

AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE LA SUBUNIDAD-1 DEL RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDAR-1) EN EL HIPOTÁLAMO OVINO MEDIANTE LA TÉCNICA DE RT-PCR

DNA Amplification of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit-1 (NMDAR-1) in Sheep Hypothalamus by RT-PCR

Ana Z. Ruiz E.¹ y Roger Kittok²

¹*Departamento de Ciencias Biomédicas, Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Apartado Postal 4563, Maracay, Venezuela. E-mail: ruizz11@yahoo.com*

²*Animal Sciences Department, University of Nebraska-Lincoln. Nebraska 68503, United States.*

RESUMEN

El receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), uno de los principales receptores de los aminoácidos excitatorios, ha sido involucrado en el control de la secreción de la hormona luteinizante (LH) al facilitar la liberación de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH). La capacidad del NMDAR para estimular la liberación de la LHRH está significativamente comprometida en animales castrados. En este estudio se plantearon tres objetivos: Primero, estandarizar las condiciones óptimas para re-amplificar el ADN de la subunidad-1 del NMDAR (NMDAR-1) en ovino. Segundo, determinar si existe diferencia en la distribución del ADN de la NMDAR-1 en los diferentes cuadrantes hipotalámicos del ovino no castrado y finalmente, determinar si las hormonas sexuales testiculares están involucradas en la expresión del NMDAR en el hipotálamo. El ADN de la NMDAR-1 procedente de cuatro cuadrantes del hipotálamo (cuadrantes dorsal-rostral, ventral-rostral, dorsal-caudal, y ventral-caudal) fue amplificado mediante la técnica de RT-PCR. Las condiciones óptimas encontradas para amplificar el ADN de la NMDAR-1 fueron 1,5 mM CIMg2, 100 nM de los oligonucleótidos iniciadores y 59°C como temperatura de hibridación. No se observó efecto del cuadrante del hipotálamo sobre la expresión del ADN de la NMDAR-1 en el hipotálamo del ovino no castrado. La castración redujo ($P < 0,05$) la expresión del ADN para el NMDAR-1, comparado con la de animales no castrados. Estos resultados sugieren que el NMDAR-1 se encuentra distribuido ampliamente en el hipotálamo del ovino. Además, a través de estos resultados se puede presumir que

la expresión del receptor NMDA en el hipotálamo del ovino está afectada por las hormonas sexuales esteroideas.

Palabras clave: Receptor NMDA, ovino, ADN patrón, RT-PCR, hormonas testiculares.

ABSTRACT

The N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), one of the excitatory amino acid receptors, has been implicated in the control of luteinizing hormone (LH) secretion through facilitation of luteinizing hormone releasing-hormone (LHRH). Interestingly, the ability of NMDAR to stimulate LHRH release is significantly compromised in castrated animals. The present study had three aims. Firstly, to standardize the optimal conditions used to amplify the DNA for NMDAR subtype-1 (NMDAR-1) in the sheep. Second, to determine whether a difference exists in the distribution of DNA for NMDAR-1 in different hypothalamic regions in intact male sheep. Finally, to determine if testicular steroid hormones are involved in NMDA receptor expression in the hypothalamus. The DNA of NMDAR-1 was amplified by RT-PCR in four quadrants of the hypothalamus (dorsal-rostral, ventral-rostral, dorsal-caudal, and ventral-caudal quadrant) of intact and castrated male sheep. The optimal conditions to amplify the DNA of NMDAR-1 were 1.5 mM $MgCl_2$, 100 nM of primers and 59°C annealing temperature. In experiment 1, there was no effect of quadrant on the DNA expression of NMDAR-1 in the hypothalamus of the intact male sheep. Experiment 2 revealed that castration reduced ($P < 0.05$) the expression of DNA for NMDAR compared to that in intact males. Taken together, these data suggest that NMDAR-1 is widely expressed in the hypothalamus of male sheep. Furthermore these experiments suggest that testicular steroid hormones are

involved in the regulation of NMDAR-1 expression at the DNA level, which allows understanding of its involvement in the modulation of different activities including reproduction.

Key words: NMDA receptor, sheep, template DNA, RT-PCR, testicular steroid hormones

INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos L-glutamato y aspartato, principales aminoácidos excitatorios (AAEs) del sistema nervioso de los mamíferos, han sido involucrados en la regulación de diversas funciones del organismo animal. Estos aminoácidos participan en los procesos de transmisión nerviosa del tipo excitatorio y en la plasticidad sináptica. El L-glutamato ejerce sus funciones a través de diferentes receptores capaces de formar canales iónicos. Los receptores del L-glutamato han sido clasificados de acuerdo a sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas en dos grandes grupos: receptores ionotrópicos y metabotrópicos [21]. Los receptores ionotrópicos se encuentran subdivididos a su vez en receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) y en receptores no N-metil-D-aspartato [22]. Los NMDAR son complejos proteicos heteroméricos compuestos de dos tipos de subunidades, la subunidad-1 (NMDAR-1) y la subunidad-2 (NMDAR-2). La subunidad-1 del receptor NMDA (NMDAR-1) es esencial para el funcionamiento del receptor [14], mientras que la subunidad-2, la cual puede a su vez tener cuatro diferentes tipos (NMDAR-2A, NMDAR-2B, NMDAR-2C y NMDAR-2D), sólo participa en la modulación de las funciones de la subunidad-1 [21]. Las subunidades-2 solo potencian la respuesta de la subunidad-1 ante los agonistas del NMDA o del L-glutamato, afectando la sensibilidad por el Mg^{2+} o alterando la efectividad de las sustancias antagonistas [13, 24].

El receptor NMDA juega un papel clave en la transmisión nerviosa del sistema nervioso central, esencialmente en la inducción de la potenciación del tipo de larga duración, en la adquisición de la memoria, en el aprendizaje del humano, así como en algunos procesos fisiopatológicos asociados a la citotoxicidad tales como la neuro-degeneración del sistema nervioso central (SNC). El receptor NMDA ha sido involucrado en algunos desórdenes neurológicos tales como: Esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, enfermedad de Parkinson y accidentes cerebro-vasculares [13, 14, 22, 23, 26, 28].

