



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"EFECTO DE LA PICROTOXINA SOBRE LA ACTIVIDAD
METABOLICA DE LINFOCITOS DEL BAZO DE RATONES CDI"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

OSCAR CARDENAS FLORES



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m. 345342



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

Presidente Prof.: ATONATIU EDMUNDO GOMEZ MARTINEZ

Vocal Prof.: PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ

Secretario Prof.: MA. GUADALUPE REYES GARCIA

1 er sup. Prof.: ENRIQUE ORTEGA SOTO

2 do. sup Prof.: MARIA EVA GONZALEZ TRUJANO


Sitio donde se desarrollo el Tema:

Laboratorio de Investigación de Inmunología,
Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema:

M. en C. Ma GUADALUPE REYES GARCIA 

Supervisor Técnico:

Dr. FERNANDO GARCIA TAMAYO 

Sustentante:

OSCAR CARDENAS FLORES 

DEDICO ESTE TRABAJO A:

Mis padres: Por apoyarme en cada momento y etapa de mi vida, a ti ma por estar siempre junto a mí, en los momentos más difíciles de mi vida y por contar siempre con tu apoyo incondicional, a ti pa por enseñarme a valorar muchas cosas de la vida y a pesar de los errores que he cometido se que siempre cuento contigo GRACIAS por su apoyo, ya que sin él no me hubiera sido posible terminar esta etapa de mi vida.

A mis hermanos: A tí Beto, por el apoyo que me brindas durante todo el tiempo, recuerda que el tiempo pasa muy rápido, y en un abrir y cerrar de ojos pasan muchas cosas disfruta a tu familia y cuidalos mucho.

A ti Cachorro, aunque se que a veces existe un gran abismo entre nosotros sabes que puedes contar conmigo, y aprovecho para darte un consejo, ya conéctate las pilas, por que cuando menos te das cuenta ya paso el tiempo y quisieras que este regresara para cambiar algunas cosas, y cuando te das cuenta de esto, ya pasaron algunos años. Tienes todo para voltear al mundo de cabeza, tienes salud, tienes a mis padres, que como Beto y yo te queremos mucho, así es que no tienes pretexto.

A mi Tía Mica: Por todo el apoyo recibido, por sus consejos y su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, a mí Tío Sergio que a pesar de que ya no esta con nosotros se que nos cuida, gracias por esos momentos felices que me diste cuando era niño a sí como la alegría que me daba cuando venían a la casa.

A ti Abue por esa fortaleza tan grande que tienes y que inspiras.

A ti Gris: Por el apoyo incondicional que me ofreciste durante el tiempo que viviste conmigo por todas las cosas buenas que me enseñaste, que si las escribiría no terminaría. Gracias por los momentos felices que pasamos juntos y sobre todo por darme el tesoro más grande que tengo a Karla. Gracias por todo, eres una gran mujer y vales mucho. Te deseo lo mejor y que dios te bendiga. GRACIAS POR TODO.

A ti hija: Por que eres la razón de mi vida y el motivo por el cual sigo adelante. No olvides que te quiero mucho y que a pesar de las circunstancias siempre estaré contigo en los momentos buenos y malos de la vida.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

II. ANTECEDENTES

- 2.1. El sistema Inmune
 - 2.1.1 Generalidades
 - 2.1.2. Linfocitos T y B
- 2.2. Interacciones neuroinmunológicas
 - 2.2.1. Interacciones entre el sistema nervioso y el sistema inmune
- 2.3. Neurotransmisión en el Sistema Nervioso Central.
 - 2.3.1. El Sistema Nervioso Central.
 - 2.3.2. Neurotransmisores
 - 2.3.3. Neurotransmisores aminoácidos
 - 2.3.4. El Ácido γ -aminobutírico (GABA)
 - 2.3.5. Síntesis y Catabolismo del GABA.
 - 2.3.6. Vías metabólicas alternas del GABA
 - 2.3.7. Receptores de GABA.
 - 2.3.8. Receptor GABA_A
 - 2.3.9. Receptor GABA_B
 - 2.3.10. Receptor GABA_c
 - 2.3.11. Agonistas del GABA.
 - 2.3.12. Antagonistas del GABA.
- 2.4. Estimulantes del Sistema Nervioso Central.
 - 2.4.1. Generalidades
 - 2.4.2. Grupo cerebral
 - 2.4.3. Grupo del tallo encefálico
 - 2.4.4. Grupo de la médula espinal
 - 2.4.5. Picrotoxina
 - 2.4.6. Mecanismo de acción.
 - 2.4.7. Absorción, destino, excreción.
 - 2.4.8. Uso clínico.
 - 2.4.9. Reacciones adversas.

2.5. Las sales de tetrazolio y el MTT

III. OBJETIVO E HIPOTESIS

3.1. Objetivo

3.2. Hipótesis

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Animales

5.2. Sacrificio de los animales y obtención del bazo

5.3. Extracción de los linfocitos

5.4. Cuenta y ajuste celular

5.5. Cultivo de las células

5.6. Reducción del MTT

5.7. Análisis estadístico

VI. RESULTADOS

6.1. Viabilidad celular

6.2. Reducción de MTT.

6.2.1 Reducción de MTT según la dosis

6.2.2. Reducción de MTT según el sexo

6.3. Análisis estadístico

VII. DISCUSIÓN

VIII. CONCLUSIONES

IX. BIBLIOGRAFIA

X. APÉNDICE

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es un conjunto de células y moléculas que sirven para reconocer y eliminar del cuerpo todas aquellas sustancias extrañas o microorganismos que nos invaden y nos pueden causar daño. Las principales células del sistema inmune son los linfocitos y los macrófagos, los cuales se encuentran repartidos por todo el cuerpo. Ellos producen una gran cantidad de moléculas que pueden ser efectoras de la inmunidad (como los anticuerpos) o mensajeros (como las citocinas) que permiten la comunicación de las diferentes células entre sí o con las células de otros sistemas diferentes.

El sistema inmune está permanentemente relacionado con los sistemas nervioso y endócrino. Entre ellos existen varias interacciones bidireccionales, debido a que comparten la capacidad para sintetizar algunos de sus mediadores solubles y sus respectivos receptores de membrana. Las hormonas del sistema endócrino influyen sobre el funcionamiento de los otros dos sistemas y lo mismo sucede con las citocinas del sistema inmune o los neurotransmisores del sistema nervioso. El descubrimiento reciente de receptores extracerebrales (en las células del sistema inmune) para algunos de los neurotransmisores que produce el sistema nervioso ha permitido confirmar estas interacciones y ampliar la visión que hasta ahora se tenía sobre como se lleva a cabo las interacciones entre estos sistemas.

Así por ejemplo, existen varios neurotransmisores como el glutamato y las catecolaminas que estimulan diversas funciones en las células que tienen receptores para ellos, incluyendo las células del sistema inmune. Por otra parte existen otros neurotransmisores como el ácido gamma aminobutírico (GABA), que es el neurotransmisor inhibitorio más importante del sistema nervioso y, sin embargo se puede unir a diversos receptores que no solamente se encuentran en las neuronas, sino que también en los ovarios, riñones, testículos, intestinos, hígado, estómago, pulmones, corazón, adrenales y bazo.

El presente trabajo estudia la posibilidad de que los linfocitos del bazo de ratones CD1 modifiquen su actividad metabólica cuando se cultivan en un medio en el cual se han añadido diferentes cantidades de un antagonista del receptor del GABA. El trabajo propone, además, que probablemente, los cambios en la actividad metabólica de los linfocitos van a ser diferentes según el sexo de los ratones, debido a que algunos otros autores han encontrado que los esteroides sexuales influyen en la expresión de los receptores para GABA. La actividad metabólica de las células linfoides, cultivadas en presencia y / o ausencia de la picrotoxina, será medida por su capacidad para reducir el MTT. El cambio de color del MTT será leído en un equipo de ELISA y las diferencias con los controles serán contrastadas mediante un análisis estadístico de ANOVA.

CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

2.1. EL SISTEMA INMUNE.

2.1.1. GENERALIDADES.

La inmunología es una disciplina científica relativamente joven, que durante muchos años estuvo incluida dentro de la microbiología. La palabra inmunidad que deriva del latín *immunes* (exento de “cargos”), fue inventada por los griegos del siglo de oro para hacer referencia a la protección que las personas convalecientes adquirían después de haber sobrevivido a las enfermedades contagiosas. Nosotros sabemos hoy en día que esas enfermedades están causadas por microorganismos, pero en la antigüedad se creía que eran castigos de los dioses y la capacidad para defenderse de las infecciones fue considerada un regalo de los mismos dioses.

La inmunidad de los seres vivos se obtiene a través de diversos mecanismos defensivos que sirven de protección contra los microorganismos o las sustancias tóxicas del medio ambiente

Cada cuerpo vivo posee varios mecanismos defensivos. El más extenso de ellos es la envoltura que forma una barrera a la individualidad bioquímica de cada especie. Las envolturas naturales como la piel separan los seres vivos de su medio ambiente y son la primera defensa natural contra los microorganismos del exterior. Cuando los virus y las bacterias del exterior atraviesan la piel, el siguiente mecanismo defensivo que los puede detener es una reacción inflamatoria que generalmente esta localizada en los tejidos infectados

En cada respuesta inflamatoria participa un conjunto heterogéneo de enzimas solubles y de células fagocíticas o citotóxicas. Las células que son citotóxicas se llaman así porque pueden destruir, específicamente o inespecíficamente, otras células del hospedero que han sido infectadas, están dañadas o se han malignizado. En el curso de las reacciones inflamatorias también participan células que sintetizan y liberan al exterior una gran cantidad de moléculas biológicamente activas. Al final de las reacciones inflamatorias, cuando las infecciones están controladas, interviene otro tipo de células que fagocitan los tejidos dañados e inactivan los residuos metabólicos que son perjudiciales. Se tiene inmunidad cuando se pueden ejecutar todas las actividades antes de que los seres vivos se enfermen a causa de sus relaciones con los microorganismos y las toxinas del medio ambiente.

