

03040

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
(NEUROBIOLOGÍA)**

**"TRANSPLANTE DE UNA LÍNEA CELULAR  
INMORTALIZADA PRODUCTORA DE GABA EN  
LA AMÍGDALA DE LA RATA ALBINA"**

Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias  
(Neurobiología) que presenta:

**Q.F.B. Claudia Gpe. Castillo Martín del Campo**

**Tutor:**

**Dra. Ma. Magdalena Giordano Noyola**

**Centro de Neurobiología  
Campus Juriquilla, Querétaro, Qro.**

Febrero, 2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Plasticidad Neuronal del Centro de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, bajo la dirección de la Dra. Ma. Magdalena Giordano Noyola. Durante la realización de este trabajo la alumna contó con una beca para estudios de posgrado (maestría) otorgada por CONACyT, así como una beca complementaria otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

Mi mayor gratitud a la Dra. Magda Giordano por haberme permitido trabajar en su laboratorio y brindarme su apoyo y comprensión, pero sobre todo su valiosa amistad.

A los miembros de mi Comité Tutoral, los doctores Raúl Paredes Guerrero, Alfredo Varela Echavarría y María Esther Jiménez Cataño, mil gracias por todos los comentarios y sugerencias realizados para esta tesis durante estos dos años de trabajo.

A la Q.F.B. Bertha Juárez por su ayuda en el procesamiento de muestras cromatográficas.

A la Bióloga María Soledad Mendoza Trejo por su gran apoyo técnico en el área del cuarto de cultivo.

Al Químico Andrés Falcón Alcantara por su apoyo técnico en el procesamiento bioquímico de las muestras, así como a la Unidad de Bioquímica Analítica por las facilidades prestadas.

Al M.C. Leopoldo González Santos por su asesoría técnica en el procesamiento de imágenes, de igual forma a todo el personal de la Unidad de Análisis de Imágenes por todo el apoyo prestado.

Al M.V.Z. José Martín García Servín encargado del bioterio por las facilidades prestadas.

A los miembros del Jurado de examen de grado, Dra. María Magdalena Giordano Noyola, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. José Segovia Vila, Dr. Alfredo Varela Echavarría y Dra. María Esther Jiménez Cataño, por sus útiles comentarios y sugerencias.

## DEDICATORIAS

A mis padres María Guadalupe y José Luis, por todo el amor, apoyo y comprensión que me han brindado sin condición alguna y quienes siempre me han alentado a seguir adelante para alcanzar mis metas. A ellos les dedico este trabajo desde lo mas profundo de mi corazón sin tener palabras para expresar mi agradecimiento.

A mis hermanos José Luis, Gabriel y Gerardo, por estar conmigo siempre y apoyarme incondicionalmente.

A mis maravillosos amigos Verónica Rodríguez, Wendy Herrera (lo logramos amiga!!!), Soledad Mendoza, Salomé Carreón, Rebeca Mejía, José Flores, Carlos Soria, Dra. Carrizales, Dinora Morales, Alejandra Flores, Norma Sánchez, Talina Cuervo, mil gracias por compartir conmigo momentos inolvidables y por su apoyo incondicionalmente. A todos ustedes les dedico este trabajo que significa mucho para mí porque es el término de un ciclo más en mi vida.

A mis compañeros del laboratorio Vero, Sol, Talina, Juan y Fernando, chicos es realmente un placer trabajar con ustedes, gracias por compartir conmigo su tiempo y sus conocimientos.

A todos mis maestros de la maestría, que aunque en muchas ocasiones me hicieron ver mi suerte, me brindaron los conocimientos necesarios para alcanzar esta meta.

**"No es la fuerza, sino la perseverancia de los altos sentimientos  
la que hace a los hombres superiores"**

**Friedrich Nietzsche**

## INDICE

RESUMEN.....	3
SUMMARY .....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. ANTECEDENTES .....	8
1. UTILIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES Y CÉLULAS INMORTALIZADAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS PARA TRANSPLANTES EN EL SNC .....	12
1.1. Estrategias para el desarrollo de líneas celulares utilizadas para trasplantes.....	13
1.2. Células neuronales troncales (Neural Stem Cells) y trasplantes.....	23
2. TÉCNICAS DE TRANSPLANTE.....	29
2.1. Trasplantes de tejido sólido.....	30
2.2. Trasplante de células en suspensión.....	31
3. ÁCIDO $\gamma$ -AMINO BUTIRICO (GABA).....	33
3.1. Distribución.....	33
3.2. Síntesis.....	35
3.3. GAD67 y GAD65.....	36
3.4. Liberación y recaptura.....	39
3.5. Receptores a GABA.....	40
4. ANATOMÍA DE LA AMÍGDALA.....	45
4.1. Características histoquímicas de la amígdala.....	48
III. JUSTIFICACIÓN.....	50
IV. HIPÓTESIS.....	52
V. OBJETIVOS .....	52
VI. MATERIAL Y METODOS.....	53
Animales.....	53
Cultivos Celulares.....	53
Pruebas de Liberación de GABA por alta concentración de $K^+$ .....	54

Determinación de GABA total .....	55
Transplantes .....	55
Histología .....	56
HPLC .....	57
<b>VII. RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
Histología .....	58
Determinación de GABA y glutamato por HPLC .....	66
Determinación de GABA y glutamato en cultivos .....	66
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>85</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>86</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>88</b>
APÉNDICE I. Preparación de las células a transplantar .....	88
APÉNDICE II. Conteo de células .....	89
APÉNDICE III. Soluciones amortiguadoras para pruebas de liberación de GABA y GABA total .....	91
APÉNDICE IV. Determinación de proteínas por el Método de Bradford .....	92
APÉNDICE VI. Técnica Inmunohistoquímica para Glutamato Descarboxilasa (GAD67) .....	95
APÉNDICE VII. Técnica Inmunohistoquímica para la Proteína Ácida Glial Fibrilar (GFAP) .....	96
APÉNDICE VIII. Preparación de soluciones comunes .....	97

## SUMMARY

Transplants of genetically modified cell lines represent a valuable tool in neurobiology and could be an alternative treatment for neurodegenerative disorders. The cell line M213-20 was immortalized using the tsA58 allele of the SV40 large T antigen (Giordano, et al., 1993; 1996) and later transfected with human GAD 67 cDNA using an Epstein-Barr virus-based plasmid vector (Conejero-Goldberg, et al., 2000). One of the subclones isolated (clone 4), produces large amounts of GABA for extended periods of time when kept in culture (Conejero-Goldberg, et al., 2000) and could be useful for intracerebral transplantation in epilepsy. The purpose of the present study was to transplant clone 4 into the basolateral amygdala of male Spraque-Dawley rats, and evaluate the changes in GABA content at different time points as well as the histological appearance of the transplants. The first group of animals received transplants of clone 4 (400,000/2 $\mu$ l), a group received transplants of clone control M213-20, one group received a sham transplant, and another group served as an intact control. The results showed a significant increase in GABA levels in the amygdala of transplanted rats only at 8-weeks after transplant. Histological analysis showed that the cells were present in all cases and showed a healthy appearance. At 12-weeks post transplant, the transplanted cells were localized not only in the amygdala but also along the external capsule. These results show that genetically modified cells can be used to deliver molecules of interest into specific brain nuclei.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## I. INTRODUCCIÓN

El aumento en la incidencia mundial de enfermedades neurodegenerativas aunado a la limitada capacidad del sistema nervioso central de regenerarse ha impulsado a muchos investigadores a la búsqueda y desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas que puedan restaurar el funcionamiento normal del cerebro. Dentro de estos modelos se encuentran los trasplantes de células. En la actualidad existe un considerable número de estudios en modelos animales que demuestran la sobrevivencia de los trasplantes de tejidos neuronales, así como su integración al cerebro al que fueron transplantados y su posible participación en la recuperación funcional después de un daño cerebral (Koutouzis, I.K. et al., 1994; Barry, D.I. et al., 1989; Giordano, M., Hagenmeyer-Houser, S.H. & Sanberg, P.R., 1988).

Sin embargo el uso de trasplantes como una herramienta clínica para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso en humanos aún plantea múltiples preguntas no sólo técnicas y científicas, sino de tipo ético, ya que la principal fuente de tejido para dichos injertos es el tejido fetal. Por esta razón es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de tejido (Giordano, M., Takashima, H., Poltorak, M., Geller, H.M. & Freed, W.J., 1996). Una de estas fuentes son las células provenientes de cultivo, que incluso pueden ser modificadas genéticamente para producir sustancias de interés.

En este trabajo se realizaron trasplantes de una línea celular inmortalizada de origen estriatal, M213-2O cl-4. Esta línea celular fue previamente inmortalizada utilizando el alelo A58 del antígeno T grande del virus Simian 40 (SV40) (Giordano, M. et al., 1993). Posteriormente fue transfectada con el cDNA del GAD67 humano utilizando como vector el virus de Epstein Barr (Conejero-Goldberg, C. et al., 2000). La línea celular obtenida (M213-2O cl-4) tiene como propiedad la liberación de grandes cantidades del neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Alteraciones en los

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

niveles normales de este neurotransmisor se relacionan con algunas enfermedades neurodegenerativas como la epilepsia y la enfermedad de Huntington (Cooper, J.R., Bloom, F.E. & Roth, R.H., 1996).

Dada la importancia de este neurotransmisor en el funcionamiento del sistema nervioso, el estudio del efecto de estas células al ser transplantadas y su integración al tejido huésped dará información sobre su posible uso en algunas patologías. Es por esto que se realizó una caracterización tanto histológica como neuroquímica del trasplante. Utilizando ratas albinas de la cepa *Sprague - Dawley* se hicieron trasplantes bilaterales de la clona M213-2O cl-4 en la amígdala basolateral. A la par se realizaron trasplantes falsos y trasplantes con células pertenecientes a una clona control que no contiene el transgén del GAD67h, pero que posee las mismas características morfológicas y estructurales (Giordano, M. et al., 1993; Conejero-Goldberg, C. et al., 2000). Se evaluó el trasplante tanto histológica como neuroquímicamente a tres diferentes tiempos postrasplante, con la finalidad de establecer cuando se integra el trasplante al cerebro huésped.

Nuestros resultados indican que el trasplante presenta una buena integración, comprobado por los análisis histológicos realizados, utilizando técnicas histoquímicas como la de violeta de cresilo e inmunohistoquímicas con anticuerpos contra la Proteína Acídica Glial Fibrilar (GFAP) y la Descarboxilasa del Ácido Glutámico (GAD). Este análisis también fue útil para demostrar que estas células, como ocurre con los trasplantes de células en suspensión, migraron a lo largo de la cápsula externa, alejándose del sitio de inyección sin producir gliosis en el tejido huésped. Esta migración se observó sobre todo en los cortes de los cerebros de las ratas con un tiempo postrasplante mayor. Tal vez esta sea una razón por la que el estudio neuroquímico del trasplante realizado en la amígdala disecada después del trasplante, no reveló diferencias significativas en el contenido de GABA en el grupo de ratas con un tiempo

postransplante de 12 semanas.

La importancia de este trabajo reside en que es la primera vez que se evalúa in vivo la producción de GABA por parte de un transplante de esta línea celular y que se hace una descripción histológica detallada del mismo. Esta evaluación es necesaria para determinar si la estrategia usada en la producción de esta clona es la apropiada, de manera que los trasplantes de estas células modifiquen significativamente el contenido de GABA en el tejido cerebral sin producir alteraciones en el tejido huésped.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## II. ANTECEDENTES

Los trasplantes neuronales son una técnica quirúrgica que tienen una amplia aplicación en la neurobiología moderna, ya que constituyen una poderosa herramienta para el estudio de la función del cerebro. Permitiendo evaluar los aspectos anatómicos y funcionales durante el desarrollo como la diferenciación y regeneración de diferentes sistemas neuronales, así como resaltar la importancia de estructuras o sistemas de neurotransmisión en diversas funciones o patologías (Emerich, D.F. & Granholm, L., 1998).

Aunque los trasplantes de tejido neuronal han sido ensayados esporádicamente en cerebros de mamíferos adultos desde el siglo XIX, sólo en los años setenta se llevaron a cabo bajo condiciones confiables. El primer reporte de trasplantes neuronales data de 1890, en ese estudio Thompson realizó trasplante de cortezas de gatos y perros, pero no observó una buena sobrevivencia de los tejidos transplantados (Gash, D.M., 1984; Dunnet, S.B., 1998).

El primer experimento que demostró la sobrevivencia de los tejidos transplantados fue el publicado por Elizabeth Hopkins Dunn (1917) (En: Gash, D.M., 1984). Hopkins Dunn realizó trasplantes de tejidos corticales fetales en el cerebro de ratas y observó la sobrevivencia de los trasplantes sólo en dos ocasiones. Con base en estos estudios se determinaron dos factores importantes que contribuyen a la sobrevivencia del tejido, el uso de tejido fetal y la utilización de aloinjertos (trasplante donde el donador es de la misma especie) (Gash, D.M., 1984; Dunnet, S.B., 1998). El tercer factor que interviene en la sobrevivencia del trasplante se identificó tiempo después: la importancia de seleccionar el lugar de la colocación del trasplante permitiendo la rápida vascularización e incorporación del nuevo tejido. Este tercer factor puede explicar el éxito de los casos estudiados por Dunn, ya que estos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

transplantes se realizaron en el ventrículo lateral permitiendo el contacto con la gran vascularización del plexo coroideo.

En 1940, Le Gros Clark en la Universidad de Oxford usando conejos de 15 a 20 días de gestación como fuente de tejido donante, realizó transplantes de porciones de corteza y las implantó en el ventrículo lateral del cerebro de conejos de 6 semanas de edad. Cuatro semanas después de la implantación realizó el análisis histológico y encontró evidencia de que las células transplantadas continuaban creciendo y diferenciándose. Le Gros Clark realizó también en 1942, el primer transplante de médula espinal en humanos (En: Gash, D.M., 1984).

Sin embargo, no es sino hasta la década de los setenta cuando se tuvo un mayor desarrollo en el estudio de los transplantes en el SNC. En esta década tres grupos independientes Olson y Malmfors (1970), Björklund y Stenevi (1971) y Das y Altman (1971) publicaron sus procedimientos de transplantes en el sistema nervioso central en el cerebro anterior, cerebelo, y en la cámara ocular anterior (En :Dunnet, S.B., 1998). Al final de esta década, Perlow y cols. (1979) utilizaron un modelo animal de la enfermedad de Parkinson y demostraron que el transplante de sustancia nigra fetal revierte las anomalías motoras de este modelo (En: Freed, W.J., 1993; Gash, D.M., 1984). En ese mismo año Björklund y cols (1979) encontraron una disminución en la conducta de rotación inducida por anfetamina gracias al transplante de sustancia nigra en cavidades corticales.

Durante los últimos años la utilización de transplantes del SNC se ha convertido en una técnica de amplia aplicación, incluso se plantean como una alternativa terapéutica para enfermedades degenerativas del SNC como el mal de Parkinson. Ignacio Madrazo y René Drucker-Colín (1986), llevaron a cabo los primeros transplantes en humanos utilizando como fuente del transplante la glándula suprarrenal con

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

resultados positivos. Estudios recientes han demostrado que estos trasplantes son capaces de sobrevivir por largo tiempo en los pacientes, pero también sugieren que la mejoría clínica derivada de la intervención quirúrgica es contrarrestada por la continua pérdida de las neuronas dopaminérgicas del huésped (Brailowsky, S., 1998; Stein, D.G., Brailowsky, S. & Will, B., 1995). Recientemente Curt Freed y cols. (Freed, C.R. et al., 2001), realizaron trasplantes bilaterales de tejido mesencefálico embrionario en el putamen de pacientes que presentaban casos severos de Parkinson observando efectos relativamente benéficos sólo en pacientes jóvenes.

Actualmente la tecnología del trasplante intracerebral ha cambiado considerablemente. Su aplicación al tratamiento de los trastornos cerebrales en el hombre plantea todavía múltiples preguntas técnicas, morales y éticas, ya que una de sus fuentes es el uso de tejido fetal, por lo que sería ideal contar con una fuente alternativa de tejido para trasplantar (Giordano, M. et al., 1996). Entre las alternativas que se han explorado está el uso de tejido porcino (Fink, J.S. et al., 2000) y el uso de injertos de células modificadas genéticamente provenientes de cultivo y no de tejido donador autólogo o fetal, ya que estos últimos contienen múltiples tipos celulares y podría ser que algunas células establecieran conexiones aberrantes con el huésped o inhibieran, por ejemplo, sistemas que deberían seguir activos (Brailowsky, S., 1998; Stein, D.G. et al., 1995).

La utilización de estirpes o líneas celulares cultivadas para trasplantes intracraneales tienen muchas ventajas entre las que podemos mencionar: 1) se pueden caracterizar y manipular previamente al trasplante; 2) se pueden producir en gran cantidad con características muy específicas; 3) pueden ser utilizadas para múltiples trasplantes; en cada trasplante, se emplea material casi idéntico, lo cual permite una estandarización de los protocolos de un experimento a otro y 4) el uso de estas líneas celulares no implica un problema importante de ética.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Por último es importante decir que los trasplantes no siempre producen efectos benéficos. Existen reportes que indican anomalías fisiológicas o conductuales como resultado de los injertos intracerebrales. Entre las desventajas reportadas están las siguientes: a) obstrucción de la circulación del líquido cefalorraquídeo, produciendo hidrocefalia; b) destrucción del tejido cerebral del receptor por compresión; c) efectos tóxicos por liberación excesiva de aminoácidos excitadores; d) alteraciones de la barrera hematoencefálica generando el rechazo del injerto (Lewin, R., 1987). Además, como ya se explicó debido a que los trasplantes de tejido fetal contienen múltiples tipos celulares pueden generarse conexiones aberrantes que inhiban sistemas en el huésped que deberían estar activos. Pueden también formarse circuitos reverberantes excitadores indeseables que puedan ser origen de crisis epilépticas debidas al injerto (Lewin, R., 1987; Brailowsky, S., 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1. UTILIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES Y CÉLULAS INMORTALIZADAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS PARA TRANSPLANTES EN EL SNC

Como ya se mencionó anteriormente, los trasplantes en el SNC constituyen una poderosa herramienta de investigación básica que ayuda al entendimiento de las interrelaciones entre las células. De igual manera son útiles en el estudio de la diferenciación y regeneración de diferentes sistemas neuronales así como de algunos aspectos anatómicos y funcionales en el desarrollo (Emerich, D.F. & Granholm, L., 1998; Koutouzis, I.K. et al., 1994). Sin embargo, el uso de trasplantes de tejido fetal en la clínica se ve complicado por cuestiones de tipo práctico, moral y legal, por lo que sería ideal contar con una fuente alternativa de tejido para trasplatación. En este sentido se han desarrollado líneas celulares inmortalizadas que pueden servir como material para trasplantes. Los avances en la biología celular y molecular han brindado la posibilidad de diseñar diversos métodos por medio de los cuales se pueden alterar las características de las células de origen neuronal para que se puedan seguir dividiendo y seleccionar aquellas con características deseables (Giordano, M., Takashima, H., Poltorak, M., Geller, H.M. & Freed, W.J., 1994).

Sin embargo, hay ciertos puntos importantes que deben ser tomados en cuenta en el desarrollo de modelos de células genéticamente modificadas en el trasplante intracerebral. El primero es el nivel de expresión genética de la proteína de interés. Este debe ser suficiente para poder llevar a cabo el efecto fenotípico deseado y no causar efectos tóxicos en el tejido huésped. El segundo punto es que la sobrevivencia de las células implantadas depende de factores diversos como:

- Efectos de la infección viral con la que fueron modificadas las células.
- Daño celular producido por las condiciones de cultivo.
- Mecanismos de implantación celular.
- Falta de una adecuada vascularización.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- La respuesta inmune del huésped hacia las células o hacia el producto del gen que expresan estas células. (Gage, F.H. et al., 1990)

### **1.1. Estrategias para el desarrollo de líneas celulares utilizadas para trasplantes.**

Actualmente el desarrollo de la biología molecular y celular ha permitido a los investigadores el expandir y desarrollar líneas celulares en cultivo así como refinar los métodos usados para el trasplante neural permitiendo una mejor localización y sobrevivencia del trasplante.

En estudios de trasplantes puede utilizarse tejido embrionario el cual se transplanta directamente después de su disección y disgregación. Utilizando este mismo tejido se pueden obtener líneas celulares inmortalizadas y modificadas genéticamente para producir alguna sustancia química de interés y transplantarse posteriormente. Incluso se pueden realizar cultivos primarios a partir del tejido no embrionario, es decir del animal adulto, como por ejemplo tejido cutáneo, y posteriormente transfectar este cultivo primario con un vector que posea el gen de interés. Después del análisis de la expresión molecular del gen y su cuantificación, el tejido puede ser utilizado en trasplantes en el mismo individuo donador, disminuyendo la respuesta inmune hacia el trasplante y por tanto las drogas usadas para modular dicha respuesta (Schinstine, M. & Gage, F., 1993).

Existen diversas estrategias para generar las líneas celulares que pueden ser utilizadas para trasplantes, una de las cuales se mencionó anteriormente, en la que se utiliza tejido embrionario a partir del cual se obtienen cultivos primarios. Otra es el cultivo y clonación de células tumorales, ejemplos de estos incluyen: la línea celular PC12 derivada de feocromocitoma, la línea B16/C3 que proviene de melanoma murino, la línea IMR-32 derivada de neuroblastoma humano y la línea celular C6 obtenida de un

tumor glial de rata (Wainer, B.H. & Heller, A., 1992). Cada una de las líneas celulares anteriormente mencionadas ya ha sido usada en estudios de trasplantes cerebrales. Otra manera, es producir híbridos a partir de la fusión de células primarias con células tumorales, ejemplos de estas líneas son las derivadas de células mesencefálicas embrionarias de ratón y la línea celular N18TG2 derivada de neuroblastoma-glioma murino. Esta última estrategia tiene la desventaja de que las células tienen el potencial de ser tumorales. Estrategias más recientes incluyen el uso de técnicas genéticas para introducir un fragmento de DNA (cDNA) el cual codifica para una proteína, enzima o algún factor de crecimiento, estas células pueden ser también immortalizadas por la incorporación de genes immortalizadores, como por ejemplo el gen myc, el antígeno T grande de poliovirus y el antígeno T grande del virus Simian 40 (SV40) (Cepko, C.L., 1989; Jat, P.S., Cepko, C.L., Mulligan, R.C. & Sharp, P.A., 1986). Un ejemplo de estas células son las líneas celulares M213-2O cl-2 y M213-2O cl-4 producidas por Conejero, et al. (2000), las cuales fueron previamente immortalizadas por la incorporación del alelo tsA58 del antígeno T grande del SV40 (Giordano, M. et al., 1993; Giordano, M. et al., 1996).

Actualmente las técnicas de transferencia genética han tenido un gran avance que ha permitido desarrollar células genéticamente modificadas para ser usadas como pequeñas bombas biológicas de algunos factores terapéuticos. El criterio que debe ser utilizado para el desarrollo adecuado de células transformadas se discute a continuación (En: Thode, S., Raymon, H.K. & F.H., G., 1998).

El primer paso para el desarrollo de líneas celulares transformadas es la elección del área del cerebro y la etapa embrionaria óptima a la cual se van a obtener las células. La capacidad de estas células primarias de dividirse es clave para el éxito de la immortalización debido a que existe una mayor facilidad de integración de los vectores, sobre todo los virales, en estas condiciones (Giordano, M. et al., 1994). La tabla 1 muestra

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

los diferentes tipos celulares que pueden ser utilizados para trasplantes.

