

393
Royal
Cris
2011 Ngo

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS



TESIS DE DOCTORADO

**EFFECTO DE UN INHIBIDOR DE LA VIA P38, SOBRE LA
REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS RECEPTORES A
GLUTAMATO Y LA MUERTE NEURONAL BAJO LA
ADMINISTRACION NEONATAL DE GLUTAMATO
MONOSODICO.**

M. en C. MARTHA CATALINA RIVERA CERVANTES

JURIQUILLA, QRO. SEPTIEMBRE 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroquímica de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, CIBO-IMSS, bajo la dirección del Dr. en Cs. Carlos Beas Zárate. Los integrantes del comité tutorial fueron: el Dr. en Cs. Rogelio Arellano Ostoia (Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, Qro. UNAM) y el Dr. en Cs. Alfredo Feria Velasco (Departamento de Biología Celular y Molecular, Guadalajara Jal., U de G).

El presente trabajo lo dedico muy especialmente

A mis Padres, porque los amo.

*A mis Hijas, Andrea y Julieta por su paciencia y amor;
y por llenar de alegría mi vida con sus risas.*

*Al compañero de mi vida, con quien reafirmo cada día el
amor que le tengo.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Beas Zárate por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, brindándome su apoyo incondicional.

Al Dr. Alfredo Feria Velasco por dedicar una parte de su tiempo a la revisión de este trabajo.

A mi comité evaluador, por sus valiosos comentarios durante el desarrollo del trabajo, ayudándome a mejorar su calidad.

Agradezco muy especialmente al Dr. Rogelio Arellano Ostoa, por brindarme su amistad y por trasmitirme su entusiasmo, lo que me permitió cumplir mis metas.

A Leonor Casanova y Carmen Vázquez por su amistad y apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Vero, Mario, Raúl y José, por el apoyo académico que me brindaron para la realización de este proyecto.

Al M. C. Mario Eduardo Flores Soto por todo el apoyo que me brindo.

De manera especial agradezco a la Dra. Verónica Chaparro Huerta por su amistad y confianza, la cuál confirmo cada día.

Al M. C. Juan Reyes Gómez, por su apoyo incondicional y sus muy valiosas sugerencias, sin las cuales no hubiera sido posible este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente deseo agradecer a las Instituciones que me apoyaron para hacer posible mi trabajo de tesis doctoral.

A la Universidad de Guadalajara por darme apoyo en mi superación y con ello poder contribuir a tener cada día una mejor Universidad.

Al IMSS por el gran esfuerzo que implica apoyar trabajos de investigación, sin lo cual no hubiera sido posible la realización de este.

A la UNAM por todo lo que representa y el esfuerzo que hace por tener y mantener el nivel académico actual.

Al programa de mejoramiento del profesorado (PROMEP) por la beca otorgada y por el apoyo que brinda a los académicos en su superación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado al proyecto 30901-M, sin el cual no hubiera sido posible realizar este proyecto.

INDICE

CONTENIDO	PAG.
ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
I INTRODUCCION	1
1.1 NEUROTRANSMISION GLUTAMATERGICA	2
1.1.1 METABOLISMO	
1.1.2 PAPEL FISIOLÓGICO DEL Glu	
1.1.3 RECEPTOR A NMDA	
1.1.4 RECEPTOR A KAINATO	
1.1.5 RECEPTOR A AMPA.	
1.2 MECANISMOS CELULARES DE EXCITOTOXICIDAD	11
II ANTECEDENTES	17
2.1 MODELOS DE EXCITOTOXICIDAD <i>IN VITRO</i>	18
2.1.1 MODELOS EN CULTIVOS DE CELULAS CEREBRALES	
2.1.2 MODELOS EN REBANADAS DE TEJIDO NEURAL	
2.2 MODELOS DE EXCITOTOXICIDAD <i>IN VIVO</i>	21
2.2.1 MODELOS DE ADMINISTRACION INTRACEREBRAL DE Glu	
2.2.2 MODELOS DE ADMINISTRACION SISTEMICA DE Glu	
2.3 PARTICIPACION DE LOS R-Glu EN LA EXCITOTOXICIDAD	23
2.3.1 CAMBIOS EN LA EXPRESION DE LAS SUBUNIDADES DE LOS R-GLU.	
2.3.1.1 <i>Regulación transcripcional de la expresión del gen GluR2</i>	
2.4 PROTEINAS CINASAS ACTIVADAS POR MITOGENOS (MAPK)	27
2.4.1 ASPECTOS GENERALES	
2.4.2 CINASAS REGULADAS POR SEÑAL EXTRACELULAR (ERK)	
2.4.3 CINASAS REGULADAS POR ESTRES (SAPK)	
2.4.3.1 <i>Cinasas c-Jun N-terminal (JNK/SAPK)</i>	
2.4.3.2 <i>Cinasas reguladas por estrés p38/SAPK</i>	

III	HIPOTESIS	36
IV	OBJETIVOS GENERALES	37
V	OBJETIVOS PARTICULARES	38
VI	METODOLOGIA	39
6.1	REACTIVOS UTILIZADOS	40
6.2	MATERIAL BIOLÓGICO Y TRATAMIENTOS	41
6.3	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA VIA P38	43
6.3.1	PREPARACION DE LA MUESTRA	
6.3.2	DETERMINACION DE LA DOSIS OPTIMA DEL SB203580	
6.3.3	TECNICA DE WESTERN BLOT	
6.4	EVALUACION DEL DAÑO CELULAR	44
6.4.1	PREPARACION DE LA MUESTRA	
6.4.2	ANALISIS HISTOLOGICO POR HEMATOXILINA Y EOSINA (H/E)	
6.4.3	DETERMINACION DE LA DOSIS DE SB203580	
6.5	DETECCION DEL DAÑO CELULAR APOPTOTICO	46
6.6	NIVELES DE RNAm POR PCR	47
6.6.1	PREPARACION DE LA MUESTRA	
6.6.2	EXTRACCION DEL RNAtotal POR EL METODO DE ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA	
6.6.3	FORMACION DEL DNAc UTILIZANDO TRANSCRIPTASA REVERSA	
6.6.4	NIVELES DE RNAm-REACCION EN CADENA DE POLIMERASA	
6.7	NIVELES DE PROTEINA GluR2- INMUNOHISTOQUIMICA	49
6.8	ESTADISTICA	51
VII	RESULTADOS	52
7.1	HIPOCAMPO CEREBRAL	53
7.1.1	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA VIA P38	
7.1.2	ANALISIS HISTOLOGICO DE LOS CORTES TEÑIDOS CON HEMATOXILINA Y EOSINA	
7.1.2.1	Análisis morfológico del daño celular	
7.1.2.2	Análisis cuantitativo del daño celular	

7.1.3	DETECCION DEL DAÑO CELULAR APOPTOTICO	
7.1.4	NIVELES DE RNAm DE LAS SUBUNIDADES DE LOS R-Glu	
7.1.4.1	Niveles de expresión de las subunidades del R-NMDA	
7.1.4.2	Niveles de expresión de las subunidades del R-AMPA	
7.1.5	NIVELES DE LA PROTEINA DE GluR2-INMUNOHISTOQUIMICA	
7.1.6	NIVEL DE EXPRESION DEL RNAm DE NRSF EN EL HIPOCAMPO	
7.2	CORTEZA CEREBRAL	75
7.2.1	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA VIA P38	
7.2.2	ANALISIS HISTOLOGICO POR HEMATOXILINA Y EOSINA (H/E)	
7.2.2.1	Análisis morfológico del daño celular	
7.2.2.2	Análisis cuantitativo del daño celular	
7.2.3	DETECCION DEL DAÑO CELULAR APOPTOTICO	
7.2.4	NIVELES DE RNAm DE LAS SUBUNIDADES DE LOS R-Glu	
7.2.4.1	Niveles de expresión de las subunidades del R-NMDA	
7.2.4.2	Niveles de expresión de las subunidades del R-AMPA	
7.2.5	NIVELES DE LA PROTEINA DE GLUR2-INMUNOHISTOQUIMICA	
7.2.6	NIVELES DE RNAm DE NRSF EN EL CORTEZA CEREBRAL	
VIII	DISCUSION Y CONCLUSIONES	90
8.1	ESTUDIOS HISTOLOGICOS	91
8.2	ESTUDIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	95
8.3	CONCLUSIONES	103
IX	BIBLIOGRAFIA	104
X	APENDICES	127
9.1	APENDICE I Preparación de soluciones para estudios histológicos	128
9.2	APENDICE II Preparación de soluciones para estudios de biología molecular	130
9.3	APENDICE III Artículo publicado	132

ABREVIATURAS

AMPA	Acido α amino-3-hidroxi-4-metil -isoxasol
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina.
Arg (R)	Arginina (código de una letra).
ATF2	Factor activador de la transcripción 2.
ATF2 ^{PP}	Factor activador de la transcripción 2 (activado o fosforilado).
ATP	Trifosfato de adenosina
BHE	Barrera hematoencefálica.
BSA	Albúmina de suero de bovino.
Ca ⁺⁺	Ion calcio.
[Ca ⁺⁺] _i	Concentración intracelular del Ca ⁺⁺ .
CNQX	6-ciano -7-nitroquinoxaline.
DAB	Diaminobenzidina.
DAG	Diacilglicerol.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
DNAc	Acido desoxirribonucleico complementario.
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados.
EP	Edad posnatal.
ERK	Proteína cinasa activada por señal extracelular.
FrI	Región frontal 1.
g	Gramo (s).
GDP	Difosfato de guanosina.
Gli	Glicina.
Gln (Q)	Glutamina (código de una letra).
Gln-asa	Enzima glutaminasa.
Glu	Acido glutámico.
GluR1-7	Subunidades de los R-Glu (R-AMPA y R-KA).
GMS	Glutamato monosódico.
GTP	Trifosfato de guanosina.
h	Hora (s).
H/E	Hematoxilina -eosina.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
i.p.	Intraperitoneal.
Ile (I)	Isoleucina (código de una letra).
ICa ⁺⁺ SV	Corrientes de Ca ⁺⁺ , sensibles a voltaje.
IP ₃	Trifosfato de inositol
JNK/SAPK	Proteína cinasa c-jun N- términoal/proteínas cinasas activadas por estrés.
K ⁺	Ion potasio.
KA1-2	Subunidades de R-Glu (R-Ka).
LPS	Lipopolisacáridos.
LTP	Potenciación postetánica a largo plazo.

MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos.
MAPKK	MAPK cinasa.
MAPKKK	MAPK cinasa cinasa.
Mg ⁺⁺	Ion magnesio.
min	Minuto (s).
μl	Microlitro (s).
μM	Micromolar.
mM	Milimolar.
mV	Milivolts.
Na ⁺	Ion sodio.
Nasp	1-naftil acetil espermidina.
NGF	Factor de crecimiento nervioso.
nmol	Nanomoles.
NR1	Subunidad del R-NMDA.
NR2 (A-D)	Subunidades del R-NMDA.
NR3	Subunidad del R-NMDA.
p.c.	Peso corporal.
p38/SAPK	p38/ proteína cinasa activada por estrés.
pb	Pares de bases.
Pro	Prolina.
R-AMPA	Receptores a ácido α amino-3-hidroxi-4-metil -isoxasol.
R-Glu	Receptores a glutamato.
R-Glu _i	Receptores a glutamato ionotrópicos.
R-Glu _m	Receptores a glutamato metabotrópicos.
R-KA	Receptores a ácido kaínico.
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero.
R-NMDA	Receptores a N-Metil-D-Aspartato.
rpm	Revoluciones por minuto.
s.c.	Subcutánea.
SAPK	Proteínas cinasas activadas por estrés.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.
SN	Sistema nervioso.
SNC	Sistema nervioso central.
SSF	Solución salina fisiológica.
Thr	Treonina.
TrkA	Receptor a tirosina cinasa A.
Tyr (Y)	Tirosina (código de una letra).
Val (V)	Valina (código de una letra).

RESUMEN

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que el glutamato (Glu) induce excitotoxicidad y provoca la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), a través de la vía p38 y JNK. En este trabajo se evaluó el papel de p38, en condiciones de excitotoxicidad, para analizar la interacción entre la activación de las MAPK, la muerte neuronal y la expresión de las subunidades de los receptores a Glu. Se evaluaron, número de neuronas normales, núcleos positivos a TUNEL, expresión de las subunidades (NR1, GluR1 y GluR2) y la actividad de p38; en el hipocampo y corteza a los 8, 10, 12 y 14 días de EP (EP), después del tratamiento neonatal con GMS (4mg/kg de peso corporal, administrado los días 1, 3, 5 y 7 de EP). El GMS disminuyó el número de neuronas normales e incrementó los núcleos positivos a TUNEL. La expresión de NR1 y GluR1 incrementó por el tratamiento con GMS, mientras que GluR2 disminuye. La actividad de la p38, medida a través de la fosforilación de ATF2, fue más alta después del tratamiento con GMS. Además, el SB203580, un inhibidor específico de p38 evitó los cambios inducidos por el GMS, en todos los parámetros evaluados, excepto en la expresión de NR1. Estos resultados sugieren que el tratamiento con GMS induce muerte neuronal apoptótica a través de la activación de p38, lo que probablemente este asociado con la expresión de los receptores AMPA, permeables a calcio, dado por la disminución de la expresión de GluR2. Además este estudio establece una posible relación entre la regulación de la expresión por el NRSF y la vía de señalización p38/SAPK.

SUMMARY

Recently, *in vitro* studies have shown that glutamate induced excitotoxicity and provoked mitogen-activated protein kinases (MAPK) activation through p38 and JNK pathways. Therefore, in this work the p38 role was evaluated under excitotoxicity conditions after monosodium glutamate (MSG) administration to newborn rats, to analyze the putative interaction between MAPK activation, neuronal death, and ionotropic glutamate receptor subunits expression. The morphological characteristics, non-altered neural cells number, positive-nucleus to TUNEL, NR1, GluR1 and GluR2 subunits expression by RT-PCR, and p38 activity were evaluated in hippocampus and cerebral cortex regions at 8, 10, 12 and 14 postnatal days (PND) after MSG neonatal treatment (4mg/kg of body weight; subcutaneously administered on 1, 3, 5 and 7 PND). MSG treatment diminished the non-altered neural cells number and increased positive-nucleus to TUNEL number. The expression of NR1 and GluR1 subunits were elevated by MSG treatment, while GluR2 subunit was decreased. The p38 activity, measured through phosphorylation ATF2, was higher after MSG treatment. Furthermore, SB203580, a specific inhibitor of p38 activity avoided the changes induced by MSG treatment in all parameters evaluated, particularly in hippocampus; except that of NR1 subunit expression. These results suggest that MSG treatment induces apoptotic neuronal death through p38 activation, which probably is associated with AMPA-type glutamate receptors expression with high permeability to calcium, given that GluR2 diminishes after MSG treatment. Moreover, our study shown a likely relation between expression by NRSF regulation and p38 pathway.

I. INTRODUCCION

1.1 NEUROTRANSMISION GLUTAMATERGICA

1.1.1 METABOLISMO

El ácido glutámico (Glu) es un aminoácido no-esencial que no cruza la barrera hematoencefálica (BHE), se sintetiza a partir de la glucosa y por diversas vías metabólicas. Las enzimas que sintetizan y metabolizan el Glu se localizan principalmente en dos compartimentos cerebrales, las neuronas y las células gliales. Dentro de las terminales nerviosas el Glu se almacena en las vesículas sinápticas por un proceso dependiente de trifosfato de adenosina (ATP). Después de la estimulación nerviosa y la subsecuente despolarización, el Glu se libera de una manera dependiente de la concentración de calcio (Ca^{++}) (Dingledine y Mc Bain, 1999).

El Glu que se libera de las células nerviosas y se recaptura tanto por las células gliales como neuronales, utiliza mecanismos de alta afinidad, dependientes de la concentración de sodio (Na^+). Dentro de las células gliales, al Glu se le incorpora un segundo ion amonio por la acción de la glutamina sintetasa (Gln-s) para formar glutamina (Gln). La glutamina sale de la célula glial y es captada por las neuronas, se difunde dentro de la terminal nerviosa y se convierte a Glu por una glutaminasa (Gln-asa) mitocondrial (Nicklas, 1986). En esta forma el Glu se recicla desde la terminal nerviosa a la célula glial y nuevamente a la terminal nerviosa (Figura 1) (Dingledine y Mc Bain, 1999).

1.1.2 PAPEL FISIOLÓGICO DEL Glu

La exposición de las neuronas al Glu es un elemento esencial en la función neuronal, ya que entre otras cosas induce elevaciones transitorias en la concentración de Ca^{++} intracelular ($[Ca^{++}]_i$) que es necesaria para los procesos fisiológicos normales (Barich, 1998; Bito, 1998).

El Glu como principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos participa en la respuesta posináptica excitadora. Además, durante el desarrollo, los receptores a glutamato (R-Glu) participan en la sinaptogénesis, crecimiento y proliferación neuronal (Komuro y Rakic, 1993; Pearse y col., 1987). También poseen un papel central en procesos de plasticidad sináptica como la potenciación posttetánica a

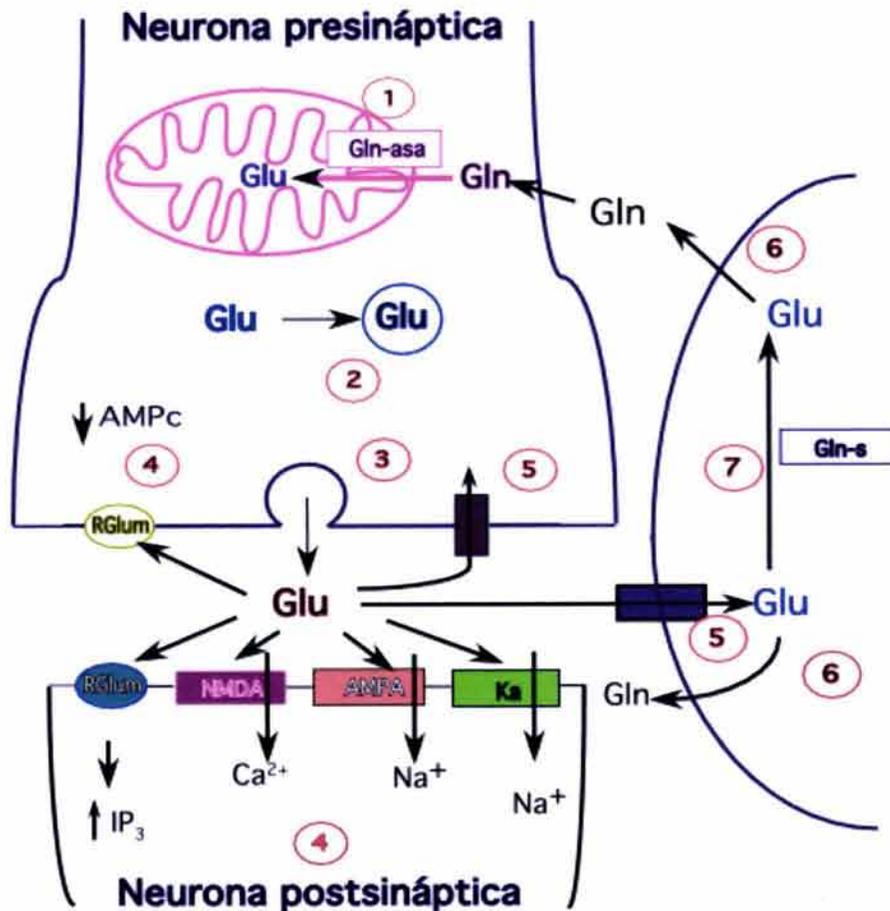


Figura 1. Metabolismo del Glu. 1) La conversión de Gln a Glu involucra la acción enzimática de la glutaminasa (Gln-asa) en la mitocondria; 2) el Glu sintetizado se empaca y almacena en concentraciones altas dentro de vesículas sinápticas; 3) se libera hacia el espacio intersináptico; 4) interacciona con múltiples sitios receptores; 5) es capturado por las células gliales a través de la actividad de transportadores de Glu; 6-7) en las células gliales el Glu se convierte en Gln por la glutamina sintetasa (Gln-s). Tomada de Trends in Pharmcol Sci., 2001 (22):174-181.

largo plazo (LTP), la cual se considera como posible sustrato celular del aprendizaje y la memoria (Sakimura y col., 1995).

El efecto excitador del Glu sobre la célula postsináptica depende de su interacción con dos tipos de receptores, denominados ionotrópicos y metabotrópicos (Dingledine y McBain, 1999).

Los receptores metabotrópicos activan proteínas G, y por tanto promueven la síntesis de segundos mensajeros. En el sistema nervioso (SN), se han descrito por lo menos ocho tipos de receptores metabotrópicos glutamatérgicos (R-Glu_m), que se conocen como R-Glu_m 1-8, clasificados dentro de tres clases funcionales con base a la homología en la secuencia de aminoácidos, agonistas farmacológicos y vías de transducción de señales, a las cuales ellos se acoplan. La activación de R-Glu_m 1 y R-Glu_m 5 (Grupo I), estimula preferentemente a la enzima fosfolipasa C, la cual sintetiza el trifosfato de inositol (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). En general la activación de R-Glu_m 2-3 (Grupo II) y R-Glu_m 4, 6-8 (Grupo III) inhiben a la enzima adenilato ciclasa, reduciendo los niveles de monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c). Los genes para estos receptores codifican para una proteína, la cual cruza siete veces la membrana, y al igual que los receptores ionotrópicos poseen un dominio extracelular usualmente largo, el cual precede a los 7 segmentos transmembranales (Dingledine y McBain, 1999).

Los receptores ionotrópicos son canales iónicos activados por ligando. La apertura del poro acuoso permite la entrada de Na⁺ o Ca⁺⁺ y la salida de K⁺. El efecto neto del flujo de iones a través de la membrana es una rápida despolarización (menos de 10 ms) de la célula nerviosa.

Los receptores ionotrópicos glutamatérgicos (R-Glu_i) se clasifican de acuerdo con su afinidad a agonistas específicos como: N-Metil-D-Aspartato (R-NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol (R-AMPA) y ácido kaínico (R-KA). Los R-Glu_i se conforman por la agregación de diferentes subunidades proteicas, algunas de las cuales se modifican después de la transcripción por dos diferentes procesos: el *empalme alternativo*, que establece la formación de dos versiones de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) que difieren en un segmento de 115 pares de bases (pb) para el caso de las variantes flip-flop; el segundo proceso, *la edición* del RNAm que determina la sustitución de un aminoácido

por otro (Figura 2). Cada subunidad tiene cuatro dominios hidrofóbicos transmembranales, enumerándose del M1 al M4. De éstos, el segmento M2 no cruza completamente la membrana sino que retorna al lado citoplasmático formando un asa que contribuye a la estructuración del poro iónico. El extremo amino terminal se ubica en el lado extracelular mientras que el carboxilo terminal es intracelular (Figura 2) (Dingledine y McBain, 1999).

Los R-Glu_i son heterómeros formados por la agregación de cuatro o cinco subunidades, de esta manera constituyen receptores con distintas propiedades farmacológicas y biofísicas (Nakanishi, 1992).

1.1.3 RECEPTOR NMDA

Los R-NMDA se ensamblan con dos tipos de subunidades: la subunidad NMDAR1 (NR1), y la subunidad NMDAR2 (NR2). De esta última, existen cuatro subtipos denominados como NR2 A-D, las cuales modifican las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas del R-NMDA. Una subunidad recientemente identificada es NR3, y la inclusión de NR3A reduce el tiempo de apertura y conductancia del canal, sugiriendo que esta subunidad juega un papel regulador en las propiedades electrofisiológicas del receptor (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993).

La composición de estos receptores se ha inferido al evaluar la distribución de la proteína o RNAm de las diferentes subunidades (Monyer y col., 1994; Dunah y col., 1998; Thompson y col., 2000), en animales con delección de genes específicos (Ebraldize y col., 1996; Ito y col., 1997) y por comparación de las propiedades funcionales de los R-NMDA nativos y recombinantes (Momiya y col., 1996; Misra y col., 2000; Flint y col., 1997). Estos estudios han permitido determinar la asociación entre las propiedades del R-NMDA con la presencia de subunidades específicas. Por ejemplo, los receptores recombinantes homoméricos para NR1 poseen las características farmacológicas de un R-NMDA nativo, dado que todos los sitios de unión a agonistas y moduladores son codificados por un único gen. Sin embargo, las corrientes catiónicas inducidas por un agonista son muy pequeñas en los receptores homoméricos para NR1 pero se incrementa más de 100 veces por la co-expresión de una de las subunidades NR2, esto sugiere que existe una alta probabilidad de que la mayoría de los R-NMDA en el cerebro sean heteroméricos. Dado que los R-

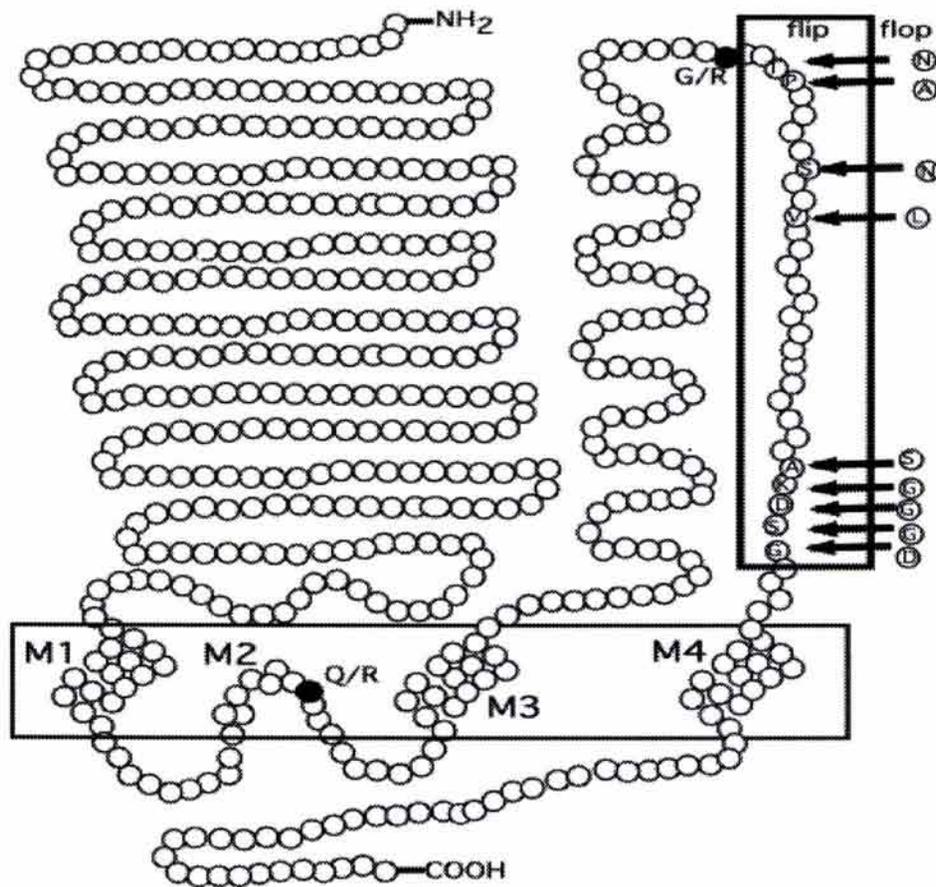


Figura 2. Representación esquemática de la topología transmembrana de las subunidades del R-Glu. Los círculos representan aminoácidos (aa). Los dos sitios de edición del RNA, Q/R y R/G, se indican con círculos negros. El recuadro (superior) delimita la región del empalme para las variante flip/flop. Los nueve aa (código de una letra) en la versión flip se indican con las flechas dentro del recuadro y se sustituyen por los indicados fuera del recuadro en la flop. Tomada de *Prog in Neurobiol.*, 1998 (54):581-618.

heteroméricos recombinantes muestran diferentes propiedades fisiológicas dependiendo de cual de las cuatro subunidades NR2 se encuentre ensamblada con NR1, las subunidades NR2 se pueden considerar como reguladoras, mientras que la subunidad NR1 es fundamental en la formación de R-NMDA funcionales (Tabla 1) (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993).

La distribución de cada subunidad se ha examinado a través de técnicas de hibridación *in situ*. La subunidad NR1 se expresa ampliamente en el cerebro, predominando en el cerebro anterior, mientras que la subunidad NR2 se expresa en un patrón diferencial en las diversas regiones cerebrales. Por ejemplo, el RNAm para NR2A está ampliamente distribuido en el cerebro, aunque en mayor proporción en corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. El transcrito NR2B está presente en el cerebro anterior con altos niveles de expresión en la corteza cerebral, hipocampo, septum, putamen-caudado y bulbo olfatorio. El RNAm para NR2C se expresa predominantemente en el estrato de células granulares del cerebelo con una muy débil expresión en el bulbo olfatorio y el tálamo. Bajos niveles de NR2D se detectan en el tálamo, tallo cerebral y bulbo olfatorio (Monyer y col., 1994). Esto le confiere al R-NMDA bases estructurales para una variación funcional (Dingledine y McBain, 1999).

Además, los patrones de expresión de las subunidades NR2 se regulan diferencialmente durante el desarrollo. En el cerebro de roedores, los RNAm de las subunidades NR2B y NR2D se presentan en edad prenatal, mientras que las subunidades NR2A y NR2C se detectan alrededor del nacimiento (Akazawa y col., 1994; Ozawa y col., 1998).

La activación del R-NMDA, *in vitro*, requiere de la unión simultánea de dos diferentes agonistas, el Glu y la glicina (Gli), por esta razón se les refiere como co-agonistas del R-NMDA. Sin embargo en el SNC, la concentración de Gli en el medio extracelular (1 μM) es suficiente para que el Glu sea el único activador de este tipo de receptores. El R-NMDA también posee otras características importantes como son: su alta permeabilidad a Ca^{++} (Choi, 1995), el bloqueo por Mg^{++} extracelular y la presencia de múltiples sitios de regulación farmacológica, incluyendo sitios de unión para poliaminas, protones y zinc (Dingledine y McBain, 1999; Mayer y Westbrook, 1987), y una cinética

Tabla 1. Familias moleculares de los diferentes R-Glu. Tanto los receptores ionotrópicos como los metabotrópicos comprenden tres clases diferentes de receptores. Tomada de Basic Neurochemistry, 1999 (15):315-333.

Receptores a Glutamato						
	Ionotrópicos			Metabotrópicos		
Clasificación de R-Glu	NMDA	AMPA	Kainato	Clase I	Clase II	Clase III
Subunidades	NR1	GluR1	GluR5	R-Glu _m 1	R-Glu _m 2	R-Glu _m 4
	NR2A	GluR2	GluR6	R-Glu _m 5	R-Glu _m 3	R-Glu _m 6
	NR2B	GluR3	GluR7			R-Glu _m 7
	NR2C	GluR4	Ka1			R-Glu _m 8
	NR2D		Ka1			
Segundos mensajeros	↑ Ca ⁺⁺	↑Ca ⁺⁺ ↑ Na ⁺	↑ Na ⁺	↑ IP3 Ca ⁺⁺	↓ AMPc	↓AMPc

de activación lenta (Lester y col., 1990). La corriente regulada por el R-NMDA es máxima entre los -20 y -30 mV, y se reduce conforme se llega a potenciales hiperpolarizantes. Esta reducción en la corriente iónica se debe al bloqueo del canal iónico por el Mg^{++} extracelular. Sin embargo, cuando se despolariza la membrana celular, se reduce la afinidad del sitio de unión por el Mg^{++} y el bloqueo se elimina (Mayer y col., 1984).

1.1.4 RECEPTOR A KAINATO

Los R-KA se forman por combinaciones de las subunidades GluR5-7 en combinación con KA1 y KA2, estas subunidades proteicas exhiben una afinidad diferencial por el ácido kaínico (Dingledine y McBain, 1999) (Tabla 1).

Las subunidades GluR5 y GluR7 también se modifican por procesos postranscripcionales y cada una puede generar dos variantes: GluR5 (1 y 2), GluR7 (a y b). Otro mecanismo adicional de diversidad molecular es la edición del RNAm de las subunidades GluR5 y GluR6, ocurre en la región del poro iónico en donde un residuo de glutamina (Gln:Q) se sustituye por uno de arginina (Arg:R). Así, el residuo Q, facilita la entrada de Ca^{++} y el R, limita su permeabilidad (Chittajallu y col., 1999). Las isoformas GluR5 (Q) y GluR6 (Q) se denominan formas no editadas, mientras que las isoformas GluR5 (R) y GluR6 (R) son formas editadas. La cantidad de formas editadas se regula durante el desarrollo del SNC, donde se observa que, la edición de la subunidad GluR5 es 50 a 60% más baja en la etapa embrionaria en comparación con la edad adulta, mientras que la edición de la subunidad GluR6, es de alrededor del 70-95% (Bernard y Khrestchatsky, 1994; Paschen y col., 1994). Así mismo, la subunidad GluR6 puede presentar modificaciones de edición en el primer segmento transmembranal (M1), donde la isoleucina se sustituye por valina (I/V) y la tirosina por cisteína (Y/C). Así, la isoforma GluR6 (R)(V)(C) es la que predomina en el adulto.

Finalmente, las subunidades GluR5, GluR6 y GluR7 pueden ensamblarse de forma homomérica o en combinación heteromérica con KA1 o KA2 para formar canales iónicos con diferentes propiedades funcionales (Chittajallu y col., 1999).

1.1.5 RECEPTOR A AMPA

Los R-AMPA regulan la neurotransmisión excitadora rápida en la mayoría de las sinapsis en el SNC. Estos receptores fueron inicialmente nombrados receptores a quisquálico, sin embargo han sido renombrados como R-AMPA, ya que el quisquálico actúa también sobre los R-Glu_m. Mientras que el ácido α -amino-3-hidroxi-4-metil-isoxasol (AMPA) es más específico para los R-AMPA.

Los R-AMPA son heterómeros que se forman por diferentes combinaciones de las subunidades GluR1-4 (Tabla 1). Durante la maduración de sus respectivos RNAm se producen variantes de empalme que originan receptores con diferente selectividad y cinética de desensibilización, cada una de las subunidades GluR1-GluR4, existen en dos formas diferentes denominadas “flip” y “flop”, creadas por empalme alternativo de 115 pb en la región inmediatamente precedente a la región M4 (Sommer y col., 1990). El proceso de edición del RNAm incrementa la diversidad de las subunidades del R-AMPA. Un residuo de glutamina (Q) en M2 es codificado en los genes de GluR1-GluR4. Sin embargo la subunidad GluR2 posnatalmente, contiene una arginina (R) en esta posición; a este sitio de intercambio de aminoácidos se le ha llamado sitio Q/R (Figura 2). Este cambio de codón se genera durante la edición nuclear y sólo se presentan bajos niveles del RNAm no editado, en el tejido fetal (Burnashev y col., 1992; Higushi y col., 1993).

Los R-AMPA son permeables a Na⁺ y K⁺ y casi se les puede considerar impermeables al Ca⁺⁺. Diversos estudios indican que las propiedades funcionales de los receptores recombinantes dependen de la composición de sus subunidades. Los canales recombinantes homoméricos o heteroméricos formados con las subunidades GluR1, GluR3 o GluR4 son permeables al Ca⁺⁺ mientras que los canales ensamblados con, al menos, una subunidad GluR2, son prácticamente impermeables al Ca⁺⁺, esto se atribuye al proceso de edición del RNAm en el sitio Q/R en la región que constituye el poro del canal (Hollman y col., 1991; Jonas y col., 1994; Jonas y Burnashev, 1995; Sommer y col., 1991).

Los R-AMPA están distribuidos ampliamente en el SNC, aunque existen diferencias regionales notables en su distribución, por ejemplo, en el hipocampo y la corteza cerebral se encuentran elevados los niveles de sitios de unión de alta afinidad para el AMPA-[³H], con variaciones en densidad entre los diferentes estratos o tipos celulares

(Monaghan y col., 1984; Olsen y col., 1987; Insel y col., 1990). Estudios durante el desarrollo cerebral en ratas, por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, han revelado diferentes patrones de expresión regional de las subunidades GluR1-GluR4. En el hipocampo de ratas adultas los RNAm de GluR1, GluR2 y GluR3 se expresan de forma abundante, en el estrato de células piramidales y en el giro dentado. El RNAm para GluR4 es mucho menos abundante en la corteza cerebral, los patrones de expresión de GluR1, GluR3 y GluR4 difieren entre los estratos, mientras que GluR2 se distribuye en todas las capas corticales de manera uniforme (Keinänen y col., 1990).

En la mayoría de las sinapsis centrales, tanto los R-AMPA como R-NMDA se activan durante la transmisión sináptica. Los R-AMPA regulan la neurotransmisión rápida dada su cinética de activación, a diferencia de la neurotransmisión mediada por R-NMDA que ocurre más lentamente y permanece por un periodo de tiempo más largo, ya que su cinética es mucho más lenta que la que exhiben los R-AMPA.

1.2 MECANISMOS CELULARES EN LA EXCITOTOXICIDAD

Varios estudios sugieren que un incremento en la neurotransmisión excitadora y la acumulación de Ca^{++} intracelular, pueden contribuir a una pérdida neuronal selectiva. Por ejemplo Andine y col., (1991) demostraron que varias horas después de un daño isquémico, se incrementa tanto la captura de Ca^{++} en las células piramidales de CA1 así como los niveles extracelulares de aminoácidos excitatorios (Andine y col., 1991). Los aminoácidos excitatorios como el Glu son neurotóxicos, en altas concentraciones (Kure y col., 1991). No existen evidencias del mecanismo preciso de muerte neuronal excitotóxica, ya que los datos *in vivo* e *in vitro* están en desacuerdo si es de tipo apoptótica o necrótica (Choi, 1988, 1992a y b).

La necrosis y la apoptosis son dos mecanismos de muerte celular con diferentes características morfológicas. La necrosis es causada por un evento traumático o tóxico que se caracteriza por el hinchamiento celular, daño a los organelos intracelulares incluyendo la mitocondria y un rápido colapso en la homeostasis celular, lo anterior conduce al rompimiento de la membrana y a la liberación del contenido celular. En contraste, la apoptosis es un proceso activo de destrucción de células neuronales con

características morfológicas y moleculares bien definidas. Así el encogimiento celular, el ondulamiento de la membrana y la picnosis nuclear así como la condensación cromatínica y la fragmentación del DNA caracterizan la muerte celular apoptótica (Beilharz y col., 1995). La muerte por apoptosis es un proceso que ocurre naturalmente y juega un papel esencial en la remodelación de los tejidos (Ellis y col., 1991).

La muerte celular excitotóxica se ha descrito como un proceso necrótico (Gwang y col., 1997; Ferrer y col., 1995; Lesort y col., 1997), apoptótico (Filipkowski y col., 1994; Ferrer y col., 1995; Ankarcrona y col., 1996; Lesort y col., 1997) como un proceso que depende de la intensidad del estímulo (Bonfoco y col., 1995; Ankarcrona y col., 1995) ó también como un proceso continuo entre la necrosis y la apoptosis (Portera-Cailliau y col., 1997a)

Ankarcrona y col., (1995), demostraron que las células granulares cerebelares, en cultivo, expuestas a concentraciones neurotóxicas de Glu presentan dos tipos distintos de daño: una subpoblación neuronal sucumbe a la necrosis aguda durante e inmediatamente después de la exposición al Glu, mientras que el resto de las neuronas que recuperan sus niveles energéticos y su función mitocondrial, mueren de manera retardada con características de muerte apoptótica (Ankarcrona y col., 1995).

La excitotoxicidad es aun más complicada por el hecho de que la ejecución de un programa de muerte puede diferir según el tipo neuronal expuesto al daño (Nicotera y col., 1999), así como a la composición de receptores individuales que puede ser un factor decisivo en el tipo de muerte (Portera-Cailliau y col., 1997b). Lo anterior se asocia con el grado de sobrecarga de Ca^{++} , que se ha probado puede inducir un cambio en la forma de muerte de apoptosis a necrosis (Gwag y col., 1995). Este fenómeno se ha asociado a diferentes estados patológicos del SNC, entre los que se incluyen: la epilepsia (Kohr y Heinemann, 1989), hipoxia/isquemia (Siesjo y Bengtsson, 1989) y trauma encefálico (Faden y col., 1989). Además, se le implica en padecimientos crónico neurodegenerativos, tales como: la enfermedad de Huntington (Young y col., 1988), Alzheimer (Greenamyre y col., 1985) y el Parkinson (Turski y col., 1991), etc.

Evidencias experimentales, en condiciones *in vitro*, sugieren que el Glu puede inducir toxicidad a las células por dos diferentes procesos. La vía oxidativa (Murphy y

col., 1989; Bannai, 1986) en donde la exposición constante de las células a altas concentraciones de Glu, induce la inhibición de la captura de cisteína, el precursor del glutathione, y el desbalance en la homeostasis intracelular de cisteína conduciendo a la incapacidad de las células para protegerse del daño oxidativo (Murphy y col., 1990). Y la vía clásica conocida como excitotoxicidad que ocurre a través de la activación de R-Glu_i (Olney, 1969; Olney, 1978). De acuerdo con esto, al Glu se le implica en la muerte neuronal por la inducción de un incremento en la $[Ca^{++}]_i$ libre, el cual activa un gran número de sistemas intracelulares que podrían llevar a la célula a un proceso de daño e incluso la muerte (Choi, 1990; Choi, 1995; Rothman y Olney, 1986; Siesjo y Bengtsson, 1989). Los mecanismos posibles por los cuales el Glu puede inducir una elevación en la $[Ca^{++}]_i$ son:

- i) la activación de R-NMDA y R-AMPA permeables a Ca^{++} ;
- ii) la activación de R-Glu_m tipo I, los cuales inducen un incremento en la producción de IP_3 ;
- iii) la activación de canales de Ca^{++} , sensibles a voltaje;
- iv) la inactivación de los mecanismos de amortiguamiento de Ca^{++} ; y/o
- v) reclutamiento de receptores a rianodina (Oguro y col., 1995).

Estudios clínicos en humanos, y farmacológicos en roedores han demostrado que la concentración extracelular de Glu se eleva a niveles tóxicos en un proceso isquémico (Benveniste y col., 1984; Hagberg y col., 1985; Bullock y col., 1995; Davalos y col., 1997). La privación de oxígeno y glucosa promueve la disminución del almacén energético dentro de los compartimentos neuronales y gliales, afectando el metabolismo celular, las bombas iónicas y la capacidad de las células para mantener el potencial de membrana de reposo. Consecuentemente, las células se despolarizan generándose potenciales de acción que disparan la liberación de Glu de las terminales presinápticas. El Glu estimula de forma excesiva a sus receptores posinápticos, induciéndose un ingreso incontrolado de iones Na^+ y Ca^{++} a las neuronas (Dugan y Choi, 1999). La entrada sostenida de Ca^{++} a la neurona y su excesiva acumulación en el citosol y la mitocondria dispara diversos eventos intracelulares que eventualmente conducen a la muerte celular

(Figura 3) (Choi, 1988; Choi, 1995).

