



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL
TRANSPORTADOR 3 DE AMINOÁCIDOS NEUTROS
DEPENDIENTE DE SODIO (SNAT3) EN CEREBELO DE POLLO
DURANTE LA ONTOGENIA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ANA IRIS FUENTES VELÁZQUEZ

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL
TRANSPORTADOR 3 DE AMINOÁCIDOS NEUTROS
DEPENDIENTE DE SODIO (SNAT3) EN CEREBELO DE POLLO
DURANTE LA ONTOGENIA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ANA IRIS FUENTES VELÁZQUEZ

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SINODALES

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES
DIRECTOR

Dra. LAURA C. BERUMEN SEGURA
SINODAL

Dr. ARTURO ORTEGA SOTO
SINODAL

Dra. ANAID ANTARAMIÁN SALAS
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Angelina Rodríguez Torres, por su paciencia y confianza. Por ser una de las mejores maestras que he tenido. Por enseñarme a tener más de un punto de vista, a pensar, y a creer en mí.

Al Dr. Arturo Ortega Soto del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN, por su apoyo, comprensión y amabilidad durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Anaid Antaramián Salas del Instituto de Neurobiología de la UNAM y a la Dra. Laura C. Berumen Segura de la Universidad Autónoma de Querétaro, por la apoyo y amabilidad.

Al Dr. José Carmen Gudiño Rosales del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Querétaro, por su cordial apoyo y gentileza.

Al M en C. José Angel Iván Romero Espinoza de la compañía ROCHE, por su gran amabilidad, apoyo y gentileza.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por la financiación de este trabajo a través del proyecto FOFI2012-FCQ2012016.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Desarrollo del sistema nervioso central del pollo	1
1.2 Generalidades del sistema nervioso	3
1.3 Sinápsis glutamatérgica	4
1.4 Ciclo glutamina-glutamato	7
1.5 Transportadores de solutos	9
1.5.1 La familia de los transportadores SLC38	10
1.5.1.1 Sistema A	12
1.5.1.2 Sistema N	13
1.5.1.3 SNAT3	14
1.6 PCR tiempo real	15
1.7 Electroforesis de proteína e inmunodetección en fase sólida	17
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVO	19
3.1 General	19
3.2 Específicos	19
4. METODOLOGÍA	20
4.1 Materiales	20
4.1.1 Materiales y equipo	20
4.1.2 Reactivos	20
4.1.3 Material biológico	21
4.2 Métodos	21
4.2.1 Extracción de ARN	21

4.2.2	Cuantificación de ARN	22
4.2.3	Tratamiento con ADNasa	22
4.2.4	Síntesis de AND complementario	23
4.2.5	Diseño de oligonucleótidos	23
4.2.6	PCR tiempo real	24
4.2.7	Curva estándar	24
4.2.8	Cuantificación absoluta	25
4.2.9	Cuantificación relativa	25
4.2.10	Extracción de proteína	25
4.2.11	Cuantificación de proteína	26
4.2.12	Electroforesis en gel de poliacrilamida	26
4.2.13	Inmunodetección en fase sólida	27
4.2.14	Revelado	28
4.2.15	Densitometría de banda	28
4.2.16	Análisis estadístico	29
4.3	Diseño experimental	29
5.	RESULTADOS	31
5.1	Resultados del análisis de la expresión de ARNm	31
5.1.1	Diseño y análisis de oligonucleótidos	31
5.1.2	Estandarización de condiciones de amplificación	32
5.1.3	Curva estándar	33
5.1.4	Cuantificación absoluta	35
5.1.5	Cuantificación relativa	38
5.2	Resultados del análisis de la expresión de proteína	39
5.2.1	Curva estándar	39
5.2.2	Cuantificación de proteína	39
5.2.3	Electroforesis y transferencia de proteínas	40
5.2.4	Inmunodetección en fase sólida	41
5.2.5	Densitometría de banda	42
6.	DISCUSIÓN	45
7.	CONCLUSIONES	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Preparación de curva estándar de proteína	26
2	Programa para PCR tiempo real	32
3	Concentración proteica de las muestras de cerebelo de pollo	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Organización celular del cerebelo	2
2	Sinapsis glutamatérgica entre neuronas y astrocitos	6
3	Ciclo glutamina-glutamato en el sistema nervioso	8
4	Esquema filogenético de los SNATs	11
5	Sistema de transporte N (SN) y A (SA)	12
6	Modelo topológico de SNAT3	14
7	Diseño experimental para la cuantificación de ARNm	30
8	Diseño experimental para la cuantificación de proteína	30
9	Imagen del amplicón resultado de la PCR <i>in silico</i>	31
10	Curvas de disociación de SNAT3 y actina	33
11	Curvas de amplificación de concentraciones estándar de SNAT3 y actina	34
12	Curva de amplificación de concentraciones estándar de SNAT3 y muestras problema	35
13	Curva de amplificación de concentraciones estándar de actina y muestras problema	36
14	Gráfica de la cuantificación absoluta de la expresión de SNAT3	37
15	Gráfica de la cuantificación absoluta de la expresión de actina	37
16	Gráfica de la cuantificación relativa de la expresión de SNAT3	38
17	Curva estándar de concentración de proteína BSA	39
18	Imagen representativa de una de las membranas teñidas con rojo Ponceau	41
19	Inmunodetección en fase sólida de SNAT3	41
20	Niveles de expresión proteica de SNAT3	42

21	Análisis densitométrico de una banda inespecífica de la tinción con rojo Ponceau	43
22	Gráfica de cuantificación relativa de la expresión proteica de SNAT3 / rojo Ponceau	43
23	Gráfica comparativa de la expresión de ARNm y proteína	44

RESUMEN

En la formación de un nuevo individuo, la organogénesis es un proceso crucial que abarca gran cantidad de etapas concluyendo en la formación de diversas estructuras de diferentes sistemas y aparatos, cada una con funciones específicas importantes. Uno de estos sistemas es el sistema nervioso central; dentro de éste, el cerebelo tiene una función importante como controlador de las funciones motoras, memoria y movimientos finos. Además, tiene una conformación celular diferenciada en capas, útil para el estudio del desarrollo y procesos neuroquímicos y funcionales. Dado que en aves el desarrollo de estos procesos es precoz respecto a mamíferos, el cerebelo de pollo es un modelo de estudio ideal para comprender estos mecanismos en los que están involucrados neurotransmisores que en su mayoría son aminoácidos. El transportador 3 de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNAT3 por sus siglas en inglés) está involucrado en la regulación del transporte de glutamina en el ciclo glutamato-glutamina durante la sinapsis. En el presente estudio se cuantificaron los niveles de expresión de SNAT3 para correlacionar su función en el sistema nervioso durante la ontogenia. Los resultados revelaron un aumento en la expresión del transportador conforme aumenta la edad, acentuando la importancia de este transportador en el desarrollo del cerebelo y particularmente durante la sinaptogénesis.

1. ANTECEDENTES

1.1 Desarrollo del sistema nervioso central del pollo

En general el proceso de desarrollo embrionario tiene etapas de acontecimientos específicos que persisten entre especies. En el pollo el cerebro comienza a diferenciarse en el segundo día de fecundación y su desarrollo continúa a lo largo del periodo de incubación en el que el tamaño incrementa dramáticamente.

Al comienzo del desarrollo de un nuevo individuo, las células del embrión están divididas en tres capas germinales primarias: ectodermo, endodermo y mesodermo, las cuales darán lugar a regiones específicas que forman los órganos. La formación del tubo ectodérmico, es decir el tubo neural, se lleva a cabo durante el proceso de neurulación (de “nervio” y “formación”). Uno de los tipos de neurulación es la neurulación primaria, en donde el tubo neural se forma cuando se pliega el ectodermo dorsal. La superficie ectodérmica aumenta su grosor y forma una banda de tejido que conforma la placa neural, a lo largo de lo que será el lado dorsal del embrión. Posterior a esto, los márgenes de la placa neural crecen hacia arriba formando dos crestas paralelas que son los pliegues neurales, éstos se fusionan para formar el tubo neural que está destinado a diferenciarse en el cerebro y la médula espinal, es decir, el sistema nervioso central (Kardong, 2007).

En cuanto el tubo neural se ha formado, el cerebro en desarrollo se expande a tres niveles para formar vesículas separadas una de otra mediante constricciones. Estas vesículas primarias, también llamadas regiones embrionarias son: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Cada una de ellas da origen a una región diferente en el encéfalo del adulto: cerebro anterior, cerebro medio y cerebro posterior respectivamente. La región que se desarrolla a partir del cerebro posterior es el cerebelo, el cual está relacionado con el oído y la línea lateral (Kardong, 2007; Hildebrand, 1982; Romer y Parsons, 1981).

El cerebelo es una prolongación del metencéfalo, una parte del cerebro posterior en forma de cúpula. Frecuentemente su superficie presenta circunvoluciones y

pliegues. Puede dividirse en corpus y un par de aurículas laterales. En aves y mamíferos las zonas cerebelares del corpus se expanden para crear los hemisferios cerebelares (Kardong, 2007).

El cerebelo está situado por encima del tallo cerebral, en el extremo anterior del bulbo. Es un centro cerebral a menudo muy grande y de enorme importancia para la coordinación y regulación de las actividades motoras. Su tamaño varía entre especies, y suele tener una relación con la agilidad motora del animal, en aves y mamíferos es en donde se encuentra su desarrollo máximo (Romer y Parsons, 1981).

En este órgano pueden distinguirse dos regiones importantes, la corteza cerebelar y el núcleo cerebelar central. La corteza cerebelar está compuesta por tres capas estructurales con una capa molecular externa, una mono capa de células de Purkinje y una capa granular interna (Figura 1). El arreglo celular que tiene este órgano es necesario para que los impulsos nerviosos que recibe se esparzan ampliamente y pueda realizar su adecuada función motora en el organismo (Whittow, 2000; Hildebrand, 1982).

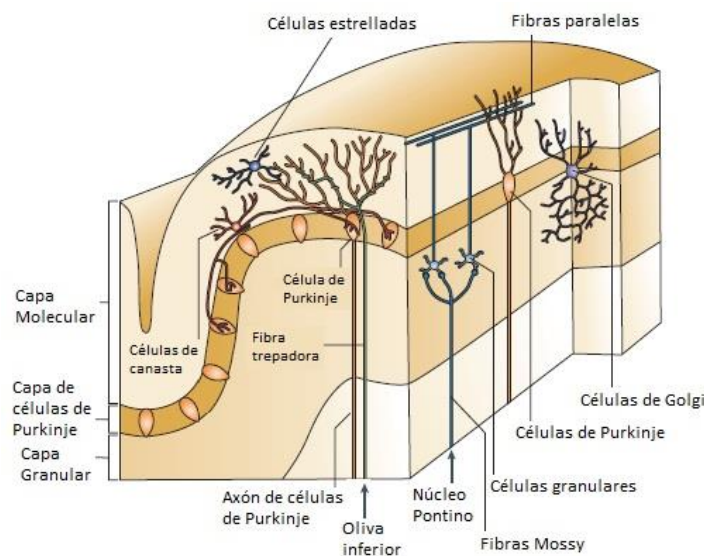


Figura 1. Organización celular del cerebelo. Figura modificada de Ramnani, 2006.

Es a través de una buena comunicación neuronal, es decir, conexiones sinápticas estables entre neuronas que la información puede ser procesada de manera adecuada en el cerebro. En el pollo la formación de las conexiones sinápticas se produce a partir del estadio embrionario de 15 días (E15) de incubación y muchas de estas conexiones empiezan a madurar inmediatamente, lo que significa que adquieren funciones y características de sinapsis del cerebro adulto; en comparación con otros modelos de estudio como rata, el desarrollo de proliferación y maduración sináptica tiene periodos de maduración en etapas adultas, alrededor del día postnatal 25 y 30 (P25 y P30) respectivamente.

Comparado con el desarrollo lento que presentan otras especies de estudio como rata o ratón, algunos desarrollos neuroquímicos y estructurales ocurren de manera similar en el pollo, lo que lo hace ser un buen modelo de estudio y por lo que es usado frecuentemente en estudios sobre crecimiento cerebral, maduración y para investigar el efecto de neurotoxinas y función de distintos neurotransmisores en el desarrollo (Rogers L, 1995).

1.2 Generalidades del Sistema Nervioso

El sistema nervioso está formado por el encéfalo, nervios craneales, médula espinal, nervios raquídeos o espinales, ganglios, plexos entéricos y receptores sensoriales. Se le puede dividir en dos subsistemas principales: El Sistema Nervioso Periférico (SNP) y el Sistema Nervioso Central (SNC). El SNP comprende las estructuras que no se encuentran protegidas por la barrera hematoencefálica y huesos. El SNC está conformado por el encéfalo y la médula espinal, los cuales integran y correlacionan diferentes tipos de información sensorial que llega hasta ellos a través de receptores sensitivos ya sean de tipo visuales, táctiles, etc. Al mismo tiempo el sistema nervioso se encuentra constituido por una red compleja y muy organizada de miles de millones de células llamadas neuronas, así como un número incluso mayor de células gliales (Tortora y Reynolds, 2006; Guyton y Hall, 2006).

Las neuronas son células que se encuentran altamente especializadas y pueden ser divididas morfológicamente en cuatro regiones: el soma o cuerpo celular donde se encuentra el centro metabólico de la célula; las dendritas, estructuras encargadas de recibir señales de otras células; el axón, una estructura que empieza a partir del soma y que conduce señales a lo largo de la célula; y por último las terminales presinápticas, que permiten la comunicación con otras células a través de conexiones llamadas sinapsis. El otro tipo celular en el SNC son las células gliales. En el SNC, las células gliales comprenden gran cantidad del volumen que éste ocupa. Su nombre se deriva del concepto que tuvieron los primeros microscopistas de que era el “cemento” que mantenía unido al sistema nervioso. Ahora se sabe que las células gliales no son simples “testigos pasivos” y que participan activamente en el funcionamiento de dicho tejido, manteniendo una estrecha relación con las neuronas en sistemas llamados neurogliales encargados de mantener la homeostasis del cerebro (Tortora y Reynolds, 2006; García y Massieu, 2004).

Las células gliales comprenden a la población celular más abundante en el sistema nervioso central. Tienen participación en el transporte de neurotransmisores y en la expresión de receptores, lo cual ha llevado a postular su participación en la función sináptica; además, participan en la diferenciación y crecimiento neuronal. Existen dos tipos de células gliales: La macroglía y la microglía. El primer tipo comprende a los oligodendrocitos, células especializadas en la formación de la mielina que rodea algunas neuronas; y a los astrocitos, los cuales participan en la formación de la barrera hematoencefálica, la regulación de iones, volumen extracelular, etc (López-Bayghen y Ortega, 2010).