El L-glutamato y sus receptores han sido localizados en algunas áreas o núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la reproducción y de ciertos procesos neuroendocrinos tales como pubertad, secreción pulsátil de las hormonas gonadotróficas, y conducta reproductiva en mamíferos. Se han encontrado receptores de L-glutamato en algunos núcleos hipotalámicos tales como el ventromedial, paraventricular, supraquiasmático, magnocelular, supraóptico, arqueado, área hipotalámica lateral y eminencia media. Este aminoácido juega un papel importante en la regulación de la secreción de la hor-

mona luteinizante (LH) desde la glándula pituitaria, a través de la estimulación de la secreción de la hormona estimuladora de la hormona luteinizante (LHRH) liberada por el núcleo periventricular del hipotálamo [2, 3, 5, 30]. El área pre-óptica (APO) del hipotálamo es considerada como la posible región donde el L-glutamato ejerce su acción sobre la secreción de la LHRH. El núcleo anteroventral-periventricular (AVPV) de la APO envía información directa a las neuronas secretoras de LHRH [1, 9, 10, 15, 18, 25]. La activación exógena de los receptores NMDA produce la liberación de LHRH desde el hipotálamo y la subsiguiente liberación de LH desde la glándula pituitaria en roedores [3, 30], primates y ovejas [5]. La administración del glutamato o alguno de sus análogos tales como NMDA (N-metil-D-aspartato) o NMA (N-metil-D, L-aspartato) estimula la secreción de LH en ratas, monos, ratones y hámsteres. Kittok [16] evidenció que sólo los ovinos no castrados respondieron con un incremento en la secreción de la LH después de la administración del análogo NMA, lo que hizo sugerir que la respuesta del hipotálamo ante el glutamato o sus análogos requiere de la presencia de niveles circulantes de las hormonas sexuales esteroideas. Estas hormonas están siendo estudiadas como uno de los posibles factores que regulan la secreción del L-glutamato en los terminales nerviosos del hipotálamo [6, 11, 12].

En esta investigación se plantearon los siguientes objetivos: Primero, estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ácido desoxi-ribonucleico (ADN) de la NMDAR-1 en el hipotálamo del ovino. Segundo, identificar en cuales porciones o cuadrantes del hipotálamo de esta especie está presente el ADN de la NMDAR-1 y finalmente evidenciar si los esteroides testiculares afectan la expresión del ADN de la NMDAR-1 del hipotálamo del ovino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Experimento 1. Fueron empleados seis (6) ovinos machos post-puberales (6-7 meses de edad), no castrados, mestizos de la raza Suffolk. Los animales procedían de la sección de ovinos y caprinos de la Universidad de Nebraska-Lincoln, EUA. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con dietas comerciales y sometidos a los planes sanitarios establecidos para esa región.

Experimento 2. Doce (12) ovejas machos post-puberales (6-7 meses de edad), mestizos de la raza Suffolk fueron usados en este experimento. Los animales fueron sujetos a las mismas condiciones mencionadas en el experimento 1 y se distribuyeron aleatoriamente en uno de los dos grupos experimentales. De los doce ovejas, seis fueron castrados a través de la técnica de colocación de una banda elástica alrededor del escroto, los otros seis animales no fueron castrados, manteniéndolos como animales controles. Veinte días después, todos los animales fueron sacrificados con una sobredosis de

pentobarbital sódico (100 mg/Kg e.v.; Fort Dodge, Fort Sodium pentobarbital; Sleepaway, Fort Dodge Labs, Inc, Ford Dodge, IA, EUA).

Recolección de muestras

Después de sacrificar a los animales procedentes de ambos experimentos, los cráneos fueron abiertos y se removieron los hipotálamos de cada animal. Cada hipotálamo fue seccionado en dos mitades, derecha e izquierda y cada uno de estas a su vez divididas en cuatro porciones o cuadrantes, dorsal-rostral (DR), ventral-rostral (VR), dorsal-caudal (DC) y ventral-caudal (VC). La porción ventral fue cortada de tal manera que la eminencia media fuese incluida en el cuadrante ventral-rostral. Una vez seccionados los tejidos, estos se colocaron en crióviales y se congelaron en nitrógeno líquido para finalmente almacenarlos a -70°C , hasta ser utilizados en la extracción del ARN total y en la amplificación del ADN para la NMDAR-1. La recolección y almacenamiento de los tejidos se realizó en menos de 5 min para evitar así la degradación del ARN de las muestras.

Procedimientos generales

Se extremaron los cuidados durante todos los procedimientos de laboratorio para evitar contaminación con las enzimas ARNasas, las cuales degradan el ARN de las muestras. Todas las superficies de trabajo fueron descontaminadas con RNAase-ZAP (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) así como los equipos, materiales de plásticos, vidrios y micro-pipetas. Todas las soluciones empleadas fueron preparadas con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) el cual destruye las enzimas ARNasas. Se emplearon guantes estériles durante todos los procedimientos de laboratorio, para evitar cualquier contaminación con RNAasas.

Extracción del ARN total

El ARN total fue extraído de cada uno de los cuadrantes de una mitad del hipotálamo de cada animal [4]. El tejido hipotálámico (300 mg) fue colocado en un vial que contenía Trizol-LS (0,75 mL de Trizol por cada 100 mg de tejido, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) y homogeneizado (homogenizador Polytron, Kinematica GmbH, Switzerland) durante 30 a 60 seg. El homogeneizado fue transferido a un tubo de microcentrífuga estéril e incubado durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4°C y al sobrenadante se le añadió cloroformo en una relación de 200 μL de cloroformo por cada 100 mg de tejido. Se agitó la preparación vigorosamente por 15 seg y luego se incubó por un período de 2 a 3 min a temperatura ambiente. La preparación se centrifugó a 12.000 rpm por 15 min a 4°C y luego el sobrenadante fue transferido a un tubo estéril de 1,5 mL. El ARN total fue precipitado añadiendo 375 μL de isopropanol por cada 100 mg de tejido. La preparación se incubó por 10 min a temperatura ambiente y centrifugaron a 12.000 rpm por 10 min a 4°C . El sobrenadante fue re-

movido y el precipitado de ARN fue lavado con 1 mL de etanol (70% v/v) por cada 100 mg de tejido. Los precipitados se dejaron a temperatura ambiente durante 30-60 min. Cada muestra de ARN total fue finalmente reconstituida en 50 μL de agua-tratada con DEPC y almacenada a -70°C .