La pérdida de la homeostasis del Ca^{++} se debe a la saturación de los mecanismos de regulación con alta afinidad como la bomba de Ca^{++} y al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, así como a las proteínas tampón de Ca^{++} como la parvalbúmina y la calretinina. Una vez saturados estos sistemas, la mitocondria captura el exceso de Ca^{++} , acumulándolo en la matriz (Figura 3). Esto conlleva a la despolarización de la membrana mitocondrial por dos mecanismos:

- a) abatimiento parcial del potencial quimiosmótico debido a la acumulación de carga positiva en la matriz;
- b) si la sobrecarga es sostenida entonces sucede una despolarización irreversible debida a la activación del poro de transición.

El colapso del potencial quimiosmótico por este último mecanismo reduce la síntesis de ATP y la activación del poro de transición constituye una vía por donde el Ca^{++} retorna al citosol (Nicholls y Ward, 2000; Murchison y Griffith, 2000).

El incremento sostenido de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ induce la generación de radicales libres que promueven la peroxidación de lípidos de la membrana, la síntesis de óxido nítrico, que puede actuar como retromensajero e induce un efecto excitotóxico por aumento en la liberación de Glu (Almeida y col., 1998). Así mismo, se activan enzimas involucradas en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Choi, 1995). Eventualmente todos estos mecanismos contribuyen al daño irreversible del tejido neuronal (Figura 3) (Dugan y Choi, 1999; Nicotera y col., 1992).

En un evento isquémico por oclusión vascular, la extensión del área dañada (área de infarto) depende de la duración y grado de la oclusión, como también de la disponibilidad del suplemento vascular alterno. Así, la región del cerebro que se abastece únicamente por la arteria ocluida desarrolla el daño más severo, que se caracteriza por una falla energética aguda la cual conduce a la pérdida de la homeostasis iónica, acumulación de Na^+ y Ca^{++} intracelular y al desbalance osmótico que si es severo puede conducir a la lisis celular, con muerte celular inmediata, a esta región se le denomina *núcleo isquémico*. Mientras que el tejido que rodea el núcleo isquémico se le conoce como *zona de penumbra* y presenta daño tisular menos severo, ya que puede mantener parcialmente el

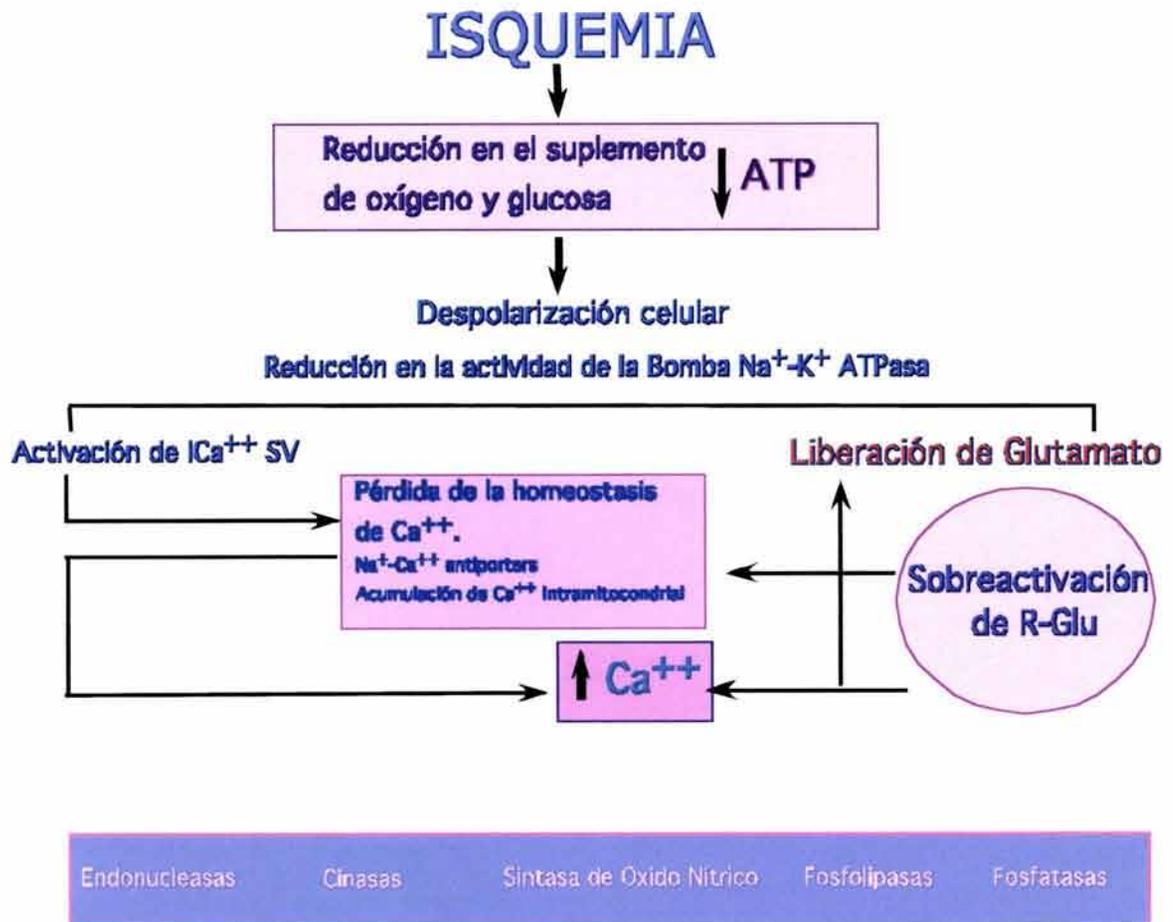


Figura 3. Vías potenciales que conducen a la muerte neuronal como resultado de un episodio de daño isquémico. En el daño isquémico se dispara una vía compleja que involucra la disminución de la energía celular almacenada, lo cual induce la activación sostenida de R-Glu, y la consecuente entrada de Ca⁺⁺. La elevación en la [Ca⁺⁺]_i libre causa la activación excesiva de una variedad de enzimas dependientes de Ca⁺⁺. Lo anterior podría llevar a la célula a la muerte.

suplemento sanguíneo por la circulación colateral y las células pueden ser viable por varias horas. con características que reproducen la muerte celular apoptótica (Dugan y Choi, 1999).

II. ANTECEDENTES

Generalmente, se acepta que el daño excitotóxico a neuronas resulta de la activación excesiva de corrientes iónicas, debidas a la entrada Ca^{++} y Na^{+} a través de canales modulados por Glu (Choi, 1987; Limbrick y col., 1995) o posiblemente por un suplemento adicional en la liberación de Ca^{++} almacenado intracelularmente, subsecuente a la activación de R-Glu_m (Mody y McDonald, 1995).

2.1 MODELOS DE EXCITOTOXICIDAD IN VITRO

2.1.1 MODELOS EN CULTIVOS DE CELULAS CEREBRALES

Típicamente, los estudios de excitotoxicidad utilizando neuronas en cultivo requieren el siguiente procedimiento:

- I) Disección de la región cerebral seleccionada seguida por la disociación y sembrado de células.
- II) Cultivo de células en un medio de crecimiento específico y por un tiempo determinado.
- III) Exposición de las células cultivadas al daño excitotóxico o a condiciones isquémicas, inducido con un medio diferente del que se usó para el crecimiento celular.
- IV) Mantenimiento de las células por un periodo postdaño, que precede a la evaluación de la sobrevivencia neuronal.

Estos parámetros influyen en el daño neuronal resultante y junto con otros factores como el estado de desarrollo neuronal pueden modificar la vulnerabilidad a la aplicación de excitotoxinas.

Las neuronas en cultivo se preparan generalmente de cerebros embrionarios de 8 días, una fase en donde se da un cambio rápido en la distribución y composición de las subunidades de los R-Glu (Watanabe y col., 1992; Monyer y col., 1994; Sheng y col., 1994), lo cual puede influir marcadamente en la vulnerabilidad de las neuronas a la exposición del Glu. Por ejemplo, la susceptibilidad al daño estriatal inducido por AMPA se incrementa dos veces cuando éste se produce del día 1 al 5 posnatal y es máxima al día 10 (McDonald y col., 1992).

Otro parámetro que influye en la susceptibilidad al daño es el tiempo durante el

cual las células se mantienen en condiciones de cultivo antes de inducir el daño, ya que el daño neurotóxico es más severo cuando el tiempo de cultivo es mayor (Choi y col., 1987; Favaron y col., 1988; Frandsen y Schousboe, 1990). Esta característica puede deberse a la expresión de diferentes subtipos de R-Glu (Frandsen y Schousboe, 1990), lo que podría reflejar un incremento en la vulnerabilidad procedente de la degeneración natural (Favit y col., 1992; Hossmann, 1994).

Por otra parte, la composición del medio de cultivo, en general, es diferente con respecto a los constituyentes del fluido extracelular, lo cual puede influir en la vulnerabilidad de las neuronas al daño; por ejemplo bajo condiciones despolarizantes utilizando 25 mM de KCl (Eimerl y Schramm, 1991; Uchiyama-Tsuyuki y col., 1995) y/o un medio libre de Mg^{++} (Cox y col., 1989) se intensifica la excitotoxicidad por Glu, presumiblemente por la liberación del bloqueo del R-NMDA mediado por Mg^{++} , el cual es dependiente de voltaje. La exposición de cultivos primarios de células granulares cerebelares de rata a 50 μM de Glu, en un medio libre de Mg^{++} durante 15 min, produce muerte neuronal la cual inicia 2-3 h después del tratamiento y termina con el 80-85% de células muertas 24 h después (Manev y col., 1989); sin embargo se requiere de 1 mM de Glu para inducir toxicidad total, cuando está presente en el medio una concentración de 2 mM de Mg^{++} (Cox y col., 1989).

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

La neurotoxicidad dependiente de Na^+ y Cl^- produce hinchamiento celular lo cual inicia con la entrada de Na^+ que arrastra Cl^- y agua, culminando con la lisis celular dentro de 1 a 2 h (Rothman, 1985; Dessi y col., 1994). El mecanismo de daño mediado por el Ca^{++} se ha estudiado por su analogía con la muerte neuronal retardada, que se induce por un breve episodio isquémico en regiones cerebrales vulnerables (Hossmann, 1994; Kirino, 1982; Pulsinelli y col., 1982).

Se han descrito dos tipos de muerte celular en algunos modelos de excitotoxicidad

in vitro: una muerte rápida de tipo necrótico, que sucede inmediatamente después de la exposición a Glu, con cambios morfológicos semejantes a los que se presentan en el núcleo isquémico y otra muerte celular de tipo retardada, con características semejantes a la que prevalece en la zona de penumbra. Por ejemplo, en neuronas corticales en cultivo, la aplicación de 300 μM de NMDA induce preferentemente apoptosis mientras que a dosis milimolares (2 mM) de este agonista se produce necrosis (Bonfoco y col., 1995).

Los antagonistas a R-NMDA han sido de los compuestos más efectivos para proteger de la muerte celular a los *cultivos* neuronales, en contra de una breve exposición de Glu, la droga debe de estar presente durante el daño para ejercer su acción positiva (Zinkad y col., 1992; Hossmann, 1994). En otros trabajos se ha demostrado un efecto protector sobre la degeneración neuronal retardada en cultivos celulares corticales con privación transitoria de oxígeno y glucosa, dado por la adición de antagonistas al R-NMDA, pero no por CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxaline 2-3 dione) en el medio (Goldberg y Choi, 1993). En contraste, la muerte neuronal isquémica en modelos animales *in vivo* se evita de manera eficiente con antagonistas al R-AMPA, el tratamiento es efectivo aun cuando comienza después de la normalización de los niveles de Glu extracelular (ver sección de modelos de excitotoxicidad *in vivo*).

2.1.2. MODELOS EN REBANADAS DE TEJIDO NEURAL

En rebanadas cerebelares preparadas de ratas de 8 días de edad posnatal (EP) la concentración más baja de Glu que induce toxicidad es 100 μM en presencia de Mg^{++} , y el daño sólo ocurre en las regiones más externas de la rebanada. Al incrementar la concentración de Glu el límite de daño necrótico se va generalizando en toda la rebanada hasta cuando se utiliza 3 mM. En contraste, 30 μM de Glu son suficientes para inducir un daño generalizado bajo condiciones de privación energética (Garthwaite y col., 1992).

De los estudios Garthwaite y col., (1992), concluyen que la difusión del Glu dentro del tejido cerebral se contraresta por una captura eficiente de éste por diversos tipos celulares. La captura eficiente del Glu contribuye a una débil neurotoxicidad en las rebanadas cerebrales. Inversamente, su inhibición puede agravar la excitotoxicidad en condiciones asociadas a privación energética, aunque otros mecanismos pueden influir de manera importante en esta condición (Albin y Greenamyre, 1992; Turski y Turski, 1993).

Entre estos mecanismos los más críticos podrían ser: un bloqueo deficiente del R-NMDA por Mg^{++} extracelular (Henneberry y col., 1989) y la incapacidad de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa para contrarrestar las corrientes entrantes de Na^+ , asociadas con la transmisión sináptica mediada por Glu (Rieppe y col., 1995; Lees y Leong, 1996).

Como en los estudios de neuronas en cultivo, en los de rebanadas cerebrales también existen discrepancias entre los mecanismos de toxicidad directa del Glu y la patogénesis de la muerte neuronal subsecuente a la privación energética.

2.2 MODELOS DE EXCITOTOXICIDAD *IN VIVO*

La excitotoxicidad directa ha sido claramente demostrada con la administración de análogos de Glu, como el ácido kaínico y el ácido quisquálico en animales de laboratorio (Olney, 1990). Varios compuestos endógenos con acción de agonistas sobre los R-Glu poseen un papel importante en desórdenes neurológicos especialmente: el aspartato, el ácido quinolínico y la L-cisteína (Zaczek y Coyle, 1982; Olney y col., 1990; Connick y Stone, 1989; Olney, 1990).

2.2.1 MODELOS DE ADMINISTRACION INTRACEREBRAL DE Glu

Altas cantidades de Glu deben de ser aplicadas al cerebro para alterar la función cerebral e inducir daño neuronal por ejemplo:

- La administración unilateral de 210 nmol de Glu en el estriado durante un periodo de 4 min, induce únicamente rotación y movimientos coreiformes de la cabeza (Toth y Lajtha, 1989).
- Para producir una deflexión del potencial de corriente directa son necesarios 10-100 μM Glu (vía perfusión por microdialisis a 1 $\mu l/min$), sugiriendo despolarizaciones locales (Obrenovitch y col., 1994).
- Se requiere la administración directa de 500 nM de Glu, durante 5 min, para inducir degeneración neuronal local retardada en el estriado (Olney y DeGubareff, 1978).

2.2.2 MODELOS DE ADMINISTRACION SISTEMICA DE Glu

El Glu no penetra la barrera hematoencefálica (BHE), por lo que la vulnerabilidad neuronal a su aplicación vía periférica se limita al periodo neonatal (que comprende la primer semana después del nacimiento) (Hawkins y col., 1995). El incremento en la permeabilidad del Glu a través de la BHE contribuye al incremento en la vulnerabilidad del cerebro inmaduro a éste aminoácido, comparado con el adulto (Alsarraf y col., 1995).

El primer reporte *in vivo* de la acción neurotóxica del Glu fue por Lucas y Newhouse (1957), quienes reportaron lesiones necróticas en la retina por efecto de la administración sistémica de altas dosis de L-Glu desde 4 a 8 mg de Glu/g de peso corporal (p.c.), en ratones neonatos y en menor grado en adultos (Lucas y Newhouse, 1957). Subsecuentemente, Olney (1969) demostró que después de la inyección única subcutánea de GMS (dosis variantes de 0.5 a 4 mg/g de p.c.) a ratones de 9 días de EP, sacrificados 48 h después, se observaron lesiones caracterizadas por edema y necrosis neuronal, las estructuras localizadas en el piso del tercer ventrículo fueron afectadas preferencialmente, aun a la dosis de 0.5 mg/g de p.c.; y además observó destrucción de las células del núcleo arcuato del hipotálamo y del giro dentado, del hipocampo (Olney, 1969). En otros trabajos se ha demostrado el mismo proceso de daño celular con GMS en ratas, conejos e incluso primates (Olney, 1990). Las características morfológicas de la excitotoxicidad en muchos tipos neuronales incluyen inflamación somatodendrítica, condensación cromatinica y el daño a organelos, en estos modelos de excitotoxicidad.

Además, se ha determinado que el consumo en la dieta GMS, en animales adultos, no induce cambios en los niveles de Glu medidos por microdiálisis, en el núcleo arcuato del hipotálamo. Estos hallazgos podrían explicar que el consumo en la dieta de MSG, aparentemente, carece de potencial neurotóxico (Bogdanov y col., 1996).

Limin y col., (1998) administraron una dosis única de GMS, en ratones de 7 EP vía subcutánea (s.c.), a diferentes concentraciones desde 0.1 a 4 mg/g de p.c., y evaluaron los cambios en la concentración de Glu en plasma, así como los efectos del GMS sobre morfología celular en núcleo arcuato, 5 h después del tratamiento. La concentración de Glu, después de la administración de 0.2, 0.3 o 0.5 mg de GMS/g de p.c., se incrementa a 2.1, 4.57 y 6.9 mM respectivamente, estos niveles fueron medidos 15 min después de la administración del GMS. Además encontraron que las primeras evidencias de daño

celular hipotalámico, coincide con la dosis de 0.2 mg/g de p.c., y se caracteriza por la presencia de núcleos picnóticos, volumen citoplásmico reducido, así como material nuclear condensado y fragmentado. También, se observó una mayor vulnerabilidad al Glu asociada al incremento en el nivel de expresión de la subunidad NR2C, la cual determina una disminución en la sensibilidad al Mg^{++} en los R-NMDA formados con esta subunidad (Limin y col., 1998).

Otros estudios han demostrado diversos eventos asociados con el proceso de daño celular excitotóxico inducido en etapa neonatal temprana, por una inyección diaria de GMS, vía s.c. por 4 días (1, 3, 5 y 7 días de EP); en estos trabajos se observaron cambios en los niveles de expresión de las subunidades a R-Glu, en particular las del R-NMDA, evaluados en el cerebro adulto (60 días EP) (Beas-Zárate y col., 2001; Beas-Zárate y col., 2002a). Además, en este mismo modelo, en la evaluación histológica de cerebros de ratas de 60 días de EP se observó la desorganización de los estratos corticales; así como la presencia de células nerviosas encogidas e hiper cromáticas en la corteza cerebral y en el hipocampo (Beas-Zárate y col., 2002a; Beas-Zárate y col., 2002b).

2.3 PARTICIPACION DE LOS R-Glu EN LA EXCITOTOXICIDAD

La activación excesiva de los R-Glu en un proceso isquémico, en el trauma encefálico y las crisis epilépticas, conduce a la muerte neuronal (Meldrum y Garthwaite, 1990). Así los R-Glu están íntimamente involucrados, tanto en la fisiología como en la patología de las funciones cerebrales.

La vulnerabilidad regional selectiva a la hipoxia-isquemia y a la excitotoxicidad están influenciadas por cambios en el desarrollo del SNC. En los modelos de excitotoxicidad la susceptibilidad al daño, por agonistas de los R-Glu, depende de la etapa del desarrollo y además el tipo de muerte celular es distinto para las diferentes regiones y tipos neuronales (McDonald y Johnston, 1990; Portera-Cailliau y col., 1997a; Portera-Cailliau y col., 1997b). Estas observaciones sugieren que, la respuesta regional o celular del cerebro inmaduro o adulto a la excitotoxicidad depende por lo menos parcialmente de los cambios relacionados con la edad, en la expresión y función de los R-Glu. Por lo que un factor importante en la vulnerabilidad del cerebro inmaduro a la neurotoxicidad es la eficiencia, distribución y composición de las subunidades proteicas que conforman los R-

Glu, entre otros.

Diversos estudios de unión de ligando a los R-Glu por autorradiografía (McDonald y Johnston, 1990), de Northern blot (Durand y Zukin, 1993), hibridación, RT-PCR y Western blot (Portera-Cailliau y col., 1996); sugieren una regulación espacio-temporal de la expresión de los R-NMDA y no-NMDA durante el desarrollo cerebral. Sin embargo, los cambios regionales o celulares en la expresión de las proteínas que constituyen los R-Glu no se comprenden del todo aun, particularmente en el contexto de la maduración neuronal, sinaptogénesis y vulnerabilidad potencial al daño.

Existen evidencia que los receptores NMDA, AMPA y Kainato están involucrados de una manera diferencial en la excitotoxicidad, en diferentes estados patológicos. Así, estudios en neuronas de hipocampo y corteza cerebral en cultivo sugieren que gran parte de la muerte celular es mediada a través de la activación del R-NMDA, probablemente reflejando su especial capacidad para regular la entrada masiva de Ca^{++} a la célula (MacDermott y col., 1986; Choi, 1992).

Sin embargo, la activación de los R-AMPA puede contribuir a la sobrecarga de Ca^{++} , en condiciones donde la actividad del R-NMDA se reduce, por ejemplo, por acidez extracelular (Dugan y Choi, 1999). De hecho, existen datos que indican un efecto neuroprotector de algunos antagonistas a R-AMPA, como CNQX y/o Nasp (1-naftil acetil espermidina) sobre la muerte celular retardada (Oguro y col., 1999; Cheung y col., 1998). La eficiencia neuroprotectiva se ha demostrado tanto en modelos de isquemia global (Gill, 1994), isquemia focal (Smith y Meldrum, 1992), y trauma encefálico (Gill y Lodge, 1997). Una de las observaciones más interesantes, consiste en la capacidad de los antagonistas AMPA para reducir la pérdida neuronal en la región CA1 del hipocampo, corteza, estriado y cerebelo después de la isquemia global, en donde los antagonistas NMDA han probado ser muy poco eficientes (Sheardown y col., 1993; Buchan y col 1991). También se ha reportado que la excitotoxicidad mediada por el R-AMPA presenta un curso temporal más lento (ocurre en varios días) y que la muerte neuronal es de naturaleza apoptótica (Larm y col., 1997). Este patrón de excitotoxicidad podría ser fundamental para que ocurra la degeneración lenta y progresiva de las células neuronales en desordenes neurológicos, colocando al R-AMPA como un blanco terapéutico en el

daño neuronal.

2.3.1 CAMBIOS EN LA EXPRESION DE LAS SUBUNIDADES DE LOS R-Glu

En 1997 Pellegrini-Giampietro y col., proponen una relación entre la muerte neuronal retardada, inducida por isquemia global transitoria, y el incremento en la formación de R-AMPA permeables a Ca^{++} , lo cual es secundario a la disminución del RNAm para la subunidad GluR2 (Pellegrini-Giampietro y col., 1997). Lo anterior concuerda con el trabajo de Gorter y col., (1997), en donde se observó la disminución en la expresión de la subunidad GluR2, en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo; otra observación interesante de este estudio es que 72 h después de la inducción de la isquemia global, pero antes de la muerte celular, el AMPA induce una elevación pronunciada en los niveles de Ca^{++} intracelular en estas células (Gorter y col., 1997). En acuerdo con estos hallazgos, al utilizar oligonucleótidos antisentido dirigidos para la subunidad GluR2 se produce neurodegeneración de las células de la región CA1 y CA3 del hipocampo, un efecto que se puede bloquear por el antagonista del R-AMPA, CNQX y por el bloqueador del R-AMPA permeable a Ca^{++} , Nasp (Oguro y col., 1999). Tsubokawa y col., (1994) encontraron una disminución en el flujo de las corrientes postsinápticas excitadoras glutamatérgicas sensibles al CNQX, en neuronas de CA1, de gerbos previamente sometidos a isquemia global. Este efecto se reduce por la diálisis de una solución tampón de Ca^{++} , sugiriendo que la disminución de la expresión GluR2 altera la selectividad iónica de los R-AMPA (Tsubokawa y col., 1994).

Además, el estatus epilepticus inducido por kainato, en ratas adultas, induce muerte de neuronas piramidales hipocampales en CA3, en estas neuronas la expresión del RNAm de la subunidad GluR2 se reduce de forma importante (Pollard y col., 1993; Friedman y col., 1994), y la reducción del RNAm de GluR2 precede la muerte celular. Estos y otros hallazgos, sugieren que la regulación a la baja de la expresión de GluR2 y la entrada de Ca^{++} a través de los R-AMPA en respuesta a glutamato endógeno puede estar involucrado en la patogénesis de diversos desordenes neurodegenerativos, además de la muerte neuronal retardada después de la isquemia

Aunado a lo anterior, se ha reportado la susceptibilidad diferencial a la neurotoxicidad durante diferentes etapas en el desarrollo del cerebro, lo que sugiere una

posible relación entre los cambios en la expresión de la subunidad GluR2, y/o de otras subunidades, en la muerte neuronal retardada y resalta la importancia del estudio de las vías de señalización que alteran la expresión de las subunidades de los R-Glu, bajo condiciones de excitotoxicidad. Su identificación puede contribuir al diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el diagnóstico y/o prevención de la isquemia cerebral o para ciertas enfermedades neurodegenerativas crónicas.

2.3.1.1 Regulación transcripcional de la expresión del gen GluR2

La subunidad GluR2 determina un gran número de propiedades biofísicas del R-AMPA, incluyendo la permeabilidad al Ca^{++} (Hollmann y col., 1991; Verdoorn y col., 1991; Burnashev y col., 1992). Así, se podría esperar que un cambio agudo en el nivel de expresión de GluR2 induzca profundos efectos sobre la actividad sináptica, como en la sobrevivencia neuronal.

Algunos estudios indican que los mecanismos que controlan el nivel de expresión de GluR2, puede ser un determinante importante del fenotipo de los R-AMPA. En este sentido, recientemente se ha identificado la presencia de un elemento represor funcional 1 (RE1), en el promotor proximal del gen para GluR2 y se ha demostrado que bajo condiciones fisiológicas este gen se encuentra bajo control transcripcional por un factor de supresión de la transcripción específico del elemento RE1 (denominado REST, NRSF o XBR) (Myers y col., 1998). NRSF se asocia con dos co-represores, que son Sin3A y coREST, los cuales en cambio reclutan la deacetilasa de histonas en la región promotora del gen blanco (Ballas et al 2001), de esta forma se restringe el acceso de la maquinaria de transcripción, requerida para la activación de genes (Chen y col., 2001).

La isquemia global transitoria induce muerte celular específica retardada, en neuronas piramidales de CA1 (Tanaka y col., 2002). El retardo entre el daño isquémico y la muerte neuronal es consistente con los cambios transcripcionales. La isquemia induce la disminución en la expresión de GluR2 en neuronas vulnerables al daño (Gorter y col., 1997).

El gen que codifica para la proteína de la subunidad GluR2 es blanco de NRSF (Huang y col., 2002), y como se mencionó esta implicado en la muerte neuronal excitotóxica (Tanaka y col., 2002). Lo anterior sugiere que NRSF podría regular los cambios transcripcionales, por ejemplo los asociados con la supresión de la expresión de

GluR2, inducidos por problemas patológicos, como la isquemia, hipoxia, enfermedades neurodegenerativas, epilepsia.

2.4 PROTEINAS CINASAS ACTIVADAS POR MITOGENOS

2.4.1 ASPECTOS GENERALES

El proceso de muerte neuronal se desarrolla en dos fases secuenciales (Deshmukh y Jonson, 1997; Pettmann y Henderson, 1998). La *fase de señalización extracelular*, en la cual las células reciben señales externas que podrían promover la sobrevivencia o la muerte; y la *fase de señalización intracelular*, en donde las células integran varias señales externas con otras que reflejan su estado endógeno, el balance entre las influencias favorables y desfavorables determina el destino celular. La fase de señalización intracelular involucra numerosos mecanismos, incluyendo flujos iónicos y activación de cascadas de proteínas cinasas y fosfatasas. Las vías de transducción involucradas en la sobrevivencia o muerte celular se han estudiado de manera extensiva, inicialmente en la línea celular PC12 y más recientemente en cultivos primarios de neuronas (Kaplan y Miller, 2000). Entre las vías de transducción involucradas en el destino celular, las proteínas cinasas asociadas a mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) ocupan un lugar central (Robinson y Cobb, 1997; Widman y col., 1999).

La vía de señalización por MAPK es uno de los sistemas más utilizados, por las células eucariotas, para transducir señales extracelulares a una respuesta intracelular. La cascada de MAPK típica está compuesta de por lo menos tres enzimas, las cuales son secuencialmente activadas por fosforilación: una MAPK cinasa cinasa (MAPKKK por sus siglas en inglés); una MAPK cinasa (MAPKK por sus siglas en inglés) y la MAPK propiamente dicha (Robinson y Cobb, 1997). Se conocen tres vías principales de MAPK que incluyen las cinasas reguladas por señal extracelular (ERK por sus siglas en inglés); las proteínas cinasas activadas por estrés (SAPK por sus siglas en inglés), las cuales se dividen en las cinasas c-Jun NH₂-terminal (JNK/SAPK por sus siglas en inglés), y la vía p38 (p38/SAPK por sus siglas en inglés) (Figura 4) (Paul y col., 1997; Kiriakis y Avruch, 1996).

Una característica común de todas las isoformas de MAPK es la fosforilación de residuos de treonina (Thr) y tirosina (Tyr) con especificidad dual. Todas las MAPK

presentan una secuencia de aminoácidos de Thr-X-Tyr en la cual el residuo X varía dependiendo de las diferentes isoformas. El aminoácido X es un ácido glutámico (Glu), una prolina (Pro) y una glicina (Gly) para la ERK, JNK y p38 MAPK, respectivamente. La secuencia de fosforilación, Thr-X-Tyr, se localiza en un asa de activación muy cerca del sitio de unión al sustrato y al ATP. La longitud de esta asa de activación varía entre las tres familias de MAPK (Gum y col., 1998). La fosforilación se realiza por la adición ordenada de un grupo fosfato a la Tyr y luego a Thr (Hale y col., 1999). Una vez activadas las MAPK pueden fosforilar y activar otras MAPK o proteínas, como pueden ser factores de transcripción en el citoplasma o núcleo de la célula (LoGrasso y col., 1997). Esto puede conducir a un incremento o disminución en la expresión de ciertos genes blanco, que inducen a su vez una respuesta biológica. La variación en la especificidad dentro de una vía sugiere que diferentes señales extracelulares pueden producir estímulos y respuestas específicas por activación de una o más vías de MAPK (Zu y col., 1998).

Para el estudio de MAPK se ha utilizado el factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés), para determinar la vía de señalización que se activa tras la unión del NGF a un sitio de alta afinidad en el receptor a *tirosina cinasa A* (TrkA por sus siglas en inglés) y a uno de baja afinidad en el receptor *p75*. Se ha demostrado que el NGF ejerce un efecto positivo sobre la activación de la vía ERK; y que por el contrario inhibe la señalización de la p38/SAPK y JNK/SAPK, las cuales se activan bajo condiciones de insuficiencia de factores de crecimiento (Xia y col., 1995; Gunn-Moore, 1998).

Generalmente, la activación de las formas ERK/MAPK induce respuestas de sobrevivencia celular, mientras que la activación de SAPKs (JNK y p38) promueven la muerte neuronal (Harper y LoGrasso, 2001).

2.4.2 CINASAS REGULADAS POR SEÑAL EXTRACELULAR- ERK.

La regulación de la proliferación celular es la función mejor estudiada de la vía ERK1/2, estas enzimas se activan en respuesta a factores de crecimiento y promotores de tumores (Ahn y Krebs, 1990; Miyasaka y col., 1990; Nicole y col., 2001) y se relacionan con el control del ciclo celular (Gotoh y col., 1991; Posada y Cooper, 1992). La participación de la vía ERK/MAPK en el proceso de protección de la muerte neuronal se

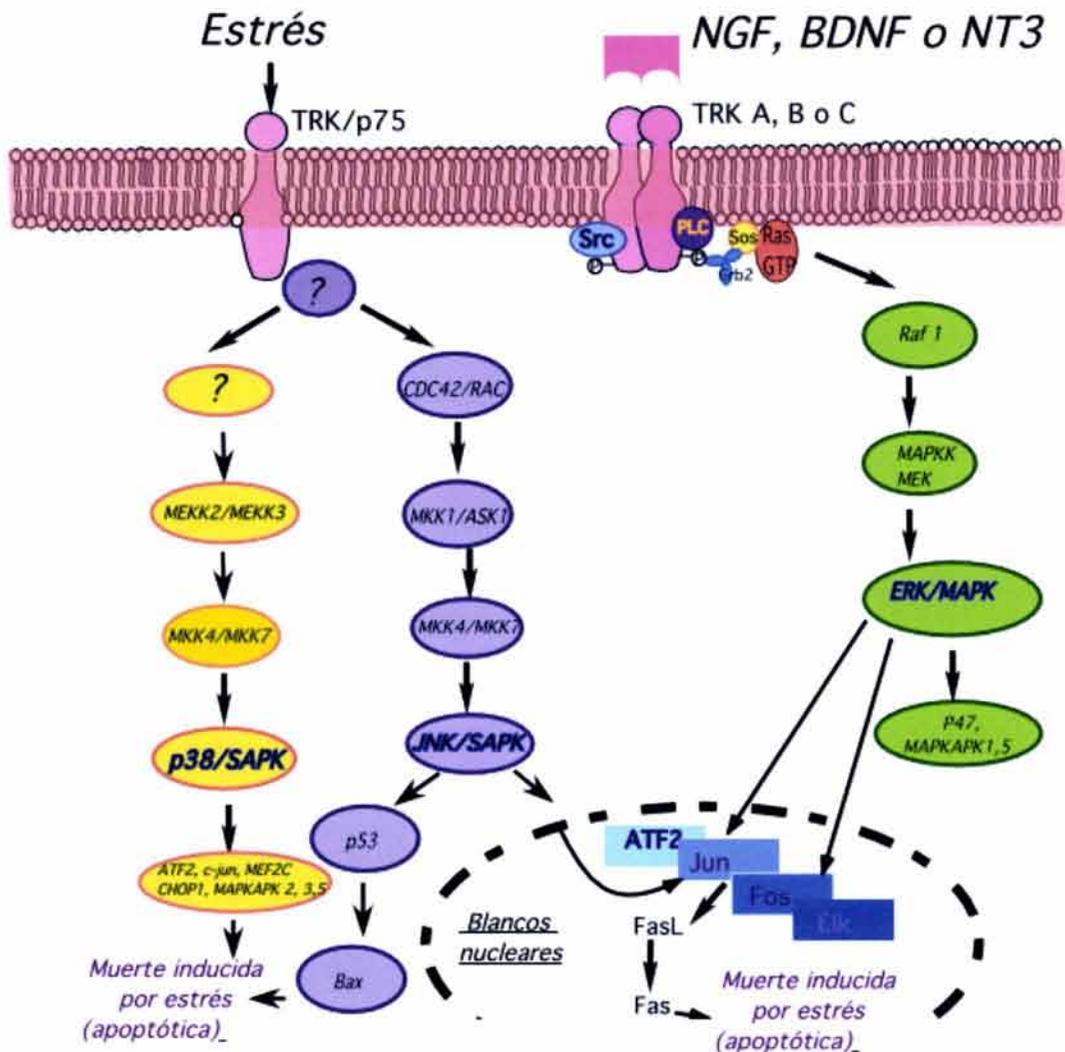


Figura 4. Diagrama esquemático de vías activadas por neurotrofinas y estrés. La vía activada por neurotrofinas es la ERK, la activación de esta vía conduce a la sobrevivencia y a respuestas de crecimiento neurítico. Las vías de estrés induce la activación de las vías JNK/SAPK y/o p38/SAPK, a través de la activación de los receptores Trk o p75, en otros eventos; lo cual puede conducir a la muerte neuronal. Tomada de Cellular Signalling, 2001 (13):299-310.

postula a través de la activación de proteínas antiapoptóticas (Harper y LoGrasso 2001).

La cascada ERK sigue los tres niveles típicos del proceso de activación secuencial de las MAPK. Una vez activada Raf-1 (MAPKKK), ésta fosforila MEK1/2 (MAPKK), la cual subsecuentemente activa ERK1/2 (MAPK), por fosforilación dual (Crews y Erikson, 1998; Alessandrini y col., 1992). La familia Raf es una cinasa Ser/Thr altamente conservada que se activa a través de su interacción con Ras (Daum y col., 1994; Blumer y Jonson, 1994). Ras es una proteína G que se activa a través de su interacción con el complejo proteico denominado Grb2-Sos. En donde, Sos cataliza la dislocación de guanosina-difosfato (GDP) con la consecuente formación del complejo Ras-guanosina-trifosfato (GTP) (Kolch, 2000). Sólo la forma Ras-GTP puede unirse a Raf y activarla. Los sustratos de ERK son numerosos incluyendo MNK-1, Elk-1, SAP-1 (Harper y LoGrasso, 2001).

2.4.3 CINASAS REGULADAS POR ESTRÉS (SAPK)

2.4.3.1 *Cinasas c-Jun N-terminal-JNK*

La JNK fue identificada originalmente como una proteína cinasa activada por estrés (Derijard y col., 1994; Kyriakis y Avruch., 1996), ya que se activa en respuesta a varios estímulos de estrés, como el factor de necrosis tumoral (TNF), estrés osmótico y radiación ultravioleta (Davis, 2000). Las JNKs modulan la actividad transcripcional de c-Jun (factor de transcripción) por fosforilación de residuos de serina, dentro del dominio N-terminal, induciendo la activación del complejo de RNA polimerasa con la consecuente transcripción de genes efectores (Kallunki y col., 1994). Las proteínas cinasas JNK/SAPK son codificadas por tres genes JNK1, JNK2 y JNK3 (Ip y Davis, 1998; Mielke y col., 1999a). Las formas JNK1 y JNK2 se expresan ampliamente en diversas regiones, incluyendo cerebro; mientras que la JNK3, parece expresarse sólo en cerebro, corazón y testículos (Davis, 2000). Las cinasas que activan la JNK son dos MAPKK's: MKK4 (SEC1) y MKK7 (Davis, 2000; Ganiatsas y col., 1998), y éstas a su vez se activa por varias MAPKKK's, dependiendo del tipo de célula, tejido y de las condiciones experimentales. Se ha reportado que la estimulación de la JNK/SAPK induce diferentes efectos, apoptóticos (Yang y col., 1997), antiapoptóticos (Nishima y col., 1997), sobre la inducción de la proliferación celular (Mitsui y col., 1997), y diferenciación celular (Yao y

col., 1997). También se ha demostrado la regulación extracelular de la JNK/SAPK en las células neuronales que depende del tipo celular y del estímulo (Harper y LoGrasso, 2001). Además, las líneas celulares PC12, Neuro2A y SHSY5Y muestran grados variantes de activación en respuesta a diferentes estímulos: por ejemplo la línea celular SHSY5Y exhibe una mayor activación de JNK1 que las líneas PC12 o Neuro2A en respuesta a H₂O₂ (Mielke y col., 2000). La JNK sólo se encuentra ligeramente activada en células Neuro2A por anisomicina, pero no por ceramida, ni radiación UV, o shock por calor (Kumagae y col., 1999). Uno de los estudios iniciales que implican a la vía JNK/SAPK en la apoptosis neuronal fue el de Xia y col., (1995), en donde demuestra la activación de esta vía en condiciones de ausencia de NFG (Xia y col., 1995).

Estudios con ratones “*nulos*”, dan información importante sobre el funcionamiento de las isoformas de JNK/SAPK. La delección de cada isoforma individual de la JNK/SAPK del genoma no produce ningún efecto perjudicial, ya que los animales se muestran aparentemente normales y no hay diferencias mayores entre los animales tipo silvestre y los nulos (Yang y col., 1997). Sin embargo, cuando el ratón nulo para JNK3 se trata con ácido kaínico muestra una menor actividad de crisis y se observa una reducción en la muerte por apoptosis de neuronas hipocámpales (Yang y col., 1997). Además, los ratones que carecen de JNK1 y JNK2, pero no otras combinaciones de JNKs, mueren durante el desarrollo embrionario, además de mostrar severas anomalías en el cerebro inducidas por la inhibición de la apoptosis fisiológica, que es indispensable para el cierre del tubo neural (Kuan y col., 1999). Inversamente, en el cerebro anterior de estos animales se incrementó 10 veces el número de células positivas a TUNEL, que detecta fragmentación de ADN en las células con proceso apoptótico, en comparación con el tipo silvestre. Estos resultados sugieren que JNK1 y JNK2 regula la apoptosis durante el desarrollo de forma específica por región, mientras que la JNK3 puede regular la respuesta neuronal al estrés (Kuan y col., 1999).

2.4.3.2 *Cinasas reguladas por estrés, p38/SAPK.*

Se han identificado cuatro diferentes cinasas de p38, codificadas por diferentes genes, la p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ (Mielke y Herdegen 2000). Los activadores directos de la p38/SAPK son: MKK6, MKK4, MKK3 y MKK3-b, los cuales fosforilan p38 sobre

un residuo de Thr y Tyr, en el asa de activación (Raingeaud y col., 1995, Han y col., 1997a; Raingeaud y col., 1996; Derijard y col., 1995). Además, se ha demostrado que ni MKK6 (Han y col., 1996) ni MKK3 (Han y col., 1997b) se expresan en cerebro, este hecho conduce a que solo MKK4 se expresa en esta región, como el único activador de la p38/SAPK.

Se ha identificado un gran número de sustratos de p38/SAPK, en donde se incluyen factores de transcripción como el factor activador de la transcripción 2 (ATF2 por sus siglas en inglés), ATF1 (Raingeaud y col., 1995, LoGrasso y col., 1997), proteína estable fosforilada a pH ácido y al calor, regulada por insulina (PHAS-I por sus siglas en inglés) (Haystead y col., 1994), proteína homóloga a C/EBP (CHOP-I por sus siglas en inglés) (Wang y Ron, 1996), p53, y las cinasas, como MAPKAP2, MAPKAP3 (McLaughlin y col., 1996), MAPKAP5 (Ni y col., 1998) y proteína cinasa-1 asociada a microtúbulos (Mnk1 por sus siglas en inglés) (Han y col., 1997B; Waskiewicz y col., 1997). La vía p38 puede contribuir a la activación del factor AP-1, a través de la inducción de la fosforilación de *c-jun* y *c-fos* vía la activación de ATF2 y elk-1 respectivamente (Hazzalin y col., 1996).

Se ha propuesto que algunas de las diferencias funcionales para las isoformas de p38/SAPK dependen de la especificidad a su sustrato (Li y col., 1996; Jiang y col., 1997; Wang y col., 1997).

Las evidencias sobre la participación de la vía p38/SAPK en la muerte neuronal surgen de experimentos en la línea celular PC12 (Seeger y Krebs, 1995), y del estudio de inhibidores específicos como son: el SB203580 y SB202190 (Liverton y col., 1999). En respuesta a una variedad de estímulos de estrés celular la p38/SAPK se encuentra fosforilada, lo que resulta en la modulación de la expresión de diferentes genes (Wang y Ron, 1996; Livingstone y col., 1995; Hall y col., 2000).

La p38 α y la p38 β son las únicas isoformas expresadas en el cerebro (Jiang y col., 1996), así cualquier función para la p38/SAPK en el cerebro se le puede adjudicar a una de estas isoformas (Mielke y col., 1999b). Una de las primeras evidencias experimentales de la participación de la vía p38/SAPK en la muerte neuronal surge de un estudio en la línea celular PC12, en donde las células tratadas con NGF inducen la activación sostenida

de la vía ERK y la inhibición de JNK y p38 (Xia y col., 1995). Esto fue confirmado por Kummer y col., quienes reportaron la inducción de apoptosis y la activación de la vía p38/SAPK en ausencia de NGF, en esta misma línea celular; además muestran que el inhibidor de la vía p38 (PD169316) induce un efecto protector sobre la muerte neuronal, asociado con el incremento en la actividad de p38 (Kummer y col., 1997).