La inmunidad, puede ser definida como la capacidad que tienen los seres vivos para conservar sus cuerpos libres de infecciones. La inmunidad depende de la actividad de varios mecanismos de protección. De acuerdo a si están o no presentes desde el momento del nacimiento, unos se denominan *naturales o innatos* y otros se llaman *adquiridos o adaptativos*. Los primeros forman una línea defensiva inespecífica. Los segundos son específicos y dependen de la respuesta del sistema inmunitario. Los mecanismos que dependen de la respuesta del sistema inmune se caracterizan por tener una especificidad exquisita contra las moléculas que estimulan los linfocitos del sistema inmune. El sistema inmune tiene una capacidad extraordinaria para reconocer cualquier molécula extraña que logra vencer las barreras naturales o innatas de protección y penetra al interior del cuerpo. Las moléculas que son reconocidas por el sistema inmune han sido denominadas antígenos.

La respuesta inmune adquirida siempre es específica y con memoria de tal forma que el sistema puede responder de manera diferente a distintos microorganismos, según éstos

poseen antígenos que el sistema inmune reconoce por primera vez o antígenos que el sistema ya ha reconocido anteriormente y para los cuales conserva una memoria. Gracias a esta capacidad de “recordar” cuando el sistema inmune queda expuesto a un antígeno extraño, mejora su capacidad para responder de nuevo frente a ese antígeno.^(85, 86, 87,88,89)

El sistema inmune es una compleja red de células y órganos que trabajan juntos para darle protección al organismo contra cualquier sustancia o partícula extraña que se introduzca en el cuerpo. En esta definición se agrupan todos los microorganismos, tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, entre otros. El “corazón” del sistema inmune es su habilidad para distinguir entre lo propio y lo extraño.

Las células más importantes del sistema inmune son los linfocitos, que tienen receptores para reconocer y responder específicamente contra los antígenos extraños. Sin embargo, en la respuesta del sistema inmune también participan otras células conocidas como células accesorias, que no son específicas para los diferentes antígenos, pero que al interactuar con los linfocitos inducen y amplifican las respuestas inmunitarias. Las células accesorias más importantes son los macrófagos, células dendríticas, los monocitos, las células cebadas y los eosinófilos.

Los linfocitos, así como todas las demás células sanguíneas provienen de la multiplicación y diferenciación de las células madre pluripotenciales que se encuentran en la médula ósea. Brevemente estas células madres diferencian a las dos líneas celulares: mieloides y linfoides, de las cuales derivan todas las células del tejido sanguíneo. De la línea mieloides derivan todas las células accesorias o células presentadoras de antígenos, y de la línea linfoides derivan los diferentes tipos de linfocitos. Los linfocitos se clasifican en T y B, debido a que su desarrollo tiene lugar en el timo (Thymus gland) y en la médula ósea

(Bone marrow) respectivamente. Cada una de las subpoblaciones de linfocitos (T y B), responde de manera diferente, dando lugar a las respuestas celular y humoral.^(85, 86, 87,88,89)

2.1.2. LINFOCITOS T y B

Los linfocitos T se dividen en linfocitos T citotóxicos (T_C) y linfocitos T colaboradores (T_H). Estos linfocitos son los encargados de iniciar las respuestas inmunitarias específicas de tipo celular, mientras que los linfocitos B inician las de tipo humoral y su respuesta conduce a la formación de anticuerpos. Para que estas respuestas se inicien en ambas poblaciones de linfocitos primero es necesario reconocer un antígeno con sus respectivos receptores de membrana, conocidos como receptores de las células T (TCR) y receptores de las células B (BCR).

Para que los linfocitos T inicien su respuesta es necesario que primero reconozcan los epítopes de un antígeno que es presentado por una célula presentadora o CPA. Las interacciones entre las células que presentan antígenos y los linfocitos que las reconocen implican un intercambio masivo de información. La interacción principal altamente específica, es la que se produce entre el complejo mayor de histocompatibilidad MHC II-antígeno y el TCR.^(85, 86,89)

Las células T reconocen a los antígenos unidos a las células que se encuentran asociados con moléculas de clase I o II y expuestos en las superficies celulares. Las moléculas de clase I y II presentan péptidos procedentes de antígenos endógenos y exógenos, respectivamente.

Los linfocitos T citolíticos (T_c, CD8) reconocen a los antígenos asociados a moléculas MHC de clase I y producen sustancias que son capaces de lisar células que presentan antígenos extraños, así como las células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares. Los linfocitos T colaboradores (T_H CD4) reconocen a los antígenos asociados con moléculas MHC de clase II en células presentadoras de antígeno como células dendríticas interdigitantes (CDI) macrófagos y células B.

Los linfocitos T CD4 y CD8 secretan moléculas mensajeras llamadas citocinas, cuya función es promover la proliferación y diferenciación de otros linfocitos y células accesorias.^(85, 87,89)

Los linfocitos B son los principales protagonistas en un tipo especial de respuesta inmune: los anticuerpos, grandes proteínas que establecen una precisa combinación con un antígeno (molécula, o parte, que se conoce como extraña). Hay cinco clases de anticuerpos IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. Cuando un linfocito B encuentra un antígeno lo reconoce, lo fagocita, aumenta su tamaño, se divide, se transforma en una célula plasmática y comienza a producir anticuerpos. Así empezamos con un linfocito capaz de reconocer un Ag particular y terminamos con miles de copias, clones de este linfocito. Muchas de estas copias pasan a formar células plasmáticas, capaces de producir cada una cientos de miles de moléculas de Ac, que se unirán al antígeno particular que los activó. Algunas de las células permanecen como linfocitos B de memoria, listos a reaccionar multiplicándose y diferenciándose cuando el Ag vuelva a presentarse en el cuerpo.

2.2. INTERACCIONES NEUROINMUNOLÓGICAS

2.2.1. INTERACCIONES ENTRE LOS SISTEMAS NERVIOSO, INMUNE Y ENDÓCRINO

En las últimas décadas se han publicado numerosos trabajos con resultados que pueden aceptarse como evidencia de una interacción funcional entre los sistemas inmune, nervioso y endócrino, ya que los tres sistemas comparten la capacidad para producir una serie de mediadores solubles y sus respectivos receptores.^(1,2)

En el caso entre la interacción entre el sistema nervioso y el sistema inmune, se puede mencionar el ejemplo de que a nivel de la piel, las fibras nerviosas, principalmente las de las neuronas que contienen sustancia P (SP), se acercan y se juntan físicamente a los mastocitos, los cuales resultan estimulados y liberan histamina y otros mediadores de las respuestas inflamatoria, dando lugar al cuadro clínico conocido como neurodermatitis. Algo parecido puede observarse en el caso de la innervación de un órgano linfóide como los ganglios en los cuales la influencia del sistema nervioso periférico o del sistema neurovegetativo es un requerimiento necesario para iniciar reacciones inflamatorias provocadas o no experimentalmente. Trabajos como estos han demostrado la existencia de las relaciones entre el sistema nervioso y el sistema inmune.^(3,4,5,6)

Esas relaciones son bidireccionales de modo que, así como las células del sistema nervioso modulan la actividad de las células del sistema inmune, así también en las células nerviosas (neuronas o células de la glía) se han encontrado receptores para algunos mediadores inflamatorios como las citocinas del sistema inmune, especialmente para interleucina 6 (IL-6), que puede ser producida tanto dentro como fuera del sistema nervioso

central. Se ha sugerido que estas moléculas del sistema inmune son necesarias para el desarrollo y la mielinización del sistema nervioso, así como para la modulación de sus funciones, las cuales están bajo los efectos de las respuestas pro- y anti-inflamatorias del sistema inmune . De hecho, así como existe un control amigdalino e hipotalámico sobre el sistema inmune (a través de las respuestas neurovegetativas), al mismo tiempo la respuesta del sistema inmune influye sobre el hipotálamo y sobre la producción de hormonas por el sistema endócrino. Todos estos hallazgos confirman la existencia de una comunicación bidireccional entre dichos sistemas.^(7,8)

La interacción entre los sistemas inmune, nervioso y endócrino se puede estudiar desde diferentes niveles, los cuales pueden resumirse de la siguiente forma :

1) Los neurotransmisores y las hormonas producidos por los sistemas nervioso y endócrino, respectivamente, se unen a receptores específicos para ellos que se expresan en las células del sistema inmune. De este modo, las hormonas y los neurotransmisores pueden regular la actividad del sistema inmune.

2) Algunos productos del sistema inmune, como por ejemplo las citocinas, pueden unirse a sus correspondientes receptores, expresados sobre las células de los sistemas nervioso y endócrino, y de este modo, influyen sobre la producción de neurotransmisores y hormonas.

3) Las hormonas liberadas por el sistema endócrino pueden unirse a sus receptores específicos que se expresan sobre la membrana de los linfocitos del sistema inmune y neuronas del sistema nervioso.