El siguiente paso es la selección del gen o transgén o combinaciones de transgenes más benéficos para el modelo que se quiera utilizar. Dichos transgenes serán usados para la inmortalización y en algunos casos para introducir genes que confieran propiedades extras a las células, como el producir ciertas enzimas o proteínas. Los dos genes más utilizados para la inmortalización de estas líneas celulares son el v-myc y el antígeno T grande del SV40 (Jat, P.S. et al., 1986). La elección de los transgenes que podemos introducir en estas líneas celulares se ha enfocado al estudio de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Huntington, Alzheimer o epilepsia, por lo que es necesario elegir correctamente dicho transgén de acuerdo con las características fisiopatológicas de la enfermedad. Este transgén puede codificar para alguna enzima clave que esté deficiente o alterada en dicha patología para ciertos factores tróficos o de crecimiento, entre otros (Thode, S. et al., 1998).

Un punto importante en la generación de líneas celulares es la elección de los vectores por los cuales se introducen los diferentes tipos de transgenes a dichas células. Existen fundamentalmente dos técnicas para introducir transgenes en células: un método biofísico o transfección y un método basado en la transducción por medio de vectores virales (Figura 1). Los vectores para transfecciones biofísicas, sólo necesitan los elementos necesarios para expresar el transgén insertado. La simplicidad de estos vectores es una ventaja, pero estos métodos tienen una baja eficacia en la transferencia genética. En contraste, los métodos que utilizan vectores virales (Tabla 2) (Wainer, B.H. & Heller, A., 1992) tienen la ventaja de una alta eficacia de infección. Estos sistemas de vectores necesitan contener toda la información necesaria para producir la infección viral además de los elementos transgénicos necesarios para la expresión del gen de interés. Los vectores retrovirales fueron los que se desarrollaron primero y han sido estudiados en gran detalle. Estos tienen la ventaja de una integración estable del ADN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

proviral al genoma de las células huésped, haciéndolos apropiados para la transferencia de genes en células en división. También pueden infectar células que no están en división pero su eficacia disminuye.

**TABLA 1. Tipos celulares que pueden ser usados en trasplantes Intracerebrales (Tomado de: Thode, S. et al., 1998).**

Tipo celular	Observaciones
<u>Células no neuronales primarias</u>	
Fibroblastos	Fácil manipulación in vitro; pueden ser derivadas del mismo huésped (tejido autólogo); sobreviven al trasplante; el problema es la expresión del transgén a largo plazo debido a la baja regulación de la transcripción.
Mioblastos	Fácil manipulación in vitro sólo si provienen de células fetales. Pueden sobrevivir al trasplante.
Astrocitos	Fácil manipulación in vitro; sobreviven al trasplante; se dispersan después de realizar el injerto.
<u>Células neuronales primarias</u>	
Adrenales	Pueden derivarse de tejido autólogo; pobre sobrevivencia después del trasplante.
Embrionarias	Buena sobrevivencia después del trasplante; forman contactos funcionales con el tejido del huésped.

Los vectores basados en adenovirus, virus adeno-asociados (AAV) o herpes virus son más convenientes para la infección de células postmitóticas. El vector viral AAV (Virus asociado a adenovirus), es un buen candidato para su uso en terapéutica, ya que hasta el momento no se conocen efectos patogénicos de este virus en humanos, además de que puede integrarse en sitios específicos del genoma de la célula huésped. Desafortunadamente para el uso de los vectores AAV, su eficacia es baja en la infección de células que no están en mitosis. Varios vectores adenovirales han sido usados para el desarrollo de células in vivo que codifican para tirosina hidroxilasa (TH). Esta enzima es

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

útil en modelos de la enfermedad de Parkinson que se basan en la lesión de las células dopaminérgicas con 6-OHDA; el trasplante de células que codifican para TH ha dado buenos resultados, por ejemplo se ha observado una disminución de la conducta de giro inducida por apomorfina después de 1-2 semanas de la inyección de las células (Horellou, P. et al., 1990; Gage, F.H. et al., 1990). Uno de los problemas con estos vectores es que la presencia de secuencias del virus tipo silvestre en el huésped, puede desencadenar una replicación patogénica emergente de partículas virales vía recombinación con las secuencias del virus usado como vector (Thode, S. et al., 1998). Esto sólo ha sido posible al reemplazar algunos genes adenovirales y así evitar una respuesta inmunológica del huésped.

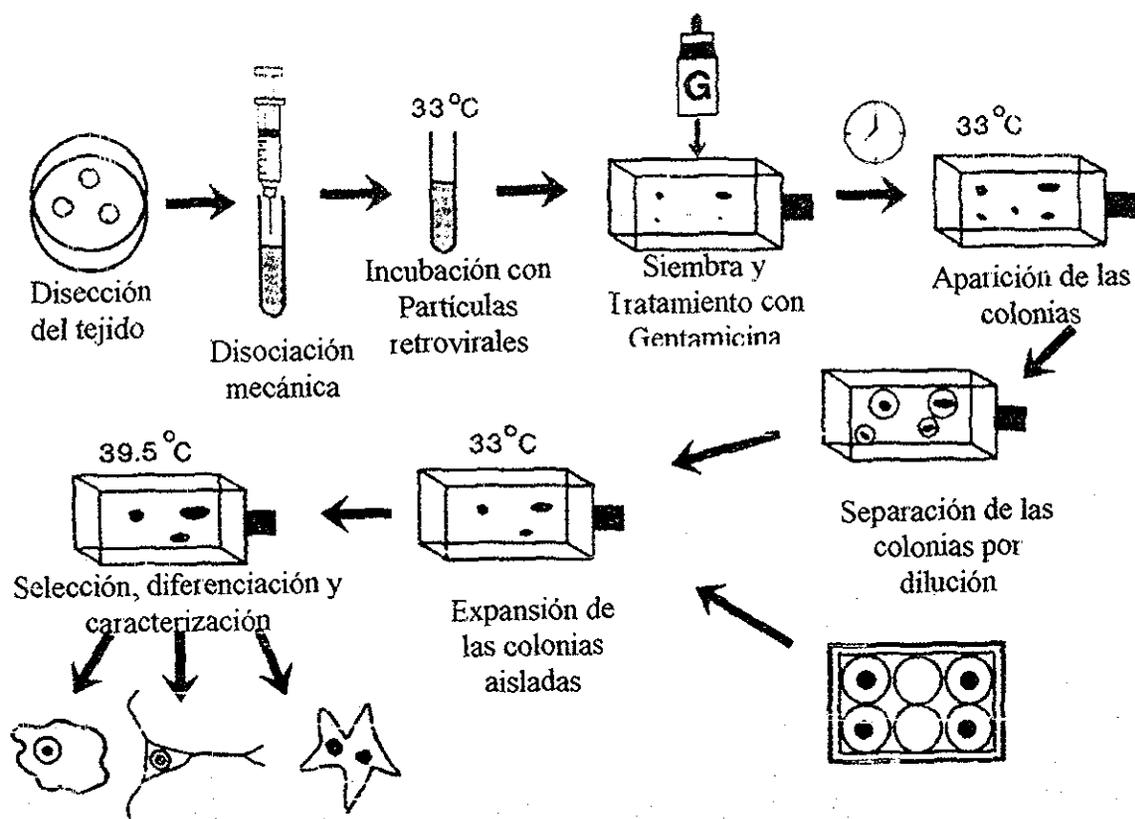


FIGURA 1. Procedimiento para la generación de líneas celulares inmortalizadas para su uso en trasplantes (Tomado de: Giordano, M. et al., 1994).

Los vectores basados en el virus Herpes-simplex (HSV) también pueden infectar células neuronales y no neuronales y expresar los transgenes funcionales. Pero al igual que con los vectores adenovirales, se han observado efectos de citotoxicidad y una respuesta inmune por parte del huésped; este es uno de los problemas que tiene que ser resuelto antes de usar estos vectores virales en el desarrollo de técnicas terapéuticas (Thode, S. et al., 1998).

El virus de Epstein-Barr es también utilizado como un vector viral episomal. Este vector posee una replicación extracromosomal en la célula, y mantiene su expresión por largos periodos de tiempo siendo útil para estudios de expresión de genes clonados y terapia genica (Mizuguchi, H., Hosono, I. & Hayakawa, T., 2000). Una línea celular que fue transfectada con este vector viral es la M213-2O cl-4 y cl-2 (Conejero-Goldberg, C. et al., 2000). En esta línea celular se utilizó este vector para la expresión del cDNA del GAD67h.

Recientemente se ha reportado el desarrollo de vectores virales utilizando lentivirus, como lo es el virus de inmunodeficiencia humana (HIV por sus siglas en inglés). La utilización de este vector excluye el problema de la presencia de secuencias virales del tipo silvestre en el huésped que pueden generar una respuesta inmune y efectos patológicos. Este vector representa una de las más complejas formas de retrovirus que puede infectar y transducirse de manera estable tanto en células en división (mitóticas) como en células diferenciadas (no mitóticas). Pero aún este sistema retroviral debe ser ampliamente estudiado debido al riesgo que conlleva el trabajar con el virus del HIV (Naldini, L. et al., 1996).

Uno de los puntos más importantes en el desarrollo de líneas celulares genéticamente transformadas para transplantes, es la regulación de la expresión del transgén, para poder obtener una expresión estable a largo plazo y mantener los niveles

adecuados del gen de interés, ya que existen reportes que indican que en muchas ocasiones en las líneas celulares transfectadas la expresión del transgén ya no sea la apropiada por una baja en la regulación de su transcripción (Snyder, E.Y. et al., 1992; Onifer, S.M., White, L.A., Whittemore, S.R. & Holets, V.R., 1993). Los niveles transgénicos pueden ser regulados de diferentes maneras: la eficacia de la vía de transcripción, estabilidad del ARN, eficiencia de la traducción y estabilidad de la proteína transgénica. Uno de los puntos más importantes en la regulación que tienen influencia sobre los niveles de la proteína codificada es el sistema de promotor usado para expresar el transgén.

Los promotores pueden ser agrupados en varias categorías como se observa en la Tabla 3. Los promotores virales generalmente permiten la expresión de altos niveles en las células mitóticas, pero pueden ser desactivados en células que ya no se dividen después del trasplante. Por el contrario, se pueden tener promotores derivados de los genes constitutivos de las células huésped (housekeeping genes) que se expresan a bajos niveles en todos los tipos celulares y en todos los estadios del ciclo celular. Otra categoría de promotores son aquellos que son tejido-específicos y que sólo permiten la regulación de la expresión del gen transfectado en un cierto tipo de células. Además se pueden tener sistemas de regulación de expresión formados por la combinación de diferentes promotores y potenciadores (enhancers). La elección del promotor óptimo para el sistema que se quiera estudiar es crucial para asegurar la producción de niveles biológicos relevantes del transgén así como asegurar su expresión a largo plazo después del trasplante.

**TABLA 2. Técnicas utilizadas para introducir transgenes en células destinadas para trasplante (En: Ithode, S. et al., 1998).**

Técnica	Observación: Ventajas/Desventajas
<u>Modelos Biofísicos</u>	
Fosfato de Calcio	Transfección de tipos celulares no neuronales in vitro; baja eficacia
Liposomas	Transfección de tipos celulares no neurales in vitro e in vivo; baja eficacia; el vector persiste como episoma no integrado en vivo.
Transferencia de genes mediado por receptores	Baja inmunogenicidad; posibilidad de transferir grandes fragmentos de ADN; puede ser utilizado en tejidos específicos; baja eficacia debido a la degradación de ADN
Inyección directa de DNA	Expresión sólo encontrada en células de músculo esquelético in vivo; el vector persiste como episoma no integrado.
Bombardeo de partículas	Baja eficacia, usada en diferentes tejidos; tipos celulares neurales y no neurales; el vector persiste como episoma no integrado
Electroporación	Aplicación de pequeños pulsos eléctricos de alto voltaje a células animales o vegetales formando poros nanométricos en la membrana plasmática permitiendo la entrada del ADN a transferir. Da lugar a líneas celulares que poseen una o muy pocas copias integradas del ADN transferido
<u>Vectores Virales</u>	
Retrovirus	Alta eficacia; integración al azar en el genoma de la célula huésped
MoMLV <sup>a</sup>	Infección sólo de células mitóticas
HIV <sup>b</sup>	Infección tanto en células que se están dividiendo como en aquellas que no lo están; la desventaja son los problemas en el manejo de este vector
Adenovirus	Alta eficacia; infección tanto en células que se están dividiendo como en aquellas que no lo están; persiste de manera episomal no integrada; reacciones inmunes debidas al virus cuando las células son transplantadas
AAV <sup>c</sup>	Baja eficacia; infección tanto en células que se están dividiendo como en aquellas que no lo están; interacción al azar en el genoma de la célula huésped
HSV <sup>d</sup>	Alta eficacia; persiste como episoma no integrado; reacciones inmunes; problemas de seguridad en el manejo de este vector.
Epstein-Barr	Vector episomal con replicación extracromosómica, mantiene su expresión por largos períodos y muy utilizado para el estudio de la expresión de genes clonadas y terapia génica

<sup>a</sup> MoMLV, Virus Moloney de leucemia murina

<sup>c</sup> AAV, Virus Adeno-asociado

<sup>b</sup> HIV, Virus de Inmunodeficiencia Humana

<sup>d</sup> HSV, Virus Herpes-simplex

**TABLA 3. Sistemas de Promotores usados para la regulación de la expresión transgénica (En: Thode, S. et al., 1998).**

Promotor	Observaciones: Ventajas/Desventajas
<b>Virales</b>	
LIR <sup>a</sup>	Forma parte del vector retroviral; altos niveles de expresión in vitro; expresión a largo plazo después del trasplante es deficiente.
CMV <sup>b</sup>	Altos niveles de expresión in vitro; expresión a largo plazo después del trasplante es deficiente.
SV40 <sup>c</sup>	Altos niveles de expresión in vitro; expresión a largo plazo después del trasplante es deficiente
HSV-TK <sup>d</sup>	Altos niveles de expresión in vitro
<b>Housekeeping genes</b>	
$\beta$ -Actina	Niveles intermedios de expresión in vitro
PGK <sup>e</sup>	expresión a largo plazo en bajos niveles después del trasplante
DHFR <sup>f</sup>	Bajos niveles de expresión in vitro expresión a largo plazo en bajos niveles después del trasplante
<b>Tejido-específicos</b>	
Preproencefalina	Específico solo para cierto tejido neuronal; expresión a largo plazo in vivo
$\beta$ -Globina	Específico de células linfáticas; bajos niveles de expresión in vitro
GFAP (gaf2)	Específico de astrocitos, utilizado para la expresión de genes de interés en estas células.
<b>Compuestos</b>	
LPV <sup>g</sup> /SV40	Niveles de expresión intermedio in vitro
MCK <sup>h</sup> /CMV	Bajos niveles de expresión in vitro; expresión a bajos niveles pero a largo plazo después del trasplante.
Tet O <sup>i</sup> /CMV	expresión en altos niveles in vitro; necesita un transactivador de tetraciclina; expresión a largo plazo después del trasplante

<sup>a</sup> LTR, Virus Moloney de la leucemia murina,

<sup>b</sup> CMV, Citomegalovirus gen de expresión temprana

<sup>c</sup> SV40, Simian virus, región de expresión temprana 40

<sup>d</sup> HSV-TK, Virus Herpes-simplex-timidina cinasa

<sup>e</sup> PGK, Fosfoglicerato cinasa

<sup>f</sup> DHFR, Dihidrofolato reductasa

<sup>g</sup> LVP, Papovavirus linfático

<sup>h</sup> MCK, Creatin cinasa muscular

<sup>i</sup> Tet O, operador de tetraciclina

Uno de los genes más estudiados para controlar la actividad del gen transfectado es el alelo tsA58 sensible a la temperatura del antígeno T grande SV40 (tsA58). La expresión de éste mutante confiere a las células la capacidad de proliferar cuando se mantienen a una temperatura de 33°C, pero cuando son incubadas a una temperatura mayor (39°C) dejan de proliferar. Estas células, pueden mantenerse en constante proliferación en cultivos celulares a temperaturas bajas, pero después del trasplante podrían diferenciarse y desarrollarse en neuronas maduras en el cerebro adulto. Whittmore et al. (1991) han mostrado que células neuronales embrionarias immortalizadas pueden desarrollar un complejo fenotipo neuronal que es en parte determinado por el área del cerebro al cual se va transplantar independientemente del área de la que originalmente deriven.

Finalmente, las células que fueron modificadas deben ser seleccionadas y caracterizadas. Para esto el vector de immortalización acarrea un gen de resistencia a un cierto fármaco, como lo es el gen de resistencia a neomicina, seleccionándolas de toda la población celular. Una vez que se seleccionaron las células modificadas, éstas pueden ser posteriormente clonadas para producir sustancias específicas, como neurotransmisores o factores tróficos en grandes cantidades, usando los vectores antes mencionados. Existen diferentes técnicas inmunohistoquímicas, que nos permiten caracterizar las clonas obtenidas (Giordano, M. et al., 1996).

De particular interés es la línea celular M213-20 de origen estriatal obtenida a partir de cultivos primarios de estriado de ratas *Sprague -- Dawley* (día embrionario 14), que fue immortalizada usando el Alelo A58 sensible a temperatura del antígeno T grande del SV40, en presencia de polibreno; se usó la línea celular empacadora  $\psi$ -2 para la replicación del vector previa a la transfección. La línea M213-20 tiene propiedades GABAérgicas comprobadas por su inmunoreactividad a GAD, por recaptura de GABA y por la síntesis de dicho neurotransmisor. Son positivas para la proteína asociada a

microtubulina-2 (MAP-2), un marcador primario neuronal, y negativas para vimentina y poseen una morfología multipolar (Giordano, M. et al., 1993). En estudios previos se encontró que estas células muestran un mínimo potencial tumorigénico en trasplantes (Giordano, M. et al., 1996)

Estas mismas células fueron posteriormente transfectadas con el cDNA del glutamato descarboxilasa (GAD67) humano usando como vector un plásmido episomal basado en el virus de Epstein-Barr. Una de las clonas resultantes (M210-20 cl-4), presentó una alta expresión de la GAD transgénica, una mayor síntesis de GABA y experimentan apoptosis en respuesta a fármacos anticancerígenos (Conejero-Goldberg, C. et al., 2000). Estas células son potencialmente útiles en modelos donde existe deficiencia del neurotransmisor GABA, como lo son en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas como la Epilepsia, o la enfermedad de Huntington entre otras.

## **1.2. Células neuronales troncales (Neural Stem Cells) y trasplantes.**

Los recientes avances en la tecnología de células troncales nos han proporcionado una nueva herramienta para la generación de líneas celulares que pueden ser utilizadas en procesos de regeneración y trasplantes. Su uso actualmente no se limita a trabajos de laboratorio. Tejido cultivado de piel, hueso y cartílago están siendo probados en investigación clínica y podrán ser utilizados como tratamiento en pocos años (Heath, C. A., 2000).

De igual manera se han desarrollado células neuronales troncales generando un gran interés por su potencial aplicación terapéutica en el SNC. Estas células pueden ser aisladas de tejido en desarrollo e incluso en el sistema nervioso central de animales

adultos y ser posteriormente expandidos en cultivo manteniendo su capacidad de diferenciarse en una gran variedad de fenotipos celulares (Chandran, S. & Svendsen, C.N., 2000; Gage, F.H., 2000).

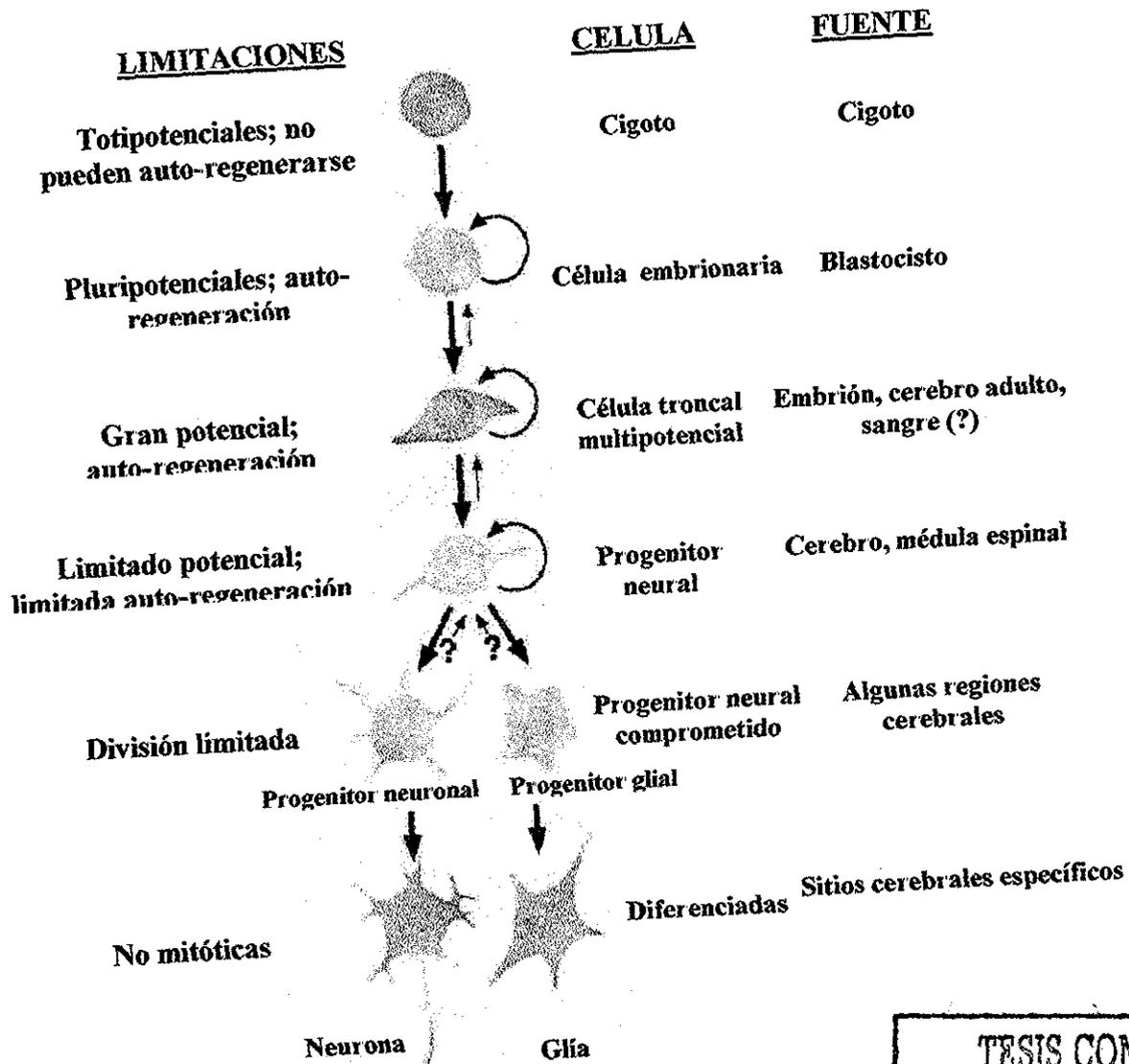
Se define como célula neuronal troncal aquella célula que tiene la potencialidad de regenerarse a sí misma y además diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos por medio de una división asimétrica. (Figura 2) (Gage, F.H., 2000; McKay, R., 1997). Sin embargo, las células troncales neurales pueden también derivarse de células más primitivas y tener la capacidad de generar no sólo células neurales sino también generar células de otros tejidos. Existen diferentes clases de células troncales en mamíferos con diferentes capacidades de diferenciación: a) totipotenciales, son aquellas que al ser implantadas en útero da lugar a un organismo completo, su fuente es el cigoto; b) pluripotenciales, su fuente es el blastocisto, tiene la capacidad de regenerarse y además diferenciarse en células multipotenciales, son usadas también en la generación de animales transgénicos; c) multipotenciales, con alta capacidad en diferenciarse en células progenitoras, su fuente principal son tejido embrionario o tejido neuronal adulto y médula ósea.

