1995).

En principio la sobre activación de los receptores glutamatérgicos promueve la despolarización de la membrana, que al prolongarse produce un desequilibrio osmótico ocasionado por la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Doble, 1999). Además, hay un incremento en la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{++}]_i$ ) (Choi, 1990; Choi, 1995; Rothman y Olney., 1986; Siesjo y Bengtsson, 1989), el cual promueve la lipoperoxidación (LP) de las membranas: citoplasmática, del retículo endoplásmico (RE) y de la mitocondria (Mattson et al., 2000). La LP se debe a la sobre producción de radicales libres, entre los que destaca el óxido nítrico (NO) y el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), los cuales a su vez favorecen la producción de peroxinitritos; además del 4-hidroxinonenal (HNE) que altera la actividad de transportadores y canales iónicos (Mattson et al., 2000) (Figura 3).

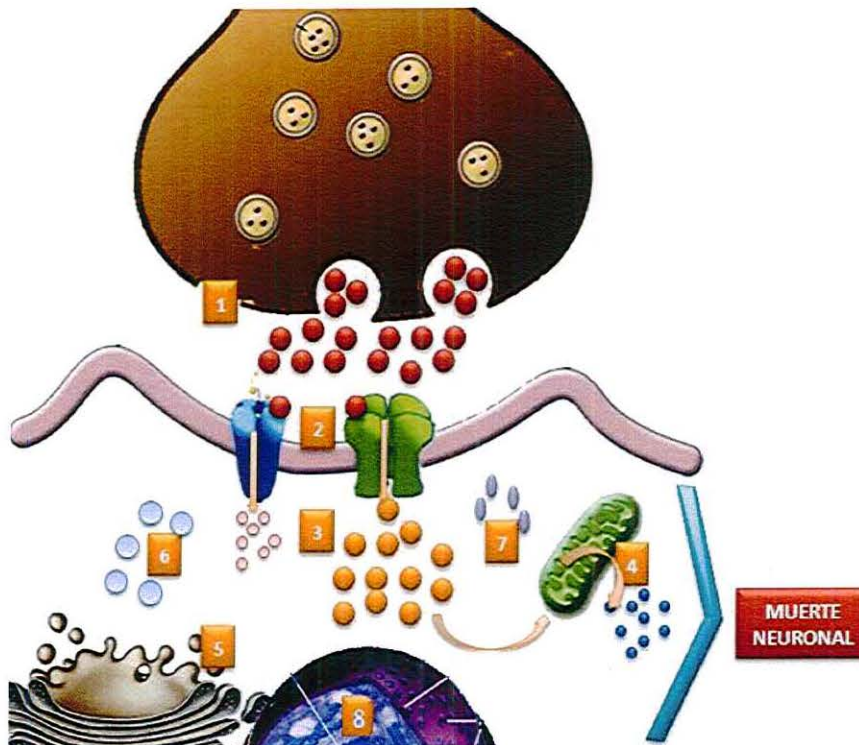
El aumento en la  $[\text{Ca}^{++}]_i$  desencadena otros mecanismos de señalización intracelular que eventualmente podrían favorecer la muerte celular por apoptosis, entre los que se encuentra la activación de diferentes enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{++}$  como proteasas, nucleasas y fosfolipasas (Arundine y Tymianski, 2003; Mattson et al., 2000; Chakranoti et al., 1999) (Figura 3).

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  $\text{Ca}^{++}$ .
- II) Un componente dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  (Rothman, 1985; Choi, 1987; Dessi et al., 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 et al., 1992; Monyer et al., 1994; Sheng et al., 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, 1988; Favaron et al., 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  $\text{Mg}^{++}$  durante 15 min, produce muerte neuronal la cual inicia 2-3 horas después del tratamiento, y 24 h después entre el 80 y el 85% de las células mueren (Manev et al., 1989).



**FIGURA 3.** Esquema simplificado de los mecanismos implicados en la muerte neuronal por Excitotoxicidad. 1) Aumento en la concentración extracelular de Glu; 2) Sobre activación de los receptores a Glu; 3) Movilización de iones y aumento en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{++}$ ; 4) Daño mitocondrial y liberación de radicales libres; 5) Lipoperoxidación de las membranas del retículo endoplásmico 6) Liberación de proteasas; 7) Activación de proteínas cinasas; 8) Activación de factores de transcripción. Elaborado con base en Mattson et al., 2000.

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 de NMDA o glutamato, reduce la expresión del RNA mensajero y la proteína de distintas subunidades del R-NMDA, como consecuencia de la excitotoxicidad (Cebers et al., 2001; Gascón et al., 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 500 nmol de Glu, durante 5 min, para inducir degeneración neuronal local retardada en el estriado (Olney y DeGubareff, 1978).

### **Administración Sistémica de Glutamato Monosódico**

La administración sistémica de glutamato monosódico (GMS) es uno de los modelos más utilizados para caracterizar los efectos neurotóxicos del Glu *in vivo*, la mayoría de las especies son susceptibles a la excitotoxicidad mediada por Glu y la severidad de la lesión depende de la especie, la edad y el sexo, así como la vía de administración (Garattini, 1979). En este sentido, se conoce que los animales recién nacidos son los más susceptibles a los efectos tóxicos del GMS (Olney et al, 1971), debido principalmente a que en la etapa neonatal, la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica para Glu (Mares et al., 2000) y las corrientes de  $Ca^{++}$  activadas por Glu son mayores, en comparación con etapas posteriores del desarrollo postnatal (Huntley et al., 1994).

En la etapa neonatal la neurotoxicidad inducida por la administración exógena del GMS y de otros agonistas como el ácido kainico, el ácido iboténico, el ácido quisquálico o el N-metil-D-aspartato (NMDA) se caracteriza por un prominente edema del soma neuronal y de las dendritas, dilatación del retículo endoplásmico, ruptura de la citoarquitectura acompañada con depleción de fosfatos de alta energía como el ATP y necrosis neuronal (Olney et al., 1974; Kizer et al, 1978; Schawarcz et al., 1978; Zaczek y Coyle, 1982; Novelli et al., 1988; Retz y Coyle, 1982; Coyle, 1983; Winn et al., 1991; Young et al., 1991; Hu y Goldsmith, 1998). La administración sistémica de GMS a animales recién