Tratamiento con la enzima ADNasa I

Antes de convertir el ARN total a su banda complementaria de ADN, las muestras fueron tratadas con la enzima ADNasa en presencia de un inhibidor de la enzima ribonucleasa (40 U/ μL), para evitar cualquier potencial contaminación con ADN genómico y la degradación del ARN. Se preparó una solución madre, la cual contenía agua-tratada con DEPC, 10 X del buffer de la ADNasa, 1 U ADNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) y 40 U del inhibidor de la ribonucleasa (MBI Fermentas, Enzymatic™, Hanover, MD, EUA). Luego se mezclaron 10 μL de la solución madre con 10 μL de cada muestra de ARN, para ser luego incubado a 37°C por 15 min. La enzima ADNasa fue removida a través del procedimiento de extracción con fenol/cloroformo [29]. Se agregaron 180 μL de agua-tratada con DEPC y 180 μL de fenol ácido (pH 4,5): cloroformo en una proporción (1:1), mezclando con micropipeta. Esta mezcla fue centrifugada a 4.000 rpm por 5 min a 4°C . La capa acuosa fue transferida a un nuevo tubo estéril de 0,5 mL y luego se le añadió igual volumen de cloroformo, mezclándose para luego centrifugar a 4.000 rpm por 5 min a 4°C . La capa acuosa fue igualmente conservada y se le agregaron dos volúmenes de isopropanol mezclándose durante algunos minutos para luego ser centrifugada a 13.000 rpm por 10 min a 4°C . Los *pelets* fueron lavados con etanol (70% v/v) y luego secados por 10 a 15 min a temperatura ambiente. Finalmente los *pelets* fueron resuspendidos en 50 μL de agua-tratada con DEPC e incubados a 60°C para garantizar que el ARN quedase disuelto en la fase acuosa.

Cuantificación de ARN total

El ARN fue cuantificado en ng/mL con un fluorómetro TD-700 (Turner Designs, Sunnyvale, CA, EUA) usando isotiocianato de fluoresceína. Las muestras fueron incubadas a 60°C durante 5 a 10 min ladas con una micropipeta. De la muestra de ARN, 1 μL fue mezclado con 9 μL de agua-tratada con DEPC (dilución 1:10). Un μL de la dilución 1:10 fue diluido en 1 mL del compuesto usado para cuantificar el ARN total (Ribogreen; Molecular Probes, ICN, Eugene, OR, EUA) La mezcla fue incubada durante 2 a 3 min a temperatura ambiente, luego fue colocada en el fluorómetro para ser cuantificada. La concentración de ARN total fue expresada en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ [27].

Preparación de la cadena complementaria del ADN (ADN-c) que codifica para la NMDAR-1

La síntesis de la primera cadena complementaria del ADN (ADN-c) para la NMDAR-1, fue realizada en un volumen total de reacción de 20 μL . Primero se preparó una solución

que contenía 2 µL de la solución de ARN total mezclado con 2 µL (0,5 mg/mL) de un oligonucleótido iniciador (Oligo (dT)₁₅: Promega, Madison, WI, EUA), completando el volumen hasta 10 µL con agua-tratada con DEPC. La mezcla fue incubada a 65°C durante 5 min. Se añadieron 10 µL de una segunda mezcla, la cual estuvo compuesta de 1 X del buffer de la enzima transcriptasa reversa, 10 mM ditioneitol (DTT), 40 U de la enzima transcriptasa II reversa (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 5 U de un inhibidor de la enzima ARNasa (Promega, Madison, WI, EUA) y 500 µM de cada uno de los nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Finalmente se incubó en el termociclador (MJ Research, ICN. Waltham, MA, EUA) por 10 min a 25°C, durante 60 min a 42°C y finalmente por 15 min a 70°C. Todas las muestras de ADN-c de la NMDAR-1 fueron almacenadas a -20°C.

Pruebas de calidad del ADN-c

La calidad del ADN-c producido fue evaluada a través del uso de un par de oligonucleótidos iniciadores que amplifican el ADN de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G₃PDH-1 y 2). La PCR fue llevada a cabo en un volumen total de reacción de 50 µL. Dicho volumen contenía 1 µL de ADN-c (40 ng/µL), 1,5 mM de CIMg2 1 µM de cada oligonucleótido iniciador (progresivo 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' y reverso 3' ATGTCGTTGTCCACCCACCT 5'), 1 mM de los desoxinucleótidos dNTPs (Sigma, St. Louis MO, EUA), 0,4 U de la enzima polimerasa y 1X del buffer de la enzima (GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EUA). El termociclador fue programado para que llevara a cabo un proceso de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguido por 29 ciclos, con una desnaturalización a 94°C por 1,5 min, hibridación a 58°C por 3 min, extensión a 72°C por 4 min y con un período de polimerización final de 72°C por 10 min. Los productos PCR procedentes de las muestras problema, así como de los controles positivos (hipotálamo de ratas) y negativos (musculatura esquelética de ovinos) fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y corridos a 100 voltios durante 30 min. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) lo cual permitió visualizar los productos de PCR bajo luz ultravioleta (Hitachi Genetic Systems, Alameda, CA, EUA). Los productos PCR amplificados tienen un peso molecular de 496 pares de bases (pb), como ha sido reportado previamente para otras especies mamíferas [30].

Amplificación del ADN-c que codifica la NMDAR-1

La reacción de amplificación se realizó usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa combinada con Transcripción Reversa (RT-PCR) en un volumen total de 35 µL [23]. Se construyó una posible secuencia de los oligonucleótidos iniciadores específicos para amplificar la cadena complementaria del ADN de la NMDAR-1 del ovejero, mediante el uso del programa BLAST [17]. Este programa permite acceder al Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI), para emplear las secuencias nucleotídicas de un gen reportado

para otras especies en la elaboración de la posible secuencia de este gen en una especie que no es conocida por este Banco de Genética. Se diseñaron un par de oligonucleótidos iniciadores, Glut-R-1388 y Glut-R-2200, para re-amplificar la NMDAR-1 del hipotálamo ovino. El iniciador GlutR-1388 (5'AACGACCACTTCACTCCAC 3'), tiene una longitud de 20 nucleótidos, que corresponde a una porción del receptor inotrópico del *Homo sapiens*, desde el nucleótido 1388 hasta el nucleótido 1408. El iniciador GlutR-1388 (3'GCCATTGTAGAT-GCCCACTT 5'), tiene una longitud de 20 nucleótidos que corresponde a una porción del receptor inotrópico del *Homo sapiens*, desde el nucleótido 2180 hasta el nucleótido 2200. Se evaluaron las condiciones óptimas con las cuales los iniciadores son más eficientes en la re-amplificación del NMDAR-1. Se probaron cuatro diferentes concentraciones de CIMg2: 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mM. Se evaluaron tres temperaturas de hibridación: 55, 57 y 59°C. Finalmente, se evaluaron tres diferentes concentraciones de los iniciadores: 100, 200 y 300 nM. Después de optimizar el proceso de amplificación del ADN de la NMDAR-1, se procesaron los diferentes cuadrantes hipotalámicos, tanto de animales no castrados como de animales castrados o no.