En el sistema nervioso embrionario se han encontrado células troncales en la corteza cerebral, estriado, hipocampo y médula espinal. En el cerebro adulto existen dos áreas de donde se han aislado células troncales identificadas utilizando técnicas con infección retroviral o usando timidina marcada radiactivamente o bromodeoxiuridina (BrdU) por técnicas inmunohistoquímicas (Lundberg, C., Martínez-Serrano, A., Cattaneo, E., McKay, R.D.G. & Björklund, A., 1997; Sigal, S.H., Brill, S., Fiorino, A.S. & Reid, L.M., 1992; Shihabuddin, L.S., Palmer, I.D. & Gage, F.H., 1999). Una de ellas es la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y la otra es la zona subventricular (SVZ) (Shihabuddin, L.S. et al., 1999; Temple, S. & Alvarez-Buylla, A., 1999; Svendsen, C.N. & Smith, A.G., 1999). Aún no se conoce la función de las células troncales en el

sistema nervioso central del adulto, se ha sugerido que estas células son vestigios evolutivos de organismos más primitivos, en los cuales los órganos y tejidos tienen la capacidad de regenerarse y sobrevivir teniendo ventajas adaptativas en un ambiente inhóspito. Otra alternativa que se ha sugerido es que para el SNC es importante tener una capacidad limitada de regeneración para desarrollar sus funciones normales como el aprendizaje y la memoria. Es posible que la regeneración local de nuevas neuronas en algunas estructuras cerebrales pueda participar en la formación e integración de la memoria (Gage, F.H., 2000; Shors, I.J. et al., 2001).

Se pueden obtener cultivos de células troncales para su estudio *in vitro*, o incluso para diferenciarlas y usarlas en diversos modelos experimentales. El primer paso es la disección del área anatómica cerebral ya sea de tejido embrionario o adulto. Dicho tejido es disgregado y expuesto a altas concentraciones de mitógenos como el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Villa, A., Snyder, E.Y., Vescovi, A. & Martínez-Serrano, A., 2000; Gage, F.H., 2000). Cuando ya se tiene establecido el cultivo es necesario identificar las células troncales, para esto se han utilizado algunos marcadores específicos como lo es la nestina. La nestina es un filamento intermedio y es la principal proteína del citoesqueleto en las células precursoras neuronales en el sistema nervioso central y sólo se expresa en ciertas etapas del desarrollo, ya que cuando la célula ya se ha diferenciado la expresión de esta proteína baja drásticamente (Cattaneo, E. & McKay, R., 1991; McKay, R., 1997). También la presencia de CDC2 y ciclina, las cuales juegan un papel central en la regulación del crecimiento celular tienen una expresión similar a la nestina en el desarrollo de las células cerebrales (Cattaneo, E. & McKay, R., 1991).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 2. Diferentes clases de células troncales que pueden dar lugar a neuronas, así como su fuente y limitaciones (Tomado de: (Gage, F.H., 2000)).

Después de la selección, purificación y proliferación de las células troncales puede inducirse la diferenciación con mitógenos específicos o por exposición a otros factores que induzcan los diferentes linajes. Las líneas resultantes son analizadas inmunohistoquímicamente utilizando anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos para los diferentes tipos celulares, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Gage, F.H., 2000; Rouget, P., Bert, M., Borde, I. & Evrard, C., 1992). El uso de estas células en cultivo tiene diversas aplicaciones como: a) el ser utilizadas para la identificación de factores inductivos y mediadores en la neurogénesis; b) el ser utilizadas en modelos de neurodegeneración in vitro; c) el ser empleadas en el desarrollo de nuevos fármacos: d) útiles en terapia génica ex vivo, entre otras (Svendsen, C.N. & Smith, A.G., 1999).

Actualmente muchos estudios se han enfocado al estudio de estas células en vertebrados, para caracterizar su potencial in vivo al utilizarlas como fuente para trasplantes (Gaiano, N. & Fishell, G., 1998). Estas células pueden ser estudiadas en trasplantes cerebrales bajo tres diversas condiciones experimentales: en animales en desarrollo, en el cerebro adulto intacto y en el cerebro lesionado. En el cerebro en desarrollo, se han utilizado para probar la capacidad de estas células para desarrollarse en los diferentes tipos celulares neurales no solo a nivel central, sino también observar su migración e integración en el sistema nervioso periférico (Gage, F.H., 2000; Renfranz, P.J., Cunningham, M.G. & McKay, R.D., 1991).

Existen reportes de trasplantes en cerebro adulto que indican que estas células troncales pueden diferenciarse en células neuronales y glía dependiendo del ambiente local (en cuanto a factores tróficos) así como de la región anatómica donde fueron transplantadas. Es decir estas células troncales se diferenciarán sobre todo en células neuronales si se transplantan en los sitios neurogénicos, como hipocampo y SVZ, pero al ser transplantadas en sitios no neuronales la proporción de diferenciación en células neuronales es muy baja o sólo se diferenciarán en células gliales (Gage, F.H., 2000;

Renfranz, P.J. et al., 1991; Fricker, R.A. et al., 1999; Svendsen, C.N. et al., 1997; Suhonen, J.O., Peterson, D.A., Ray, J. & Gage, F.H., 1996; Lundberg, C. et al., 1997). Sin embargo existen también estudios sobre la integración y diferenciación neuronal en transplantes de células troncales humanas en el estriado y sustancia nigra de rata, sitios que no son considerado neurogénicos, donde se observó una buena proporción de diferenciación neuronal (Rubio, F.J., Bueno, C., Villa, A., Navarro, B. & Martínez-Serrano, A., 2000). Se han realizado otros experimentos con estas células en los cuales previamente se ha lesionado a los animales, y se ha observado que las células transplantadas migran al área de lesión diferenciándose y remplazando a las neuronas que fueron dañadas (Yandava, B.D., Billingham, L.L. & Snyder, E.Y., 1999; Armstrong, R.J., Watts, C., Svendsen, C.N., Dunnett, S.B. & Rosser, A.E., 2000; Snyder, E.Y. et al., 1992).

Los estudios realizados hasta el momento usando estos tipos celulares, apoyan su posible uso y aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y lesiones del sistema nervioso central. Y aunque aún falta mucho por conocer sobre estas células, es muy posible que en pocos años puedan ser ampliamente aplicadas en el tratamiento clínico de múltiples enfermedades.

## 2. TÉCNICAS DE TRANSPLANTE

Los métodos que se utilizan en la actualidad para el transplante en el cerebro o en la médula espinal deben mucho a las técnicas clásicas de microdissección y de transplante utilizadas en embriología y endocrinología.

Existen diferentes técnicas para realizar los trasplantes intracraneales entre las cuales se encuentran el uso de tejido en bloque, células semidisociadas, y células disociadas provenientes de tejido o de cultivo (Figura 3) (Björklund, A. & Dunnet, S.B., 1992). La elección del método a utilizar depende del propósito del experimento así como del tejido utilizado para el transplante.

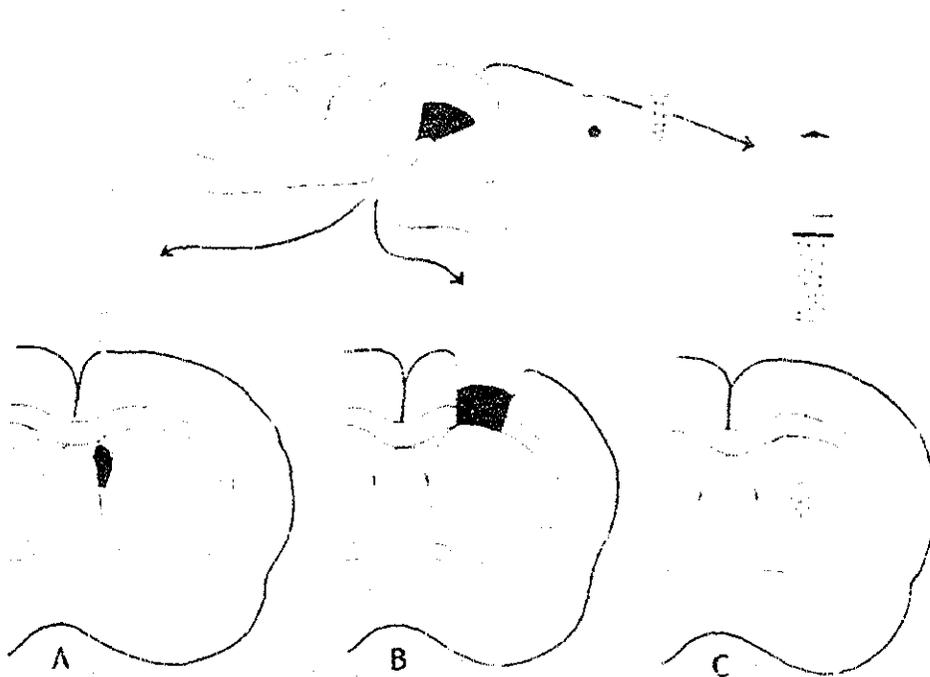


FIGURA 3. Diferentes técnicas utilizadas para la realización de trasplantes en el sistema nervioso central. A) Tejido en bloque en una cavidad natural como los ventrículos, B) Tejido en bloque en una cavidad creada quirúrgicamente y C) Transplante de células en suspensión.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.1. Transplantes de tejido sólido.

Los transplantes de tejido en bloque son los más clásicos, Elizabeth Hopkins Dunn (1917) y LeGros Clark (1940) , quienes fueron pioneros en el uso de transplantes en el sistema nervioso, utilizaron esta técnica (En: Gash, D.M., 1984). El tejido en bloque es comúnmente usado para injertos en ratas neonatas. En adultos, los tejidos sólidos son usados para transplantes en cavidades creadas quirúrgicamente (injerto en el parénquima), o en cavidades naturales como lo son los ventrículos cerebrales, así como transplantes en la cámara anterior del ojo (Björklund, A. & Dunnet, S.B., 1992; Dunnet, S.B., 1998).

Los transplantes en la cámara anterior del ojo poseen la mismas ventajas inmunológicas de los transplantes neurales, además el iris es un sitio de buena vascularización por lo que la sobrevivencia del transplante es buena. Una de las ventaja de esta técnica es que el transplante puede ser observado directamente a través de la córnea (Olson, L., Björklund, A. & Hoffer, B.J., 1984).

En cuanto a los transplantes de tejido sólido realizados en cavidades naturales, los ventrículos lateral, tercero y cuarto proveen de un buen sitio para la sobrevivencia del implante, ya que poseen una buena vascularización por la presencia del plexo coroideo. La desventaja de esta técnica de transplante es que se corre el riesgo de producir hidrocefalia si algún fragmento del transplante obstruye los acueductos ventriculares (Dunnet, S.B., 1998).

Los transplantes en cavidades creadas quirúrgicamente han sido utilizados en hipocampo, neocorteza y cerebelo. La cavidad se crea por la aspiración del tejido que se encuentra sobre la estructura en la que se realizará el transplante, generalmente parte de

la corteza cerebral. La cirugía para crear la cavidad se lleva a cabo con semanas de anticipación al trasplante o puede realizarse simultáneamente al injerto según el propósito del experimento (Dunnet, S.B., 1998; Björklund, A. & Dunnet, S.B., 1992). La desventaja de esta metodología es el daño que se genera en el tejido huésped, ya que en muchos casos puede dar lugar a necrosis.

En general esta técnica de trasplante es utilizada en experimentos que tiene la finalidad de estudiar los efectos de la liberación no regulada de neurotransmisores o factores tróficos, así como para observar las características de reinervación, diferenciación e integración sobre todo en trasplantes en neocorteza y cerebelo (Giordano, M. & Freed, W.J., 1995).

## **2.2. Trasplante de células en suspensión.**

Otra técnica usada más recientemente en trasplantes es el uso de células en suspensión. Dichas células pueden provenir de tejido embrionario o de cultivo. Cuando la fuente del trasplante es tejido embrionario debe darse un tratamiento enzimático previo para la disociación de las células, generalmente se utiliza tripsina u otras enzimas digestivas que rompen las uniones intercelulares.

La inyección de estas células se realiza estereotáxicamente utilizando jeringas con un diámetro apropiado para no dañarlas, generalmente se utilizan jeringas Hamilton de 10  $\mu$ l. El volumen de cada depósito varía de 1-4  $\mu$ l y la concentración celular puede ser de 200,000 a 2 millones de células. La inyección se realiza lentamente a lo largo de varios minutos.

Esta técnica posee varias ventajas sobre la técnica de trasplante de tejido sólido: a) pueden realizarse trasplantes en cualquier sitio del parénquima del huésped; b) se

pueden realizar trasplantes múltiples, ya que el daño al tejido huésped es mínimo; c) usa precisión esterotáxica por lo que lo hace más reproducible; d) pueden realizarse trasplantes que incluya el tejido de varios donadores, de esta manera en cada trasplante se emplea material casi idéntico; e) puede manipularse la fuente de trasplante previamente a la inyección, seleccionando un solo tipo celular, modificando las células genéticamente o simplemente marcándolas para su posterior identificación; f) puede efectuarse un recuento celular y calcular la viabilidad celular en la suspensión (Giordano, M. & Freed, W.J., 1995; Dunnet, S.B., 1998; Björklund, A. & Dunnet, S.B., 1992).

La desventaja de esta técnica es que el grado de dispersión de las células del sitio de inyección es muy grande, pero esto puede solucionarse al utilizar soluciones de medios semisólidos que pueden servir como soporte de las células o realizando un marcaje de las células previo al trasplante para poder delimitarlo (Giordano, M. & Freed, W.J., 1995; Brailowsky, S., 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3. ÁCIDO $\gamma$ -AMINO BUTÍRICO (GABA)

El ácido  $\gamma$ -amino butírico es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central de mamíferos. Fue descubierto en 1950 por Roberts y Awapara (En (Cooper, J.R. et al., 1996). Estudios electrofisiológicos entre 1950 y 1965 demostraron el papel de GABA como neurotransmisor en el sistema nervioso central de mamíferos. Se considera que GABA cumple con los cinco criterios básicos para ser un neurotransmisor:

- a) está presente en la terminal nerviosa,
- b) se libera por la estimulación eléctrica de las neuronas,
- c) tiene un mecanismo de liberación y recaptura comprobado en forma directa por su aplicación a las neuronas,
- d) posee una acción inhibitoria de la estimulación eléctrica,
- e) existen receptores específicos para esta sustancia química.

La actividad GABAérgica está involucrada en una gran variedad de funciones biológicas como la actividad locomotora, el aprendizaje, la reproducción y los ciclos circadianos (Soghomonian, J.J. & Martin, D.L., 1998). Existe evidencia que sugiere una alteración funcional GABAérgica en los desórdenes psiquiátricos y neurológicos, que incluyen la corea de Huntington, epilepsia, alcoholismo, esquizofrenia, desórdenes del sueño, y la enfermedad de Parkinson. Además las manipulaciones farmacológicas de la transmisión GABAérgica son un tratamiento efectivo de la ansiedad. La acción anestésica de los barbitúricos resulta de la inhibición de la transmisión sináptica mediada por los receptores GABA<sub>A</sub> (Cooper, J.R. et al., 1996; DeLorey, T.M. & Olsen, R.W., 1994).

#### 3.1. Distribución

En mamíferos, GABA se encuentra en altas concentraciones en el cerebro y la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

médula espinal, pero está presente sólo en cantidades traza en tejidos nerviosos periféricos como el nervio ciático. También existe periféricamente en órganos como páncreas, riñón y sistema reproductivo femenino (Erdo, S.L. & Bowery, N.G., 1986). GABA no atraviesa la barrera hematoencefálica por lo que su administración periférica no aumenta la concentración cerebral de este neurotransmisor.

La concentración de GABA en el sistema nervioso central está en orden de  $\mu\text{M/g}$ . En la rata la lámina cuadrigémina y regiones diencefálicas son las que contienen la mayor concentración GABAérgica, mientras que el cerebelo, puente y bulbo raquídeo tienen las menores concentraciones de este neurotransmisor.

Los niveles de GABA se incrementan rápidamente *posmortem*, entre un 30 y un 40% durante los primeros 2 minutos después de la muerte, si el tejido no es instantáneamente congelado. La razón de este incremento es incierto pero se cree que resulta en parte por la activación pasajera de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD).

Existe un incremento progresivo en los niveles de GABA y de la actividad de la enzima GAD en varias regiones del cerebro durante el desarrollo y existe una correlación positiva entre la actividad de esta enzima y los niveles de GABA en el cerebro. Este no es el caso de la enzima GABA-transaminasa encargada de la degradación de GABA ya que, por ejemplo, en la sustancia nigra y el globo pálido donde existen altas concentraciones de GABA, hay una baja actividad de la GABA transaminasa. Pero en otras regiones como el núcleo dentado, y los colículos inferiores las altas concentraciones de GABA se relacionan con mayor actividad de la GABA transaminasa (Cooper, J.R. et al., 1996; Sheikh, S.N., Martin, S.B. & Martin, D.L., 1999).

### 3.2. Síntesis

La síntesis de GABA constituye un proceso cíclico con el doble propósito de producir y conservar los niveles de GABA. El primer paso en la formación de GABA es la transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato, formado por el metabolismo de la glucosa en el ciclo de Krebs, por la  $\alpha$ -oxoglutarato transaminasa (GABA-I, GABA transaminasa) dando como producto el ácido glutámico. El ácido glutámico es descarboxilado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) generando finalmente GABA. De la enzima GAD se han encontrado dos isoformas la GAD 65 y la GAD 67 ; ambas producen GABA y están codificadas en diferentes genes. El pH óptimo de acción de esta enzima es de 6.5 y requiere de fosfato de piridoxal (vitamina B<sub>6</sub>) como coenzima. La enzima GAD purificada es inhibida por análogos estructurales de glutamato, reactivos con grupos sulfhidrilo, compuestos de tioles y aniones como el cloro.

GABA es metabolizado por la GABA -T hasta semialdehído succínico, el cual puede ser oxidado por la enzima deshidrogenasa de semialdehído succínico a ácido succínico y así volver a reentrar al ciclo de Krebs. La GABA-T tiene un pH óptimo de acción de 8.2 y también requiere del fosfato de piridoxal como coenzima (Figura 4).

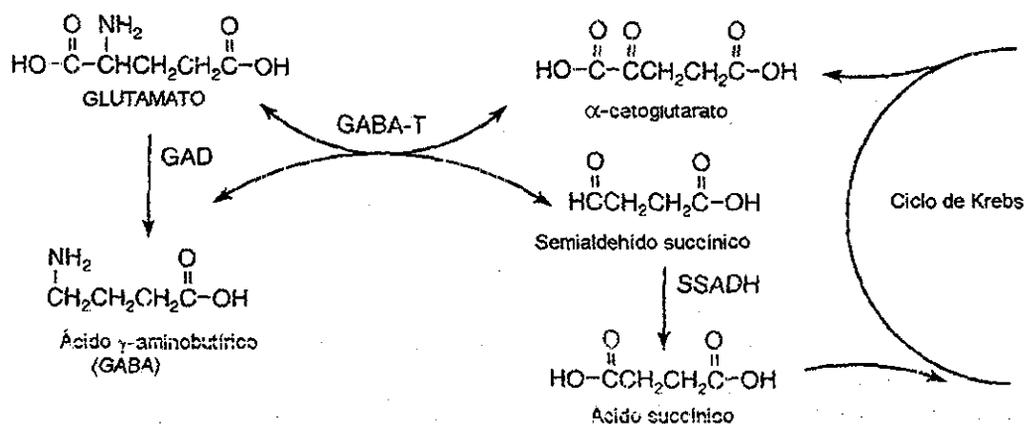


FIGURA 4. Reacciones de síntesis, conservación y metabolismo de GABA (Tomado de : DeLorey, T.M. & Olsen, R.W., 1994)

### 3.3. GAD67 y GAD65

La síntesis de GABA es un proceso altamente regulado (Spink, D.C., Porter, I.G., Wu, S.J. & Martin, D.L., 1987; Chan, S.O., Lyman, W.D. & Chiu, F.C., 1997). En el cerebro GABA es sintetizado a partir de glutamato en una reacción de un solo paso catalizada por la glutamato descarboxilasa, siendo esta la enzima limitante en la síntesis de GABA.

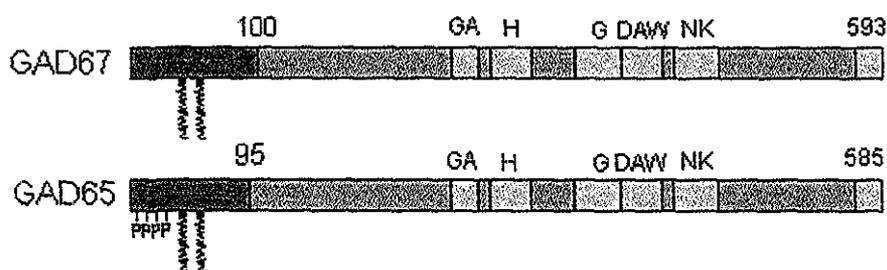
Estudios utilizando métodos de biología molecular han mostrado que en el cerebro adulto existen dos isoformas distintas de GAD, llamadas GAD65 y GAD67 (nombradas así según sus pesos moleculares, de aproximadamente 65000 y 66600 Da respectivamente) las cuales son producto de dos genes independientes localizados en los cromosomas 2 y 10 respectivamente, en humanos (Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J., Feldblum, S., Patel, N. & Tobin, A.J., 1991; Soghomonian, J.J. & Martin, D.L., 1998). Estudios anatómicos muestran que los dos genes de GAD se coexpresan en las neuronas GABAérgicas del SNC (Esclapez, M., Tillakaratne, N.J., Kaufman, D.L., Tobin, A.J. & Houser, C.R., 1994; Soghomonian, J.J. & Martin, D.L., 1998). Estas isoformas de GAD tienen una secuencia de aminoácidos muy similar (Figura 5) pero tienen diferentes propiedades cinéticas y afinidad con el cofactor así como una distribución celular diferente (Kaufman, D.L., Houser, C.R. & Tobin, A.J., 1991; Chan, S.O. et al., 1997).

Se ha demostrado por hibridización in situ que el mRNA de GAD65 se expresa en mayor proporción en el sistema visual, mientras que el mRNA de GAD67 es abundante en neocorteza, placa granular del bulbo olfatorio, septum medial y lateral, globo pálido, colículo inferior y corteza cerebral (Chan, S.O. et al., 1997).