1.3 Sinapsis glutamatérgica

La sinapsis es la zona de contacto entre células nerviosas donde se transmiten señales a través de las distintas estructuras celulares nerviosas. Comprende tres elementos principales: el presináptico, el postsináptico y el espacio entre ellos, llamado también hiato sináptico; el elemento presináptico es un ensanchamiento

con forma de botón en las terminales del axón, el postsináptico puede ser el soma de la neurona, dendritas o axón de éstas. En relación al tipo de señal, la sinapsis se puede clasificar como sinapsis química o sinapsis eléctrica (Muñoz y García, 1998). En la sinapsis eléctrica se transmiten impulsos eléctricos de una célula a otra a través de canales directos. En estas sinapsis la transmisión de las señales se da en cualquier dirección, a diferencia de la sinapsis química en donde siempre ocurre en un sentido: la neurona presináptica secreta la sustancia transmisora la cual es captada por la neurona postsináptica a través de proteínas receptoras de membrana, en donde el transmisor actúa, inhibiéndola, excitándola o modificando su sensibilidad (Guyton y Hall, 2006).

Existen alrededor de 40 sustancias transmisoras conocidas (Guyton y Hall, 2006), son llamadas neurotransmisores y son reguladores de la migración neuronal, neurogénesis y sinaptogénesis. Los neurotransmisores deben ser altamente regulados ya que su falta de activación o su inhibición puede conducir a patologías en el desarrollo o la muerte celular (Boulland y col., 2003). Algunos de los neurotransmisores más estudiados son: adrenalina, acetilcolina, histamina, glicina, serotonina, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y glutamato (Guyton y Hall, 2006). La excitabilidad en las células nerviosas está conferida en su mayoría a la actividad del neurotransmisor glutamato. El mecanismo por el que actúa involucra una comunicación entre células gliales y neuronas en un proceso conocido como sinapsis glutamatérgica tripartita. La estimulación de las neuronas mediante la sinapsis glutamatérgica tripartita está dada básicamente por una despolarización de las terminales sinápticas de las neuronas y la liberación de glutamato hacia el espacio sináptico mediante vesículas (Figura 2) (García y Massieu, 2004).

El neurotransmisor liberado debe ser captado por receptores de glutamato los cuales pueden ser de tipo ionotrópico o metabotrópico. Estos receptores son activados por sus distintos análogos: Los receptores ionotrópicos tienen un canal iónico específico a cationes y son clasificados así por su análogo NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropionato) y kainato (KA) La activación de estos receptores produce un cambio en la permeabilidad iónica de

la membrana, lo que produce que la neurona se excite. Por otro lado los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G, regulan la producción de mensajeros intracelulares y han sido clasificados por su secuencia, mecanismo de transducción y farmacología. Después de que el glutamato actúa sobre sus receptores, es eliminado rápidamente del espacio sináptico con lo que se finaliza la sinapsis excitadora (García y Massieu, 2004; López-Bayghen y Ortega, 2011).

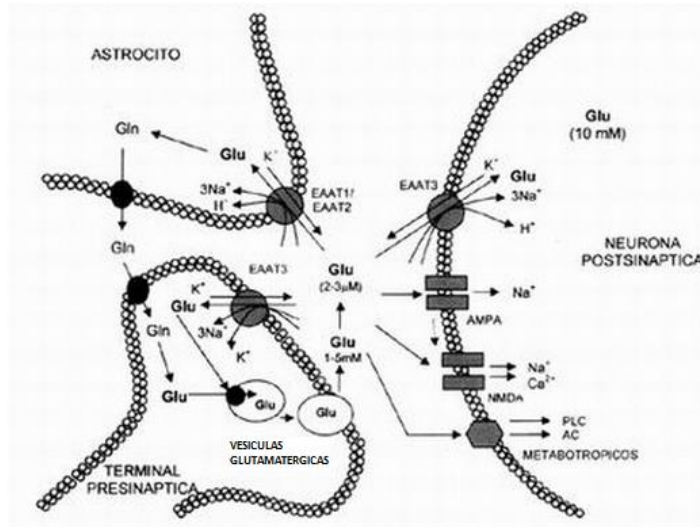


Figura 2. Sinapsis glutamatergica entre neuronas y astrocitos. Figura modificada de García y Massieu, 2004.

La regulación de la remoción del glutamato extracelular es realizada por proteínas integrales en la membrana llamadas transportadores de glutamato, las cuales utilizan un gradiente electroquímico para introducir el glutamato al interior de la célula (López-Bayghen y Ortega, 2010). La importancia de la alta regulación de la concentración de glutamato es debido a la excitotoxicidad que éste presenta; su concentración en el espacio extracelular debe mantenerse en rangos de concentraciones micro molares (Gras y col., 2012). Sin embargo, la concentración de glutamato puede alcanzar un rango de 60 a 210 mM en el momento de la

sinapsis, teniendo libres cerca de 2000 a 5000 moléculas de este neurotransmisor cuando esta ocurre (García y Massieu, 2004).

Una familia de proteínas transportadoras encargadas del flujo de glutamato en el espacio extracelular son los llamados transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT); de éstos, el transportador EAAT3 se encuentra en neuronas y los transportadores EAAT1 y EAAT2 en astrocitos. La presencia de estos transportadores y de glutamina sintetasa en astrocitos permite que exista una conversión inmediata del glutamato transportado a glutamina, para que ésta después sea proveída a neuronas permitiendo así un control en su concentración y suministro del precursor glutamato en forma no tóxica (Gras y col., 2012).

1.4 Ciclo glutamato-glutamina

Un aminoácido muy ligado al estudio del funcionamiento del glutamato es la glutamina. La glutamina es un aminoácido esencial para el metabolismo celular, es el aminoácido con más alta concentración en espacio extracelular y sangre, lo que refleja una importancia marcada en distintos tejidos (Chaudhry y col., 2002; Bröer y col., 2001). En líquido cerebrospinal la concentración de glutamina es de aproximadamente de 0.5 mM, una cantidad importante tomando en cuenta que en este fluido ningún otro aminoácido excede los 0.05 mM de concentración (Chaudhry y col., 2002).

También es conocida por compartir múltiples vías de transporte con muchos otros aminoácidos, y contribuir en la señalización y en el metabolismo en diferentes órganos como riñón e hígado (Chaudhry y col., 2002). La glutamina también juega un papel importante en músculo esquelético, siendo un sustrato utilizado para la síntesis de proteína (Nakanishi y col., 2001). La glutamina participa en la biosíntesis de otros aminoácidos, proteínas y nucleótidos y tiene un papel importante en el reciclaje de sustancias como el glutamato y el ácido γ -aminobutírico (GABA), que son los principales neurotransmisores excitatorios e inhibitorios, respectivamente (Conti y Melone, 2006). El glutamato es un aminoácido no esencial con importantes funciones dentro del SNC en donde llega a ser tóxico en cantidades abundantes

por lo que tiene una fina regulación. Además participa con un metabolismo estrechamente ligado al ciclo de Krebs, en donde funciona como un combustible de reserva para la célula cuando es oxidado a alfa-cetoglutarato, el cual entra en este ciclo (Hawkins, 2009; Mackenzie y col., 2003). La importancia de la relación entre el glutamato y la glutamina se ve reflejada en el ciclo glutamato-glutamina.

El ciclo glutamato-glutamina es considerado como la mayor vía de reciclaje de glutamato. En este ciclo, el glutamato liberado por los axones terminales de las neuronas es tomado por astrocitos que se encuentran rodeando las terminales nerviosas, mediante la acción de transportadores de glutamato. Una vez dentro de los astrocitos la enzima glutamina sintetasa convierte el glutamato en glutamina; esta glutamina es liberada al líquido extracelular y tomada por las terminales nerviosas donde es reconvertida a glutamato por acción de la enzima glutaminasa, para después ser empaquetada y excretada en vesículas (Figura 3).

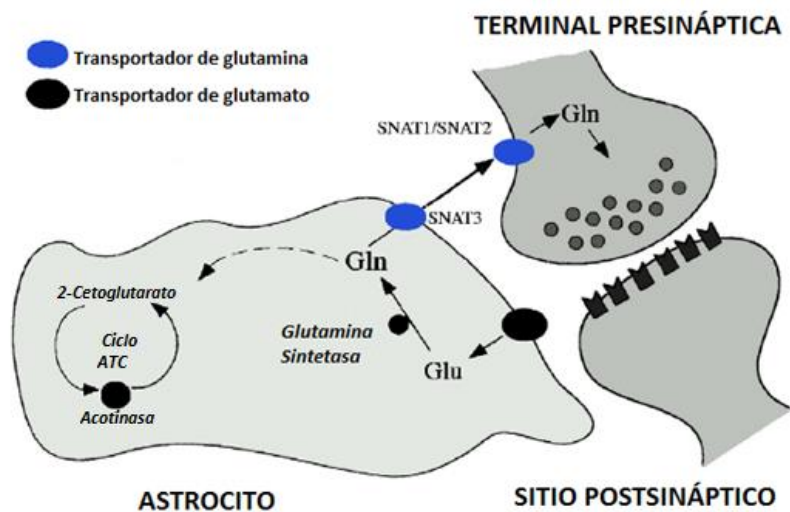


Figura 3. Ciclo glutamina-glutamato en el sistema nervioso. Modificado de Conti y Melone, 2006. (Conti y Melone, 2006).

En este proceso de reciclaje de glutamato, la transformación en glutamina es mediada por mecanismos complejos con un estrecho control de concentración de aminoácidos, iones libres y por el funcionamiento de transportadores involucrados en este reciclaje. La salida de glutamina desde astrocitos y su consumo por neuronas hace del mecanismo el más importante para la reposición del glutamato neuronal (Broër y Brookes, 2001; Conti y Melone., 2006).

Además, este ciclo tiene importante función en otros órganos, por ejemplo en hígado en donde las células periportales transforman la glutamina en glutamato y amonio, este último, junto con el amonio recogido por la circulación sanguínea, es llevado al ciclo de la urea para después ser transformado en glutamina en las células perivenosas (Chaudhry y col., 2002), este flujo de glutamina y glutamato es de suma importancia en la detoxificación de amonio en hígado (Mackenzie y Erickson, 2004).

Durante años se han estudiado los transportadores encargados de la distribución de glutamato y glutamina, sin embargo aún se mantienen importantes incógnitas sobre su función, distribución y correlación con otros transportadores dado que en algunos tipos celulares la co-expresión de algunos transportadores parece ser similar. Sin embargo, datos recientes han descrito que la bioquímica de estos transportadores varía en condiciones ambientales puntuales, lo que ha reducido la lista de los transportadores encargados de este sistema, ayudando a su posible aislamiento, para su mejor entendimiento (Bröer y col., 2001).

1.5 Transportadores de solutos

Los transportadores son proteínas integrales de membrana que tienen como función primaria facilitar el intercambio de moléculas pequeñas a través de las membranas celulares. Su función en la neurotransmisión y su alta demanda de energía dan como resultado que el cerebro use gran cantidad de proteínas transportadoras para suplir los nutrientes y facilitar la producción de energía, controlar el balance iónico y de pH, regular el balance, los niveles y la actividad de neurotransmisores y remover subproductos metabólicos. Muchos de estos

transportadores encontrados han sido caracterizados por completo en el SNC (Dahlin y col., 2009).

La clasificación de los distintos sistemas de transporte de aminoácidos se realiza con base en el reconocimiento de sus especificidades de sustrato, secuencia y distribución celular (Bröer y col., 2001). Muchos transportadores como los que se encuentran dentro de la familia de transportadores acarreadores de solutos (SLC), están involucrados en la génesis y desarrollo de desórdenes funcionales del cerebro. La superfamilia de transportadores SLC es la segunda familia más grande clasificada. Fue nombrada con base a su función de transporte (He y col., 2009) y es uno de los grupos de proteínas transportadoras de membrana que controla la toma y flujo de nutrientes, neurotransmisores, metabolitos, drogas y toxinas, sin embargo los sustratos fisiológicos de muchos de los transportadores de la familia SLC en el cerebro permanecen desconocidos. A partir de humano y roedor se han identificado aproximadamente 360 genes que codifican para proteínas de transporte pertenecientes a la familia SLC y en humano se han encontrado presentes 46 de estas familias (Dahlin y col., 2009; Höuglund y col., 2011). Los miembros pueden ser de distintos tipos según su sistema de transporte; algunos son intercambiadores, transportadores pasivos, o transportadores acoplados (Fredriksson y col., 2008).

Las familias de transportadores que son parte de los SLC están agrupadas filogenéticamente. Uno de estos grupos es la familia β y está conformada a su vez por tres familias de transportadores: SLC32, SLC36 y SLC38 (Höuglund y col., 2011). Estas tres familias también están relacionadas entre sí por su habilidad de transportar aminoácidos (He y col., 2009).

1.5.1 La familia de transportadores SLC38

Un subtipo de transportadores perteneciente a la superfamilia SLC es la familia de transportadores SLC38. Los transportadores que integran esta familia son los cotransportadores de aminoácidos neutros dependientes de Na^+ (SNAT) y hay 11

SNATs clasificados como parte de la familia SLC38, pero sólo 5 de estos miembros han sido caracterizados a detalle.

Esta familia de transportadores se subdivide funcionalmente en dos tipos de sistemas, el sistema A y el sistema N. La clasificación entre los dos sistemas tiene que ver con diferencias en su mecanismo funcional y con patrones de identidad de secuencia que se han encontrado entre los miembros de esta familia; estos patrones fueron identificados gracias a su clonación, la cual fue posible ya que la secuencia de los transportadores miembros de los SLC38 es comparable con la del transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIAAT por sus siglas en inglés, también conocido como transportador vesicular GABA), el cual ya había sido previamente identificado y clonado (Figura 4).

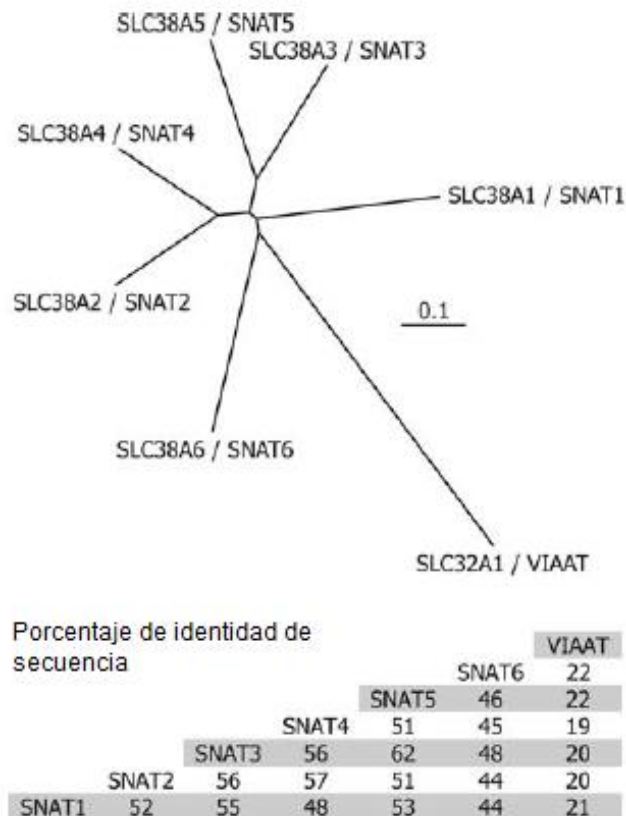


Figura 4. Esquema filogenético de los SNATs. Diagrama del resultado de la comparación de secuencias entre los SNATs y el sistema VIAAT, de acuerdo con su porcentaje de similitud. Imagen modificada de Mackenzie y Erickson, 2004.