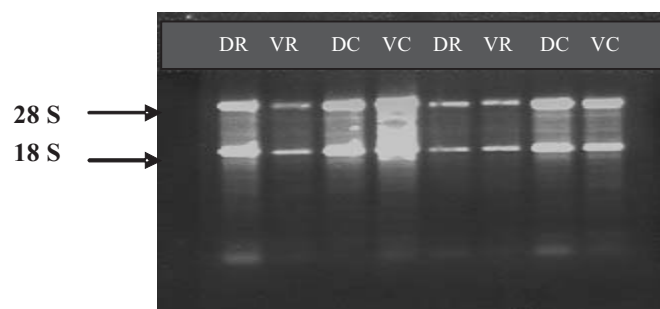
Análisis estadísticos

En ambos experimentos, se realizó una prueba de Fisher, para evaluar si la expresión del ADN patrón o molde para la NMDAR-1 fue afectado por las regiones o los diferentes cuadrantes hipotalámicos evaluados [20].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización de la RT-PCR con los oligonucleótidos iniciadores Glut-R-1388 y Glut-R-2200.

Después de extraer el ARN de los cuatro cuadrantes del hipotálamo de los ovejeros no castrados (FIG. 1) y de evaluar la

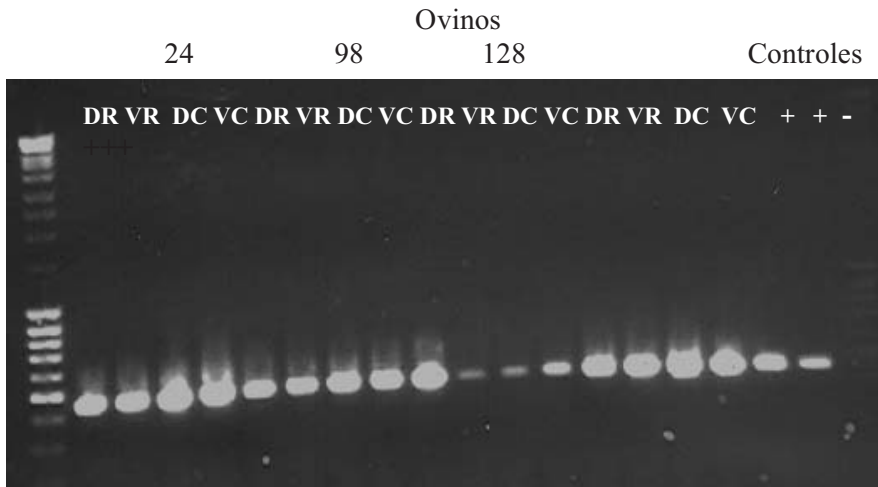


DR representa el cuadrante dorsal rostral, VR representa el cuadrante ventral rostral, DC representa el cuadrante dorsal caudal y VC representa el cuadrante ventral caudal del hipotálamo de dos ovinos. 28 y 18 S representan las fracciones del ARN ribosomal de células eucariotas, extraído del tejido hipotalámico ovino.

FIGURA 1. ARN TOTAL EXTRAÍDO DE CUATRO CUADRANTES DEL HIPOTÁLAMO DE OVINOS NO CASTRADOS / EXTRACTION OF TOTAL RNA PERFORMED ON FOUR QUADRANTS OF THE HYPOTHALAMUS OF MALE SHEEP.

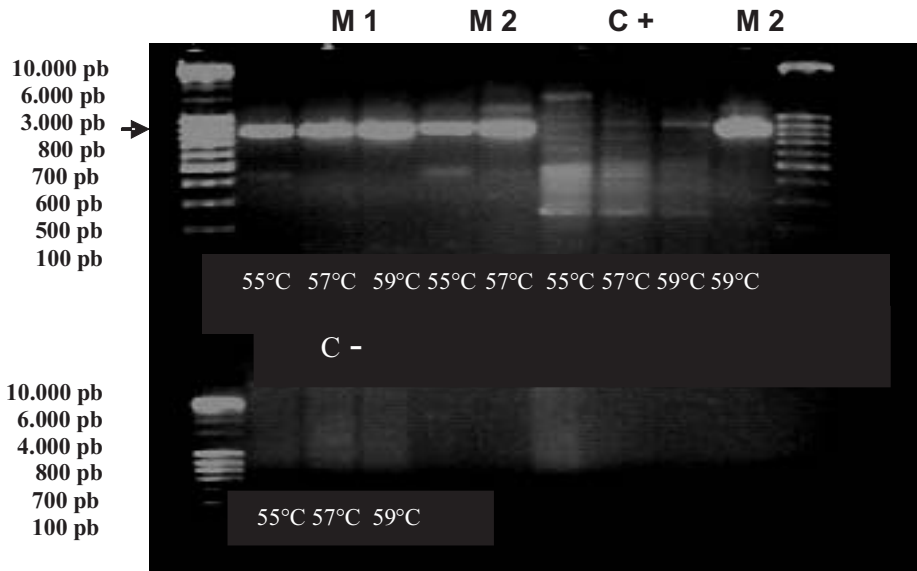
calidad del ADN-c obtenido mediante la expresión de la enzima G₃PDH (FIG. 2), fueron estandarizadas las condiciones óptimas de la reacción de RT-PCR para el par de oligonucleótidos iniciadores Glut-R-1388 y Glut-R-2200 diseñados. Para la amplificación del ADN de la NMDAR-1 en forma óptima se requirió lo siguiente: 3 µL de ADN-c a una concentración prome-

dio de 150 ng/µL, 5 unidades de la enzima polimerasa (Promega, Madison, WI, EUA), 1,5 mM de CIMg₂, 200 µM de dNTP, 1X del buffer libre de CIMg₂ y 200 nM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores del receptor NMDA (FIG. 3). Las condiciones térmicas del termociclador para amplificar la NMDAR-1, consistieron de un periodo de desnaturalización de



DR representa el cuadrante dorsal rostral, VR representa el cuadrante ventral rostral, DC representa el cuadrante dorsal caudal y VC representa el cuadrante ventral caudal del hipotálamo de cuatro ovinos. Controles positivos (hipotálamo de ratas y ratones), y Control negativo (músculo esquelético de ovino). El estándar del ADN con bandas desde 10.000 hasta 100 pares de bases (pb).