Evidencias en cultivos de neuronas granulares cerebelares indican que la activación de p38 es probablemente dependiente del estímulo. Por ejemplo, Kawasaki y col., 1997 reportaron que la p38 se activa, en estas neuronas, en respuesta a la estimulación con glutamato y que esta activación es dependiente de Ca^{++} y de la activación del R-NMDA. Por el contrario, en otro trabajo se reportó que ni la privación de suero, ni el tratamiento con glutamato inducen un incremento en la actividad de p38, en neuronas granulares cerebelares, aunque si se observó muerte neuronal (Gunn-More y Tavare, 1998). En estos estudios se ilustra el problema asociado con las condiciones variables de cultivo.

Son pocos los reportes del efecto *in vivo* de los inhibidores de la p38. En SNC Irving y col., reportaron un incremento en la expresión de p38 fosforilada, seguida de isquemia cerebral focal, en la rata (Irving y col., 2000). Junto a la activación de *c-Jun*, la isquemia global transitoria también estimula la cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por estrés tanto la JNK/SAPK como la p38/SAPK, en la region CA1 del hipocampo (Ozawa y col., 1999; Sugino y col., 2000), y de hecho la inhibición de p38/SAPK protege a las neuronas piramidales del hipocampo de la muerte celular por apoptosis, en un modelo de isquemia global transitoria (Sugino y col., 2000; Nishimura y col., 2003).

Ferrer y col., evalúan la expresión de p38 fosforilada por efecto de la administración intracerebral, en la corteza somatosensorial de ratas adultas, de ácido quinolínico lo que resulta en un incremento en la expresión de p38 activa que precede a la muerte neuronal (Ferrer y col., 2001). Finalmente, en el modelo de inducción de crisis y muerte celular con ácido kaínico, Mielke y col., reportaron una actividad basal alta de p38 en el hipocampo y corteza, por análisis de Western blot, además de una reducción importante de p38 fosforilada después del tratamiento con kaínico, evaluado aun 10 días

después del tratamiento (Mielke y col., 1999b).

Los resultados de los estudios *in vivo*, al igual que los análisis *in vitro*, sugieren que diferentes estímulos de estrés resultan en la activación de diferentes vías de señalización, como la JNK y la p38, lo que podría resultar en muerte celular. El avance en el conocimiento de la relación entre la vía JNK y el daño excitotóxico está limitado, ya que no existen inhibidores específicos, para los diferentes proteínas cinasas que conforman la vía JNK.

Por otra parte, la actividad basal alta de p38, en neuronas centrales, esta en contradicción con la hipótesis de que p38 responde a estímulos de estrés induciendo apoptosis; lo anterior indica que se requieren mas estudios para determinar el papel fisiológico de la p38 en el SN; así como en condiciones de daño neuronal, inducido en modelos experimentales *in vivo*.

Como se menciono antes, la aplicación de Glu a neuronas en cultivo o la isquemia global transitoria, inducen los siguientes eventos.

- Regulación a la baja de la subunidad GluR2.
- Aumento en la expresión de receptores permeables a Ca^{++} .
- Estimulación de las MAPK.
- Regulación de la expresión de diversos genes a través de la activación las MAPK

Claramente estos eventos anteceden a la muerte neuronal por apoptosis. Sin embargo, se desconoce si existe alguna correlación entre todos ellos o son epifenómenos de un proceso multifactorial que eventualmente conduce a la muerte neuronal. En este contexto es posible que bajo condiciones de excitotoxicidad, la activación de la vía de señalización p38/SAPK conduzca a cambios en la expresión de las subunidades a los R-Glu, modificando sus propiedades fisiológicas lo que resultaría en un incremento en el ingreso de Ca^{++} a las neuronas.

Por todo lo anterior en este trabajo se pretende evaluar la participación de la vía de señalización p38/SAPK, con el uso de inhibidores específicos en un modelo de excitotoxicidad inducida por la administración subcutánea (s.c.) neonatal de GMS, asegurando así la entrada del glutamto al SNC, con el propósito de establecer el papel de

las proteínas cinasas en el fenómeno de muerte neuronal y en la regulación de la expresión de las subunidades a los R-Glu en el hipocampo y corteza cerebral. Además se decidió evaluar la participación de NRSF sobre los niveles de expresión de GluR2, bajo el mismo modelo se inducción del daño neuronal.

III. HIPOTESIS

La sobreactivación de los receptores a glutamato induce muerte neuronal y cambios en la expresión de las subunidades que constituyen dichos receptores a través de la activación de p38/SAPK.

IV. OBJETIVOS GENERALES

- I) Estudiar el efecto de un inhibidor de la vía p38/SAPK en la muerte neuronal en el hipocampo y corteza cerebral de ratas bajo condiciones de excitotoxicidad, inducida por la administración neonatal de glutamato monosódico.

- II) Evaluar los cambios de expresión de las subunidades determinantes en la formación de canales iónicos de los receptores AMPA y NMDA valorando el papel de la vía p38/SAPK, en el hipocampo y corteza cerebral de ratas tratadas neonatalmente con glutamato monosódico.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto del inhibidor de la vía p38 (SB203580) mediante la cuantificación de neuronas con morfología normal, en un estudio histológico, en la región CA1 y CA3 del hipocampo y Fr1 de la corteza cerebral de ratas a los 8, 10, 12 y 14 días de edad postnatal.
- Evaluar la muerte celular apoptótica en la región CA1 y CA3 del hipocampo y Fr1 de la corteza cerebral de ratas tratadas con GMS y con el inhibidor de la vía p38/SAPK (SB203580), de 8, 10 y 14 días de EP.
- Determinar los posibles cambios en la expresión del RNAm de las subunidades NR1, GluR1 y GluR2, en el hipocampo y corteza cerebral de ratas tratadas neonatalmente con GMS y evaluar el efecto del inhibidor, SB203580, de la vía p38/SAPK. Evaluando además, la presencia de la proteína GluR2, en los animales control y tratados con GMS, a los 8 y 14 días de EP.

VI. METODOLOGIA

6.1 REACTIVOS UTILIZADOS

Los reactivos utilizados para el desarrollo del trabajo fueron los siguientes (No. de catálogo): glutamato monosódico (G-1626), fosfato de sodio monobásico (S-3139), fosfato de sodio dibásico (S-3264), cloruro de sodio (S-3014), cloroformo (C-2432), isopropanol (I-9516), dietil-pirocarbonato (D-5758), tris-base (T-6791), EDTA (E-5134), heparina sódica (H-4784), procaína (P-9879), paraformaldehído (P-6148), Tris-HCl (T-7149), tritón X-100 (X-100), citrato de sodio (S-4641), borohidrato de sodio (S-9125), azida de sodio (S-2002), poli-L-lisina (P 8920). Estos reactivos fueron adquiridos de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, E.U.A.).

Etanol absoluto (9014-02, BAKER), xilol (9049-02, BAKER), resina sintética (7987, HYCEL), albúmina sérica (A-2153), la mezcla de inhibidores de proteasas (1697-498-ROCHE)

Otros reactivos como: ácido bórico (15583-024), trizol (15596-026), transcriptasa reversa (28-025-013), desoxinucleótidos trifosfatados (10297-018), ditiotreitól (Y00147), iniciadores aleatorios (48190-011), RNAsin (10777-019), amortiguador para PCR (Y02028), cloruro de magnesio (Y02016), Taq polimerasa (18038-042), marcador de peso molecular de 100pb (15628-019), agarosa (9012-36-6), bromuro de etidio (15585-011), proteinasa K (25530-049) y las secuencias de los iniciadores fueron de ACCESOLAB, de la marca Invitrogen. El inhibidor de la p38/SAPK, el SB203580 (55-9395) se adquirió en Calbiochem.

El suero normal de caballo (S-1000), el anticuerpo anti-ratón hecho en caballo (BA-1000), anticuerpo de cabra anti-conejo IgG (BA-1000), el kit ABC estándar (PK-6100), el kit DAB (SK-4100) fueron de la marca VECTOR y el anticuerpo anti-GluR2 para rata hecho en ratón (AB-5804 CHEMICON) adquiridos en CTR SCIENTIFIC; anti-ATF2, phospho-specific (189275-Calbiochem).

El procedimiento de preparación de soluciones de los experimentos de histología y RT-PCR y se describen en el apéndice 1 y 2 respectivamente.

6. 2 MATERIAL BIOLÓGICO Y TRATAMIENTOS

Las ratas recién nacidas (cepa Wistar) se redujeron a 8 machos por caja y se criaron con la madre hasta la edad de sacrificio, se mantuvieron en condiciones de bioterio con ciclos luz-obscuridad 12x12 h, temperatura 25°C y humedad relativa del 40%, con libre acceso al agua y al alimento, hasta la edad de sacrificio que fue de 8, 10, 12 o 14 días EP. El esquema general de trabajo, así como la “n” experimental, se muestra en el diagrama de la figura 5.

Para evaluar tanto la muerte neuronal, así como los posibles cambios en la expresión molecular de los R-Glu, en el hipocampo y la corteza cerebral, en el modelo de excitotoxicidad, por GMS, se utilizaron los siguientes grupos de estudio:

- Grupo I* Animales intactos (grupo control).
- Grupo II* Animales tratados con una dosis diaria de NaCl equimolar a la concentración de sodio presente en el GMS (1.38 mg/g de p.c.), los días 1, 3, 5 y 7 de EP vía s.c. y sacrificados el día 8 de EP (grupo NaClecq).
- Grupo III* Animales tratados con GMS con una dosis diaria (4 mg/g de p.c.), por vía s.c. los días 1, 3, 5 y 7 de EP (grupo GMS)
- Grupo IV* Animales a los que se les administró SB203580 (inhibidor de p38/SAPK) con una dosis diaria de 30 μ M (0.42 μ g/g de p.c.), vía s.c., los días 1, 3, 5 y 7 de EP (grupo SB203580).
- Grupo V* Animales a los que se les administró una dosis diaria, vía s.c., de SB203580 los días 1, 3, 5 y 7 de EP, 30 min antes de la inyección de GMS (grupo SB+GMS). Las dosis probadas en diferentes grupos de animales fueron 10 μ M (0.14 μ g/g de p.c.); 20 μ M (0.28 μ g/g de p.c.); 30 μ M (0.42 μ g/g de p.c.); 40 μ M (0.56 μ g/g de p.c.).

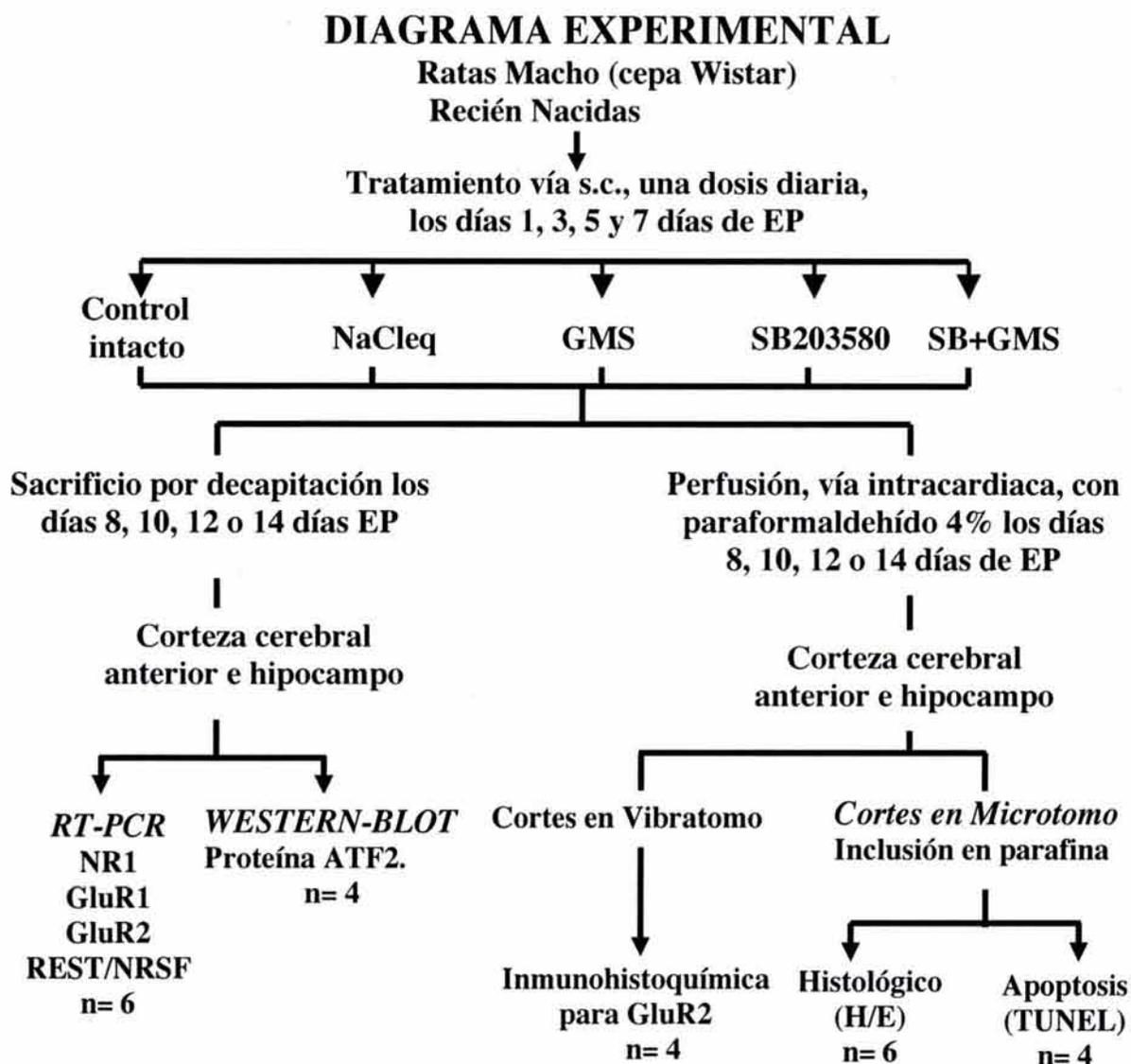


Figura 5. Diagrama general de trabajo en donde se muestran los diferentes grupos de estudio. La dosis de GMS utilizada fue de 4 mg/g de p.c.; y la de SB203580 fue la de 30 μ m (0.42 μ g/g de p.c.), excepto para el estudio de Western blot en donde se probaron diferentes dosis de inhibidor 10, 20, 30, 40 μ m (0.14, 0.28, 0.42, 0.56 μ g/g de p.c., respectivamente).

6.3 DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE LA VIA p38

6.3.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

Durante y después del tratamiento, los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio hasta el día de su sacrificio (8EP). El cerebro se obtuvo por decapitación en condiciones de asepsia y se procedió a diseccionar la región frontal de la corteza cerebral y el hipocampo. Los tejidos se mantuvieron a -80°C hasta el día del experimento.

6.3.2 DETERMINACION DE LA DOSIS DE SB203580

Para evaluar la actividad de la vía p38 se determinaron los niveles de ATF2 fosforilado (ATF^{PP}), por la técnica de Western blot. Los grupos utilizados para éste estudio fueron los siguientes: control, NaCleb, GMS y además se evaluaron, en base a referencias bibliográficas, diferentes dosis del inhibidor SB203580 [$10\ \mu\text{M}$ ($0.14\ \mu\text{g/g}$ de p.c.); $20\ \mu\text{M}$ ($0.28\ \mu\text{g/g}$ de p.c.); $30\ \mu\text{M}$ ($0.42\ \mu\text{g/g}$ de p.c.); $40\ \mu\text{M}$ ($0.56\ \mu\text{g/g}$ de p.c.)] administrado previamente al GMS.

6.3.3 TECNICA DE WESTERN BLOT

En el procedimiento de extracción de proteínas del hipocampo y corteza cerebral los tejidos se homogeneizaron en 1 ml de amortiguador de lisis [$920\ \mu\text{l}$ de regulador de lisis] [($10\ \text{mM}$ Tris-HCl, pH 7.5; $150\ \text{mM}$ NaCl; $20\ \text{mM}$ NaF; $0.5\ \text{mM}$ Na_3VO_4 (ortovanadato de sodio); $2\ \text{mM}$ NP_{40} + $80\ \mu\text{l}$ de una mezcla de inhibidores de proteasas; las muestras se incubaron por 30 min y se centrifugaron a $13,000\ \text{rpm}$ por 30 min, a 4°C . Se recuperó el sobrenadante el cual se mantuvo a -20°C (Kumar y col., 1999).

Se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y se tomaron $50\ \mu\text{g}$ de proteína por muestra para llevar a cabo la electroforesis.

Las alícuotas del homogeneizado se depositaron, en un gel al 10% de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida, para la electroforesis (SDS-PAGE), y se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche libre en grasas (10% Svelty) en Tris-amortiguador salino (TBS) por 24 h. Se adicionó el anticuerpo primario anti-ATF2 phospho-specific (ATF^{PP}), en una dilución 1:1000, se incubó durante 24 h en refrigeración, se lavó nuevamente 5 veces con TBS+Tween-20 0.05% (TTBS); luego se

incubó con el anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-conejo con una dilución de 1:1000 y se incubó durante 24 h. Se lavó 5 veces con TTBS y se le adicionó el complejo avidina-biotina (kit ABC estándar) por 1 h. Después de tres lavados con TTBS, la membrana se reveló con diaminobenzidina (DAB). El análisis se realizó tomando una fotografía digital de la membrana y utilizando un sistema de fotodocumentación, *Kodak Digital Science 1D Image Analysis*, se procedió al análisis de las bandas de expresión de la proteína ATF2 utilizando la herramienta de intensidad neta y área de la banda.

6.4 EVALUACION DEL DAÑO CELULAR

6.4.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

Después del tratamiento, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico inyectado por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 50 mg/kg de p.c., y se perfundieron con solución amortiguadora de fosfato de sodio (SSF) 0.1 M a pH 7.4, suplementada con heparina (1000 U/l) y procaína (1 g/l), por vía intracardiaca hasta la decoloración de los pulmones y el hígado. Posteriormente, se fijaron con una solución de paraformaldehído 4% en SSF 0.1M, hasta la rigidez total de la cola.

Inmediatamente después de la perfusión, se extrajo el cerebro y se mantuvo en solución fijadora durante una semana. Transcurrido este tiempo, los cerebros se sometieron a un proceso de deshidratación en un gradiente de alcohol (etanol) y xilol (Apéndice 1), posteriormente se hizo la inclusión del tejido cerebral en parafina.

6.4.2 ANALISIS HISTOLOGICO POR HEMATOXILINA-EOSINA (H/E)

Para el análisis de la población neuronal con alteraciones morfológicas, se evaluaron ratas tratadas con GMS y/o con el inhibidor de la vía p38/SAPK (SB203580) a los 8, 10, 12 o 14 días de EP (n= 6). Se utilizaron dos bloques de tejido en parafina, uno de los bloques comprendió la corteza cerebral frontal y el otro bloque incluyó el hipocampo completo. De estos bloques se hicieron cortes coronales de 8 μ m de espesor, con un microtomo de rotación (American Optical 820), que se colocaron en portaobjetos y se recubrieron con solución de Ruyter, se mantuvieron en una estufa a 60°C por una noche.

Finalmente, los cortes de tejido montados en portaobjetos se sometieron a la reacción de H/E, bajo el siguiente procedimiento: los tejidos se desparafinaron con xilol

por 30 min, enseguida se hidrataron con etanol a concentraciones decrecientes (100, 90, 80 y 70%), posteriormente se sumergieron en agua destilada por 3 min y acto seguido se procedió con el método de tinción, se sumergen en hematoxilina de Harris (5 min), agua corriente (hasta retirar el excedente de colorante), alcohol ácido (2-5 segundos), lavado con agua corriente, luego se colocaron en agua amoniacal (1-2 min), nuevamente se lavaron con agua corriente, se sumergieron en alcohol al 96% (2min), eosina (2 min) y finalmente tres alcoholes (etanol al 100%) por 2 min, cada uno (Apéndice 1).

6.4.3 DETERMINACION DE LA DOSIS DE SB203580

La severidad del daño neuronal en las regiones evaluadas se estimó por el conteo de neuronas con morfología normal del estrato de células piramidales de la región CA1 y CA3 del hipocampo y la región frontal 1 (Fr1) de la corteza cerebral de cada grupo de estudio. Las neuronas excluidas en el conteo fueron aquellas que presentaron algunos de los criterios de daño celular definidos por Farber y col., por microscopia de luz, como: cariorrexis (fragmentación del núcleo en trozos, con cromatina condensada), picnosis (retracción del núcleo con condensación de la cromatina), cariolisis (la disolución del núcleo por la acción de la desoxirribonucleasa); sí como pérdida de la afinidad del citoplasma por la hematoxilina (Farber y col., 1981; Farber, 1982).

El conteo celular se realizó con un microscopio LEICA DME y se tomaron fotografías, con una cámara digital DC120, de la corteza cerebral y de la región CA1 y CA3 del hipocampo, con el objetivo 100X.

Se realizó un estudio histológico para determinar la dosis óptima de un inhibidor de la vía p38/SAPK (SB203580), sobre la muerte neuronal inducida por GMS en el hipocampo de ratas. Se probaron tres dosis diferentes, elegidas en base a referencias bibliográficas, y se evaluó el efecto protector del inhibidor, las dosis evaluadas del inhibidor fueron: 10 μM (0.14 $\mu\text{g/g}$ de p.c.); 30 μM (0.42 $\mu\text{g/g}$ de p.c.); 40 μM (0.56 $\mu\text{g/g}$ de p.c.). Una vez determinada la dosis a utilizar que fue la de 0.42 $\mu\text{g/g}$ de p.c., se evaluaron tres diferentes tiempos de inyección que fueron 30 min antes y después del GMS y al mismo tiempo. De aquí se determinó que el SB203580 es más efectivo en su efecto protector del daño si se administra 30 min antes del GMS.

6.5 DETECCIÓN DE DAÑO CELULAR APOPTOTICO

La técnica de TUNEL se ha utilizado ampliamente como un marcador de la muerte celular apoptótica, que se utiliza para identificar fragmentación del DNA. Esta técnica indica una fase tardía de daño al ADN en el proceso de apoptosis (Cui y col., 2000), lo cual ocurre varias horas o aun días después del estímulo degenerativo (Namura y col., 1998; Zhu y col., 2000).

La detección de células apoptóticas se realizó utilizando la reacción de TUNEL mediante un kit comercial, "*Detección de Muerte Celular*" *In Situ* (POD) (Cat.1 684 817 ROCHE), que se basa en el marcaje de hebras de ADN cortadas; el fundamento de este procedimiento es la tinción inmunoespecífica de los fragmentos de ADN. La técnica consiste en inducir la unión de nucleótidos deoxigenina, catalíticamente adicionados al ADN, por medio de la deoxinucleotidil-transferasa (TdT) una enzima que cataliza la adición de nucleótidos trifosfatados al extremo 3'OH de cadenas del DNA.

El procedimiento se realizó de acuerdo al protocolo especificado en el producto. Los tejidos montados en los portaobjetos fueron obtenidos por el mismo procedimiento de H/E con la diferencia que los portaobjetos estaban recubiertos con una solución de polilisina (0.1%). El tejido se sometió a un proceso de desparafinado con xilol y de rehidratación con etanol a diferentes concentraciones (Apéndice 1). Posteriormente las secciones de tejido se incubaron con proteinasa K (10-20 µg/ml en Tris/HCl 10 mM a pH 7.5, durante 15-30 min a 21-37°C), se lavaron con SSF y se incubaron en peróxido de hidrógeno al 0.3% en metanol, durante 10 min a temperatura ambiente, para inactivar la peroxidasa. Después, se lavaron nuevamente y se incubaron en una solución permeabilizadora de Tritón X-100 al 0.1% en citrato de sodio durante 2 min, en hielo (4°C). Después de dos lavados se adicionó la mezcla de TUNEL (que contiene la enzima: TdT) y las placas se incubaron por una hora en una cámara húmeda a 37°C. Posteriormente se lavaron y se agregó el conjugado POD (peroxidasa de rábano) durante 30 min a 37°C. Los portaobjetos se lavaron con SSF y se les adicionó la DAB por 10 min, para revelar el marcaje, después de un último lavado se secaron para su visualización y análisis por microscopia de luz, para lo cual

se utilizó un microscopio marca Leica DME. Las secciones se analizaron con el objetivo 100X se cuantificó en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y Fr1 de la corteza de ambos hemisferios en 4 laminillas diferentes de cada animal.

6.6 NIVELES DE RNAm POR PCR

Una posible explicación de la susceptibilidad al daño neuronal por GMS, administrado etapa posnatal temprana, podría ser un incremento en la expresión de R-Glu permeables a Ca^{++} . Para probar esta idea en nuestro modelo, se evaluó la expresión del RNAm de las subunidades NR1; NR2A-D (solo a los 14 días de EP) y GluR1-GluR2 (R-AMPA).

6.6.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

Finalizado el tratamiento, de los diferentes grupos de animales en estudio, se sacrificaron por decapitación a los 8, 10, 12 o 14 días de EP, utilizando material de disección previamente esterilizado en condiciones asépticas, se extrae el encéfalo y se obtiene la corteza cerebral y el hipocampo. Los tejidos cerebrales se pesaron y se mantuvieron a $-70^{\circ}C$ hasta el día de la extracción de ácido ribonucleico total (RNA total).

6.6.2 EXTRACCION DE RNAtotal POR EL METODO DE ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA

Para la extracción del RNA total se utilizó el método de isotiocianato de guanidina (trizol) (Chomczynski y Sacchi 1987), el tejido cerebral obtenido (corteza cerebral e hipocampo) se homogeneizó con 500 μ l de trizol por cada 50 mg de tejido. Se incubó de 5-8 min a $4^{\circ}C$, a la muestra se le adicionó cloroformo frío y se centrifugó a 12,000 rpm durante 19 min, a $4^{\circ}C$. Se separaron las dos fases (fenol-cloroformo/acuosa); a la fase acuosa se le adicionó un volumen igual de isopropanol frío ($4^{\circ}C$), se dejó reposar por 24 h a $4^{\circ}C$. Posteriormente, las muestras se centrifugaron bajo las condiciones anteriores durante 19 min. El RNA precipitado se lavó con etanol al 75% varias veces, y al final se resuspendió con 30-50 μ l de agua (dependiendo del tamaño de la pastilla) tratada previamente con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%.

La cantidad y calidad del RNA total se evaluó a través de la absorbancia de la muestra con la relación 260/280nm, lo que permitió calcular la concentración de RNA en la muestra. Preparaciones puras de RNA presentan valores de 1.7 a 2.0.

6.6.3 FORMACION DE DNAC UTILIZANDO TRANSCRIPTASA REVERSA

Para la formación del DNA complementario (DNAC), se utilizó la transcriptasa reversa (RT) del virus de leucemia murina de Moloney. Se tomaron 2 µg de RNA de cada muestra y se le adicionó agua estéril para llevarlo a un volumen total de 6 µl. Las muestras se desnaturalizan a 70°C durante 10 min. Posteriormente, se adicionó un volumen total de 14 µl de la mezcla de transcriptasa reversa, la cual consiste en lo siguiente:

Amortiguador para RT 5X a pH 8.3 (50 mM), dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados, 2.5 mM); ditiotreitól (10 mM), iniciadores aleatorios (*Random primers*) 1 mg/µl; e inhibidor de RNAasa (1 U/µl). La mezcla se incubó con la transcriptasa reversa (200 U/µl) a 37°C durante 1 h; y una etapa final a 95°C por 10 min, se adicionaron 5 µl de agua estéril.

El DNAC, se mantuvo a -20°C, y se utilizó para llevar a cabo la reacción de PCR, para los diferentes genes a evaluar.

6.6.4 NIVELES DE RNAm-REACCION EN CADENA DE POLIMERASA

Para la reacción en cadena de polimerasa (PCR), se utilizó una mezcla de reacción con la siguiente composición:

1 µl de DNAC; 2 µl dNTPs (10 mM); 5 µl MgCl₂ (50 mM); 5 µl amortiguador para PCR a partir de tris-HCl (50 mM), a pH 8.0; 26 µl agua estéril inyectable; 5 µl de cada iniciador, sentido y antisentido 3 mM (consultar tabla 2) y 1 µl de Taq DNA polimerasa (1 U/µl).

A la mezcla de reacción de amplificación se les adicionó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. Las condiciones del termociclador utilizado (Minicycler MJ Research) consistieron en una etapa a 95°C por 1 min; luego 60°C por 1 min y 72°C por 1.5 min con una etapa final de extensión a 72°C por 5 min.

Los productos amplificados de la PCR, se corrieron en una cámara horizontal de electroforesis (GIBCO BRL Horizon 58), junto con un marcador de peso molecular de

100 pares de bases (pb). El gel de agarosa al 1.5% que contenía bromuro de etidio, se corrió durante 45 min a 70 V en amortiguador TBE 1X. El gel se observó con un transiluminador de luz ultravioleta (VILBER-LOURMAT) y se tomaron fotografías con una cámara digital, las cuales se analizaron con un sistema de fotodocumentación, *Kodak Digital Science 1D Image Analysis*, para realizar la evaluación correspondiente. Los valores para las subunidades se calcularon y normalizaron contra el área representada por la expresión del gen constitutivo para la β -actina. Los resultados se expresan en unidades relativas de intensidad de la banda.

La secuencia de los “iniciadores” para las distintas subunidades a cuantificar se tomaron del trabajo de Gonoï y col., (1994). Dichas secuencias se muestran en la tabla 2, estos oligonucleótidos fueron sintetizados por GIBCO.

6.7 INMUNOHISTOQUIMICA PARA GluR2

Con el propósito de evaluar si los cambios en el nivel de expresión del RNAm, observados en este trabajo, corresponden con los cambios en el nivel de proteína para la subunidad GluR2 se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico, utilizando un anticuerpo específico, en cortes de hipocampo a los 8 y 14 días de EP.

Los animales se fijaron por perfusión vía intracardiaca, con una solución de paraformaldehído al 4%, como se describió anteriormente para los tejidos obtenidos para H/E. Después de una semana de posfijación los tejidos se montaron en un vibratomo (LEICA-VT1000S) y se realizaron cortes seriados de 40 μ m, los cuales se lavaron en SSF. Se procedió a disminuir el fondo de la reacción con una solución de borohidrato de sodio al 0.1% por 10 min. Los tejidos se lavaron con SSF 1X hasta eliminar las burbujas formadas, posteriormente se adicionó una solución de tritón X-100 al 0.5% en SSF 1X-azida de sodio al 0.1%, por 1 h en agitación. Nuevamente se lavaron con SSF 1X-azida de sodio y se inactivó la peroxidasa con peróxido de hidrógeno al 0.3% en SSF 1X-azida de sodio durante 5 min, esta vez se lavaron con SSF-Tritón X-100 0.1%-azida de sodio. Se incubaron con suero normal de caballo, en una dilución de 1:100 por 30 min en agitación, posteriormente se retiró el suero y se agregó el anticuerpo anti-GluR2 para rata hecho en ratón, en una dilución de 1:1000 en SSF-BSA-azida de sodio por 48 h en agitación.

Tabla 2. Secuencias utilizadas para la síntesis de los iniciadores (primers) para evaluar los niveles de expresión del RNAm de las diferentes subunidades a R-Glu, del factor de transcripción NRSF y para la expresión del gen constitutivo utilizado en este estudio (β -Actina) .

SUBUNIDAD	SECUENCIA	
GluR1	Sentido	GCTTCATGGACATTGACTTA
	Antisentido	ATCTCAAGTCGGTAGGAGTA
GluR2	Sentido	ATTGTAGACTACGATGATTC
	Antisentido	AATAGTGAGCTTGTACTTGA
NR1	Sentido	TACTGCGCAACTGGCAGCTTTT
	Antisentido	GTTTAGCGTCCCCAGAAGTAC
NR2A	Sentido	GACTACAGCCTGGAGGCAAG
	Antisentido	GTCTTGACACTTCAAGTGGA
NR2B	Sentido	GGATCTACCAGTCTAACATG
	Antisentido	GTCACCCTAGTGATTGATAG
NR2C	Sentido.	ACATGAAGTATCCGTATGG
	Antisentido	GTTCTGGTTGTAGCTGACAG
NR2D	Sentido.	AGGTGTTCTATCAGCGTG
	Antisentido.	TGTAGCTGTGCATGTTTCAG
NRSF	Sentido.	GACCCGACACGCAAGACAGGTTTACA
	Antisentido.	TTCCCTCCGCTGCTTTAGTCTCCAC
β-Actina	Sentido	CACCACAGCTGAGAGGGAAATCGTGCGTGA
	Antisentido	ATTTGCGGTGCACGATGGAGGGGCCGACT

Se retiró el anticuerpo primario y se enjuagaron con SSF-Tritón X-100 0.1%-azida de sodio, se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón hecho en caballo, en dilución 1:1000, que se preparó en una solución similar a la del anticuerpo primario y se incubó durante 24 h, en agitación. Después de la incubación se lavaron perfectamente con la solución de SSF-Tritón X-100 0.1%-azida de sodio y se transfirieron los tejidos a una solución del complejo Avidina-Biotina, que se preparó 30 min antes, se incubó durante 2 h con agitación, esta solución se retiró y los tejidos se lavaron con SSF IX y se revelaron con un kit de DAB.

Los tejidos se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina al 0.1% y se mantuvieron en cámara húmeda, hasta que el tejido se adhirió al portaobjetos, después se deshidratan con diferentes concentraciones de etanol y se procedió al montaje del cubreobjetos con resina.

Se analizaron los cortes en un microscopio LEICA DME y se tomaron fotografías, con una cámara digital DC120, de la corteza cerebral, de la región CA1 y CA3 del hipocampo con el objetivo 100X.

6.8 ESTADISTICA

La “n” experimental fue de 4 a 6 (ver figura 5), con experimentos por duplicado para los estudios de biología molecular (RT-PCR y Western Blot) en todos los grupos de trabajo. Los datos histológicos fueron analizados por dos personas con desconocimiento del tipo de muestra a analizar. Todos los datos se compararon entre los diferentes grupos de estudio. Se realizó la prueba de ANOVA de una vía y la prueba HSD-Tukey para comparaciones entre grupos. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa. Los resultados se expresan como la $\bar{x} \pm eem$.

VII. RESULTADOS

7.1 HIPOCAMPO

7.1.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA VIA P38

Los resultados de la expresión de la proteína ATF2 bi-fosforilada (ATF2^{PP}) dan evidencia del grado de activación de la p38/SAPK en el modelo de excitotoxicidad por GMS. En el hipocampo de ratas control de 8 días de EP se encontraron niveles bajos de la proteína ATF2^{PP}, al igual que en el grupo que se le administró la solución de NaCleq. Sin embargo, en los animales con GMS se observó un incremento significativo de un 220% en la expresión de esta proteína (Figura 6). Cuando se administró el SB203580, antes del GMS, se observó una disminución en los niveles de proteína ATF^{PP}, que fue dependiente de la dosis de inhibidor que se utilizó. Por ejemplo a las dosis de 30 y 40 μ M de inhibidor la reducción en los niveles de ATF2^{PP} fue de 72 y 83% respectivamente, en comparación con el grupo tratado con GMS; a la dosis de 30 μ M de SB203580 no se observó diferencia significativa con respecto al control (Figura 6). Con base en estos resultados en los siguientes experimentos se utilizó esta dosis (30 μ M) de inhibidor. El grupo de NaCleq no se incluyó en el resto de los experimentos.

7.1.2 ANALISIS HISTOLOGICO DE LOS CORTES TEÑIDOS CON HEMATOXILINA Y EOSINA

7.1.2.1 *Análisis morfológico del daño celular*

Los experimentos se diseñaron con el objetivo de caracterizar el efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre el número de neuronas, con características morfológicas normales como un contorno regular, citoplasma homogéneo y núcleo definido, siguiendo un análisis histológico por la técnica de tinción de H/E.

En el análisis de las laminillas del grupo control no se observaron características morfológicas anormales en los elementos celulares del hipocampo, a las edades estudiadas, mientras que en la región CA1 y la CA3 del hipocampo de los animales tratados con GMS, se observaron alteraciones histológicas severas caracterizadas por encogimiento celular, cavitación, ondulamiento de la membrana y pérdida de la afinidad por la hematoxilina (Figura 7 y 8). Otras células presentan

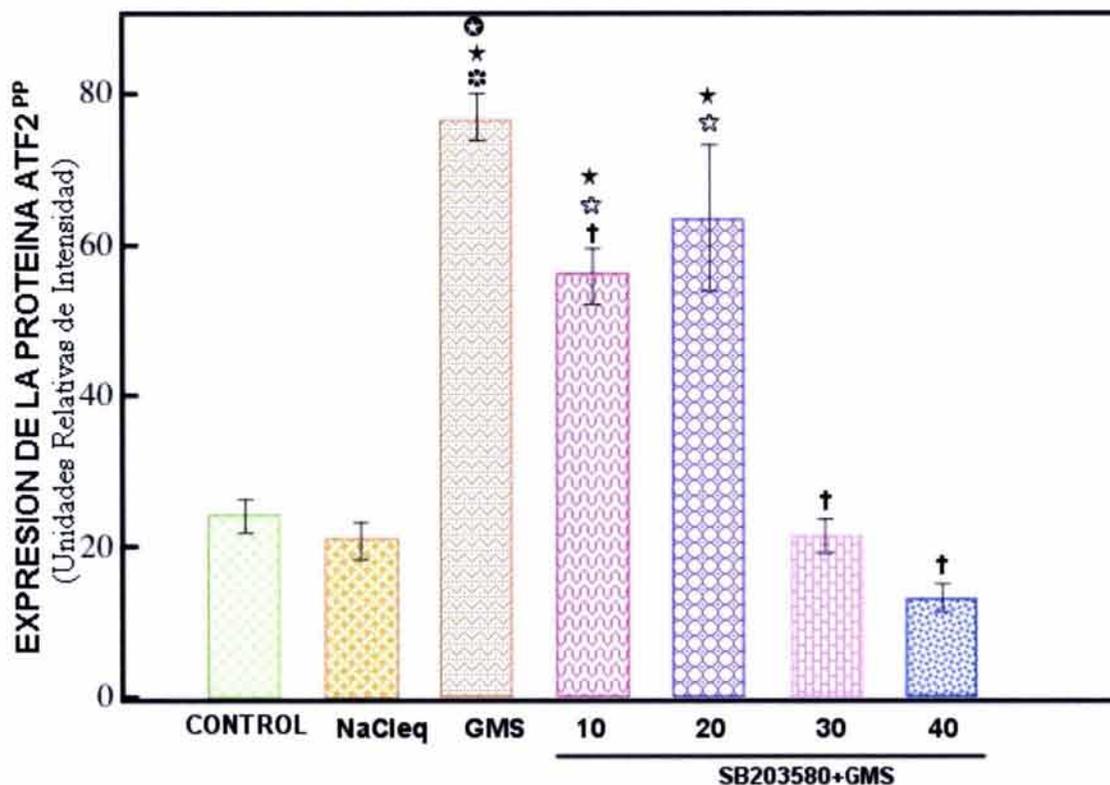


Figura 6. Expresión de la proteína ATF2^{PP}, por Western blot en el hipocampo de ratas tratadas neonatalmente con GMS (4 mg/g de p.c.), con NaCleb y con diferentes dosis de SB203580 (10, 20, 30 o 40 μ M). Los valores representan $\bar{x} \pm eem$, de la intensidad relativa de la banda, de cuatro experimentos por duplicado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en la siguiente forma: * $P < 0.0001$ GMS vs Control; ★ $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. ⊛ $p < 0.001$ GMS vs NaCleb; ☆ $p < 0.001$ SB+GMS vs NaCleb. † $p < 0.01$ SB+GMS vs GMS.

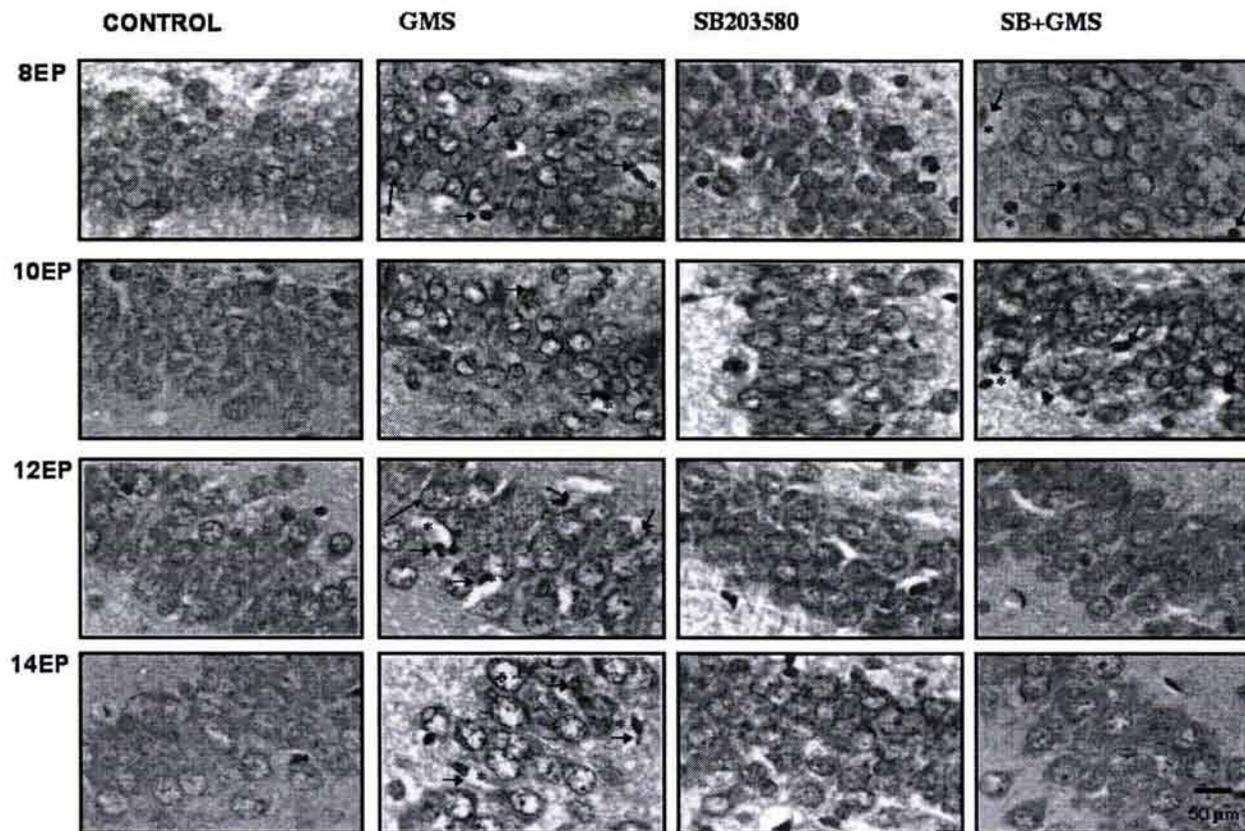


Figura 7. Fotomicrografías representativas de la región CA1 del hipocampo, de los diferentes grupos de animales tratados neonatalmente con GMS, SB203589 (30 μ M) ó SB+GMS. Secciones coronales a nivel del hipocampo con tinción de H/E. En el grupo de GMS se observan muy pocas neuronas normales (flecha larga), abundantes neuronas muertas (flechas cortas), neuronas encogidas (cabeza de flecha), y proceso de cavitación (asterisco).