4) Algunas células del sistema nervioso producen citocinas y hormonas (neuroesteroides) iguales a los que producen las células de los sistemas inmune y endocrino, respectivamente. De una manera similar, los linfocitos del sistema inmune pueden producir neurotransmisores y hormonas.⁽⁹⁾

Se puede afirmar que, como una consecuencia de las interacciones anteriores, no solo el sistema nervioso modula al sistema inmune sino que las actividades de los tres sistemas se encuentran permanentemente en equilibrio u homeostasis. Numerosas evidencias sugieren la existencia de varias formas de agentes estresantes como el ejercicio intenso que, a través del sistema endócrino, pueden cambiar las funciones del sistema inmune.

Esto sucede mediante los cambios en la producción de algunas hormonas para las cuales existen receptores en la membrana de las células del sistema inmune. Se pueden mencionar algunas como la epinefrina (E), la norepinefrina (NE), la hormona del crecimiento (GH), la β -endorfina, la testosterona, los estrógenos y el cortisol. Los efectos de las hormonas antes mencionadas sobre el sistema inmune, así como la presencia de receptores para ellas en las células de otros sistemas fuera de las glándulas endocrinas, más la cercanía y el contacto anatómico entre los sistemas nervioso y endócrino, han servido para revelar la existencia de vías de comunicación entre los tres sistemas.⁽¹⁾

Ya se mencionó que los nervios periféricos sirven para enviar mensajes que pueden estimular los órganos linfoides primarios y secundarios. En las terminaciones de los nervios periféricos se encuentran vesículas que contienen moléculas solubles llamadas neurotransmisores. Esas vesículas se acercan a la membrana y se abren al exterior vertiendo su contenido de transmisores, los cuales van a encontrar receptores específicos sobre la membrana de las células que se encuentran en los órganos linfoides. Según la clase de neurotransmisores que liberan las fibras nerviosas estimuladoras han sido denominadas noradrenérgicas, colinérgicas o peptidérgicas. La médula ósea parece recibir predominantemente estimulaciones noradrenérgicas. En cambio, el timo puede ser estimulado por los tres tipos de fibras. El bazo tiene una inervación principalmente noradrenérgica, a pesar de que también se han encontrado en sus tejidos fibras colinérgicas y peptidérgicas. Los ganglios linfáticos reciben estimulaciones noradrenérgicas y peptidérgicas. La mayoría de las investigaciones en esta área se han enfocado en la inervación simpática, iniciada por el hipotálamo después que ha recibido las estimulaciones que generan los agentes estresantes. La norepinefrina se une a los receptores α -adrenérgicos, la epinefrina a los receptores α y β -adrenérgicos y las encefalinas se unen a los receptores opioides.^(10,11)

Estas hormonas del sistema endocrino y los neurotransmisores del sistema nervioso se unen de una manera diferente a sus correspondientes receptores de membrana en los linfocitos y los macrófagos del sistema inmune. Los receptores adrenérgicos se han encontrado en los linfocitos y su número varía según la subpoblación de los mismos. Esto podría explicar la gran cantidad de cambios estimulatorios en el tipo de respuesta de los linfocitos cuando se eleva la producción de catecolaminas a causa del estrés.^(12,13)

La epinefrina o adrenalina en su mayoría es secretada de la médula adrenal, mientras que la norepinefrina o noradrenalina es liberada de las terminales nerviosas simpáticas. La expresión de receptores β -adrenérgicos en las células T y B, así como en los macrófagos y en los neutrófilos de numerosas especies dan las bases moleculares para que estas células puedan ser blanco de las catecolaminas. Dichos receptores están conectados intracelularmente con el sistema de la adenilato ciclasa, el cual genera AMPc como segundo mensajero. El estudio *in vitro* del efecto que tiene la adrenalina sobre la actividad citotóxica de las células NK, en humanos, ha demostrado que dicha actividad es inhibida mediante la adición de inductores de AMPc (en una forma directa) a células efectoras y las células blanco.^(1,2,14,15)

Las células NK contienen el mayor número de receptores β -adrenérgicos, mientras que los linfocitos T CD4+ tienen el menor número. La densidad de los receptores β -adrenérgicos en las células NK está regulado por la intensidad del estímulo estresante y es por esto que las células NK presentan mayor respuesta al estímulo que otras subpoblaciones celulares.^(1,16)

La estimulación colinérgica del sistema inmune es menos pronunciada que la estimulación adrenérgica. Sin embargo, los receptores colinérgicos han sido encontrados en las células epiteliales del timo y de médula ósea. El efecto más importante de la acetilcolina en el sistema inmune es la activación de la proliferación de las células T, pero la acetilcolina puede también acelerar la síntesis de anticuerpos en células B.^(1,16)

Estudios recientes sugieren un rol para GABA en la regulación de la función del sistema inmune mas específicamente la expresión de receptores GABA_A en células T, ya que como sabemos GABA no atraviesa la barrera hematoencefalica, en este trabajo realizado por Jide Tian, Cindy Chau, Tim G.⁽⁸³⁾, mostraron que se expresan receptores para GABA_A en células T de ratones Balb/c. Los resultados obtenidos los relizaron *in vitro e in vivo* utilizando agonistas y antagonistas de GABA donde dependiendo del fármaco utilizado inhibían la proliferación de células T, como es el caso de los agonistas ó facilitaban la proliferacion como es el caso de los antagonistas, estos fármacos utilizados como el muscimol ,RU3315, Bicucullina y Ptx confirmaron la actividad en especifico de receptores GABA_A ; en estos resultados no se encontraron expresión de receptores GABA_B. También se encontró que GABA inhibe la producción de IL-2 por células T estimuladas con antígenos.

2.3 NEUROTRANSMISIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

2.3.1. EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La unidad funcional del Sistema Nervioso Central es la neurona y la mayoría de los agentes neurofarmacológicos tienen a la neurona como sitio de acción primaria. Las neuronas son capaces de transmitir y recibir información de otras neuronas. La transmisión de la información se hace a través de la conducción del impulso nervioso (excitatorio o inhibitorio) por medio de redes de neuronas íntimamente relacionadas unas con otras. La "información" o impulso es "captada" por numerosas prolongaciones del cuerpo celular de la neurona llamadas dendritas, que de esta forma aumentan notoriamente la superficie receptiva. La neurona emite o dispara el impulso nervioso a través de una prolongación generalmente única llamada axón, que termina en una pequeña expansión en forma de bulbo, denominada botón terminal o axónico.^(16,17)

Se calcula que existen aproximadamente cien mil millones de células nerviosas. Este es exactamente el mismo número de planetas que orbitan a las estrellas que contiene la Vía Láctea. (La cita es de C.SAGAN: Un punto azul pálido; una visión del futuro humano en el espacio. Editorial PLANETA, 1996, pag 397). Cada célula se contacta a través de más de 500 sinapsis, recibiendo cada neurona información aproximadamente de otras 1000 neuronas. Los neurotransmisores están alojados dentro de vesículas para impedir que sus moléculas más elementales sean degradadas por las enzimas existentes en el botón terminal del axón. La vesícula sináptica con sus neurotransmisores químicos debe unirse a la membrana presináptica para poder liberar dichas sustancias en el espacio sináptico. Se calcula que en un botón terminal axónico existen varios miles de vesículas, y en cada una de las cuales se almacenan alrededor de cien mil moléculas de neurotransmisores. Del

espacio sináptico el neurotransmisor pasa a la membrana postsináptica, uniéndose a determinados sitios protéicos específicos llamados receptores.^(16,18)

El lugar donde el axón de una neurona se pone en contacto con otra célula, otro axón o con dendritas de otras neuronas se denomina sinapsis. En este espacio entre las membranas de una y otra neurona, la transmisión del impulso se hace por medio de transmisores químicos, ya que ambas neuronas no se fusionan.

Estas células y sus sinapsis son sumamente sensibles a la falta de glucosa y de oxígeno, así como a cualquier sustancia tóxica que circule por la sangre. Afortunadamente, el cerebro se halla separado de la circulación sanguínea general por la denominada “barrera hematoencefálica”. Esta barrera consiste en un tejido compuesto por células (de la glía y del endotelio del vaso sanguíneo), fibras y una sustancia intercelular. Las células neurales o astrocitos poseen expansiones terminales adheridos a la pared externa de los vasos sanguíneos cerebrales por un lado, y por el otro envuelven en forma de telaraña a las neuronas propiamente dichas (Figura 1).

Si bien el oxígeno y las sustancias químicas de bajo peso molecular pueden difundirse libremente a través de la membrana basal de los vasos sanguíneos, las células de la glía y las neuronas, las sustancias algo más complejas, como la glucosa o los psicofármacos, necesitan de un transporte activo o ser altamente liposolubles para poder atravesar las membranas y llegar a la neurona donde ejercen su acción.^(18,19,20)

Normalmente, la célula nerviosa posee un potencial eléctrico negativo de 70 milivoltios respecto del exterior. Ello es debido a que permite la entrada de iones de potasio y elimina activamente los iones de sodio (bomba de sodio/potasio).