FIGURA 2. TRANSCRIPCION REVERSA DEL ARN PARA PRODUCIR ADN-c DE LA ENZIMA G₃PDH EN CUATRO CUADRANTES DEL HIPOTÁLAMO DEL OVINO NO CASTRADO / REVERSE TRANSCRIPTION OF RNA CONDUCTED TO OBTAIN c-DNA



Se evaluaron tres temperaturas de hibridación: 55, 57 y 59°C en dos muestras (M1 y M2) de hipotálamos de ovinos. La evaluación de la tercera temperatura de hibridación, 59°C en la muestra 2 (M2), fue descargada en el canal 9 de la parte superior del gel. Se empleo 1,5 mM de CIMg₂ y 200 nM del oligonucleótidos iniciadores como concentraciones optimas para la reacción de RT-PCR. Control positivo (hipotálamo de rata), y Control negativo (músculo esquelético de ovino). El estándar del ADN posee bandas desde 10.000 hasta 100 pares de bases (pb).

FIGURA 3. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN RT-PCR CON EL PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES USADOS PARA REAMPLIFICAR EL ADN MOLDE PARA LA NMDAR-1 DEL HIPOTÁLAMO DEL OVINO NO CASTRADO / OPTIMIZATION OF RT-PCR REACTION WITH THE SET OF PRIMERS USED TO AMPLIFY THE TEMPLATE DNA OF THE NMDAR-1 IN THE HYPOTHALAMUS OF MALE SHEEP.

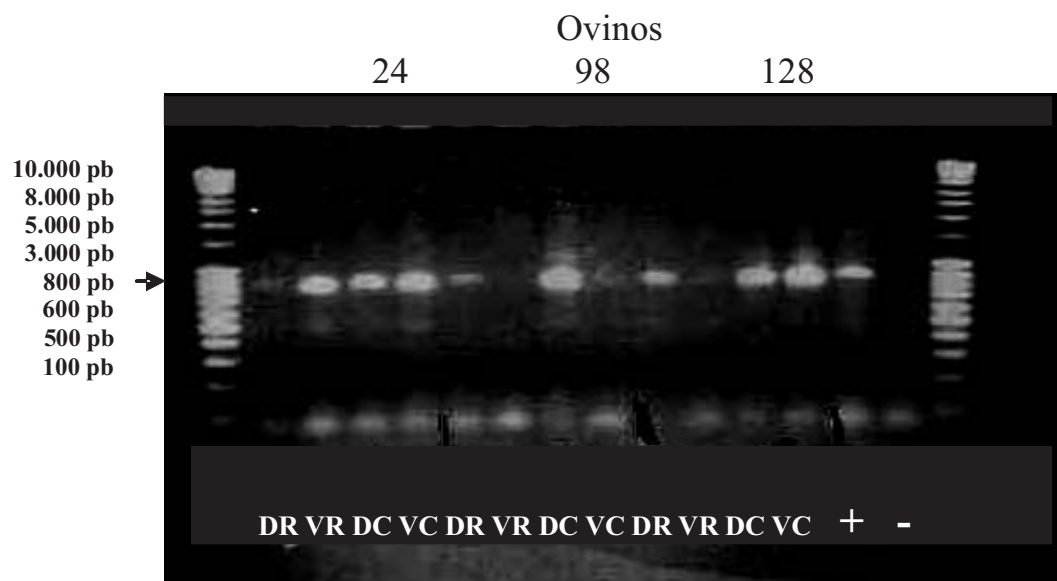
95°C durante 3 min seguido de 34 ciclos. Cada ciclo estuvo conformado por una fase de desnaturalización a 95°C por 30 seg, un proceso de Hibridación a 58°C por 1 min seguido por un período de extensión a 72°C por 1,5 min y un período final de extensión de 72°C por 10 min.

Las condiciones óptimas requeridas para la amplificación del ADN de la NMDAR-1 del hipotálamo del ovino mediante la reacción de RT-PCT, coinciden con las reportadas para este receptor para las ratas y ratones [13, 14]. Ishii y col. [13] encontraron que la mejor temperatura de hibridación en el termociclador fue de 55°C. En nuestros experimentos esta temperatura amplificó inespecíficamente algunos productos PCR, por lo que se seleccionó una temperatura de 59°C como la óptima para amplificar la NMDAR-1 del hipotálamo ovino.

Amplificación del ADN patrón para la NMDAR-1 del hipotálamo del ovino no castrado

En el experimento 1 se identificó la amplificación del ADN patrón de la NMDAR-1 en los cuatro cuadrantes del hipotálamo de ovejos no castrados. El tamaño de la banda de ADN de la NMDAR-1 fue de aproximadamente 800 pb (FIGS. 3 y 4.) al comparar con el marcador de peso molecular de ADN (MBI Fermentas, Enzymatic™, Hanover, MD, EUA). Este valor coincidió con el peso molecular reportado en el Banco de genes (NCBI), información usada en la elaboración de los oligonucleótidos iniciadores para la NMDAR-1, así como también coincide con el peso molecular del ADN de la NMDAR-1 de rata [21, 22, 28].

La expresión del ADN de la NMDAR-1 no fue afectada por la región o tipo de cuadrante hipotalámico evaluado en el ovejito no castrado (TABLA 1). Las porciones hipotalámicas cau-



DR=cuadrante dorsal rostral, VR= cuadrante ventral rostral, DC= cuadrante dorsal caudal y VC= cuadrante ventral caudal del hipotálamo de tres ovinos. Control positivo (hipotálamo de ratas), y Control negativo (tejido muscular esquelético de ovino). El estándar del ADN con bandas desde 10.000 hasta 100 pares de bases (pb).

FIGURA 4. TRANSCRIPCION REVERSA DEL ARN PARA PRODUCIR EL ADN MOLDE PARA LA NMDAR-1 EN CUATRO CUADRANTES DEL HIPOTÁLAMO DEL OVINO NO CASTRADO (EXP. 1) / REVERSE TRANSCRIPTION OF RNA WAS CONDUCTED TO OBTAIN TEMPLATE DNA FOR THE NMDAR-1 OF FOUR HYPOTHALAMIC QUADRANTS OF MALE SHEEP (EXP. 1).