nacidos, es un modelo que permite estudiar no solo los mecanismos implicados en la inducción del proceso excitotóxico, si no también, las consecuencias de este proceso sobre la fisiología general del sistema nervioso a corto, mediano y largo plazo (Fernstrom y Goldsmith, 1998). En este sentido, se ha reportado que cuatro administraciones individuales y alternadas durante los primeros siete días de edad postnatal, de 4 mg/g de peso corporal de GMS, promueven la muerte en varias regiones cerebrales, como la corteza cerebral, el estriado, el hipocampo y la sustancia negra (Beas-Zárate et al., 2001; Ureña-Guerrero et al., 2009; López-Pérez et al., 2005). Dentro de los efectos a mediano y largo plazo que ejerce el tratamiento neonatal con GMS durante la primera semana de vida, podemos mencionar la pérdida de neuronas piramidales (Beas-Zárate et al., 2002), de células GABAérgicas (Ureña-Guerrero, 2009) y dopaminérgicas (López-Pérez et al., 2005) en diferentes regiones cerebrales. Así como, hiperplasia e hipertrofia de los astrocitos y las células microgliales (Martínez-Contreras et al., 2002), aumento en la densidad de receptores muscarínicos para acetilcolina; modificaciones en la actividad de la colina-acetil-transferasa (Ortuño-Sahagún et al., 1997) y en la descarboxilasa del ácido glutámico (Ureña-Guerrero et al., 2003), así como la disminución en la liberación de GABA exógeno (Beas-Zárate et al., 1998); en regiones cerebrales como la corteza cerebral y el hipocampo de ratas adultas.

Además, después del tratamiento neonatal con GMS se han observado cambios en la susceptibilidad convulsiva (Ureña-Guerrero, 2005), así como disminuciones en la capacidad de aprendizaje (González-Burgos et al., 2009; Olvera-Cortés et al., 2005) y aumentos en la susceptibilidad al estrés (Seo, 2010) procesos en los que la participación de la inhibición GABAérgica mediada por el R-GABA<sub>A</sub> son esenciales. Por lo que resulta importante dilucidar si dicho tratamiento modifica la densidad, composición estructural y funcionalidad del R-GABA<sub>A</sub>.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tratamiento neonatal con GMS induce daño neuronal en varias regiones y tipos neuronales, afectando particularmente la funcionalidad de la neurotransmisión GABAérgica, lo que se refleja en una mayor susceptibilidad a la generación de crisis convulsivas y al estrés, así como déficit de aprendizaje, entre otros. Dado que dicho tratamiento, disminuye significativamente la densidad de células GABA-positivas en la corteza cerebral e hipocampo de ratas adultas, es probable que la composición estructural del R-GABA<sub>A</sub> se encuentre modificada. Por lo que, en el presente trabajo se pretende evaluar los niveles de expresión del RNA mensajero de las subunidades más comunes del R-GABA<sub>A</sub> después del tratamiento neonatal con GMS en el hipocampo de ratas adulta. Los resultados permitirán conocer mejor la participación del R-GABA<sub>A</sub> en los trastornos neuronales inducidos por el tratamiento neonatal con GMS.

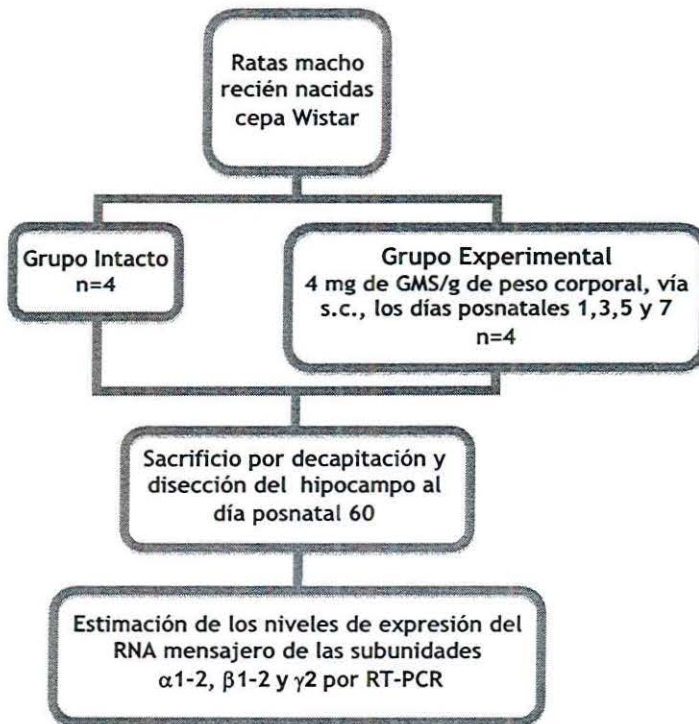
## **HIPÓTESIS**

El tratamiento neonatal con GMS modificará diferencialmente los niveles de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo del adulto.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto a largo plazo del tratamiento neonatal con GMS sobre los niveles de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 2$  del receptor  $GABA_A$  en el hipocampo de rata adulta.

## DIAGRAMA EXPERIMENTAL



## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho, recién nacidas de la cepa Wistar, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio (ciclos luz:oscuridad 12X12 h;  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; y 30% humedad relativa) con libre acceso al agua y alimento durante todo el proceso experimental.

Los animales de experimentación se dividieron en dos grupos de trabajo:

**Grupo I:** Animales intactos que no recibieron ningún tratamiento (Grupo Intacto), n=4.

**Grupo II:** Animales a los que se les administró glutamato monosódico (GMS) a la dosis de 4mg/g de peso corporal por vía subcutánea los días 1, 3, 5, y 7 de edad posnatal (Grupo GMS), n=4.

Después del tratamiento, a los 60 días de edad posnatal los animales se sacrificaron por decapitación, se extrajo el cerebro en condiciones asépticas y se disecó el hipocampo.

### Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó de acuerdo al método de isotiocianato ácido de guanidina-fenol-cloroformo, los tejidos (60-80 mg) se homogeneizaron por ultrasonido en 800  $\mu\text{l}$  de Trizol y se mantuvieron en baño de hielo por 8 min, después de los cuales se agregaron 160  $\mu\text{l}$  de cloroformo frío, que se mezclaron vigorosamente en vortex durante 1 min, enseguida se incuban nuevamente en baño de hielo durante 8 min. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 10,000 RPM X 19 min a  $4^\circ\text{C}$ , se extrajo cuidadosamente el sobrenadante (fase acuosa), se le agregó un volumen igual de isopropanol, se mezclaron por inversión y se mantuvieron a  $-20^\circ\text{C}$  por 24 horas.

Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 RPM X 19 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 75% preparado previamente en agua libre de endonucleasas (DEPC). El lavado con etanol al 75% consistió en tres ciclos de desprendimiento del precipitado y centrifugación a 9000 RPM X 7min a 4°C. Finalmente, el precipitado se disolvió en 50 µl de agua DEPC y se evaluó la pureza y concentración del extracto, a través de índice de absorbancia de la muestra a 260/280 nm (RNA) y la lectura a 260 nm, respectivamente. Las muestras se conservan a -80°C hasta su utilización para la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA).

### **Síntesis de cDNA**

La síntesis de cDNA o retrotranscripción (RT) se realizó por medio de la transcriptasa reversa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV-RT), de acuerdo al procedimiento sugerido por el proveedor y descrito a continuación. Se usaron 2 µg de RNA total para un volumen de reacción de 20 µl.

1. Se adicionaron los siguientes componentes a un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas:
  - 1 µl de oligo (dT) 500µg/ml
  - 2 µg de RNA total
  - 1 µl de dNTP Mix (10mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP a pH neutro)
  - Agua destilada estéril a 12 µl
2. La mezcla de reactivos se incubó a 65°C por 5 min, e inmediatamente después, se incubó en agua de hielo por al menos 2 min.
3. El contenido se depositó en el fondo del tubo por centrifugación y se adicionaron:
  - 4 µl de Buffer First-Strand 5x
  - 2 µl de DTT (ditiotreitól) 0.1 M
  - 1 µl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 unidades/µl).
4. La mezcla se incubó a 37°C por 2 min.

5. Se adicionó 1µl de M-MLV-RT con 200 unidades y se mezclaron gentilmente por micropipeteo.
6. Se incubó a 37°C por 5 min.
7. Finalmente, la reacción se inactivó por calentamiento a 70°C por 15 min.

Las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización para la reacción de PCR.

### **Análisis de las muestras por PCR**

Las muestras se normalizaron a través de la expresión del RNA mensajero para el gen constitutivo β-actina y los volúmenes para la reacción de PCR se ajustaron para que las muestras tuvieran el mismo nivel de expresión. Una vez establecido el volumen a usar, se realizaron las reacciones de los genes problema con esos volúmenes.

Para los ensayo de la PCR se empleó la DNA-polimerasa de *Thermus aquaticus* y de acuerdo con las indicaciones del proveedor se preparó la siguiente mezcla de reacción por cada muestra.

- 27 µl de agua bidestilada estéril
- 5 µl de oligonucleótido iniciador sentido 3 µM
- 5 µl de oligonucleótido iniciador antisentido 3 µM
- 5 µl de Amortiguador 10x para PCR
- 1 µl de desoxinucleótidos trifosfatados 10 M
- 1 µl de Taq-DNA polimerasa (1U/ml)
- 0.5-2 µl de cDNA

Los oligonucleótidos iniciadores que se utilizaron variaron dependiendo del segmento de interés a amplificar (Tabla 3).

Todos los componentes se mezclaron cuidadosamente y se depositaron en el fondo de un tubo de microcentrifuga para PCR, enseguida, se agregó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación durante los ciclos de amplificación y



se colocaron dentro del termociclador, donde se programaron las siguientes condiciones de amplificación:

- Desnaturalización inicial del cDNA: 94°C por 5 min,
- Ciclos de amplificación: 94°C por 1min, 60°C por 1min y 72°C por 1.5 min, secuencia que se repitió 20 veces para el gen constitutivo,  $\beta$ -Actina (Nudel et al., 1983).
- Extensión final de 72°C por 7 min.

Para las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, se programaron las siguientes condiciones de amplificación:

- Desnaturalización del cDNA: 94°C por 2 min.
- Ciclos de amplificación: 94°C por 30 seg, 53°C por 30 seg y 72°C por 1 min, secuencia que se repitió 36 veces (Zemkova et al., 2008).
- Con una extensión de 72°C por 7 min.

**TABLA 3.** Secuencia de los iniciadores de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> y de  $\beta$ -actina que se utilizaron para la normalización de las muestras en el análisis de la RT-PCR.

Subunidad	Iniciadores	Peso (pb)
$\beta$ -actina	5'CACCACAGCTGAGAGGGAAATCGTGCGTGA3' 3'TCAGGCCGGGGAGGTAGCACGTGGCGTTA5'	512
$\alpha$ 1	5'ACCGACTGTCAAGAATAGCC3' 3'GCAGTCTTCCTCTGTCTGTT5'	360
$\alpha$ 2	5'CAATGCTTCTGACTCCGTT3' 3'CGCAAACACAAGAGACGGG5'	382
$\beta$ 1	5'TGACCCTTGACAACAGGTA3' 3'CCGTATAGGTGCTGATAGT5'	386
$\beta$ 2	5'TGGAGATCGAAAGCTATGGC3' 3'CGACGATTACGGTTGTTGCT5'	525
$\gamma$ 2	5'CCAATGGATGAACACTCCTG3' 3'GTCGTTACCTAGAGAAGCAG5'	425

Los productos de amplificación de cada PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, preteñidos con bromuro de etidio (0.6 mg/ml de gel), a 60 V en amortiguador TBE (Tris-Ácido Bórico 90mM y EDTA 2.5 Mm, pH8.4). Las bandas de los productos de amplificación se evidenciaron por medio de luz

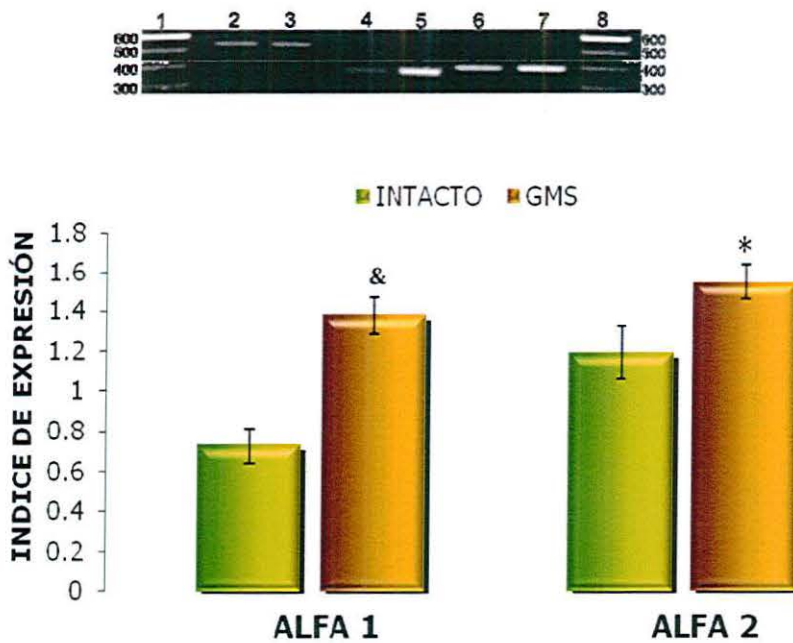
UV y las imágenes se capturaron y digitalizaron a través del Sistema de Análisis y Fotodocumentación de Electroforesis EDAS 120 (Kodak Digital Science, Eastman Kodak Company). El análisis de las bandas se realizó mediante el programa de computo Kodak Digital Science 1D, considerando la intensidad neta por área mínima ocupada por el pico en la zona de mayor intensidad en pixeles.