La distribución intracelular de las proteínas de GAD es también distinta. La

proteína GAD65 pero no la GAD67, co-localiza con la sinaptofisina y aparentemente está asociada con las vesículas sinápticas (Chan, S.O. et al., 1997; Kaufman, D.L. et al., 1991). GAD65 parece estar relacionada con la unión a membranas y sobre todo en terminales nerviosas, mientras que GAD67 está más ampliamente distribuida a nivel citoplasmático en las células. Ambas formas sintetizan GABA pero GAD67 sintetiza preferentemente el GABA citoplásmico y se relaciona con las sinapsis no convencionales (llevadas a cabo entre dendritas) mientras que GAD65 sintetiza el neurotransmisor que va a las vesículas sinápticas. Existe evidencia que sugiere que estas dos formas juegan diferentes papeles en la codificación de la información GABAérgica en las neuronas (Soghomonian, J.J. & Martin, D.L., 1998)

Ambas isoformas están compuestas por dos dominios: uno altamente divergente que es el dominio N-terminal (con 23% de homología) que está involucrada con la asociación a la membrana y las interacciones heteroméricas y otro dominio mucho más grande y más conservado (73% identidad) que es el C-terminal que contiene el centro catalítico (Figura 5).



**FIGURA 5.** Comparación entre las dos isoformas de GAD. El dominio N terminal (en rosa) presenta una identidad del 23% y se relaciona con el reconocimiento del sustrato; es comparable en ambas enzimas ya que sólo difieren en la sección fosforilada que presenta la GAD65, que se involucra con la asociación a membranas. El sitio catalítico de la enzima se localiza en el dominio C-Terminal (en azul) tiene un 73% de identidad y es el más conservado. Contiene seis motivos (en amarillo) que están estructuralmente conservados en ambas enzimas y se relacionan con la dependencia al cofactor fosfato de piridoxal (tomado de: Soghomonian, J.J. & Martin, D.L., 1998).

Las dos GADs se encuentran en la membrana plasmática aunque con diferente asociación y en fracciones citoplasmáticas de las células cerebrales. La asociación membranal de GAD65 se relaciona con la fosforilación del dominio N-terminal, mientras que la asociación de la GAD67 a las membranas parece ser secundaria a la de GAD65 ya que involucra la formación de un heterodímero GAD65-GAD67 a través de interacciones indefinidas entre los dominios N-terminal de las dos isoformas (Cooper, J.R. et al., 1996; Soghomonian, J.J. & Martin, D.L., 1998).

Del total de GAD presente en el cerebro de ratas cerca del 50% está presente como apo-GAD, que es la forma inactiva de la enzima ya que no está unida al cofactor fosfato de piridoxal. La apo-GAD65 presenta cantidades un poco mayores a las de la apo-GAD67 en el cerebro de ratas. Bajo condiciones depolarizantes el cofactor se asocia con la apo-GAD y forma la holo-GAD que es la forma activa de la enzima incrementando la actividad neuronal y aumentando la síntesis de GABA (Cooper, J.R. et al., 1996; Soghomonian, J.J. & Martin, D.L., 1998).

Tanto el sistema neural como el endocrino en los vertebrados utiliza el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como una molécula de señalización. Las neuronas y las células de los islotes pancreáticos contienen las mismas dos GADs diferenciándose en el tamaño, carga y antigenicidad. Las células  $\beta$  pancreáticas producen también GABA y presentan altos niveles de actividad enzimática de GAD. La función de GABA y GAD en las células pancreáticas es aún desconocida, pero se considera que GABA tiene un papel importante como molécula de señalización en los islotes pancreáticos. Recientemente se han identificado auto anticuerpos de GAD65 pancreática en la circulación sanguínea de pacientes diabéticos insulina-dependientes, responsables de la destrucción de las células pancreáticas (Ueno, H., 2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.4. Liberación y recaptura

La liberación de GABA al espacio sináptico es estimulada por la despolarización de la neurona presináptica. GABA difunde a través del espacio sináptico hasta su receptor específico localizado en la superficie postsináptica o presináptica. La acción de GABA en la sinapsis está regulada por la recaptura del neurotransmisor tanto por la terminal nerviosa presináptica como por las células gliales circundantes (Figura 6).

El sistema de recaptura de GABA es mediado por sistemas de transporte membranales, procesos dependientes de temperatura e ion-específicos. Estos transportadores tienen la capacidad de realizar el transporte bidireccional del neurotransmisor. El proceso de recaptura está mediado por los gradientes de concentración de  $\text{Na}^+$  con una dependencia de  $\text{Cl}^-$ .

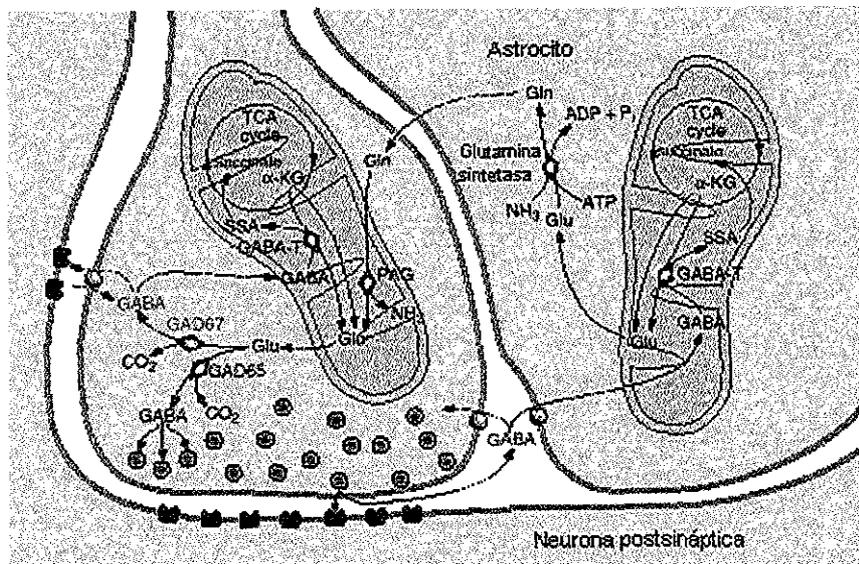


FIGURA 6. Terminal sináptico GABAérgico. Se presentan en la figura las vías de síntesis, liberación y recaptura del neurotransmisor (Tomado de: Soghomonian, J.J. & Martin, D.L., 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El transportador de GABA es una glicoproteína de 70-80 kDa con múltiples regiones transmembranales y no posee ninguna secuencia homóloga con el receptor postsináptico de GABA. Estudios farmacológicos y cinéticos sugieren la existencia de varios subtipos de transportadores de GABA (Masson, J., Sagne, C., Hamon, M. & El Mestikawy, S., 1999).

El GABA recapturado por la terminal nerviosa es reutilizado, pero el que se recaptura en glía es metabolizado a semialdehído succínico por GABA-T y no puede ser resintetizado debido a la carencia de la enzima GAD en este tipo celular (Figura 6).

En la glía, GABA es convertido a glutamina y transferido de regreso a la neurona donde la glutaminasa convierte la glutamina a glutamato, posteriormente dicho glutamato servirá como precursor de la síntesis de GABA. En condiciones fisiológicas normales la relación de GABA interno/ externo es aproximadamente 200. El proceso de recaptura de este neurotransmisor es dependiente de un gradiente de concentración de  $\text{Na}^+$  (DeLorey, T.M. & Olsen, R.W., 1994).

### **3.5. Receptores a GABA**

Los receptores a GABA se encuentran en la membrana pre o postsináptica teniendo un sitio de reconocimiento de GABA. Cuando el neurotransmisor o algún agonista apropiado se unen a este sitio causan un cambio en la permeabilidad de la membrana a los iones inorgánicos principalmente el cloro. Este cambio en la permeabilidad del cloro resulta en la hiperpolarización de la neurona en el caso de la inhibición postsináptica o una despolarización en el caso de la inhibición presináptica.

En los vertebrados los receptores de GABA se encuentran principalmente en las

membranas de las células nerviosas pero no están exclusivamente asociadas con éstas, sino que también se expresan en astrocitos donde están involucrados en la regulación de canales de cloro. También podemos encontrar receptores GABAérgicos en neuronas del sistema nervioso autónomo (Cooper, J.R. et al , 1996).

En los vertebrados se han encontrado tres tipos de receptores GABAérgicos: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. Estos se diferencian por sus propiedades farmacológicas, fisiológicas y bioquímicas. Las características generales de estos receptores se resumen en la Tabla 4.

Los receptores a GABA presentan diferentes localizaciones en el sistema nervioso central. Por estudios de autoradiografía se ha identificado que hay abundancia de GABA<sub>A</sub> en la capa de células granulares del cerebelo donde no se presenta GABA<sub>B</sub>. En cambio la concentración de sitios GABA<sub>B</sub> en el núcleo interpeduncular es mucho mayor que la de GABA<sub>A</sub> (Cooper, J.R. et al., 1996). Mientras que GABA<sub>C</sub> se ha encontrado en el hipocampo y en la retina (Ault, B. & Nadler, J.V., 1983; Bormann, J., 2000). Todos los subtipos de receptores tienen localización pre y postsináptica participando independientemente en la transmisión sináptica.

Los receptores GABA<sub>A</sub> son los más abundantes entre los receptores GABAérgicos en el SNC y han sido extensamente estudiados y caracterizados. Como el receptor nicotínico a acetilcolina, el receptor GABA<sub>A</sub> contiene un canal iónico integral transmembranal al cual se unen dos moléculas. Este canal iónico se asocia con la conductancia de cloro. Al incrementar la permeabilidad de cloro en las neuronas decrecen los efectos despolarizantes de una entrada excitatoria.

**TABLA 4. Tipos de Receptores GABAérgicos (Adaptado de: (Cooper, J.R. et al., 1996; Johnston, G.A.R., 1997).**

Tipo de Receptor	Farmacología			Canales	Segundos mensajeros
	Agonista	Antagonista	Modulador		
GABA <sub>A</sub>	GABA Muscimol Isoguavacina	Bicuculina Picrotoxina	Benzodiazepinas Barbitúricos Esteroides	Cl <sup>-</sup>	-
GABA <sub>B</sub>	GABA Baclofen	Faclofen	-	K <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup>	Adenilato ciclase Fosfatidil Inositol Proteína cinasa C Adenilato ciclase
GABA <sub>C</sub> Insensible a Bicuculina/Baclofen	GABA Ácido trans-4- aminocrotónico Muscimol (Agonista parcial)	Estricnina 3-APMPA	-	Cl <sup>-</sup>	Adenilato ciclase

La evidencia de la relación entre los receptores GABA<sub>A</sub> y las benzodiazepinas fue descrita por Tallman y Gallagher (En: (Cooper, J.R. et al., 1996). Posteriormente se descubrió que la interacción de los agonistas GABAérgicos como las benzodiazepinas, resulta en una alteración del canal de cloro del receptor, alterando su conductancia. Otros agonistas GABAérgicos como los barbituratos, prolongan la duración de la apertura de los canales de cloro.

El receptor GABA<sub>A</sub> está formado por una serie de subunidades que están alostéricamente moduladas por los barbituratos y las benzodiazepinas y pertenece a la familia de los receptores ionotrópicos. Es una glicoproteína heteropentamérica de aproximadamente 275 kDa. Existen cinco clases de subunidades polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\rho$ ) que han sido clonadas y se han encontrado múltiples isoformas de estas. Son 15 genes los que codifican para las diferentes subunidades ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-4}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ , y  $\rho_{1-2}$ ) que proveen la base estructural de este receptor. Esta extraordinaria heterogenicidad de los

receptores GABA<sub>A</sub> lo provee de una diversidad de funciones relacionadas con la sensibilidad a GABA, modulación de efectores alostéricos, adaptación a estímulos, distribución en y entre las neuronas, desarrollo ontogénico y alteraciones en condiciones patológicas.

Los receptores GABA<sub>B</sub> se presentan en menor cantidad que los receptores antes descritos. Se presenta la mayor parte de las veces en la terminal presináptica (Mohler, H., Benke, D. & Fritschy, J.M., 2001) y pertenecen a la familia de los receptores metabotrópicos. La activación de los receptores GABA<sub>B</sub> juega un papel importante en la disminución de la liberación de aminas, aminoácidos excitatorios, neuropéptidos y hormonas. Este receptor está acoplado a canales de Ca<sup>2+</sup> o K<sup>+</sup> vía segundos mensajeros. La inhibición generada por la activación de estos receptores se relaciona con un incremento en la conductancia de potasio o un decremento en la conductancia de calcio.

El receptor GABA<sub>B</sub> se distingue farmacológicamente de los GABA<sub>A</sub> por su afinidad a baclofén, que actúa como una agonista GABAérgico. La activación presináptica de estos receptores por baclofén produce un decremento de la conductancia de calcio y de la liberación del neurotransmisor. Los receptores GABA<sub>B</sub> postsinápticos están indirectamente acoplados a canales de K<sup>+</sup> vía proteínas G y se encargan de mediar los potenciales postsinápticos inhibitorios tardíos. Este receptor no es modulado ni por benzodiazepinas ni barbituratos. La principal diferencia es que GABA<sub>B</sub> no es un canal sino un receptor de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Este subtipo de receptor sólo se activa bajo ciertas condiciones fisiológicas y estudios realizados en animales lo han relacionado con el desarrollo de conductas específicas (Cooper, J.R. et al., 1996).

Los receptores GABA<sub>C</sub> forman un grupo farmacológicamente distinto. Mientras que los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> se definen por sus sensibilidades a bicuculina y

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

baclofen, respectivamente,  $GABA_C$  no responde a ninguna de estas drogas y no es modulado por las benzodiazepinas y barbituratos como los  $GABA_A$ . Una característica fisiológica de estos receptores es su desensibilización a concentraciones muy altas del agonista. Este subtipo de los receptores GABAérgicos está relacionado fuertemente con la inhibición lateral en la retina de vertebrados. Estructuralmente también es diferente ya que puede ensamblarse como homoligómero (a diferencia de  $GABA_A$  que son heteroligómeros). Estos receptores están relacionados con la activación de segundos mensajeros como la proteína cinasa C y la adenilato ciclasa (Bormann, J., 2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. ANATOMÍA DE LA AMÍGDALA

El término amígdala proviene del griego *amygdale*, debido a su gran similitud con la forma de una almendra (Alheid, G.F., De Olmos, J.D. & Beltramino, C.A., 1995). El complejo nuclear amigdalino es una masa de sustancia gris situada en la porción mediodorsal del lóbulo temporal, rostral y dorsal con respecto al extremo inferior del ventrículo lateral. Está cubierto por una corteza rudimentaria y en dirección caudal tiene continuidad con el uncus de la circunvolución del parahipocampo (Carpenter, M.B., 1991).

El complejo amigdalino se divide en dos masas nucleares principales: 1) un grupo nuclear corticomedial y 2) un grupo nuclear basolateral. Con frecuencia se incluye un núcleo central como parte del núcleo corticomedial. Las subdivisiones nucleares del grupo corticomedial comprenden: a) el área amigdalina anterior, b) el núcleo de la cintilla olfatoria lateral, c) el núcleo amigdalino medial y d) el núcleo amigdalino cortical. El grupo nuclear amigdalino no cortical se encuentra muy próximo al putamen y a la cola del núcleo caudado.

La parte más grande y mejor diferenciada del complejo amigdalino en los humanos es el grupo nuclear basolateral. Las subdivisiones de este grupo nuclear son: a) el núcleo amigdalino lateral, b) el núcleo amigdalino basal y 3) un núcleo amigdalino basal accesorio. En dirección caudal, el complejo amigdalino se halla en contacto con la cola del núcleo caudado, que se extiende en dirección anterior por el techo del asta inferior del ventrículo lateral.

Entre las diferentes conexiones aferentes del complejo amigdalino, están bien establecidas las fibras olfatorias. Las fibras de la cintilla olfatoria lateral terminan en el grupo corticomedial. Ninguna fibra de la cintilla olfatoria lateral parece penetrar en el

grupo nuclear basolateral. Los núcleos amigdalinos basolaterales reciben impulsos olfatorios indirectos por medio de relevos en la corteza piriforme (López, L.A., 1995; Carpenter, M.B., 1991). Así, casi todas las partes del complejo amigdalino reciben vías olfatorias directas o indirectas. No se ha determinado con precisión las vías que conducen estos impulsos a la amígdala, suponiéndose que puede ser a través del tálamo y por descarga de la corteza somatosensorial a dicha estructura. A la amígdala llegan también impulsos que proceden del hipotálamo, de los núcleos inespecíficos del tálamo, de la formación reticular cerebral y de las regiones neocorticales: lóbulo temporal (polo y segunda circunvolución temporal), corteza orbitofrontal (a través del fascículo uncinado) y cíngulo (Alheid, G.F. et al., 1995; López, L.A., 1995).

Las proyecciones diencefálicas hacia la amígdala siguen vías paralelas a los sistemas eferentes. Las fibras que se originan en la mitad rostral del hipotálamo pasan a todos los núcleos amigdalinos, con excepción del núcleo central. Las aferentes hipotalámicas hacia la amígdala se originan principalmente en el área hipotalámica lateral ipsilateral; el núcleo hipotalámico ventromedial se proyecta principalmente a las regiones mediales de la amígdala. La amígdala recibe pocas proyecciones ipsilaterales de los núcleos talámicos paraventriculares de la línea media. Los núcleos parabranciales laterales, que reciben aferentes ipsilaterales del núcleo solitario, proyectan de manera ipsilateral hacia el núcleo central de la amígdala (Carpenter, M.B., 1991).

La amígdala envía impulsos a través de dos sistemas: la estría terminalis que es la vía amígdalofugal central y por las proyecciones amígdalocorticales y amígdaloestriadas. La estría terminalis es una delgada banda de fibras que después de emerger de la amígdala cursa contigua a la parte medial de la cola del núcleo caudado en el techo de la prolongación temporal del ventrículo lateral; posteriormente, siempre adosada a la cola del núcleo caudado rodea la parte posterior del tálamo y llega al

cuerpo del ventrículo, donde cursa en el surco tálamo-estriado con la vena del mismo nombre. Al llegar a nivel del foramen interventricular, pasa por debajo de éste y en la proximidad de la comisura anterior se divide en tres componentes: supracomisural, infracomisural y comisural; los dos primeros se distribuyen por la región septal, el área preóptica y la parte anterior del hipocampo llegando algunas fibras hasta el núcleo ventromedial. El componente comisural pasa al lado opuesto a través de la comisura anterior para seguir un trayecto inverso en el hemisferio contralateral hasta alcanzar la amígdala. Algunas fibras pasan a la habénula por la estría medularis. La mayor parte de las fibras de la estría terminalis proviene del grupo corticomediale de la amígdala.

La vía amígdalofugal es un sistema difuso que se origina en la división basolateral de la amígdala. Sus fibras se distribuyen por la región septal, el área preóptica y el hipotálamo anterior, llegan hasta el núcleo ventromedial de éste y a algunos núcleos talámicos incluyendo el dorsomedial; otras alcanzan el tegmento mesencefálico probablemente incorporadas al haz medial del cerebro anterior. Existen fibras que llegan al tubérculo olfatorio a través de la banda diagonal de Broca. También existen conexiones entre el complejo basolateral de un lado y las regiones correspondientes del hemisferio contralateral, a través de las fibras comisurales, así como proyecciones de esta parte de la amígdala al cíngulo, hipocampo, y corteza temporal y orbitofrontal (López, L.A., 1995).

En cuanto a las proyecciones amígdalo-corticales, se creyó durante mucho tiempo que la amígdala estaba principalmente asociada a estructuras subcorticales de control de las funciones viscerales y autónomas, pero ahora se sabe que esta estructura cerebral no sólo se limita a esas funciones. Las proyecciones tan amplias de la amígdala hacia múltiples regiones de la corteza cerebral sugieren que este complejo desempeña un importante papel en funciones cognitivas superiores y motivacionales. Las proyecciones de la amígdala se dirigen hacia regiones de la corteza frontal, insular,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

temporal y occipital. Las proyecciones amígdalo-corticales comprenden la corteza somatosensorial y casi todas las regiones del lóbulo temporal. Así mismo, la amígdala envía proyecciones hacia el neocórtex, que se originan en el núcleo basolateral y pasan a través del fascículo longitudinal de asociación y la estría terminalis. Esta proyección presenta su mayor densidad sólo en regiones ventromediales del núcleo caudado. La mayor parte de las fibras amígdalo-estriadas son ipsilaterales, pero una distribución simétrica contralateral corre por la comisura anterior. Las proyecciones amígdaloestriadas podrían integrar las actividades motoras correspondientes a los estados emocionales y motivacionales.

#### **4.1. Características histoquímicas de la amígdala.**

La amígdala recibe aferentes noradrenérgicas del locus coeruleus y aferentes dopaminérgicas de la sustancia nigra del mesencéfalo. Las terminaciones que contienen dopamina y varicosidades noradrenérgicas están distribuidas de una manera similar, con las mayores densidades en el núcleo central. Los axones que utilizan cada uno de estos neurotransmisores llegan a la amígdala por la estría terminal y por vías ventrales. La inmunorreactividad a la acetilcolina transferasa en la amígdala se encuentra presente sólo en las fibras y terminaciones, con mayor densidad en los núcleos basales y en la cintilla olfatoria lateral. Estas fibras colinérgicas se originan en las grandes neuronas colinérgicas de la sustancia innominada. Las fibras serotoninérgicas de la amígdala se originan en el núcleo dorsal del rafe y tienen una gran densidad en los núcleos basal y lateral (Amaral, D.G., Prince, J.L., Pitkänen, A. & Carmichel, S. I., 1992; Carpenter, M.B., 1991).

Los péptidos que se hallan en las células de las terminaciones del complejo nuclear amigdalino incluyen la somatostatina, encefalina, sustancia P, colecistoquinina, neurotensina y polipéptido intestinal vasoactivo. Las células, fibras y terminaciones

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

inmunorreactivas a la somatostatina de la amígdala representa las mayores concentraciones del encéfalo y parecen tener un origen intrínseco. Las células y terminaciones inmunorreactivas a la encefalina, sustancia P y neurotensina tienen un origen intrínseco y se localizan principalmente en los núcleos central y medial. Las células que contienen colecistoquinina y polipéptido intestinal vasoactivo se encuentran presentes en los núcleos amigdalinos laterales y en la corteza piriforme. Muchas de las neuronas amigdalinas que sintetizan estos péptidos envían proyecciones hacia la región preóptica y los núcleos hipotalámicos

En cuanto a la presencia de GABA en amígdala, la inmunorreactividad en la amígdala hacia este neurotransmisor esta asociada con fibras, terminaciones y cuerpos celulares. Se ha encontrado inmunoreactividad a GAD o GABA en los cuerpos celulares en todos los núcleos amigdalinos, entre los que presentan una mayor reacción están el núcleo lateral, basal y cortical (Amaral, D.G. et al., 1992).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### III. JUSTIFICACIÓN

El uso de trasplantes neuronales ha sido una herramienta para el estudio de los mecanismos básicos de desarrollo neuronal y de plasticidad (Nakao, N. & Itakura, T., 2000). Su empleo en diversos experimentos para la regeneración de circuitos neuronales dañados en modelos de lesión cerebral han demostrado la eficacia de los injertos tanto en lo que se refiere a su sobrevivencia así como en el reestablecimiento de la función dañada (Koutouzis, I.K. et al., 1994).

Con base a lo anterior y conociendo la patología de las enfermedades neurodegenerativas algunos investigadores han empleado los trasplantes neuronales como una opción de tratamiento clínico que ayude a resolver este problema (Freed, C.R. et al., 2001). Sin embargo, su empleo todavía implica múltiples interrogantes entre ellas la fuente de tejido a utilizar para los trasplantes. Es por ello que muchos investigadores se han dado a la tarea de generar líneas celulares de ciertos tipos neuronales que están relacionadas con enfermedades neurodegenerativas. Incluso con el conocimiento de que en estas patologías existe deficiencia de ciertos neurotransmisores, se han generado líneas celulares específicas transformadas genéticamente para producir dichos neurotransmisores en grandes cantidades (Conejero-Goldberg, C. et al., 2000; Loscher, W., Ebert, U., Lehmann, H., Rosenthal, C. & Nikkhah, G., 1998; Thompson, K. et al., 2000; New, K.C., Gale, K., Martuza, R.L. & Rabkin, S.D., 1998; Eaton, M.J. et al., 1999).