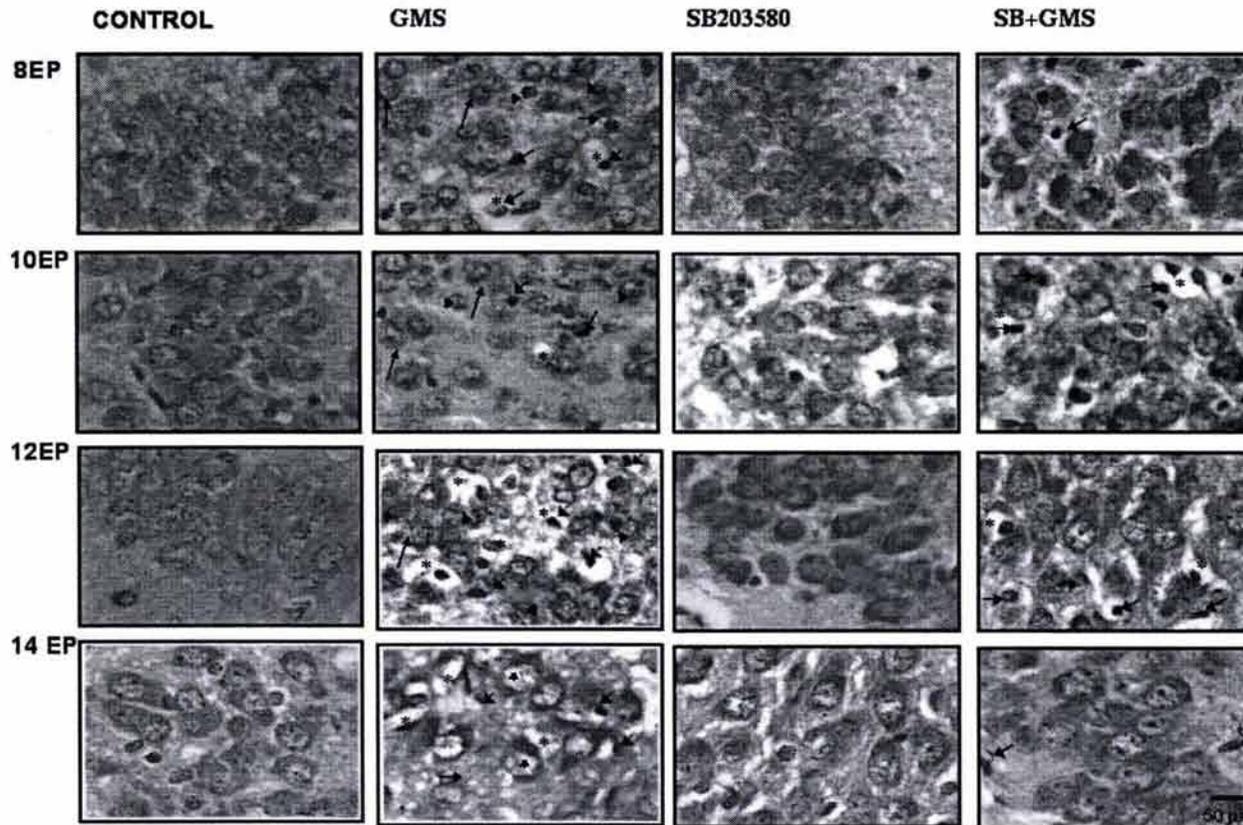


Figura 9. Fotomicrografías representativas de la región CA3 del hipocampo, de los diferentes grupos de animales tratados neonatalmente con GMS, SB203589 (30 μ M) ó SB+GMS. Secciones coronales a nivel del hipocampo con tinción de H/E. Las neuronas normales (flecha larga) se encuentran muy pocas en el grupo de GMS; neuronas muertas (flechas cortas) abundantes en el grupo de GMS; neuronas encogidas (cabeza de flecha); proceso de cavitación (asterisco).

parcial o total de tinción de la sustancia de Nissl, hinchamiento celular y grados variantes de acidofilia del pericarion. (Figuras 8 y 9).

7.1.2.2 *Análisis cuantitativo del daño celular*

Para el análisis cuantitativo del daño neuronal sólo se consideraron las neuronas vistas como normales, en comparación con aquellas que muestran alteraciones morfológicas. Así se evaluó el número de neuronas con morfología normal a las edades de 8, 10, 12 y 14 días de EP.

Los resultados muestran que el tratamiento con GMS indujo una disminución en la población neuronal a partir del día 8 de EP y este efecto fue más significativo a los días 10, 12 y 14 EP en la región CA1; esto mismo se observó en CA3 en donde el número de células fue significativamente menor en el grupo de GMS, desde los 8 hasta los 14 días de EP con respecto al del grupo control (Figuras 9 y 10). Así, el conteo de neuronas a los 10EP de la región CA1 fue de 223 ± 3.27 y 156 ± 4.67 ($\bar{x} \pm eem$) en ratas control y con GMS respectivamente, lo que significa una disminución del ~30%. En contraste, el efecto fue de solo el 13% en la región CA3, para esta misma edad. El principal efecto del GMS se observó a los 14 días de EP, en la región CA1, en donde se encontró una disminución de más del 70% en el número de células con morfología normal (Figura 9).

Por otro lado, se evaluó el efecto del inhibidor de la vía p38 (SB203580) sobre el número de neuronas con características morfológicas normales, cuando solo fue administrado el inhibidor no se produce daño celular en el hipocampo, cuando se administra el GMS previo al SB203580, este protege a las neuronas de la región CA1 del hipocampo de daño celular en todas las edades estudiadas en este trabajo. En la región CA3 el efecto protector del SB203580 se observó sólo en los animales de 10 días de EP (Figuras 9 y 10).

En las figuras 9 y 10, al comparar el número de células con morfología normal en los grupos control se observa una disminución desde los 8 hasta los 14 días de EP. La administración de SB203580 no protege de la muerte neuronal normal que se observó en los grupos control de las diferentes edades.

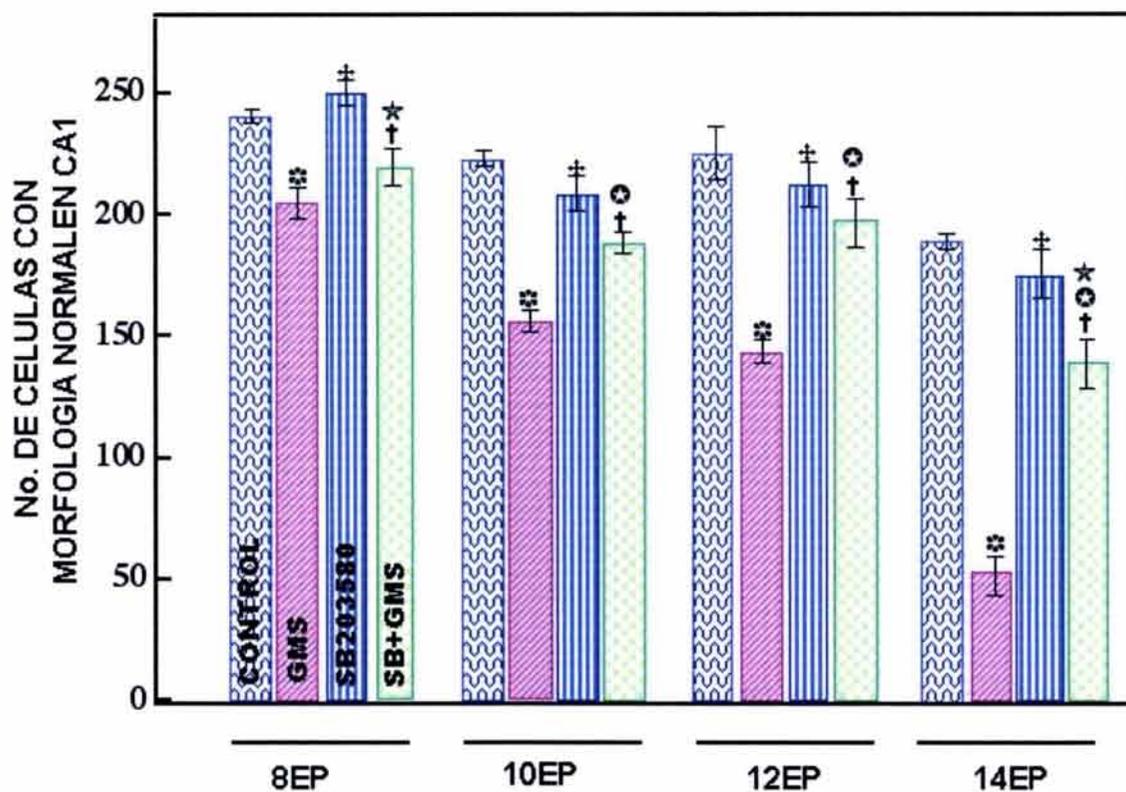


Figura 9. Efecto del tratamiento con GMS y SB203580 sobre el número de neuronas en la región CA1 del hipocampo. Se grafica el número de neuronas con características normales ($\bar{x} \pm eem$) de 6 experimentos, con respecto a la edad. Las significancias estadísticas fueron: * $p < 0.001$ GMS vs Control; ★ $p < 0.001$ SB203580 vs Control; † $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. ‡ $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; ⊕ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

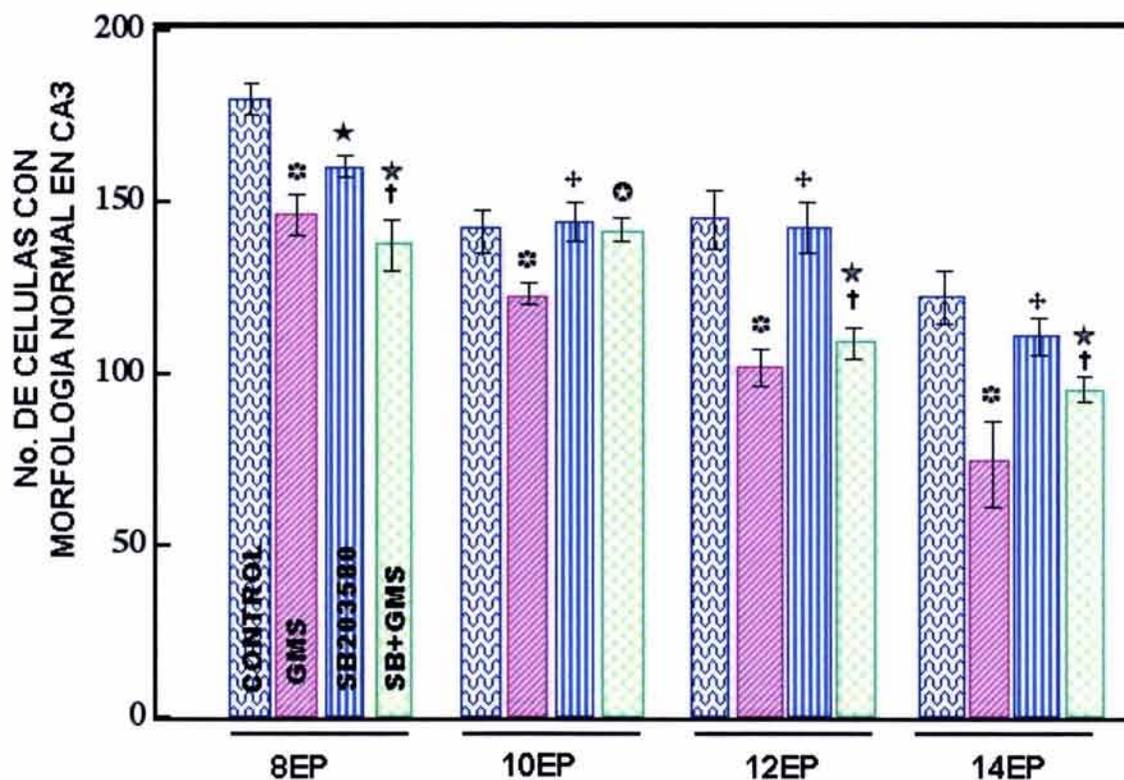


Figura 10. Efecto del tratamiento neonatal con GMS y SB203580 en el número de neuronas en la región CA3 del hipocampo, a los 8, 10, 12 y 14 días de EP. Los datos muestran la $\bar{x} \pm eem$ de 6 experimentos. * $p < 0.001$ GMS vs Control; † $p < 0.001$ SB203580 vs Control; ‡ $p < 0.001$ SB+ GMS vs Control. § $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; ¶ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

7.1.3 DETECCIÓN DEL DAÑO CELULAR APOPTOTICO

Las células que se incluyeron en el conteo, como positivas a TUNEL, se observaron al microscopio con puntos oscuros y con núcleo fragmentado. Además se observaron puntos oscuros sin citoplasma identificable, según Brecht y col., (2201) son ácidos nucleicos y/o restos de cromatina de células muertas, estas estructuras no se incluyeron en el conteo (Brecht y col., 2201).

En el análisis de los campos microscópicos se llevó a cabo el conteo de núcleos apoptóticos, positivos a la técnica de TUNEL, en la región CA1 y CA3 del hipocampo del grupo control, los resultados mostraron la presencia de neuronas positivas a TUNEL lo cual sugiere que durante el desarrollo del cerebro la muerte neuronal retardada, de tipo apoptótica, está presente. Además no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control, y el grupo tratado con el SB203580 en las edades evaluadas (Figura 11 -14).

En la región CA1 se observó, bajo el efecto de la aplicación de GMS, un mayor número de células positivas TUNEL que en el grupo control en las tres edades evaluadas (8, 10 y 12 días de EP), siendo hasta 5 veces mayor al del control a los 14 días de EP, este número sumado al número de células normales difiere del total de células evaluadas por la técnica H/E. No se observaron núcleos positivos a TUNEL en el grupo al que se le administró SB203580 previo al GMS, siendo el valor menor al del grupo control, con excepción de los 14 días de EP en donde el inhibidor de la vía p38 no protege totalmente de la muerte neuronal apoptótica observada en el grupo de GMS (Figuras 11 y 12).

En la región CA3 del hipocampo, con la técnica de TUNEL, se hizo evidente la muerte neuronal apoptótica en el grupo control y de SB203580, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos en las edades evaluadas (Figuras 13 y 14). Sin embargo, en el grupo de GMS se observó un ligero incremento en la inmunoreactividad a TUNEL a los 8, 10 y 14 días de EP, con respecto al control (Figura 14). Por otra parte, en esta región el efecto protector del SB203580 administrado previo al GMS a los 8 días de EP, no fue evidente ya que se

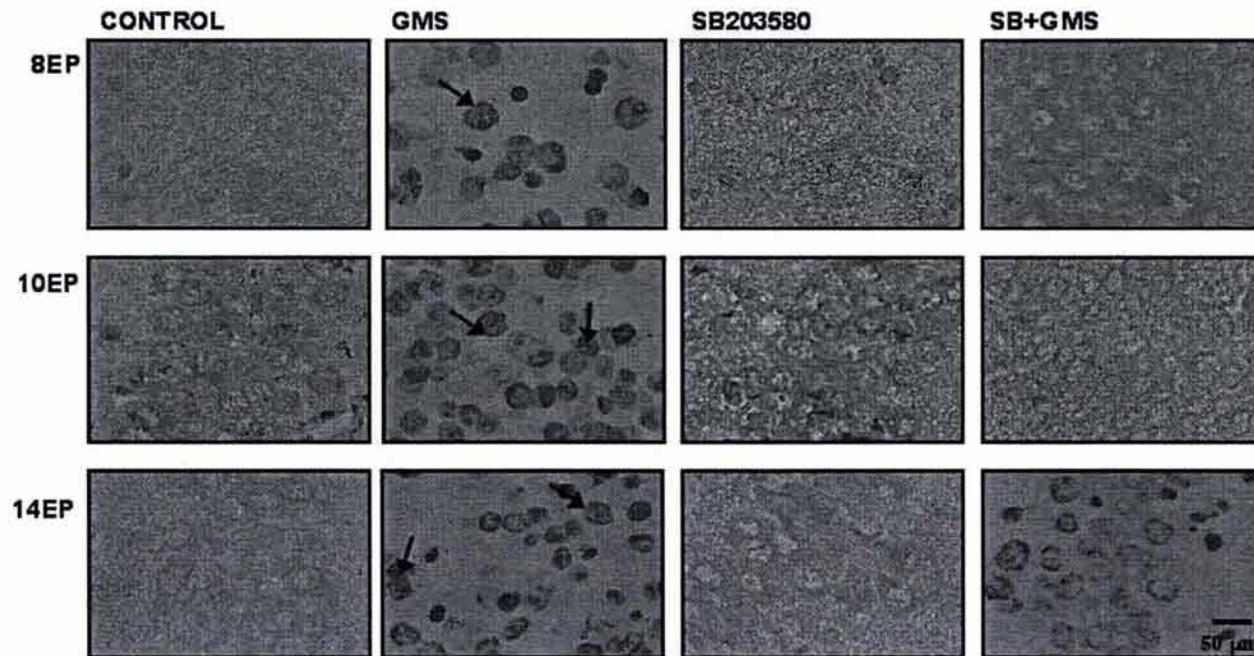


Figura 11. Microfotografías comparativas de la región CA1 del hipocampo de ratas a los 8, 10 y 14 días de EP. Se identifican células en proceso de apoptosis (Flechas), en el grupo control, GMS, SB, y SB+GMS.

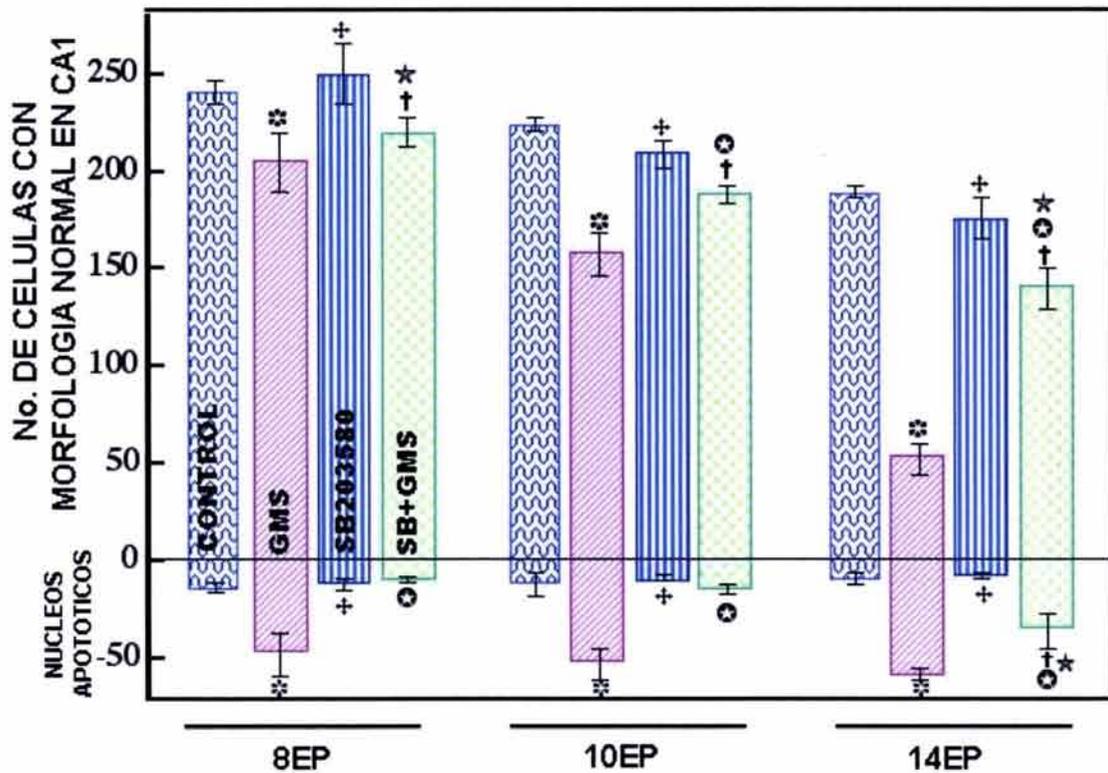


Figura 12. Conteo de neuronas en la región CA1 del hipocampo de ratas de 8, 10 y 14 días de EP. En el panel superior se muestra el número de neuronas con morfología normal teñidas con H/E (n=6), de los grupos control, GMS, SB, y SB+GMS en cada edad estudiada; en el panel inferior se muestra el número de núcleos positivos a la técnica de TUNEL (n=4) en los mismos grupos de estudio. Los valores representan la $\bar{x} \pm eem$. Las significancias estadísticas fueron: * $p < 0.001$ GMS vs Control; † $p < 0.001$ SB203580 vs Control; ‡ $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. †* $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; ‡* $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

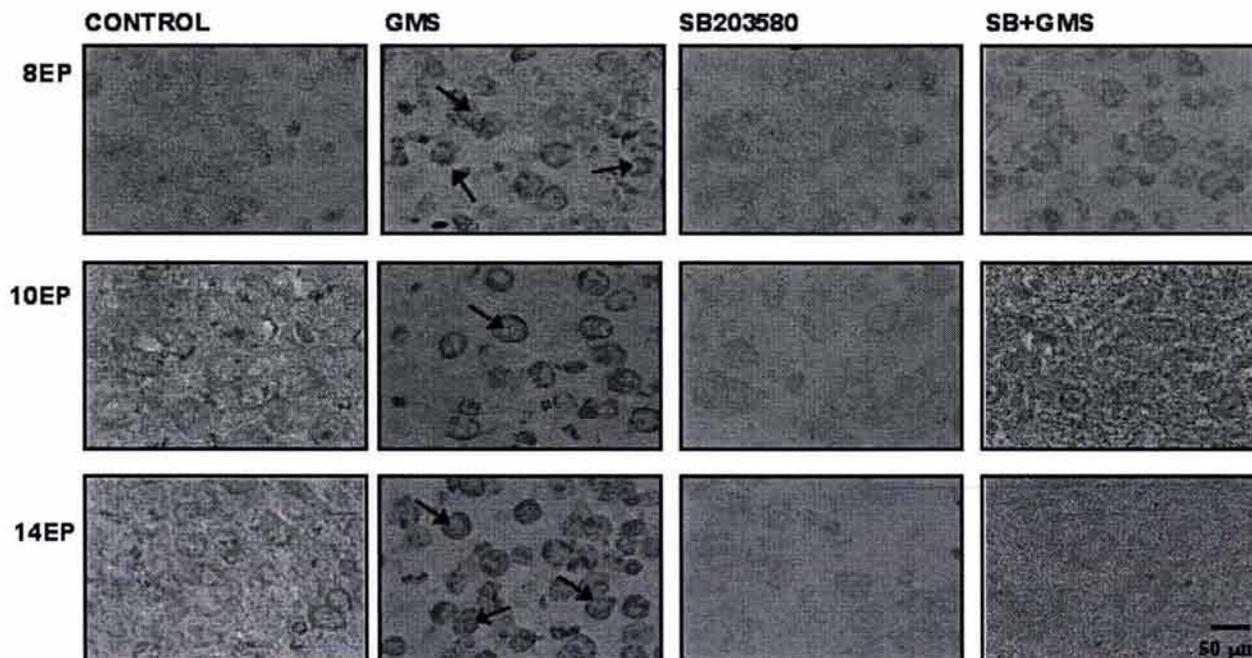


Figura 13. Microfotografías comparativas de la región CA3 del hipocampo de ratas. a los 8, 10 y 14 días de EP. Se identifican células en proceso de apoptosis (Flechas), en el grupo control, GMS, SB, y SB+GMS.

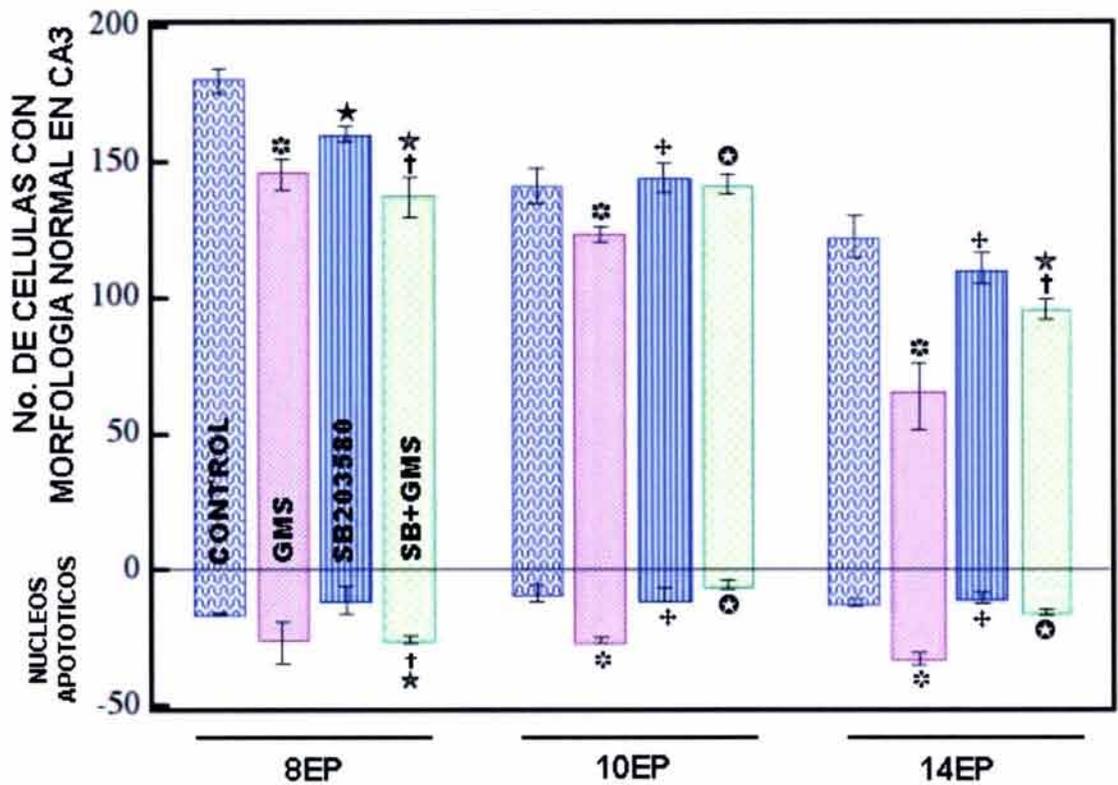


Figura 14. En la gráfica se muestra la $\bar{x} \pm eem$ del número de células con morfología normal, evaluados por la tinción de H/E ($n=6$; panel superior); y el número de células apoptóticas determinado por el método de TUNEL ($n=4$; panel inferior); en la región CA3 de los diferentes grupos de estudio, a las edades de 8, 10 y 14 días de EP. * $p < 0.001$ GMS vs Control; ★ $p < 0.001$ SB203580 vs Control; † $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. ‡ $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; ☆ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

observó que el número de células positivas a TUNEL en este grupo no es diferente de forma estadística, al grupo de GMS. Sin embargo a los 10 y 14 días de EP sí se observó un menor nivel de señal positiva a TUNEL, en este grupo (Figura 14).

7.1.4 NIVELES DE RNAm DE LAS SUBUNIDADES DE LOS R-Glu

En la figura 15 se muestra una composición fotográfica de geles representativos, utilizando la técnica de RT-PCR, para las subunidades NR1 y GluR2 en las mismas edades estudiadas, de los diferentes grupos.

La expresión del gen constitutivo (β -actina), en cada edad evaluada, se observa sin diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio, la expresión de este gen se utilizó con la finalidad de normalizar la expresión de los diferentes genes problema.

7.1.4.1 Niveles de expresión de las subunidades del R-NMDA

Expresión de NR1

En la gráfica, de la figura 16, se muestra que la expresión de NR1 en el hipocampo se mantiene constante a los 8 y 10 días de EP del grupo control, mientras que a los 12 días de EP, se observa un incremento en el nivel de este RNAm.

Por otro lado, los niveles de expresión para la subunidad NR1 en el hipocampo de los animales tratados con GMS aumentó con respecto a la edad entre los 8 y 12 días de EP, observándose una pequeña reducción en el nivel de expresión de esta subunidad a los 14 días de EP con respecto a la edad anterior. Sin embargo, cuando se comparan los niveles de NR1 de este grupo con los encontrados en el control se observó un incremento en la expresión en el grupo de GMS desde los 10 días de EP, o sea 2 días después de finalizado el tratamiento con GMS, esta característica se mantiene hasta los 14 días de EP, lo que sugiere un incremento en la formación de R-NMDA (Figura 16).

La administración de SB203580 no indujo cambios en la expresión de la subunidad NR1, en ninguna de las edades evaluadas, en comparación al grupo control. Por otra parte, cuando el SB203580 se administró previo al GMS no indujo cambios en

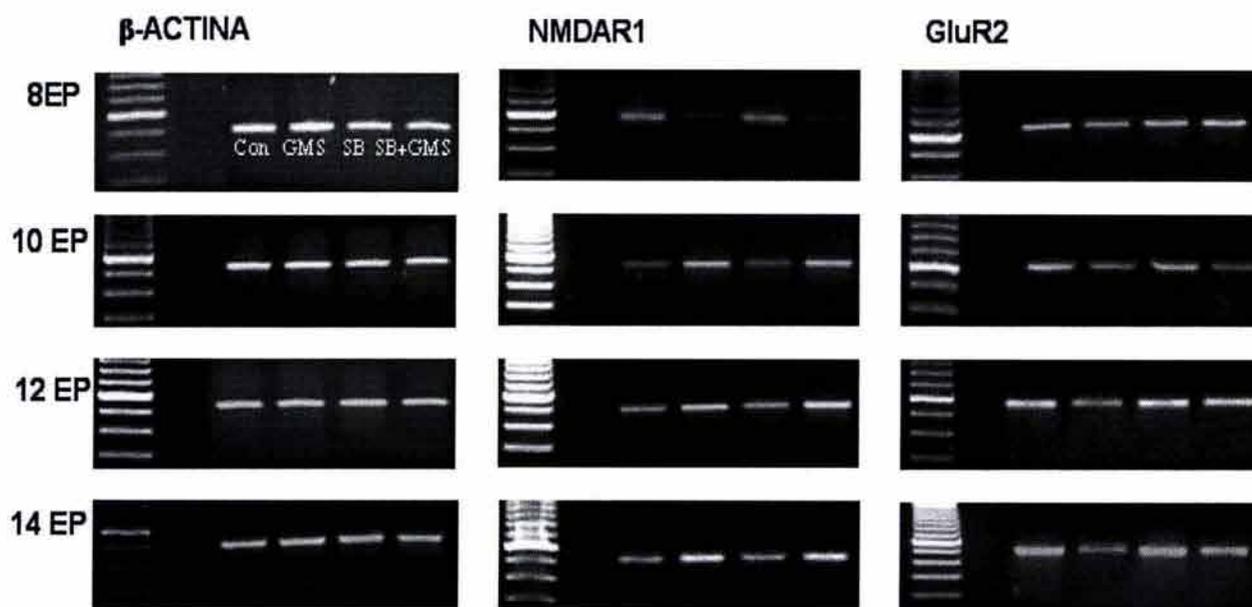


Figura 14. Fotografías digitales de geles representativos de la expresión de RNAm, por PCR, para β -Actina, NR1 y GluR2 en los diferentes grupos de estudio: control (carril 3), GMS (carril 4), SB (carril 5), y SB+GMS (carril 6). A los 8, 10, 12 y 14 días de EP. El primer carril contiene un marcador de peso molecular de 100 pb.

los niveles de expresión de NR1 al compararlo con el grupo de GMS, a excepción de los 12 días de EP en donde se observa una pequeña disminución, aunque esta reducción no alcanza el nivel de NR1 evaluado en el grupo control (Figura 16).

Expresión de NR2

Al evaluar los niveles de expresión de las subunidades NR2 A-D a los 14 días de EP. En el grupo control y en el tratado con GMS no se encontraron diferencias en la expresión de las subunidades NR2A y NR2C, aunque sí se observó un incremento de la expresión de NR2B en el hipocampo de los animales tratados con GMS. En nuestro modelo no se observó la expresión de la subunidad NR2D en el hipocampo en esta edad (no se muestran gráficos).

7.1.4.2 Niveles de expresión de las subunidades del R-AMPA

Expresión de GluR1

Los niveles de expresión de la subunidad GluR1 en el grupo control se mantienen relativamente constantes, durante todas las edades evaluadas, en tanto que la administración neonatal de GMS indujo un incremento significativo en los niveles de expresión para la subunidad GluR1 a los 12 y 14 días de EP, con respecto al grupo control (Figura 17).

La administración del inhibidor, de la vía p38 solo, no indujo cambios en los niveles de expresión de GluR1 al compararlo con el control. En contraste, cuando el SB2035680 se administró previo al GMS, los niveles de expresión de esta subunidad no mostraron diferencias significativas, con respecto al control, lo que indica que el SB203580 inhibió el aumento en el nivel de expresión de GluR1, que induce el GMS (Figura 17).

Expresión de GluR2

Los niveles de expresión del RNAm para la subunidad GluR2 se incrementa durante el desarrollo posnatal, en las edades evaluadas en este trabajo, y alcanza el valor máximo a los 14 días de EP en el hipocampo.

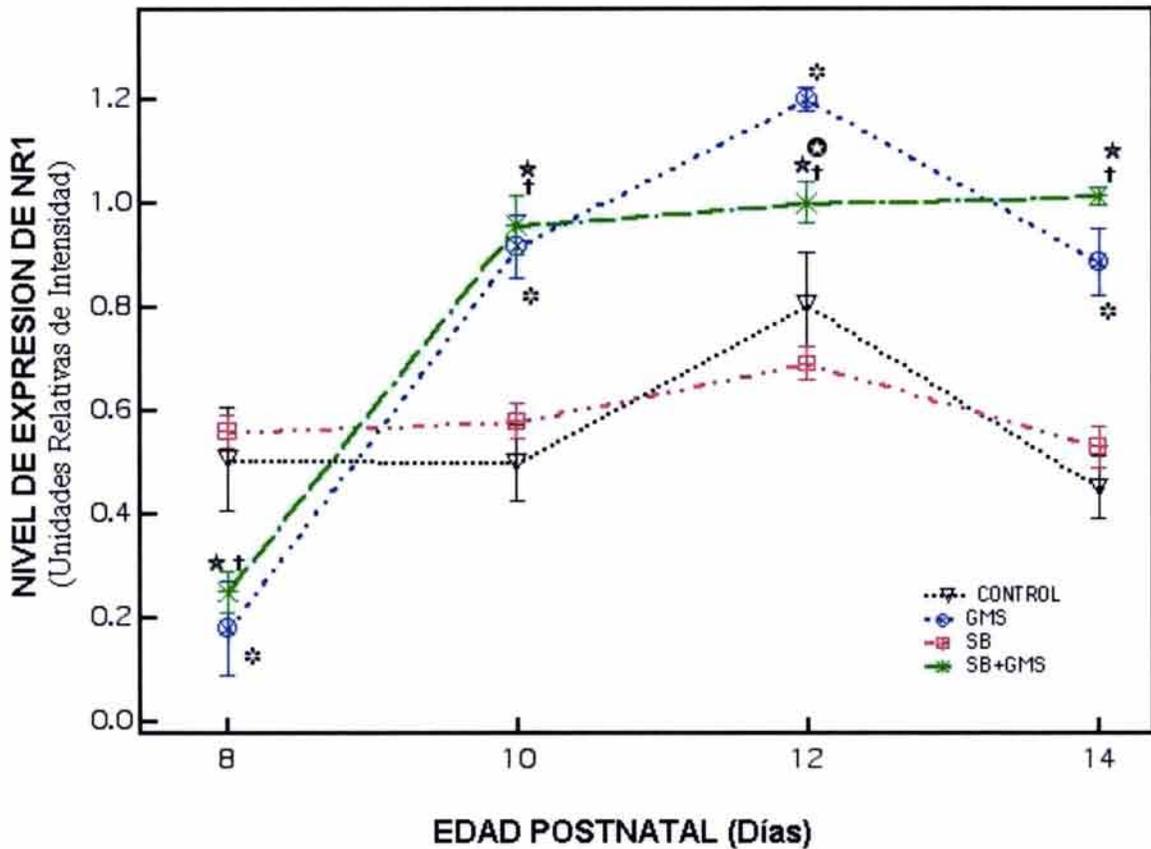


Figura 16. Niveles de RNAm de NR1 en el hipocampo de ratas de los diferentes grupos de estudio a los 8, 10, 12 y 14 días de EP. Cada punto (dato) representa la intensidad relativa de la banda ($\bar{x} \pm eem$) derivada de los resultados de 6 experimentos por duplicado y normalizada para el producto de PCR del gen constitutivo (β -Actina). Las significancias estadísticas fueron: * $p < 0.001$ GMS vs Control; ★ $p < 0.001$ SB203580 vs Control; † $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. ‡ $p < 0.001$ SB vs GMS; ⬤ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

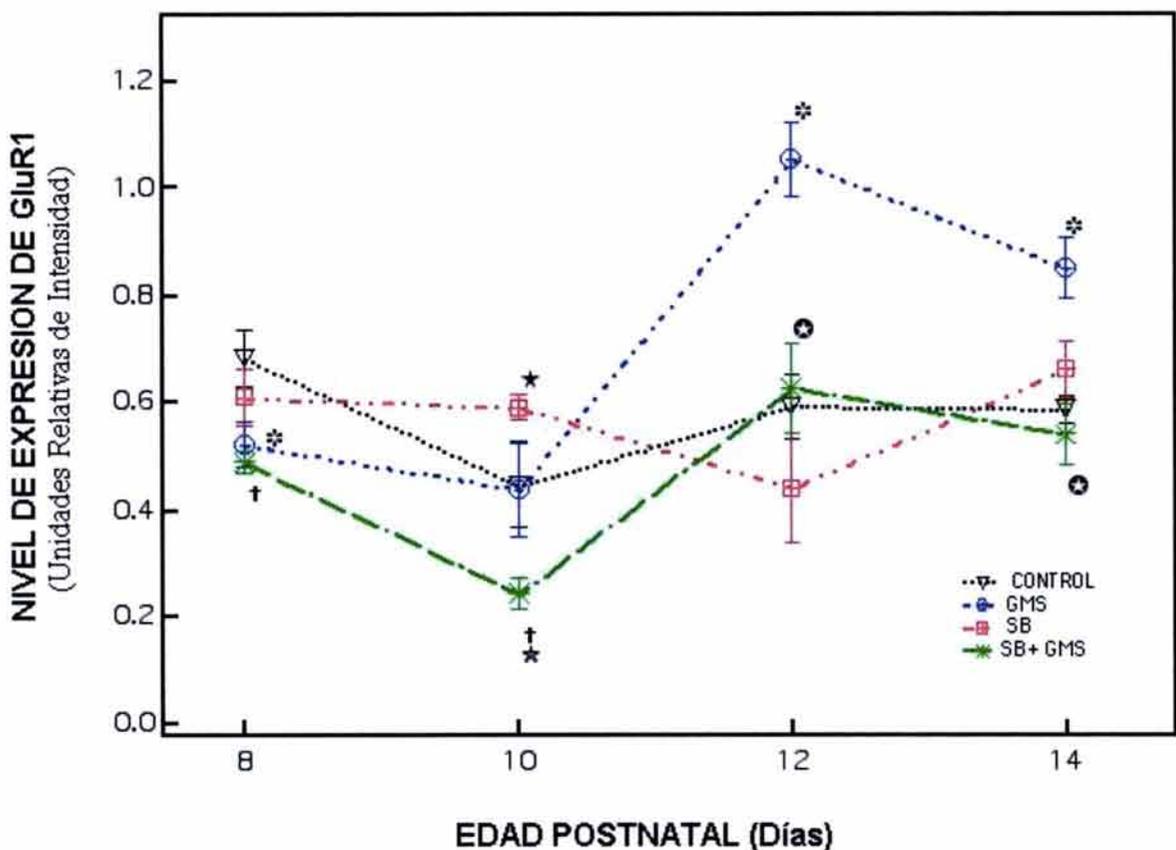


Figura 17. Perfil de expresión del RNAm de la subunidad GluR1, por RT-PCR, a los 8, 10, 12 y 14 días de desarrollo posnatal, en el hipocampo del grupo control, GMS, SB y SB+GMS. Cada punto (dato) representa la intensidad relativa de la banda ($\bar{x} \pm eem$) derivada de los resultados de 6 experimentos por duplicado y normalizada para el producto de PCR del gen constitutivo (β -Actina). Los valores de significancias estadísticas son: * $p < 0.001$ GMS vs Control; ★ $p < 0.001$ SB203580 vs Control; † $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. ‡ $p < 0.001$ SB vs GMS; Ⓢ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

Inversamente a lo que se observó para la subunidad GluR1, los niveles de expresión del RNAm para GluR2 se disminuyeron por el efecto del GMS, al compararlos con los niveles del grupo control, en un 55% en promedio aproximadamente desde los 10 y hasta los 14 días de EP. La administración del inhibidor de la vía p38 (SB203580) solo, no induce cambios en el nivel de expresión de la subunidad GluR2, con respecto al control. Sin embargo, cuando el SB203580 se administró 30 min antes que el GMS se observó que los niveles de RNAm de GluR2 aumentan progresivamente, desde los 8 hasta los 14 días de EP, alcanzando los valores del control a los 12 días de EP, lo cual sugiere que el SB203580 inhibe el efecto del GMS sobre los niveles de GluR2, bajo estas condiciones experimentales (Figura 18).

7.1.5 NIVELES DE LA PROTEINA DE GluR2 POR INMUNOHISTOQUIMICA

En los resultados se observó una disminución en la inmunoreactividad para GluR2 en el grupo de GMS, respecto al grupo control a los 14 días de EP; esto fue evidente en ambas regiones evaluadas, tanto en CA1 (Figura 19), como en CA3 (Figura 20), lo que concuerda con los resultados obtenidos por RT-PCR para los niveles de expresión del RNAm de esta subunidad. Sin embargo, es claro que la disminución en la inmunoreactividad es mucho más marcada para la región CA1 que para CA3 en esta misma edad en los animales tratados con GMS.

7.1.6 NIVEL DE EXPRESION DEL RNAm DE NRSF EN EL HIPOCAMPO

Los resultados mostraron que el nivel de expresión del RNAm de NRSF fue bajo en el hipocampo de animales control, y en aquellos en los que se les aplicó únicamente el inhibidor de la vía p38 (SB203580), a las edades evaluadas. Sin embargo, la administración neonatal de GMS induce un incremento significativo en los niveles de este RNAm, tanto a los 8 como a los 14 días de EP en el hipocampo, en comparación al control. Además, la administración de SB203580 30 min antes que el GMS previno el incremento en el nivel de RNAm de NRSF, inducido por el GMS (Figura 21).