Los resultados se expresan como índice de expresión, el cual se obtuvo al dividir el nivel de expresión de cada RNA mensajero de interés entre el nivel de expresión del gen constitutivo  $\beta$ -actina. Los valores representan la media  $\pm$  el error experimental de la media de 4 muestras por grupo con ensayos de la PCR por triplicado y geles por duplicado. Además la RT por duplicado.

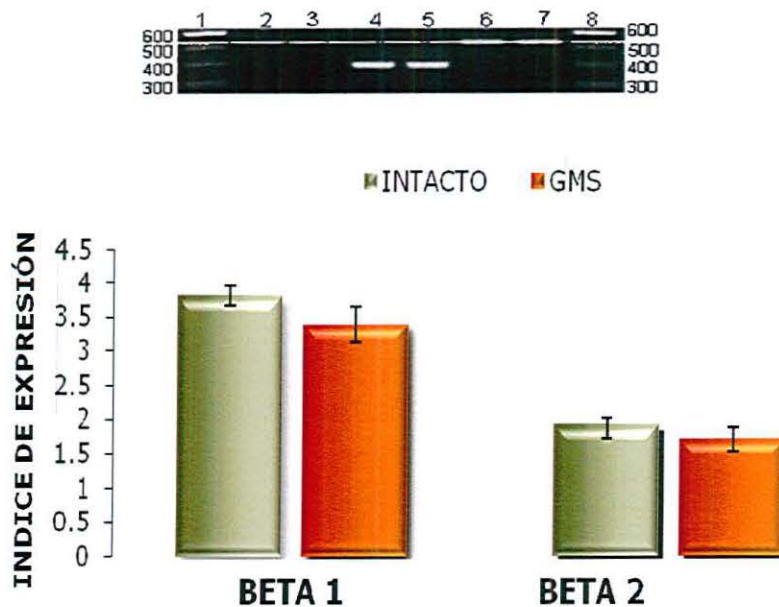
Las medias se compararon mediante la prueba ANOVA de una vía y se consideraron estadísticamente significativas aquellas comparaciones con una  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

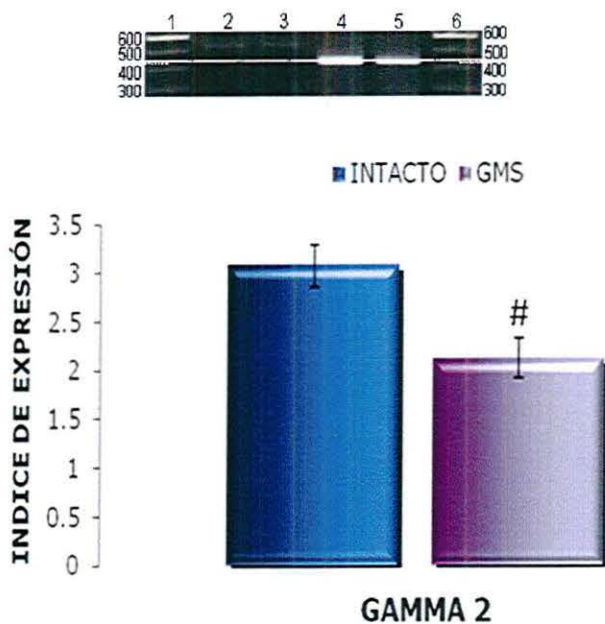
El tratamiento neonatal con GMS aumentó significativamente el nivel de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en el hipocampo de ratas adultas; en aproximadamente 70 y 30%, respectivamente (Figura 4). Sin embargo, dicho tratamiento no tuvo efectos significativos sobre el nivel de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , aunque sí se observó una ligera disminución, en ambos casos menor al 10% (Figura 5). Finalmente, en relación al nivel de expresión del RNA mensajero de la subunidad  $\gamma 2$  se observó que el tratamiento neonatal con GMS disminuyó significativamente su nivel de expresión, en aproximadamente un 45% en el hipocampo de ratas adultas (Figura 6).



**Figura 4.** Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre el nivel de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del R-GABA<sub>A</sub> en el hipocampo de rata a los 60 días de edad postnatal. El índice de expresión se obtuvo al dividir el nivel de expresión del RNA mensajero del gen problema entre el del gen constitutivo  $\beta$ -actina. Los valores representan la media  $\pm$  el error experimental de 4 muestras con RT por duplicado, PCR por triplicado y geles por duplicado. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.05$  y &  $p < 0.005$  GMS vs. Intacto por ANOVA de una vía. En la parte superior se muestra un gel representativo, donde: carril 1 y 8: marcador de tamaño (pb), carriles 2 y 3:  $\beta$ -actina, carriles 4 y 5: alfa 1, carriles 6 y 7: alfa 2 intacto y experimental, respectivamente en cada caso.



**Figura 5.** Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre el nivel de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  del R-GABA<sub>A</sub> en el hipocampo de rata a los 60 días de edad postnatal. El índice de expresión se obtuvo al dividir el nivel de expresión del RNA mensajero del gen problema entre el del gen constitutivo  $\beta$ -actina. Los valores representan la media  $\pm$  el error experimental de 4 muestras con RT por duplicado, PCR por triplicado y geles por duplicado. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.01$  y &  $p < 0.005$  GMS vs. Intacto por ANOVA de una vía. En la parte superior se muestra un gel representativo, donde: carril 1 y 8: marcador de tamaño (pb), carriles 2 y 3:  $\beta$ -actina, carriles 4 y 5: beta 1, carriles 6 y 7: beta 2, intacto y experimental, respectivamente en cada caso.