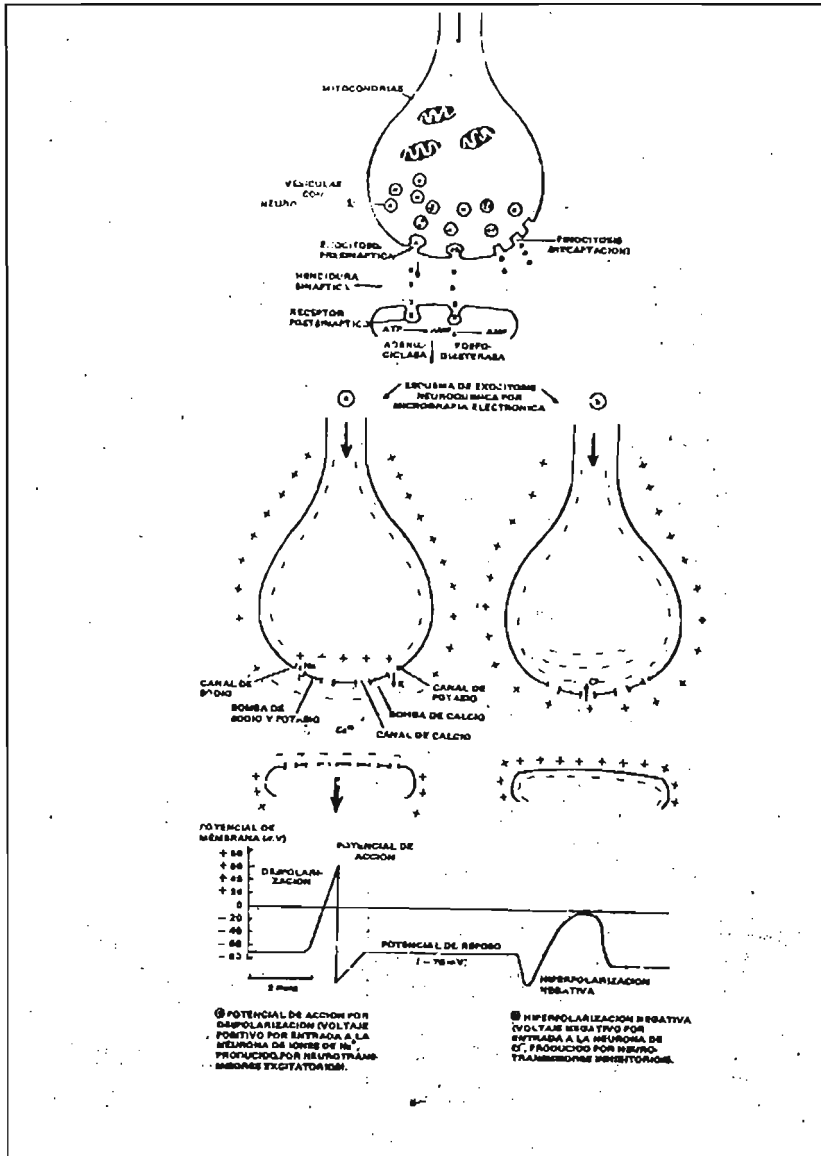


Figura 1. Modelo de transducción por canales iónicos

La figura muestra como se lleva a cabo la sinapsis, donde el axón de una neurona se pone en contacto con otra célula, otro axón o con dendritas de otras neuronas, la transmisión del impulso se hace por medio de transmisores químicos, ya que ambas neuronas no se fusionan.

Esta “bomba” la constituyen proteínas que cambian su estructura para permitir la entrada o salida de los iones. Este trabajo se realiza con un gasto de energía que queda almacenada en el adenosíntrifosfato (ATP).

Cuando la célula “dispara” el impulso (como respuesta a la información recibida del exterior a través de sus dendritas) permite que el sodio entre en el axón, cambiando su potencial eléctrico de negativo a positivo (potencial de acción), propagándose así el impulso.

Cuando el impulso llega a la parte dilatada final del axón (botón terminal axónico) libera sustancias químicas que están almacenadas dentro de vesículas protectoras, y logran cumplir así el objetivo de transmitir la información a la célula nerviosa vecina. Dado que la amplitud del impulso es la misma, a mayor cantidad de impulsos habrá mayor liberación de moléculas de las sustancias, llamadas neurotransmisores.^(21,22,23)

2.3.3. NEUROTRANSMISORES

En los últimos años se ha podido demostrar que los transmisores sinápticos pueden diferenciarse no solamente por sus acciones, sino también por las características de las respuestas que provocan (rápidas o lentas, estimulantes o inhibitoras), por las distintas estructuras químicas que tienen (simples o complejas), por su peso molecular (alto o bajo), por su naturaleza química, por la preponderancia de las respuestas químicas o eléctricas que generan, etcétera.

De acuerdo con estas diferentes particularidades se les ha denominado neurotransmisores (respuestas rápidas), neuromoduladores (respuestas lentas), neuromediadores (respuestas de tipo postsináptico), neuropéptidos (transmisores de alto peso molecular) y neurohormonas (moduladores de la secreción de otras hormonas).

Sin embargo, muchas de esas acciones se superponen, por lo que los límites de cada una de estas categorías resultan imprecisos.

Los neurotransmisores se caracterizan por estar presentes en el sistema nervioso central y por tener mecanismos propios de síntesis, almacenamiento, degradación, recaptación e inactivación. Además, deben poseer receptores específicos a los cuales puedan bloquear los fármacos antagonistas. Este tipo de neurotransmisores provocan respuesta químicas y eléctricas.

Tabla No 1.

Criterios que debe reunir un neurotransmisor

1. Se sintetiza en la neurona
 2. Está presente en la neurona presináptica y se libera en cantidades fisiológicamente significativas mediante la despolarización
 3. Cuando se administra de manera exógena, como fármaco, produce los mismos efectos que los neurotransmisores endógenos.
 4. En las neuronas o en la hendidura sináptica existen mecanismos que eliminan o desactivan al neurotransmisor.⁽²⁴⁾
-

Los neurotransmisores pueden inducir respuestas químicas y eléctricas. Las primeras actúan sobre receptores químicos específicos e inducen un determinado tipo de acción.

En cambio, las respuestas eléctricas pueden ser excitatorias o inhibitorias.

Las respuestas excitatorias producen un potencial postsináptico excitatorio, que origina una despolarización neuronal con ingreso de sodio y egreso de potasio intracelular hasta que se logra un nuevo equilibrio, merced a la bomba de la Na-K-ATPasa, que finalmente limita la propagación del impulso.

Si la respuesta es de tipo inhibitorio, se produce un potencial postsináptico inhibitorio que provoca la entrada de cloruro a la neurona y ocasiona la hiperpolarización, hasta lograr un nuevo equilibrio.

La respuesta dependerá de la sumatoria de ambos procesos (excitatorios e inhibitorios), que la neurona recibe simultánea y constantemente. Los neurotransmisores se han clasificado como aminas biógenas, aminoácidos y péptidos.

Las aminas biógenas son los neurotransmisores mejor conocidos, ya que fueron los primeros en descubrirse. Sin embargo funcionan como neurotransmisores sólo en un pequeño porcentaje de neuronas. Los aminoácidos fueron descubiertos más tarde, sobre todo debido a la dificultad para distinguir entre los aminoácidos presentes en la mayoría de las proteínas y los que actúan de forma independiente. Están presentes en más de 70% de las neuronas. Los péptidos neurotransmisores ocupan un lugar intermedio en lo que se refiere al porcentaje de neuronas que los contienen.⁽²⁴⁾

Los datos más recientes han conducido a la identificación de, al menos, otras cuatro clases de neurotransmisores: nucleótidos, gases, eicosanoides y anandamidas.

- | |
|---|
| <p>CLASIFICACIÓN DE LOS NEUROTRNSMISORES.</p> <ol style="list-style-type: none">1. aminas biógenas2. aminoacidos3. péptidos4. nucleótidos5. gases6. eicosanoides |
|---|

Figura 2. Muestra la clasificación de los neurotransmisores.