El sistema A fue nombrado así por su afinidad al transporte de alanina, mientras que el sistema N, se nombró así por su afinidad de transporte de aminoácidos que contienen nitrógeno en su cadena lateral. Los sistemas de transportadores A y N, presentan características similares, como el transporte de aminoácidos netamente neutros, dependencia a Na^+ y su inhibición a bajo pH extracelular (Mackenzie y Erickson, 2004). Sin embargo, también presentan características propias y distintivas, lo que genera su división.

Los integrantes del sistema A son: SNAT1, SNAT2 y SNAT4. Los transportadores que integran el sistema N son SNAT3 y SNAT5, estos últimos son intercambiadores de H^+ , lo que los caracteriza y diferencia funcionalmente del sistema A (Figura 5) (Bröer y col., 2001; Bröer y col., 2009).

Los 6 transportadores restantes han sido bien caracterizados aunque se tiene poca información acerca de ellos; el más conocido es el SNAT6; la expresión de su ARNm ha sido detectada en placenta, vaso, músculo, cerebro y pulmón, pero es llamado “miembro huérfano” ya que junto con los otros cinco SNATs restantes de ésta familia, no ha sido clasificado funcionalmente (Sundberg y col., 2008).

1.5.1.1 Sistema A

El sistema A es un sistema dependiente de Na^+ , reconoce aminoácidos neutros con cadenas polares cortas o lineales incluyendo glutamina y muestra una particular sensibilidad a inhibición a bajo pH. Además, funciona de manera unidireccional y

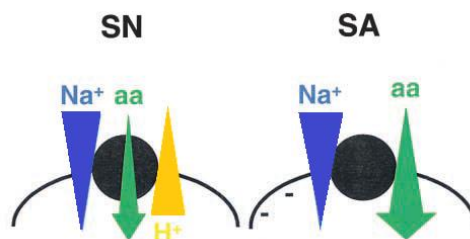


Figura 5. Sistemas de transporte N (SN) y A (SA). Características del transporte y acoplamiento de aminoácido. Modificado de Chaudhry y colaboradores, 2002. (Chaudhry y col., 2002)

puede transportar aminoácidos de manera activa en contra del gradiente de concentración (Armano y col., 2002; Chaudhry y col., 2002).

El sistema A cuenta con características distintivas: tiene la propiedad de ser regulado por una variedad de condiciones ambientales como cambios hormonales y restricción de aminoácidos, además de poder transportar sustratos N-metilados, como el aminoácido análogo no metabolizable ácido alfa-metilamino-isobutirico (MeIAB), el cual es un inhibidor competitivo del sistema y no es reconocido por ninguna otra familia de transportadores (Bröer y Brookest, 2001; Armano y col., 2002).

Los transportadores SNAT1 y SNAT2 son los transportadores más estudiados en el sistema A; están presentes en neuronas y ausentes en astrocitos. Están encargados del transporte de glutamina al interior de la célula y se ha demostrado que ambos son expresados en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata durante estadios del desarrollo estando distribuidos homogéneamente a lo largo del desarrollo neuronal (Armano y col., 2002).

1.5.1.2 Sistema N

El sistema N tiene una especificidad por sustratos confinada a asparagina, glutamina e histidina, los cuales contienen nitrógeno en su cadena lateral. Presenta sensibilidad a pH y tolerancia funcional a sustituir el Na^+ por Li^+ . Fue identificado por primera vez en hepatocitos como un transportador dependiente de Na^+ , sin embargo su función también ha sido descrita en otros sistemas como cerebro, páncreas, riñón y músculo.

El sistema N es integrado por el SNAT3 y el SNAT5, en cerebro estos transportadores son importantes en el ciclo glutamina-glutamato transportando glutamina fuera de los astrocitos. La dirección del flujo de glutamina de estos transportadores puede ser alterada incluso en condiciones fisiológicas normales, lo que permite tanto la entrada como salida de glutamina en las células (Mackenzie y Erickson, 2004; Umapathy y col., 2008).

1.5.1.3 SNAT3

El transportador 3 de aminoácidos neutros (SNAT3) se expresa en cerebro confinando su localización exclusivamente en astrocitos. Sin embargo el ARNm del SNAT3 también es abundante en hígado, riñón, corazón, tejido adiposo y músculo esquelético.

El ADNc expresado por el SNAT3 en humano, codifica para una proteína con un peso molecular de 56kD y 504 aminoácidos (Figura 6). Su estructura tiene una identidad de 90% una similitud de 91% con la proteína SNAT3 de rata. También muestra una homología significativa del 55 y 56% de identidad de secuencia con los transportadores SNAT1 y SNAT2 respectivamente así como del 20% con el transportador vesicular GABA (Fei y col., 2000; Chaudhry y col., 2002).

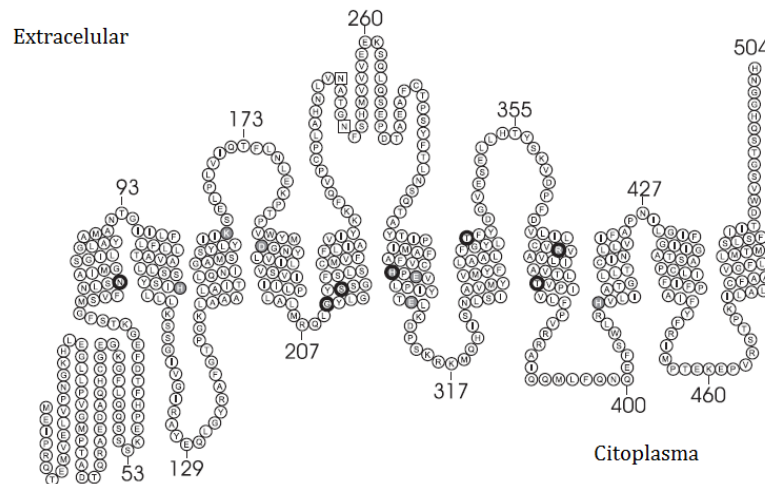


Figura 6. Modelo topológico de SNAT3. Imagen modificada de Schnelder y col., 2007.

La fuerza de transporte que el SNAT3 realiza no se ve contribuido por el potencial de membrana, produciendo un gradiente de concentración de glutamina mucho más bajo y un flujo reverso bajo condiciones fisiológicas (Chaudhry y col., 2002; Boulland y col., 2003).

La actividad electroquímica del SNAT3 en la toma de aminoácidos está asociada con la toma neta de 1 Na⁺ : 1 aminoácido en intercambio con 1 H⁺ lo que sugeriría su actividad electroquímica como neutra, sin embargo se ha demostrado en su expresión en ovocitos se presenta una conductancia iónica desacoplada, además hay evidencia de que el SNAT3 puede mediar el flujo de glutamina cuando el gradiente de H⁺ es invertido (Mackenzie y Erickson, 2004).

Como ya se ha mencionado la expresión de estos transportadores puede ser regulada por multitud de factores, es por ello que la determinación de la expresión del transportador SNAT3 durante la ontogenia nos puede ayudar a definir su función, y para ello es importante cuantificar los niveles de expresión de ARNm como la síntesis de proteína. Una de las técnicas más sensibles para dichas cuantificaciones son PCR y la inmunodetección en fase sólida.

1.6 PCR tiempo real

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que se utiliza para la amplificación exponencial de una secuencia de ADN específica. En general la técnica tiene como fundamento la función natural de la enzima ADN polimerasa que a través de oligonucleótidos que sirven como punto de partida sintetiza una nueva cadena de ADN que proviene de la cadena molde existente.

La combinación de la reacción de PCR con técnicas de fluorescencia ha permitido la introducción de la PCR tiempo real, la cual permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y fiabilidad, para ello se emplean técnicas basadas en la utilización de agentes intercalantes o sondas específicas marcadas con fluorocromos. Uno de estos fluorocromos es SYBR Green I, un agente intercalante inespecífico de secuencia que en solución no emite fluorescencia, únicamente al unirse a una doble cadena de ADN. Esta técnica está dada por la amplificación exponencial de secuencias de ADNc generando copias que vuelven a ser usadas como molde y empleando oligonucleótidos específicos. Para ello utiliza el fundamento de la PCR punto final, haciendo ciclos repetitivos de tres fases a diferentes temperaturas: la fase de desnaturalización a 95°C en donde el ADN se

desnaturaliza, la fase de alineamiento en donde la temperatura baja hasta alcanzar la óptima adecuada en donde los oligonucleótidos se unen y la fase de elongación, en donde la temperatura se modifica dependiendo de la polimerasa usada dado que cada una requiere una temperatura específica óptima para su adecuado funcionamiento en la replicación del gen. En cada ciclo de elongación el gen que se amplifica produce la emisión de una fluorescencia por el fluorocromo que se une al nuevo amplicón de doble cadena producido, esta fluorescencia se representa en una gráfica frente al número de ciclos para obtener una curva que muestre la cinética de la reacción. Debido que la fluorescencia se mide durante el momento en que hay ADN de doble cadena es posible describir la cinética de la reacción. (Gibbs, 1990; Wong y Medrano 2005).

La cinética de reacción está conformada por tres fases: una fase lineal, una exponencial (que es en donde se tiene el periodo de amplificación) y una de meseta. Al obtener la cinética de reacción de concentraciones conocidas se puede obtener la ecuación de una recta, graficando el logaritmo de la concentración conocida frente al valor del punto de cruce (CP) obtenido, es decir el punto donde inicia la fase exponencial, y así conocer la concentración del gen que se está amplificando (Wong y Medrano 2005).

Al mismo tiempo, la amplificación de un solo producto es interpretada como una curva de disociación única la cual se obtiene al aumentar la temperatura y captar la fluorescencia continuamente. Debido a que el SYBR Green solo emite fluorescencia al estar intercalado en una doble cadena de ADN, la pérdida total de fluorescencia a una temperatura específica se interpreta como el producto de reacción. Al graficar la derivada de la fluorescencia emitida respecto al tiempo, obtenemos un área bajo la curva, que será el reflejo del amplicón generado en la reacción.

1.7 Electroforesis de proteína e inmunodetección en fase sólida

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas presentes en una mezcla. Mediante la aplicación de un campo eléctrico éstas moléculas son conducidas hacia el electrodo con carga opuesta, la velocidad de su movimiento está influenciada por carga, tamaño de la molécula y tamaño del poro de la matriz de separación. El soporte más común utilizado para esta separación es una solución de acrilamida que polimeriza en cadenas de poliacrilamida creando cadenas cruzadas en una matriz semisólida. Una de las variantes más utilizadas es que a esta matriz se le añade duodecil sulfato de sodio (SDS) el cual desnaturaliza la estructura de las proteínas de la mezcla rompiendo las interacciones no covalentes, desarmando la estructura terciaria y cuaternaria de las mismas y aportándoles una carga negativa separando la mezcla compleja de proteínas únicamente por peso molecular (Lodish y col. 2000; Campbell y Farrell, 2003).

La detección de una proteína en particular combina la electroforesis con el uso de anticuerpos y la sensibilidad de ensayos enzimáticos, esta técnica es llamada inmunodetección en fase sólida. Posterior a la separación de proteínas, éstas son transferidas a una membrana mediante una electrotransferencia en la cual las proteínas quedan atrapadas en los poros de la membrana. La membrana es incubada con una solución de anticuerpo específico a la proteína que se desea encontrar, así sólo la banda que contiene la proteína de interés se une al anticuerpo formando una capa de anticuerpos unidos a la proteína, posteriormente se incuba con un segundo anticuerpo específico del primero. Este anticuerpo secundario debe estar unido a una enzima que funciona como catalizador, para que la detección de éste emita una fluorescencia o quimioluminiscencia. Así la sola la banda que contiene la proteína de interés es detectable (Lodish y col. 2000).

2. HIPÓTESIS

Los niveles de expresión del transportador de aminoácidos neutros SNAT3 se ven modificados en el cerebelo de pollo durante la ontogenia.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Determinar los niveles de expresión del transportador SNAT3 en cerebelo de pollo durante la ontogenia.

