

MI PROYECTO DE TESIS

Papel de los receptores NMDA de glutamato en la vulnerabilidad neuronal después de isquemia cerebral transitoria en rata.

Severiano Dos Anjos Vilaboa

Área de Biología Celular. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad de León. 24071. León.

sanjv@unileon.es.

Cuando no llega la sangre a una parte o todo el cerebro (ictus) se produce una disminución de oxígeno y nutrientes (especialmente glucosa) que lleva a la muerte de muchas células de las regiones afectadas. Cuando se reanuda de nuevo el riego sanguíneo (reperusión), muchas neuronas que sobrevivieron a la interrupción del mismo (isquemia), pueden sufrir una muerte celular retrasada que se produce incluso varios días después del ictus. Algunas neuronas son más vulnerables que otras a la isquemia. Un área particularmente vulnerable a la isquemia es el hipocampo, una región implicada en los mecanismos de memoria y reconocimiento de lugares. En el hipocampo se reconocen varias regiones, pero en particular el área CA1 es mucho más vulnerable que las áreas CA3 y giro dentado –GD- (**Figura 1 y 2**). En este proyecto de tesis se pretende averiguar si esta diferencia en la vulnerabilidad celular en el hipocampo es debida a uno de los mecanismos de señalización celular del sistema glutamatérgico. Este sistema juega un papel crucial en los mecanismos de aprendizaje, pero su sobreexcitación induce muerte celular (excitotoxicidad). El sistema glutamatérgico utiliza el glutamato para enviar un mensaje desde una neurona a otra. La neurona que recibe el mensaje puede utilizar varios sistemas de reconocimiento del mismo, uno de ellos, son unos canales proteicos situados en la membrana denominados receptores NMDA que permiten el paso del calcio al interior de la célula cuando son activados por el glutamato. Cada receptor NMDA está formado normalmente por cuatro polipéptidos (subunidades) que se unen para formar el canal. La célula puede expresar distintos tipos de subunidades pero cada canal para ser funcional debe estar constituido al menos por dos tipos de subunidades, una subunidad NR1 y un tipo de subunidad NR2 (NR2A, B, C, D). Durante la isquemia existe un aumento muy significativo en los niveles extracelulares de

glutamato que produce la sobreexcitación de los receptores NMDA y lleva a la muerte neuronal. En este proyecto de tesis proponemos la hipótesis de que las neuronas que sobreviven modifican tanto el número de receptores como la composición de las subunidades del receptor.

Para probar nuestra hipótesis utilizamos ratas de la cepa Sprague-Dawley, las cuales fueron anestesiadas y sometidas a un proceso de isquemia cerebral global durante 15 minutos. Después de 48 horas se compararon las modificaciones morfológicas y la expresión de ARNm y proteínas de las principales subunidades de los receptores NMDA entre animales sometidos a isquemia y los correspondientes animales control. El análisis se realizó en varias regiones cerebrales (hipocampo, cortex y núcleo basales) que tienen diferente vulnerabilidad a la isquemia (**Figura 1**).

Los resultados obtenidos mediante técnicas histológicas (violeta de cresilo) y un colorante fluorescente que permite detectar neuronas en proceso de degeneración (fluor Jade-B) confirman que existe una importante mortalidad neuronal retrasada en el área CA1 del hipocampo y menor en las áreas CA3 y GD (**Figura 2**). En el córtex cerebral y núcleos basales (caudado putamen), las neuronas también se encuentran afectadas pero no observamos una muerte neuronal tan importante.

Los estudios de PCR en tiempo real para analizar los niveles de ARN mensajero de las distintas subunidades de los receptores NMDA nos permitieron detectar descensos muy importantes tras la isquemia cerebral. Tras la comparación de las proporciones de ARNm de las distintas subunidades (patrón de expresión) observamos diferencias significativas del hipocampo con respecto a estructuras cerebrales más resistentes al daño isquémico (córtex y núcleos basales). En el hipocampo observamos una importante modificación de la expresión de una de las subunidades NR2A en relación a NR1 y NR2B que se correlaciona también con los datos de la expresión proteica de estas subunidades analizadas por Western blot. Los datos indican que las células resistentes a la isquemia reducen el número y cambian la composición de sus receptores NMDA, como pensábamos inicialmente, aunque no parecen ser los únicos responsables de la diferencia en la vulnerabilidad neuronal a la isquemia. Nuestros datos también muestran que las células resistentes a isquemia-reperfusión poseen niveles más bajos de la subunidad NR2A que las células de los animales control.