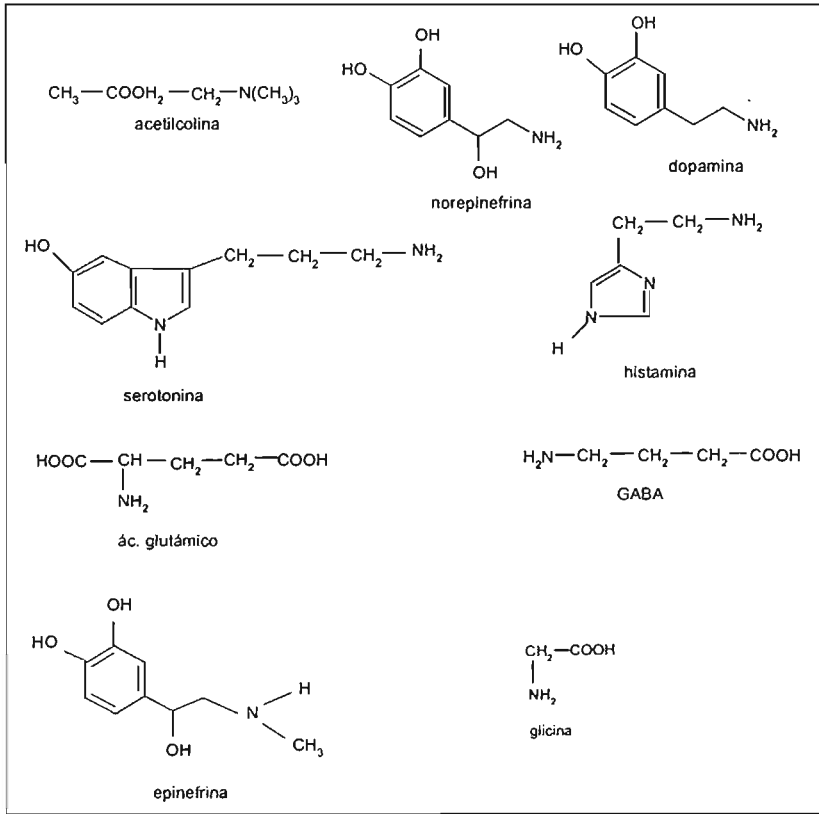


Figura 3. Muestra algunos neurotransmisores del sistema nervioso central

2.3.3. NEUROTRANSMISORES AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son las estructuras básicas de las proteínas. Debido a su abundancia, se pensó durante mucho tiempo que no podían funcionar también como neurotransmisores. Sin embargo, el SNC contiene solo concentraciones altas de algunos aminoácidos, en particular, el ácido gamma-amino butírico (GABA) y el glutamato, los cuales son los dos neurotransmisores aminoácidos principales. Estos aminoácidos son en extremo potentes en su capacidad para alterar la descarga neuronal. Al principio los fisiólogos se negaban a aceptar que estas sustancias simples fueran neurotransmisores centrales, a causa de su distribución general dentro del encéfalo y por la observación clara de que producen efectos poderosos inmediatos, fácilmente reversibles y repetitivos, sobre cada neurona sometida a prueba: los aminoácidos dicarboxílicos generan excitación casi universal, y los ω -aminoácidos monocarboxílicos (GABA, β -alanina, taurina), causan inhibiciones cualitativamente similares y sostenidas. Con la aparición de antagonistas selectivos de los efectos de los aminoácidos, la identificación de receptores selectivos y de subtipos de receptores que median sus efectos, y con el desarrollo de métodos para hacer un mapa de localización de los ligandos y sus receptores, se puede contar con pruebas firmes de que los aminoácidos GABA, glicina y glutamato son transmisores centrales, siendo así que el GABA es un aminoácido inhibitorio, y el glutamato es activador. Como forma simplificada de ver el cerebro, se ha sugerido que su trabajo depende de un equilibrio entre estos dos neurotransmisores y que todas las aminas biógenas y los neurotransmisores peptídicos simplemente regulan este equilibrio.^(24,25)

Los descubrimientos más recientes insisten en la relevancia del estudio de los neurotransmisores aminoácidos. Así, se ha comprobado que las benzodiazepinas, los barbitúricos y varios anticonvulsivantes actúan principalmente mediante mecanismos GABAérgicos y que la fenciclidina, actúa sobre los receptores de glutamato.

En base a estudios neurofisiológicos se han separado los aminoácidos en dos clases generales:

- 1) Aminoácidos excitatorios: ácido glutámico, ácido aspártico, ácido cisteico y ácido homocisteico; que despolarizan las neurona en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos
- 2) Aminoácidos inhibitorios: GABA, glicina taurina, β -alanina; que hiperpolarizan las neuronas de los mamíferos.

Desde un punto de vista estrictamente cuantitativo, probablemente los aminoácidos sean los transmisores más importante en el SNC de los mamíferos, en tanto que los otros transmisores (aminas biógenas y neurotransmisores peptídicos) probablemente intervengan en la transmisión de un pequeño porcentaje en los sitios sinápticos centrales.^(24,26,27)

2.3.4. EL ACIDO γ - AMINOBUTÌRICO (GABA)

Sintetizado en el laboratorio 1883, el ácido γ -aminobutírico fue considerado por muchos años como un catabolito de los microbios y plantas. Sin embargo, no fue sino hasta 1950 que los investigadores identificaron al GABA como un constituyente normal del SNC de los mamíferos y encontraron que ningún otro tejido de los mamíferos, con excepción de la retina, contiene mas que trazas de este material. Obviamente se pensó que una sustancia con distribución tan poco habitual debería tener algunas características y efectos fisiológicos específicos que la harían importante para el funcionamiento del SNC.^(28,29)

Pero no se reconoció de inmediato su potencia como depresor del SNC. En el receptor de estiramiento del crustáceo, el GABA imitó los efectos observados con la estimulación de los nervios inhibidores y la picrotoxina antagonizó tanto los efectos del GABA aplicado como la estimulación del nervio inhibidor. Kravist y colaboradores^(30, 31), demostraron que el GABA era el único aminoácido inhibidor que se encontraba exclusivamente en los nervios inhibidores del crustáceo y que la potencia inhibidora de los extractos de estos medios se debía a su contenido de GABA. La descarga de GABA se correlacionó, a continuación, con la frecuencia de la estimulación nerviosa. Los registros intracelulares del músculo indicaron que la estimulación del nervio inhibidor y la administración del GABA producían incrementos idénticos de la conductancia del Cl⁻ en el músculo. Estas observaciones satisfacen por completo, en consecuencia, los criterios para la identificación de un neurotransmisor.^(30,31)

Se observó, más tarde, que estas mismas propiedades fisiológicas y farmacológicas eran modelos de utilidad para las pruebas de la función del GABA en el SNC del mamífero. Se cuenta con un gran número de datos a favor de que el GABA media las acciones inhibitorias de las interneuronas locales en el cerebro, y que puede mediar también la inhibición presináptica dentro de la médula espinal. Se han demostrado sinapsis inhibitorias GABAérgicas presuncionales con mayor claridad entre las neuronas cerebelosas de Purkinje y sus blancos en el núcleo de Deiter, también entre las interneuronas pequeñas y las células mayores emisoras de impulsos de la corteza cerebelosa, el bulbo olfatorio, el núcleo cuneiforme, el hipocampo y el núcleo septal lateral; por último, entre el núcleo vestibular y las motoneuronas trocleares. El GABA media también la inhibición dentro de la corteza cerebral y entre el núcleo caudado y la sustancia negra.⁽³²⁾

En la actualidad se halla generalmente aceptado el papel del ácido γ -aminobutírico, como el principal transmisor inhibitorio en el sistema nervioso, tanto de los vertebrados como de los invertebrados. El papel funcional del GABA es eminentemente inhibitorio. El GABA se halla distribuido ubicuamente en el sistema nervioso central de los mamíferos (si bien de forma irregular, desde la corteza hasta la médula espinal), y virtualmente todas las neuronas del SNC son intensamente inhibidas por este aminoácido, que viene a representar el transmisor empleado en cerca de la mitad de las terminaciones sinápticas de algunas regiones cerebrales. Es un sistema, por tanto, de regulación muy precisa para una función muy concreta. Podría decirse, dada la amplia distribución del GABA, que cualquier función del SNC (sensitivomotriz, vigilia, memoria, atención o emoción) está sometida a la activación equilibradora y ajustable del sistema GABAérgico.

Su eliminación general supone el descontrol del sistema, teniendo en las convulsiones su máxima expresión, mientras que su activación generalizada determina la depresión, también generalizada, con sueño y coma. Por el contrario, la modulación del GABA en estructuras y sistemas concretos constituye la base de actuaciones farmacológicas de indudable beneficio terapéutico.

El conocimiento de que el GABA funciona como un transmisor inhibitorio en el cerebro, ha inducido un esfuerzo de investigación exhaustiva para implicar al GABA en la etiología de muchos trastornos neurológicos y psiquiátricos. Los receptores para el GABA han sido implicados tanto directa como indirectamente en la patogenia de las enfermedades de Huntington, de Parkinson, epilepsia, esquizofrenia, discinesias tardías y demencia senil, así como otros trastornos conductuales.^(32,33)

2.3.5. SÍNTESIS Y CATABOLISMO DEL GABA

La síntesis del GABA, está relacionada con los procesos metabólicos de la glucosa y más específicamente con el ciclo de Krebs. El sustrato inmediato es el ácido glutámico, que es un aminoácido no esencial. Éste puede provenir de la glutamina, mediante la acción de la enzima glutaminasa o del ciclo de Krebs del ácido alfa-cetoglutarico, en donde normalmente el complejo enzimático alfa-cetoglutarato deshidrogenasa convierte este metabolito en ácido succínico (Succinil CoA). Esto ocurre en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.⁽³⁴⁾

La putresina, cadaverina, espermina y espermidina también son sustancias a partir de las cuales se puede sintetizar el GABA, mediante reacciones de desaminación y descarboxilación.

El GABA se forma finalmente por una descarboxilación del ácido glutámico, catalizada por la L-ácido glutámico descarboxilasa (GAD), la cual requiere como cofactor al fosfato de piridoxal (vit B₆). Esta enzima se encuentra en su forma soluble en la terminal axónica.

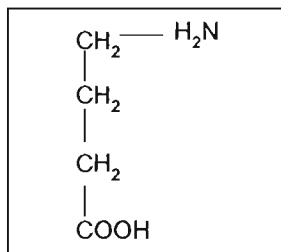


Figura 4. Ácido γ - Aminobutírico (GABA)

El catabolismo de GABA ocurre por una reacción de transaminación en la que interviene la GABA-transaminasa (GABA-T) también conocida como alfa-cetoglutarato aminotransferasa, la cual tiene como cofactor la vitamina B₆. El producto de esta reacción es el semialdehído succínico y el amonio que es un producto que se recicla entre la reacción de síntesis del ácido glutámico y en la destrucción del GABA. El semialdehído succínico ingresa nuevamente al ciclo de Krebs por virtud de la deshidrogenasa semialdehidosuccínica, que origina el ácido succínico. Las enzimas GABA-T y deshidrogenasa semialdehidosuccínica (SSADH) se encuentran en las mitocondrias.