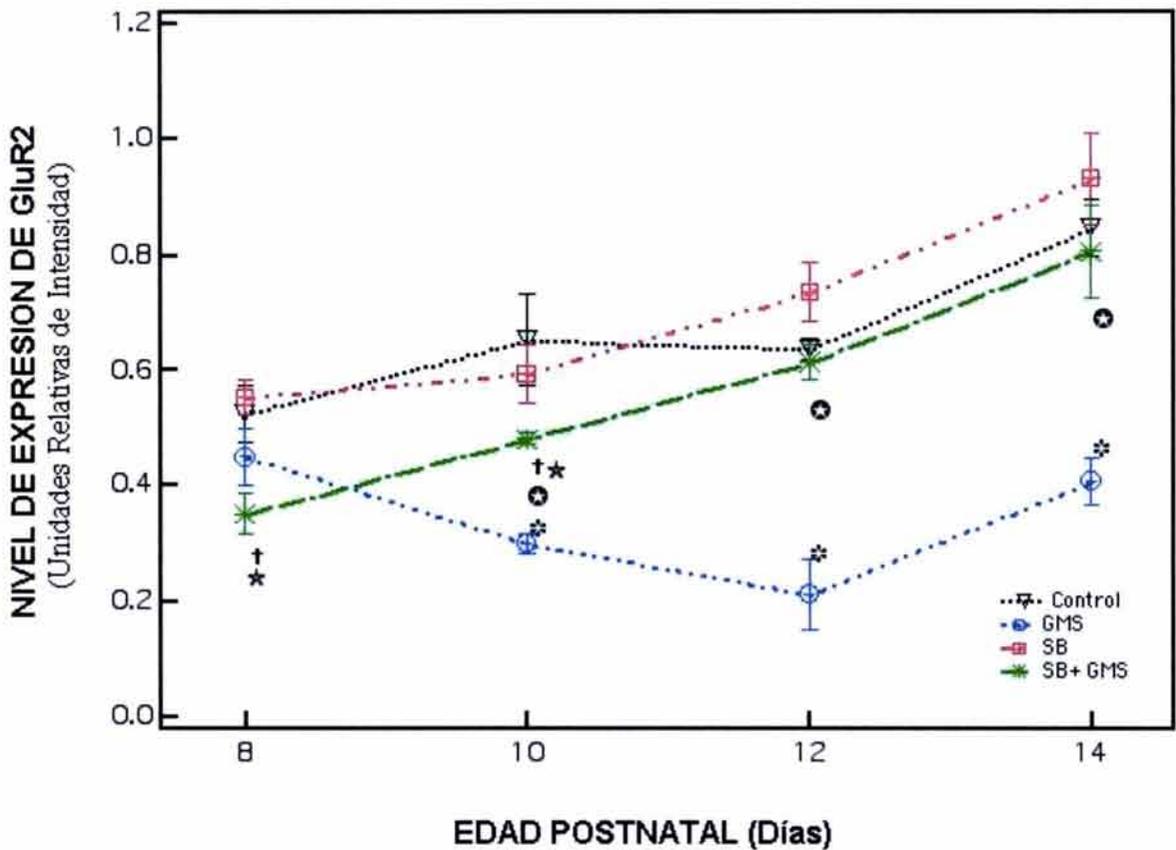


Figura 18. Perfil del nivel de expresión de la subunidad GluR2 del R-AMPA durante el desarrollo posnatal (8, 10, 12 y 14 días de EP). Los valores representan $\bar{x} \pm eem$ de la intensidad relativa de la banda de 6 experimentos por duplicado; valor normalizado para el producto de PCR del gen constitutivo (β -Actina). * $p < 0.001$ GMS vs Control; † $p < 0.001$ SB203580 vs Control; † $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. † $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; † $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

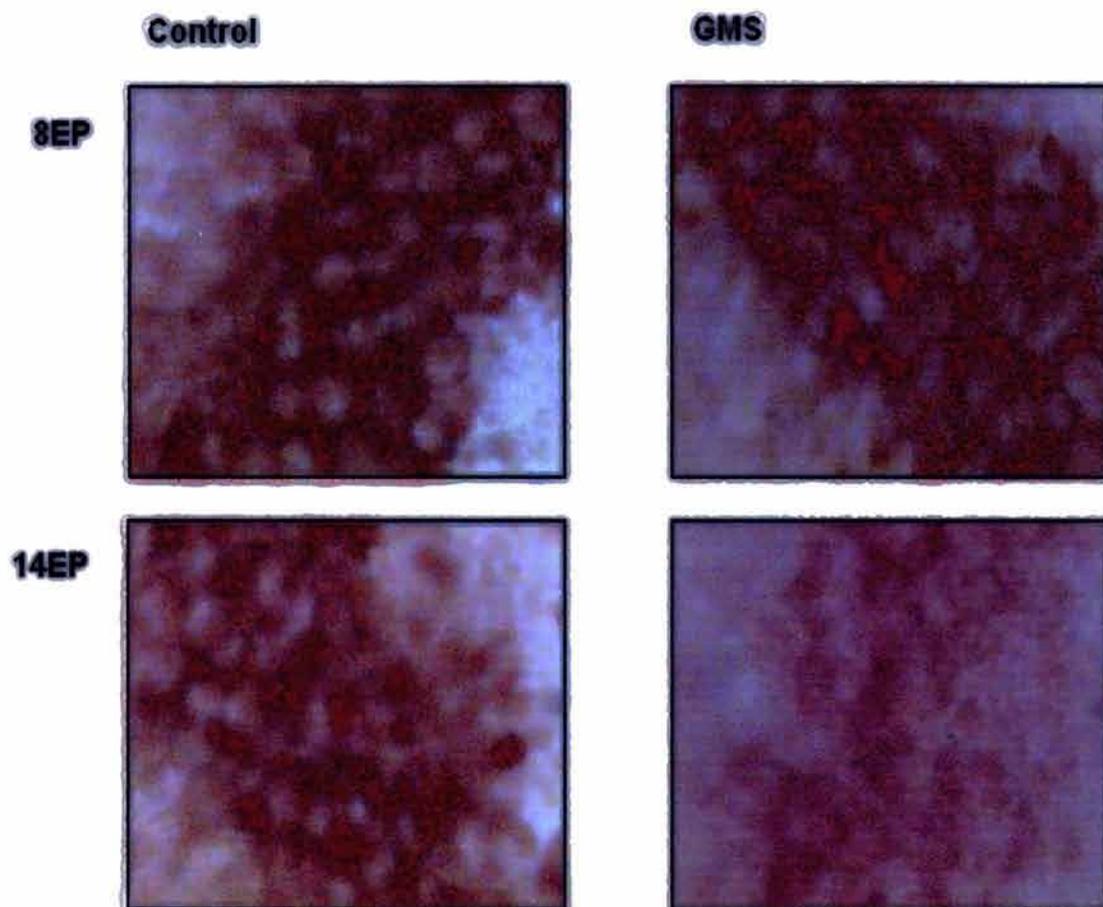


Figura 19. *Microfotografías representativas de neuronas inmunopositivas para la subunidad GluR2, en la región CA1 del hipocampo de animales control y con GMS a los 8 y 14 días de EP.*

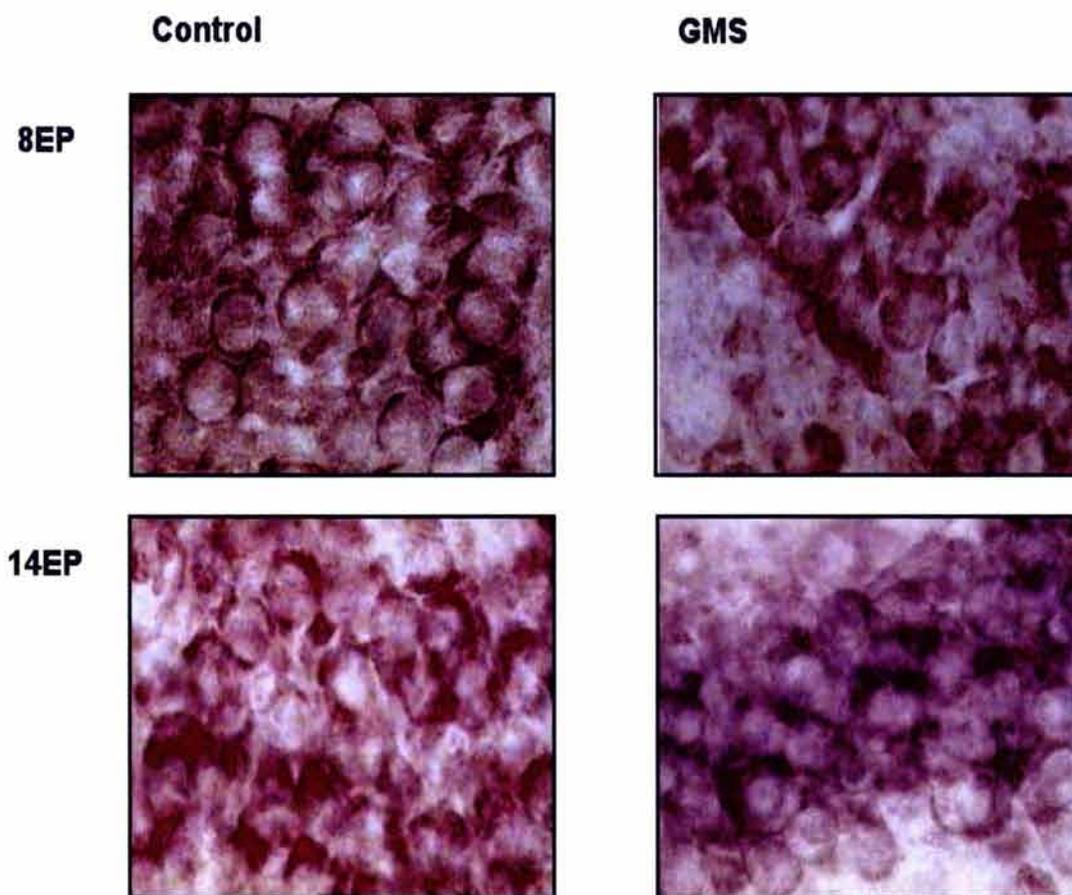


Figura 20. *Microfotografías representativas de neuronas inmunopositivas para la subunidad GluR2, en la región CA3 del hipocampo de animales control y con GMS a los 8 y 14 días de EP.*

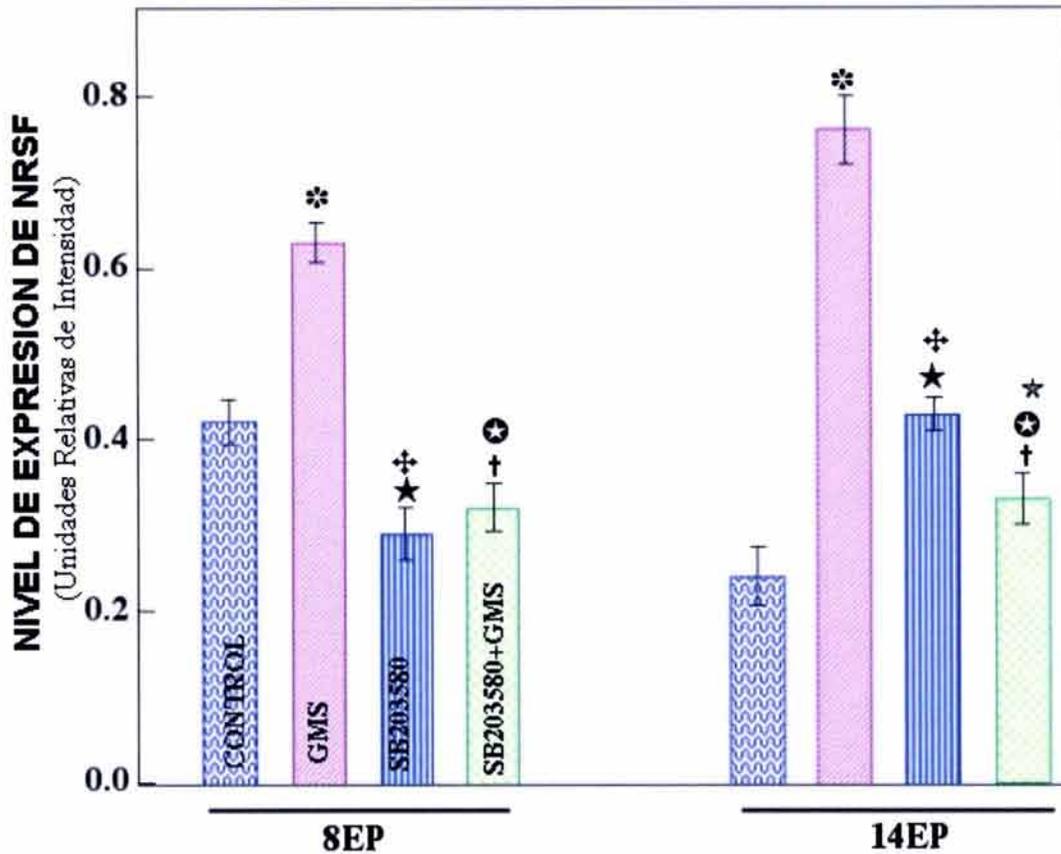


Figura 21. Niveles de expresión del RNAm para el factor silenciador restrictivo neuronal (NRSF/REST) en el hipocampo a los 8 y 14 días de EP. En el panel superior se muestra una fotografía digital representativa de un gel, del producto de PCR para NRSF a los 14 días de EP, de los cuatro grupos de estudio (Control, GMS, SB y SB+GMS), la flecha derecha indica la correspondencia de los pares de bases. * $p < 0.001$ GMS vs Control; ★ $p < 0.05$ SB203580 vs Control; † $p < 0.05$ SB+GMS vs Control. ‡ $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; ☆ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.05$ SB+MSG vs SB203580.

7.2 CORTEZA CEREBRAL

7.2.1 DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE LA VIA P38

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el de NaCleq, en la corteza cerebral de ratas de 8 días de EP. Además, se observó un incremento en la expresión de ATF2^{PP}, de casi 3 veces, en el grupo tratado con GMS en comparación con el control, este efecto se evitó al administrar el inhibidor de la vía p38 (SB203580) 30 min antes del GMS, y los niveles correspondientes al grupo control se alcanzaron cuando se administró la dosis de inhibidor de 30 μ M (0.42 μ g/g) y de 40 μ M (0.56 μ g/g) (Figura 22).

7.2.2 ANALISIS HISTOLOGICO EN CORTES TEÑIDOS CON HEMATOXILINA Y EOSINA.

7.2.2.1 *Análisis morfológico del daño celular*

Los cortes histológicos teñidos con H/E, hacen evidente la presencia de células con morfología normal: células redondas, contornos definidos y un citoplasma homogéneo en el grupo de animales control en todas las edades evaluadas (8-14 días de EP). En el grupo tratado con GMS, se observaron alteraciones histológicas abundantes y lesiones, con características de muerte neuronal por necrosis (Figura 23).

Las principales alteraciones que se reconocieron en los cortes se caracterizaron por la presencia de células rojas (pérdida de la afinidad por la hematoxilina, con picnosis nuclear); además el citoplasma muestra diversos grados de encogimiento. Estas características de daño celular que se observaron en el grupo de GMS, no se encontraron en los animales a los que se les administró el inhibidor de la vía p38, 30 min antes del GMS. Además no se observaron diferencias significativas en la morfología de las células del grupo de SB203580, cuando se comparó con el grupo control (Figura 23).

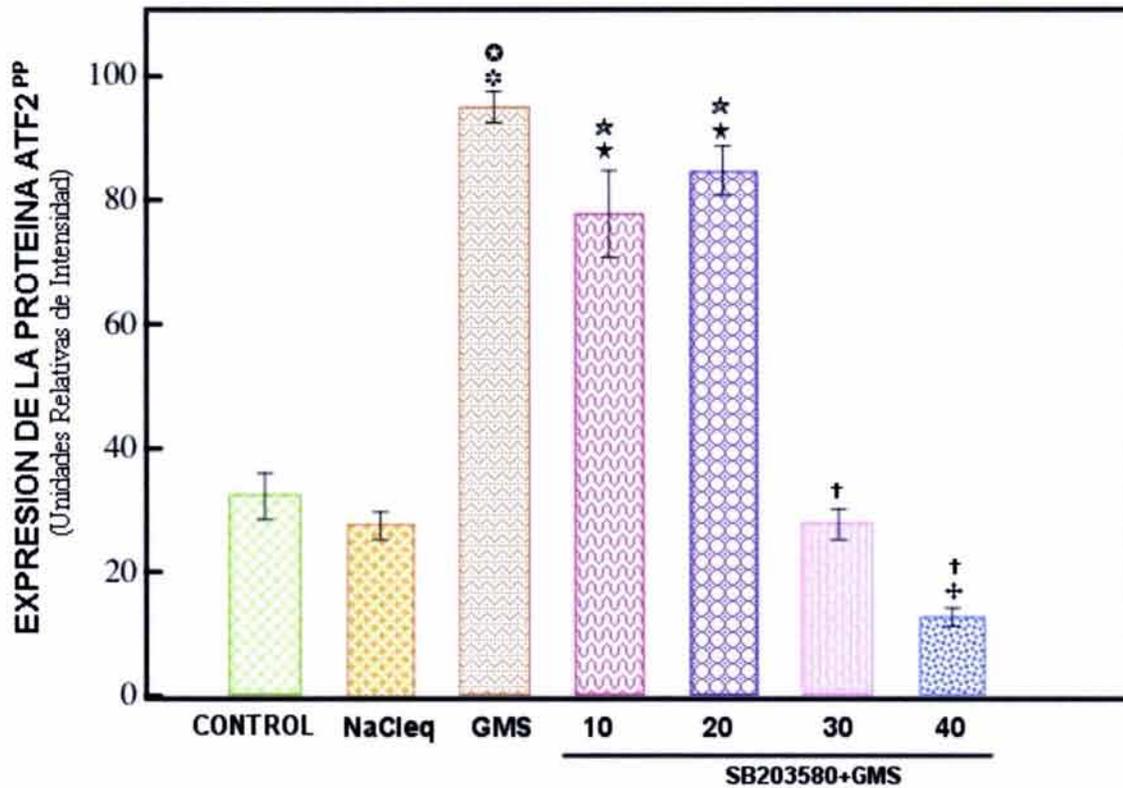


Figura 22. Expresión de la proteína ATF2^{PP}, por Western blot, en la corteza cerebral de ratas tratadas neonatalmente con GMS (4 mg/g de p.c.), con NaCleq y con diferentes dosis de SB203580 (10, 20, 30 o 40 μ M). Los valores representan $\bar{x} \pm eem$, de la intensidad relativa de la banda, de cuatro experimentos por duplicado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en la siguiente forma: ✱ $P < 0.0001$ GMS vs Control; ★ $p < 0.001$ y ‡ $p < 0.05$ SB+GMS vs Control. ☆ $p < 0.001$ GMS vs NaCleq; ☆ $p < 0.001$ SB+GMS vs NaCleq. † $p < 0.01$ SB+GMS vs GMS.

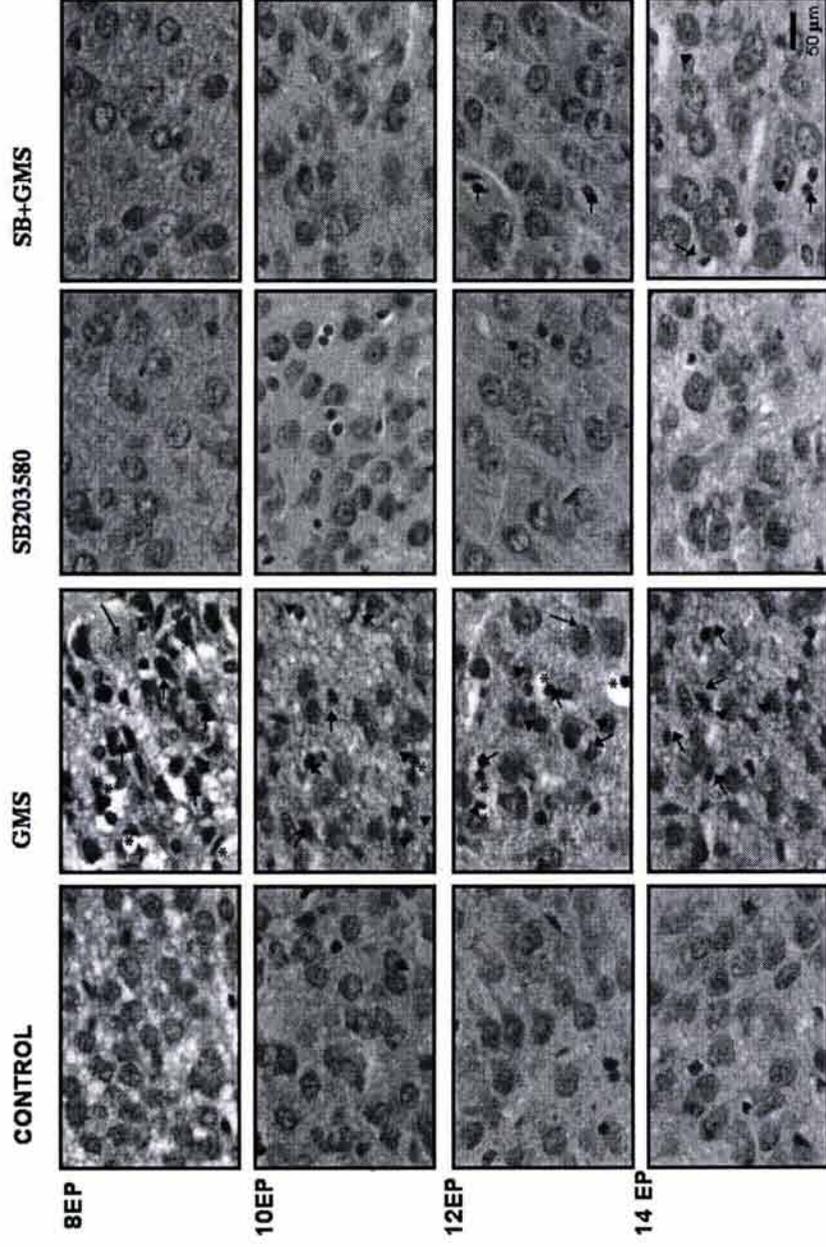


Figura 23. Fotomicrografías de secciones de la corteza cerebral (capa II de la región Fr1), del hemisferio derecho a los 8, 10, 12 y 14 días de EP; de ratas control, tratadas con CMS, con SB203580 y SB+GMS. Se observan neuronas normales (flecha larga), un número abundante de neuronas muertas (flechas cortas), en el grupo de CMS; neuronas encogidas (cabeza de flecha); proceso de cavitación (asterisco)

7.2.2.2 Análisis cuantitativo del daño celular

El conteo celular a los 8, 10, 12 y 14 días de EP en secciones corteza cerebral (región Fr1, un área de 1.4 mm²) teñidas con H/E, hizo evidente un proceso de muerte celular en la región Fr1 del grupo control (Figura 24).

Los resultados obtenidos en el conteo de neuronas con morfología normal de las ratas control, GMS, SB203580 y SB+GMS, mostraron que la administración de GMS induce una disminución significativa en el número de células con morfología normal de los 8 a los 12 días de EP. Por ejemplo al día 8 de EP el número de células con morfología normal fue de 262.61 ± 7.2 y de 186.93 ± 3.56 ($\bar{x} \pm eem$) en ratas control y GMS respectivamente, lo cual significó una disminución del 30%. Sin embargo cuando se administró el SB203580 previo al GMS, el número de células se redujo solo en un 14.7%, a esta misma edad, en comparación con el valor del control. Mientras que para 14 días de EP el SB203580 solo ó en combinación con en el GMS, induce un efecto protector de la muerte, dado que el número de células normales es mayor para estos dos grupos, en relación a los que se encontraron en el control (Figura 24).

7.2.3 DETECCION DEL DAÑO CELULAR APOPTOTICO

Algunos núcleos teñidos con TUNEL no fueron claramente identificados como neuronas ya que numerosas estructuras con señales positivas, no revelaron un cuerpo celular definido. Las células que se incluyeron en el conteo, como positivas a TUNEL, se observan al microscopio con puntos oscuros y con núcleo fragmentado.

La señal de TUNEL fue positiva en el grupo control y en el de SB203580, la diferencia estadística entre estos grupos no es significativa, los resultados observados en el grupo control indicaron que existe muerte neuronal en estas etapas del desarrollo en la corteza cerebral, con fragmentación de DNA una característica típica de la muerte por apoptosis (Figura 25).

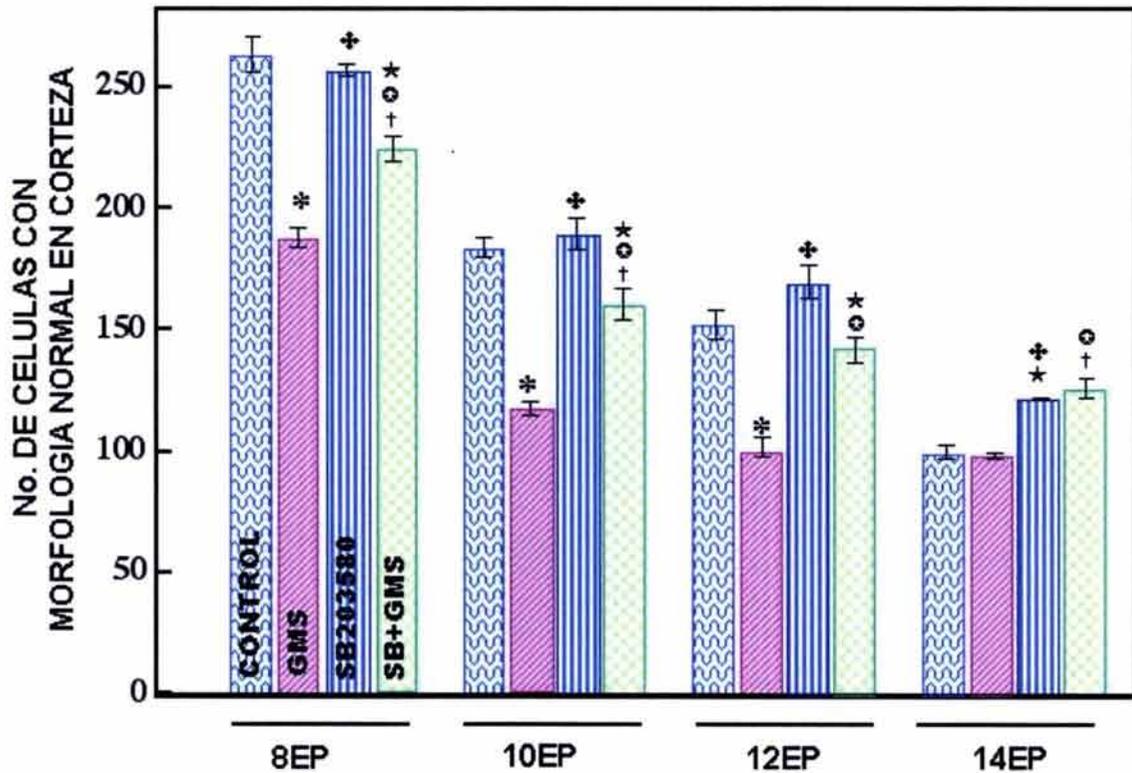


Figura 24. La gráfica de barras muestra el efecto de la aplicación del GMS y SB203580 sobre la muerte neuronal, evaluada por el conteo de neuronas en secciones de corteza cerebral teñidas con H/E a los 8, 10, 12 y 14 días de EP. Las significancias estadísticas fueron: * $p < 0.001$ GMS vs Control; † $p < 0.001$ SB203580 vs Control; ‡ $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. † $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; ‡ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

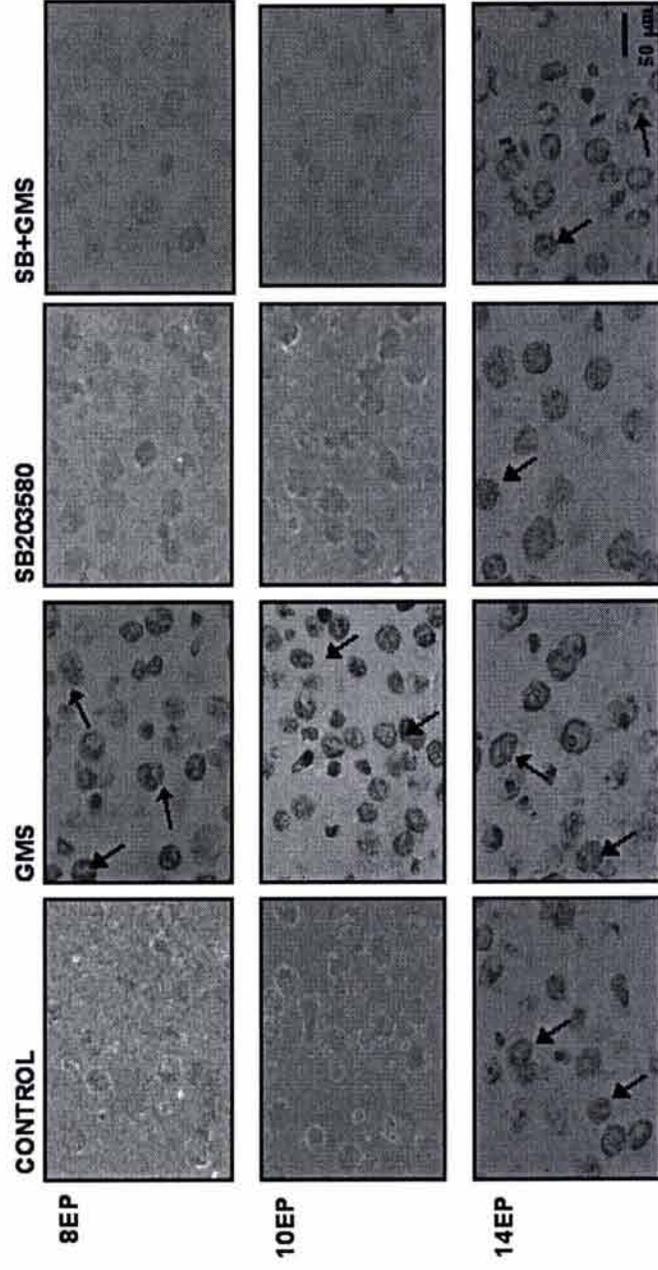


Figura 25. Fotomicrografías que muestran secciones de cerebros de ratas de los cuatro grupos de estudio con marcaje para la técnica de TUNEL en la corteza cerebral del hemisferio derecho (capa II de la región FrI), a los 8, 10 y 14 días de EP.

Después de la inducción del daño con GMS, el número total de núcleos positivos a TUNEL se incrementó en un 77 y 26.5% a los 8 y 10 días de EP respectivamente, en comparación con el grupo control en cada edad. Al evaluar el efecto del SB203580 sobre la muerte neuronal apoptótica, inducida por GMS, solo se observó un efecto protector significativo a los 10 y 12 días de EP en donde el número de núcleos positivos a TUNEL no fue estadísticamente diferente al encontrado en el grupo control (Figura 26).

7.2.4 NIVELES RNAm DE LAS SUBUNIDADES DE LOS R-Glu

7.2.4.1 Niveles de expresión de las subunidades del R-NMDA

Expresión de NR1.

Los resultados obtenidos por RT-PCR mostraron un incremento en los niveles de expresión de la subunidad NR1, a través del tiempo de estudio, alcanzando un valor máximo a los 12 y 14 días de EP en el grupo control (Figuras 27 y 28). Este mismo comportamiento se observó en los otros grupos de estudio. Sin embargo, es evidente que a los 8 y 10 días de EP el nivel de expresión de NR1 fue mayor en el grupo de GMS, con respecto al del control. Este incremento representó el 51% y 133% para 8 y 10 días de EP respectivamente. El SB203580 que se administró 30 min antes del GMS no indujo efectos significativos sobre los niveles de expresión de la subunidad NR1 en esta región, a ninguna de las edades evaluadas, cuando se comparó con el grupo de GMS (Figuras 27 y 28).

Expresión de NR2

En cuanto a los niveles de subunidades de la familia NR2, en la corteza cerebral, se observó expresión de la subunidad NR2A y NR2B; en cuanto a la NR2D tuvo una muy baja expresión. Mientras que la subunidad NR2C no se expresa en esta región a los 14 días de EP, bajo las condiciones experimentales de este estudio. En cuanto al efecto del GMS, sobre el nivel de expresión de NR2A no hubo diferencias significativas al compararlo con el control. Sin embargo, se incrementó el nivel de expresión NR2B, bajo el efecto del GMS (datos gráficos no se muestran).

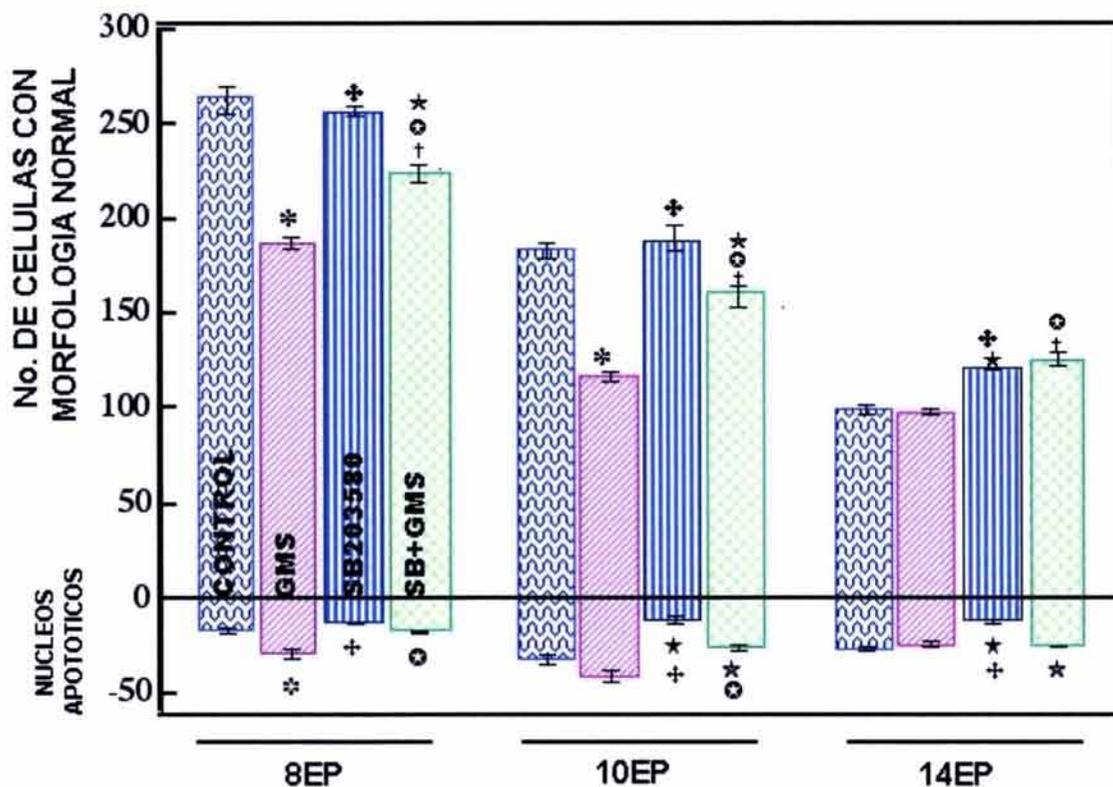


Figura 26. Número de células con morfología normal, evaluados por la tinción de H/E (panel superior), y núcleos apoptóticos, por el método de TUNEL (panel inferior), de los diferentes grupos de estudio, en cortes coronales de la corteza cerebral (región Fr1, 1.4 mm²) en función de la edad (8, 10 y 14 días de EP). En la gráfica se muestra la $\bar{x} \pm eem$. Las significancias estadísticas son: * $p < 0.001$ GMS vs Control; † $p < 0.001$ SB203580 vs Control; ‡ $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. ‡ $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; ⊕ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

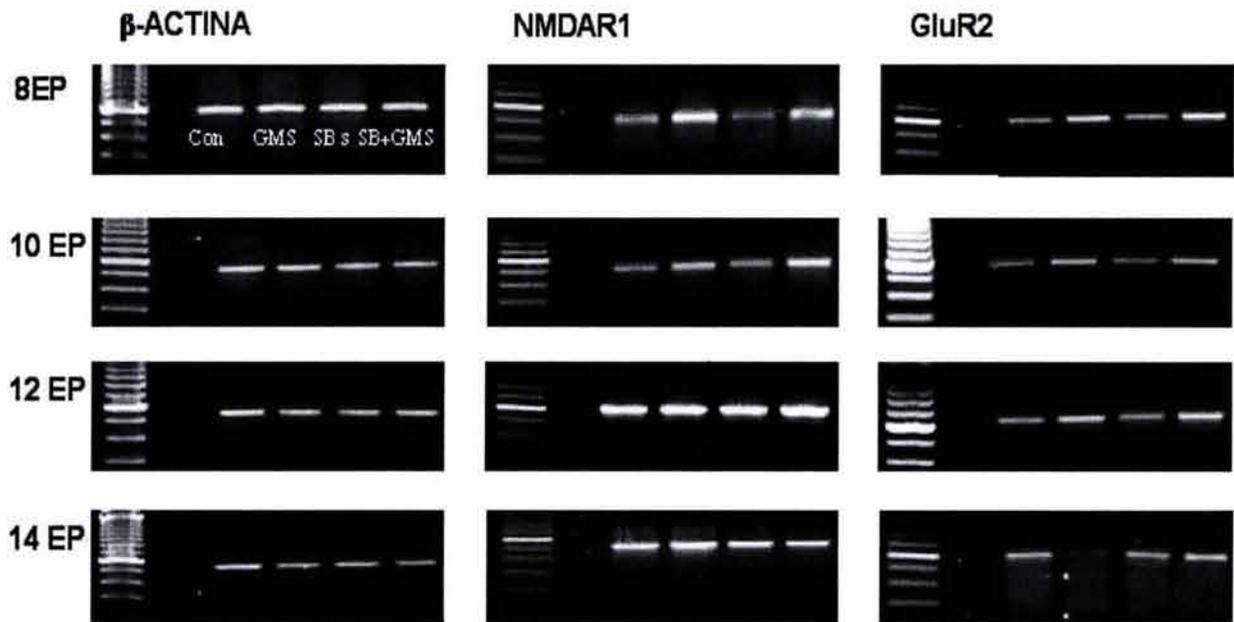


Figura 27. Fotografías digitales de geles representativos de la expresión de RNAm, por PCR, para β -Actina, NR1 y GluR2 en los diferentes grupos de estudio: control (carril 3), GMS (carril 4), SB (carril 5), y SB+GMS (carril 6). A los 8, 10, 12 y 14 días de EP. El primer carril contiene un marcador de peso molecular de 100 pb.

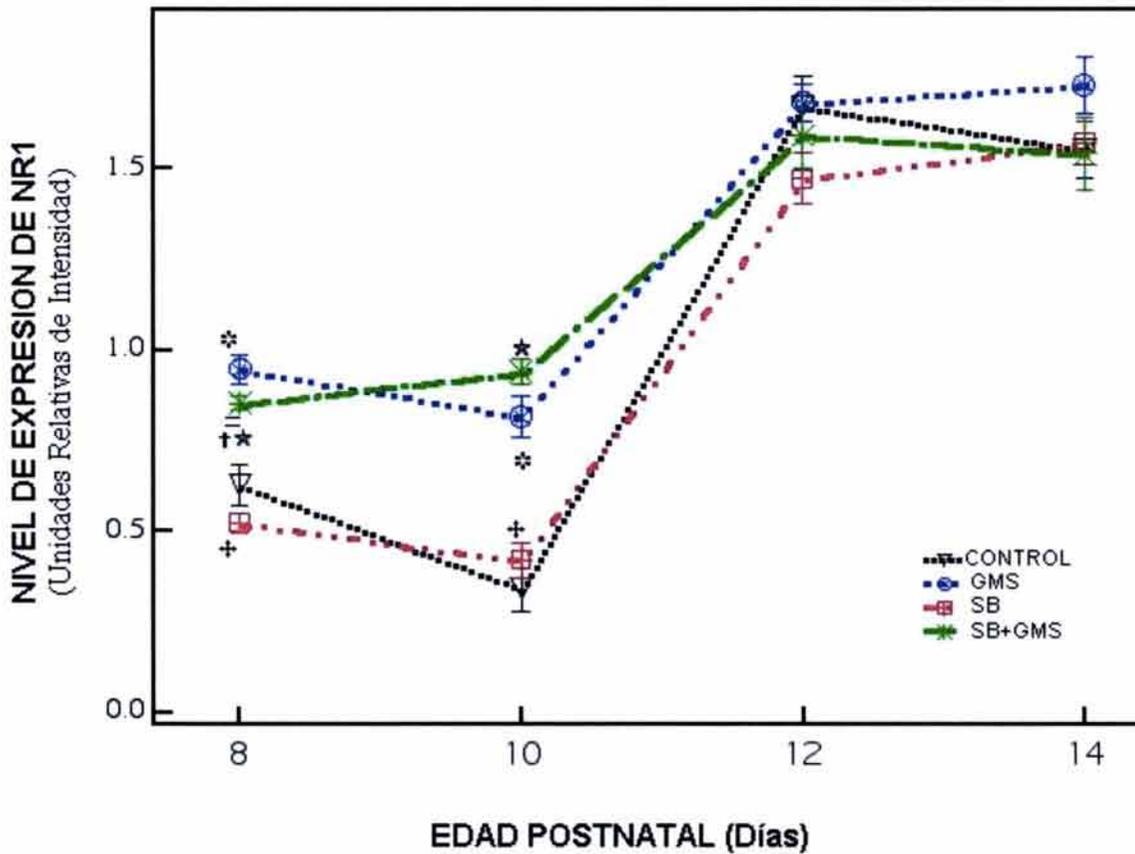


Figura 28. Perfil postnatal (8, 10, 12 y 14 días de EP), de expresión del RNAm de la subunidad NR1 por RT-PCR, entre el grupo control, GMS, SB203580 y SB+GMS en la corteza cerebral. Cada valor representa la intensidad relativa de la banda ($\bar{x} \pm eem$) derivada de los resultados de 6 experimentos y normalizada para el producto de PCR del gen constitutivo (β -Actina). Las significancias estadísticas son: * $p < 0.001$ GMS vs Control; † $p < 0.001$ SB203580 vs Control; ‡ $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. † $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; ‡ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

7.2.4.1 Niveles de expresión de las subunidades del R-AMPA

Expresión de GluR2

En la gráfica de la figura 29 se analizan los niveles de expresión del RNAm para la subunidad GluR2. Los resultados mostraron una tendencia a un incremento en el nivel de GluR2, en las edades evaluadas del grupo control y del grupo que se le administró únicamente el inhibidor de la p38/SAPK, además no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre estos grupos.

Por otra parte, cuando se compararon los niveles de expresión de GluR2 del grupo de GMS con el control se observó que los niveles de esta subunidad son más altos a las edades de 8, 10 y 12 días de EP, en un 160, 126 y 66% respectivamente; esta diferencia se redujo con respecto a la edad ya que a los 12 días de EP la expresión de GluR2, en el grupo de GMS fue tan sólo el 66% más alta que la del control. Mientras que a los 14 días de EP, el nivel de expresión de GluR2, en el grupo de GMS fue menor en un 54%, en relación al control (Figura 29).