**Figura 6.** Efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre el nivel de expresión del RNA mensajero de la subunidad  $\gamma 2$  del R-GABA<sub>A</sub> en el hipocampo de rata a los 60 días de edad postnatal. El índice de expresión se obtuvo al dividir el nivel de expresión del RNA mensajero del gen problema entre el del gen constitutivo  $\beta$ -actina. Los valores representan la media  $\pm$  el error experimental de 4 muestras con RT por duplicado, PCR por triplicado y gels por duplicado. ( $p < 0.05$ , # $p < 0.01$  y &  $p < 0.005$  GMS vs. Intacto por ANOVA de una vía. En la parte superior se muestra un gel representativo, donde: carril 1 y 6: marcador de tamaño (pb), carriles 2 y 3:  $\beta$ -actina, carriles 4 y 5: gamma 2, intacto y experimental, respectivamente en cada caso.

## DISCUSIÓN

Diferentes evidencias experimentales han demostrado que la administración sistémica de GMS a animales recién nacidos produce muerte neuronal por excitotoxicidad en el hipocampo de ratas durante diferentes etapas del desarrollo posnatal (Ishikawa et al., 1997; Beas-Zárate et al., 2001; Beas-Zárate et al., 2002). En este sentido, recientemente se demostró que dicho tratamiento eleva significativamente la concentración intracerebral de Glu, así como la de GABA y otros aminoácidos (López-Pérez et al., 2010), lo cual sugiere que en este proceso no sólo participa la neurotransmisión glutamatérgica, sino también la GABAérgica. En este sentido, aunque diversos tipos neuronales son susceptibles a la excitotoxicidad que dispara el tratamiento neonatal con GMS, recientemente se han observado disminuciones significativas en la densidad de células GABA-positivas y en diferentes marcadores de la neurotransmisión GABAérgica en el hipocampo de ratas adultas (Ureña-Guerrero et al., 2009). Por lo que, en este trabajo se caracterizaron los efectos del tratamiento neonatal con GMS sobre el nivel de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha$ 1-2,  $\beta$ 1-2 y  $\gamma$ 2 del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo de la rata adulta.

Los resultados del presente trabajo demuestran que el tratamiento neonatal con GMS eleva significativamente el nivel de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 (Figura 4), en tanto que disminuye significativamente el de la subunidad  $\gamma$ 2 (Figura 6), sin afectar el nivel de expresión de las subunidades  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 (Figura 5). Las subunidades estudiadas en este trabajo corresponden a las más abundantes en el sistema nervioso central y son típicas de los receptores GABA<sub>A</sub> post-sinápticos que participan en la inhibición fásica mediada por GABA (Olsen y Sieghart, 2008).

Las modificaciones que el tratamiento neonatal con GMS induce en el nivel de expresión del RNA mensajero de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> que se

describen aquí, se relacionan con disminuciones en la densidad de células GABA-positivas (Ureña-Guerrero et al., 2005), en la liberación estimulada de GABA exógeno (Beas-Zárate et al., 1998) y endógeno (Ureña-Guerrero, 2005) en el hipocampo adulto, demostradas previamente. Además, también se han observado cambios compensatorios que consisten en el aumento de expresión de las proteínas GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub> (Ureña-Guerrero et al., 2009) así como de su actividad enzimática (Ureña-Guerrero et al., 2003). Por lo que, se puede proponer que las células que sobreviven al daño producido por el tratamiento con GMS, al estar expuestas a concentraciones extracelulares de GABA menores, sobre expresan R-GABA<sub>A</sub>, condición que parece evidenciarse por el aumento en el nivel de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha$  estudiadas aquí. Sin embargo, estos receptores pudieran ser menos sensibles a la potenciación de la inhibición que ejercen las BZ's a través de la subunidad  $\gamma$ 2, ya que el nivel de expresión de su RNA mensajero se observó disminuido después del tratamiento. La pérdida de neuronas GABAérgicas con la subsecuente modificación de sus receptores se ha relacionado con diferentes condiciones neuropatológicas, particularmente con la generación de crisis epileptiformes (Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001; Brooks-Kayal et al., 1998; Pirker et al., 2003). En este sentido, estudios previos demostraron que el tratamiento neonatal con GMS aumenta la susceptibilidad del adulto a las crisis inducidas por 4-aminopiridina y por iodo-metil-bicuculina (Ureña-Guerrero, 2005). Por otro lado, en un modelo de epilepsia de lóbulo temporal (ELT) en roedores, también se observó una disminución de la expresión del RNA mensajero de la subunidad  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 4 en el hipocampo con la técnica de hibridación *in situ*, y al evaluar la expresión de las subunidades  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 3,  $\beta$ 3 y  $\gamma$ 2 por inmunohistoquímica, se observó una disminución en la inmureactividad para cada una de estas proteínas en el área CA1 del hipocampo (Brooks-Kayal et al., 1998; Pirker et al., 2003). Además, después de un daño excitotóxico inducido por isquemia, también se han observado disminuciones en el nivel de expresión de la subunidad  $\beta$ 3 (Li et al 1993). Por lo que, en estudios futuros se propondría no solo determinar si los cambios observados en el presente, a nivel



## CONCLUSIÓN

del RNA mensajero se expresan también a nivel de sus proteínas respectivas, sino además evaluar otras subunidades como  $\alpha 4$  o  $\beta 3$ .

En relación con la subunidad  $\gamma 2$ , se conoce que aun cuando no es indispensable en la formación del receptor funcional, si le confiere propiedades farmacológicas y funcionales específicas (Kanaumi et al., 2006; Gutiérrez et al., 1996). Así, se han descrito diversas mutaciones en la secuencia que codifica a esta subunidad, que tienen implicaciones en la función GABAérgica alterada en diferentes estados patológicos, como la propensión a crisis febriles, y a síndromes de epilepsia generalizada (Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001; Kang et al., 2006; Hales et al., 2005). Además, la expresión de  $\gamma 2$  disminuye significativamente en la corteza prefrontal de pacientes con esquizofrenia (Huntsman et al., 1998). En este sentido, la subunidad  $\gamma 2$  se ha relacionado tanto con la inhibición tónica como fásica en el hipocampo; y se considera una subunidad crítica para el mantenimiento sináptico del receptor (Eugéne et al., 2007), y además existen evidencias de que esta subunidad potencia la afinidad hacia las benzodiazepinas, por lo que tanto las modificaciones en su secuencia (Campos-Caro et al., 1996), como disminuciones en su expresión podrían relacionarse con alteraciones en la regulación de la excitabilidad neuronal, producidas por un daño en la neurotransmisión GABAérgica, como el que parece inducir el tratamiento neonatal con GMS.