Una vez liberado fuera de las células, el GABA termina su acción dentro de la hendidura sináptica por recaptura. Este proceso se lleva a cabo no solo por las neuronas GABAérgicas sino también por la glía. En estas últimas células el GABA se puede reincorporar al ciclo de Krebs o formar glutamina a partir de glutamato, pero en la glía no se sintetiza GABA de *novo* porque estas células carecen de la GAD. ^(34,35)

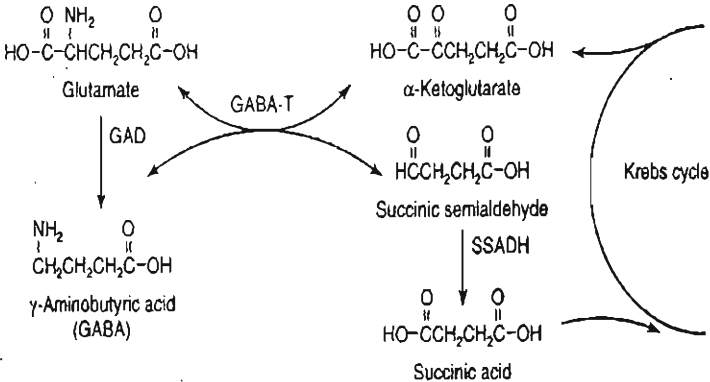


Figura 5. Conservación y metabolismo del GABA

Es muy probable que la liberación del GABA se haga más por las pozas citoplasmáticas, que por los depósitos vesiculares, aunque también se requiere de Ca^{++} , para que se lleve a cabo este proceso. El mecanismo de recaptura es de alta afinidad con un transporte activo Na^+ -dependiente y hace que se acumule GABA en las neuronas inhibitoras que lo utilizan como neurotransmisor.

En estudios en los que se ha aplicado GABA iontoforéticamente se ha visto que éste es un neurotransmisor que inhibe el disparo neural en prácticamente todas las áreas estudiadas. Un ejemplo interesante al respecto lo proporcionan las células de Purkinje del cerebelo, las cuales se neuromodulan básicamente por inhibición. El GABA actúa a nivel neuronal por dos mecanismos de inhibición:

- 1) El postsináptico (IPost), en el que se produce, una hiperpolarización mediante un influjo de Cl^- o eflujo de K^+ .
- 2) El presináptico (IPre), que ocurre por un mecanismo de despolarización, que al parecer es mediado por una salida de Cl^-

De esta manera el GABA ejerce sus acciones inhibitoras mediante mecanismos iónicos comunes, que al parecer tienen que ver con un ionóforo al cloro.^(34,35,36,37)

2.3.6. VÍAS METABÓLICAS ALTERNAS DE GABA

Además de sufrir una transaminación y la entrada subsiguiente en el ciclo de Krebs, al parecer el GABA puede pasar por otras transformaciones en el sistema nervioso central, formando muchos compuestos cuya importancia, y hasta su existencia en forma natural, no ha sido totalmente comprobada. La figura 6 describe muchos de los derivados para los cuales el GABA puede servir de precursor. Quizá la más simple de estas conversiones metabólicas es la reducción del semialdehído succínico a γ -hidroxibutirato (GBH). El GBH también se encuentra en el cerebro humano en donde parece tener sus más altas concentraciones en la sustancia nigra y en las zonas de los ganglios basales. Entre los metabolitos cerebrales, el γ -hidroxibutirato es muy importante ya que posee propiedades anestésicas. Además, tiene una interrelación interesante con las catecolaminas, ya que cuando se administra GHB exógeno o γ -butirolactona (GBL) en dosis que inducen sueño ocasiona un gran aumento del contenido cerebral de dopamina, ningún efecto sobre la noradrenalina cerebral, serotonina o GABA.

En la literatura han aparecido varias publicaciones que tratan la existencia natural del ácido γ -amino- β -hidroxibutírico (GABOB) en el cerebro de los mamíferos. Sin embargo, a pesar de que muy poco o nada de GABOB esté presente en el cerebro, se han llevado a cabo muchas investigaciones electrofisiológicas para determinar su posible acción como sustancia neuroinhibidora. Este compuesto es considerado por algunos grupos de investigadores como un bloqueador de las convulsiones inducidas experimentalmente en animales cuando se les administra localmente al cerebro aún por vía general. Algunos investigadores, también aseguran que el GABOB es clínicamente eficaz para prevenir y aliviar convulsiones epilépticas.^(25,38)

En 1958, se detectó en el cerebro de los mamíferos la γ -aminobutirilcolina por cromatografía en papel. Este éster de colina al parecer es resistente a la hidrólisis por la acetilcolinesterasa, en tanto que la butirilcolinesterasa tiene cierta capacidad limitada para hidrolizar esta sustancia. Además este éster no sufre una transaminación con el α -oxoglutarato, como sí lo hace con su compuesto análogo GABA.^(25,38)

Por muchos años, se supo que la γ -butirobetaína era una sustancia que se encontraba en los tejidos de las serpientes y las anguilas pero sólo hasta hace poco, se sugirió la existencia en el tejido de los mamíferos. Este compuesto ha sido tentativamente identificado en el SNC de los mamíferos formando un complejo con la coenzima A. Desde el punto de vista farmacológico, la acción de la γ -butirobetaína semeja, hasta cierto punto, la acción de la acetilcolina, excepto que es mucho menos potente y tiene una acción más prolongada sobre los tejidos del ganglio cervical superior, íleo y la unión neuromuscular.

El ácido γ -guanidinobutírico también es un metabolito normal del cerebro de los mamíferos y puede actuar como fuente de GABA.

Se ha publicado que la γ -aminobutirilhistidina (homocarnosina) se encuentra en cerebro de vaca, gatos, perros y en el de ranas, pero se desconoce la importancia biológica de este compuesto.^(25,38)

También se han considerado la acetilcarnitina y la carnitina como metabolitos normales del cerebro de los mamíferos, pero su existencia de ninguna manera se limita a este tejido. Los ésteres de carnitina tienen una actividad semejante a la acetilcolina en la mayoría de las preparaciones biológicas.^(25,38,39)

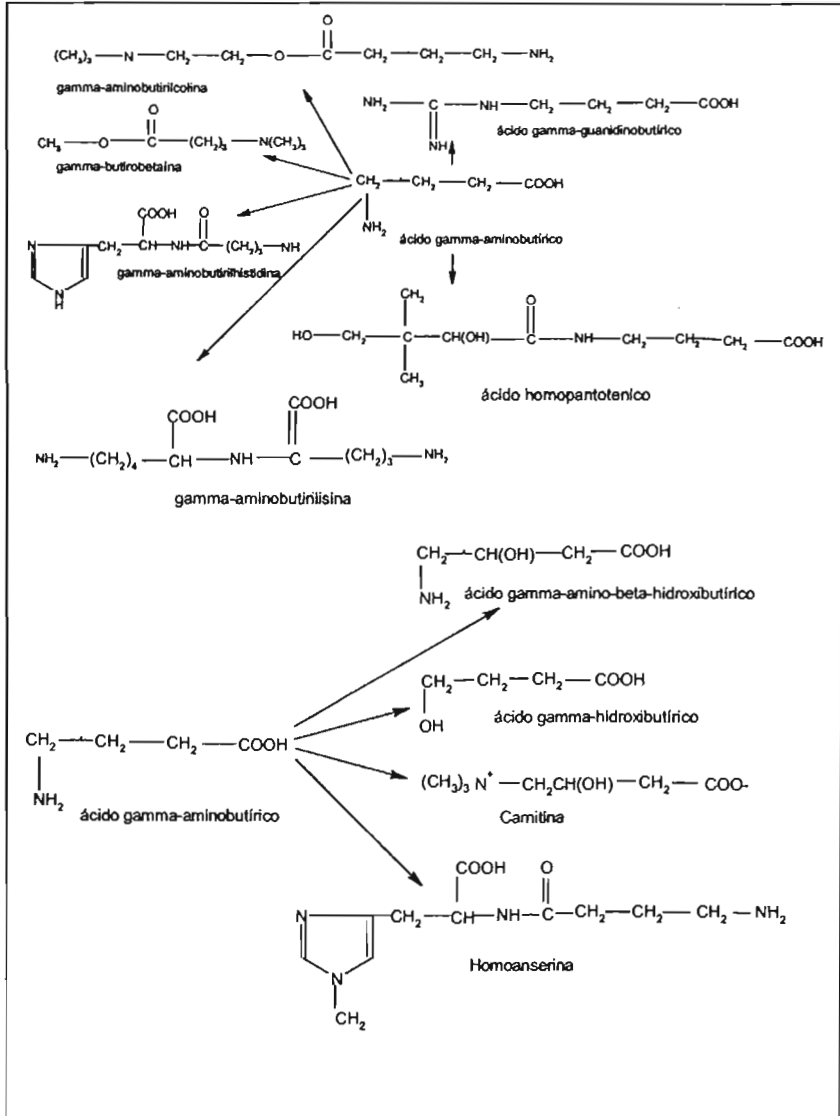


Figura 6. Posibles vías metabólicas alternativas para el GABA.