En cuanto al grupo tratado con SB203580, a los 12 y 14 días de EP, el inhibidor de la vía p38/SAPK evitó el efecto del GMS ya que los niveles de GluR2 no fueron diferentes estadísticamente con respecto al control (Figura 29).

7.2.5 NIVELES DE LA PROTEÍNA DE GluR2-INMUNOHISTOQUÍMICA

Este análisis se llevó a cabo con la finalidad de establecer una relación entre el nivel de la proteína GluR2, por inmunohistoquímica (estudio cualitativo) y los cambios en la expresión de RNAm para GluR2, entre el grupo control y el tratado con GMS. El resultado mostró un incremento significativo en la densidad de la proteína para GluR2 en la corteza cerebral de ratas tratadas con GMS a los 8 días de EP con respecto al grupo control (Figura 30). Al contrario, al evaluar la densidad de esta proteína a los 14 días de EP se observó que el GMS indujo una reducción en la inmunotinción específica para GluR2 .

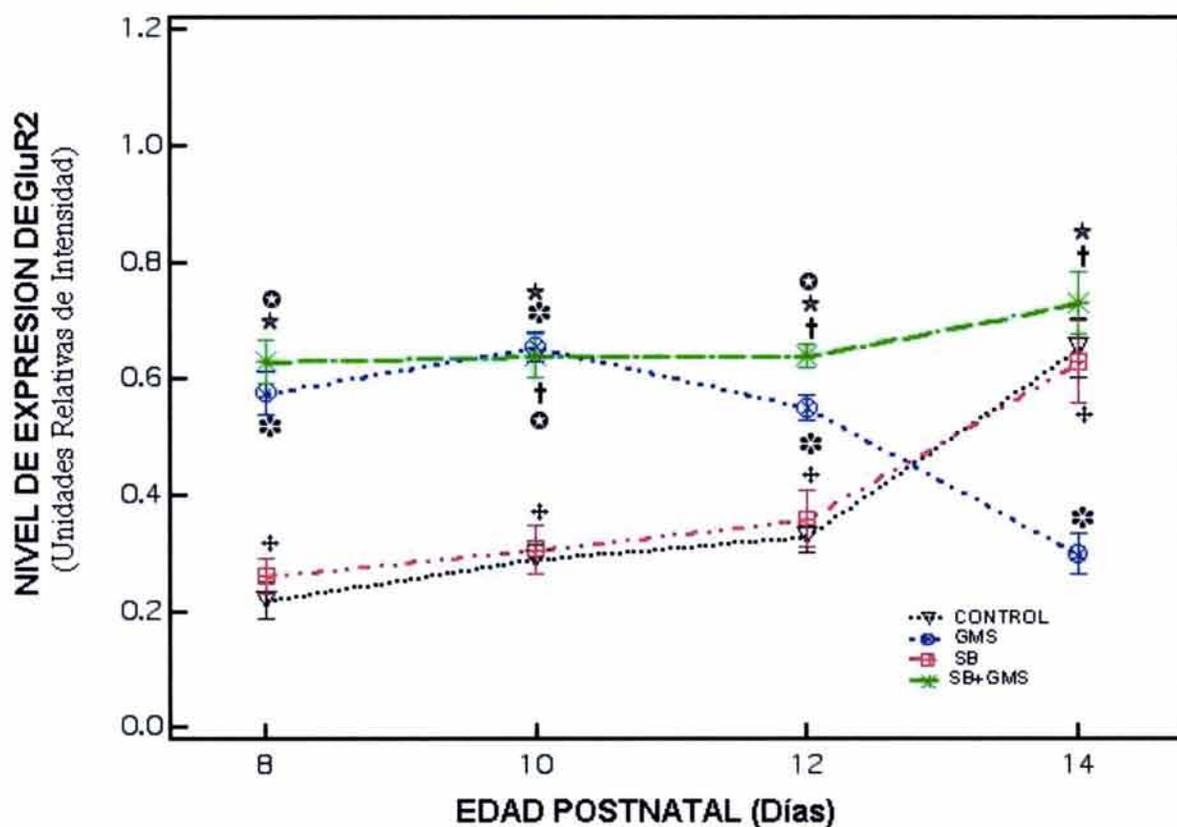


Figura 29. Perfil de expresión de RNAm de la subunidad GluR2 por RT-PCR a los 8, 10, 12 y 14 días de EP, en la corteza cerebral de los diferentes grupos de estudio. Cada valor representa la intensidad relativa de la banda ($\bar{x} \pm eem$) derivada de los resultados de 6 experimentos y normalizada para el producto de PCR del gen constitutivo (β -Actina). Las significancias estadísticas fueron: * $p < 0.001$ GMS vs Control; † $p < 0.001$ SB203580 vs Control; ‡ $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. § $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; ¶ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. * $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

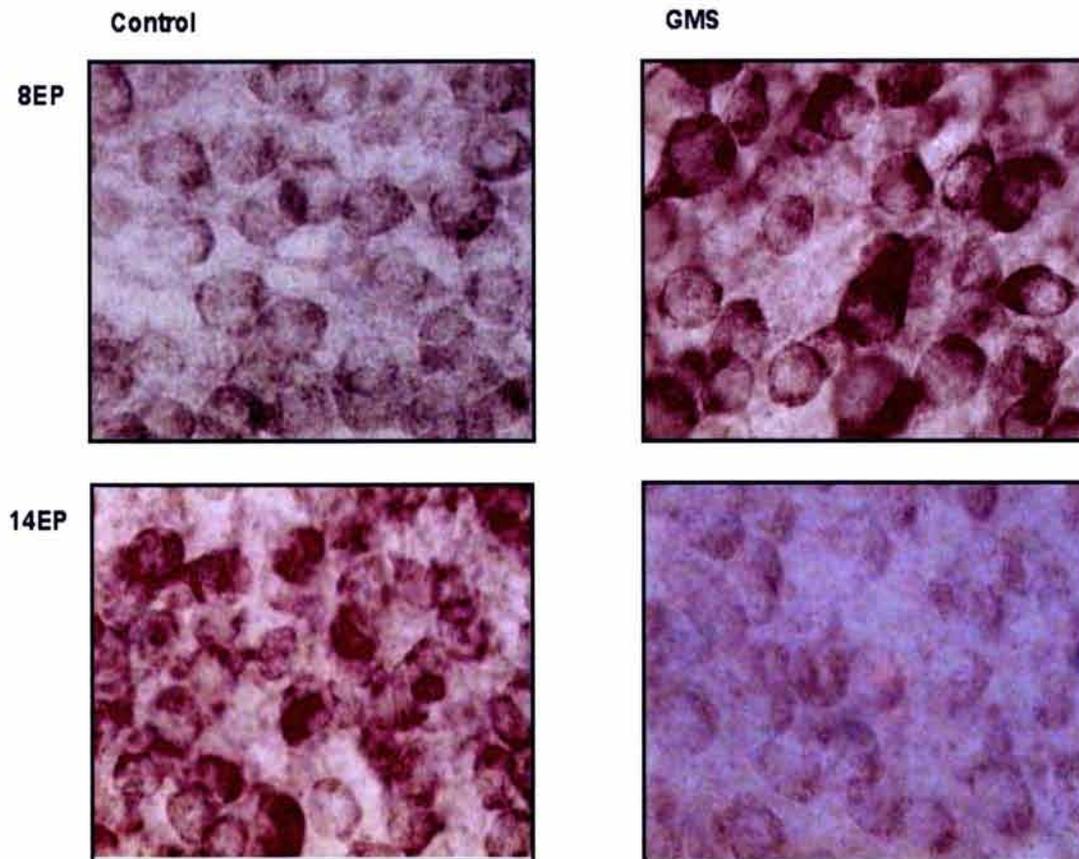


Figura 30. *Microfotografías representativas de la marca inmunohistoquímica para la subunidad GluR2 en la corteza cerebral (región Fr1) de animales control y con GMS a los 8 y 14 días de EP. Se observa un mayor grado de inmunotinción en la corteza de animales con GMS a los 8 días de EP, con respecto al control; evento que se revierte cuando se evalúan los 14 días de EP.*

7.2.6 NIVELES DE RNAm DE NRSF EN LA CORTEZA CEREBRAL

Los resultados de expresión del factor silenciador restrictivo neuronal (NRSF), por RT-PCR, a los 8 y 14 días de EP mostraron que la administración de SB203580 no induce, por sí solo, cambios en el nivel de expresión de NRSF, ya que el nivel de RNAm de NRSF en este grupo no fue diferente estadísticamente con respecto al control (Figura 31).

En el grupo control los niveles de NRSF fueron 54% más bajos con respecto al que se observó en el grupo de GMS, a los 14 días de EP. El efecto del GMS sobre el nivel de expresión de NRSF se inhibió por la aplicación de SB203580, al administrarlo 30 min antes del GMS, ya que el nivel de NRSF en este grupo alcanzó el observado en el grupo control (Figura 31).

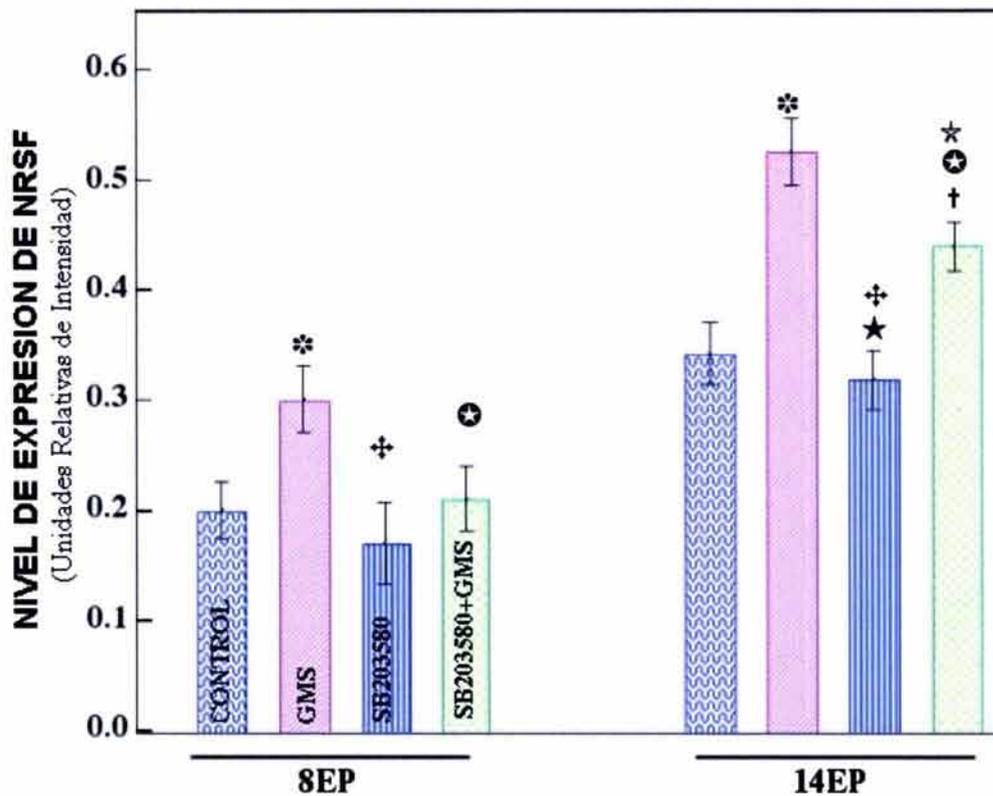


Figura 31. Efecto del GMS y SB203580, sobre los niveles de expresión del RNAm para el factor de transcripción NRSF/REST en la corteza cerebral a los 8 y 14 días de EP. En el panel superior se muestra una fotografía representativa de un gel del producto de PCR para NRSF de los cuatro grupos de estudio (Control, GMS, SB y SB+GMS), la flecha derecha indica la correspondencia de pares de bases. En el panel inferior se muestran los valores de la $\bar{x} \pm eem$ de 6 experimentos por duplicado. * $p < 0.001$ GMS vs Control; † $p < 0.001$ SB+GMS vs Control. ‡ $p < 0.001$ SB203580 vs GMS; ⊕ $p < 0.001$ SB+GMS vs GMS. ☆ $p < 0.001$ SB+MSG vs SB203580.

VIII. DISCUSSION

8.1 ESTUDIOS HISTOLOGICOS

La vulnerabilidad de las neuronas al daño excitotóxico por la aplicación de GMS se atribuye, en parte, al estado de maduración de la BHE, debido a que no es permeable a sustancias como el glutamato (Pardridge, 1979). Y dado que la BHE se establece en la cuarta semana de vida, en roedores, la aplicación de GMS en la etapa juvenil de ratas o ratones no induce daño neuronal. Por lo anterior, la aplicación s.c. de GMS en ratas de edad neonatal asegura que llegue a diversas áreas del SNC.

Los análisis morfológicos demuestran que cuatro dosis de GMS (vía s.c.), en el periodo neonatal, inducen daño neuronal. En el análisis microscópico fueron observadas células con signos de daño, tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral, caracterizados por picnosis, hinchamiento celular ocasional, pérdida de la afinidad por la hematoxilina, reducción en el volumen citoplásmico asociado a un proceso de cavitación. El GMS indujo un patrón de excitotoxicidad que se generaliza a regiones como la corteza cerebral frontal y el hipocampo. En contraste, en trabajos semejantes al nuestro, han reportado que la aplicación s.c. de una dosis de GMS (4mg/g de p.c.), induce características morfológicas de daño excitotóxico solo en el núcleo arcuato del hipotálamo (Olney, 1969; Limin y col., 1998), y un incremento en los niveles de Glu evaluados en plasma, así como en dializados de cuerpo estriado y núcleo arcuato (Bogdanov y Wurtman 1994; Bogdanov y col., 1996; Limin y col., 1998).

En el análisis cuantitativo del daño se observó pérdida neuronal en los cortes histológicos, con tinción de H/E, en la corteza cerebral y en menor grado en el hipocampo desde los 8 hasta los 14 días de EP, bajo condiciones normales (grupo control). Por otra parte, los resultados observados en el grupo control al realizar la técnica de TUNEL mostraron neuronas positivas, tanto en hipocampo como en la corteza cerebral, cuantificando un mayor número en esta última región. Estos resultados son comparables a estudios en donde reportan pérdida neuronal asociada a la fragmentación de DNA, producida durante el desarrollo posnatal del cerebro, en particular en la corteza cerebral (Cowan y col., 1984; Raff, 1992; Srinivasan y col., 1998).

La administración neonatal de GMS produjo una disminución en el número de células normales de aproximadamente un 30% en la corteza cerebral. A diferencia, en la región CA1 y CA3, del hipocampo, el número de células con morfología normal

disminuyó hasta un 70 y 40% respectivamente, en relación al grupo control. La disminución en el número de células, con características morfológicas normales en las regiones cerebrales evaluadas, sugiere que existen diferencias regionales a la susceptibilidad del fármaco.

Diversos estudios han mostrado que la muerte celular excitotóxica se debe a un proceso necrótico (Gwang y col., 1997; Lesort y col., 1997), apoptótico (Ankarcona y col., 1996; Lesort y col., 1997), como un proceso que depende de la intensidad del estímulo (Bonfoco y col., 1995; Ankarcona y col., 1996) o como un proceso continuo entre la necrosis y la apoptosis (Portera-Cailliau y col., 1997; 1997b). En el análisis histológico por H/E, en la corteza e hipocampo cerebral, se observaron características morfológicas de los dos tipos de muerte neuronal, la necrosis y la apoptosis. Así, el aumento en el volumen celular y la presencia de núcleos picnóticos con eosinofilia (neuronas rojas) caracterizan a la muerte de tipo necrótico; mientras que la condensación del citoplasma y fragmentación nuclear corresponden a la muerte celular apoptótica.

La administración de GMS en edad neonatal induce muerte neuronal apoptótica, evaluada por el método de TUNEL, tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral. En la región Fr1 de la corteza cerebral se observa que el número de células positivas a TUNEL fue en promedio 1.5 veces mayor que las del control a los 8 y 10 días de EP. En la región CA1 y CA3 del hipocampo el número de células positivas a TUNEL fue más alto hasta 6.0 y 3.0 veces respectivamente, en relación al control. En este modelo de excitotoxicidad el hipocampo muestra una mayor vulnerabilidad al daño que la corteza cerebral, ya que la región CA1 fue más susceptible a la neurodegeneración por Glu. En este sentido, se conoce que las lesiones por isquemia global inducen daño neuronal particularmente en CA1, y que este proceso se asocia a muerte neuronal apoptótica mediada por la sobreactivación de R-Glu (Kirino, 1982; Nitatori y col., 1995; Gorter y col., 1997).

Al sumar el número de células positivas a TUNEL a las células con características morfológicas normales, del grupo de GMS, el total de células fue menor a las células normales evaluadas en el grupo control, de la misma edad. Lo que sugiere que existe otro tipo de muerte neuronal inducida por GMS, posiblemente de tipo

necrótico o por una lenta y progresiva destrucción neuronal no detectada por el método de TUNEL. Para corroborar los resultados anteriores es importante utilizar otros procedimientos de detección de muerte neuronal necrótica, por ejemplo un método de tinción con azul de tripano, en cultivo celulares o células disgregadas. Además de realizar una técnica alterna, por ejemplo la de Anexina V, para confirmar los resultados de apoptosis obtenidos por el método de TUNEL.

Al considerar nuestras evidencias en relación al patrón de daño neuronal que se observa en el trauma encefálico y la isquemia focal, que involucran un componente excitotóxico, en donde la zona adyacente al núcleo isquémico presenta muerte con características de necrosis, mientras que en la zona de penumbra la muerte es de tipo apoptótica (Choi, 1996; Kuroda y Siesjo, 1997). También, se sabe que la muerte neuronal por sobreactivación de los R-Glu tiene implicaciones en diversas enfermedades neurodegenerativas (Lipton y Rosenberg, 1994). Y dado que la aplicación sistémica de GMS, en el presente trabajo, induce cambios morfológicos que confirman la presencia de los dos tipos de muerte neuronal (necrosis y apoptosis), particularmente en el hipocampo; éste modelo nos permite valorar la magnitud del daño neuronal debido al Glu en ausencia de otros factores que pudieran contribuir en la muerte neuronal, por ejemplo una menor disponibilidad de factores tróficos, lo cuál es un factor común en los modelos de isquemia.

Se ha demostrado que el SB203580 (compuesto derivado de piridinil-imidazol) inhibe de manera selectiva la vía p38/SAPK con un valor de IC_{50} de 40nM *in vivo* o *in vitro* (Kumar y col., 1999). Además, se ha reportado que el SB203580 y otros compuestos relacionados compiten con el ATP por el sitio de unión en la proteína p38, lo que inhibe su actividad, más no su activación (Young y col., 1997). Utilizando el mismo modelo de aplicación sistémica de GMS se evaluó el efecto del SB203580, midiendo los niveles de la proteína ATF2^{PP}. El nivel de expresión de ATF2^{PP} entre el grupo de animales control y el tratado con NaClecq no presentó diferencia estadística; esto sugiere que la actividad basal de la vía de señalización p38 observada en el control (intacto) no se modifica por el tratamiento neonatal con NaClecq. Por lo que no se incluyó este grupo en el resto de los experimentos.

Después de la administración de GMS se observó un incremento en los niveles de ATF2^{PP}, lo que implica que la vía de señalización p38/SAPK esta involucrada en el proceso de daño excitotóxico por Glu, tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral. Estos resultados apoyan estudios en cultivos de células granulares cerebelares, tratadas con Glu, en donde se observa un incremento en la inmunoreactividad para p38 activa, y sugieren que la activación de esta vía de señalización es dependiente de $[Ca^{++}]_i$ (Kawasaki y col., 1997). Además, concuerdan con estudios de inmunohistoquímica para p38 fosforilada, con un modelo de trauma focal, en donde el nivel de la proteína p38 permanece elevado aun 24 h después de la oclusión de la arteria cerebral media (Barone y col., 2001; Irving y col., 2000).

En el modelo de aplicación sistémica de GMS, la dosis de SB203580 utilizada fue del orden de μ M, esta dosis no afecta la actividad de otras 12 diferentes proteínas cinasas, incluyendo algunas de la vía ERK y JNK (Cuenda et al., 1995). Los resultados mostraron que el SB203580, administrado previo al GMS por vía s.c., evita el incremento en la inmunoreactividad para ATF2^{PP}, lo que sugiere que la actividad de la p38, por GMS, fue inhibida por el SB203580. La inhibición de la p38/SAPK con el SB203580 induce neuroprotección en los animales tratados con GMS, tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo, estas observaciones son congruentes con estudios en donde la apoptosis inducida por la aplicación de Glu, en cultivos neuronales, es inhibida por el tratamiento con SB203580 (Kawasaki y col., 1997).

Es importante mencionar que el tratamiento neonatal con SB203580 no modificó el número neuronas con morfología normal, ni el número de núcleos positivos a la técnica de TUNEL, en las diferentes edades y regiones de estudio. A excepción de un pequeño incremento a los 14 días de EP, en la corteza cerebral, en donde el número de células con morfología normal del grupo de SB203580 es mayor al del control, lo que podría sugerir un efecto neuroprotector del SB203580 sobre la pérdida neuronal normal que se observó en la corteza cerebral.

El efecto de neuroprotección por la aplicación de SB203580 fue particularmente evidente en la región CA1, del hipocampo. A los 14 días de EP, el GMS induce una reducción del 70% en el número de neuronas normales al ser comparadas con el control, cuando se administró el SB203580 previo al GMS la

reducción en el número de neuronas normales fue solo del 26%. Además, utilizando la técnica de TUNEL, en el grupo de SB+GMS, se observó que el inhibidor de la p38 protegió de la muerte neuronal apoptótica, efecto más significativo en la región CA1. El grado de inhibición de la muerte neuronal apoptótica, por el SB203580, parece depender del porcentaje de neuronas dañadas por el GMS; como lo sugiere el presente trabajo, ya que en la región CA1 se observó un mayor número de células apoptóticas, así como un mayor efecto neuroprotector por la aplicación del SB203580.

En las regiones cerebrales evaluadas la neuroprotección por SB203580 (grupo SB+GMS) es congruente con el incremento en el número de células normales, en el mismo grupo y a la misma edad.

El efecto neuroprotector, del inhibidor de la vía p38, fue menor en la corteza cerebral en donde no se observaron diferencias significativas entre el número de células positivas a TUNEL del grupo de SB+GMS con respecto al grupo de GMS. Si se asume que el SB203580 es más efectivo para proteger de la muerte neuronal en regiones cerebrales más susceptibles al daño por glutamato, en particular para la muerte celular apoptótica, se podría sugerir que la administración neonatal de GMS induce un bajo porcentaje de muerte tipo apoptótica en la corteza cerebral, posiblemente el daño neuronal observado en el estudio histológico sea dado fundamentalmente por la muerte de tipo necrótico. Otra posible explicación podría ser la participación de otra vía de señalización, en la modulación del daño neuronal en esta región, probablemente la vía JNK, por lo que serían necesarios más estudios para valorar la participación de esta vía de señalización en la muerte neuronal excitotóxica.

La muerte neuronal generada por el tratamiento neonatal de GMS, en las primeras etapas del desarrollo posnatal, podría inducir modificaciones que alterarían los patrones normales de sinaptogénesis, diferenciación y migración celular lo cual tendría profundos efectos en la función normal del cerebro, de animales adultos, que podrían favorecer el desarrollo de padecimientos neurodegenerativos.

8.2 ESTUDIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Diversos estudios de unión de ligando a los R-Glu (McDonald y Johnston, 1990), de Northern blot (Durand y Zukin, 1993), hibridación, RT-PCR y Western blot

(Portera-Cailliau y col., 1996); sugieren una regulación espacio-temporal de la expresión de los R-NMDA y no-NMDA durante el desarrollo cerebral. Los anteriores estudios revelan que el pico máximo de densidad de R-NMDA se presenta durante las dos primeras semanas de vida posnatal en rata, periodo que representa una etapa determinante en la formación de redes neurales y en la maduración de los diferentes sistemas de neurotransmisión (Coyle, 1982; Spreafico y Frassoni, 1993; Aghajanian y Bloom, 1967). Además, se ha establecido que el RNAm y la proteína de la subunidad NR1 se incrementan durante este periodo de vida posnatal, en condiciones normales (Monyer y col., 1993; Goebel y Poosch, 1999, Takai y col., 2003). Estas observaciones son congruentes con los resultados obtenidos en este trabajo, en animales del grupo control, donde el nivel de expresión de la subunidad NR1, en el hipocampo y corteza cerebral, mostró el patrón de expresión observado en el desarrollo normal del cerebro. Sin embargo, los cambios regionales o celulares que ocurren (o no ocurren) en la expresión de las proteínas que constituyen los R-Glu no se comprenden del todo aun, particularmente en el contexto de la vulnerabilidad potencial al daño.

Los niveles de expresión de las subunidades NR2A-D de los R-NMDA fueron evaluadas solo a los 14 días de EP en el grupo control y GMS. Los niveles de RNAm del grupo control corresponden en su mayoría a los reportados en la literatura (Monyer y col., 1994; Dunah y col., 1998; Goebel y Poosch, 1999); un nivel mayor para NR2A que para NR2B tanto en el hipocampo como en la corteza, lo que concuerda con el hecho de que esta última subunidad disminuye progresivamente después del nacimiento. En cuanto a la expresión de NR2C se observó un bajo nivel en el hipocampo, lo que podría significar que aun no se alcanza el nivel de expresión observado en el adulto y además esta subunidad parece ser más abundante en cerebelo (Thompson y col., 2000), los resultados concuerdan con estudios en los que se evalúa el nivel de la proteína en el hipocampo (Monyer y col., 1994; Takai y col., 2003). Sin embargo, otros estudios no reportan la expresión de NR2C en esta región (Wenzel y col., 1997; Mori y Mishina, 1995). Además, se observó la expresión subunidad NR2D aunque en muy bajos niveles en la corteza cerebral, lo cual no es totalmente consistente con lo reportado en la literatura, debido a que esta subunidad está presente

fundamentalmente en el tallo cerebral (Wenzel y col., 1997). Las discrepancias en los resultados podrían deberse a diferencias en la sensibilidad del método de detección utilizado.

En los modelos de excitotoxicidad, la susceptibilidad al daño por agonistas de los R-Glu depende de la etapa del desarrollo; y además los patrones de muerte celular son distintos para las diferentes regiones y tipos neuronales (McDonald y Johnston, 1990; Portera-Cailliau y col., 1997; Portera-Cailliau y col., 1997b). Los resultados del presente trabajo, así como los reportados en la literatura, sugieren que la respuesta regional del cerebro inmaduro o adulto a la excitotoxicidad depende por lo menos parcialmente de los cambios relacionados con la edad, en relación a la expresión y función de los R-Glu. De esta forma, se ha demostrado que durante los primeros cinco días de edad posnatal la activación de los R-GABA_A conduce a despolarización, lo que favorece la activación de los R-NMDA, por la eliminación del bloqueo por Mg⁺⁺ en el receptor (Leinekugel y col., 1997).

El tratamiento neonatal con GMS incrementa la expresión del RNAm para NR1 con respecto al control, en la mayoría de las edades evaluadas tanto en hipocampo como en la corteza cerebral. En este sentido, diferentes evidencias experimentales han demostrado que las modificaciones en los niveles de Glu extracelular inducen cambios en la expresión de las subunidades que constituyen los R-NMDA (Limn y col., 1998, Cebers y col., 2001). Dado que, la subunidad NR1 es indispensable en la formación de R-NMDA funcionales y su nivel de expresión podría determinar la conformación y por lo tanto la abundancia del R-NMDA (Seeburg, 1993); los resultados obtenidos sugieren que el incremento en la formación de R-NMDA podría llevar a la acumulación de Ca⁺⁺ y Na⁺ en el espacio intracelular, esto constituye un componente importante en el proceso de daño neuronal mediado por la aplicación neonatal GMS.

Además, los cambios en los niveles de la expresión de las subunidades NR2, por efecto de la aplicación GMS, no son significativos para la subunidad NR2A y NR2C en hipocampo, ni para NR2D en corteza, sin embargo la expresión de la subunidad NR2B, aumentó por el efecto del GMS, de 2 y 3 veces en la corteza cerebral e hipocampo respectivamente. De esta forma, podríamos deducir que bajo condiciones

de excitotoxicidad se promueve la formación de R-NMDA heteroméricos NR1/NR2B. En estudios funcionales de coexpresión heteróloga se demostró que la presencia de la subunidad NR2B determina una mayor afinidad por el Glu y la Gli, que la que se observa para los receptores formados por NR1/NR2A (Buller y col., 1994) y también muestran una menor sensibilidad al bloqueo del canal por Mg^{++} . Por lo que, bajo las condiciones de daño excitotóxico inducido por la aplicación de GMS se favorecería la formación de un mayor número de receptores NMDA, con características fisiológicas que facilitan su activación, como las que confiere la presencia de la subunidad NR2B, en el receptor. Las evidencias experimentales sugieren que la actividad funcional, así como la abundancia, de R-NMDA parece estar regulado por mecanismos dependientes de actividad (Fields y Nelson, 1992; Didier y col., 1994; Resink y col., 1995).

Por otra parte, los R-AMPA se distribuyen ampliamente en todo el SNC, aunque existen diferencias regionales. Las regiones cerebrales que expresan de forma abundante los R-AMPA incluyen: el hipocampo, en donde la región CA1 presenta mayor densidad que la CA3, y la corteza cerebral (Insel y col., 1990). En este trabajo, no se observó la expresión del RNAm para GluR1 en la corteza cerebral, dato que no apoya totalmente lo reportado en la literatura ya que, aunque bajo, si se observa expresión de GluR1 en la corteza frontal a los 14 días de EP; sin embargo el mayor nivel de GluR1 reportado en esta región es a los 21 días de EP. Mientras que en el hipocampo, del grupo control, si se observó expresión de GluR1 que mostró un pequeño incremento con respecto a la edad evaluada, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, en donde el pico máximo de expresión de esta subunidad se reporta a los 14 días de EP (Pellegrini-Giampietro y col., 1991).

El nivel de RNAm para GluR2 incrementó con respecto a la edad en el hipocampo y la corteza cerebral, de animales del grupo control; lo que corresponde con el pico máximo de expresión que se reportó en un estudio por hibridación *in situ*, a los 14 días de EP; además en este estudio reportan diferencias regionales en la expresión de GluR2, siendo mayor en CA1 que en CA3 y giro dentado (Pellegrini-Giampietro, 1991).

En conclusión, los genes de GluR1 y 2 muestran diferentes patrones de expresión espacial y temporal en el desarrollo posnatal, del cerebro de rata. Estos

hallazgos sugieren que las subunidades que constituyen los R-AMPA tienen funciones únicas durante el desarrollo, como lo indican varios trabajos (Levitan y col., 1988; Witzemann y col., 1989). Bajo condiciones normales, las principales neuronas excitadoras del hipocampo (Bochet y col., 1994) y neocorteza (Jonas y col., 1994) muestran una muy baja permeabilidad al Ca^{++} , y una abundante expresión de RNAm para GluR2. Los R-AMPA en estas células se forman predominantemente en combinaciones heterómericas de GluR1/GluR2 y de GluR2/GluR3 (Wenthold y col., 1996). Lo anterior está en acuerdo con lo reportado en el presente trabajo, aunque faltaría evaluar el nivel de expresión de GluR3.

El perfil de expresión de GluR2 en la corteza cerebral, bajo el efecto del GMS, mostró un incremento entre los 8 y 12 días de EP y una disminución del 54% a los 14 días, con respecto al control. Estos resultados concuerdan con lo que se observó en el análisis inmunohistoquímico para GluR2 a los 8 y 14 días de EP, tras la administración de GMS. Este análisis sugiere la presencia de un mayor número de R-AMPA con GluR2, en la corteza cerebral de los animales de 8 y 12 días de EP, por efecto del GMS; lo que podría indicar que la mayoría de los R-AMPA, bajo estas condiciones no permiten la entrada de Ca^{++} a la célula.

Como ocurre en diversos estudios con modelos de isquemia global, la expresión del RNAm de GluR2 se redujo tras la inducción del daño neuronal, por la aplicación subcutánea neonatal de GMS, en el hipocampo.

En otros estudios, la reducción en la expresión de GluR2 solo se observó en células piramidales de CA1, vulnerables al daño por isquemia; mientras que en CA3 y el giro dentado no se redujo la expresión de GluR2 (Gorter y col., 1997). Para corroborar si la disminución en la expresión del RNAm GluR2 que se observó en el hipocampo completo por efecto del GMS, corresponde con lo reportado, en el presente trabajo se evaluó la presencia de la proteína GluR2, estos resultados sugieren que la disminución en la expresión del RNAm de GluR2 es consecuencia de una baja específica en la región CA1, como lo indica la inmunotinción de la proteína GluR2.

La administración neonatal con GMS induce un incremento en los niveles de RNAm para GluR1 y una reducción para GluR2, con respecto a la edad en el hipocampo de estos animales, lo que sugiere un aumento en la formación de R-AMPA,

sin GluR2. Estudios que involucran registros de corrientes iónicas y de expresión por PCR, demuestran que la abundancia de GluR2 esta inversamente relacionada a la permeabilidad al Ca^{++} por el R-AMPA en un amplio rango de tipos celulares (Burnashev, 1996). Algunos datos indican que la disminución en la expresión de GluR2, en las neuronas que normalmente es abundante, predice la vulnerabilidad neuronal al daño. También se ha reportado que la excitotoxicidad mediada por el R-AMPA presenta un curso temporal más lento (ocurre en varios días) y que la muerte neuronal es de naturaleza apoptótica (Larm y col., 1997). Este patrón único de excitotoxicidad podría ser fundamental para que ocurra la degeneración lenta y progresiva de las células neuronales en desordenes neurológicos, colocando al R-AMPA como un blanco terapéutico en el daño neuronal. Estas evidencias permiten sugerir que la muerte neuronal apoptótica observada en el hipocampo, de los animales tratados neonatalmente con GMS, podría ser una consecuencia de la disminución en la expresión de la subunidad GluR2, y por lo tanto de la entrada masiva de Ca^{++} a través de R-AMPA permeables a este ion.

Así, los resultados de los estudios de expresión de las diferentes subunidades a los R-Glu, sugieren que el tratamiento neonatal con GMS modifica el perfil del sistema de neurotransmisión glutamatérgico, tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo, específicamente induciendo cambios en la estructura y por lo tanto en la función de los R-Glu, los cuales favorecerían un incremento en la concentración intracelular de Ca^{++} , alcanzando niveles tóxicos para las células que resultan posiblemente en la potenciación de un evento excitotóxico generado por la aplicación de Glu.

Actualmente los mecanismos moleculares por los cuales se altera la expresión de GluR2 no se han determinado completamente, en condiciones de daño neuronal. Después de inducir isquemia global la expresión de factores de transcripción, incluyendo productos de genes de expresión temprana, proteínas de estrés y factores neurotróficos se alteran en la región CA1 del hipocampo (Aoki y col., 1993; Nowak y col., 1993; Takeda y col., 1993; Kindy y col., 1994; Kokaia y col., 1994; Kamme y col., 1995). Estas proteínas son posibles candidatos en la regulación a la baja de la expresión de GluR2, reduciendo la eficiencia de la transcripción y/o la estabilidad del

producto. La disminución del RNAm y la proteína GluR2 no es simplemente el resultado de la pérdida de la capacidad transcripcional o traduccional, sino el resultado de un cambio regulatorio aparentemente no ventajoso para el sistema. También, es probable que el mecanismo de regulación responsable de la reducción en la expresión de GluR2 este activo en algunos procesos fisiológicos, como en el desarrollo embrionario del cerebro (Pellegrini-Giampietro y col., 1991).

La disminución en la expresión de la subunidad GluR2, que se asocia al incremento en la formación de R-AMPA permeables a Ca^{++} , concuerda con la inducción de cambios transcripcionales inducidos por vías de transducción de señales de la membrana celular al núcleo.

El presente trabajo muestra evidencias de que la vía de señalización p38/SAPK interfiere en los mecanismos de regulación de la expresión de los R-Glu, en particular las subunidades GluR1 y GluR2 del R-AMPA. Como lo demuestra el análisis del efecto del SB203580, en donde se observó que el inhibidor evita los cambios en el nivel de expresión de RNAm de estas subunidades, inducido por la aplicación de GMS.

Durante la embriogénesis, el NRSF se expresa de manera generalizada y juega un papel estratégico en la elaboración y especificación del fenotipo neuronal, ya que regula a la baja la expresión de diferentes genes específicos neuronales, en progenitores neurales. El presente estudio muestra un bajo nivel de expresión del RNAm de NRSF en el grupo control, lo que es consistente con otros estudios (Palm y col., 1998) que sugieren que los bajos niveles de NRSF, bajo condiciones fisiológicas, pueden reflejar un control fino de genes blanco, implicado en la plasticidad sináptica dependiente de actividad (Shimojo y col., 1999).

En el presente trabajo, la administración de GMS induce un incremento en la expresión de RNAm para NRSF en la corteza cerebral y en el hipocampo, en las dos edades evaluadas, siendo más alto el nivel en el hipocampo a los 14 días de EP. Lo anterior sugiere que la reducción en el niveles de expresión de GluR2 se da a través de la actividad inhibidora de la transcripción por NRSF sobre RE1, en la región promotora del gen de GluR2. Los presentes resultados concuerdan con estudios en donde las crisis convulsivas y el daño isquémico marcadamente regulan a la alta la

expresión de REST, suprimiendo la actividad promotora del gen de GluR2, en neuronas hipocampales vulnerables (Palm y col., 1998; Calderone y col., 2003), y sugieren, además, que estos eventos podrían formar parte de un mecanismo de inducción de muerte neuronal, inducido por daño.

La administración de SB203580, previó al GMS, evita el incremento en la expresión de NRSF, inducido por el daño excitotóxico. Lo que sugiere una posible interacción entre los mecanismos de regulación de la expresión de p38/SAPK y NRSF, por lo que son necesarios más estudios para identificar los componentes de la cascada de señalización que regula la expresión de NRSF y por lo tanto la del gen de GluR2.

El conocimiento detallado de las vías de señalización que se activan después de la sobre-estimulación de los receptores a Glu es determinante para proponer mecanismos de prevención del daño neuronal, inducido por hipoxia e isquemia. Los resultados presentados sugieren que la activación de la vía de señalización por p38 es un componente necesario de la muerte neuronal inducida por glutamato. Además, establecen una posible interacción entre los mecanismos de regulación de la expresión de los R-Glu, y la vía p38, a través del factor silenciador de la transcripción NRSF. Estos estudios en conjunto pueden ayudar a demostrar que la inhibición de p38, puede ser una estrategia neuroprotectiva útil en el tratamiento de enfermedades neurológicas.

8.3. CONCLUSIONES

La administración de GMS en etapa neonatal, por vía subcutánea, induce:

- Un patrón de excitotoxicidad, que no se había demostrado en estudios de aplicación sistémica de glutamato.
- La formación de R-Glu que favorecen el daño excitotóxico. Esto debido a que se inducen cambios en la expresión de las subunidades que constituyen tanto los R-NMDA como R-AMPA, permitiendo la conformación de canales permeables a Ca^{++} .
- Un incremento en el número de células apoptóticas positivas a TUNEL, aunque es evidente un remanente de células muertas que sugiere la ocurrencia de otro tipo de muerte celular, presumiblemente de tipo necrótico.
- El SB203580 reduce significativamente la muerte neuronal en las regiones evaluadas por HE y en el análisis de células apoptóticas por TUNEL.
- Los cambios observados en los niveles de expresión de las subunidades a GluR2 en corteza y GluR1 y GluR2 en hipocampo, se revierten por la aplicación del SB203580.
- Los datos de expresión de GluR2 y NRSF indican una relación entre la activación de la vía p38, la modulación de la transcripción génica vía NRSF y la expresión del RNAm de NRSF.

IX. BIBLIOGRAFIA

Aghajanian GK, Bloom FE (1967) The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study. *Brain Res* 6:716-727.

Ahn NG, Krebs EG (1990) Evidence for an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade in Swiss 3T3 cells. Activation of serine peptide kinase activity by myelin basic protein kinases *in vitro*. *J Biol Chem* 265:11495-11450.

Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347:150-160.

Albin RL, Greenamyre JT (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* 42:733-738.

Alessandrini A, Crews CM, Erikson RL (1992) Phorbol ester stimulates a protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 89:8200-8204.

Almeida A, Heales SJR, Bolaños JP, Medina JM (1998) Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res* 790:209-216.

Alsarraf H, Preston JE, Segal MB (1995) The entry of acidic amino acids into brain and CSF during development, using in situ perfusion in rat. *Develop Brain Res* 90:151-158.

Andine P, Orwar O, Jakobson I, Sandberg M, Hagberg H (1991) Changes in extracellular aminoacids and spontaneous neuronal activity during ischemic and extended reflow in the CA1 of the rat hippocampus. *J Neurochem* 57:222-229.

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

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

Aoki M, Abe K, Kawagoe J, Nakamura S, Kogure K (1993) Acceleration of HSP70 and HSC70 heat shock gene expression following transient ischemia in the preconditioned gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:781-788.

Ballas N, Battaglioli E, Atouf F, Andres ME, Chenoweth J, Anderson ME, Burger C, Moniwa M, Davie JR, Bowers WJ, Federoff HJ, Rose DW, Rosenfeld MG, Brehm P, Mandel G (2001) Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron* 31: 352-365.

Bannai S (1986) Exchange of cysteine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J Biol Chem* 261:2256-2263.

Barish ME (1998) Intracellular calcium regulation of channel and receptor expression in the plasmalemma: potential sites of sensitivity along the pathways linking transcription, translation, and insertion. *J Neurobiol* 37:146-157.

Barone FC, Irving EA, Ray AM, Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger AM, White RF, McVey MJ, Legos JJ, Erhardt JA, Nelson AH, Ohlstein EH, Hunter AJ, Ward K, Smith BR, Adams JL, Parsons AA (2001) SB 239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 296:312-321.

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

Beas- Zárate C, Flores-Soto ME, Armendáriz-Borunda J (2002a) NMDAR2C and 2D subunits gene expresión is induced in brain by neonatal exposure of monosodium L-glutamate to adults rats. *Neurosci Lett* 321:9-12.

Beas- Zárate C, Rivera-Huizar SV, Martínez-Contreras A, Feria-Velasco A, Armendáriz-Borunda J (2001) Changes in NMDA-receptor gene expresión are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. *Neurochem Int* 39:1-10.

Beilharz EJ, Williams ChE, Dragunow M, Sirimanne ES, Gluckman PD (1995) Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the mature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Mol Brain Res* 29:1-14.

Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH (1984) Elevation of extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43:1369-1374.

Bernard A, Khrestchatisky M (1994) Assessing the extent of RNA editing in the TMII regions of GluR5 and GluR6 kainate receptors during rat development. *J Neurochem* 62:2057-2060.

Bito H (1998) The role of calcium in activity-dependent neuronal gene regulation. *Cell Calcium* 23:143-150.

Blumer KJ, Johnson GL (1994) Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem Sci* 6:236-240.