3.2 Específicos

- Extraer el ARN total de cerebelo de pollo.
- Establecer las condiciones de amplificación para amplificar el transportador SNAT3 y el gen de referencia actina por PCR tiempo real.
- Realizar la cuantificación absoluta del transportador SNAT3 y actina.
- Efectuar la cuantificación relativa del transportador SNAT3 normalizado al gen de referencia.
- Obtener extractos proteicos membranales enriquecidos de cerebelo de pollo.
- Cuantificar los extractos proteicos.
- Realizar un ensayo de inmunodetección en fase sólida.
- Evaluar mediante un análisis densitométrico la intensidad de las bandas obtenidas por inmunodetección.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Material y equipo

- Micropipetas de volúmenes: 2 μ L, 10 μ L, 200 μ L y 1000 μ L
- Puntas para micropipetas con filtro
- Tubos Eppendorf de volúmenes: 1.5 y 2.0 mL libres de nucleasas
- Mortero de porcelana con pistilo
- Recipiente para nitrógeno líquido
- Centrífuga
- Equipo de disección
- Refrigerador 4°C
- Congelador -20°C
- Espectofotómetro
- Incubadora
- Microcentrífuga
- Termociclador Light Cycler 1.5
- Capilares
- Agitador Vortex
- Fuente de poder
- Cámara de transferencia
- Membranas de nitrocelulosa
- Placas radiográficas
- Hypercassette

4.1.2 Reactivos

- Trizol (Invitrogen)
- Nitrógeno líquido (INFRA)
- Etanol absoluto grado biología molecular (Sigma)
- Agua inyectable (Pisa)
- Enzima transcriptasa reversa Superscript III (Life Technologies)
- Oligonucleótidos dT (Invitrogen)
- Oligonucleótidos degenerados (Invitrogen)
- Mezcla maestra para amplificación con SYBR Green I (Roche)

- Kit para purificación de producto de PCR (Qiagen)
- Kit de quimioluminiscencia ECL (Promega)
- Anticuerpo goat anti-cobayo IgG-HRP: sc-2438 (Santa Cruz)
- Suero anti-SNAT3 (Dr. Francisco Zafra, CBM-SO, España)
- Reactivo de Bradford (Sigma)
- Mix de acrilamida-bisacrilamida 30% (Bio-Rad)
- Marcador de peso molecular Protein Ladder #SM0661 (Fermentas)
- Rojo de Ponceau (Bio-Rad)
- Leche descremada (Svelty)
- Tween 20 (Sigma)
- Solución reveladora (KODAK)
- Solución fijadora (KODAK)

4.1.3 Material biológico

Se utilizaron embriones de pollo libres de patógenos como modelo biológico, obtenidos de la casa comercial Avimex, los cuales se mantuvieron a 36°C en incubadora hasta alcanzar los estadios embrionarios: E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19 y E20. Una vez concluidas las horas de incubación, los embriones se retiraron de la incubadora y fueron extraídos del huevo usando equipo de disección. En el cascaron se cortó una circunferencia alrededor del saco vitelino con tijeras de disección, se extrajo el embrión y se decapitó. Se disectó la cabeza para extraer el cerebelo y se colocó inmediatamente en nitrógeno líquido. Los embriones fueron tratados según la Guía Internacional del Manejo de Animales de Laboratorio y a la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

4.2 Métodos

4.2.1 Extracción de ARN

Los cerebelos congelados fueron pulverizados utilizando un mortero y pistilo evitando lo más posible los cambios de temperatura y la degradación del ARN manteniendo las muestras en nitrógeno líquido. El polvo obtenido de cada muestra de tejido fue utilizado para extraer el ARN total utilizando la solución de Trizol que es una mezcla de fenol, isotiocianato de guanidina y cloroformo. Se adicionó 1 mL de esta solución por cada 100 mg de tejido inicial. Se homogenizó y se dejó

reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente, permitiendo la completa disociación de los tejidos nucleoproteicos. Se agregó un volumen de cloroformo a razón de 0.2 mL por cada mL de Trizol agregado. Se agitó e incubó por 3 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 17000 g por 20 min a 4°C separando la fase acuosa de la fase orgánica. Se recuperó la fase acuosa en donde se encuentra el ARN y se le adicionó isopropanol en razón de 0.5 mL por cada mL de Trizol usado. La mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4° C, se retiró el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 75% en razón de 1 mL por cada mL de Trizol agregado. Se agitó y centrifugó a 7500 g por 15 min a 4° C, por último la pastilla se dejó secar al aire y se homogenizó en 30 µL de agua libre de ARNasa.

4.2.2 Cuantificación de ARN

Se cuantificó el ARN por espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a tres longitudes de onda: 260, 280 y 230 nm; en estas longitudes de onda el ARN, proteínas e impurezas orgánicas respectivamente, tienen su máximo de absorción. Al calcular la relación de $A_{260/280}$ podemos conocer la pureza de la muestra respecto a contaminantes proteicos y la relación $A_{260/230}$ nos permite saber la pureza del ARN respecto a las impurezas orgánicas. Se considera a la muestra libre de contaminación si el valor obtenido se encuentra entre 1.8 y 2.

4.2.3 Tratamiento con ADNasa

La muestra de ARN total se trató con ADNasa grado amplificación según el protocolo establecido por el fabricante para eliminar ADN que tuvieran las muestras. La mezcla de reacción se prepara con una concentración final de 1X de solución amortiguadora ADNasa, 0.5 unidades de ADNasa I y 1 µg de ARN total. La mezcla se llevó a un volumen final de 10 µL con agua ultra pura libre de nucleasa, se incubó durante 10 min a 37°C, se adicionó ácido etilendiaminotraacético (EDTA) 2mM para inactivar la enzima. Posteriormente se agregó una concentración final de 1µM de mezcla de oligonucleótidos degenerados y oligos dT. La mezcla se incubó a 65°C por 10 min y se trasladó inmediatamente a hielo para mantener a 4°C.

4.2.4 Síntesis de ADN complementario

Se sintetizó el ADN complementario (ADNc), utilizando la enzima transcriptasa reversa Superscript III de la marca Life Technologies. Se utiliza la mezcla tratada previamente con ADNasa añadiendo en un tubo en frío (4°C) lo siguiente: mezcla de dNTP's en una concentración final de 0.5 mM por cada dNTP, 1 µg de ARN total tratado de la muestra a sintetizar y agua destilada suficiente para un volumen final de 13 µL. La mezcla se calienta a 65° C por 5 minutos y se transfiere a hielo por un minuto. Se centrifuga y se añaden 4 µL de buffer amortiguador 5X, 1 µL de DTT, 1 µL de inhibidor de ARNasa RNaseOUT y 1 µL de enzima retrotranscriptasa. Se mezcla y se incuba 1 hora a 55° C y se inactiva la reacción calentando la mezcla a 70° C por 15 minutos. El ADNc obtenido se almacenó a 4° C

4.2.5 Diseño de oligonucleótidos

Las secuencias de ARNm de los cinco miembros de la familia de SLC38 de *Gallus gallus* se obtuvieron de la base de datos del GenBank que forma parte del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2012); se realizó un alineamiento con el programa CLUSTALW proporcionado por el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) con el fin de encontrar las regiones variables entre la secuencia del SNAT3 y los otros SNATs de la familia SLC38. A partir de los datos encontrados se seleccionó la región diferencial de SNAT3 y se diseñó un par de oligonucleótidos con la siguiente secuencia:

Sentido: AGC TGC TGC ACA CCT ACA G

Antisentido: CGA GGA TGG AGG GAG CAA A

El porcentaje de GC para el oligonucleótido sentido fue de 57% con una TM de 56°C y el porcentaje de GC para el oligonucleótido antisentido fue de 57% con una TM: 55° C.

Los oligonucleótidos se probaron con ayuda del programa AmplifX realizando una PCR *in silico* para comprobar que no formaran dímeros de oligonucleótidos o

hibridaciones inespecíficas. A través de este mismo programa se obtuvo la temperatura teórica de alineamiento a partir de la cual se iniciaron las pruebas para encontrar la mejor temperatura de amplificación.

4.2.6 PCR tiempo real

En este estudio se utilizó SYBR Green I como agente intercalante y el equipo termociclador Light Cycler 1.5 de Roche. Se utilizaron oligonucleótidos de SNAT3 que se diseñaron específicos para la secuencia de pollo, y oligonucleótidos de actina con una secuencia previamente descrita por Durán y colaboradores en 2004. En cada experimento se utilizaron estos dos pares de oligonucleótidos para amplificar las muestras problema.

Para la realización de esta técnica se utilizó una mezcla maestra que contiene 1 μ L de buffer SYBR Green I (Taq polimerasa, dNTPs, buffer de reacción, $MgCl_2$, dNTPU y SYBR Green), 1 μ L de cada oligonucleótido en concentración 3 μ M, 1 μ L de ADNc (sintetizado de 1 μ g de ARN total), 0.8 μ L de $MgCl_2$ 25mM y 5.2 μ L de agua libre de nucleasa.

4.2.7 Curva estándar

Después de realizada la PCR tiempo real, se obtuvo ADN purificado de SNAT3 y actina, a una concentración de 0.1 μ g/ μ L a partir de las cuales se realizaron estándares de diluciones seriadas de concentraciones conocidas de ADN de SNAT3 y de actina expresadas en μ g/ μ L. Con estas diluciones se determinaron los puntos de cruce (CP) de las distintas concentraciones. El CP es el punto de inflexión al comienzo de la fase logarítmica en la cinética de reacción. Para obtener la ecuación de la recta se graficó el logaritmo de la concentración obtenida frente al valor del punto CP. Se calculó la eficiencia de reacción la cual debe tener un rango de 1.8 a 2 ya que ésta indica el número de moléculas que se producen en cada ciclo por cada molécula presente.

4.2.8. Cuantificación absoluta

Una vez que se obtuvieron las curvas estándar se calculó la concentración de las muestras problema, relacionando el punto de cruce (CP) de éstas muestras y el CP de las concentraciones estándar anteriormente evaluadas. En cada experimento se amplifican cuatro diluciones estándar tanto de SNAT3 como de actina y se evaluaron todas las muestras problema para cada uno de los genes. Los valores de CP de las muestras se interpolaron en la ecuación de la recta de la curva estándar respectiva y se determinó la concentración de las mismas.

4.2.9 Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se basa en una comparación de los niveles de expresión del gen de SNAT3 frente a la expresión del gen actina para conocer el número de veces que se expresa el gen de estudio respecto al gen de referencia. Este gen de referencia cumple la característica de expresarse constantemente en todas las muestras a evaluar.

Se calculó el cociente de los datos de la cuantificación absoluta de SNAT3 entre los valores de la cuantificación absoluta de actina, para comprobar que las variaciones obtenidas por el gen problema son debidas a su expresión y no a problemas técnicos o de manipulación.

4.2.10 Extracción de proteína

A cada cerebelo disectado se le agregó un volumen de sacarosa 1x en proporción 1:5 (5 volúmenes por cada volumen de muestra) y se homogenizó mecánicamente haciendo pasar la muestra a través de puntas para micropipeta de volumen 20 - 200 μ L y después de volumen 2 - 10 μ L. El homogenizado resultante se centrifugó a 5000 rpm por 4 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 13,000 rpm por 20 min a 4° C. La pastilla final se homogenizó en un volumen de solución HBM 1x según su tamaño, variando de 30 hasta 50 μ L por muestra.

4.2.11 Cuantificación de proteína.

Se realizó una curva de concentración estándar a partir de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) en concentración de 1mg/ml. Se hicieron diluciones de esta solución y se agregó reactivo de Bradford para obtener una curva de concentración según el Cuadro 1.

Cuadro 1. Preparación de curva estándar de proteína.

BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Estándar de BSA 1mg/mL (μL)	Agua (μL)	Mezcla estándar + Agua (μL)	Reactivo de Bradford (μL)
0	0	80	20	180
1	4	76	20	180
3	12	68	20	180
6	24	56	20	180
12	48	32	20	180

Cada punto de la curva se adicionó por duplicado en placa de 96 pozos. En la misma placa se añadieron duplicados de cada muestra de proteína extraída (20 μL de una dilución 1:50), y se añadieron 180 μL de reactivo de Bradford. Se dejó reaccionar por 5 minutos y se leyó a 595 nm en lector de microplaca iMark de Bio-Rad. Se graficó la absorbancia obtenida de la curva de calibración frente a la concentración de los puntos de la curva a partir de la cual se obtuvo la ecuación de la recta en la que se interpolaron los datos y se obtuvieron las concentraciones de proteína de las muestras.

4.2.12 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La preparación de estos geles se realizó según el manual de laboratorio Sambrook y Russell 2001. El gel separador se preparó al 10% con mix de acrilamida y bis acrilamida 30% (solución 1:19), Tris 1.5 M pH 8.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED. El gel de empaquetamiento se preparó 5% con mix de acrilamida y bis

acrilamida 30% (solución 1:19), Tris 1 M pH 6.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED. A partir de las concentraciones obtenidas en la cuantificación de los extractos proteicos, se calculó el volumen de cada muestra necesario para cargar 75 µg de proteína, ajustando a un volumen final de 30 µL con HBM 1X y buffer de carga compuesto de Tris-HCl, SDS, glicerol, bromofenol y β-mercaptoetanol. Las muestras se calentaron por 5 minutos a 95° C, se transfirieron a hielo, después se centrifugaron rápidamente y se cargaron en el gel. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 85 V durante el tiempo suficiente para que el azul de bromofenol llegara al final del gel.

4.2.13 Inmunodetección en fase sólida

Una vez finalizada la electroforesis, las muestras se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa, mediante una transferencia húmeda en donde se utilizó buffer de transferencia compuesto de Tris y glicina adicionado con 20% de metanol puro. La transferencia se realizó a un voltaje constante (100 V) durante una hora. Para comprobar la adecuada transferencia de las proteínas se realizó una tinción con rojo Ponceau a las membranas.

Se eliminó el rojo Ponceau de las membranas y se bloquearon con una solución de TBS al 5% de leche descremada por dos horas. Una vez concluido el bloqueo, se realiza un lavado rápido de 3 minutos con TBS 1X para retirar el exceso de leche.

A continuación las membranas se incubaron con anticuerpo primario, en este caso se utilizó suero anti SNAT3 producido en cobayo (cedido por el Dr. Francisco Zafra del CBM-SO Madrid, España), en una dilución 1:200 en TBS 1X con leche descremada al 2%, y se incubaron toda la noche a 4° C en agitación. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS 1X con leche descremada al 2%. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario, anti-cobayo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés) producido en cabra de la marca Santa Cruz. Este anticuerpo se utilizó en proporción 1:5000 en TBS 1X con leche descremada al 2% y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente protegido de la luz.

Transcurrida la incubación, se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno con TBS 1X, seguido de 2 lavados de 10 minutos con TBS 1X adicionado con Tween 20 (TBS-T) en una proporción 1:2000. El exceso de detergente fue removido con un lavado rápido de 3 minutos con TBS 1X.

4.2.14 Revelado

Las membranas se revelaron en cuarto totalmente oscuro mediante un ensayo de quimioluminiscencia (ECL) en donde se utilizaron en proporción 1:1 la solución de peróxido y la solución potenciadora de luminol incluidas en el kit ECL de Promega. La mezcla de estas soluciones en presencia de HRP conjugado en el anticuerpo secundario cataliza una reacción de oxidación del luminol, resultando en la emisión de luz. Las membranas se cubrieron con la mezcla de reacción. Se retiró el exceso y se colocaron entre láminas de plástico transparente evitando tener burbujas entre éste y la membrana. Las membranas se presionaron contra la placa de revelado en un hypercassette durante diferentes tiempos, posteriormente las placas expuestas se sumergieron en soluciones reveladora y fijadora durante un minuto, haciendo un lavado con agua entre soluciones. Las placas reveladas se secaron al aire.

4.2.15 Densitometría de banda

Se realizó una densitometría de banda a las placas obtenidas de la inmunodetección, por medio del programa Quantity One 4.6.6 Basic de Bio-Rad. Este análisis se basó en la lectura de densidad óptica asociada a la densidad de pixeles por área seleccionada, tomando como patrón de referencia el área de la banda con mayor tamaño. De la misma forma, se realiza un análisis densitométrico a una de las bandas proteicas inespecíficas obtenida de la tinción de la membrana con rojo Ponceau, con el fin de normalizar la densidad óptica de SNAT3 a un control de carga.

4.2.16 Análisis estadístico

Se realizó un análisis porcentual de los datos de concentración y densidad óptica obtenidos. Para los datos obtenidos de los experimentos de PCR tiempo real, se tomó el valor más alto de cada experimento tanto para el gen problema como para el gen de referencia; a este dato se le dio como valor 100% y a partir de éste se calculó el valor porcentual de los demás datos. Los valores porcentuales de cada experimento se promediaron y graficaron con la desviación estándar correspondiente, posteriormente se realiza una cuantificación relativa para lo cual los datos se normalizaron con respecto al gen de referencia actina y se graficaron con su desviación estándar.