2.3.7. RECEPTORES DE GABA

El término “receptor de GABA” por lo general se refiere a un sitio de conocimiento de GABA en las membranas postsinápticas que cuando se acopla con el GABA o un agonista apropiado, cambia la permeabilidad de la membrana a los iones inorgánicos, principalmente de los cloruros. Este cambio en la permeabilidad al cloruro ocasiona una hiperpolarización de la neurona receptora en el caso de una inhibición presináptica o de una despolarización en el caso de una inhibición posináptica. Sin embargo es claro que el GABA se puede unir a un gran número de proteínas en los tejidos del SNC, algunas de las cuales pueden ser fisiológicamente importantes, pero no se les puede llamar apropiadamente receptores de GABA. Estas proteínas incluyen al transportador de GABA de alta afinidad y las enzimas que intervienen en el metabolismo de GABA como la GAD y la GABA-T. Desde hace mucho tiempo, se piensa que en el SNC hay receptores de GABA de distintos tipos farmacológicos y funcionales y, a pesar de que los estudios electrofisiológicos han demostrado la existencia de receptores de GABA insensibles a la bicuculina, estos receptores han sido difíciles de caracterizar debido a la falta de agentes farmacológicos apropiados. Por esta razón, muchos investigadores han definido estrictamente a los receptores de GABA en base a su sensibilidad con los antagonistas de GABA, bicuculina y picrotoxina. Aún cuando han sido extensamente investigados los receptores de GABA en el SNC, las indicaciones son de que estos receptores regulan una gran diversidad de efectos fisiológicos, de comportamiento y bioquímicos.^(25,40,41)

Los receptores sobre los que GABA actúa son de tres tipos, A, B y C. Cabe destacar que el receptor GABA_A está asociado al canal de Cl⁻ y forma parte de un magno complejo que permite la acción alostérica de numerosos fármacos, mientras que el receptor GABA_B está asociado a proteínas G reguladoras de canales de Ca²⁺ y K⁺. En la tabla siguiente se indica el perfil farmacológico de ambos tipos de receptores.⁽⁴⁶⁾

Tabla No 2. Perfil de actividad sobre los receptores de GABA

	GABA _A	GABA _B
Agonistas		
GABA	Potente	Potente
Muscimol	Potente	Débil
Baclofeno	Débil	Potente
Antagonistas		
Bicuculina (competitiva)	Potente	Inactiva
Picrotoxina (no competitiva)	Potente	Inactiva
Penicilina	Baja potencia	
Potenciadores		
Benzodiazepinas	Potentes	
Pentobarbital	Potencia moderada	
Fenitoína	Muy débil	
Reguladores		
Benzodiazepinas		
Neuroesteroides		
Barbituratos		
Anestésicos		
Alcohol		

Algunos autores mencionan un tercer grupo de receptores para el GABA, los GABA_c que, lo mismo que los receptores GABA_A, consiste de un canal para iones cloro, que se encuentra controlado por el ligando y que aumenta la polarización de la membrana.⁽⁵⁰⁾

Distribución de los receptores de GABA.

La distribución de los receptores GABA_A y GABA_B en el SNC es bastante coincidente, aunque en la mayor parte de las regiones cerebrales predomina el GABA_A. Los dos receptores son extraordinariamente abundantes en la corteza cerebelosa, en particular en las capas granular y molecular.^(42,43,44,45)

Están ampliamente expresados en el tálamo, el hipocampo, la corteza cerebral, los núcleos de la base, los núcleos del tronco y la médula espinal en sus diversas capas. Dentro de la corteza, destaca su presencia en la capa 4C de la corteza visual; en el resto de la corteza, son más abundantes en las capas II y III que en las I, IV y VI. Ahora bien, las subunidades que componen los receptores GABA_A y sus respectivas variantes (α 1-6, β 1-4, γ 1-4, δ , ϵ , θ , ρ 1-3) muestran una enorme variabilidad en su distribución dentro del SNC. Lo mismo sucede con las subunidades del receptor que fijan a un ligando particular. Todo ello determina que el análisis de la distribución de receptores GABA en el SNC sea particularmente complejo, sobre todo cuando se ha de relacionar su activación con una determinada función.^(46,47,48)

2.3.8. RECEPTOR GABA_A

Es una proteína heterooligomérica compuesta por cinco subunidades polipeptídicas : α , β , γ , δ y ϵ ; algunos autores mencionan una subunidad más la ρ . El peso molecular de las subunidades oscila entre 50 y 60 kilodaltones (kDa). Existen numerosos subtipos de cada

subunidad, habiéndose clonado hasta ahora seis subtipos de la subunidad α , cuatro de la β , cuatro de la γ , uno de la δ y tres de la ρ , y comparten un 70 % de homología a nivel de intrasubunidades y de un 30% a nivel de intersubunidades. Cada subunidad posee cuatro dominios transmembranales M_1 - M_4 ; una o más de estas regiones, probablemente la M_2 , contribuye a formar la pared del canal iónico. Las subunidades presentan secuencias de aminoácidos similares entre sí. La similitud se extiende al analizar la estructura y la disposición. La disposición N-terminal está situada extracelularmente y se halla en gran parte glucosilada (ver Figura 7), existe un puente disulfuro entre las cisteínas 138 y 152, conformándose un bucle de 15 aminoácidos, que se supone, participa en la fijación de los ligandos. A partir del residuo 210 penetra en la membrana y establece las sucesivas porciones transmembranales. Entre M_3 y M_4 existe un dominio intracelular cuyo tamaño y secuencia son específicos para cada subunidad, (y sobre la que ejercen los mecanismos reguladores intracelulares) siendo susceptible de fosforilación por la proteincinasa A, la proteincinasa C y la tirosin cinasa.^(49,51,52,53,54)

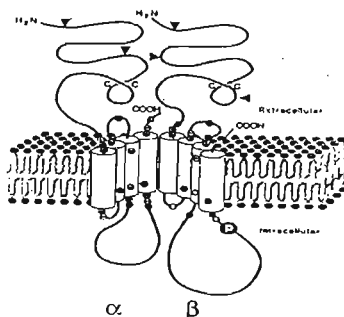


Figura 7. Muestra el modelo de las subunidades α y β del receptor GABA_A

La porción C-terminal es también extracelular (figura 7). El GABA se fija a la subunidad β , aunque su acción sólo se expresa si están presentes las subunidades α y β . Pero lo más característico del receptor GABA_A es la posibilidad de que la interacción de diversos ligandos con sus subunidades provoque una interacción heterotrofa del receptor GABA. La presencia de benzodiazepinas, alcohol, barbitúricos, neuroesteroides y otras moléculas en interacción con diversas subunidades del receptor potencian la fijación y la actividad del ligando endógeno GABA sobre su sitio de acción. Para que la benzodiazepina que actúa sobre la subunidad α potencie la acción del GABA sobre la subunidad β , se requiere de la presencia de la subunidad γ . Esto indica el alto grado de interacción alostérica entre las diversas subunidades y la complejidad de acción de este receptor.^(55,56)

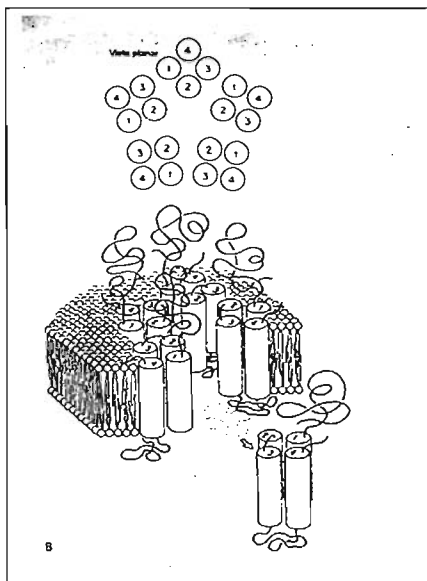


Figura 8. Modelo del receptor de GABA

2.3.9. RECEPTOR GABA_B

Este tipo de receptor está acoplado con proteínas G triméricas que inducen la síntesis de AMP_C; está localizado a nivel de las terminaciones presinápticas en la periferia y en diferentes regiones pre y postsinápticas del SNC. En numerosas estructuras (hipocampo, tálamo) este tipo de receptor es responsable de la inhibición tardía. La inhibición rápida es debida al GABA_A. El efecto iónico responsable de la inhibición es un aumento de la permeabilidad potásica y una disminución de permeabilidad cálcica. Estos dos efectos aparecen desigualmente repartidos; la disminución de los iones Ca⁺⁺ es más importante a nivel de los receptores presinápticos donde ocasiona, en las terminaciones, una disminución de la cantidad de neurotransmisor liberado. ^(57,58,59)

Tabla 3. La tabla muestra diferentes receptores de la familia 4TM así como las subunidades identificadas para cada tipo de receptor.

nAChR					5HT	Glycine Receptors		GABA _A Receptors						
α ₁	β ₁	γ	δ	ε	A	α ₁	β	α ₁	β ₁	γ ₁	δ	ε	π	θ
α ₂	β ₂					α ₂		α ₂	β ₂	γ ₂				
α ₃	β ₃					α ₃		α ₃	β ₃	γ ₃				
α ₄	β ₄							α ₄	β ₄	(γ ₄)				
α ₅								α ₅						
α ₆								α ₆						
α ₇														
(α ₈)														
α ₉														
α ₁₀														

2.3.10. RECEPTOR GABA_C

Recientemente se ha informado de la existencia de un tercer tipo de receptor para el GABA, el llamado receptor GABA_C con unas propiedades farmacológicas diferentes, aislado de neuronas retinianas.