Dentro de las líneas celulares modificadas genéticamente que pueden ser utilizadas para trasplantes, se encuentra la línea celular M213-2O ci-4. Sus características genéticas y fenotípicas la hacen una buena opción para ser probada en modelos experimentales donde exista deficiencia de GABA, neurotransmisor que produce esta línea celular en cantidades considerables. Previamente a su empleo en

modelos conductuales es necesario caracterizar la sobrevivencia de estas células en el tejido huésped, asegurarnos de que no presente efectos tumorigénicos en cerebro transplantado, así como cuantificar los niveles de GABA que estas células están liberando in vivo. Estos son algunos de los objetivos de este trabajo que nos proporcionarán información necesaria para emplear esta nueva línea celular en modelos experimentales donde exista deficiencia de este neurotransmisor como lo es la epilepsia o la enfermedad de Huntington.

#### IV. HIPÓTESIS

El trasplante en la amígdala de la rata de las células transfectadas con el cDNA del GAD67 humano, resultará en un incremento de la concentración de GABA en esta región.

#### V. OBJETIVOS

- a) Determinación cromatográfica de la concentración de GABA en amígdala de los animales transplantados a diferentes tiempos postransplante.
- b) Observar la sobrevivencia de células a diferentes tiempos postransplante y correlacionarlo con la concentración de GABA en amígdala intacta.
- c) Realizar las observaciones histológicas del trasplante utilizando técnicas inmunohistoquímicas para GAD y GFAP.
- d) Determinación de la concentración de GABA total y GABA liberado por estímulo de altas concentraciones de potasio en cultivos de la clona M213-20 cl-4 utilizada para los trasplantes, así como de la línea celular M213-20, que no posee el cDNA del hGAD67.

#### IV. HIPÓTESIS

El trasplante en la amígdala de la rata de las células transfectadas con el cDNA del GAD67 humano, resultará en un incremento de la concentración de GABA en esta región.

#### V. OBJETIVOS

- a) Determinación cromatográfica de la concentración de GABA en amígdala de los animales transplantados a diferentes tiempos postransplante.
- b) Observar la sobrevivencia de células a diferentes tiempos postransplante y correlacionarlo con la concentración de GABA en amígdala intacta.
- c) Realizar las observaciones histológicas del trasplante utilizando técnicas inmunohistoquímicas para GAD y GFAP.
- d) Determinación de la concentración de GABA total y GABA liberado por estímulo de altas concentraciones de potasio en cultivos de la clona M213-20 cl-4 utilizada para los trasplantes, así como de la línea celular M213-20, que no posee el cDNA del hGAD67.

## VI. MATERIAL Y METODOS

### Animales

Se usaron ratas macho albinas de la cepa *Sprague - Dawley* sometidas a un ciclo invertido (12 luz/12 oscuridad), con agua y alimento *ad libitum*. Las cuales se distribuyeron en los siguientes grupos:

**GRUPO 1.** Grupo control, ratas intactas.

**GRUPO 2.** Grupo falso trasplante, ratas transplantadas sólo con el medio de cultivo, DMEM/F12.

**GRUPO 3.** Grupo transplantado con la línea celular 261-F (esta línea no posee el transgén del cDNA del GAD67 humano).

**GRUPO 4.** Grupo del trasplante; ratas transplantadas con la línea celular M213-2O cl-4.

En cada grupo se incluyeron como mínimo 8 ratas. Las ratas de los grupos 1, 2 y 4 se subdividieron a su vez para ser sacrificadas a las 4, 8 y 12 semanas después del trasplante. Las ratas del grupo 3 se sacrificaron a las 4 semanas postrasplante.

### Cultivos Celulares

La línea celular M213-2O cl-4, que se utilizó para los trasplantes posee las características descritas anteriormente. Estas células se cultivaron a una temperatura permisiva de 33°C, con 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina, en frascos de 75 cm<sup>3</sup>.

Una vez que se alcanzó un 70 - 80% de confluencia, las células se cambiaron a una temperatura no permisiva de 39.5°C por un tiempo mínimo de 3 días.

El día del trasplante se disociaron las células utilizando tripsina. El botón formado se incubó con una solución 5µM de bisbenzimidida (Hoechst 33342) por 30 minutos, esta sustancia permite la localización del trasplante por medio de su observación por microscopía de fluorescencia (Apéndice I). Posteriormente se lavaron y resuspendieron a una concentración de 200,000 células/µl, la cual se ajustó previamente utilizando el hematocitómetro (Apéndice II).

#### **Pruebas de Liberación de GABA por alta concentración de K<sup>+</sup>**

Se realizaron cultivos de las clonas M213-2O y M213-2O cl-4 en 2 placas de seis pozos para cada línea celular. La línea celular M213-2O cl-4 fue cultivada tanto en presencia como en ausencia de higromicina para su selección. Se usó la higromicina debido a que el trasgén utilizado para transfectar esta línea celular posee en su estructura el gen de resistencia a higromicina, como gen reportero. Cuando llegaron a una confluencia del 90% se les eliminó el medio de cultivo DMEM/F-12 10%SFB 1% penicilina/estreptomina y se lavaron con solución salina estéril. La prueba consistió en la aplicación de una solución amortiguadora con alta concentración de potasio (Apéndice III) la cual se recogió a tres tiempos diferentes (15, 30 y 45 minutos) . Se almacenó la muestra a -70°C para posteriormente analizarla por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Previamente a la aplicación del amortiguador con alta concentración de potasio, se aplicó otra solución amortiguadora preparada de manera similar pero sin potasio por 5 minutos para obtener un valor control basal. El volumen aplicado de ambos amortiguadores fue de 0.5 ml por pozo.

Finalmente se separaron las células utilizando un aplicador de plástico y se

almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la determinación de proteínas totales (Apéndice IV).

### Determinación de GABA total

Se realizaron cultivos de las clonas M213-2O y M213-2O cl-4 en frascos de  $25\text{ cm}^2$ . Cuando llegaron a una confluencia del 90% se les aplicó un mililitro de una solución de ácido sulfosalicílico al 35% por 20 minutos. Pasado el tiempo de incubación se separaron las células con ayuda de un aplicador de plástico y se colocaron en tubos eppendorf. Se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche posterior y al día siguiente se centrifugaron por 5 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se destinó para su análisis en HPLC y el precipitado para el análisis de proteínas totales.

### Transplantes

Se realizaron transplantes bilaterales en el núcleo basolateral de la amígdala por medio de la técnica esterotáxica, utilizando las coordenadas (2.5mm posterior a Bregma, 4.25mm lateral de la línea media y 8.0 mm abajo de la dura) de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson. Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (70 mg/kg) y xilazina (6 mg/kg) para la realización del transplante.

Previamente se tripsinizaron las células de la clona M213-2O cl-4 y fueron marcadas con bisbenzimidida para preparar la suspensión celular con una concentración de 200,000 células/ $\mu\text{l}$  como ya se explicó anteriormente.

El volumen de la suspensión a transplantar, con o sin células fue de  $2\mu\text{l}$ . El transplante se realizó a través de una jeringa Hamilton ( $10\mu\text{l}$ ) llena con la suspensión celular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Histología

Para la realización del análisis inmunohistoquímico del grupo transplantado con la suspensión celular de la clona M213-2O cl-4, las ratas se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (>50 mg/kg) y se perfundieron por vía intracardiaca primero con solución salina seguido por paraformaldehído 4% en solución amortiguadora de fosfatos (0.1M, pH 7.4). Se obtuvo el encéfalo y se mantuvo en solución postfijadora (paraformaldehído 4%) durante 24hrs y después se almacenó en sacarosa al 35% a 4°C. Se realizaron posteriormente cortes de 30-40µm en el microtomo. Algunos de estos cortes fueron teñidos con violeta de cresilo (Apéndice V) para observar la localización del transplante. En el resto de los cortes se realizaron las técnicas inmunohistoquímicas de GAD67 (anticuerpo policlonal de conejo anti-glutamato descarboxilasa, CHEMICON) y GFAP (Anticuerpo policlonal de conejo anti-Proteína Acídica Glial Fibrilar, CHEMICON) para determinar la presencia de estas proteínas en el transplante y en el tejido huésped utilizando la metodología de avidina-biotina para evidenciar la unión anticuerpo-antígeno usando el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado hecho en cabra (VECTOR) (Apéndices VI y VII).

Otro grupo de ratas transplantadas también fue anestesiado con una sobredosis de pentobarbital (>50 mg/kg) y posteriormente se sacrificaron por decapitación. Se obtuvo el encéfalo, se congeló inmediatamente en hielo seco y se mantuvo a -70°C hasta realizar los cortes. Utilizando el criostato se realizaron cortes de 20 µm que se montaron en portaobjetos gelatinizados. Posteriormente se cubrieron con glicerol y se les colocó un cubreobjetos para su observación directa en el microscopio de fluorescencia utilizando un filtro ultravioleta para la localización de las células transplantadas marcadas previamente con la bisbenzimidida.

## HPLC

Para la determinación de GABA en la amígdala transplantada, se inyectó previamente a la decapitación del animal ácido 3-mercaptopropiónico (1.2 mmol/kg de peso) por vía intraperitoneal, este reactivo se utiliza como inhibidor de la enzima GAD y es requisito inyectarlo entre 1 y 1.5 minutos antes de sacrificar al animal ya que por su acción genera convulsiones que alterarían los resultados. Después de la decapitación se realizó la disección de la amígdala completa y se homogenizó utilizando una solución de metanol al 85%. Dicho homogenizado fue ultracentrifugado y el sobrenadante se guardó para su análisis en HPLC.

Para la determinación neuroquímica de GABA se utilizó la técnica cromatográfica montada para la detección de aminoácidos cerebrales que se basa en separación por cromatografía de líquidos de alta resolución por fase reversa, realizando una derivatización precolumna con el reactivo de ortoftaldehído para permitir la detección de aminoácidos por fluorescencia (Martínez, M. et al , 1998; Palmero, S., de Marchis, M., Prati, M. & Fugassa, E., 1992; Herranz, A.S., Lerma, J. & Martín del Río, R., 1984).

## Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico paramétrico ya que nuestras variables dependientes se distribuyen normalmente. Para la determinación de diferencias entre grupos se realizó un análisis de varianza (ANOVA). La prueba post-hoc empleada fue la de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## VII. RESULTADOS

### Histología

El análisis histológico de los cortes de cerebro de las ratas transplantadas con la clona M213-20 cl-4 marcada con bisbenzimidida demostró la presencia de estas células en los animales transplantados gracias a su observación por microscopía de fluorescencia. La localización del trasplante se observó en el lóbulo temporal en la parte inferior, cercana a la región de la amígdala con una migración aparente de las células transplantadas hacia una parte más dorsal del cerebro a través de la cápsula externa (Figura 7). Esta migración se presentó en mayor grado en los cortes realizados a los tiempos postransplante mayores, mientras que a los tiempos más cortos el trasplante estuvo más localizado en el sitio de la inyección. De tal manera que los cortes de los cerebros analizados 12 semanas postransplante presentaron la mayor migración con respecto a los otros tiempos (Figura 8).

En los cortes teñidos con la técnica de Nissl (violeta de cresilo) se observó la presencia del trasplante en el área de la amígdala, también estas preparaciones nos permitieron demostrar que no existe necrosis del tejido ni se provocó la formación de tumores en ninguno de los animales transplantados. Además con esta tinción se observó que el tamaño de las células transplantadas menor que las del tejido huésped que las rodea, permitiéndonos hacer una mejor identificación de estas células con las otras técnicas histológicas. En general la apariencia de las células es buena sin presentar deterioro aparente (Figura 9 y Figura 10).

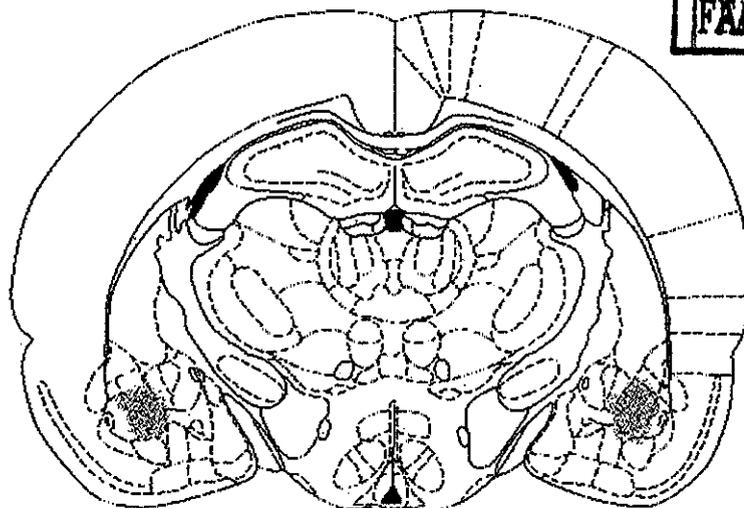
Los cortes histológicos destinados para las pruebas inmunohistoquímicas para GAD67 resultaron positivos en la región del trasplante y se relacionó con la localización de las células identificadas con bisbenzimidida (Figura 11). En cuanto a la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

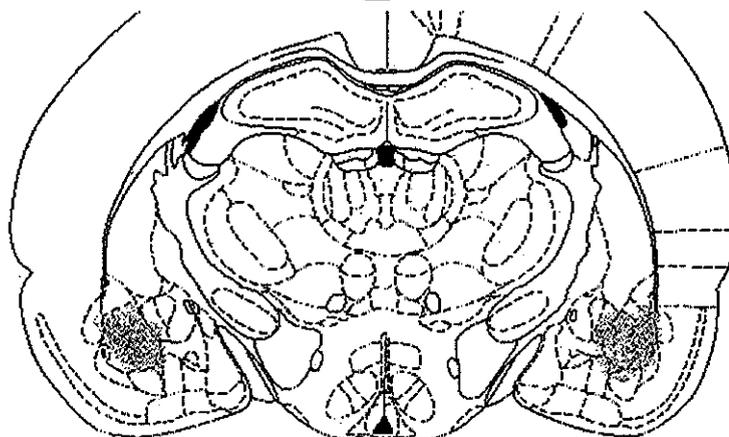
reacción glial provocada por la implantación de la cánula durante la cirugía, ésta fue determinada por la técnica inmunohistoquímica para GFAP. Se observó que en los cortes realizados a los menores tiempos postransplante existía una reacción de gliosis leve que fue disminuyendo con relación al tiempo postransplante, hasta sólo reducirse a la presencia de astrocitos de mayor tamaño e intensidad de marcaje rodeando el lugar del transplante (Figura 12). Lo anterior nos indica que el daño causado por la cirugía fue mínimo y que las células transplantadas se integran bien al tejido circundante sin producir una reacción glial a su alrededor.

En todos los casos se observó de la presencia de las células marcadas con bisbenzimidida, que se relacionó con los resultados de las otras técnicas (tinción con violeta de cresilo, inmunohistoquímicas para GAD y GFAP), confirmando así la presencia, integración y la condición del transplante al tejido huésped en cada una de las ratas transplantadas. Además es importante mencionar que los trasplantes no se observan como grupos compactos sino como células individuales bien integradas al tejido, es por eso que la expresión de GAD67 no es muy intensa pues se presentó en las células dispersas.

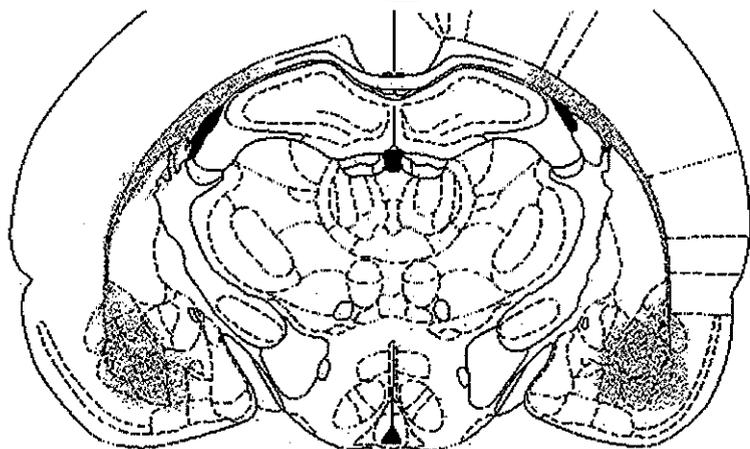
A.



B.



C.



**Interaural 6.44 mm**

**Bregma -2.56mm**

**FIGURA 7.** Distribución y localización de las células transplantadas a los diferentes tiempos post-transplante. A. 4 semanas, B 8 semanas y C. 12 semanas postransplante. A tiempos más cortos las células transplantadas se observan menos diseminadas y más localizadas en la amígdala, mientras que en un mayor tiempo postransplante se ve que las células migran a través de la cápsula externa.

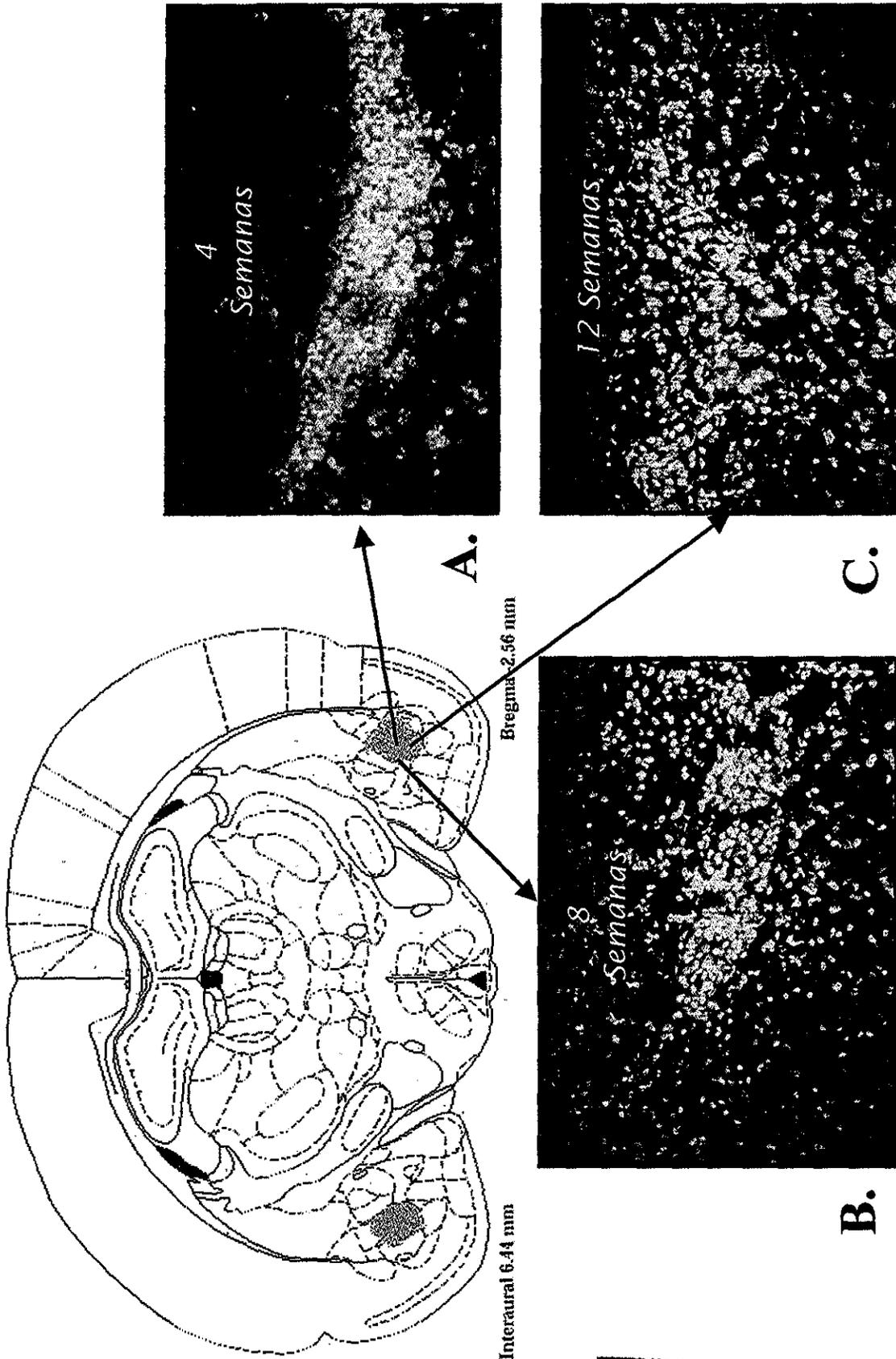
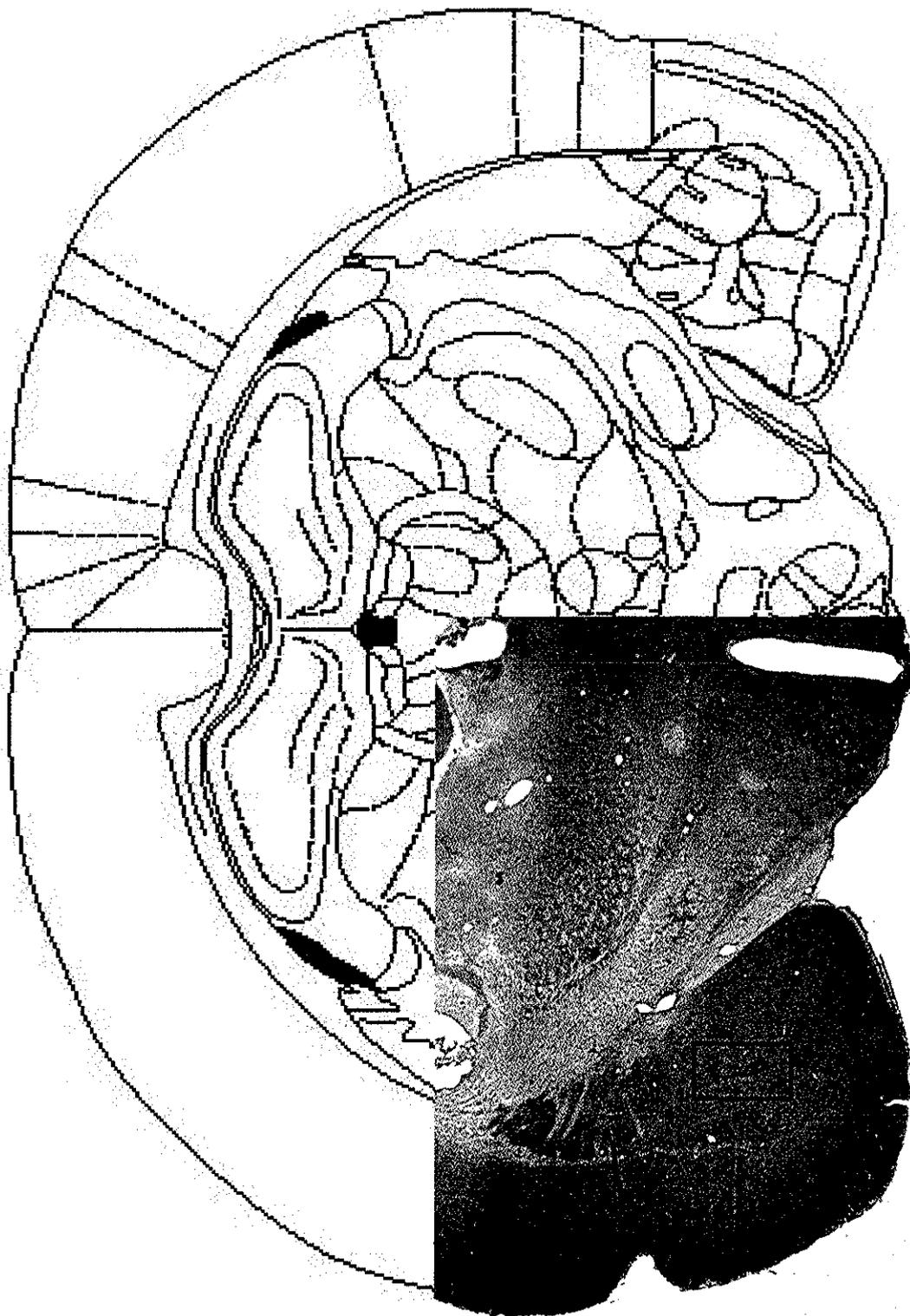