De acuerdo con todo lo anterior, es necesario determinar si los cambios observados a nivel del RNA mensajero de las subunidades del R-GABA<sub>A</sub> estudiadas aquí, en el hipocampo de la rata adulta, después del tratamiento neonatal con GMS se expresan también a nivel de proteína y de los receptores ensamblados en las neuronas. Así, como las características farmacológicas y funcionales de dichos receptores, y su distribución a lo largo de las diferentes áreas del hipocampo. Lo que nos permitiría conocer mejor, las consecuencias del daño neuronal excitotóxico inducido por el tratamiento neonatal con GMS y sus posibles implicaciones en el desarrollo de diversas condiciones neuropatológicas del adulto.

## CONCLUSIÓN

El tratamiento neonatal con GMS aumenta los niveles de expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del R-GABA<sub>A</sub> en el hipocampo de ratas de 60 días de edad. Además, dicho tratamiento, también disminuye el nivel de expresión del RNA mensajero de la subunidad  $\gamma 2$  en el hipocampo de ratas de 60 días de edad. Si estas modificaciones, se expresan también a nivel de la proteína respectiva y de la estructuración del R-GABA, entonces probablemente exista un aumento en la densidad de R-GABA<sub>A</sub> post-sinápticos con mayor afinidad por el GABA, que se inactiven más rápidamente y menos sensibles a las benzodiazepinas, condiciones que se relacionarían con el aumento en la susceptibilidad convulsiva observado después del tratamiento neonatal con GMS.

## REFERENCIAS

1. Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Cal* 34:325-337.
2. Alexander SP, Mathie A y Peters JA (2001) Nomenclature supplement. *Trends Pharmacol Sci*, 12a. ed. 1-146.
3. Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, Baulac M, Brince A, Bruzzone R, LeGuern E (2001) First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 28:46-48.
4. Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.
5. Barnard EA, Darlison MG, Fujita N, Glencorse TA, Levitan ES, Reale V, Schofield PR, Seeburg PH, Squire MD, Stephenson FA (1988) Molecular biology of the GABA(A) receptor. *Adv Exp Med Biol* 236:31-45.
6. Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87(4):1215-1284.
7. Beas-Zárate C, Rivera-Huizar SV, Martínez-Contreras A, Feria-Velasco A, Armendariz-Borunda J (2001) Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. *Neurochem Int* 39(1): 1-10.
8. Beas-Zárate C, Sánchez-Ruiz MY, Ureña-Guerrero ME, Feria Velasco A (1998) Effect perinatal administration of monosodium L-glutamate to young rats on GABA release from various cerebral regions during postnatal development. *Neurochem Int* 33:217-232.
9. Beas-Zárate C, Pérez-Vega M, González-Burgos I (2002) Neonatal exposure to monosodium L-glutamate induces loss of neurons and cytoarchitectural alterations in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats. *Brain Res* 952:275-81.
10. Bormann J (1988) Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci* 11:112-116.
11. Bormann J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 21:16-19.

12. Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002) International Union Pharmacology. XXXIII. Mammalian  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>B</sub> receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 54:247-264.
13. Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikner TY, Coulter DA (1998) Selective changes in single cell GABAA receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 4:1166-1172.
14. Burt DR, Kamatchi GL (1991) GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J* 5:2916-2923
15. Brumback AC, Staley KJ (2008) Thermodynamic regulation of NKCC1-mediated Cl<sup>-</sup> cotransport underlies plasticity of GABA(A) signaling in neonatal neurons. *J Neurosci* 28(6):1301-12.
16. Campos-Caro A, Sala S, Ballesta JJ, Vicente-Agulló F, Criado M, Sala F (1996) A single residue in the M2-M3 loop is a major determinant of coupling between binding and gating in neuronal nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*.93(12):6118-23.
17. Cebers G, Cebere A, Kovács AD, Högberg H, Moreira T, Liljequist S (2001) Increased ambient concentration alters the expression of NMDA receptor subunits in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 39(2):151-60.
18. Coyle JT (1983) Neurotoxic action of kainic acid. *J Neurochem* 41:1-11.
19. Corringer PJ, Le Novère N, y Changeux JP (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:431-458.
20. Chiu C, Reid CA, Tan HO, Davies PJ, Single FN, Koukoulas I, Berkovic SF, Tan SS, Sprengel R, Jones MV, Petrou S (2008). Developmental impact of a familial GABAA receptor epilepsy mutation. *Ann Neurol* 64(3):284-93.
21. Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379.
22. Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
23. Choi DW (1990) Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J Neurosci* 10:2493.2501.
24. Choi DW (1995) Calcium: still center stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18:58-60.
25. Collingridge GL y Singer W (1990) Excitatory amino acids receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 11:290-296.
26. Danysz W, Parsons CG, Bresinki I y Quack G (1995) Glutamate in disorders. *Drug News Perspect* 8:261-277.

27. Doble A (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81:163-221. 51(1):7-61.
28. Dessi F, Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y (1994) Glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture is mediated by two distinct components: a sodium-chloride component and a calcium component. *Brain Res* 650:49-55.
29. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*. 51(1):7-61.
30. Enna SJ y Möhler H (2007) *The GABA Receptors*. 3a ed. Humana press, Totowa, New Jersey. pp 325.
31. Erlander MG y Tobin AJ (1991) The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res* 16(3):215-226.
32. Erecinska M y Silver IA. (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 35:245-296.
33. Eugène E, Depienne C, Baulac S, Baulac M, Fritschy JM, Le Guern E, Miles R, Poncer JC (2007). GABA(A) receptor gamma 2 subunit mutations linked to human epileptic syndromes differentially affect phasic and tonic inhibition. *J Neurosci* 27(51):14108-16.
34. Fagg GE y Foster AC (1983) Amino acid neurotransmitters and their pathways in mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9(4):701-719.
35. Farrant M y Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6(3):215-229.
36. Favaron M, Manev H, Alho H, Bertolino M, Ferret B, Guidotti A, Costa E (1988) Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 85:7351-7355
37. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R (1989) The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244:798-800.
38. Fernstrom JD y Goldsmith PC (1998) Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. *Neuroendocrinology* 68(2):77-78.
39. Feldum S, Erlander MG, Tobin AJ (1993) Different distributions of GAD<sub>65</sub> and GAD<sub>67</sub> mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J Neurosci Res* 34:689-706.
40. Frandsen A, Schousboe A (1990) Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int J Develop Neurosci* 8:209-216.
41. Garattini S (1979) Evaluation of the neurotoxic effects of glutamic acid. En: *Nutrition and the Brain*. Vol. 4 (Wurtman RJ, Wurtman JJ, eds.) Raven Press, New York, 79-116.