TABLA 1
EXPRESIÓN DEL ADN MOLDE PARA LA SUBUNIDAD-1 DEL RECEPTOR NMDA DE CUATRO CUADRANTES DEL HIPOTÁLAMO DEL OVINO NO CASTRADO / EXPRESSION OF DNA TEMPLATE FOR NMDA RECEPTOR SUBUNIT-1 IN FOUR HYPOTHALAMIC QUADRANTS OF MALE SHEEP

Animales no castrados (n)	Cuadrante DR	Cuadrante VR	Cuadrante DC	Cuadrante VC
24	No	Sí	Sí	Sí
98	Sí	No	Sí	No
128	Sí	No	Sí	Sí
139	Sí	Sí	Sí	Sí
79	No	No	Sí	Sí
191	Sí	No	No	Sí

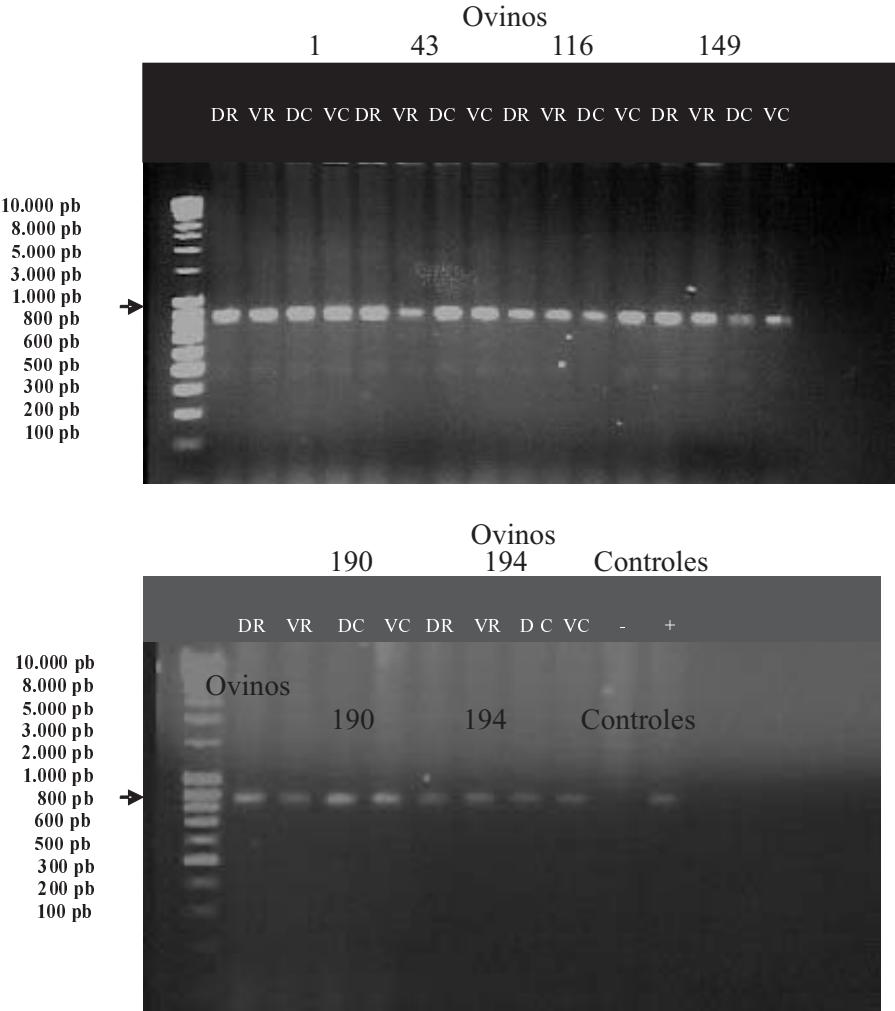
Sí = Presencia de la banda de 800 bp. No = Ausencia de la banda de 800 bp.

dales tanto dorsales como ventrales, expresaron con mayor frecuencia el ADN para este receptor, lo cual fue un resultado inesperado. Las razones por las cuales no se pudo detectar diferencia en la re-amplificación del ADN para la NMDAR-1 en las porciones hipotalámicas evaluadas pueden ser diversas. Para la localización y posterior extracción del hipotálamo, se contó con referencias anatómicas tales como el quiasma óptico y los cuerpos mamilares. Sin embargo, la falta de referencias anatómicas para la disección de los cuatro cuadrantes (DR, VR, DC y VC) o porciones del hipotalámico evaluadas, así como de un equipo de estéreo-taxis, dificultó la precisión de las disecciones a nivel del cerebro de estas especies. Se trató de incluir el 75% de la porción ventral en el cuadrante VR, lo que debería incluir el hipotálamo medio ventral y la eminencia media. Las variaciones entre animales pudieron afectar la localización de estas referencias. Las regiones de interés pudieron estar ubicadas en un cuadrante en un determinado animal pero en el

cuadrante adyacente en otro animal. Además, el número de animales usado pudo no haber sido suficiente para detectar una pequeña diferencia entre cuadrantes en la expresión del ADN para la NMDAR-1 en el hipotálamo del ovino. Finalmente, la NMDAR-1 se expresa en muchas células neuronales a lo largo del cerebro de los mamíferos 13, 22 por estar involucrado en diferentes procesos fisiológicos tales como transmisión nerviosa del sistema nervioso central, inducción de la potenciación del tipo de larga duración necesaria para el proceso de aprendizaje y la adquisición de la memoria así como también en procesos fisiopatológicos [13, 14, 22, 23, 26, 28].

Amplificación del ADN patrón para la NMDAR-1 del hipotálamo del ovino castrado y no castrado

En el experimento 2, se evaluó el efecto de las hormonas sexuales esteroideas sobre la expresión del ADN patrón de la NMDAR-1 en el hipotálamo del ovino macho (FIGS. 5a y 5b).



DR= cuadrante dorsal rostral, VR= cuadrante ventral rostral, DC= cuadrante dorsal caudal y VC= cuadrante ventral caudal del hipotálamo de seis ovinos. Control positivo (hipotálamo de ratas), y Control negativo (músculo esquelético de ovino). El estándar del ADN con bandas desde 10.000 hasta 100 pares de bases (pb).