FIGURA 8. Las células marcadas con bisbenzimida (Hoesch 33342) a los diferentes tiempos después del trasplante. A. 4 semanas, B. 8 semanas y C. 12 semanas postrasplante. Todas las micrografías fueron tomadas a la misma magnificación (10X). Se observa que la dispersión aumenta con respecto al tiempo postrasplante.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Bregma -2.56 mm

**Figura 9.** Localización del trasplante utilizando la técnica de Nissl. Se observó la presencia de las células transplantadas en el área de la amígdala, sin provocar reacciones gliales, necróticas o tumoraciones.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

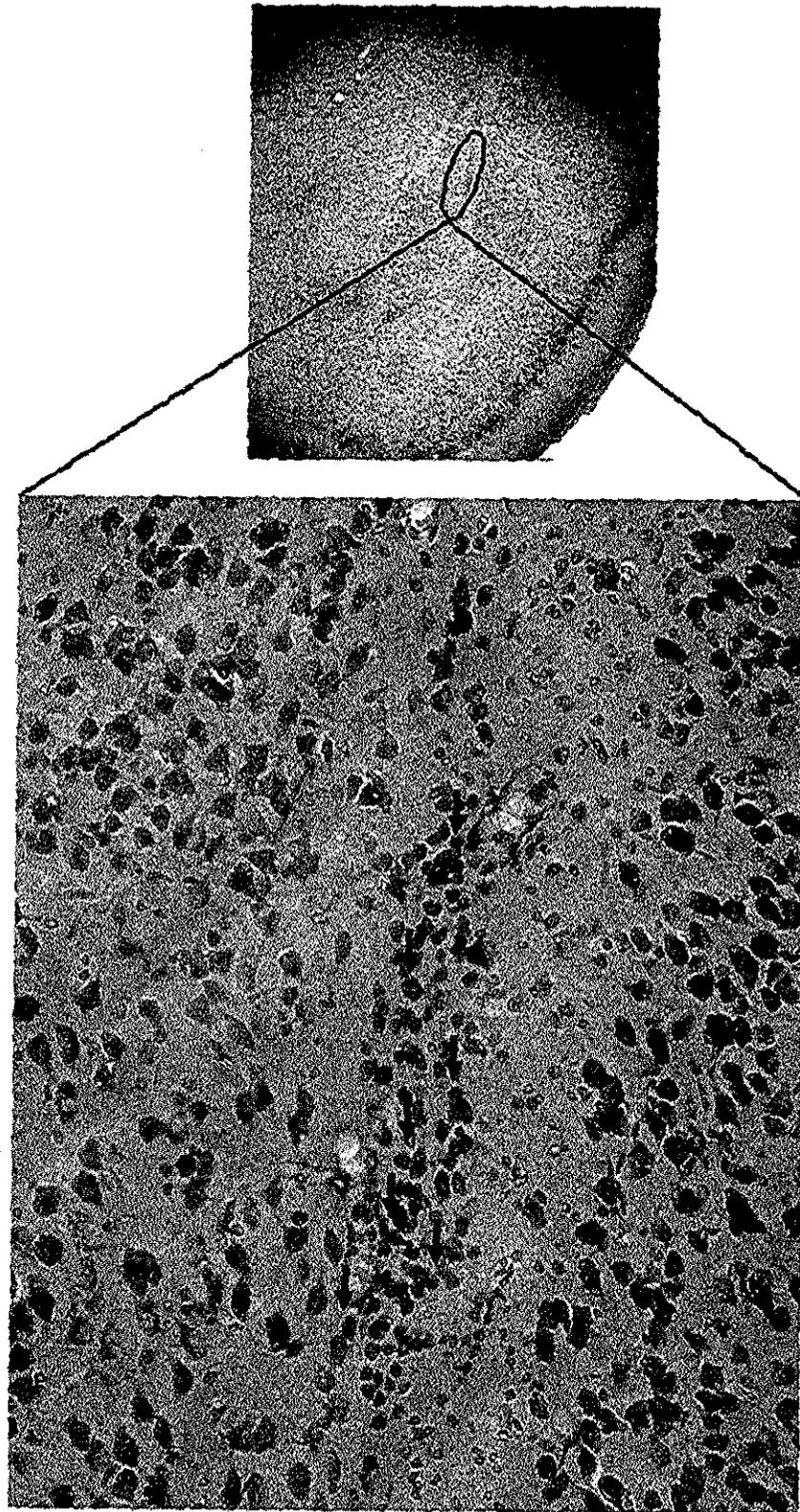
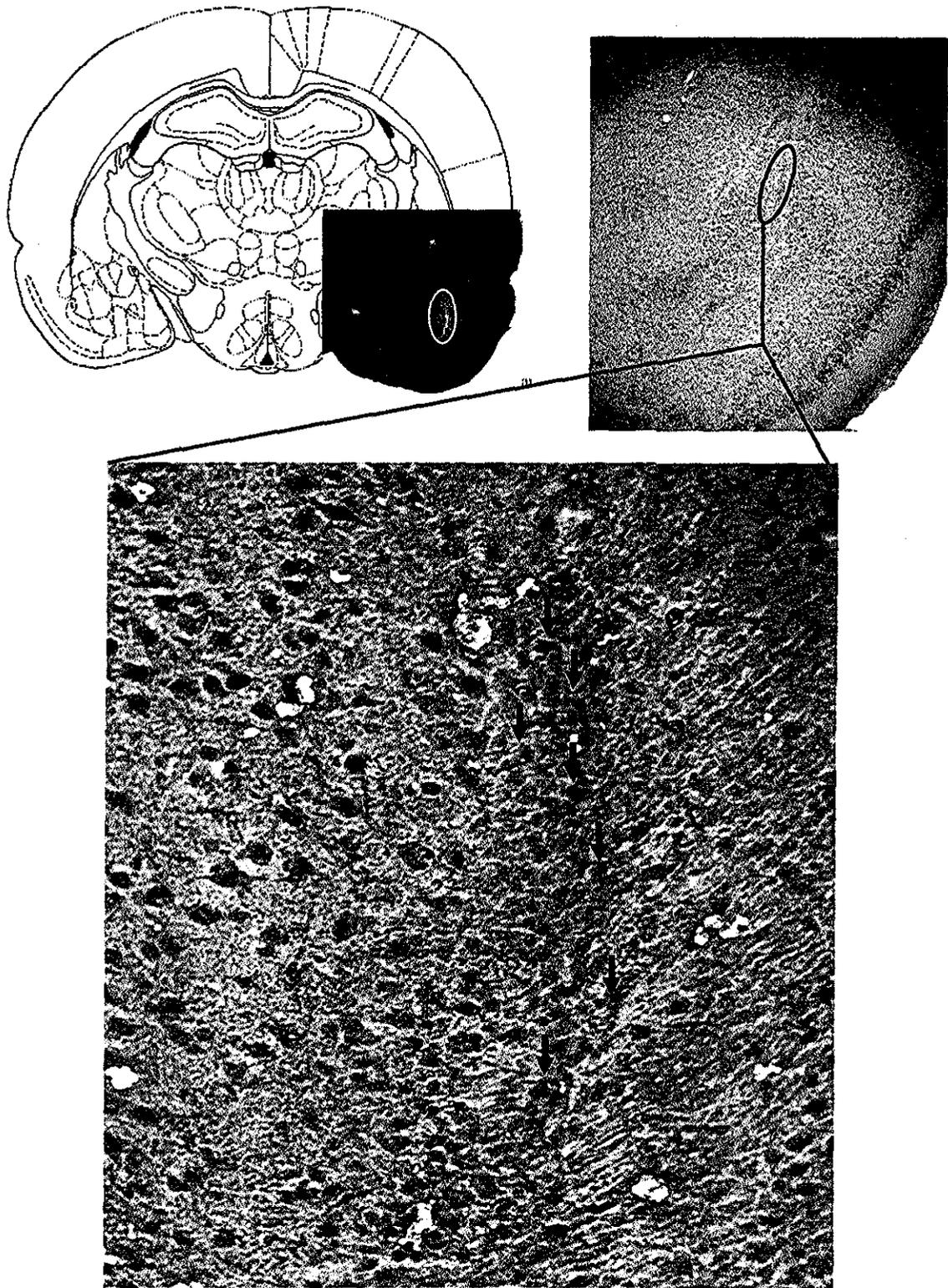


Figura 10. Utilizando la Técnica de Nissl se pudo observar las células transplantadas las cuales se presentan en al área de la amígdala, cercanas a la cicatriz de la cirugía.



**Figura 11.** Análisis inmunohistoquímico para GAD67 en las ratas transplantadas. La localización de las células GAD67 (+) del transplante coinciden con las células marcadas con Bisbenzimidida observadas con microscopía de fluorescencia.

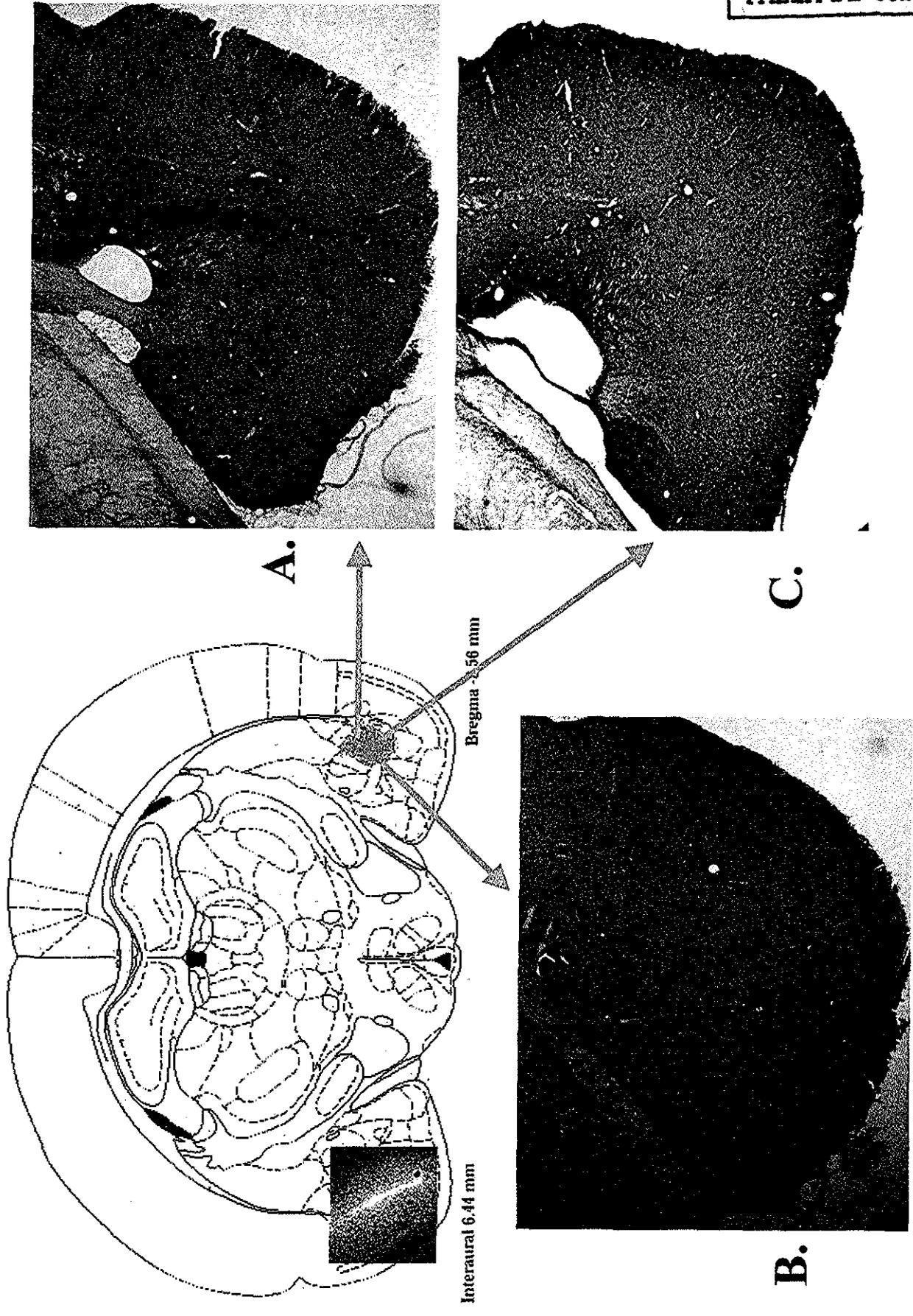


Figura 12. Análisis inmunohistoquímico de GFAP en las ratas transplantadas. Se observa una buena integración del trasplante al tejido huésped ya la presencia reacción glial es muy leve y se presenta a tiempos postransplante cortos. A) 4 semanas; B) 8 semanas y C) 12 semanas.

### **Determinación de GABA y glutamato por HPLC**

Se realizó la determinación de la concentración de GABA y glutamato en amígdala para los grupos intacto, falso transplante y transplante con las clonas M213-2O cl-4 y la clona 261-F, a los diferentes tiempos después del transplante. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 13.

Se encontró una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre la concentración de GABA en el grupo del transplante con la clona M213-2O cl-4 a las 8 semanas posteriores al transplante, con respecto al grupo transplantado con la línea celular M261-F, utilizada como clona control. Esta diferencia no se observa con ninguno de los otros dos grupos transplantados con esta misma clona en los otros tiempos post-transplante.

Con respecto a la determinación neuroquímica de glutamato en la amígdala diseccionada, se encontró que la concentración de este neurotransmisor en los homogenados se fue incrementando con respecto al tiempo post-transplante. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo con transplante de 12 semanas de la clona M213-2O cl-4 con respecto a los tres grupos controles empleados (el grupo intacto, el grupo del falso transplante y el grupo transplantado con la clona M261-F).

### **Determinación de GABA y Glutamato en cultivos**

Los resultados de la determinación cromatográfica de las concentraciones de GABA y glutamato en respuesta a la estimulación con altas concentraciones de potasio en cultivos de la clona M213-2O cl-4, se presentan en las Figuras 14 y 15.

En la figura 14 se presentan los resultados obtenidos para la determinación de la concentración de GABA bajo condiciones control (amortiguador sin potasio) y en condiciones de estimulación por altas concentraciones de potasio. Se encontró una mayor concentración del aminoácido en las muestras obtenidas bajo condiciones control que con las estimuladas con el potasio, tanto en los cultivos seleccionados con higromicina como los que no lo fueron. Al realizar el análisis estadístico se encontró que existe una diferencia significativa debida al efecto de grupo, siendo la concentración de GABA obtenida para la clona control sin transfectar (M213-2O) menor con respecto a las concentraciones obtenidas para las clonas transfectadas con el cDNA del GAD67h seleccionadas y sin seleccionar con higromicina.

Al igual que en el caso de la determinación de la concentración de GABA, en el caso de la concentración de Glutamato en los cultivos seleccionados con higromicina y sin seleccionar, presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la obtenida del cultivo de la clona control, presentando esta última concentraciones menores que la clona transfectada. En este caso la mayor concentración de glutamato se presentó los 45 minutos posteriores de la adición del amortiguador con y sin potasio en la clona seleccionada (Figura 15). De igual manera que con GABA, la concentración de Glutamato fue mayor en las muestras control que en las muestras obtenidas por estímulo de alta concentración de potasio.

Por último en la figura 16 se presenta la determinación cromatográfica de GABA total en los cultivos M213-2O y M213-2O cl-4 con y sin higromicina. La concentración de GABA en los cultivos seleccionados con higromicina presentaron sólo una tendencia a presentar una mayor concentración de GABA, sin presentar diferencia estadística significativa con respecto a la clona sin el transgén (M213-2O).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

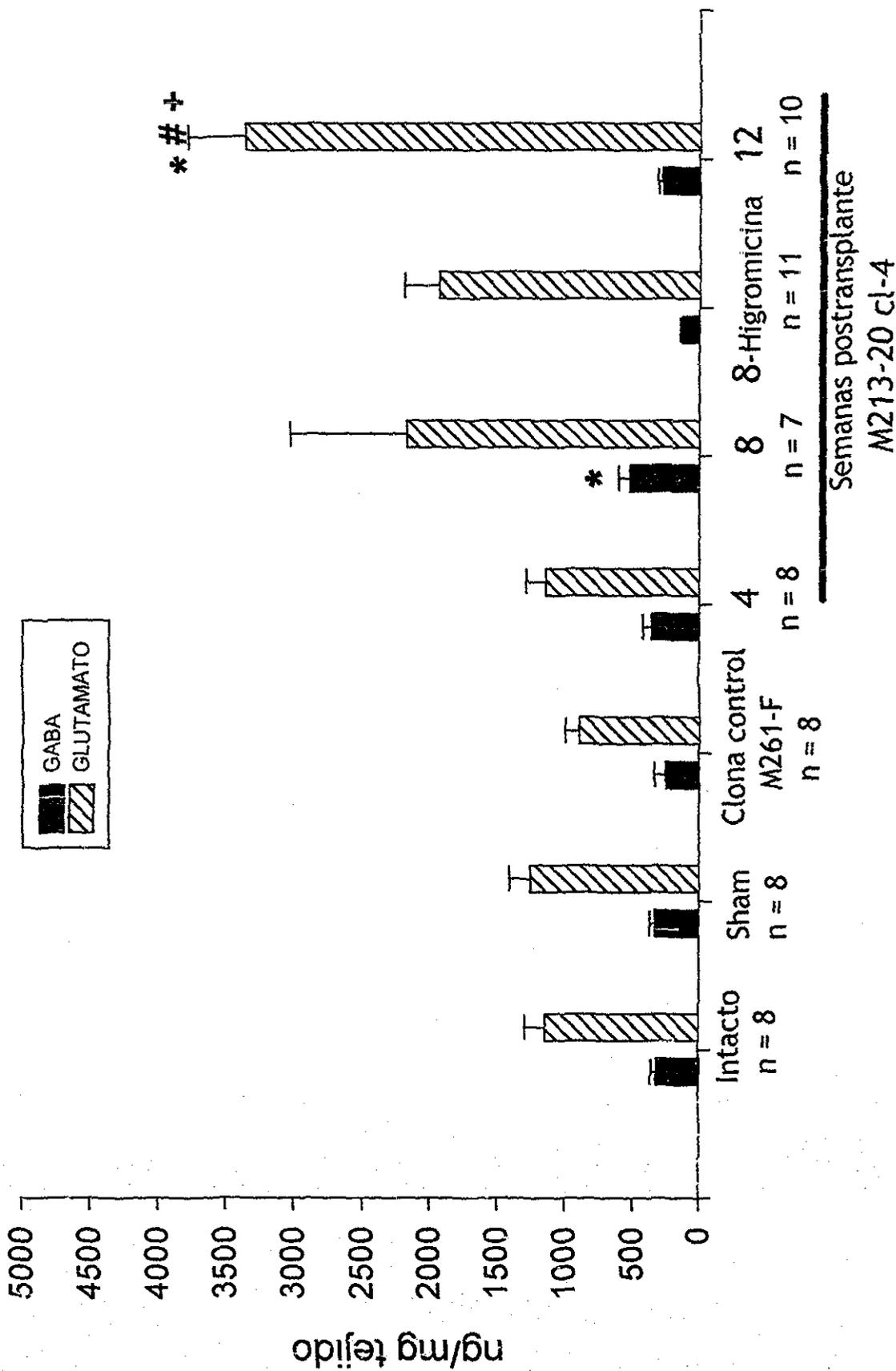
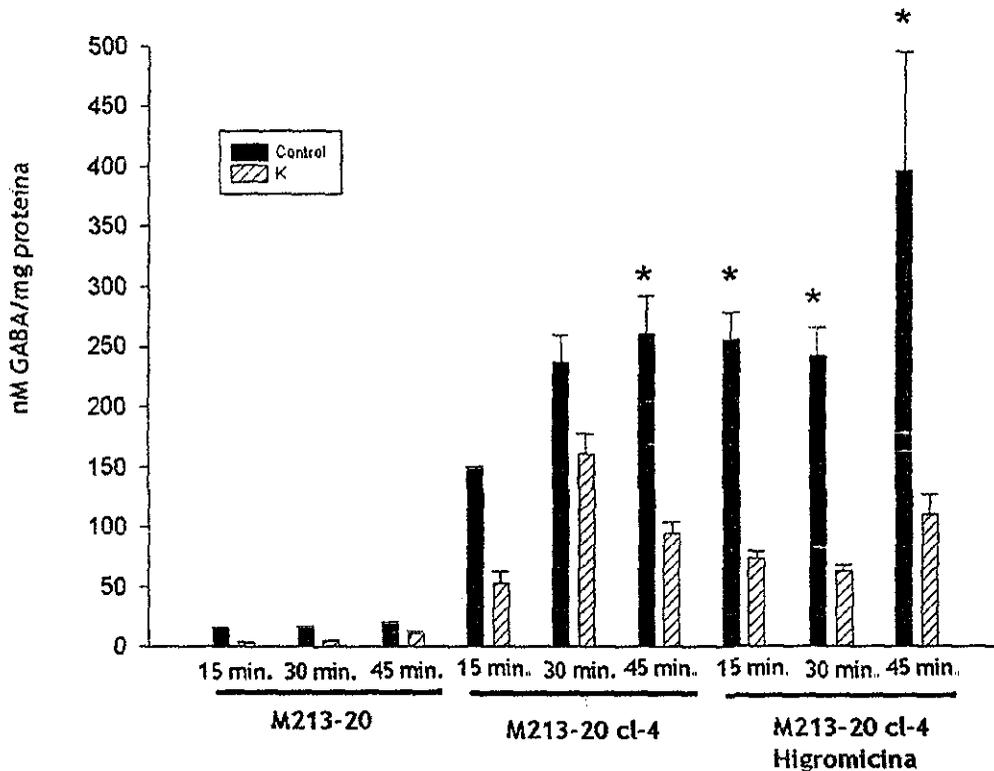


Figura 13. Determinación cromatográfica de GABA y glutamato en los homogenizados de amígdala en las ratas transplantadas y controles.

+ Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo intacto ( $p < 0.05$ )

# Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo sham ( $p < 0.05$ )

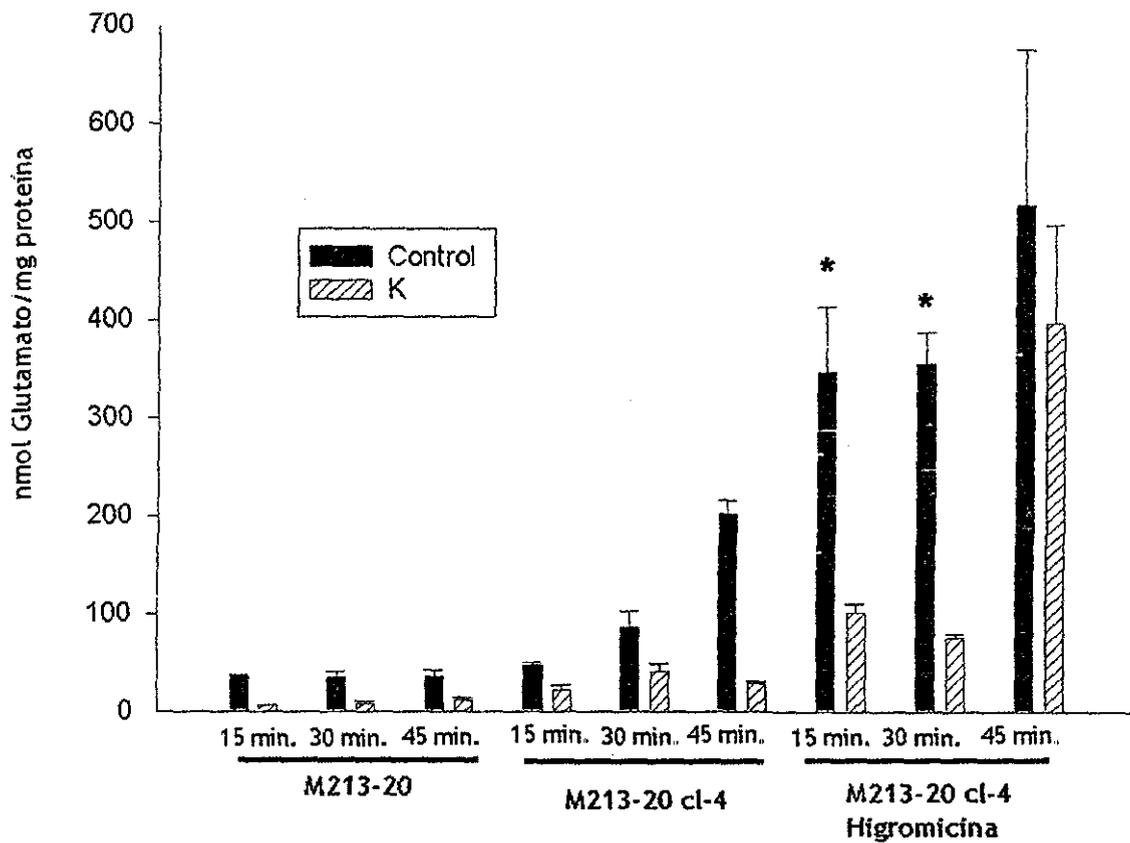
\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo transplantado con la clona M261-F ( $p < 0.05$ )



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 14.** Pruebas de Liberación de GABA por estímulo de alto potasio de la clona M213-20 control y M213-20 cl-4 (seleccionada y sin seleccionar con higromicina). Al realizar el análisis estadístico se encontró un efecto significativo debido al grupo, siendo los valores encontrados para la clona control significativamente menores a los que se presenta la clona transfectada ( $F_{(2,20)} = 57.70$ ;  $p < 0.05$ ). De igual manera se encontró un efecto significativo debido al tiempo de estimulación con potasio, siendo el tiempo de 45 minutos significativamente mayor al de 15 minutos pero sin diferir del de 30 minutos ( $F_{(2,20)} = 57.70$ ;  $p < 0.05$ ).

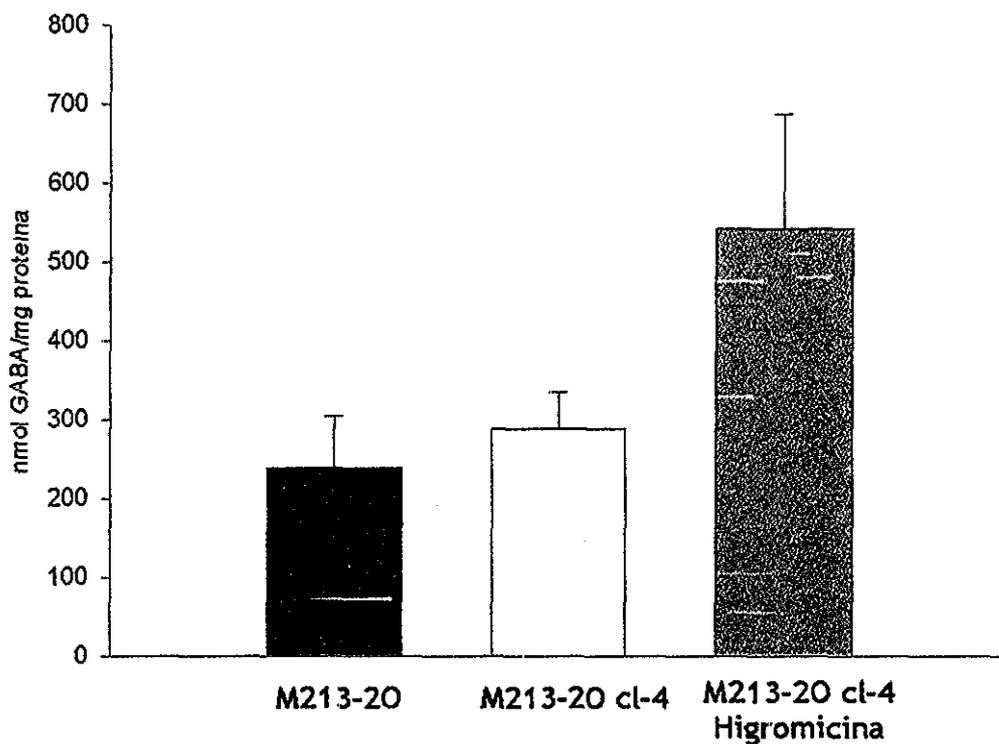
(\*) Diferencia estadísticamente significativamente entre los valores control vs.  $K^+$  en los diferentes tiempos de estimulación con potasio en las líneas celulares probadas ( $F_{(1,20)} = 144.87$ ;  $p < 0.05$ ); siendo las concentraciones obtenidas para el control mayores que para las muestras obtenidas por el estímulo de potasio.



**Figura 15.** Pruebas de Liberación de glutamato por estímulo de alto potasio de la clona M213-20 control y M213-20 cl-4 (seleccionada y sin seleccionar con higromicina).

(\*) Diferencia estadísticamente significativa entre los valores control vs. K en los diferentes tiempos de estimulación con potasio en las líneas celulares probadas ( $F_{(1,18)}=29.67$ ;  $p<0.05$ ); siendo las concentraciones obtenidas para el control mayores que para las muestras obtenidas por el estímulo de potasio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 16.** Determinación cromatográfica de GABA total en las clonas M213-20 (control sin transgén) y M213-20 cl-4 (seleccionada y sin seleccionar con higromicina). Aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa, se observó que la clona M213-20 cl-4 seleccionada con higromicina tuvo la mayor concentración de este neurotransmisor.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VIII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se analizó el efecto del trasplante de una línea celular inmortalizada productora de GABA en la amígdala de la rata albina, caracterizándola histológica y neuroquímicamente con el fin de evaluar su uso potencial como una herramienta en modelos de restauración neuronal. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos indican que el trasplante de la clona M213-20 cl-4 presenta una buena integración al tejido huésped, esto queda demostrado con el análisis histológico del injerto realizado con las diversas técnicas ya mencionadas, donde se observa que las células transplantadas se integran al tejido circundante sin tener ningún efecto tumorigénico y con una reacción glial mínima por la cirugía.

Debido a que las células en este estudio se transplantaron como suspensión celular, la migración de éstas a través del tejido huésped fue notoria, dato que ya ha sido reportado por otros grupos de investigadores que han realizado trasplantes neuronales de células en suspensión, donde las células transplantadas llegan a migrar hasta 1.5 - 2.5 mm del sitio de inyección (Lundberg, C. et al., 1997; Rubio, F.J. et al., 2000). En este caso las células de la clona M213-20 cl-4, migraron en dirección dorsal a través de la cápsula externa.

En cuanto los resultados obtenidos cromatográficamente de la concentración de GABA en los homogenizados de la amígdalas de los animales transplantadas, podemos concluir que es hasta las 8 semanas cuando las células se ha integrado completamente con el tejido circundante favoreciendo la liberación de GABA en mayor concentración. Contrario a lo anterior, en el tiempo postransplante de 12 semanas donde se esperaba una concentración mayor del aminoácido o al menos similar a la de los trasplantes de 8 semanas, se encontró que los niveles de éste bajan, incluso presenta niveles menores que los presentados por los trasplantes de 4 semanas. Esto probablemente se deba a la

migración que presenta el injerto, ya que para realizar la determinación de GABA en HPLC solo se realiza la disección de la amígdala, y en este tiempo postransplante ya existe una gran migración de las células a través de la cápsula externa, por lo que probablemente en el tejido diseccionado quedan sólo algunas de las células transplantadas, lo que se ve reflejado en menores concentraciones de GABA tisular.

En lo referente a los niveles de glutamato obtenidos en la amígdala diseccionada después del transplante se encontró que a diferencia de las concentraciones de GABA, los niveles del glutamato van aumentando gradualmente con respecto al tiempo postransplante, alcanzando una mayor concentración a las 12 semanas postransplante siendo estadísticamente diferente a las concentraciones presentadas por los tres controles utilizados (grupo intacto, falso transplante y transplante con M261-F), probablemente debido a que como se está determinando contenido total podría tratarse de células metabólicamente más activas. Lo anterior puede explicarse gracias a los resultados obtenidos in vitro por las pruebas de liberación con estímulo de alto potasio.

En los experimentos de liberación se encontró que no aumenta la liberación de estos neurotransmisores (GABA y Glutamato) en presencia de altas concentraciones de potasio extracelular. Esto es contrario a lo que se esperaba, ya que en otros estudios usando estas células (Conejero-Goldberg, C. et al., 2000) las mayores concentraciones de estos aminoácidos se presentaron en las muestras estimuladas con el amortiguador con altas concentraciones de potasio. En el presente estudio se realizaron de igual forma las pruebas de liberación de GABA (utilizando también un amortiguador de alta concentración de potasio similar al nuestro) y la determinación de GABA total en las mismas líneas celulares. Conejero y cols. (2000) observaron que en las pruebas de liberación a los 15 minutos después de la aplicación del potasio extracelular existe una mayor concentración de GABA en el sobrenadante de los cultivos de la clona M213-20 cl-4 que en los de M213-20 en una proporción de 23:1 (M213-20 cl-4/M213-20) y a los 30

minutos de la aplicación del estímulo de 52:1 (M213-20 cl-4/M213-20). En nuestros experimentos las proporciones de liberación de GABA M213-20 cl-4/M213-20 fueron menores, ya que a los 15 minutos después del estímulo se obtuvo una proporción de 19:1 y a los 30 minutos de 12:1, siendo estas considerablemente menores que las reportadas en el trabajo previo. De la misma forma la proporción obtenida de GABA total difiere enormemente. En los experimentos realizados por Conejero y cols. (2000) se encontró una proporción de contenido de GABA total de 48:1 de la línea celular transfectada M213-20 cl-4, con respecto a la clona sin transfectar M213-20, mientras que nuestros resultados revelaron una proporción de solo 3:1 (M213-20 cl-4/M213-20).

Los resultados anteriores sugieren que tal vez la membrana de estas células presenta cierto deterioro causado por la múltiple resiembra de las células, que le impide responder adecuadamente al estímulo presentado, produciendo una liberación no regulada del neurotransmisor. Otra explicación a la falta de respuesta de las células al potasio, es que probablemente el potencial de membrana de reposo de estas se encontraba en valores más negativos a los normales (-60mV). Esto tendría como consecuencia que al aplicar el estímulo de potasio, el potencial no aumentara lo suficiente para provocar la apertura de los canales de calcio y como consecuencia la liberación del neurotransmisor.

Esto nos lleva a pensar que existe tal vez una disminución en la actividad de la enzima GAD, que se está traduciendo en una baja producción de GABA, lo cual aunado a una alteración en la membrana celular, tal vez debida al gran número de resiembras que han sufrido estas células desde su transfección, tenga como resultado que no exista un incremento de la concentración de GABA ni *in vitro* ni *in situ*.

La concentración de glutamato proveniente de las células transfectadas tanto en los experimentos *in vitro* como los experimentos *in situ*, nunca había sido reportada para

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

esta línea celular. Según el análisis histológico de los trasplantes, las altas concentraciones de este neurotransmisor no están causando un efecto excitotóxico en el tejido circundante ya que no se observó ninguna lesión alrededor del trasplante que indicara excitotoxicidad causada por el trasplante. Probablemente el tejido circundante tolera las altas concentraciones de este neurotransmisor gracias a su recaptura por parte de las células gliales o tal vez la alta concentración de este neurotransmisor sólo indique que se trata de células metabólicamente más activas.

Nuestro estudio aporta conocimientos muy valiosos sobre el comportamiento de estas células tanto *in vitro* como *in situ*. Los resultados obtenidos nos indican que es necesario realizar más experimentos para conocer la funcionalidad de estas células antes de ser empleadas en un modelo conductual, ya que es necesario primero evaluar la actividad de la enzima GAD para asegurarnos que además de una alta expresión transgénica, este producto sea funcional.

Los resultados obtenidos en los experimentos de liberación en respuesta a potasio, contrastan con los datos que presentan Conejero y cols. (Conejero-Goldberg, C. et al., 2000). Este grupo encontró un claro aumento en los niveles de GABA total y así como su liberación por estímulo de alta concentración de potasio. En consecuencia, y dado que actualmente la línea celular ha presentado serios problemas en cuanto a su cultivo, como el no llegar a confluencia y no presentar la morfología descrita anteriormente (Conejero-Goldberg, C. et al., 2000), es posible que la expresión del transgén ya no sea la apropiada por una baja en la regulación de su transcripción (Snyder, E.Y. et al., 1992; Onifer, S.M. et al., 1993).

Uno de las conclusiones importantes de este estudio es que es necesario realizar una nueva transfección del cDNA del GAD67h en líneas celulares inmortalizadas, y conservar una cantidad importante de las primeras siembras de la clona que exprese

establemente el transgén y tenga las características neuroquímicas deseadas para usarla en estudios posteriores.

## REFERENCIAS

- Alheid, G. F., De Olmos, J. D. & Beltramino, C. A. 1995. Amygdala and extended amygdala. En: Paxinos, G. *The rat nervous system*, (pp. 495-578): Academic Press.
- Amaral, D. G., Prince, J. L., Pitkänen, A. & Carmichel, S. I. 1992. Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. En: Aggleton, J. P. *The amygdala*, (pp. 1-66): Wiley-Liss.
- Armstrong, R. J., Watts, C., Svendsen, C. N., Dunnett, S. B. & Rosser, A. E. 2000. Survival, neuronal differentiation, and fiber outgrowth of propagated human neural precursor grafts in an animal model an animal model of Huntington's disease. *Cell Transplantation*, **9**, 55-64.
- Ault, B. & Nadler, J. V. 1983. Physiological evidence for two pharmacologically distinct, bicuculline-insensitive actions of GABA in rat hippocampal slice. *Soc. Neurosci., Abstr.* **9**, 411.
- Barry, D. I., Wanscher, B., Kragh, J., Bolwig, T. G., Kokaia, M., Brundin, P., Bjorklund, A. & Lindvall, O. 1989. Grafts of fetal locus coeruleus neurons in rat amygdala-piriform cortex suppress seizure development in hippocampal kindling. *Exp Neurol*, **106**, 125-32.
- Björklund, A. & Dunnet, S. B. 1992. Neural transplantation in adult rats. En: Dunnet, S. B. & Björklund, A. *Neural Transplantation. A practical Approach.*, (pp. 57-78): IRL Press.
- Bjorklund, A. & Stenevi, U. 1979. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res*, **177**, 555-60.
- Bormann, J. 2000. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 16-9.
- Brailowsky, S. 1998. Los transplantes de células en el sistema nervioso. En: *El cerebro averiado*, (pp. 163-191): Fondo de cultura economica.
- Carpenter, M. B. 1991. Vías olfatorias, formación del hipocampo y amígdala. En: *Neurpanatomía. Fundamentos*: Editorial Medica Panamericana.

- Cattaneo, E. & McKay, R. 1991. Identifying and manipulating neuronal stem cells. *Trends Neurosci*, **14**, 338-40.
- Cepko, C. L. 1989. immortalization of neural cells via retrovirus-mediated oncogene transduction. *Annu Rev Neurosci*, **12**, 47-65.
- Conejero-Goldberg, C., Tornatore, C., Abi-Saab, W., Monaco, M. C., Dillon-Carter, O., Vawter, M., Elsworth, J. & Freed, W. 2000. Transduction of human GAD67 cDNA into immortalized striatal cell lines using an Epstein-Barr virus-based plasmid vector increases GABA content. *Exp Neurol*, **161**, 453-61.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E. & Roth, R. H. 1996. Aminoacid transmitters. En: *The biochemical basis of neuropharmacology*, (pp. 126-193). New York: Oxford University Press.
- Chan, S. O., Lyman, W. D. & Chiu, F. C. 1997. Temporal and spatial expression of glutamic acid decarboxylases in human fetal brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **46**, 318-20.
- Chandran, S. & Svendsen, C. N. 2000. Neural Stem cells for transplantation. En: Dunnet, S. B., Boulton, A. A. & Baker, G. B. *Neural Transplantation Methods*, (pp. 41-54). Totowa, NJ: Humana Press<sup>o</sup>.
- DeLorey, T. M. & Olsen, R. W. 1994. GABA and Glycine. En: Siegel, G. J. *Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, (pp. 389-399): Rave Press.
- Dunnet, S. B. 1998. Neural Transplantation. En: Bulton, A. A., Baker, C. G. & Bateson, A. N. *Neuromethods*, (pp. 55-87): Humana Press Inc.
- Eaton, M. J., Plunkett, J. A., Martinez, M. A., Lopez, T., Karmally, S., Cejas, P. & Whittemore, S. R. 1999. Transplants of neuronal cells bioengineered to synthesize GABA alleviate chronic neuropathic pain. *Cell Transplant*, **8**, 87-101.
- Emerich, D. F. & Granholm, L. 1998. Recent advances in neural transplant research. *Cell Transplantation*, **7**, 83-85.
- Erdo, S. L. & Bowery, N. G. 1986. GABAergic mechanisms in the mammalian periphery. En: New York: Raven Press.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Erlander, M. G., Tillakaratne, N. J., Feldblum, S., Patel, N. & Tobin, A. J. 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, **7**, 91-100.
- Esclapez, M., Tillakaratne, N. J., Kaufman, D. L., Tobin, A. J. & Houser, C. R. 1994. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci*, **14**, 1834-55.
- Fink, J. S., Schumacher, J. M., Ellias, S. L., Palmer, E. P., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., H.S., K., Dempsey, P. K., Fischman, A. J., Raineri, R., Manhart, C., Dinsmore, J. & Isacson, O. 2000. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplantation*, **9**, 273-278.
- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Isai, W. Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q., Eidelberg, D. & Fahn, S. 2001. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*, **344**, 710-9.
- Freed, W. J. 1993. Neural transplantation: a special issue. *Exp Neurol*, **122**, 1-4.
- Fricker, R. A., Carpenter, M. K., Winkler, C., Greco, C., Gates, M. A. & Bjorklund, A. 1999. Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci*, **19**, 5990-6005.
- Gage, F. H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science*, **287**, 1433-8.
- Gage, F. H., Fisher, L. S., Jinnah, H. A., Rosenberg, M. B., Iusynski, M. H. & Friedmann, I. 1990. Grafting genetically modified cells to the brain: conceptual and technical issues. *Progress in Brain Research*, **82**, 1-10.
- Gaiano, N. & Fishell, G. 1998. Transplantation as a tool to study progenitors within the vertebrate nervous system. *J Neurobiol*, **36**, 152-61.
- Gash, D. M. 1984. Neural transplants in mammals. A historical overview. En: Sladek, J. R. & Gash, D. M. *Neural Transplants. Development and Function.*, (pp 1-12). New

York: plenum Press.