Se tomaron los datos arrojados por la densitometría de banda para cada membrana. A los valores más altos tanto de SNAT3 como de una banda arbitraria de la tinción de Ponceau se les asignó un valor de 100% y a partir de éste valor se calcularon los valores de las bandas restantes. Los porcentajes de las dos membranas se promediaron y graficaron con su desviación estándar. Se normalizaron los datos obtenidos de SNAT3 con respecto al rojo Ponceau de cada membrana. El resultado se promedió y graficó junto con su desviación estándar.

Las diferencias obtenidas en los niveles de expresión una vez que se realizó el análisis de datos, se evaluaron bajo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente se realizó un análisis *post-hoc* de Tukey en el que se consideró una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.05$. Este análisis se realizó con ayuda del programa estadístico GraphPad Prism 6

4.3 Diseño experimental

Se ilustra el diseño experimental que se llevó a cabo durante este estudio, la Figura 7 muestra la metodología para la cuantificación de ARN, la Figura 8 ilustra el procedimiento de cuantificación de proteína.

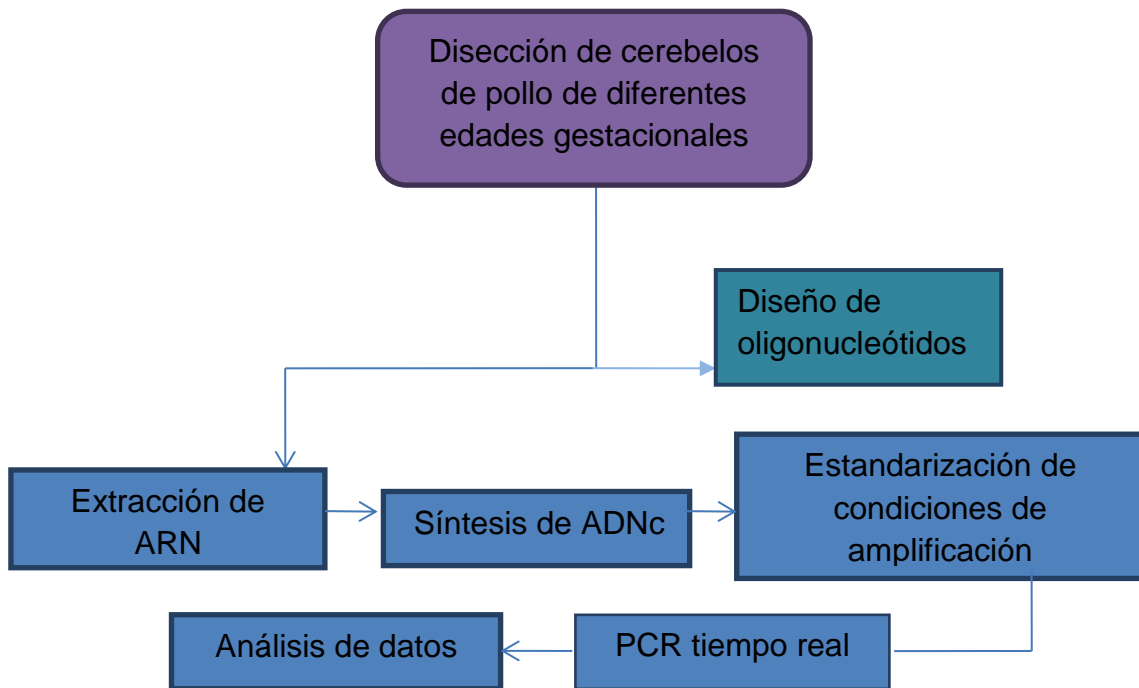


Figura 7. Diseño experimental para cuantificación de ARNm.

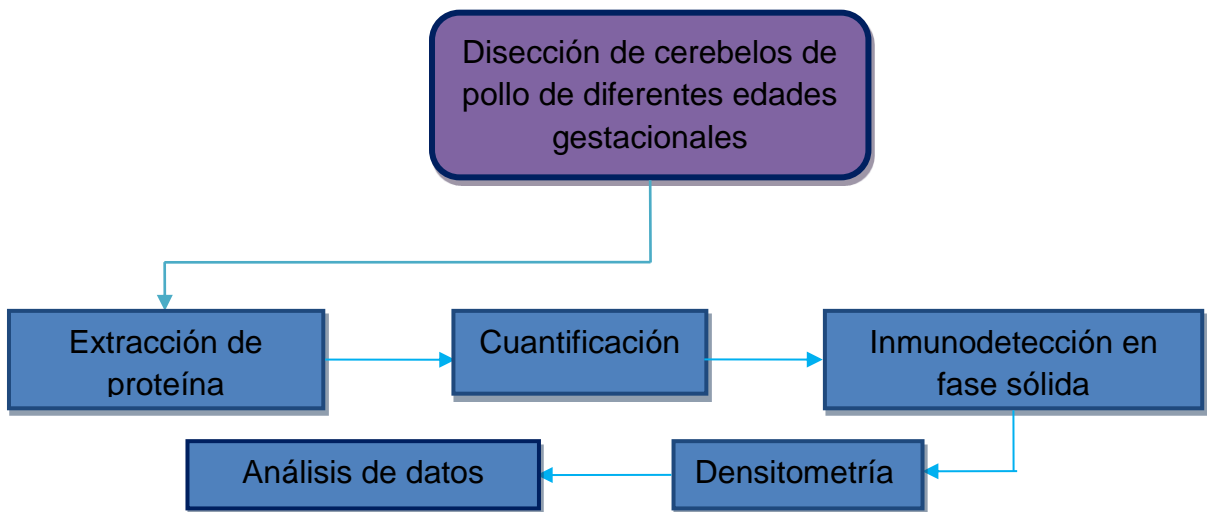


Figura 8. Diseño experimental para cuantificación de proteína.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados del análisis de la expresión de ARNm

5.1.1 Diseño y análisis de oligonucleótidos

A partir del diseño de oligonucleótidos de SNAT3, se realizó una PCR *in silico* mediante el programa AmplifX y se obtuvo un amplicón único de 237 pares de bases. Los oligonucleótidos sentido y anti sentido se alinearon en las bases 1064 y 1282 respectivamente dentro de la secuencia de ARNm de *Gallus gallus*. A continuación se presenta la secuencia para SNAT3 con la que se realizó la PCR *in silico* (Figura 9). En azul se marca la secuencia de bases del amplicón y en morado la secuencia en donde se diseñaron los oligonucleótidos.

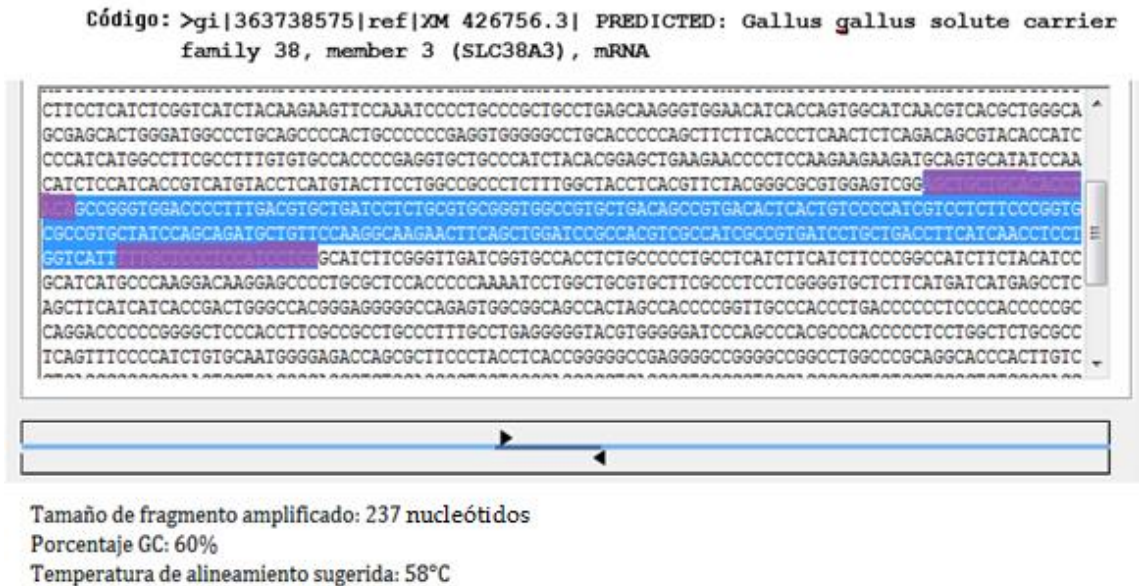


Figura 9. Imagen del amplicón resultado de la PCR *in silico*

5.1.2 Estandarización de condiciones de amplificación

Una vez que los oligonucleótidos se evaluaron *in silico*, se procedió con la estandarización *in vitro* de las condiciones para la amplificación de los genes SNAT3 y actina por PCR tiempo real. Se inició realizando pruebas a diferentes temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos, partiendo de la temperatura teórica calculada por el programa utilizado para la PRC *in silico*, adicionalmente se realizó un ajuste en las concentraciones de MgCl₂ ya que este es un catalizador de la polimerasa, la modificación de su concentración tiene efectos importantes en la reacción. Las mejores condiciones de amplificación se obtuvieron a una concentración final de 3 mM de MgCl₂ con una temperatura de hibridación de 59° C. Las condiciones de amplificación utilizadas para SNAT3 y actina a la vez, se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Programa para PCR tiempo real

	Modo de análisis	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Adquisición
Desnaturalización	Ninguno	1	95 °C	15 min	Ninguno
Amplificación	Cuantificación	40	95 °C	10 seg	Ninguno
			59 °C	10 seg	Ninguno
			72 °C	12 seg	Simple
Curvas de disociación	Curva de disociación	1	95 °C	0 seg	Ninguno
			65 °C	1 min	Ninguno
			95 °C	0 seg (a)	Continuo
Frío	Ninguno	1	50 °C	30 seg	Ninguno

(a) = Rampa de 0.1 °C/seg

Con estas condiciones generamos un único amplicón para los genes evaluados. En la Figura 10 se representan las curvas de disociación obtenidas.

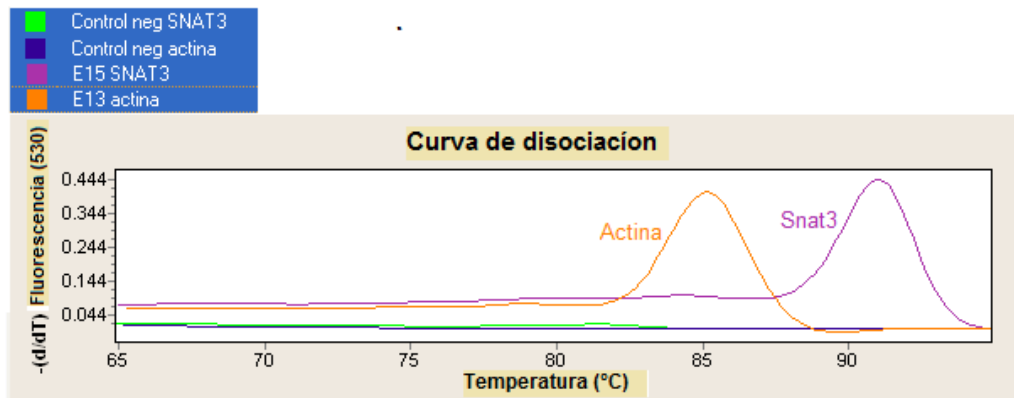


Figura 10. Curvas de disociación de SNAT3 y actinas. Adicionalmente se muestran controles negativos sin amplificación.

En la imagen podemos observar picos únicos de amplificación para SNAT3 y actina, adicionalmente se muestran controles negativos para cada gen los cuales no presentan fluorescencia, lo cual indica que la reacción no tiene contaminaciones que modifiquen los picos de amplificación que corresponden a los genes esperados.

5.1.3 Curvas estándar

Una vez establecidas las condiciones de amplificación se procedió con la generación de curvas estándar de SNAT3 y actina. Para ello se realizaron diluciones seriadas de un orden de magnitud de diferencia, estas diluciones se hicieron a partir de amplicones puros de ambos genes. Para SNAT3 se utilizaron las concentraciones 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} y 1×10^{-9} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para actina se utilizaron las concentraciones 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, estas diluciones se definieron con base en el número de ciclos en que se observaba la amplificación de las muestras problema. El rango de concentración de las curvas estándar es dependiente del ciclo en que se observaba la amplificación de las muestras problema para asegurar su interpolación. Con base a los puntos de cruce obtenidos en la cinética de reacción y el logaritmo de la concentración de las diluciones, el programa informático acoplado al termociclador realizó una regresión lineal y

calculó la eficiencia de la reacción. En la Figura 11 se ilustran las curvas estándar de amplificación y eficiencias de reacción obtenidas para SNAT3 y actina.

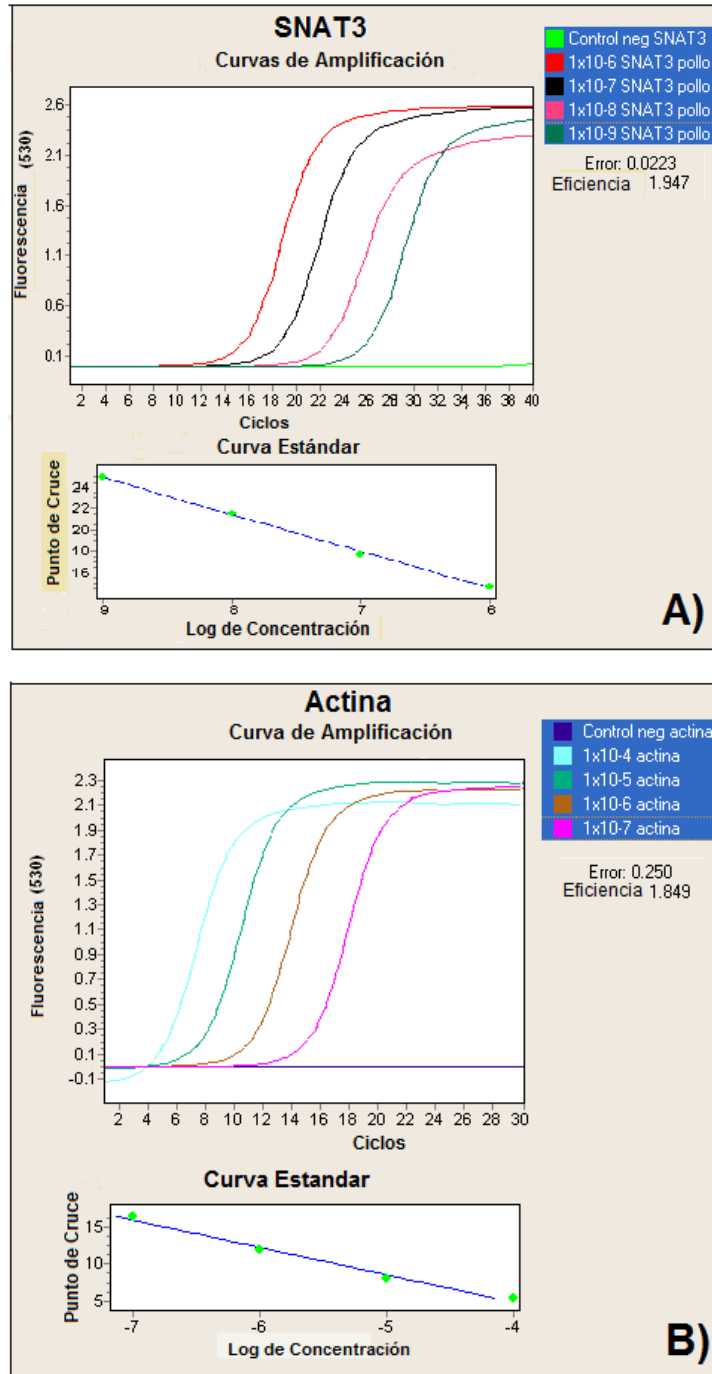


Figura 11. Curvas de amplificación de concentraciones estándar de SNAT3 y actina. A) Curva estándar para SNAT3. B) Curva estándar para actina.