42. Gascón S, Deogracias R, Sobrado M, Roda JM, Renart J, Rodríguez-Peña A, Díaz-Guerra M(2005) Transcription of the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *J Bio Chemistry* 280(41):28-27.
43. Gereau RW y Swanson GT (2008) *The Glutamate Receptors*, Humana Press, Portland, Oregon. pp 576.
44. González-Burgos I, Velázquez-Zamora DA, Beas-Zárate C (2009) Damage and plasticity in adult rat hippocampal trisynaptic circuit neurons after neonatal exposure to glutamate excitotoxicity. *Int J Dev Neurosci* 27(8): 741-5.
45. Greenamyre JT, Penney JB, Young AB, D'Amato CJ, Hicks SP, Shoulson I(1985) Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Science* 227:1496-1499
46. Greenamyre JT (1986) The role of glutamate in neurotransmission and neurologic disease. *Arch Neurol* 43:1058-1063.
47. Gutiérrez A, Khan ZU, Miralles CP, De Blas AL (1996) Altered expression of gamma 2L and gamma 2S GABAA receptor subunits in the aging rat brain. *Brain Res Mol* 35:91-102.
48. Hu L, Fernstrom JD y Goldsmith PC (1998) Exogenous Glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury en the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. *Neuroendocrinology* 68(2):77-88.
49. Hahner L, McQuilkin S, Harris RA (1991) Cerebelar GABAB receptors modulate funtion of GABAA receptors. *FASEB J* 5:2466-2472.
50. Hales TG, Tang H, Bollan KA, Johnson SJ, King DP, McDonald NA, Cheng A, Connolly CN(2005) The epilepsy mutation, gamma2(R43Q) disrupts a highly conserved inter-subunit contact site, perturbing the biogenesis of GABAA receptors. *Mol Cell Neurosci* 29(1):120-7.
51. Huntley GW, Vickers JC, Morrison JH (1994) Cellular and synaptic localization of NMDA and non-NMDA receptor subunits in the neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease. *Trends Neurosci* 17(12):536-543.
52. Huntsman MM, Tran BV, Potkin SG, Bunney WE Jr, Jones EG (1998) Altered ratios of alternatively spliced long and short gamma2 subunit mRNAs of the gamma-amino butyrate type A receptor in prefrontal cortex of schizophrenics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(25):15066-71.
53. Hayashi T (1954) Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Br J Med.* 3:183-192.
54. Hof P, Trapp B, De Vellis J, Claudio L, Colman D (1999) *The cellular components of nervous tissue. Fundamental Neuroscience.* Editors: Zigmond M, Blomm F, Roberts J, Landis S, Squiere L, Academic Press. London. pp 41-70.

55. Ishikawa K, Kubo T, Shibasaki S, Matsumoto A, Hata H, Asai S (1997) Hippocampal degeneration inducing impairment of learning in rats: model of dementia? *Behav Brain Res* 83:39-44.
56. Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 9(5):331-43.
57. Johnston GA (2002) Medical chemistry and molecular pharmacology of GABA<sub>A</sub> receptors. *Curr Top Med Chem* 2:903-913.
58. Kardos J (1999) Recent advances in GABA research. *Neurochem Int* 34:353-358.
59. Kanaumi T, Takashima S, Iwasaki H, Mitsudome A, Hirose S (2006) Development changes in the expression of GABA<sub>A</sub> receptor alpha 1 and gamma 2 subunits in human temporal lobe, hippocampus and basal ganglia: an implication for consideration on age-related epilepsy. *Epilepsy Res* 71(1):47-53.
60. Kang JQ, Shen W, Macdonald RL (2006) Why does fever trigger febrile seizures? GABA<sub>A</sub> receptor gamma2 subunit mutations associated with idiopathic generalized epilepsies have temperature-dependent trafficking deficiencies. *J Neurosci* 26(9):2590-7.
61. Kohr G, Heinemann U (1989) Effects of NMDA antagonists by NMDA antagonists on picrotoxin, low Mg<sup>2+</sup> and low Ca<sup>2+</sup> induced epileptogenesis and on evoked changes in extracellular Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations in rat hippocampal slices. *Epilepsy Res* 4,187-200.
62. Kizer JS, Nemeroff CHB, Youngblood WW (1978) Neurotoxic amino acid and structurally related analogs. *Pharmacol Rev* 29:301-318.
63. Koroshetz W y Moskowitz MM (1996) Emerging treatment for stroke in humans. *Trends Pharmacol Sci* 17:227-233.
64. Kandel E, Schwartz J, Jessell T (2000) The brain and Behavior. Principles of Neural Science. USA McGraw-Hill. pp 175-228.
65. Li H, Siegel RE, Schwartz RD (1993) Rapid decline of GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNA expression in hippocampus following transient cerebral ischemia in the gerbil. *Hippocampus* 3:527-537.
66. Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58(2):193-201.
67. Lopez-Antunez L (1983) Anatomía Funcional del Sistema nervioso, 2a. ed., Editorial Limusa, México. pp 784.
68. López-Pérez SJ, Ureña-Guerrero ME, Morales-Villagrán A (2010) Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model. *Brain Res* 1317:246-256.
69. López-Pérez SJ, Vergara P, Ventura-Valenzuela JP, Ureña-Guerrero ME, Segovia J, Beas-Zárate C (2005) Modification of dopaminergic markers

expression in the striatum by neuronal exposure to glutamate during development. *Int Dev Neurosci* 23:335-342.

70. Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G (2005) Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*. 130(3):567-580.
71. Macdonald RL y Olsen RW (1994) GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annu Neurosci* 17:569-602.
72. Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E (1989) Delayed increase of Ca<sup>++</sup> influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol* 36:106-112.
73. Mattson MP, LaFerla FM, Chan SL, Leissring MA, Shepel PN, Geiger JD (2000) Calcium signaling in the ER: its role neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 23(5):222-229.
74. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contribution of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 4:281-309.
75. Mares P, Chino H, Kubová H, Mathem P, Veliky M (2000) Convulsant action of systemically administered glutamate and bicuculline methiodide in immature rats. *Epilepsy Res* 42(2-3):183-189.
76. Martínez-Contreras A, Huerta M, López-Pérez SJ, García-Estrada J, Luquín S, Beas Zárata C (2005) Astrocytic and microglia cells reactivity induced by neonatal administration of glutamate in cerebral cortex of adult rats. *J Neurosci Res* 67:200-210.
77. Mody I y McDonald JF (1995) NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca<sup>++</sup> release. *Trends Pharmacol Sci* 16:356-359.
78. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sackman B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
79. Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 451:205-212.
80. Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D (1983) The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic  $\beta$ -actin gene. *Nucleic Acids Res* 11:1759-1771.
81. Obrenovitch TP, Urenjack J, Zilka E y Jay TM (2000) Excitotoxicity in neurological disorders-the glutamate paradox. *Int J Dev Neurosci* 18,281-287.
82. Olvera-Cortés E, López-Vázquez MA, Beas-Zárata C, González-Burgos I (2005) Neonatal exposure to monosodium glutamate disrupts place learning ability in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 82(2):247-51.