Nuestros resultados se están publicando en revistas internacionales reconocidas en el área de neurociencias, como Brain Research o Neurochemistry International, entre otras.

Dirigida por:

Dr. Arsenio Fernández López. Área de Biología Celular. Dpto. Biología Molecular.
Fecha prevista de defensa: finales de 2008.

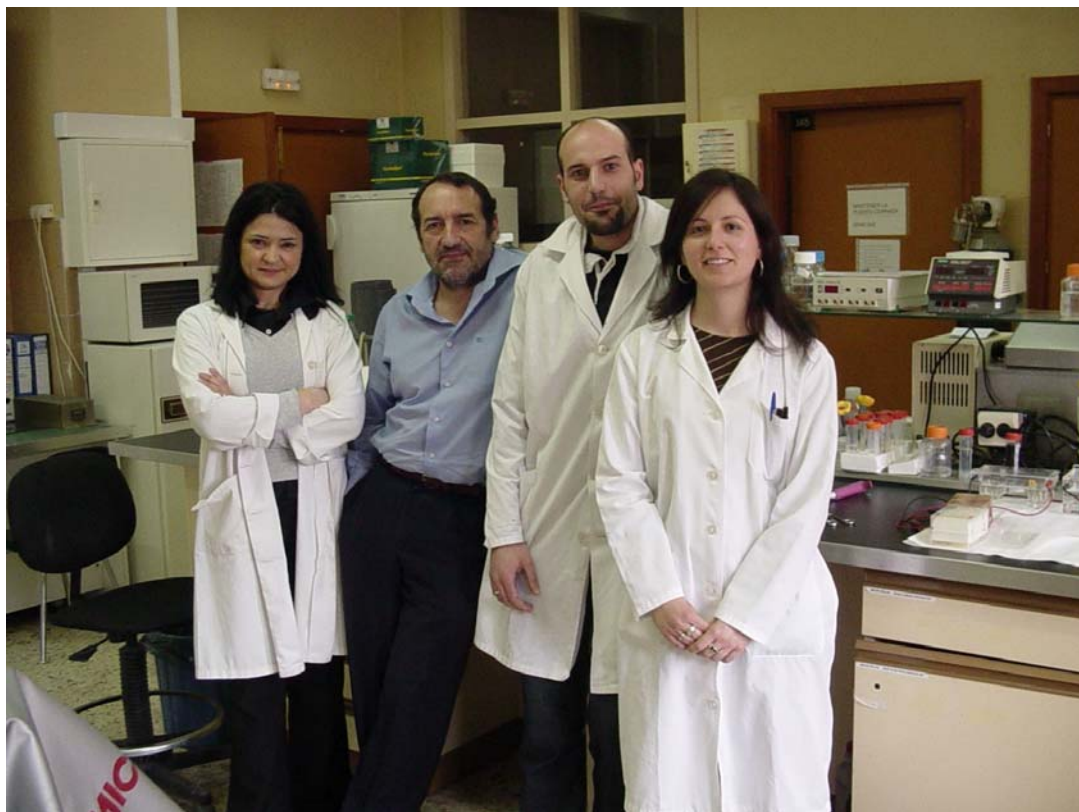
Otros miembros del equipo de investigación:

Dr. Pedro Calvo Fernández (Área de Bioquímica y Biología Molecular)
Dr. Carlos César Pérez García (Área de Medicina Veterinaria)
Dra Beatriz Martínez Villayandre (Área de Bioquímica y Biología Molecular)
D. Sheyla Montori Pina (Área Biología Celular)

Colaboradores

Dr José Manuel Gonzalo Orden (Dpto. Medicina y Cirugía Animal)
D. Marta María Reguero Purriños (Dpto. Medicina y Cirugía Animal)

Galería de fotos



Grupo de investigación al que pertenece el autor de la tesis doctoral. De izquierda a derecha: Dra Beatriz Martínez Villayandre; Dr. Arsenio Fernández López, Severiano Dos Anjos Vilaboa y Sheyla Montori Pina.