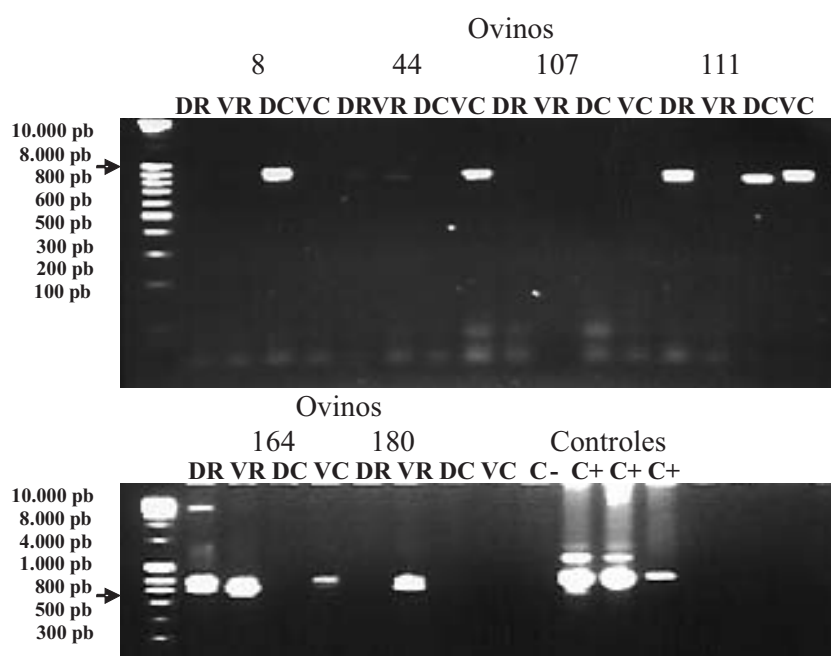
FIGURA 5A. TRANSCRIPCIÓN REVERSA DEL ARN PARA PRODUCIR EL ADN MOLDE PARA LA NMDAR-1 EN CUATRO CUADRANTES DEL HIPOTÁLAMO DEL OVINO NO CASTRADO (EXP. 1) / REVERSE TRANSCRIPTION OF RNA WAS CONDUCTED TO OBTAIN TEMPLATE DNA FOR THE NMDAR-1 OF FOUR HYPOTHALAMIC QUADRANTS OF MALE SHEEP (EXP. 1).

Nuevamente, no se evidenció efecto del tipo de cuadrante o la porción del hipotálamo sobre la expresión del ADN patrón para el receptor NMDA (TABLAS IIa y IIb). La castración disminuyó en forma significativa la expresión del ADN para este receptor, específicamente en los cuadrantes hipotalámicos DR, VR y DC ($P < 0,05$), comparado con la misma región de los animales no castrados. Estos resultados hacen suponer que el receptor NMDA se encuentra regulado por factores producidos por el testículo, uno de los cuales podría ser la hormona testosterona. Las hormonas testiculares esteroideas afectaron la expresión del receptor NMDA en ratas [8, 15, 31]. Kus y col. [18] encontraron expresión de la NMDAR-1 en los núcleos supra-óptico, supra-quiasmático, ventro-medial y núcleo arquea-

do del hipotálamo de la rata macho. En el ovino, el núcleo antero-ventral-peri-ventricular (AVPV) del APO del hipotálamo así como los núcleos arqueado y ventro-medial (NA-NVM), poseen un gran número de receptores estrogénicos y androgénicos [7, 19] lo cual podría explicar la participación de las hormonas sexuales esteroideas sobre la expresión del receptor NMDA en el hipotálamo del ovino.

CONCLUSIONES

El ADN del receptor NMDA se distribuye ampliamente en las diferentes porciones evaluadas del hipotálamo del ovino



DR= cuadrante dorsal rostral, VR= cuadrante ventral rostral, DC= cuadrante dorsal caudal y VC= cuadrante ventral caudal del hipotálamo de seis ovinos. Controles positivo (hipotálamo de ratas y ratón), y Control negativo (-) (músculo esquelético del ovino). El estándar del ADN con bandas desde 10.000 hasta 100 pares de bases (pb).

FIGURA 5B. TRANSCRIPCIÓN REVERSA DEL ARN PARA PRODUCIR EL ADN MOLDE PARA LA NMDAR-1 EN CUATRO CUADRANTES DEL HIPOTÁLAMO DEL OVINO CASTRADO (EXP. 1) / REVERSE TRANSCRIPTION OF RNA WAS CONDUCTED TO OBTAIN TEMPLATE DNA FOR THE NMDAR-1 OF FOUR HYPOTHALAMIC QUADRANTS OF CASTRATED MALE SHEEP (EXP. 2).

TABLA IIa
EXPRESIÓN DEL ADN MOLDE PARA LA SUBUNIDAD-1 DEL RECEPTOR NMDA DE CUATRO CUADRANTES DEL HIPOTÁLAMO DEL OVINO NO CASTRADO / EXPRESSION OF DNA TEMPLATE FOR NMDA RECEPTOR SUBUNIT-1 IN FOUR HYPOTHALAMIC QUADRANTS OF MALE SHEEP

Animales no castrados (N)	Cuadrante DR	Cuadrante VR	Cuadrante DC	Cuadrante VC
1	Sí	Sí	Sí	Sí
43	Sí	Sí	Sí	Sí
116	Sí	Sí	Sí	Sí
149	Sí	Sí	Sí	Sí
190	Sí	Sí	Sí	Sí
194	Sí	Sí	Sí	Sí

Sí = Presencia de la banda de 800 bp. No = Ausencia de la banda de 800 bp.

TABLA IIb
**EXPRESIÓN DEL ADN MOLDE PARA LA SUBUNIDAD-1 DEL RECEPTOR NMDA DE CUATRO CUADRANTES
DEL HIPOTÁLAMO DEL OVINO CASTRADO / EXPRESSION OF DNA TEMPLATE FOR NMDA RECEPTOR SUBUNIT-1 IN FOUR
HYPOTHALAMIC QUADRANTS OF CASTRATED MALE SHEEP**

Animales castrados	Cuadrante DR	Cuadrante VR	Cuadrante DC	Cuadrante VC
8	No	No	Sí	No
44	No	No	No	Sí
107	No	No	No	No
111	Sí	No	Sí	Sí
164	Sí	Sí	No	Sí
180	No	Sí	No	No

Sí = Presencia de la banda de 800 bp. No = Ausencia de la banda de 800 bp.