Bochet P, Audinat E, Lambolez B, Crepel F, Rossier J, Iino M, Tsuzuki K, Ozawa S (1994) Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron* 12:383-388.

Bogdanov MB, Tjurmina OA, Wurtman RJ (1996) Consumption of a high dietary dose of monosodium glutamate fails to affect extracellular glutamate levels in the hypothalamic arcuate nucleus of adult rats. *Brain Res* 736:76-81.

Bogdanov MB, Wurtman RJ. (1994) Effects of systemic or oral ad libitum monosodium glutamate administration on striatal glutamate release, as measured using microdialysis in freely moving rats. *Brain Res* 660:337-40.

Bonfoco E, Krain D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-Methyl-D-Aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92:7162-7166.

Brecht S, Gelderblom M, Srinivasan A, Mielke K, Dityateva G, Herdegen T (2001) Caspase-3 activation and DNA fragmentation in primary hippocampal neurons following glutamate excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res* 94:25-34.

Buchan A, Li H, Pulsinelli WA (1991) N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, fails to protect against neuronal damage caused by transient, severe forebrain ischemia in adult rats. *J Neurosci* 11:1049-1056.

Buller AL, Larson HC, Schneider BE, Beaton JA, Morrisett RA, Monaghan DT (1994) The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J Neurosci* 14:5471-5484.

Bullock R, Zauner A, Woodward J, Young HF (1995) Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. *Stroke* 26:2187-9.

Burnashev N (1996) Calcium permeability of glutamate gated channels in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 6: 311-317.

Burnashev N, Monyer HM, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8:189-198.

Calderone A, Jover T, Noh KM, Tanaka H, Yokota H, Lin Y, Grooms SY, Regis R, Bennett MV, Zukin RS (2003) Ischemic insults derepress the gene silencer NRSF in neurons destined to die. *J Neurosci* 23:2112-2121.

Cebers G, Cebere A, Kovacs AD, Hogberg H, Moreira T, Liljequist S (2001) Increased ambient glutamate concentration alters the expression of NMDA receptor subunits in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 2:151-60.

Chen H, Tini M, Evans RM (2001) HATs on and beyond chromatin. *Curr Opin Cell Biol* 13:218-224.

Cheung NS, Carrol FY, Larm JA, Beart PM, Giardina SF (1998) Kainate-induced apoptosis correlates with c-Jun activation in Cultured Cerebellar granule Cells. *J Neurosci Res* 52:69-82.

Chittajallu R, Braithwaite SP, Clarke VRJ, Henley JM (1999) Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci* 20:26-35.

Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379.

Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.

Choi DW (1990) Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J Neurosci* 10:2493-2501.

Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-76.

Choi DW (1992a) Bench to bedside: the glutamate connection. *Science* 258:241-243.

Choi DW (1992b) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.

Choi DW (1995) Calcium: still center stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18:58-60.

Choi DW (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Current Opinion in Neurobiology* 6:667-672.

Choi DW, Maulucci-Gede M, Kriegstein AR (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7:357-368.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step of isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytic Biochem* 162:156-159.

Connick JH, Stone TW (1989) Quinolinic acid neurotoxicity: protection by intracerebral phenylisopropyladenosine (PIA) and potentiation by hypotension. *Neurosci Lett* 101:191-196.

Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DD, Stanfield BB (1984) Regressive events in neurogenesis. *Science* 225:1258-1265.

Cox JA, Lysko PG, Henneberry RC (1989) Excitatory amino acid neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured neurons: role of the voltage-dependent magnesium block. *Brain Res* 499:267-272.

Coyle JT (1982) Development of neurotransmitters in the neocortex. *Neurosci Res Bull* 20: 479-491.

Crews CM, Erikson RL (1998) Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* 74:215-217.

Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gañagher TF, Young PR, Lee JC (1995) SB203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364:229-233.

Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK (2000) Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J* 14:955-967.

Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR (1994) The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 11:474-480.

Davalos A, Castillo J, Serena J, Noya M (1997) Duration of glutamate release after acute ischaemic stroke. *Stroke* 28:708-710.

Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239-252.

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76:1025-1037.

Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267:5198-5202.

Deshmukh M, Jonson (1997) Programmed cell death in neurons: focus on the pathway of nerve growth factor deprivation-induced death of sympathetic neurons. *Mol Pharmacol* 51:897-906.

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.

Didier M, Mienville JM, Soubrie P, Bockaert J, Berman S, Bursztajn S, Pin JP (1994) Plasticity of NMDA receptor expression during mouse cerebellar granule cell development. *Eur J Neurosci* 6: 1536-1543.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptors ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.

Dingledine R, McBain CJ (1999) Glutamate and aspartate. En: Basic Neurochemistry. Editores: Siegel JG, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. pp 315-333 Lippincott-Raven Press PH.

Dugan LL, Choi DW (1999) Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. En Basic Neurochemistry. Editores: Siegel JG, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. Lippincott-Raven Press, PH. pp 711-729.

Dunah AW, Luo J, Wang YH, Yasuda RP, Wolfe BB (1998) Subunit composition of N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system that contain the NR2D subunit. *Mol Pharmacol* 53:429-437.

Durand GM, Zukin RS (1993) Developmental regulation of mRNAs encoding rat brain kainate/AMPA receptors: a northern analysis study. *J Neurochem* 61:2239-2246.

Ebraldze AK, Rossi DJ, Tonegawa S, Slater NT (1996) Modification of NMDA receptor channels and synaptic transmission by targeted disruption of the NR2C gene. *J Neurosci* 16:5014-25.

Eimerl S, Schramm M (1991) Acute glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells: agonist potency, effects of pH, Zn²⁺ and the potentiation by serum albumin. *Brain Res* 560:282-290.

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology* 7:663-698.

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.

Farber JL (1982) Biology of disease: membrana injury and calcium homeostais in the pathogenesis of coagulation necrosis. *Lab Invest* 47: 114-123.

Farber JL, Chien KR, Mittnacht S Jr (1981) The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol* 102: 271-281.

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.

Favit A, Nicoletti F, Scapagnini U, Canonico PL (1992) Ubiquinone protects cultured neurons against spontaneous and excitotoxin-induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:638-645.

Ferrer I, Blanco R, Carmona M (2001) Differential expression of active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates following quinolinic acid excitotoxicity in the rat. *Mol Brain Res* 94:48-58.

Ferrer I, Martin F, Serrano T, Reiriz J, Perez-Navarro E, Alberch J, Macaya A, Planas AM (1995) Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins. *Acta Neuropathol (Berl)* 90:504-510.

Fields RD, Nelson PG (1992) Activity-dependent development of the vertebrate central nervous system. *Inter Rev Neurobiol* 34: 133-214.

Filipkowski RK, Hetman M, Kaminska B, Kaczmarek L (1994) DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *Neuroreport* 5:1538-40.

Flint AC, Maisch US, Weishaupt JH, Kriegstein AR, Monyer H (1997) NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J Neurosci* 17:2469-2476.

Frandsen A, Schousboe A (1990) Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int J Develop Neurosci* 8:209-216.

Friedman LK, Pellegrini-Giampietro DE, Sperber EF, Bennett MVL, Moshe SL, Zukin RS (1994) Kainate-induced *status epilepticus* alters glutamate and GABAA receptor gene expression in adult rat hippocampus: an *in situ* hybridization study. *J Neurosci* 14:2697-2707.

Ganiatsas S, Kwee L, Fujiwara Y, Perkins A, Ikeda T, Labow MA, Zon LI (1998) SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 95:6881-6886.

Garthwaite G, Willams GD, Garthwaite J (1992) Glutamate toxicity : an experimental and theoretical analysis. *Eur J Neurosci* 4:353-360.

Gill R (1994) The pharmacology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA)/kainate antagonists and their role in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 6:225-256.

Gill R, Lodge D (1997) Pharmacology of AMPA antagonists and their role in neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* 40:197-232.

Goebel DJ, Poosch MS (1999) NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res* 69:164-170.

Goldberg MP, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: Calcium-dependent injury and calcium independent-mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13:3510-3524.

Gonoi T, Mizuno N, Inagaki N, Kuromi H, Seino Y, Miyazaki J, Seino S (1994) Functional neuronal ionotropic glutamate receptors are expressed in the non-neuronal cell line, MIN6. *J Biol Chem* 269:16989-16992.

Gorter JA, Petrozzino JJ, Aronica EM, Rosebaun DM, Thoralf O, Bennett MVL, Connor JA, Zukin S (1997) Global ischemia induced downregulation of GluR2 mRNA and increases AMPA receptors-mediated Ca⁺⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci* 17:6179-6188.

Gotoh Y, Nishida E, Matsuda S, Shiina N, Kosako H, Shiokawa K, Akiyama T, Ohta K, Sakai H (1991) In vitro effects on microtubule dynamics of purified Xenopus M phase-activated MAP kinase. *Nature* 349:251-254.

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.

Gum RJ, McLaughlin MM, Kumar S, Wang Z, Bower MJ, Lee JC, Adams JL, Livi GP, Goldsmith EJ, Young PR (1998) Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *J Biol Chem* 273:15605-15610.

Gunn-Moore FJ, Tavare JM (1998) Progress toward understanding the molecular mechanisms of neurotrophic factor signalling. *Cell Signal* 3:151-157.

Gwag BJ, Koh JY, DeMaro JA, Ying HS, Jacquin M, Choi DW (1997) Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. *Neuroscience* 77:393-401.

Gwag BJ, Lobner D, Koh JY, Wie MB, Choi DW (1995) Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro. *Neurosci* 68:615-619.

Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nystrom B, Jacobson I, Hamberger A (1985) Ischemic-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J Cereb Blood Flow Metab.* 5: 413-419.

Hale KK, Trollinger D, Rihanek M, Manthey CL (1999) Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol* 162:4246-4252.

Hall JP, Merithew E, Davis RJ (2000) c-Jun N-terminal kinase (JNK) repression during the inflammatory response? Just say NO. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 97:14022-14024.

- Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ (1997a)** Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386:296-299.
- Han J, Lee JD, Jiang I, Li Z, Feng L, Ulevitch RJ (1996)** Characterization of the structure and function of a novel MAP Kinase Kinase (MKK6). *J Biol Chem* 271:2886-2891.
- Han J, Wang X, Jiang Y, Ulevitch RJ, Lin S (1997b)** Identification and characterization of a predominant isoform of human MKK3. *FEBS Lett* 403:19-22.
- Harper SJ, LoGrasso P (2001)** Signalling for survival death in neurons. The role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signalling* 13:299-310.
- Hawkins RA, DeJoseph MR, Hawkins PA (1995)** Regional brain glutamate transport in rats at normal and raised concentrations of circulating glutamate. *Cell Tissue Res* 281:207-214.
- Haystead TA, Haystead CM, Hu C, Lin TA, Lawrence JC (1994)** Phosphorylation of PHAS-I by mitogen-activated protein (MAP) kinase. Identification of a site phosphorylated by MAP kinase in vitro and in response to insulin in rat adipocytes. *J Biol Chem* 269:23185-191.
- Hazzalin CA, Cano E, Cuenda A, Barratt MJ, Cohen P, Mahadevan LC (1996)** p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr Biol* 6:1028-1031.
- Henneberry RC, Novelli A, Cox JA, Lysko PG (1989)** Neurotoxicity of N-Methyl D-Aspartate receptor in energy-compromised neurons. An hypothesis for cell death in aging and disease. *Ann NY Acad Sci (USA)* 568:225-233.
- Higushi M, Single FN, Köhler M, Sommer B, Sprengel R, Seeburg PH (1993)** RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* 75:1361-1370.
- Hollman M, Hartley M, Heinemann S (1991)** Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptors channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853.
- Hossmann KA (1994)** Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischaemia: The excitotoxin hypothesis revisited. *Brain Pathol* 4: 23-36.
- Huang Y, Doherty JJ, Dingledine R (20002)** Altered histone acetylation at glutamate receptor 2 and brain-derived neurotrophic factor genes is an early event triggered by status epilepticus. *J Neurosci* 22:8422-8428.

Insel TR, Miller LP, Gelhard RE (1990) The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain--I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* 35:31-43.

Ip YT, Davis RJ (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205-219.

Irving EA, Barone FC, Reith AD, Hadingham SJ, Parsons AA (2000) Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 77:65-75.

Ito I, Futai K, Katagiri H, Watanabe M, Sakimura K, Mishina M, Sugiyama H (1997) Synapse-selective impairment of NMDA receptor functions in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 or epsilon 2 subunit. *J Physiol* 500:401-408.

Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β). *J Biol Chem* 271:17920-17926.

Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J (1997) Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 272:30122-30128.

Jonas P, Burnashev N (1995) Molecular Mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptors channels. *Neuron* 15:987-990.

Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H (1994) Differences in Ca⁺⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptors channels in neocortical neurons caused by differential GluRB subunit expression. *Neuron* 12:1281-1289.

Kallunki T, Su B, tselny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis RJ, Karin M (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-jun binding and phosphorylation. *Genes Dev* 8:2996-3007.

Kamme F, Campbell K, Wieloch T (1995) Biphasic expression of the fos and jun families of transcription factors following transient forebrain ischaemia in the rat. Effect of hypothermia. *Eur J Neurosci* 7:2007-2016.

Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 3:381-391.

Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, Nishida E (1997) Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 272:18518-18521.

Keinänen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH (1990) A family of AMPA –selective glutamate receptors. *Science* 249:556-560.

Kindy MS, Hu Y, Dempsey RJ (1994) Blockade of ornithine decarboxylase enzyme protects against ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:1040-1045.

Kirino T (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischaemia. *Brain Res* 239:57-69.

Kohr G, Heinemann U (1989) Effects of NMDA antagonists on picrotoxin-low Mg^{++} and low Ca^{++} -induced epileptogenesis and on evoked changes in extracellular Na^{+} and Ca^{++} concentrations in rat hippocampal slices. *Epilepsy Res* 4:187-200.

Kokaia Z, Metsis M, Kokaia M, Bengzon J, Elmer E, Smith ML, Timmusk T, Siesjo BK, Persson H, Lindvall O (1994) Brain insults in rats induce increased expression of the BDNF gene through differential use of multiple promoters. *Eur J Neurosci* 6:587-596.

Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351:289-305.

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

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22:667-676.

Kumagae Y, Zhang Y, Kim OJ, Miller CA (1999) Human c-Jun N-terminal kinase expression and activation in the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 67:10-17.

Kumar S, Jiang MS, Adams JR, Lee JC (1999) Pyridinylimidazole compound SB203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biophys Res Comm* 263:825-831.

Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA (1997) Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272: 20490-20494.

Kure S, Tominaga T, Yoshimoto T, Tada K, Narisawa K (1991) Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 179:39-45.

Kuroda S, Siesjo BK (1997) Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci* 4:199-212.

Kyriakis JM, Avruch J (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* 271:313-324.

Larm JA, Cheung NS, Beart PM (1997) Apoptosis induced via AMPA-selective glutamate receptors in cultured murine cortical neurons. *J Neurochem* 69:2 617-622.

Lees GJ, Leong W (1996) Interactions between excitotoxins and the Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor ouabain in causing neuronal lesions in the rat hippocampus. *Brain Res* 714:145-155.

Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA_A and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18:243-55.

Lesort M, Esclaire F, Yardin C, Hugon J (1997) NMDA induces apoptosis and necrosis in neuronal cultures. Increased APP immunoreactivity is linked to apoptotic cells. *Neurosci Lett* 221:213-216.

Lester RAJ, Clements JD, Westbrook GL, Jahr CE (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* 346:565-567.

Levitan ES, Schofield PR, Burt DR, Rhee LM, Wisden W, Kohler M, Fugita N, Rodríguez HF, Stephenson A, Darlinson MG, Barnard EA, Seeburg PH (1988) Structural and functional basis for GABAA receptor heterogeneity. *Nature* 335:76-79.

Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228:334-340.

Limbrick DD, Chrun SB, Sombati S, DeLorenzo RJ (1995) Inability to restore resting intracellular calcium levels as an early indicator of delayed neuronal cell death. *Brain Res* 690:45-156.

Limin H, Fernstrom JD, Goldsmith PC (1998) Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. *Neuroendocrinology* 68:77-88.

Limin H, Fernstrom JD, Goldsmith PC (1998) Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. *Neuroendocrinology* 68:77-88.

Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-22.

Liverton NJ, Butcher JW, Claiborne CF, Claremon DA, Libby BE, Nguyen KT, Pitzenger SM, Selnick HG, Smith GR, Tebben A, Vacca J-P, Varga SL, Agarwal

L, Dancheck K, Forsyth AJ, Fletcher DS, Frantz B, Hanlon WA, Harper CF, Hofsess SJ, Kostura J, Lin J, Luell S, Nelly EA, Keefe SJ (1999) Design and síntesis of potent, selective and orally bioavailable tetra substituted imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Med Chem* 42:2180-2190.

Livingstone C, Patel G, Jones N (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J* 14:1785-1797.

LoGrasso PV, Frantz B, Rolando AM, O-Keefe SJ, Hermes JD, O'Neill EA (1997) Kinetic mechanism for p38 MAP kinase. *Biochemistry* 36:10422-10427.

Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 58:193-201.

MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321:519-522.

Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E (1989) Delayed increase of Ca^{2+} influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol* 36:106-112.

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage dependent block by Mg^{++} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.

Mayer ML, Westbrook GL (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28:197-276.

McDonald JW, Johnston MV (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Rev* 15:41-70.

McDonald JW, Schoepp DD (1992) The metabotropic excitatory amino acid receptor agonist 1S,3R-ACPD selectively potentiates N-methyl-D-aspartate-induced brain injury. *Eur J Pharmacol* 215:353-354.

McLaughlin MM, Kumar S, McDonnell PC, Van Horn S, Lee JC, Livi GP, Young PR (1996) Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 271:8488-8492.

Meldrum B (1985) Possible Therapeutic applications of antagonists of excitatory aminoacid neurotransmitters. *Clin Sci* 68:113-122.

Meldrum B, Garthwaite J (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 11:379-87.

Mielke K, Brecht S, Dorst A, Herdegen T (1999b) Activity and expression of JNK1, p38 and ERK kinases, c-jun N-terminal phosphorylation and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures. *Neurosci* 91:471-483.

Mielke K, Damm A, Yang DD, Herdegen T (1999a) Selective expression of JNK isoforms and stress-specific JNK activity in different neural cell lines. *Mol Brain Res* 75:128-137.

Mielke K, Herdegen T (2000) JNK and p38 stress kinases—degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Progress in Neurobiol* 61:45-60.

Misra C, Brickley SG, Farrant M, Cull_Candy SG (2000) Identification of subunits contributing to synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in Golgi cells of the rat cerebellum. *J Physiol* 524:147-162.

Mitsui H, Takuma N, Kurokawa K, Exton JH, Takuwa Y (1997) Dependence of activated G α 12-induced Gi to S phase cell cycle progression on both Ras/mitogen-activated protein kinase and Ras/Rac1/Jun N-terminal kinase cascades in NIH3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 272:4904-4910.

Miyasaka T, Miyasaka J, Saltiel AR (1990) Okadaic acid stimulates the activity of microtubule associated protein kinase in PC-12 pheochromocytoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 168:1237-1243.

Mody I, McDonald JF (1995) NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol Sci* 16:356-359.

Momiyama A, Feldmeyer D, Cull_Candy SG (1996) Identification of a native low-conductance NMDA channel with reduced sensitivity to Mg²⁺ in rat central neurones. *J Physiol* 494:479-492.

Monaghan DT, Yao D, Cotman CW (1984) Distribution of ³H-AMPA binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography. *Brain Res* 324:160-164.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sackmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.

Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sackmann B, Seeburg PH (1993). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.

Mori H, Mishina M (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34:1219-1237.

Murchinson D, Griffith HW (2000) Mitochondria buffer non-toxic calcium loads and release calcium through the mitochondrial permeability transition pore and sodium/calcium exchanger in rat basal forebrain neurons. *Brain Res* 854:139-151.

Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT (1989) Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cysteine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2:1547-1548.

Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT (1990) Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cysteine uptake. *FASEB J* 4:1624-1633.

Myers SJ, Peters J, Huang Y, Comer MB, Barthel F, Dingledine R (1998) Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neuronal-specific expression multiple promoters, and regulatory elements. *J Neurosci* 18:6723-6739.

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

Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA (1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 18:3659-3668.

Ni H, Wang XS, Diener K, Yao Z (1998) MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 243:492-496.

Nicholls DG, Ward MW (2000) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends in Neurosci* 23:166-174.

Nicole O, Ali C, Docagne F, Plawinski L, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A (2001) Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 21:3024-3033.

Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S (1992) Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32:449-70.

Nicotera P, Leist M, Manzo L (1999) Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 20:46-51.

Niklas WJ (1986) Glia-neuronal inter-relationships in the metabolism of excitatory amino acids. En: *Excitatory Aminoacids*. Editores: Roberts PJ, Storm-Mathisen J, Bradford HF, pp 57-66. McMillan, London.

Nishima H, Fischer KD, Radvanyi L, Shahinian A, Hakem R, Rubie EA, Bernstein A, Mak TW, Woodgett JR, Penninger JM (1997) Stress-signalling kinase Sek-1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and Cd3. *Nature* 385:350-353.

Nishimura M, Sugino T, Nozaki K, Takagi Y, Hattori I, Hayashi J, Hashimoto N, Moriguchi T, Nishida E (2003) Activation of p38 kinase in the gerbil hippocampus showing ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1052-1059.

Nitatori T, Sato N, Wagury S, Karasawa Y, Araki H, Shibanaï K, Kominami E, Uchiyama Y (1995) Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 15:1001-1011.

Nowak TS, Osborne OC, Suga S (1993) Stress protein and proto-oncogene expression as indicators of neuronal pathophysiology after ischemia. *Prog Brain Res* 96:195-208.

Obrenovitch TP, Urenjak J, Zilkha E (1994) Intracerebral microdialysis combined with recording of extracellular field potential: a novel method for investigation of depolarizing drugs in vivo. *Br J Pharmacol* 113:1295-1302.

Oguro K, Nakamura M, Masuzawa T (1995) Histochemical study of Ca(2+)-ATPase activity in ischemic CA1 pyramidal neurons in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol* 90:448-453.

Oguro K, Oguro N, Kojima T, Sonja Y, Calderone A, Zheng X (1999) Knockdown of AMPA receptors GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons. *J Neurosci* 19:9218-9227.

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

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

Olney JW (1990) Excitotoxin-mediated neuron death in youth and old age. *Prog Brain Res* 86:37-51.

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

Olney JW, Zorumski C, Price MT, Labruyere J (1990) L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin. *Science* 248:596-599.

Olsen RW, Szamraj O, Houser CR (1987) ³H-AMPA binding to glutamate receptor subpopulations in rat brain. *Brain Res* 402:243-254.

Ozawa H, Shioda S, Dohi K, Matsumoto H, Mizushima H, Zhou Ch, Funahashi H, Nakay Y, Nakajo S, Matsumoto K (1999) Delayed neuronal cell death in the rat hippocampus is mediated by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Neuroscience Lett* 262:57-60.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate Receptors in the mammalian central Nervous System. *Progress in Neurobiol* 54:581-618.

Palm K, Belluardo N, Metsis M, Timmusk T (1998) Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J Neurosci* 18:1280-1296.

Pardridge WM (1979) Regulation of aminoacid available to brain: selective control mechanisms for glutamate. En: *Advances in Biochemistry and Physiology*. Editores: Filer LJ Jr, Garattini S, Kare MR, Reynolds AW, pp 125-137. New York Raven Press.

Paschen W, Dux E, Djuricic B (1994). Developmental changes in the extent of RNA editing of glutamate receptor subunit GluR5 in rat brain. *Neurosci Lett* 174:109-112.

Paul A, Wilson S, Belham CM, Robinson CJM, Scott PH, Gould GW, Plevin R (1997) Stress activated protein kinases: activation regulation and function. *Cell Signaling* 9:403-410.

Pearse IA, Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD (1987) Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett* 223:143-147.

Pellegrini-Giampietro DE, Bennett MV, Zukin RS (1991) Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an *in situ* hybridization study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4157-4161.

Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS (1997) The GluR2 (GluRB) hypothesis: Ca⁺⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20:464-470.

Pettmann B, Henderson CE (1998) Neuronal cell death. *Neuron* 20:633-647.

Pollard H, Héron A, Moreau J, Ben-Ari Y, Khrestxhatisky M (1993) Alterations of the GluR-B AMPA receptor subunit flip/flop expression in kainate- induced epilepsy and ischemia. *Neuroscience* 57:545-554.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ (1996) N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. *J Neurochem* 66:692-700.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ (1997a) Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol* 378:70-87.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ (1997b) Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal death in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neurol* 378:88-104.

Posada J, Cooper JA (1992) Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science* 255:212-215.

Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F (1982) Temporal profile of neuronal damage in a model transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11:491-498.

Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.

Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270:7420-7426.

Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16:1247-1255.

Resink A, Villa M, Benke D, Moler H, Balazs R (1995) Regulation of expression of NMDA receptor subunit in rat cerebellar granule cells: effects of chronic K⁺-induced depolarization and NMDA exposure. *J Neurochem* 64: 558-565.

Rieppe MW, Hori N, Ludolph AC, Carpenter DO (1995) Failure of neuronal ion exchange, not potentiated excitation causes excitotoxicity after inhibition of oxidative phosphorylation. *Neurosci* 64:91-97.

Robinson MJ, Cobb M (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:180-186.

Rothman SM (1985) The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* 5:1483-1489.

Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105-111.

Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, Mishina M (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. *Nature* 373:151-155.

Seeburg PH (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 16:359-365.

Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB* 9:180-186.

Sheardown MJ, Suzdak PD, Nordholm L (1993) AMPA, but not NMDA, receptor antagonism is neuroprotective in gerbil global ischaemia, even when delayed 24 h. *Eur J Pharmacol* 236:347-353.

Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144-147.

Shimojo M, Paquete AJ, Anderson DJ, Hersh LB (1999) Protein kinase A regulates cholinergic gene expression in PC12 cells: REST4 silences the silencing activity of neuron-restrictive silencer factor/REST. *Mol Cell Biol* 19:6788-6795.

Siesjo BK, 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.

Smith SE, Meldrum BS (1992) Cerebroprotective effect of a non-N-methyl-D-aspartate antagonist, GYKI 52466, after focal ischemia in the rat. *Stroke* 23:861-864.

Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Köler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249:1580-1585.

Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11-19.

Spreafico R, Frassoni C (1993) Morphological aspects of neocortical maturation. En: Epileptogenic and excitotoxic mechanisms. *Editores*: Avanzini G, Fariello R, Heinemann, Mitani R, pp 59-66. John Libbey Company Ltd.

Srinivasan A, Roth KA, Sayers RO, Shindler KS, Wong AM, Fritz LC, Tomaselli KJ (1998) *In situ* immunodetection of activated caspase-3 apoptotic neurons in the developing nervous system. *Cell Death Differ* 5:1004-1016.

Sugino T, Kazunhiko N, Takagi Y, Hattori I, Hashimoto N, Moriguchi T, Nishida E (2000) Activation of mitogen-activated protein kinase after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *J Neurosci* 20:4506-4514.

Takai H, Katayama K, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K (2003) Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. *Exp Mol Pathol* 75:89-94.

Takeda A, Onodera H, Sugimoto A, Kogure K, Obinata M, Shibahara S (1993) Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience* 55:23-31.

Tanaka H, Calderone A, Jover T, Grooms SY, Yokota H, Zukin RS, Bennet MVL (2002) Ischemic preconditioning acts upstream of GluR2 downregulation to afford neuroprotection in the hippocampal CA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2362-2367.

Thompson CL, Drewery DL, Atkins HD, Stephenson FA, Chazot PL (2000) Immunohistochemical localization of N-methyl-D-aspartate receptor NR1, NR2A, NR2B and NR2C/D subunits in the adult mammalian cerebellum. *Neurosci Lett* 283:85-88.

Toth E, Lajtha A (1989) Motor effects of intracaudate injection of excitatory aminoacids. *Pharmacol Biochem Behav* 33:175-179.

Tsubokawa H, Oguro K, Masuzawa T, Kaway N (1994) Ca²⁺-dependent non-NMDA receptors-mediated synaptic currents in ischemic CA1 hippocampal neurons. *J Neurophysiology* 71:1190-1196.

Turski L, Bressler K, Retting KJ, Loschmann PA, Wachtel H (1991) Protection of substantia nigra from MPP⁺ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 249:414-418.

Turski L, Turski WA (1993) Towards and understanding of the role of glutamate in neurodegenerative disorders: energy metabolism and neuropathology. *Experientia* 49:1064-1072.

Uchiyama-Tsuyuki Y, Araki H, Otomo S (1995) Depolarization and hypoxia-induced cell damage in serum-free cultures of the rat cortex, and related extracellular glutamate changes. *Eur J Pharmacol* 293:245-250.

Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sackmann B (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252:1715-1718.

Wang XS, Diener K, Manthey CL, Wang S, Rosenzweig B, Bray J, Delaney J, Cole CN, Chan-Hui PY, Mantlo N, Lichenstein HS, Zukowski M, Yao Z (1997) Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272:23668-23674.

Wang XZ, Ron D (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science* 272:1347-1349.

Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16:1909-1920.

Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.

Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J II, Niedzielski AS (1996) Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16:1982-1989.

Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 68:469-478.

Widman C, Gibson S, Jarpe MB, Jonson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79:143-180.

Witzemann V, Barg B, Criado M, Stein E, Sakman B (1989) Developmental regulation of five subunit specific mRNAs encoding acetylcholine receptor subtypes in rat muscle. *FEBS Lett* 242:419-424.

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

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389:865-70.

Yao R, Yoshihara M, Osada H (1997) Specific activation of a c-jun NH₂-Terminal kinase isoform and induction of neurite outgrowth in PC-12 cells by staurosporine. *J Biol Chem* 272:18261-18266.

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.

Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, Kassis S, Doyle ML, McNulty D, Gallagher TF, Fisher S, McDonnell PC, Carr SA, Huddleston MJ, Seibel G, Porter TG, Livi GP, Adams JL, Lee JC (1997) Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem* 272:12116-12121.

Zaczek R, Coyle JT (1982) Excitatory aminoacid analogues: neurotoxicity and seizures. *Neuropharmacology* 21:15-26.

Zhu C, Wang X, Hagberg H, Blomgren K (2000) Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurochem* 75:819-829.

Zinkad WC, Thompson C, Salama AI, Patel J (1992) Excitatory aminoacid-evoked calcium influx and calcium-dependent neurotoxicity in rat cortical cultures. *Ann NY Acad Sci (US)* 648:355-357.

Zu YL, Qi J, Gilchrist A, Fernandez GA, Vazquez-Abad D, Kreutzer DL, Huang CK., Sha-afi RI (1998) p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. *J Immunol* 160:1982-1989.

X. APENDICES

10.1 APENDICE 1

SSF 3X pH 7.2

Na₂HPO₄ 30 mM

NaH₂PO₄ 30 mM

NaCl 390 mM

Solución de lavado

A partir de la SSF 3X se preparó SSF 1X (dilución 1:3), por cada litro de PBS 1X se agregaron 1000 UI de heparina y 1 g de procaina

Solución fijadora

Para preparar un litro de solución de paraformaldehído al 4%: Calentar 650 ml de agua destilada a 60°C, adicionar, 40 g de paraformaldehído. Agitar constantemente y adicionar NaOH 2 N (hasta aclarar la solución). Agregar 300 ml de SSF 3X, ajustar el pH a 7.2 con HCl y aforar con agua destilada. Filtrar si es necesario.

Técnica de inclusión en parafina, consta de 3 etapas:

1. *Deshidratación, los tejidos se colocan en diferentes concentraciones de alcohol por los tiempos señalados.*

Etanol 80%	19 h
Etanol 96%	3 h
Etanol 96%	3 h
Etanol 100%	14 h
Etanol 100%	2 h

2. *Aclaramiento del tejido. Los tejidos se transfieren a xilol hasta que el tejido obtenga un color amarillento, pero transparente.*

Xilol 1	1 h
Xilol 2	1 h

Xilol 3

1 h

3. *Inclusión en parafina. Los tejidos aclarados, con xilol, permiten la inclusión de la parafina en las siguientes condiciones:*

Parafina 1 56°C 1 h

Se puede dejar hasta 24 h a temperatura ambiente.

Parafina 2 56°C 1 h

Se hace la inclusión del tejido permitiendo la formación del bloque.

Solución de gelatina para recubrir portaobjetos:

Gelatina al 2.5%

Sulfato de cromo-potasio al 0.5%

Se calienta agua destilada a 65°C, se disuelve la gelatina; ya disuelta se agrega el sulfato de cromo-potasio.

Los portaobjetos se sumergen en ésta solución a baño María durante 20 min y se ponen a secar a 37°C por 24 h.

Desparafinado y rehidratación de tejidos:

Xilol 1	10 min.
Xilol 2	10 min.
Xilol 3	10 min.
Etanol 100%	5 min.
Etanol 90%	5 min.
Etanol 80%	5 min.
Etanol 70%	5 min.
Agua	3 min.

Preparación de portaobjetos recubiertos con polilisina

- Lavar los portaobjetos con una mezcla de agua-extrán.
- Enjuagar abundantemente con agua corriente.
- Sumergir los portaobjetos en etanol al 96° o absoluto.

- Preparar poli-L-lisina (Diluir la poli-L-lisina 1:10 en agua desmineralizada, preparar en recipiente de plástico).
- Sumergir los portaobjetos por 15-20 min.
- Poner en el horno a 37°C por 1 h hasta que sequen.

Soluciones utilizadas en la inmunohistoquímica, para GluR2.

SSF 1X

SSF-H₂O₂ 0.3% (se toman 300 µl por cada 100 µl de SSF).

SSF-azida de sodio 0.1% (se adiciona 0.1 g por cada 100 ml de SSF).

SSF-tritón X-100 0.5%-azida de sodio 0.1% (al SSF-azida se adicionan 0.5 ml de Tritón X-100 para 100 ml).

SSF-tritón X-100 0.1%-Azida de sodio 0.1% (al SSF-azida se adicionó 0.1 ml de Tritón X-100 por cada 100 ml).

SSF-Albumina de suero de bovino (BSA por sus siglas en inglés) 0.1%- azida 0.1% (adicionar 0.1 g de BSA por cada 100 ml de SSF-azida)

Suero normal 1:100 de caballo (100 µl en 10 ml de SSF-azida 0.1%).

10.2 APENDICE 2

Preparación de soluciones para ensayos de RT-PCR.

Para preparar el agua con dietilpircarbonato (DEPC) 0.1%, se adicionó 1ml de DEPC por cada litro de agua, dejar en agitación a temperatura ambiente por 24 h.

Mezcla de reacción para DNAC:

• Amortiguador 5X para RT	4.0 µl
• dNTPs 2.5 mM en mezcla	4.0 µl
• DTT (directo del kit)	2.0 µl
• Iniciadores Aleatorios (1 µg/µl)	1.0 µl
• RNAsin (1U/µl)	1.0 µl
• RT (200U/µl)	2.0 µl
	14.0 µl por muestra

Mezcla de reacción para PCR:

• Agua Inyectable	26.0 µl
• Iniciador sentido (3 µM)	5.0 µl
• Iniciador antisentido (3 µM)	5.0 µl
• dNTPs (2.5mM)	2.0 µl
• Amortiguador 10X	5.0 µl
• MgCl ₂ (50 mM)	5.0 µl
• Taq polimerasa (1U/µl)	1.0 µl
	<hr/>
	49.0 µl

La mezcla de reacción se prepara por separado y se adicionan 49µl de la mezcla más 1µl de la muestra de DNAC por cada ensayo.

Amortiguador TBE 10X

Trizma Base 0.89 M
EDTA 0.025 M
Acido Bórico 0.89 M

Solución Cargadora

Xilen Cianol al 25%
Azul de bromofenol al 25%
Glicerol al 30%

NMDA and AMPA Receptor Expression and Cortical Neuronal Death Are Associated With p38 in Glutamate-Induced Excitotoxicity In Vivo

M.C. Rivera-Cervantes,¹ J. Segura Torres,⁴ A. Feria-Velasco,² J. Armendariz-Borunda,³ and C. Beas-Zárate^{1,4}

¹Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico

²Unidad de Morfología de Alta Resolución, Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico

³Instituto de Biología Molecular y Terapia Génica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico

⁴División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicanos del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, Mexico

Early overstimulation of ionotropic glutamate receptors (iGluRs), such as the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) receptors, produces excitotoxicity in several brain regions. The molecular composition of those receptors and their regulation by intracellular signaling systems could be determinants in the development of progressive neurodegenerative mechanisms in the central nervous system (CNS). Studies of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, morphologic changes including cell number, and the expression of the NR1 and GluR2 subunits, by reverse transcriptase-PCR were evaluated at early postnatal ages (postnatal day [PD]8–14) in cerebral cortex of rats treated with monosodium glutamate (MSG; 4 mg/g body weight) administered subcutaneously on PD1, 3, 5, and 7. An important increase in p38 activity at PD8 and loss of cortical cell number were observed from PD8–14 in animals treated with MSG, together with significant morphologic changes characterized by cell shrinkage, nuclear hyperchromatism, and cytoplasmic vacuolation. These morphologic changes were prevented by SB203580, an inhibitor of p38 signaling, at PD8–14. No change in cerebral cortex thickness was observed among experimental or control rats. A significant increase in NR1 subunit expression was observed in response to MSG from PD8–14. GluR2 expression increased from PD8–12, but at PD14, its expression was reduced to 54% with respect to controls. SB203580 prevented alone the decreased in GluR2 expression induced by MSG. These results suggest that initial neuronal death (at PD8 and 10) in cerebral cortex may be due to an excessive Ca^{2+} influx through NMDA receptors, whereas the further damage process could be mediated by AMPA receptors through p38 signaling. This could represent a determinant mechanism to decide whether nerve cells survive or die. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

Key words: glutamate receptors; transduction signal; neurodegeneration; cerebral cortex

L-Glutamate (Glu) is a major excitatory transmitter of the mammalian central nervous system (CNS), and under normal circumstances plays a key role in neurologic processes, including cognition, learning, and memory (Collingridge and Lester, 1989). The family of glutamate receptors (Glu-R) is categorized into two subgroups: ionotropic and metabotropic. Ionotropic glutamate receptors (iGluRs) are ligand-gated ion channels and are divided into three subtypes by their selective agonists: *N*-methyl-D-aspartate (NMDA-R), kainate (KA-R), and α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA-R) (Dingledine and McBain, 1999). Activation of iGluRs allows the influx of Ca^{2+} and Na^{+} , and outward move-

Abbreviations: AMPA-R, α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptor; CNS, central nervous system; Glu, L-glutamate; Glu-R, glutamate receptor; iGluRs, ionotropic glutamate receptors; KA-R, kainate receptors; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MSG, monosodium glutamate; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NMDA-R, *N*-methyl-D-aspartate receptor; PD, postnatal day, RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

Contract grant sponsor: CONACyT; Contract grant number: 30901-M; Contract grant sponsor: FOFOI; Contract grant number: IMSS-2002/009.

*Correspondence to: Dr. Carlos Beas-Zárate, Lab. Neurobiol. Cel and Molec., Div. Neurociencias, CIBO, Apdo. Postal #4-160, Guadalajara, Jalisco, México, 44421. E-mail: cbeaszarate@megared.net.mx

Received 12 November 2003; Revised 4 February 2004; Accepted 9 February 2004

Published online 23 April 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.20103

ment of K^+ , resulting in neuronal depolarization (Dingledine and McBain, 1999).

The overstimulation of iGluRs produces excitotoxicity, which is thought to be involved in several brain disorders, such as ischemic-hypoxic injury (Siesjö and Bengtsson, 1989), epileptic seizures (Kohr and Heinemann, 1989), and some chronic neurodegenerative diseases (Greenamyre et al., 1985; Young et al., 1988).

Experimental studies have shown that severe brain ischemia, caused by either acute stroke or brain trauma, produces a marked increase in the release of Glu and other excitatory amino acids, which enhances Ca^{2+} influx through the Glu-R (Choi and Rothman, 1990; Michaels and Rothman, 1990). A marked rise in the concentration of free cytoplasmic Ca^{2+} thus is thought to play an important role in Glu-induced neuronal death (Choi, 1987). This phenomenon was named excitotoxicity by Olney (1978).

During focal cerebral infarction, neurons in the center of the ischemic region die rapidly. In contrast, more distant neurons in the penumbra area, although prone to injury, remain viable for several hours (Siesjö, 1992). A similar type of delayed neuronal cell death is observed after exposure to excitatory amino acids in specific nerve cells, both in vitro and in vivo (Hahn et al., 1988).

Several studies have indicated that brain susceptibility to hypoxia-ischemia and excitotoxicity seems to be an age-dependent response, depending on brain maturity, brain region, and neuronal type (Kuroiwa and Okeda, 1994; Towfighi and Mauger, 1998). Earlier research into energy-deprived neurons was directed toward the role of NMDA-R in Glu-induced neurotoxicity (Simon et al., 1984; Albers et al., 1992), probably reflecting its special ability to mediate rapid Ca^{2+} influx, leading to cellular Ca^{2+} overload (MacDermott et al., 1986; Choi, 1992b). Pharmacologic blockade of AMPA-type Glu-R, however, also produces substantial protective effects in the ischemic brain. The neuroprotective effect has been demonstrated in both global ischemia (for review, see Gill, 1994) and focal ischemia models (Buchan et al., 1991; Smith and Meldrum, 1992). The prominent role of AMPA-kainate receptor-mediated injury during ischemia contrasts with the low profile role of AMPA-kainate receptors in several in vitro models of excitotoxicity (Choi, 1992b). In mouse cortical cell cultures, AMPA-kainate antagonists do not increase neuronal survival after either Glu exposure (Koh and Choi, 1991) or oxygen or glucose deprivation (Goldberg and Choi, 1993). The reason for this seems to be a masking of the relatively slowly triggered AMPA-R-mediated injury by more fulminant, rapidly triggered NMDA-R-mediated injury (Choi, 1992a).

In vitro studies of hippocampal and cerebral cortical cultures suggest that activation of NMDA-R mediates neuronal death (Choi, 1988b); however, AMPA-R activation may contribute to intracellular Ca^{2+} overload, when NMDA-R activity is reduced by extracellular acidity (Dugan and Choi, 1999). In fact, a neuroprotective effect exerted by non-NMDA-R antagonists like

6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) and 1-naphthyl-acetyl spermine on delayed cellular death has been demonstrated (Cheung et al., 1998; Oguro et al., 1999). The intensity to Glu exposure and the resulting effects on mitochondrial function are critical factors in determining which of the two pathways of cell death takes place (Du et al., 1997; Leist et al., 1998). Understanding the excitotoxicity mechanism is complicated further by the fact that death program execution might differ in different neuronal subpopulations (Nicotera et al., 1999). For example, the contribution of individual receptors could be relevant in the decision of the cell death mode (Portera-Cailliau et al., 1997b). The degree of Ca^{2+} overload might also convert the cell death mode in some cases from apoptosis to necrosis.

Intracellular signaling pathways leading to Glu excitotoxicity are largely unknown. Ca^{2+} influx into neurons, however, activates second messengers that mediate a wide range of cellular responses, such as Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinases and type I Ca^{2+} -sensitive adenylate cyclase activation (Ghosh and Greenberg, 1995). The protein kinase C and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways are also known to contain enzymes that transduce Ca^{2+} signals that affect long-lasting neuronal responses inducing changes in gene expression (for review, see Kobayashi and Mori, 1998).