- Giordano, M. & Freed, W. J. 1995. An overview of transplantation techniques in small animals. En: Ricordi, C. *Methods in Cell Transplantation*: R.G. Landes Company.
- Giordano, M., Hagenmeyer-Houser, S. H. & Sanberg, P. R. 1988. Intraparenchymal fetal striatal transplants and recovery in kainic acid lesioned rats. *Brain Res*, **446**, 183-8.
- Giordano, M., Takashima, H., Herranz, A., Poltorak, M., Geller, H. M., Marone, M. & Freed, W. J. 1993. Immortalized GABAergic cell lines derived from rat striatum using a temperature-sensitive allele of the SV40 large T antigen. *Exp Neurol*, **124**, 395-400.
- Giordano, M., Takashima, H., Poltorak, M., Geller, H. M. & Freed, W. J. 1994. Development of immortalized cell lines for transplantation in central nervous system injury and degenerations models. *Methods in Neurosciences*, **21**, 308-325.
- Giordano, M., Takashima, H., Poltorak, M., Geller, H. M. & Freed, W. J. 1996. Constitutive expression of glutamic acid decarboxylase (GAD) by striatal cell lines immortalized using the tsA58 allele of the SV40 large T antigen. *Cell Transplant*, **5**, 563-75.
- Heath, C. A. 2000. Cells for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, **18**, 17-9.
- Herranz, A. S., Lerma, J. & Martin del Rio, R. 1984. Determination of gamma-aminobutyric acid in physiological samples by a simple, rapid high-performance liquid chromatographic method. *J Chromatogr*, **309**, 139-44.
- Horellou, P., Marlier, L., Privat, A., Darchen, F., Scherman, D., Henry, J. P. & Mallet, J. 1990. Exogeneous expression of L-dopa and dopamine in various cell lines following transfer of rat and human tyrosine hydroxylase cDNA: grafting in an animal model of Parkinson's disease. *Prog Brain Res*, **82**, 23-32.
- Jat, P. S., Cepko, C. L., Mulligan, R. C. & Sharp, P. A. 1986. Recombinant retroviruses encoding simian virus 40 large T antigen and polyomavirus large and middle T antigens. *Mol Cell Biol*, **6**, 1204-17.
- Johnston, G. A. R. 1997. Molecular Biology, Pharmacology, and Physiology of GABAC

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- receptors. En: Enna, S. J. & Bowery, N. G. *The GABA Receptors.*: Humana Press.
- Kaufman, D. L., Houser, C. R. & Tobin, A. J. 1991. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem*, **56**, 720-3.
- Koutouzis, T. K., Emerich, D. F., Borlongan, C. V., Freeman, T. B., Cahill, D. W. & Sanberg, P. R. 1994. Cell transplantation for central nervous system disorders. *Crit Rev Neurobiol*, **8**, 125-62.
- Lewin, R. 1987. Dramatic results with brain grafts. *Science*, 247-245.
- López, L. A. 1995. Sistema Olfatorio. En: *Anatomía Funcional del Sistema Nervioso*. México: Limusa.
- Loscher, W., Ebert, U., Lehmann, H., Rosenthal, C. & Nikkhah, G. 1998. Seizure suppression in kindling epilepsy by grafts of fetal GABAergic neurons in rat substantia nigra. *J Neurosci Res*, **51**, 196-209.
- Lundberg, C., Martínez-Serrano, A., Cattaneo, E., McKay, R. D. G. & Björklund, A. 1997. Survival, Integration, and Differentiation of Neural Stem Cell Lines after Transplantation to the Adult Rat Striatum. *Experimental Neurology*, **145**, 342-360.
- Martinez, M., Mercado, O., Santamaria, A., Galvan, S., Vazquez, M., Bucio, V., Hall, C., Hernandez, R., Hurtazo, A., Pego, E., Rodriguez, F., Salvatierra, R., Sosa, A. & Rios, C. 1998. The action of anfepramone on neurochemical and behavioral markers in rats. *Proc West Pharmacol Soc*, **41**, 125-7.
- Masson, J., Sagne, C., Hamon, M. & El Mestikawy, S. 1999. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev*, **51**, 439-64.
- McKay, R. 1997. Stem cells in the central nervous system. *Science*, **276**, 66-71.
- Mizuguchi, H., Hosono, T. & Hayakawa, T. 2000. Long-term replication of Epstein-Barr virus-derived episomal vectors in the rodent cells. *FEBS Lett*, **472**, 173-8.
- Mohler, H., Benke, D. & Fritschy, J. M. 2001. GABA(B)-receptor isoforms molecular architecture and distribution. *Life Sci*, **68**, 2297-300.
- Nakao, N. & Itakura, T. 2000. Fetal tissue transplants in animal models of Huntington's

- disease: the effects on damaged neuronal circuitry and behavioral deficits. *Prog Neurobiol*, **61**, 313-38.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R. & Gage, F. H. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, **272**, 263-267.
- New, K. C., Gale, K., Martuza, R. L. & Rabkin, S. D. 1998. Novel synthesis and release of GABA in cerebellar granule cell cultures after infection with defective herpes simplex virus vectors expressing glutamic acid decarboxylase. *Brain Res Mol Brain Res*, **61**, 121-35.
- Olson, L., Björklund, A. & Hoffer, B. J. 1984. Camera Bulbi anterior. New vistas on a classical locus for neural tissue transplantation. En: Sladek, J. R. & Gash, D. M. *Neural transplants. Development and function.*, (pp. 125-165): Plenum Press.
- Onifer, S. M., White, L. A., Whittemore, S. R. & Holets, V. R. 1993. In vitro labeling strategies for identifying primary neural tissue and a neuronal cell line after transplantation in the CNS. *Cell Transplant*, **2**, 131-49.
- Palmero, S., de Marchis, M., Prati, M. & Fugassa, E. 1992. HPLC analysis of free amino acids and amino acids of total proteins in cultured cells: an application to the study of rat Sertoli cell protein metabolism. *Anal Biochem*, **202**, 152-8.
- Renfranz, P. J., Cunningham, M. G. & McKay, R. D. 1991. Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell*, **66**, 713-29.
- Rouget, P., Bert, M., Borde, I. & Evrard, C. 1992. Generation of neural cell lines by transfer of viral oncogenes. En: Wood, J. N. *Neural cell lines. A practical approach.*, (pp. 27-54): IRL press.
- Rubio, F. J., Bueno, C., Villa, A., Navarro, B. & Martinez-Serrano, A. 2000. Genetically perpetuated human neural stem cells engraft and differentiate into the adult mammalian brain. *Mol Cell Neurosci*, **16**, 1-13.
- Schinstine, M. & Gage, F. 1993. Factors affecting proviral expression in primary cells

grafted in primary cells grafted into CNS. En: Waxman, S. G. , (pp. 311-323). New York: Raven Press, Ltd.

Sheikh, S. N., Martin, S. B. & Martin, D. L. 1999. Regional distribution and relative amounts of glutamate decarboxylase isoforms in rat and mouse brain. *Neurochem Int*, **35**, 73-80.

Shihabuddin, L. S., Palmer, I. D. & Gage, F. H. 1999. The search for neural progenitor cells: prospects for therapy of neurodegenerative disease. *Molecular Medicine Today*, **5**, 474-480.

Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, I. & Gould, E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, **410**, 372-6.

Sigal, S. H., Brill, S., Fiorino, A. S. & Reid, L. M. 1992. The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol*, **263**, G139-48.

Snyder, E. Y., Deitcher, D. L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartwig, E. A. & Cepko, C. L. 1992. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell*, **68**, 33-51.

Soghomonian, J. J. & Martin, D. L. 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci*, **19**, 500-5.

Spink, D. C., Porter, I. G., Wu, S. J. & Martin, D. L. 1987. Kinetically different, multiple forms of glutamate decarboxylase in rat brain. *Brain Res*, **421**, 235-44.

Stein, D. G., Brailowsky, S. & Will, B. 1995. Brain transplants as therapy for brain injuries? En: *Brain Repair*, (pp. 87-103): Oxford University Press.

Suhonen, J. O., Peterson, D. A., Ray, J. & Gage, F. H. 1996. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature*, **383**, 624-7.

Svensden, C. N., Caldwell, M. A., Shen, J., ter Borg, M. G., Rosser, A. E., Tyers, P., Karmioli, S. & Dunnett, S. B. 1997. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, **148**, 135-46.

- Svendsen, C. N. & Smith, A. G. 1999. New prospects for human stem cell-therapy in the nervous system. *Trends in Neuroscience*, **22**, 357-364.
- Temple, S. & Alvarez-Buylla, A. 1999. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, **9**, 135-141.
- Thode, S., Raymon, H. K. & F.H., G. 1998. Somatic gene transfere and cell transplantation strategies for neurodegenerative diseases. En: Freeman, T. B. & Widner, H. *Cell Transplantation for Neurobilogical Disorders: Toward reconstruction of the human central nervous system*, (pp. 303-331). Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Thompson, K., Anantharam, V., Behrstock, S., Bongarzone, E., Campagnoni, A. & Tobin, A. J. 2000. Conditionally immortalized cell lines, engineered to produce and release GABA, modulate the development of behavioral seizures. *Exp Neurol*, **161**, 481-9.
- Ueno, H. 2000. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **10**, 67-79.
- Villa, A., Snyder, E. Y., Vescovi, A. & Martínez-Serrano, A. 2000. Establishment and Properties of a Growth Factor-Dependent, Perpetual Neural Stem Cell Line from the Human CNS. *Experimental Neurology*, **161**, 67-84.
- Wainer, B. H. & Heller, A. 1992. Neural hybrid cell lines: generation, characterization and utility. En: Wood, J. N. *Neural cell lines. A practical approach.*: The practical approach series. IRL Press.
- Whittemore, S. R., Holets, V. R., Keane, R. W., Levy, D. J. & McKay, R. D. 1991. Transplantation of a temperature-sensitive, nerve growth factor- secreting, neuroblastoma cell line into adult rats with fimbria-fornix lesions rescues cholinergic septal neurons. *J Neurosci Res*, **28**, 156-70.
- Yandava, B. D., Billingham, L. L. & Snyder, E. Y. 1999. "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7029-34.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## LISTA DE TABLAS

**TABLA 1.** Tipos celulares que pueden ser usados en trasplantes Intracerebrales.

**TABLA 2.** Técnicas utilizadas para introducir transgenes en células destinadas para trasplante.

**TABLA 3.** Sistemas de Promotores usados para la regulación de la expresión transgénica.

**TABLA 4.** Tipos de Receptores GABAérgicos.

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1.** Procedimiento para la generación de líneas celulares inmortalizadas para su uso en trasplantes.

**FIGURA 2.** Diferentes clases de células troncales que pueden dar lugar a neuronas, así como su fuente y limitaciones.

**FIGURA 3.** Diferentes técnicas utilizadas para la realización de trasplantes en el sistema nervioso central.

**FIGURA 4.** Reacciones de síntesis, conservación y metabolismo de GABA.

**FIGURA 5.** Comparación entre las dos isoformas de GAD.

**FIGURA 6.** Terminal sináptica GABAérgica.

**FIGURA 7.** Distribución y localización de las células transplantadas a los diferentes tiempos post-trasplante.

**FIGURA 8.** Las células marcadas con bisbenzimidida (Hoescht 33342) a los diferentes tiempos después del trasplante.

**FIGURA 9.** Localización del trasplante utilizando la técnica de Nissl. Observación de las células transplantadas en el área de la amígdala, no se observaron reacciones gliales, necróticas o tumoraciones

**FIGURA 10.** Utilizando la técnica de Nissl se pudieron observar las células transplantadas, las cuales poseen una morfología y tamaño diferente de las células del tejido circundante.

**FIGURA 11.** Análisis inmunohistoquímico para GAD67 en las ratas transplantadas. La localización de las células GAD67 (+) del trasplante coinciden con la de las células marcadas con bisbenzimidida observadas con microscopía de fluorescencia.

**FIGURA 12.** Análisis inmunohistoquímico de GFAP en las ratas transplantadas a los tres diferentes tiempos postransplante.

**FIGURA 13.** Determinación cromatográfica de GABA y glutamato en los homogenados de la amígdala en las ratas transplantadas y controles.

**FIGURA 14.** Pruebas de Liberación de GABA por estímulo de alto potasio en la clona M213-20 cl-4 seleccionada con higromicina y sin seleccionar, así como de la clona control sin el transgén.

**FIGURA 15.** Pruebas de Liberación de glutamato por estímulo de alto potasio de la clona M213-20 cl-4 seleccionada con higromicina y sin seleccionar, así como la de la clona control sin el transgén.

**FIGURA 16.** Determinación cromatográfica de la concentración de GABA total en las clonas M213-20 (clona control) y M213-20 cl-4 seleccionada y sin seleccionar con higromicina

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## APÉNDICES

### APÉNDICE I. Preparación de las células a transplantar

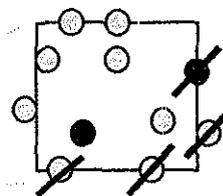
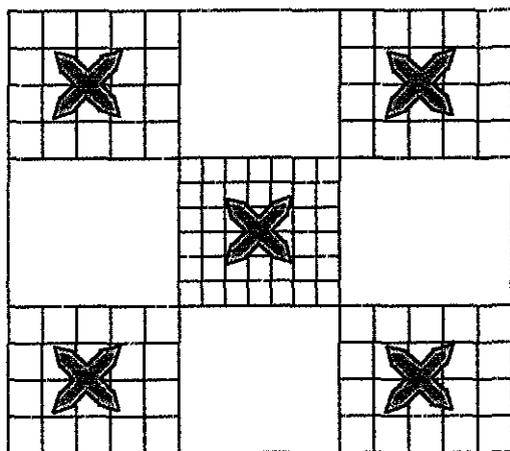
Para la preparación de las células a transplantar se sigue el siguiente protocolo. Se descongelan las células y se siembran en frascos de 25cm<sup>2</sup>. Cuando han alcanzado una confluencia del 90% se separan utilizando Tripsina/EDTA y se resiembran en un frasco de 75 cm<sup>2</sup> y continúan incubándose a 33°C y 5%CO<sub>2</sub>. Una vez que se haya llegado a una confluencia aproximada del 80% se realiza el paso del cultivo a condiciones no permisibles (39.5°C y 5% CO<sub>2</sub>) en las cuales debe permanecer como mínimo por tres días.

El día del trasplante se disocian con tripsina/EDTA y se centrifugan. El botón celular se resuspende en un volumen de medio completo conocido (3 ml). Se realiza el conteo de las células utilizando Azul de Tripano. Conociendo el número de células totales, se resuspenden en un volumen adecuado de medio de cultivo con una concentración de 5µM de bisbenzimidá. Se incuban a 39.5°C por 30 minutos y posteriormente se centrifugan y se realizan tres lavados con medio de cultivo completo. Al final se resuspenden en un volumen de medio adecuado para obtener la concentración requerida para el trasplante.

## APÉNDICE II. Conteo de células

Preparar la suspensión de células en una solución de sales balanceada, como Hanks o en su caso medio de cultivo. Transferir 0.5 ml de 0.4% de azul de tripan (w/v) a un tubo de ensaye, añadir 0.3 ml de solución de Hanks o medio de cultivo y 0.2 ml de la suspensión celular (factor de dilución 5) mezclar y dejar reposar de 5-15 min.

Poner una pequeña cantidad en las cámaras del hematocitómetro con el cubreobjetos puesto. Deben llenarse bien las cámaras. Contar las células en el 1 milímetro cuadrado del centro y en los 4 cuadrantes. Las células no viables se ven de color azul. Contar las células en la parte superior izquierda que toquen la línea por medio del perímetro de cada cuadrado. No contar las células que estén afuera de la línea de la parte inferior de la derecha (Ver figura)



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Contar en las dos cámaras. Si más del 10% de las células se encuentran agrupadas se repite el procedimiento agitando y pipeteando vigorosamente la suspensión de las células así como la mezcla con azul de tripan. Si hay mas de 200 o más de 500 células por cuadro se repite el procedimiento ajustando a un factor de dilución apropiado.

Cada cuadro del hematocitómetro con el cubreobjetos puesto representa un volumen

total de  $0.1 \text{ mm}^3$  o  $10^{-4} \text{ cm}^3$ . Ya que  $1 \text{ cm}^3$  equivale a  $1 \text{ ml}$ , la concentración por mililitro (y el # total de células) se determina por el siguiente calculo:

$$\text{cel/ml} = (\text{X cuadrado})(\text{factor de dilución}) \times 10^4$$

$$\text{células totales} = (\text{cel/ml})(\text{vol. Original de la suspensión})$$

**Viabilidad: %total de las células viables (no teñidas) entre células totales x 100**

### APÉNDICE III. Soluciones amortiguadoras para pruebas de liberación de GABA y GABA total

Para realizar la determinación de GABA total en los cultivos es necesario preparar una solución de ácido sulfosalicílico 35%. Para la prueba se lavan las células con solución balanceada de Hanks o solución salina y se agregan 0.5 ml de ácido sulfosalicílico al 35% y se incuban a temperatura ambiente por 20 minutos. Después de la incubación se adicionan 0.5 ml de ácido sulfosalicílico, se separan las células de los frascos y se transfieren a tubos Eppendorf y se incuban toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifuga y el sobrenadante se colecta y tanto el sobrenadante como el pellet se mantienen a -70°C.

Para las pruebas de liberación por estímulo de potasio es necesario preparar los siguientes amortiguadores con las concentraciones descritas de cada uno de los compuestos.

<u>Alto Potasio</u>	<u>Sin Potasio (CONTROL)</u>
1.0 mM MgCl <sub>2</sub>	1.0 mM MgCl <sub>2</sub>
1.18 mM CaCl <sub>2</sub>	1.18 mM CaCl <sub>2</sub>
3.0 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
50 mM KCl	144 mM NaCl
94 mM NaCl	10 mM Hepes
10 mM Hepes	5 mM glucosa
5 mM glucosa	

Estas soluciones son los amortiguadores que se aplican a los cultivos según la técnica descrita en el texto.

#### APÉNDICE IV. Determinación de proteínas por el Método de Bradford

1.- Preparar la solución stock de Albúmina Sérica Bovina (BSA) para la curva con una concentración de 0.1g/l. En 107.9l ( 150g) de la solución comercial de BSA (1.39 mg/ml). Tomar los diferentes volúmenes de las concentraciones requeridas. La curva se hace por triplicado.

2.- Medir las diferentes volúmenes de agua desionizada dependiendo de las diluciones requeridas.

3.- Se agrega el reactivo de Bradford (200 $\mu$ l) a cada tubo.

4.- Se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos.

Tubo	Concentración de BSA $\mu$ g/ml	Volumen de BSA ( $\mu$ l)	Agua desionizada ( $\mu$ l)	Reactivo de Bradford ( $\mu$ l)
1	0	0	800	200
2	1	5	795	200
3	2	10	790	200
4	4	20	780	200
5	8	40	760	200
6	10	50	750	200
7	12	60	740	200
8	----	5 $\mu$ l de la muestra	795	200

5.- Se mide la absorción a 590 nm (espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis, Spectometer Lambda Bio)

6.- Graficar los valores de absorbancia (y) para interpolar los valores sobre la curva de las muestra no conocidas (x).

## APÉNDICE V. Técnica de tinción con violeta de cresilo (Técnica de Nissi)

1. Montar los cortes en los portaobjetos previamente gelatinizados. Dejar secar de 3 a 5 días, para que se adhieran perfectamente.

2. Incubar los cortes en cloroformo absoluto durante 30 minutos bajo la campana de extracción.

3. Pasar los cortes por las siguientes soluciones:

Alcohol 25% (2min)

Violeta de cresilo (7 min)

Alcohol 50% (30 seg)

Alcohol 70% (5 min)

Solución diferenciadora (hasta que vire el color aprox. 30 seg)

Alcohol 95% (1 min)

Alcohol absoluto (1 min)

Alcohol:Xilol (30 seg)

Xilol (2 min)

4. Cubrir con resina

NOTA: Preparar la solución de violeta de cresilo, disolviendo 0.25g del reactivo en 100 ml de alcohol al 25%. La solución diferenciadora es 300 ml de alcohol 70% con 10 gotas de ácido acético)

Para la tinción con violeta de tejido sin profundir se utiliza la siguiente técnica:

1. Montar los cortes en los portaobjetos previamente gelatinizados.

2. Pasar las laminillas por las siguientes soluciones:

Alcohol 100% (5 min)

Alcohol 100% - Cloroformo (1:1) (10 min)

Alcohol 100% (5min)

Alcohol 95% (5 min)

Agua destilada (2 min)

Violeta de cresilo (10 min)

Agua destilada (5 min)

Alcohol 70% (2x2 min)

Solución diferenciadora alcohol 95% + 5 gotas de ácido acético (1 min. O menos)

alcohol 95% (sumergir rápidamente 3-5 veces)

Alcohol 100% (2x2 min)

Alcohol 100% (2x2 min)

Xyleno

3. Cubrir con permount o DPX

NOTA: Para preparar la solución de violeta de cresilo se emplea 2.5g de acetato de violeta de cresilo (82% de la tinción total) 100 ml de agua destilada. Filtrar

## APÉNDICE VI. Técnica Inmunohistoquímica para Glutamato Descarboxilasa (GAD67)

Se realizan cortes de 30-40  $\mu\text{m}$ , los cuales se mantienen en anticongelante hasta su procesamiento. La técnica utilizada para la determinación inmunohistoquímica de GAD es la siguiente:

1. Tres lavados con TBS (20 min)
2. Incubar con NGS 3%, 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  en TBS (30 min.)
3. Tres lavados con TBS (30 min)
4. Triton X 1% en TBS con 1% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 min)
5. DMSO 1% en TBS (10 min)
6. Tres lavados con TBS (30 min)

APLICACIÓN DEL ANTICUERPO PRIMARIO (Rabbit Anti-Glutamate decarboxylase, GAD67, Anticuerpo Policlonal, CHEMICON)

7. Dilución 1:1000 de anticuerpo En solución NGS 1% en TBS. Se incuba por 48 horas a 4°C.
8. Después de la incubación se realizan cuatro lavados con NGS 1% en TBS a temperatura ambiente (60 min.)

APLICACIÓN DEL ANTICUERPO SECUNDARIO ( Biotinylated Anti-rabbit IgG (H+L) hecho en cabra, VECTOR)

9. Incubar con el anticuerpo secundario biotinilado (dilución 1:200) en NGS 3%, Triton X 0.3% en TBS.
10. Cuatro lavados con Triton X 0.2% en TBS (60 min.)
11. Preparar ABC 30 minutos antes. Incubar en ABC a temperatura ambiente (90 min.).
12. Cuatro lavados con PBS (45 min.)
13. Incubar con solución DAB (10 min.)
14. Tres lavados con PBS (30 min.)

## APÉNDICE VII. Técnica Inmunohistoquímica para la Proteína Ácida Glial Fibrilar (GFAP)

Se realizan cortes de 30-40  $\mu\text{m}$ , los cuales se mantienen en anticongelante hasta su procesamiento. La técnica utilizada para la determinación inmunohistoquímica de GAD es la siguiente:

1. Dos lavados con TBS (20 min)
2. Borohidrato de sodio al 0.5% (15 min)
3. Tres lavados con TBS (30 min)
4. Triton X 1% en TBS con 1% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 min)
5. DMSO 1% en TBS (10 min)
6. Tres lavados con TBS (30 min)
7. NGS 20%, Triton X 0.3% en TBS (15 min)

APLICACIÓN DEL ANTICUERPO PRIMARIO (Rabbit Anti-Glial fibrillary acidic protein, GFAP, Anticuerpo Policlonal, CHEMICON)

8. Dilución 1:500 de anticuerpo En solución NGS 3%, Triton 0.3% en TBS. Se incuba por 48 horas a 4°C.
9. Después de la incubación se realizan cuatro lavados con NGS 1%, 0.02% Triton X en TBS a temperatura ambiente (60 min.)

APLICACIÓN DEL ANTICUERPO SECUNDARIO ( Biotinylated Anti-rabbit IgG (H+L) hecho en cabra, VECTOR)

10. Incubar con el anticuerpo secundario biotinilado (dilución 1:200) en NGS 3%, Triton X 0.3% en TBS.
11. Cuatro lavados con Triton X 0.2% en TBS (60 min.)
12. Preparar ABC 30 minutos antes. Incubar en ABC a temperatura ambiente (90 min.)
13. Cuatro lavados con PBS (45 min.)
14. Incubar con solución DAB (10 min.)
15. Tres lavados con PBS (30 min.)

## APÉNDICE VIII. Preparación de soluciones comunes

### TBS

Para la preparación de 0.05M Tris-buffer salino pH 7.6, se pesan los siguientes compuestos:

6.06 g Hidrocloruro Trizma

1.39 g Base Trizma

9.0 g NaCl

y se disuelven en un litro de agua desionizada. Se ajusta el pH a 7.6

### PB (Buffer de fosfatos)

Preparar los siguientes stocks:

- Fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0.2 M: pesar 5.52 g en 200 ml de agua destilada.
- Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro) 0.2 M: 25.55 g en 900 ml de agua destilada.

Para obtener 1 litro de PB 0.2M mezclar:

Fosfato de sodio monobásico	190 ml
Fosfato de sodio dibásico	810 ml
Total	1000 ml

Para obtener PB 0.1M mezclar con agua con un volumen igual y ajustar el pH 7.4

### PBS

Preparar 500ml solución salina al 1.8% y se mezcla con 500 ml de PB 0.2M.

Ajustar pH a 7.4

## PARAFORMALDEHIDO

Pesar 40 g de paraformaldehído y diluir en 500 ml de agua destilada previamente calentada a 60°C. Si no se disuelve, agregar NaOH. Diluir con 500 ml de PB 0.2 M. Ajustar pH a 7.4

## GLICEROL PARA MONTAR CORTE PARA FLUORESCENCIA

Pesar o medir los siguientes compuestos:

Azida de sodio	250 mg
Buffer de fosfatos (PBS) 0.1M	5ml
NaCl	0.450 g
Glicerol	ajustar a 50 ml

Se pone azida de sodio y el cloruro de sodio en buffer y se mezclan, añadir 45 ml de glicerol lentamente. Se almacena la solución a 4°C.

## ANTICONGELANTE

Polivinilpirrolidona (PVP-40)	10g
Sucrosa	300g
Etilenglicol	300 ml
TBS	500 ml
Agua destilada	para 1L

Se mezcla la sucrosa y el PVP-40 en el TBS, agregar lentamente el etilenglicol, se llega a un volumen final de 1 litro con agua destilada. La disolución del PVP-40 puede tomar de 1-6 hrs. Se almacena la solución obtenida a 4°C.