Para SNAT3 observamos una eficiencia de 1.947 y de 1.849 para actina, estas eficiencias son adecuadas ya que el rango aceptable para la cuantificación es de 1.8 a 2, y por lo tanto estas fueron las curvas que se utilizaron para realizar la cuantificación absoluta.

5.1.4 Cuantificación absoluta

Para la cuantificación de la expresión de ARN se realizaron tres experimentos independientes, en cada uno se evaluó la amplificación de SNAT3 y actina simultáneamente. Los experimentos incluyeron las curvas estándar de los genes a evaluar, los ADNc de las edades E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19 y E20, así como controles negativos que contenían agua, los cuales nos permitieron discriminar cualquier contaminación que afectara la amplificación, ya que en cada experimento se prepara un mix único de reacción. En las Figuras 12 y 13 se muestra un ejemplo del resultado de la amplificación de las curvas de concentraciones estándar de SNAT3 y actina con las muestras problema.

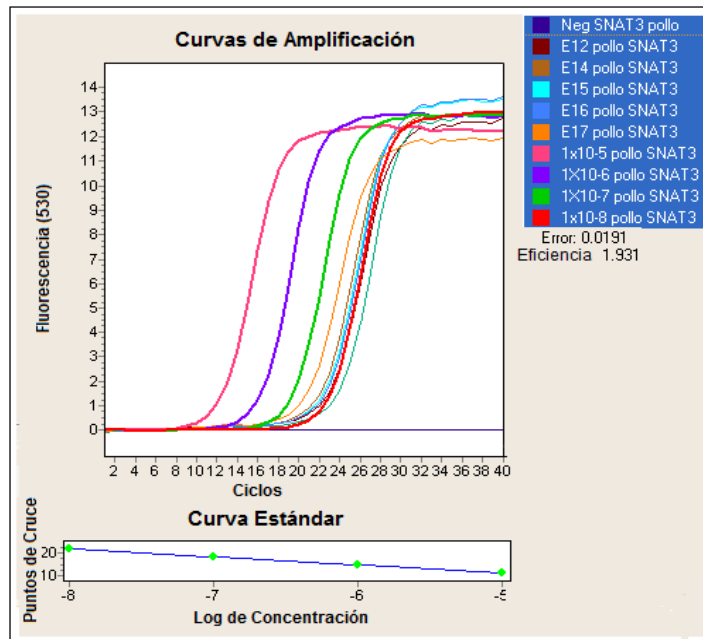


Figura 12. Curvas de amplificación de concentraciones estándar de SNAT3 y muestras problema.

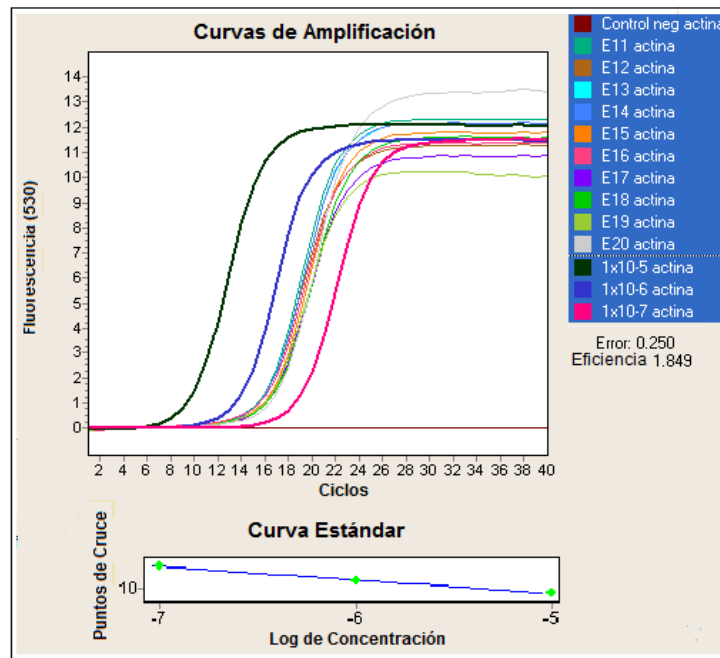


Figura 13. Curvas de amplificación de concentraciones estándar de actina y muestras problema.

Podemos observar que las muestras problema amplifican dentro del rango de concentración de las curvas estándar. Los CP obtenidos en cada reacción se interpolaron en su correspondiente curva estándar y se obtuvieron las concentraciones de cada muestra. Las curvas con mayor intensidad de color son las cinéticas de reacción correspondientes a las curvas estándar, mientras que las curvas de color más tenue corresponden a las cinéticas de reacción de los ADNc de cerebelo de pollo de distintas edades.

El resultado de cada una de las tres cuantificaciones independientes se analizó en porcentajes, tomando arbitrariamente como 100% el valor máximo de concentración y calculando a partir de éste los valores de las muestras restantes. Los datos de todos los experimentos se promediaron y se graficaron obteniendo valores de porcentaje de cada edad embrionaria. Posteriormente se realizó un análisis estadístico como se describe en a través de un análisis ANOVA en una vía y un *post-hoc* de Tukey, considerando una $p < 0.05$. Los resultados se graficaron y se muestran en las Figuras 14 y 15.

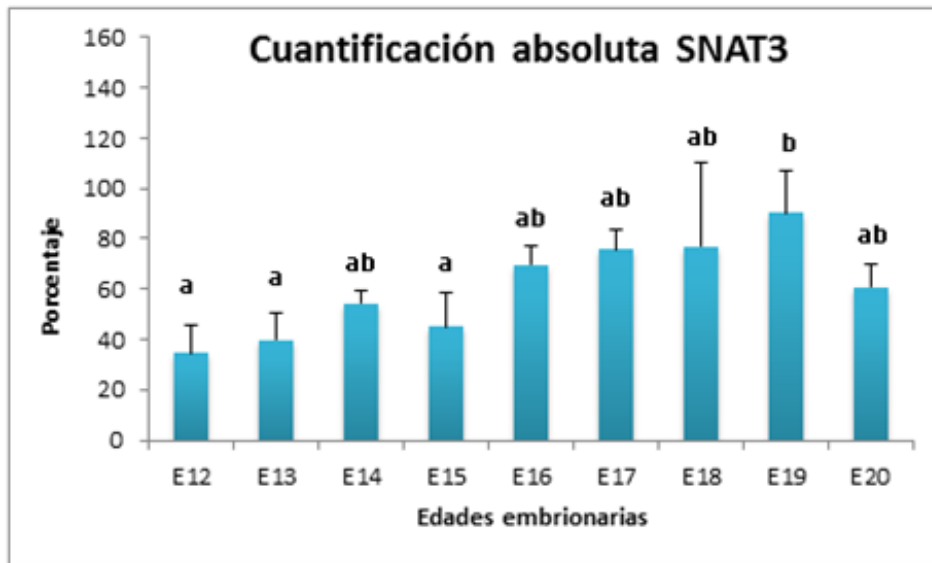


Figura 14. Gráfica de la cuantificación absoluta de la expresión de SNAT3.

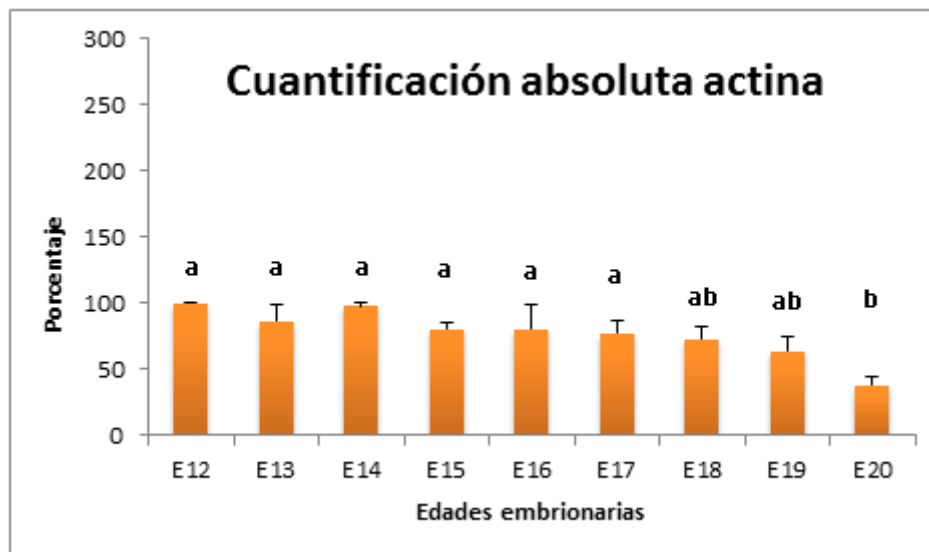


Figura 15. Gráfica de la cuantificación absoluta de la expresión de actina.

Como se puede observar, la gráfica de la cuantificación absoluta de SNAT3 nos muestra un aumento en la expresión del transportador conforme aumenta la edad. El análisis estadístico nos permite encontrar diferencias significativas, obteniendo un aumento en la expresión a partir de E16 y un pico máximo de expresión significativo en E19 seguido de un decaimiento de la expresión en E20. Los niveles

de expresión de la actina son constantes hasta la edad E17 con una disminución estadísticamente significativa en E20.

5.1.5 Cuantificación relativa

A partir de los datos de la cuantificación absoluta se calculó el cociente del porcentaje de SNAT3 frente actina para obtener la cuantificación relativa representada por la normalización de los resultados referidos al gen actina. Posteriormente se realizó un análisis estadístico con una $p < 0.05$. El resultado se representa en la Figura 16.

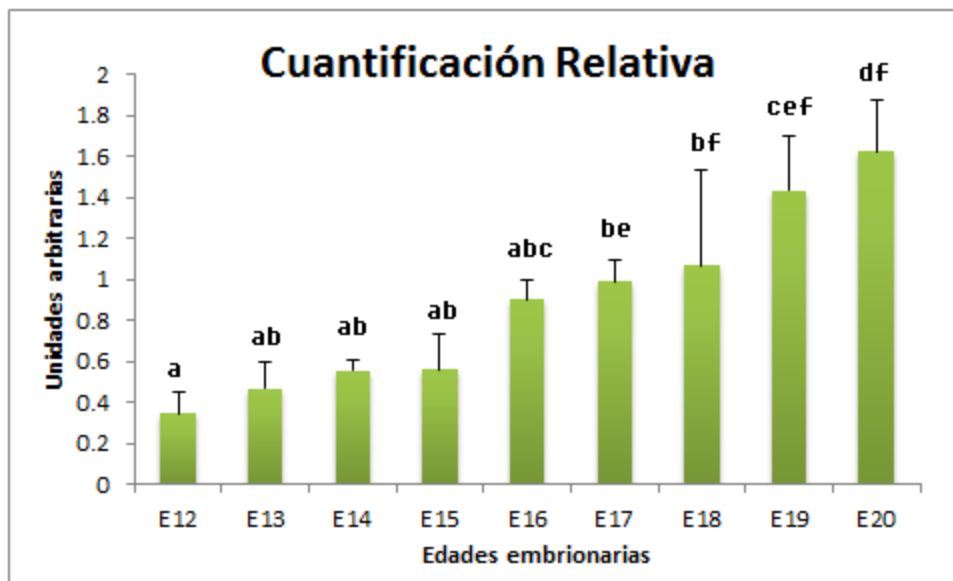


Figura 16. Gráfica de la cuantificación relativa de expresión del ARNm de SNAT3 en cerebelo de pollo

En la gráfica podemos observar un aumento en la expresión de SNAT3 conforme aumenta la edad. A partir de E16 se presenta un cambio estadísticamente significativo y un pico máximo de expresión en E20. Cada barra corresponde a la media del cociente las concentraciones absolutas de SNAT3 frente a actina más su desviación estándar de las tres cuantificaciones independientes. Las letras representan los grupos con diferencias estadísticamente significativas.

5.2 Resultados del análisis de la expresión de proteína

5.2.1 Curva estándar

La curva estándar de proteína se realizó como se describe en los materiales y métodos. Una vez que se obtuvieron absorbancias de las muestras de la curva estándar de BSA se graficó la absorbancia frente a la concentración y se obtuvo la ecuación de la curva. La gráfica y ecuación se muestran en la Figura 17.

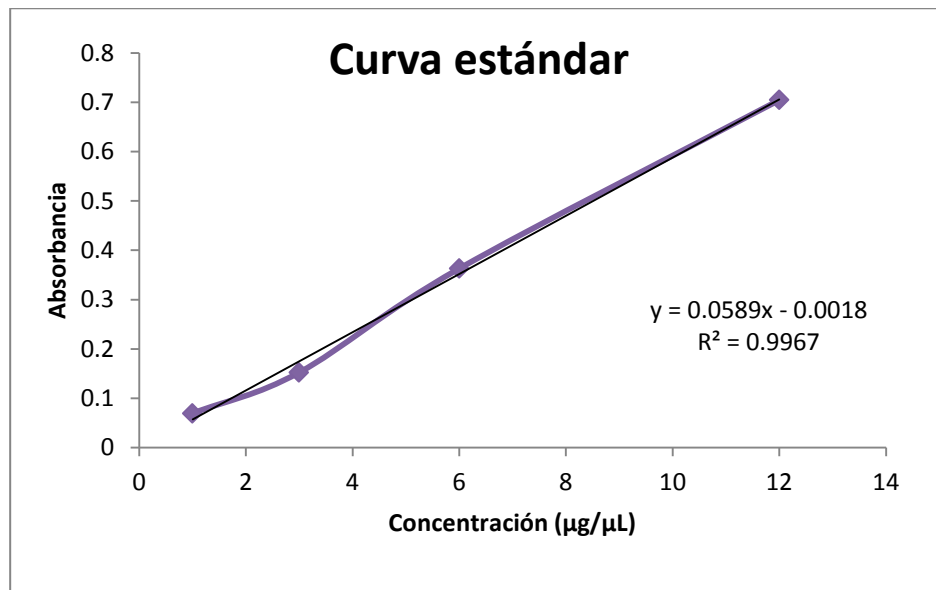


Figura 17. Curva estándar de concentración de proteína BSA.