Diverse evidence has shown that different MAPK pathways are stimulated after intracellular Ca^{2+} overload by iGluR overactivation (Lev et al., 1995; Finkbeiner and Greenberg, 1996). The p38 group of MAPKs therefore seems to be involved in inflammation, cell growth, cell differentiation, the cell cycle, and cell death (Mielke and Herdegen, 2000; Nebreda and Porras, 2000).

The p38 seems to be involved in the pathogenesis of stroke; to date, little is known regarding the activity of this pathway after focal cerebral ischemia (Walton et al., 1998). Prolonged activation of p38 has been shown to be involved in neuronal apoptosis and p38 inhibitors promote survival of a variety of neurons in vitro (Horstmann et al., 1998; Skaper and Walsh, 1998). The mechanisms involved in neuronal survival through MAPK via activation, however, are not yet understood. It is known that stress factors activate the p38 pathway, modifying transcription, translation, and activation of several genes involved in survival and neuronal death. Activation of this pathway could modify iGluR expression in some neurons as a response mechanism to neurotoxicity. Signaling pathways associated with changes in iGluR expression in vivo and under excitotoxic conditions have not been studied. The aim of the present work was to evaluate the direct neuroprotective effects of p38 inhibition after excitotoxic injury by neonatally administered Glu and to determine whether SB203580 could regulate the GluR subunits expression in rat cerebral cortex. These results may contribute to a better understanding of the mechanism involved in brain injury.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Monosodium L-glutamate (MSG) was purchased from Sigma (St. Louis, MO). SB203580 (p38 inhibitor) and anti-ATF2, phospho-specific, human (rabbit) used as primary antibodies were purchased from Calbiochem (Novabiochem, San Diego, CA). Trizol, Taq DNA polymerase, and reverse transcriptase (RT) were obtained from Gibco BRL (Gaithersburg, MD). In situ cell death detection kit POD was purchased from Roche Molecular Biochemicals (Germany). All other chemicals used were of the highest purity locally available.

Animals

Pregnant Wistar rats were used and kept under optimal environmental conditions, i.e., in separate cages with free access to water and food and 12/12-hr light/dark cycles at temperatures of 23–25°C. On the day of birth, all litters were adjusted to eight offspring per female. Offspring were given MSG (4 mg/g body weight) subcutaneously (s.c.) on PD1, 3, 5, and 7 (Beas-Zárate et al., 2001). A group of untreated animals was used as external controls. A third group was treated with SB203580 (0.42 µg/g body weight), a p38 inhibitor, administered s.c. 30 min before MSG, and a fourth group was treated with SB203580 alone at the same doses. In the initial experiment, various SB203580 doses were used (0.14 µg/g [10 µM], to 0.56 µg/g [40 µM]) and an additional group treated with a sodium chloride solution equimolar to that of MSG (eqNaCl) (1.38 mg/g) was also included. All animals were used on PD8, 10, 12, and 14. Some treated and control animals were fixed by perfusion and used for histologic analysis and other treated and control animals were killed by decapitation and the cerebral motor cortices were dissected out for further molecular analysis.

All animals in the various groups were from the same litters or from parallel litters. Animal care and handling were in accordance with Mexican General Health Laws and their corresponding chapters (1987) and the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 80.23, revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Morphologic Study

Animals from each group were anesthetized at PD8, 10, 12, or 14 by intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg) and perfused intracardially with Ringer phosphate solution (320 mOsmol/L at pH 7.2) for 2 min at a pressure of 130 cm H₂O, then with fixing solution (0.1 M phosphate-buffered 4% paraformaldehyde, pH 7.2) for 15 min (Feria-Velasco and Karnovsky, 1970). Brains were extracted and fixed for 48 hr in the same fixing solution at room temperature.

Coronal sections of the brains, including the motor cortex, were washed in 0.1 M phosphate buffer for 6 hr and dehydrated in a graded series of ethanol, cleared with xylene, and embedded in paraffin. Sections (8-µm thick) cut with a rotatory microtome were collected on glass slides, stained with hematoxylin and eosin (HE), and covered with glass coverslips. Preparations were examined under a light microscope (100×) connected to a Leica Image Analyser and equipped with an analog photomicroscopy system. Cells with healthy morpholog-

ical characteristics were observed and counted on the Fr1 region from cerebral cortex. Data obtained corresponded to six animals for each group studied and four sections were examined for each animal, analyzing a total of eight fields per section. Results were expressed as number of cells with healthy morphology.

Evaluation for Apoptosis

For immunohistochemical detection and quantification of apoptosis at the single-cell level, evaluation was based on labeling of DNA strand breaks after TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) carried out according to the instruction manual of the in situ cell death detection kit, POD (Roche Cat. No. 1 684 817) using paraffin-embedded tissue sections. Briefly, sections were dewaxed, rehydrated, and treated with protease. Permeabilization and TUNEL reaction were carried out. Incorporated fluorescein was detected by anti-fluorescein antibody Fab fragments from sheep, conjugated with horseradish peroxidase (POD) and the stained cells with diaminobenzidine were analyzed under a light microscope. Apoptotic cells from four experiments were counted in the same manner as described for the morphologic studies.

Molecular Studies

Unfixed cerebral frontal cortices collected from each group were dissected out at 4°C to be used for molecular biology studies.

Western analysis for ATF2. Animals were sacrificed and cerebral motor cortex was removed rapidly and frozen at -95°C. Tissue was sonicated on ice in lysis buffer containing 920 µl regulator of lysis (10 mM), Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 0.5 mM sodium orthovanadate, 2 mM sodium pyrophosphate, 80 µl protease inhibitor cocktail (1 tablet complete [1697498-Roche] in 2 ml H₂O). Samples were incubated on ice for 30 min and centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4°C. Protein concentration was estimated using the Lowry et al. (1951) method, using bovine serum albumin (BSA) as the standard, and then 50 µg of protein was electrophoresed on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose. The membrane was treated with nonfat milk (10%; Svelty) in Tris-buffered saline (TBS) with 0.25% Tween-20 for 24 hr to avoid nonspecific antibody binding. Blots were incubated with anti-ATF2, phospho-specific, used as primary antibodies [1:1000 (189275-Calbiochem)] for 24 hr. After five washes in TBS with 0.05% Tween-20 (TTBS), blots were incubated for 24 hr with biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:1,000, BA1000; Vector Laboratories) as secondary antibody. After five TTBS washes, blots were incubated with ABC Elite kit (PK6101; Vector Laboratories) for 1 hr. After a final three TTBS washes, membranes were developed with diaminobenzidine (D5905; Sigma).

For data collection, blots were photographed using a Kodak Digital Science Scanner and analyses were carried out using the same system. Data obtained corresponded to values from three experiments with determinations made by duplicate.

RNA extraction and quantification. Total RNA was isolated from cerebral frontal cortices according to the method described by Chomczynski and Sacchi (1987). Briefly, brain tissue was homogenized using a polytron system in the presence of Trizol, chloroform was added, the aqueous phase was col-

TABLE I. PCR Primers Used for Amplification of Target Genes

Gene		Sequences	Cycles
NR1	Sense	5'-TACACTGCCAACTTGGCAGCTT-3'	28
	Antisense	3'-CATGAAGACCCCTGCCATGTT-5'	
GluR1	Sense	5'-GCTTCATGGACATTGACTTA-3'	65
	Antisense	3'-ATCTCAAGTCGGTAGGAGTA-5'	

lected, and RNA was precipitated with isopropanol at 4°C overnight. The quantity and RNA integrity were assessed routinely by absorbance ($A_{260/280}$) and ethidium bromide fluorescence of RNA separated electrophoretically on 1% formaldehyde-containing agarose gels (Armendariz-Borunda et al., 1997).

Analyses of AMPA- and NMDA-receptor subunits by RT-PCR. RT-PCR was carried out according to a methodology described previously (Delgado-Rizo et al., 1998; Beas-Zárate et al., 2001). A standardized semiquantitative PCR method was used based on amplification of the target gene and a constitutively expressed gene, β -actin. Target genes were the NMDA-R1 (NR1), GluR1 (GR1), and GluR2 (GR2) subunits of AMPA-R and the primers used are depicted in Table I. Total RNA (2 μ g) was reverse transcribed in 0.05 M Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 7 mM $MgCl_2$ buffer containing 0.05 U/ μ l RNase inhibitor and 200 U/ μ l Maloney's murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase. Samples were incubated for 10 min at 70°C and then 60 min at 37.5°C. Reverse transcriptase was inactivated by heating sample tubes at 95°C for 10 min. cDNA thus obtained were used immediately in PCR or were stored at -20°C until use. Optimal PCR conditions were determined to detect the expression of each particular NMDA or AMPA subunit. Amplification was carried out in a PCR buffer of 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) and 50 mM NaCl containing a mix of 100 μ M dNTPs and 1 U Taq DNA polymerase. Amplification reactions were overlaid with light mineral oil and held at 95°C for "hot-start" PCR for 5 min, then run in an automated thermal cycler for the number of cycles specified in Table I. Each cycle consisted of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1.5 min, with a final extension for 5 min at 72°C.

Photographic and densitometric scanning. Densitometric analysis of PCR products was carried out with a Kodak computational system. Sample electrophoreses were photographed with a Kodak Digital Science Scanner and analysis was carried out using the same system. After the scanning was complete, the area corresponding to each band, which represented the amplified PCR product, was calculated automatically and normalized against the area representing the expression of the constitutive gene. Results were expressed as relative intensity in arbitrary units compared to the control value.

Each parameter was determined in duplicate for each animal, using at least six animals, and then averaged for each group before comparison between groups.

Statistical Analysis

All morphologic data were analyzed by double blind. All data collected from control rats were compared among different groups of the study. Statistical comparisons were made using analysis of variance (ANOVA), and Tukey HSD-test was used

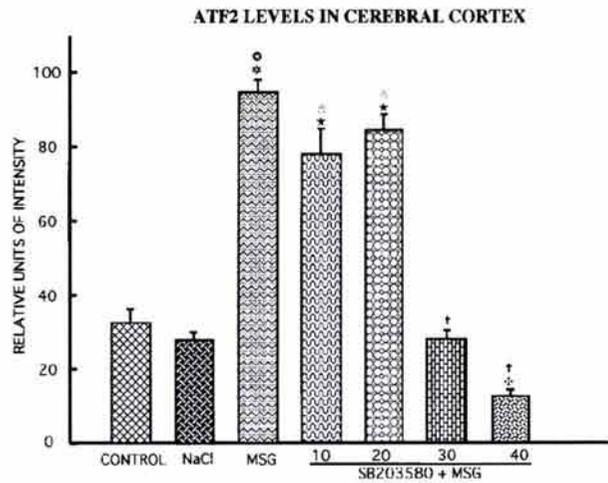


Fig. 1. ATF2 determination was used to evaluate p38 pathway activity. Cerebral cortex samples obtained from different groups: control, NaCl equimolar to MSG, MSG, and different doses of SB203580 (0.14 μ g/g body weight [10 μ M] to 0.42 μ g/g body weight [40 μ M]) combined with MSG, which were analyzed by Western blotting using an antibody against ATF2-phosphorylated protein. Values are means \pm SEM obtained from three experiments with determinations by duplicate. There were no statistically significant differences between controls and those injected with a NaCl equimolar to MSG (eqNaCl). Control vs. MSG: asterisk, $P < 0.001$; control vs. SB203580 + MSG: filled star, $P < 0.001$ and cross, $P < 0.05$. EqNaCl vs. MSG: circled star, $P < 0.001$; eqNaCl vs. SB203580 + MSG: star, $P < 0.001$. MSG group vs. SB203580 + MSG: dagger, $P < 0.01$.

for the post-hoc comparison between groups; a $P < 0.05$ was considered significant. Data were represented as means \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS

Evidence of p38 Activity

To determine whether the activity of p38 MAPK was altered after MSG treatment compared to that in control groups, cerebral cortex tissue from PD8 animals were subjected to Western analysis using ATF2-phosphorylated antibody. There were no significant changes in the ATF2 levels between eqNaCl group and the control group (Fig. 1). MSG treatment, however, induced a very rapid and significant activation of p38 with respect to the control group (Fig. 1). The SB203580, however, blocked that p38 activation at 0.42 μ g/g with respect to the MSG-induced effect, whereas 0.56 μ g/g produced an significant inhibition of p38 activity with respect to values from the control group (Fig. 1).

Morphologic Findings

Based on previous experiments and findings from our laboratory, the eqNaCl group was not included in this study. In relation to the group treated with SB203580 alone, it was included in all further experiments using a dose of 0.42 μ g/g. The results showed that normal mor-

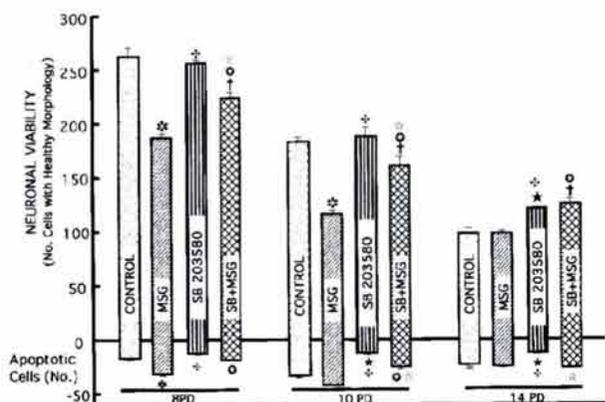


Fig. 2. Upper graph shows the numbers of normal-looking neurons counted in the Fr2 area at PD8, 10, and 14 in cerebral cortices of rats from control, MSG + SB203580, MSG-injected groups. Lower graph shows the number of apoptotic-positive neurons visualized and counted with TUNEL technique registered on corresponding section. Values are means \pm SEM. Significantly different at each age: control (C) vs. MSG: asterisk, $P < 0.001$; control vs. SB203580: filled star, $P < 0.001$; control vs. SB203580 + MSG: dagger, $P < 0.001$. MSG group vs. SB203580: cross, $P < 0.001$; MSG group vs. SB203580 + MSG: circled star, $P < 0.001$. Comparison between SB203580 vs. SB203580 + MSG: star, $P < 0.001$.

phologic characteristics were observed in tissue elements of the cerebral cortex from control animals at all ages studied (PD8, 10, and 14), (Fig. 2A,D,G), whereas conspicuous histologic changes were visible in cortices from animals treated with MSG, particularly at PD8 (Fig. 2B,E,H). These changes were represented mainly by cell shrinkage, nuclear hyperchromatism, and cytoplasmic vacuolation in nerve cells, as well as reactive gliosis mainly composed by astrocytes and oligodendrocytes.

When the numbers of normal-looking neurons were compared to nerve cells showing conspicuous degenerative alterations, cerebral cortices of MSG-injected rats differed significantly from those of control animals (Fig. 2).

The administration of SB203580 alone did not produce morphologic changes in the cerebral cortex (data not shown) with the exception of some glial reaction, especially in 10-day-old rats. Injection of SB203580 before MSG prevented the morphologic alterations induced by MSG in the cerebral cortices at all ages studied (Fig. 2C,F,I).

No significant differences were seen in the cerebral cortex thickness when data from the four groups were compared at the same ages (data not shown). A progressive reduction in cortical number of cells was seen from PD8–14 in the control animals, and a major decrease in number of cells was observed in MSG-injected rats (Fig. 3).

The effect of MSG on cell number in cerebral cortex was abolished when SB203580 was administered before the MSG injection (Figs. 2,3). There was no significant difference between values obtained from rats treated with SB203580 alone and control rats (Fig. 2). At PD14, how-

ever, the cell number in cerebral cortex of rats injected with SB203580 alone or given SB203580 before MSG was greater than was the number of cells observed in sections from control and MSG-injected rats (Fig. 3).

The results obtained showed that reduction in the number of cells produced by MSG was greatly induced via apoptosis, mainly at PD8 and PD10 (Fig. 3). Neuronal death was reduced by p38 inhibitor, whereas SB203580 alone did not have effect on the number of apoptotic cells (Fig. 3).

Molecular Findings

MSG induced a significant increase in the expression of NR1 subunit of NMDA-R and GluR2 subunit of AMPA-R in the cerebral cortex at PD8 and PD10 (Fig. 4 and 5). At PD12, that increase was seen only for the GluR2 subunit with respect to the corresponding values of the control group (Fig. 5). Diminished expression of GluR2 subunit (54%) at PD14 was observed (Fig. 5), but this effect was reverted by SB203580 when it was administered before MSG (Fig. 5). No difference in the expression of NR2A and NR2D subunits was observed between control and MSG-treated groups (data not shown). The administration of SB203580 alone did not produce changes in expression of NR1 and GluR2 subunits relative to the control group at any age studied (Fig. 4 and 5).

DISCUSSION

Glutamate release and subsequent excitotoxic cell damage has been proposed as a major mechanism producing neuronal cell death in several experimental paradigms of human neurodegenerative disorders (see review by Olney, 2002). The precise mechanisms underlying excitotoxic cell death are unclear, and both in vitro and in vivo data are discordant with regard to whether excitotoxic neuronal death is apoptotic or necrotic (Choi, 1988a, 1992a,b; Olney, 2002).

Necrosis and apoptosis are distinct mechanisms of cell death with very different morphologic characteristics. Necrosis is caused by catastrophic toxic or traumatic events, with passive cell swelling, injury to cytoplasmic organelles including the mitochondria, and a rapid collapse of internal homeostasis. Necrosis leads to membrane lysis, the release of cellular contents, and resulting inflammation (Barron et al., 1973). In contrast, apoptosis is an active process of neuronal cell destruction with specific defined morphologic and molecular features. Cell shrinkage, membrane blebbing, nuclear pyknosis, chromatin condensation, and DNA fragmentation all characterize apoptosis (Beilharz et al., 1995).

Ankarcrona et al. (1995) have shown that cerebellar granule cells exposed to neurotoxic concentrations of Glu undergo two distinct fates: a subpopulation succumbs to acute necrosis during and immediately after that exposure; the remaining neurons, which recover energy levels and mitochondrial function, die from delayed-onset apoptosis. The intensity of Glu exposure and the resulting effects on mitochondrial function are critical factors in determining cell death pathways (Du et al., 1997; Leist et al., 1998).

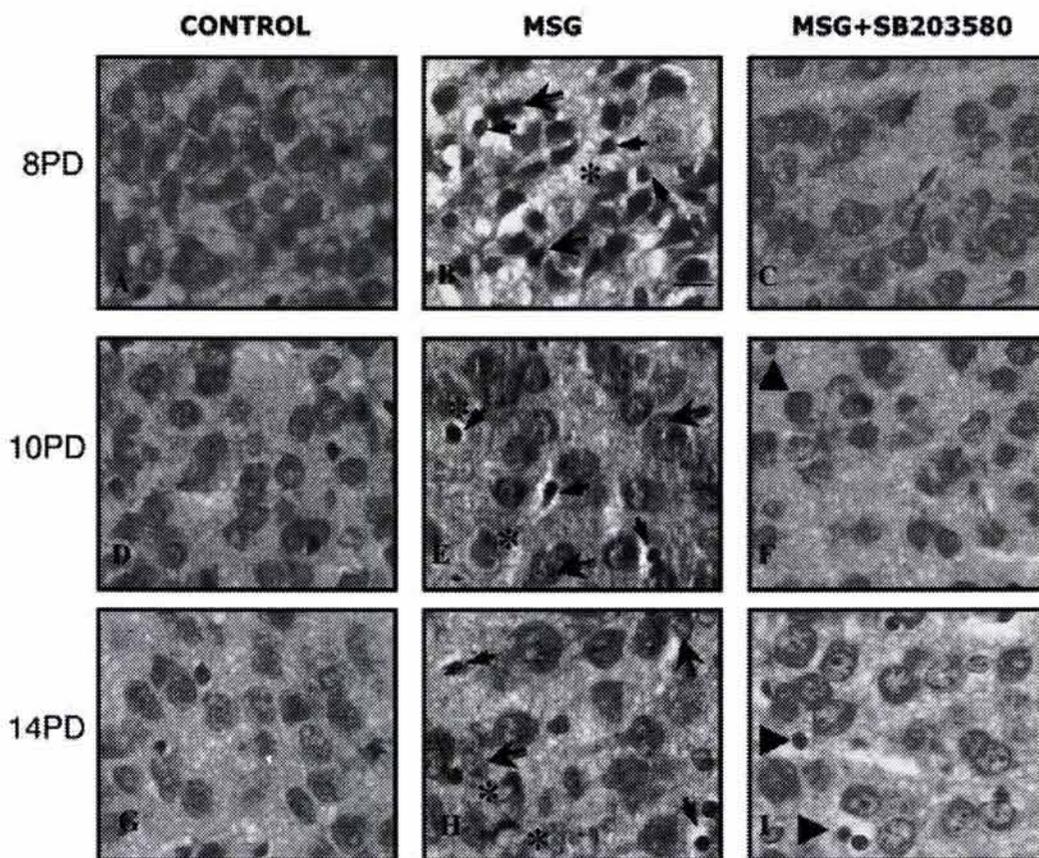


Fig. 3. Cerebral cortices of 8-, 10-, and 14-day-old rats from control group (A, D, G) showing normal aspects of tissue elements, and from the MSG-injected group (B, E, H), in which numerous nerve cells appear shrunken (small arrows), some show vacuolated cytoplasm (asterisk), and others exhibiting degenerative changes (arrow with double

line). C, F, I: Cerebral cortex of a rat injected subcutaneously with MSG during neonatal period and when SB203580 was administered before MSG injection. Few reactive astrocytes (arrow head) are seen and most nerve cells show a normal appearance. Hematoxylin and eosin stain. Scale bar = 15 μ m.

Excitotoxicity is complicated further by the prospect that execution of the death program might differ in different neuronal subpopulations (Nicotera et al., 1999). For example, the contribution of individual receptors could be relevant in the decision of the mode of cell death (Portera-Cailliau et al., 1997b). The degree of Ca^{2+} overload might also convert the mode of cell death in some cases from apoptosis to necrosis (Gwag et al., 1995).

In the present work, significant neuronal loss was observed in the cerebral cortex at PD8, 10, and 14 under normal conditions, which is in accordance with studies reporting a normal neuronal loss associated with DNA fragmentation during postnatal brain development (Cowan et al., 1984; Clarke, 1990). Together with this natural process, neonatal MSG administration produced an increase in neuronal death, characterized by cell shrinkage and cytoplasmic vacuolation, particularly at PD8 and 10, where a 30% reduction in cell number was observed (Fig. 2 and 3). In this respect, after the TUNEL method, it was shown that 37 and 63% of total neuronal death induced by

MSG at PD8 and PD10, respectively, seems to be through apoptosis. It could mean that the remaining neuronal death may be via necrosis or by slow and progressive neuronal destruction.

Results show that the p38 inhibitor, SB203580, administered 30 min before MSG was able to protect that neuronal death observed at PD8 and 10 (Fig. 3). These data suggest that p38 signaling pathway could modulate apoptosis seen in Glu-induced neurotoxicity in this in vivo model. In this way, it has been demonstrated that prolonged activation of p38 or its analogs such as quinolinic acid (Jiang et al., 1997; Juo et al., 1997) seems to be involved in neuronal apoptosis and p38 inhibitors promote survival of a variety of neurons in vitro in both Glu administration and hypoxia models (Kawasaki, et al., 1997; Clerk et al., 1998). Similarly, this signaling has been associated with neuronal death in different ischemic models, in which SB203580 pretreatment reduced ischemic cell death in the CA1 region (Sugino et al., 2000). In the present study, the administration of SB203580 thus pro-

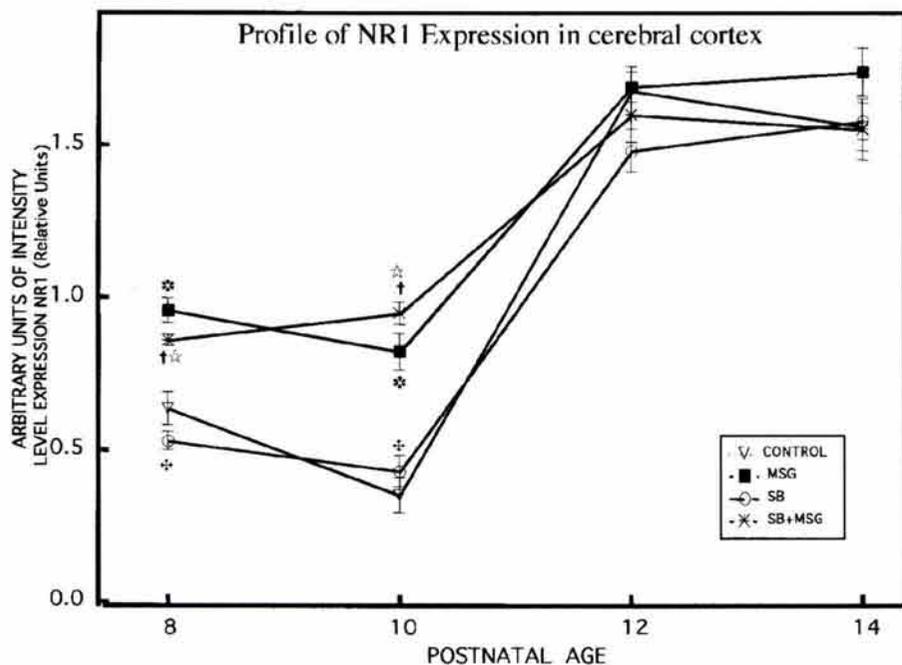


Fig. 4. Effects of MSG on the expression of the NR1 subunit in cerebral cortices of rats treated neonatally (PD1, 3, 5, and 7) with 4 mg/g body weight MSG (experimental group). Total RNA was extracted using Trizol reagent and RT-PCR of NR1 mRNA was carried out at different postnatal ages (PD8, 10, 12, and 14), using appropriate sense and anti-sense primers and conditions (Table I). β -Actin was used as the constitutively expressed control gene. Values are the mean (\pm SEM) of two PCR reactions per animal, with four animals in each group. Significantly different compared to: control group vs. MSG: asterisk, $P < 0.001$; control group vs. SB203580: filled star, $P < 0.001$; control group vs. SB203580 + MSG: dagger, $P < 0.001$. MSG group vs. SB203580: cross, $P < 0.001$. SB203580 alone vs. SB203580 + MSG: star, $P < 0.001$.

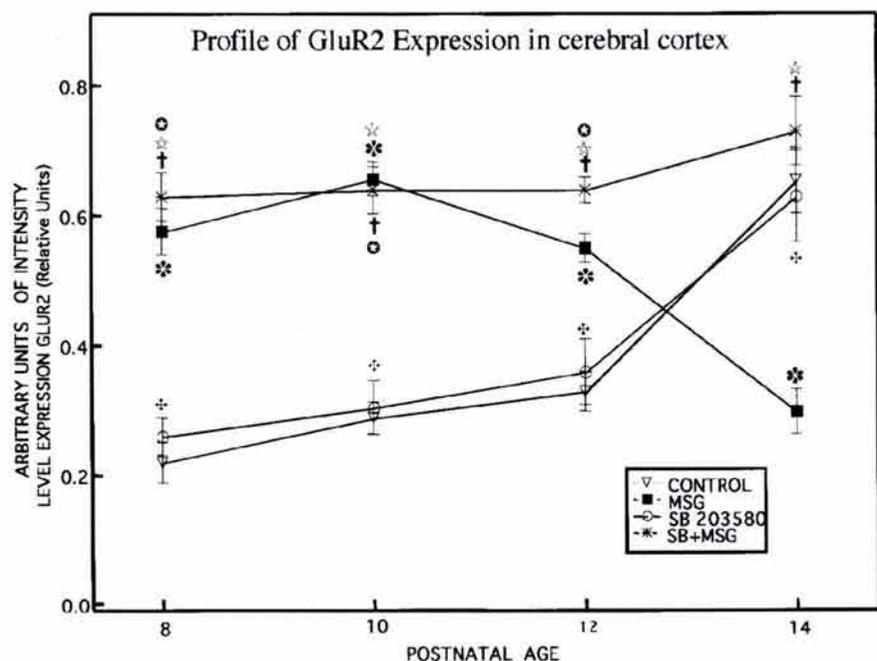


Fig. 5. Effect of MSG on GluR2 subunit expression in cerebral cortices of rats treated neonatally with MSG (experimental group) at a dose of 4 mg/g body weight. Total RNA was extracted using Trizol reagent RT-PCR of β -actin, and GluR2 mRNA were carried out as in Figure 4. β -Actin was used as the constitutively expressed control gene. Values are the mean (\pm SEM) of two PCR reactions per animal, with four animals in each group. Significantly different compared to: control group vs. MSG: asterisk, $P < 0.001$; control group vs. SB203580: filled star, $P < 0.001$; control group vs. SB203580 + MSG: dagger, $P < 0.001$. MSG group vs. SB203580: cross, $P < 0.001$; MSG group vs. SB203580 + MSG: circled star, $P < 0.001$. SB203580 vs. SB203580 + MSG: star, $P < 0.001$.

vided significant neuroprotection when administered before MSG *in vivo*. In this excitotoxic model, however, substantial cell death remained, which argues that even mild excitotoxicity clearly has additional p38-independent components that may contribute to cell death. It is therefore possible that remaining cells, which subsequently died by excitotoxic damage, may have used a signaling pathway different from that through p38 activation.

This process of neuronal death seems to be influenced by differential activation of the Glu-R subtypes. It may be due possibly to high variation in expression, localization, and functions of the Glu-R subtypes and signaling systems. It is therefore possible to infer that susceptibility to neuronal death induced by excitotoxic conditions differs between brain regions and in various developmental stages of the nervous system (Clarke, 1990;

Martin et al., 1993; Jakowec et al., 1995; Portera-Cailliau et al., 1997a,b).

Spatial and temporal distribution of the NMDA-R subunit mRNA has been examined by in situ hybridization analyses (Ozawa et al., 1998). In adult rodents, NR1 subunit mRNA is distributed ubiquitously in the brain throughout CNS development. In contrast, mRNA encoding the four NR2 subunits exhibit differential distribution in the brain. NR2A mRNA is distributed widely in the brain, particularly in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum, whereas the NR2B transcript occurs selectively in the forebrain, with high-level expression in cerebral cortex. Expression patterns of the NR2 subunits are also regulated during development in the rodent brain (Watanabe et al., 1992; Monyer et al., 1994). NR2B and NR2D mRNA occur prenatally, whereas NR2A and NR2C mRNA are first detected around birth.

In this work, enhanced expression of NR1, particularly significant at PD8 and 10 under effect of toxic Glu (Fig. 4) is especially important, due mainly to its postulated role in Glu-induced neurotoxicity. According to some hypotheses, intracellular entry of excess Ca^{2+} and Na^+ through NMDA ion channels, and to a lesser extent through AMPA ion channels, is a primary cause of cell death (Choi, 1992). Because the NR1 subunit is required for NMDA-R heterodimers, its level of expression and abundance may govern the number of functional NMDA channels formed (Seeburg, 1993). In this manner, the increase in NR1 subunit expression observed in the present work suggests a greater amount of NMDA receptor constituted with this subunit, as well as an important increase in GluR2 subunit expression, which was also observed at PD8 and 10 (Fig. 4 and 5). This increase in GluR2 could induce formation of AMPA-R channels that determine initial neuronal depolarization through high Na^+ permeability via AMPA-R, resulting in an overactivation of NMDA-R by removing Mg^{2+} ions from this channel, which may mediate the initial mechanisms of neuronal death.

AMPA receptors containing an edited form of the Glu receptor subunit GluR2 are relatively impermeable to Ca^{2+} ; receptors lacking this subunit are much more permeable to calcium (Hume et al., 1991; Dingledine et al., 1999). It had been demonstrated widely that an acute reduction in GluR2 expression could act as a molecular switch, leading to increased Ca^{2+} permeability of AMPA receptors and enhanced toxicity of Glu in neurologic disorders (Pellegrini-Giampietro et al., 1997).

In the present work, reduction in GluR2 mRNA observed at PD14 does not seem to be associated directly with an immediate neuronal death via apoptosis (Fig. 3 and 5). Decreased GluR2 subunit expression could constitute part of the process to induce progressive neuronal death, which is in accordance with several works in different toxicity and ischemia models (Gorter et al., 1997; Oguro et al., 1999).

p38 is an evolutionary conservation mechanism for transducing external stress and injury to internal cellular

responses that balance cell survival and cell death (Mori et al., 2002). Recent studies have shown that p38 is implicated in progression of acute brain damage after ischemia (Sugino et al., 2000). Phosphorylated Jun-N-terminal kinase (JNK) and p38 are expressed in neurons and glial cells in the cerebral cortex and hippocampus after transient forebrain ischemia (Takagi et al., 2000), and p38 inhibitors attenuate neuronal damage after focal cerebral ischemia (Legos et al., 2001). The results of the study by Legos et al. (2001) are in agreement with those of the present work, in that neuronal death induced by neonatal MSG administration is inhibited by SB203580, indicating that this transduction signaling pathway is important in inducing cellular death processes via overactivation of Glu receptors.

The effect of SB203580 on NMDA-R expression in the cerebral cortex in both normal and MSG-treated animals was also evaluated. SB203580 administered 30 min before MSG produced a protective effect against changes in the expression of GluR2 subunits induced by MSG alone at PD14. This effect was not observed on NR1. These results suggest that the p38 signaling pathway also participates in regulation of Glu-R subunit expression, possibly through activation of different transcription factors, such as c-fos, c-jun, and ATF2, as suggested by several authors (Hughes and Dragunow, 1995; Banasiak et al., 2000; Mielke and Herdegen, 2000). Further studies are required to clarify mechanisms involved in regulation of gene expression mediated by this MAPK.

In conclusion, the underlying process that mediates cell death after neonatal MSG administration remains to be elucidated, but clearly includes the overlapping mechanisms of excitotoxicity and cell-signaling pathways. Because overactivation of Glu receptors seems to induce differential changes in Glu-R expression, it could be related directly to neuronal death processes. This suggests that changes in the composition of Glu-R, which may increase Ca^{2+} permeability and activation of the p38 pathway, could be involved directly in the mechanism for that neurotoxicity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of the doctoral thesis of M.C. Rivera-Cervantes, and was supported partially by CONACyT (grant 30901-M) and FOFOI (grant IMSS-2002/009 to C.B.Z.).

REFERENCES

- Albers GW, Goldberg MP, Choi DW. 1992. Do NMDA antagonists prevent neuronal injury? *Yes*. *Arch Neurol* 49:418-420.
- Ankarkona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15:961-973.
- Armendariz-Borunda J, LeGross JL, Campollo O, Panduro A, Rincon AR. 1997. Antisense oligodeoxynucleotides down-regulate TGF β -production by Kupffer cells from CCl $_4$ -injected rat livers. *Biochim Biophys Acta* 1353:241-252.
- Banasiak JK, Xia Y, Haddad GG. 2000. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 62:215-249.

- Barron KD, Means ED, Larsen E. 1973. Ultrastructure of retrograde degeneration in thalamus of rat I. Neuronal somata and dendrites. *J Neuropathol Exp Neurol* 32:218-244.
- 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* 39:1-10.
- Beilharrz EJ, Williams CE, Dragunow M, Sirimanne ES, Gluckman PD. 1995. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Brain Res Mol Brain Res* 29:1-14.
- Buchan AM, Xue D, Haung ZG, Smith K-F, Lesiuk H. 1991. Delayed AMPA receptors blockade reduces cerebral infarction induced by focal ischemia. *Neuroreport* 2:473-476.
- Cheung NS, Carrol FY, Larm JA, Beart PM, Giardina SF. 1998. Kainate-induced apoptosis correlates with c-Jun activation in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 52:69-82.
- Choi DW. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379.
- Choi DW. 1988a. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Choi DW. 1988b. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.
- Choi DW. 1992a. Bench to bedside: the glutamate connection. *Science* 258:241-243.
- Choi DW. 1992b. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.
- Choi DW, Rothman SM. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:1261-1276.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Clarke PGH. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181:195-213.
- Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH. 1998. Stimulation of "stress regulated" mitogen activated protein kinases (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J Biol Chem* 273:7228-7234.
- Collingridge GL, Lester RA. 1989. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 40:144-209.
- Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DDM, Stanfield B. 1984. Regressive events in neurogenesis. *Science* 225:1258-1265.
- Delgado-Rizo V, Salazar A, Panduro A, Armendariz-Borunda J. 1998. Treatment with anti-transforming growth factor- β antibodies influenced and altered patterns of cytokine gene expression in injured rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1442:20-27.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dingledine R, McBain C. 1999. Glutamate and aspartate. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Uhler ME, editors. *Basic neurochemistry*. Philadelphia: Lippincott Raven Press. p 315-333.
- Du Y, Bales KR, Dodel RC, Hamilton-Bird E, Horn JW, Czilli DL, Simmons LK, Ni B, Paul SM. 1997. Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11657-11662.
- Dugan LL, Choi DW. 1999. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Uhler ME, editors. *Basic neurochemistry*. Philadelphia: Lippincott Raven Press. p 711-729.
- Feria-Velasco A, Karnovsky MJ. 1970. Preservación óptima del sistema nervioso central por perfusión con glutaraldehído para estudio ultraestructural. *Arch Invest Med (Mex)* 1:201-220.
- Finkbeiner S, Greenberg ME. 1996. Ca^{2+} -dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? *Neuron* 16:233-236.
- Ghosh A, Greenberg ME. 1995. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239-247.
- Gill R. 1994. The pharmacology of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA)/kainate antagonists and their role in cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 6:225-256.
- Goldberg MP, Choi DW. 1993. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13:3510-3524.
- Gorter JA, Petrozzino JJ, Aronica EM, Rosebaun DM, Thoralf O, Bennett MVL, Connor JA, Zukin S. 1997. Global ischemia induced downregulation of GluR2 mRNA and increases AMPA receptors-mediated Ca^{2+} influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci* 17:6179-6188.
- 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.
- Gwag BJ, Lobner D, Koh JY, Wie MB, Choi DW. 1995. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro. *Neuroscience* 68:615-619.
- Hahn JS, Aizenman E, Lipton SA. 1988. Central mammalian neurons resistant to glutamate toxicity are made sensitive by elevated extracellular calcium: toxicity blocked by the N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6556-6560.
- Horstmann S, Kahle PJ, Borasio GD. 1998. Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase promote neuronal survival in vitro. *J Neurosci Res* 52:483-490.
- Hughes P, Dragunow M. 1995. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 47:133-178.
- Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF. 1991. Identification of the site in glutamate-receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253:1028-1031.
- Jakowec MW, Fox AJ, Martin LJ, Kalb RG. 1995. Quantitative and qualitative changes in AMPA receptor expression during spinal cord development. *Neuroscience* 67:893-907.
- Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di-Padova F, Ulevitch RJ, Han J. 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38 delta. *J Biol Chem* 272:30122-30128.
- Juo P, Kuo CJ, Reynolds SE, Konz RF, Raingeaud J, Davis RJ, Biemann HP, Blenis J. 1997. Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway requires ICE/CED 3 family proteases. *Mol Cell Biol* 17:24-35.
- Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, Nishida E. 1997. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 272:18518-18521.
- Kobayashi T, Mori Y. 1998. Ca^{2+} channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 363:1-15.
- Koh JY, Choi DW. 1991. Selective blockade of non-NMDA receptors does not block rapidly triggered glutamate-induced neuronal death. *Brain Res* 548:318-321.
- Kohr G, Heinemann U. 1989. Effects of NMDA antagonists on picrotoxin-, low Mg^{2+} - and low Ca^{2+} -induced epileptogenesis and on evoked changes in extracellular Na^{+} and Ca^{2+} concentrations in rat hippocampal slices. *Epilepsy Res* 4:187-200.
- Kuroiwa T, Okeda R. 1994. Neuropathology of cerebral ischemia: recent advances in experimental studies on its pathogenesis. *Pathol Int* 44:171-181.
- Legos JJ, Erhardt JA, White RF, Lenhart SC, Chandra S, Parsons RF, Barone FC. 2001. SB239063, a novel p38 inhibitor, attenuates early neuronal damage following ischemia. *Brain Res* 892:70-77.

- Leist M, Volbracht C, Fava E, Nicotera P. 1998. N-Methyl-4-phenylpyridinium induces autocrine excitotoxicity, protease activation, and neuronal apoptosis. *Mol Pharmacol* 54:789–801.
- Lev S, Moreno H, Martínez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schelessinger J. 1995. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376:737–745.
- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. 1986. NMDA receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature* 321:519–522.
- Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Hagan RL, Price DL. 1993. AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* 53:327–358.
- Michaels RL, Rothman SM. 1990. Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J Neurosci* 10:283–292.
- Mielke K, Herdegen T. 2000. JNK and p38 stress kinases—degenerative effectors of signal-transduction cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* 61:45–60.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sackmann B, Seeburg PH. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529–540.
- Mori T, Wang X, Jung JC, Sumii T, Singhal AB, Fini ME, Dixon CE, Alessandrini A, Lo EH. 2002. Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: In vitro and in vivo effects. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:444–452.
- Nebreda AR, Porras A. 2000. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25:257–260.
- Nicotera P, Leist M, Manzo L. 1999. Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 20:46–51.
- Oguro K, Oguro N, Kojima T, Sonja Y, Calderone A, Zheng X. 1999. Knockout of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons. *J Neurosci* 19:9218–9227.
- Olney JW. 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer E, Olney JW, McGeer P, editors. *Kainic acid as a tool in neurobiology*. New York: Raven Press. p 95–121.
- Olney JW. 2002. New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology* 23:659–668.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581–618.
- Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS. 1997. The GluR2 (GluRB) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20:464–470.
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. 1997a. Excitotoxic neuronal death in immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol* 378:70–87.
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. 1997b. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neurol* 378:88–104.
- Seeburg PH. 1993. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 16:359–365.
- Siesjö BK. 1992. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77:169–184.
- Siesjö BK, 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.
- Simon RP, Griffiths T, Evans MC, Swan JH, Meldrum BS. 1984. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226:850–852.
- Skaper SD, Walsh FS. 1998. Neurotrophic molecules: strategies for designing effective therapeutic molecules in neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci* 12:179–183.
- Smith SE, Meldrum BS. 1992. Cerebroprotective effect of a non-N-methyl-D-aspartate antagonists, GYK152466, after focal ischemia in the rat. *Stroke* 23:861–864.
- Sugino T, Kazunhiko N, Takagi Y, Hattori I, Hashimoto N, Moriguchi T, Nishida E. 2000. Activation of mitogen-activated protein kinase after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *J Neurosci* 20:4506–4514.
- Takagi Y, Nozaki K, Sugino T, Hattori I, Hashimoto N. 2000. Phosphorylation of c-Jun NH(2)-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase after transient forebrain ischemia in mice. *Neurosci Lett* 294:117–120.
- Towfighi J, Mauger D. 1998. Temporal evolution of neuronal changes in cerebral hypoxia-ischemia in developing rats: a quantitative light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res* 109:169–177.
- Walton KM, DiRocco R, Bardett BA, Koury E, Marcy VR, Jarvis B, Shaefer EM, Bhat RV. 1998. Activation of p38 MAPK in microglia after ischemia. *J Neurochem* 70:1764–1767.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M. 1992. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138–1140.
- 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.