83. Olney JW, (1971) Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neurophathol Exp Neurol* 30(1):75-90.
84. Olney JW, Rhee V, Ho LO (1974) Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res* 77:507-512.
85. Olney JW, Ho OL, Rhee V (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* 14: 61-76.
86. Olney JW, DeGubareff T (1978) Glutamate neurotoxicity and Huntington's Chorea. *Nature* 271:557-559.
87. Olsen RW y Sieghart W (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function Update. *Pharmacol Rev* 60:243-260.
88. Ortuño-Sahagún D, Beas-Zárate C, Adame-Gonzalez G, Feria-Velazco A (1997) Effect of L-glutamate on cholinergic neurotransmission in various brain regions and during the development of rats, when administered perinatally. *Neurochem Int* 31:683-92.
89. Piker S, Schwarzer C, Czech T, Baumgartner C, Pockberger H, Maier H, Hauer B, Sieghart W, Furtinger S, Sperk G (2003) Increased expression of GABA(A) receptor beta-subunits in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(8):820-34.
90. Romano C, Prince MT, Olney JW (1995) Delayed excitotoxic neurodegeneration induced by excitatory amino acid agonists in isolated retina. *J Neurochem* 65:59-67.
91. Retz Kc y Coyle JT (1982) Effects of Kainic acid on high-energy metabolites in the mouse striatum. *J Neurochem* 38:196-203.
92. Rothman SM y Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105-111.
93. Rothman SM (1985) The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* 5:1483-1489.
94. Ribak CE, Roberts RC (1990) GABAergic synapses in the brain identified with antisera to GABA and its synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase. *J Elec Microsc Tech* 15:34-48.
95. Retaux S, Julien JF, Besson MJ, Penit-Soria J (1992) Expression of GAD mRNA in GABA interneurons of the rat medial frontal cortex. *Neurosci Lett* 136:67-71.
96. Schoepp DD y Conn PJ (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trend Pharmacol Sci* 14:13-20.

97. Stone TW (1995) CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Glutamate. CRC Press. USA. pp 95-114.
98. Schawarcz R, Scholz D y Coyle JT (1978) Structure activity relation for the neurotoxicity of kainic acid derivates and glutamate analogues. *Neuropharmacology* 17:145-151.
99. Siesjo BK y Bengtsson F (1989) 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.
100. Sieghart W, Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptors subtypes. *Curr Top Med Chem* 2(8): 795-816.
101. Sine SM y Engel AG (2006) Recent advances in Cys-loop receptor structure and fuction. *Nature* 440(7083):448-455.
102. Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changin subunit composition of heteromeric NMDA receptors Turing development of rat cortex. *Nature* 368:144-147.
103. Seo HJ, Ham HD, Jin HY, Lee WH, Hwang HS, Park SA, Kim YS, Choi SC, Lee S, Oh KJ, Kim BS, Park BR, Lee MY (2010) Chronic Administration of Monosodium Glutamate under Chronic Variable Stress Impaired Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 14(4):213-21.
104. Tapia R (1983) El ácido  $\gamma$ -aminobutírico. En: *Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas* (Pasantes-Morales H, Aréchiga H, et al.) UNAM, México. pp 57-70.
105. Turski L, Bressler K, Retting KJ, Loschmann PA, Wachtel H (1991) Protection of subtantia nigra from MPP<sup>+</sup> neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 249:414-418.
106. Ureña-Guerrero ME, López-Pérez SJ, and Beas-Zárate C (2003) Neonatal monosodium glutamate treatment modifies glutamic acid decarboxylase activity during rat brain postnatal development. *Neurochem Int* 42(4):269-276.
107. Ureña-Guerrero ME, Orozco-Suárez S, López-Pérez SJ, Flores-Soto ME, Beas-Zárate C (2009) Excitotoxic neonatal damage induced by monosodium glutamate reduces several GABAergic markers in the cerebral cortex and hippocampus in adulthood. *J Dev Neurosci* 27(8):845-855.
108. Ureña-Guerrero ME (1999) Densidad de células GABAérgicas, actividad y propiedades cinéticas de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD,EC 4.1.1.15) en diferentes regiones del cerebro de la rata después del tratamiento neonatal con Glutamato Monosódico (GMS). Tesis Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas (Neurobiología), Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

109. Ureña-Guerrero ME (2005) Participación de la neurotransmisión GABAérgica en la susceptibilidad convulsiva de ratas adultas después del tratamiento neonatal con glutamato monosódico (GMS). Tesis Doctorado, Posgrado en Ciencias Biomédicas (Neurociencias), Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
110. Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.
111. Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG, Williams DA, Sutherland GR, Mulley JC, Sheffer IE, Berkovic SF (2001) Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet* 28 :48-52.
112. Winn P, Stone TW, Latinier M, Hastings MH, Clark AJ (1991) A comparison of excitotoxic lesions of the basal forebrain by kainate, ibotenate, quinolinate, N-methyl-D-aspartate or quisqualate, and the effects on toxicity of 2-amino-5-phosphovaleric acid and kynurenic acid in the rat. *Br J Pharmacol* 102 :904-908.
113. Wisden W y Seeburg PH (1993) Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 3 :291-298.
114. Wu JY (1983) Immunocytochemical identification of GABAergic neurons and pathways. En : *Glutamine, glutamate and GABA in the Central Nervous System* (Hertz L, Kvamme E, McGeer EG, Schousboe A, eds.). Liss. New York. pp 161-176.
115. Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB (1988) NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 241 :981-983.
116. Young RSK, Petroff OAC, Aquila WJ y Yates J (1991) Effects of glutamate, quisqualate, and N-methyl-D-aspartate in neonatal brain. *Exp Neurol* 111 :362-368.
117. Zaczek R y Coyle JT (1982) Excitatory amino acid analogues: neurotoxicity and seizures. *Neuropharmacology* 21:15-26.
118. Zemkova HW, Bjelobaba I, Tomic M, Zemkova H, Stojilkovic SS (2008) Molecular, pharmacology and functional properties of GABA<sub>A</sub> receptors in anterior pituitary cells. *J Physiol* 586(13):3097-3111.

BIBLIOTECA CUCBA