La gráfica y ecuación obtenida se utilizaron para interpolar los valores de las muestras problema y así poder conocer la concentración proteica total.

5.2.2 Cuantificación de proteína

A partir de la curva estándar obtenida se interpolaron y calcularon las concentraciones de las muestras problema, promediando los duplicados de las

absorbancias obtenidas de cada muestra y se calculó el valor de la concentración. El Cuadro 3 representa el resultado de la cuantificación de proteína.

Cuadro 3. Concentración proteica de muestras de cerebelo de pollo.

Muestra	A1	A2	Ax	Sustitución en la ecuación	Concentración con factor de dilución $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
E11	0.1385	0.1365	0.1375	2.36502547	5.912563667
E12	0.1015	0.1025	0.102	1.762309	4.405772496
E13	0.1495	0.1415	0.1455	2.5008489	6.252122241
E14	0.1355	0.1235	0.1295	2.22920204	5.573005093
E15	0.2685	0.2785	0.2735	4.67402377	11.68505942
E16	0.2795	0.3065	0.293	5.00509338	12.51273345
E17	0.2935	0.3025	0.298	5.08998302	12.72495756
E18	0.2565	0.2195	0.238	4.0713073	10.17826825
E19	0.3145	0.3045	0.3095	5.2852292	13.21307301
E20	0.3425	0.2645	0.3035	5.18336163	12.95840407

A1 y A2 indican los valores de absorbancia obtenidos, Ax indica el promedio de éstos. Con los datos de concentración obtenidos para cada muestra se calculó el volumen necesario con el objetivo de cargar 75 μg de proteína en el gel. En cada pozo se cargó un volumen final de 30 μL .

5.2.3 Electroforesis y transferencia de proteínas.

En la Figura 18 observamos el patrón de bandas característico de una mezcla compleja de proteínas tras su separación por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual se tiñó con rojo Ponceau.

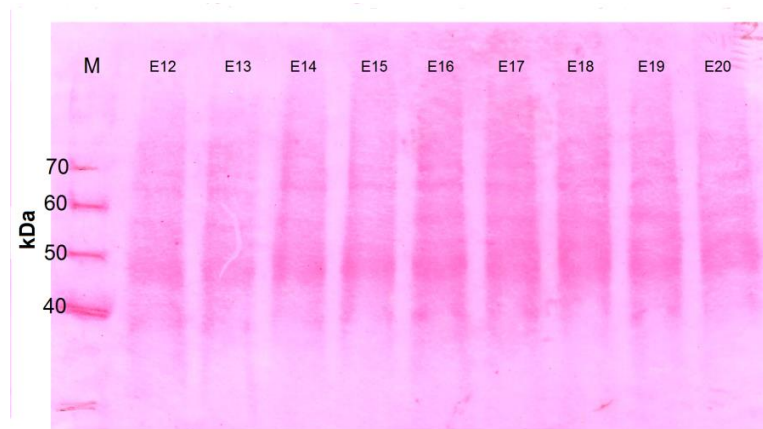


Figura 18. Imagen representativa de una de las membranas teñidas con rojo Ponceau. M indica el carril del marcador de peso molecular.

5.2.4 Inmunodetección en fase sólida

Una vez eliminado el rojo Ponceau de las membranas, éstas fueron incubadas con el suero específico para SNAT3 y reveladas como se detalla en los materiales y métodos. El análisis de los niveles de expresión proteica de SNAT3 se obtuvo mediante la técnica de inmunodetección en fase sólida. En la Figura 19 podemos observar el patrón de banda obtenido para el transportador SNAT3.

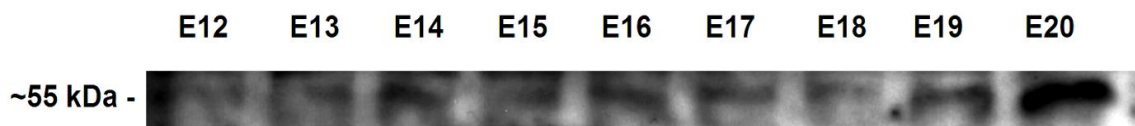


Figura 19. Inmunodetección en fase sólida de SNAT3. Expresión proteica del transportador SNAT3 durante la ontogenia del cerebelo de pollo.

En la imagen se puede observar un aumento de expresión en las edades E19 y E20. Posteriormente las bandas obtenidas por la inmunodetección en fase sólida se analizaron por densitometría.

5.2.5 Densitometría de banda

Se realizó un análisis densitométrico de la placa obtenida de la reacción de quimioluminiscencia para la inmunodetección en fase sólida de SNAT3 y de una banda proteica inespecífica de aproximadamente 65kDa de la tinción con rojo Ponceau. Se obtuvieron unidades arbitrarias de densidad óptica para cada membrana analizada. A partir de estos valores se realizó un análisis de porcentajes tomando arbitrariamente como 100% el valor de densidad más alto y calculando el porcentaje correspondiente para los valores restantes. Posteriormente se realizó un análisis estadístico a los datos para evaluar si las diferencias encontradas eran estadísticamente significativas. Los resultados se graficaron y se muestran en las Figuras 20 y 21 para SNAT3 y Ponceau respectivamente.

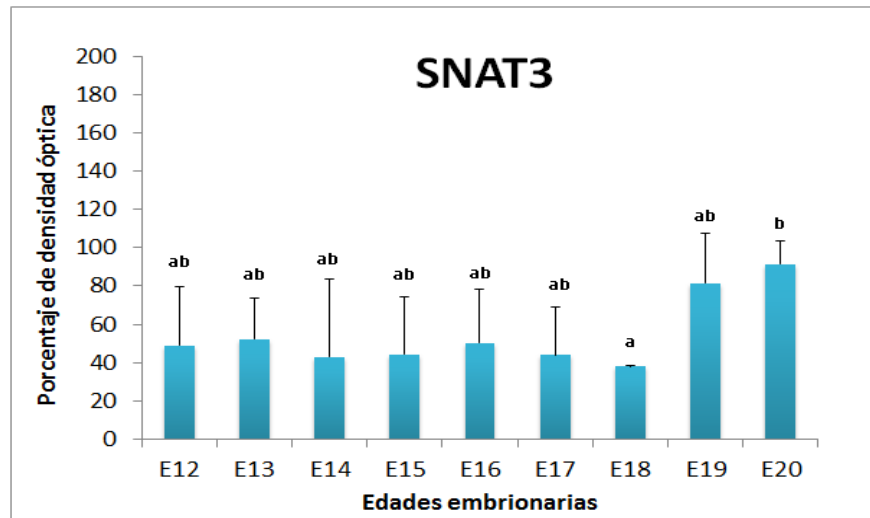


Figura 20. Niveles de expresión proteica de SNAT3.

En la gráfica observamos que al realizar el análisis estadístico se describe un patrón de expresión que es constante en todas las edades a excepción de la comparación entre E18 y E20 en donde las diferencias son estadísticamente significativas. Cada valor representa la media de los datos obtenidos por las dos membranas y las letras representan el análisis estadístico.

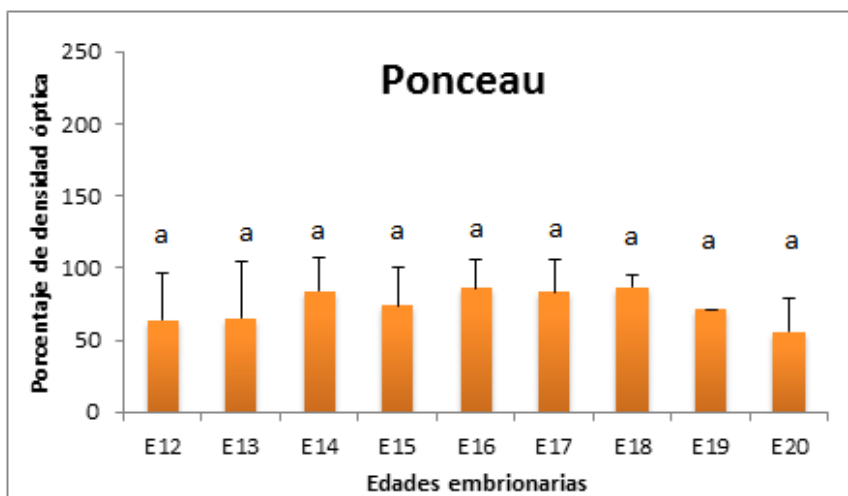


Figura 21. Análisis densitométrico de una banda inespecífica de la tinción con rojo Ponceau. Peso de la banda de aproximadamente 65kDa.

Podemos observar que los valores densitométricos obtenidos de la banda de Ponceau son constantes, y el análisis estadístico realizado a los datos demuestra que no hay cambios significativos. Los resultados se utilizaron para normalizar los valores de SNAT3, a través del cociente respecto a los valores del análisis densitométrico de Ponceau de cada membrana. El resultado se promedió y graficó su una desviación estándar y se muestra en la Figura 22.

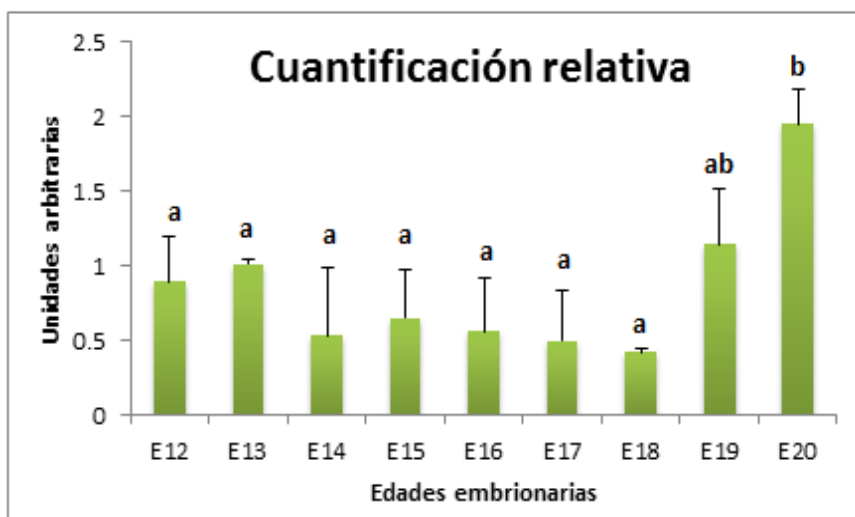


Figura 22. Gráfica de cuantificación relativa de la expresión proteica de SNAT3 / rojo Ponceau.

La gráfica muestra un patrón constante en la expresión de la proteína de SNAT3 hasta la edad E18, a partir de E19 comienza a haber un incremento en la expresión de la proteína y en E20 ese aumento es estadísticamente significativo.

Para analizar los resultados de la cuantificación de proteína y de ARNm se graficaron ambos patrones de expresión. La gráfica comparativa se ilustra en la Figura 23, en donde se muestran en las diferentes edades experimentales las tendencias de expresión del ARNm en puntos azules y proteína en puntos rojos.

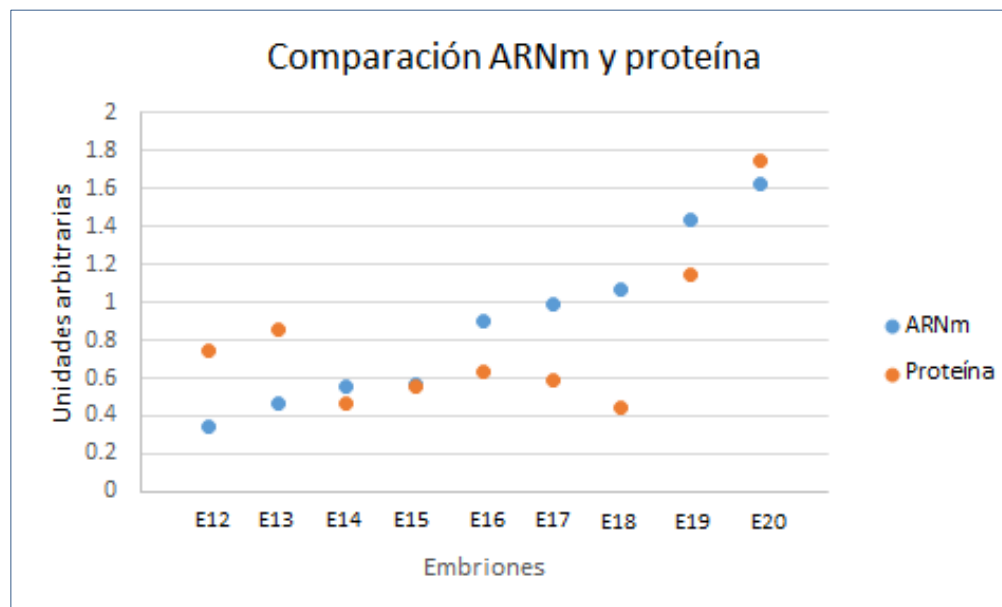


Figura 23. Gráfica comparativa de la expresión de ARNm y proteína.

En ella podemos observar patrones de expresión similares, sin embargo el ARNm exhibe cambios paulatinos crecientes en proporción a la edad. Por otro lado, al observar el patrón de expresión de proteína éste se mantiene constante hasta E18 y en E19 hay un aumento abrupto en la expresión que continúa en E20.

Cabe destacar que tanto para la proteína como para ARNm las tendencias coinciden con una expresión máxima en las edades E19 y E20.