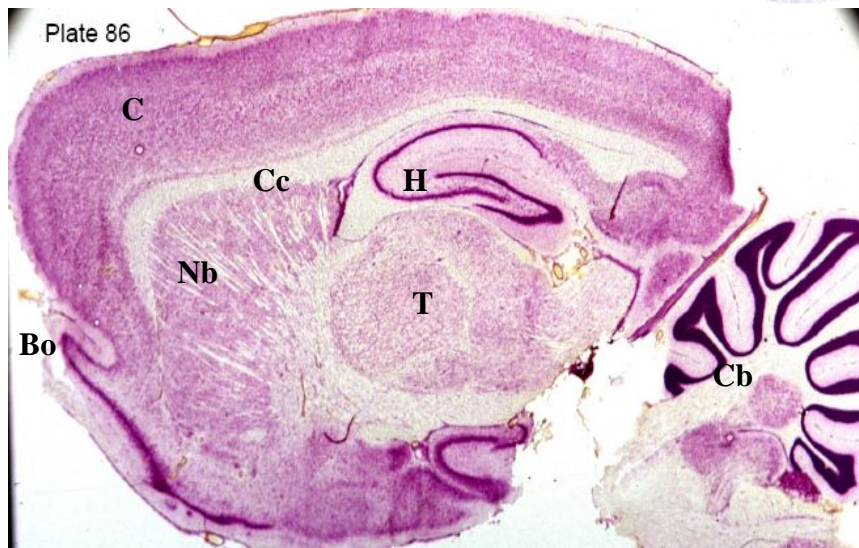


Figura 1. Corte sagital de cerebro de rata teñido con violeta de cresilo. Bo: bulbo olfatorio; C: cortex cerebral; Cb: cerebelo; Cc: cuerpo calloso; H: hipocampo; Nb: Núcleos basales (caudado-putamen); T: talamo.

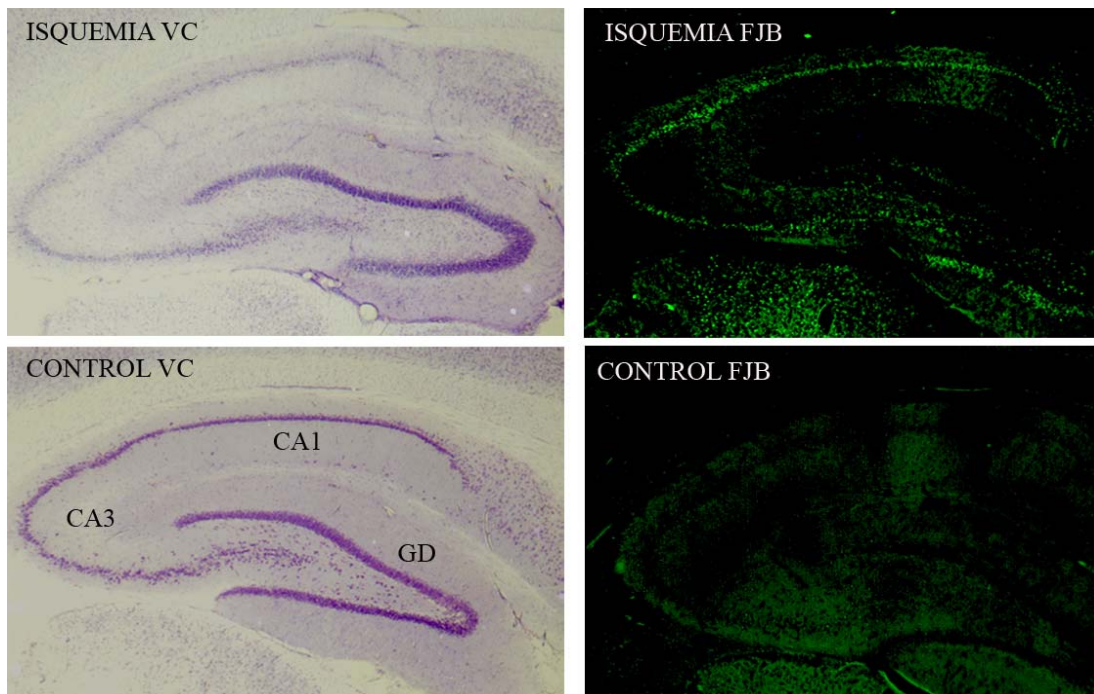


Figura 2.- Efectos de la isquemia cerebral sobre el hipocampo de rata. Se muestran imágenes del hipocampo, teñidas con violeta de cresilo (VC) y con fluorojade-B (FJB). Las imágenes muestran las claras diferencias existentes entre los animales control y sometidos a isquemia cerebral. Obsérvese la disminución del número de neuronas en el área CA1 del hipocampo observable en la tinción con violeta de cresilo. Mediante el uso del colorante fluorescente fluorojade-B (FJB) se detectan neuronas en degeneración solamente en las ratas sometidas a isquemia. GD: giro dentado.