no castrado. La castración redujo drásticamente la expresión de la NMDAR-1 en el hipotálamo, sugiriendo la participación de las hormonas sexuales esteroideas en la regulación de la expresión del receptor NMDA en el hipotálamo del ovejero.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad de Nebraska-Lincoln, E.U.A por suministrar los recursos para realizar este trabajo de investigación. Especial agradecimiento al personal del laboratorio de Fisiología Animal del Departamento de Ciencias Animal. Igualmente, al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV por el financiamiento de estudios en el exterior; de utilidad para el trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRANN, D. W. Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. **Neuroendocrinol.** 61: 213-225. 1995.
- [2] BUCHOLTZ, D. C.; VIDWANS, N. M.; HERBOSA, C. G.; SCHILLO, K. K; FOSTER, D. L. Metabolic interfaces between growth and reproduction: pulsatile luteinizing secretion is dependent on glucose availability. **Endocrinol.** 137: 601-607. 1996.
- [3] CARBONE, S.; SZWARCFARB, B.; OTERO-LOSADA, M. E.; MOGUILVSKY, J. A. Effects of ovarian steroids on gonadotropin response to N-methyl-D-aspartate and on hypothalamic excitatory amino acid levels during sexual maturation in female rats. **Endocrinol.** 130: 365-1370. 1992.
- [4] CHOMEZYNSKI, P.; SACCHI, N. Molecular cloning. **Anal Biochem.** 162:156. 1987.
- [5] GAY, V; PLANT, T. M. N-methyl-D-aspartate elicits hypothalamic gonadotropin-releasing hormone released in prepubertal male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Endocrinol.** 120:2289-96. 1987.
- [6] GAZZALEY, A. H.; WEILAND, N. G.; MCEWEN, B. S.; MORRISON, J. H. Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. **J. Neurosci.** 16: 6830-6838. 1996.
- [7] GORE, A. C.; YEUNG, G.; MORRISON, J. H.; OUNG, T. Neuroendocrine aging in the female rat: The changing relationship of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons and N-methyl-D-aspartate receptors. **Endocrinol.** 141: 4757-4767. 2000.
- [8] GORE, A. C. Gonadotropin-releasing hormone neurons, NMDA receptor, and their regulation by steroid hormone across the reproductive life cycle. **Brain Res. Rev.** 37:235-248. 2001.
- [9] GU, G. B; SIMERLY, R. B. Projection of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. **J. Comp. Neurol.** 384:142-164. 1997.
- [10] GU, G. B.; VAROQUEAUX, F.; SIMERLY, R. B. Hormone regulation of glutamate receptor gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. **J. Neurosci.** 19:3213-3222. 1999.
- [11] HSU, C.; HSIEH, Y.; LUE, S.; HSU, H. Sex specific expression of N-methyl D-aspartate receptor (NMDAR) in the preoptic area of neonatal rats. **Neurosci. Letters.** 262: 85-88. 1999.
- [12] HSU, H.; YANG, R.; SHIH, H.; HSIEH, Y.; CHEN, U.; HSU, C. Prenatal exposure of testosterone prevents SDN-POA neurons of postnatal male rats from apoptosis through NMDA receptor. **J. Neurophysiol.** 86:2374-2380. 2001.
- [13] ISHII, T.; MORIYOSHI, K.; SUGIHARA, H.; SAKURADA, K.; KADOTANI, H.; YOKOI, M.; AKAZAWA, C.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N.; MASU, M.; NAKANISHI, S. Molecular characterization of the family of N-methyl-D-

- aspartate receptor subunits. **J. Bio. Chem.** 268: 2836-2843. 1993.
- [14] KARP, S.; MASU, M.; EKI, T.; OZAWA, K.; NAKANISHI, S. Molecular cloning and chromosomal localization of the key subunit of the human N-methyl-D-aspartate receptor. **Biol. Chem.** 268:3728-3733. 1993.
- [15] KIA, H. K.; YEN, G.; KREBS, C. J.; PFAFF, D. W. Colonization of estrogen receptor alpha receptor and NMDA-2D mRNAs in amygdaloid and hypothalamic nuclei of the mouse brain. **Brain Res. Mol. Brain Res.** 104:47-54. 2002.
- [16] KITTOCK, R. Effect of glucose availability on pulse luteinizing hormone released in ram before and after castration. **Anim. Reprod. Sci.** 55:35-45. 1999.
- [17] KUMAR, K. N.; JHONSON, P. J.; CHEN, X.; PAL, R.; AHMAD, M.; RAGLAND, T.; BIGGE, C.; MICHAELIS, E. K. Cloning of a brain N-methyl-D-aspartate and D,L-Biochem. **Biophys. Res. Comm.** 253:463-469. 1998.
- [18] KUS, L.; HANDA, R.; SANDERSON, J.; KERR, J.; BEITZ, A. Distribution of NMDAR-1 receptor subunit m-RNA and [1125] MK-801 in the hypothalamus of intact, castrated and castrated DHTP treated male rats. **Mol. Brain Res.** 28:55-60. 1995.
- [19] LEHMAN, M. N.; KARSCH, F. J. Do GnRH, tyrosine hydroxylase-, and **Endocrinol.** 133: 887-895. 1993.
- [20] LONG, F.; LIU, H.; HAHN, C.; SUMAZIN P.; ZHANG M. Q.; ZILBERSTEIN, A. Genome-wide prediction and analysis of function-specific transcription factor binding sites. **In Silico Biol.** 4: 0033. 2004.
- [21] MONYER, H.; SPRENGEL, R.; HERB, A.; HIGUCHI, M.; LOMELI, H.; BURNASHEV, N.; SAKMANN, B.; SEEBURG, P. H. Heteromeric NMDA receptor: Molecular and functional distinction of subtypes. **Sci.** 256:1217-1221. 1992.
- [22] MORIYOSHI, K.; MASU, M.; ISHII, T.; SHIGEMOTO, R. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. **Nature.** 354:31-37. 1991.
- [23] NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptor and implications for brain function. **Sci.** 258:597-603. 1992.
- [24] NAKANISHI, N.; AXEL, R.; SCHNEIDER, N. A. Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 89:8552-8556. 1992.
- [25] OTTEM, E.; GODWIN, J. G.; PETERSEN, S. L. Glutamatergic signaling through the N-methyl-D-aspartate receptor directly activates medial subpopulations of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons, but does not appear to mediate the effect of estradiol on LHRH gene expression. **Endocrinol.** 143:4837-4845. 2002.
- [26] PLANELLAS-CASES, R.; SUN, W.; FERRE-MONTIEL, A. V.; MONTAL, M. Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of an N-Methyl-D-aspartate receptor subunit from human brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90: 5057-5061. 1993
- [27] SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MARIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2thd ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 83-125 pp. 1989.
- [28] SUGIHARA, H.; MORIYOSHI, K.; ISHII, T.; MASU, M.; NAKANISHI, S. Structure and properties of seven isoforms of the NMDA receptors generated by alternative splicing. **Bioch. Biophys. Res. Comm.** 185:826-832. 1992.
- [29] RASOOL, N.B.; MONROE, S.S.; GLASS, R.I. Determination of a universal nucleic acid extraction procedure by PCR detection of gastroenteritis viruses in faecal specimens. **J. Virol. Meth.** 100:1-16.2002.
- [30] URBANSKI, H. F.; OJEDA, R. Activation of luteinizing hormone releasing hormone release advances the onset of female puberty. **Neuroendocrinol.** 46:273. 1987.
- [31] WATANABE, T.; SATOSHI, I.; HIROI, H.; ORIMO, A.; MURAMATSU, M. NMDA receptor type 2D gene as target for estrogen receptor in the brain. **Mol. Brain Res.** 63:375-379. 1999.