6 DISCUSIÓN

En el presente estudio se cuantificaron los niveles de expresión del ARNm del transportador SNAT3 en cerebelo de pollo durante la ontogenia. Debido a que los transportadores de la familia SLC38 podrían tener un papel preponderante en la sinaptogénesis, se seleccionó al pollo como modelo de estudio en la ontogenia, ya que la sinaptogénesis en este modelo tiene un desarrollo más rápido si se le compara con mamíferos, pues presenta las primeras sinapsis maduras alrededor del día 13 de incubación, las cuales continúan desarrollándose rápidamente con cambios estructurales como el incremento del grosor de la membrana de las conexiones axo-dendríticas y el número de vesículas sinápticas (Rainer y Ronald, 1974). Conocer el patrón de expresión de este transportador en el desarrollo nos interesa ya que en investigaciones anteriores como la de Pinilla y col., en 2011, se ha demostrado que la familia SLC38, a la que pertenece SNAT3, está involucrada en diferentes etapas del desarrollo, lo que nos lleva a pensar que sus funciones son muy específicas y reguladas, particularmente en el sistema nervioso. La expresión tejida, tiempo y espacio diferencial de los distintos transportadores que conforman esta familia se asocia a la variabilidad e importancia de los aminoácidos que transportan. Por ejemplo, el transportador SNAT2 está involucrado en el crecimiento y volumen celular (Pinilla y col., 2011). Por su parte, a SNAT3 en rata se le asocia con el establecimiento de las conexiones sinápticas, lo cual se ha relacionado con su funcionalidad como transportador de glutamina siendo necesario para la recaptura de neurotransmisores y por ende indispensable para el buen funcionamiento de la sinapsis (Boulland y col., 2003). Se ha descrito al transportador SNAT3 como partícipe indispensable en el ciclo glutamato-glutamina en donde libera la glutamina de células gliales hacia el espacio sináptico para que la neurona pre-sináptica pueda captar este aminoácido y lo transforme en glutamato que posteriormente se liberará al espacio intersináptico (Mackenzie y Erickson, 2004; Martínez-Lozada y col., 2013).

Se analizaron los niveles de expresión del ARNm del transportador SNAT3 durante la ontogenia de pollo, utilizando la técnica de PCR tiempo real ya que esta técnica permite cuantificar y valorar las modificaciones mínimas de la expresión del gen y ha sido ampliamente definida como un efectivo método de cuantificación, a través de extensos estudios como los de Wong y Medrano en 2005 en donde se describen distintas aplicaciones de ésta técnica y la variabilidad en los métodos de cuantificación. En este trabajo realizamos una cuantificación absoluta y relativa del gen de SNAT3, tomando en cuenta estudios previos como los de Bustin y col., 2009 y Langmann y col., 2003 donde se discute la importancia del uso de un gen de referencia para poder normalizar los datos obtenidos por la amplificación por el gen problema, y en donde el gen de referencia debe tener como característica primordial una expresión constante en el modelo de estudio. Debido a la variabilidad en la expresión de los genes de estudio bajo las diferentes condiciones es necesario tener un gen de referencia al que se puedan normalizar los datos obtenidos y, cuya expresión sea estable durante todo el experimento. Se ha descrito ampliamente que no existe un gen de referencia único para todos los modelos a evaluar debido a que es necesario probar y establecer cuál es el gen de referencia ideal para cada sistema en particular ya que es modulado por factores como los tratamientos a los que se somete, estadio embrionario, etcétera (Vandesompele y col., 2002). Por ejemplo, el gen de GDAPH y el gen que codifica para la subunidad 18s ribosomal son ampliamente utilizados como genes de referencia, sin embargo; tienen características que no los hacen idóneos siempre, por ejemplo: para GDAPH se ha encontrado que su expresión varía entre diferentes tejidos de humano en condiciones de experimentación y para 18s se ha observado que en plantas muestra una alta variabilidad asociada a la diferenciación celular, formación de órganos y su maduración (Kocera y Rapacz, 2013). Nosotros seleccionamos el gen actina como gen de referencia ya que en nuestro modelo de estudio fue analizado a través de diferentes etapas del desarrollo y la actina ha demostrado tener un patrón de expresión estable en la ontogenia como se muestra en nuestros resultados.

Los resultados obtenidos de la cuantificación del ARNm de SNAT3 muestran una clara tendencia en aumento de la expresión del transportador conforme aumenta la edad, observándose un pico máximo de expresión en las edades E19 y E20, el momento en el que en pollo ya se encuentran presentes las primeras sinapsis maduras.

La relación entre el aumento de la expresión de SNAT3 con las etapas en donde se establecen las sinapsis sustentan la importante función de este transportador como partícipe del ciclo glutamato–glutamina. La intervención de este transportador en la sinapsis se ha descrito en trabajos previos como los de Boulland y col., 2003 y Mackenzie y Erickson, 2004, así como en recientes estudios realizados específicamente en pollo, en donde se ha demostrado una fina regulación funcional de SNAT3 en la sinapsis tripartita a través de su capacidad de transporte bidireccional como internalizador y liberador de glutamina. Esta regulación se demostró mediante su acople funcional con el transportador de glutamato/aspartato dependiente de sodio (GLAST), el cual está presente en la membrana plasmática de células gliales y participa en el ciclo glutamato-glutamina internalizando glutamato a éstas células. Así, estos dos transportadores funcionan de manera acoplada en la entrada de glutamato y salida de glutamina en células gliales regulando de forma muy precisa el funcionamiento de la sinapsis (Martínez-Lozada y col., 2013). El patrón de expresión encontrado en nuestros estudios, aunado con los datos previamente mencionados acerca de la función de SNAT3 en el transporte de glutamina durante la ontogenia, proponen que el aumento de expresión en las edades embrionarias justo antes de la eclosión, posiciona a este transportador como un elemento importante en el transporte y regulación de las concentraciones de glutamina en la sinaptogénesis, pero también en la maduración de la sinapsis asociada a su estricta regulación funcional.

En la mayoría de los casos la funcionalidad de una proteína se correlaciona con expresión de la misma, sin embargo no en todos los casos la expresión proteica correlaciona con la expresión génica, como es el caso particular de los transportadores VGlut (Boulland y col., 2004) y GLAST (Danbolt, 2001). Por lo

tanto, para complementar los datos de la cuantificación del ARNm de SNAT3 en la ontogenia de cerebelo de pollo, se realizó un estudio preliminar de la expresión de la proteína mediante un ensayo de inmunodetección en fase sólida. Los resultados muestran un aumento en la expresión en las edades E19 y E20, la cual correlaciona con los datos obtenidos en PCR tiempo real y con la cantidad de conexiones sinápticas presentes en este momento. Los resultados de este análisis preliminar nos indican que sí existe una correlación entre la expresión y la función del transportador en las edades embrionarias E19 y E20, remarcando la importancia del transportador como proveedor del precursor de los neurotransmisores y haciendo un énfasis en su función como regulador y sensor de otros factores importantes para el adecuado establecimiento en la sinapsis, ya que regula la concentración de iones Na^+ en el momento de transportar glutamina (Martínez-Lozada y col., 2013). Sería importante en trabajos posteriores valorar los niveles de expresión de este transportador en el modelo de pollo en edades posteriores a la eclosión, para comprobar si los datos publicados por Boulland y col., en 2003, en rata en los que se describe una cinética de expresión del transportador en forma de campana de Gauss con su máximo en P14 coincide con el máximo de la expresión en pollo en la edad gestacional E20, suponiendo que la maduración de la sinapsis en pollo se establece en este momento pero comienza a decaer en el nacimiento. Esto nos permitiría generar un modelo de más fácil manipulación y con un alto rendimiento en el aislamiento de neuronas y glías *in vitro* para avanzar con mayor rapidez en el conocimiento de la regulación funcional de estos transportadores.

Aunque SNAT3 no es el único transportador de glutamina reportado, su fina regulación y su patrón de expresión en la ontogenia realza su papel en el abastecimiento de glutamina en el cerebelo y particularmente en el establecimiento de la sinapsis.

7 CONCLUSIONES

- Los niveles de expresión del ARNm del transportador SNAT3 durante la ontogenia aumentan de forma estadísticamente significativa a partir de E16 hasta E20
- La proteína del transportador SNAT3 incrementa su expresión en las edades embrionarias E19 y E20
- Existe una correlación entre el aumento de la expresión del ARNm y el incremento de la proteína de SNAT3 en las edades embrionarias E19 y E20

8 REFERENCIAS

Armano S, Coco S, Bacci A, Pravettoni E, Schenk U, Verderio C, Varoqui H, Erickson JD, Matteoli M. Localization and functional relevance of system A neutral amino acid transporters in cultured hippocampal neurons. *JBC* **2002**;277:10467-10473.

Boulland J, Qureshi T, Seal RP, Rafiki A, Gundersen V, Bergersen LH, Fremeau RT Jr, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA. Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J comp neurol* **2004**;480:264-80.

Boulland J, Rafiki A, Levy L, Storm-Mathiesen J, Chaudhry F. Highly differential expression of SN1 a bidirectional glutamine transporter in astroglia and endothelium in the developing rat brain. *Glia* **2003**;41:260-275.

Bröer S, Brookes N. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *JNC* **2001**;77:705-719.

Bröer S, Schneider H, Bröer A, Deitmer J. Mutation of asparagine 76 in the center of glutamine transporter SNAT3 modulates substrate-induced conductances and Na⁺ binding. *JBC*. **2009**;284:25823-25831.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pffafel MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines minimum information for publication of quantitative real time PCR experiments. *Clin Chem* **2009**;55:612-622.

Campbell MK, Farrell SO. *Bioquímica*. 4^a edición. Washington: Thomson, **2003**:123.

Chaudhry F, Reimer R, Edwards R. The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *JCB* **2002**;157:349-355.

Conti F, Melone M. The glutamine commute: lost in the tube?. *Neurochem Int*. **2006**;48:459-464.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* **2001**;65:1-105.

Dahlin A, Royall J, Hohmann J, Wang J. Expression profiling of the solute carrier gene family in the mouse brain. *JEPT* **2009**;329:558-570.

Durán A, Rodríguez A, Martín P, Serrano M, Flores JM, Leitges M, Diaz-Meco MT, Moscat J. Crosstalk between PKCzeta and the IL4/Stat6 pathway during T-cell-mediated hepatitis. *EMBO J* **2004**;23:4595-605.

Fei Y, Sugawara M, Nakanishi T, Huang W, Wang H, Prasad P, Leinbach F, Ganapathy V. Primary structure, genomic organization, and functional and electrogenic characteristics of human system N1, a Na⁺ and H⁺ coupled glutamine transporter. *JBC* **2000**;275:23707-23717.

Fredriksson R, Nordström KJV, Stephansdönn O, Hägglund MGA, Schiöth HB. The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS* **2008**;582:3811-3816.

García O, Massieu L. Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal. *Arch Neurocién* **2004**;9:39-46.

Gibbs R. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry* **1990**;62:1202-1214.

Gras G, Samah B, Hubert A, Léone C, Porcheray F, Rimaniol A. EAAT expression by macrophages and microglia: still more questions than answers. *Amino Acids* **2012**;42:221-229.

Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiología Médica*. 11^a edición. Estados Unidos: Elsevier, 2006:620-638.

Hawkins R. The blood-brain barrier and glutamate. *Am J Clin Nutr* **2009**;90:867S-874S.

He L, Vasiliou K, Nebert D. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics* **2009**;3:195-206.

Hildebrand M. Anatomía y embriología de los vertebrados. México: Limusa, **1982**:439

Höglund PJ, Nordström KJV, Schiöth HB, Fredriksson R. The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of bilaterian species. *Mol Biol Evol* **2011**;28:1531-1541.

Institute of laboratory animal resources. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. **1999**.

Kardong K. Vertebrados: anatomía comparada, función y evolución. 4ª edición. España: Mc Graw Hill-Interamericana, **2007**: 158-648.

Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real time PRC. *J Appl Genetics* **2013**;406:54-391.

Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W, Schmitz G. Real time reverse transcription PCR expression profiling of the complete human ATP binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* **2003**;49:230-238.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL. Molecular cell biology, 4ª edición. Nueva York: WH Freeman, **2000**:87-92.

López-Bayghen E, Ortega A. Células gliales y actividad sináptica: control traduccional del acople metabólico. *Rev Neurol* **2010**;50:607-15.

López-Bayghen E, Ortega A. Glial glutamate transporters: new actors in brain signaling. *IUBMB Life* **2011**;63:816-823.

Mackenzie B, Erickson J. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* **2004**;477:784-795.

Mackenzie B, Schäfer M, Erickson J, Hedinger M, Weihe E, Varoqui H. Functional properties and cellular distribution of the system A glutamine transporter SNAT1 support specialized roles in central neurons. *JBC* **2003**;278:23720-23730.

Martínez-Lozada Z, Guillem AM, Flores-Méndez M, Hernández-Kelly LC, Vela C, Meza E, Zepeda RC, Caba M, Rodríguez A, Ortega A. GLAST/EAAT1 induced glutamine release via SNAT3 in Bergman glial cells: evidence of a functional and physical coupling. *JNC* **2013**;125:545-554.

Muñoz E, García X. Fisiología. células, órganos y sistemas. México: Fondo de cultura económica, **1998**; vol.2: 227-229.

Nakanishi T, Kekuda R, Fei Y, Takahiro H, Sugawara M, Martindale R, Leibach F, Prasad P, Ganapathy V. Cloning and functional characterization of a new subtype of the amino acid transport system N. *Am J Physiol Cell Physiol* **2001**;281:C1757-C1768.

National Center for Biotechnology Information. 2012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado. **1999.**

Pinilla J, Aledo JC, Cwiklinski E, Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. SNAT2 transceptor signalling via mTOR: a role in cell growth and proliferation?. *Front Biosci* **2011**;3:1289-99.

Rainer F, Ronald O. The development of synapses in the cerebellar cortex of the chick embryo. *JOC* **1974**;3:277-294.

Ramnani N. The primate cortico-cerebellar system anatomy and function. *NRN* **2006**;7:511-522.

Rogers L. The development of brain and behavior in the chicken. Reino Unido: Cab International, **1995**:4-5.

Romer A, Parsons T. Anatomía comparada. 5ª edición. México: Interamericana, **1981**:346-354.

Sambrook J, Russell D. Molecular cloning a laboratory manual. 3ª edición. New York: CSHL Press, **2001**;vol.3:A8.1.

Schneider H,;Bröer S, Bröer A, Deltmer JW. Heterologous expression of the glutamine transporter SNAT3 in *Xenopus* oocytes is associated with four modes of uncoupled transport. *JBC* **2007**;282:3788-3798.

Sundberg BE, Wååg E, Jacobsson JA, Stephansson O, Ruaks J, Svirskis S, Alsiö J, Roman E, Ebendal T, Klusa V, Fredriksson R. The evolutionary history and tissue mapping of amino acid transporters belonging to solute carrier families SLC32, SLC36, and SLC38. *J Mol Neurosci* **2008**;35:179-193.

Tortora G, Reynolds S. Principios de anatomía y fisiología. 9ª edición. Estados Unidos: Oxford, **2006**:384-413.

Umopathy NS, Dun Y, Martin PM, Duplantier JN, Roon P, Prasad P, Smith SB, Ganapathy V. Expression and function of system N glutamine transporters (SN1/SN2 or SNAT3/SNAT5) in retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2008**;49:5151-5160.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **2002**;7:1-12.

Whittow G. Sturkie's avian physiology. 5^a edición. Estados Unidos: Academic Press. **2000**:92-93.

Wong ML, Medrano JF. Real time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques **2005**;39:75-85