El receptor GABA_C ha sido el último en ser identificado en neuronas retinianas de vertebrados. A diferencia del receptor GABA_A no es activado por la bicucullina y a diferencia de los GABA_B no es modulado por el baclofen. Al parecer los receptores GABA_C están formados por subunidades ρ siendo homoligoméricos y tienen propiedades espaciales y funcionales diferentes de la de los receptores GABA_A y para glicina que también abundan en las células bipolares de la retina de los mamíferos. En particular son unas 10 veces más sensibles que los GABA_A a los agonistas fisiológicos muestran una conductancia baja y tiempos de apertura bastante largos. Muestran una alta selectividad por el cloro; también se han encontrado una amplia distribución de receptores GABA_C en muchos puntos del sistema nervioso central.⁽⁸⁵⁾

2.3.11. AGONISTAS DEL GABA

Los agonistas del receptor para GABA pueden subdividirse en dos grupos basándose en su capacidad para penetrar la barrera hematoencefálica, y, por tanto, si son activos o no después de su administración general. Agentes como el ácido 3-aminopropanosulfónico, el ácido beta-guanidinopropiónico, el ácido 4-aminotetróico, el ácido trans-4-aminocrotónico y el ácido trans-3-aminociclopentano-1carboxílico, son eficaces al intervenir como agonistas del receptor para GABA. Sin embargo, es mínima la cantidad de estos agentes que llega al cerebro después de su administración general. Además, los compuestos como el ácido trans-4-aminotetróico y el ácido 4-aminocrotónico también inhiben la GABA-T y la captación de GABA, y por tanto, su acción no es totalmente atribuible a sus propiedades agonistas directas.⁽⁶⁰⁾

En comparación con esta clase de agonistas de acción directa, los del segundo grupo enlistado atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica y son activos después de su administración general. El Muscimol es uno de los agentes de este grupo que ha sido más estudiado. Otros agentes de este grupo incluyen al 5-1-5-(1-aminoetil)-3-isoxazol, el TPI (un análogo del muscimol), el SL-76002, y la amina kojic (2-aminometil-3-hidroxi-4H-pirano-4-ona).

Además de esa primera clasificación basada en su capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica, las sustancias agonistas del receptor para GABA pueden subdividirse aún más en compuestos que estimulan directamente los receptores de GABA y aquellos que causan una activación indirecta de estos mismos receptores por diferentes mecanismos. Por ejemplo, los agentes como el muscimol, la isoguvacina, y el TPI son verdaderos agentes miméticos del GABA que interactúan directamente con sus receptores.

Los agonistas del GABA que actúan indirectamente facilitan la transmisión GABAérgica al incrementar la cantidad de GABA endógeno que llega al receptor o alterando en alguna forma el acoplamiento del receptor de GABA ionóforo y su interacción para facilitar los cambios en los receptores de GABA mediados por la permeabilidad a los cloruros. Así muchos medicamentos a menudo clasificados como agonistas indirectos de GABA actúan presinápticamente y modifican la liberación de GABA y su metabolismo más que interactuar directamente con los receptores de GABA. Por esta razón, medicamentos como la gabaculina (un inhibidor de la GABA-T), el ácido nipecótico (un inhibidor de la captación del GABA) y el baclofen (una sustancia que además de muchas otras acciones causa la liberación del GABA de sus almacenes intracelulares) a menudo son clasificadas incorrectamente como agonistas del GABA. En ocasiones las benzodiazepinas son clasificadas como agonistas del GABA. Se piensa que el pentobarbital actúa a nivel del iónoforo de GABA, pero no está claro si sus efectos depresores en el SNC son explicables por esta acción.^(61,62)

Tabla No 4.

Drogas que afectan la transmisión GABAérgica

Nombre	Mecanismo de acción	Acción típica
Diproilacetato	Catabolismo	Anticonvulsivo
Gabaculina	Inhibidor	Anticonvulsivo
Muscimol	Agonista A y C	Psicodisléptico
Ácido Imidazolaacético	Agonista débil	Sedante
Baclofeno	Agonista B	Relajante muscular
Benzodicepinas	Agonista alostérico	Ansiolítico
		Anticonvulsivo
Bicuculina	Antagonista A y C	Convulsivo
Picrotoxina	Antagonista A	Convulsivo

Referencia 62

2.3.12. ANTAGONISTAS DEL GABA

La acción del GABA en el complejo receptor-ionóforo puede ser antagonizada por sustancias que, ya sea en forma directa, compitan con el GABA por su receptor o bien, de manera indirecta modifiquen el receptor o inhiban el ionóforo activado por el GABA. Los dos antagonistas clásicos del GABA, la bicuculina y la picrotoxina, parecen actuar en formas diferentes. La bicuculina actúa como un antagonista competitivo directo del GABA a nivel del receptor, en tanto que la picrotoxina actúa como un antagonista no competitivo, quizá debido a que puede bloquear los ionóforos activados del GABA. Bajo condiciones fisiológicas normales, la bicuculina es hidrolizada a bicucina, un antagonista de GABA relativamente inactivo con una vida media corta de algunos minutos. Las sales cuaternarias que se utilizan actualmente para la mayor parte de los experimentos electrofisiológicos (metilyoduro de bicuculina y metocloruro de bicuculina) son mucho más hidrosolubles y estables en un amplio rango de pH que oscila de 2-8. Sin embargo, debe observarse que estas sales cuaternarias no son adecuadas para administración general debido a su mala penetración al sistema nervioso central.^(63,64)

Tabla No 5.

Drogas que afectan la transmisión GABAérgica		
Nombre	Mecanismo de acción	Acción típica
	Síntesis	
Hidrazida del glutámico	Inhibidor de la GAD	Convulsivo
Alilglicina	Inhibidor de la GAD	Convulsivo
Tiosemicarbazida	Antagonista B ₆	Convulsivo
Isonico-hidrazida	Antagonista B ₆	Convulsivo
	Liberación	
Toxina tetánica	Inhibidor de la liberación	Convulsivo
Barbitúricos	Incrementa la liberación	Anticonvulsivo
	Recaptación	
4-metilGABA	Inhibidor de la recaptación	
Ácido nipecótico	Inhibidor de la recaptación	
Haloperidol	Inhibidor débil	Antisicótico
	Catabolismo	
Ácido aminooxiacético	Inhibidor de GABA-T	Sedante
Ácido hidrazinopropiónico	Inhibidor de GABA-T	Sedante

Referencia 64

2.4. ESTIMULANTES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

2.4.1. GENERALIDADES

Un grupo heterogéneo de fármacos estimula el sistema nervioso central, con base en su sitio predominante de acción, esto es, el encéfalo, el tallo encefálico o la medula espinal. Sin embargo esta clasificación es artificial, pues ninguno de ellos actúa específicamente en una zona del cerebro, y como resultado de los fascículos de interconexión, sus efectos nunca son localizados.⁽⁶⁵⁾

En un tiempo estos productos se aplicaron mucho sobre todo como estimulantes respiratorios en el tratamiento de dosis excesivas, agudas de depresores del SNC. Este uso casi ha desaparecido desde que se ha comprobado que morían más pacientes después del tratamiento con analépticos que los sometidos a la terapéutica conservadora. Los motivos de ello guardan relación principalmente con el hecho de que los estimulantes del SNC no son antagonistas farmacológicamente específicos de los depresores.⁽⁶⁶⁾

2.4.2. GRUPO CEREBRAL

Este grupo esta caracterizado por drogas que causan despertar, garrulería y aumento en la actividad motora fortuita. Los fármacos que actúan predominantemente en el encéfalo, en dosis pequeñas intensifican el estado de alerta y espontaneidad de ideas y palabras. Con dosis mayores, estos efectos se intensifican y surgen movimientos incoordinados, alucinaciones, convulsiones, hipertermia y muerte. Con todos estos fármacos, después de la estimulación aparece invariablemente depresión.^(65,69)

2.4.3. GRUPO DEL TALLO ENCÉFALICO

En esta clasificación están las drogas como la picrotoxina, la niquetamida y el pentilentetrazol, que frecuentemente son llamados estimulantes bulbares o mesencefálicos. Estas drogas tienen poco efecto en la persona normal a dosis moderadas, pero en grandes dosis causan convulsiones clónicas. En estados de depresión, como después de la sobredosificación de barbitúricos o en el choque, hay un margen muy estrecho de dosificación dentro del cual este estimulante del sistema nervioso central pueden producir un aumento en la respiración sin causar convulsiones. Esta es la indicación terapéutica usual para estas drogas, que con frecuencia son llamadas analépticas. La terapéutica de este tipo requiere un control muy estricto de la dosificación. Las convulsiones que se ven con los estimulantes del tallo cerebral son usualmente de carácter clónico y consisten en una serie de contracciones y relajaciones de todos los grupos musculares rápidamente recurrentes. Después de una dosis grande, el paciente puede tener una corta serie de movimientos clónicos, seguidos por una convulsión tónica con una contracción sostenida de todos los músculos. En el hombre, el patrón de esa contracción tónica máxima es principalmente extensor y consiste en opistótonos o arqueamiento de la espalda y el cuello con extensión de las piernas pero con flexión en los brazos.^(65,66,68,69)

2.4.4. GRUPO DE LA MÉDULA ESPINAL

Los estimulantes de la médula espinal característicamente causan convulsiones tónicas sin una fase clónica. Estas drogas pueden causar algún aumento en los reflejos espinales después de la administración de pequeñas dosis no convulsionantes.⁽⁶⁹⁾

2.4.5. PICROTOXINA

Las drogas de la categoría de estimulantes convulsivos, como es el caso de la picrotoxina, producen convulsiones como efecto farmacológico primario. No se observa ninguna otra acción antes de iniciarse la crisis. Todas las drogas son absorbidas adecuadamente después de la administración bucal, y ésta suele ser la vía empleada para estos fármacos. La distribución el metabolismo y la eliminación en el hombre no han sido plenamente estudiados. Estos agentes son principalmente de uso experimental, pero en la actualidad su empleo clínico es muy limitado.⁽⁶⁶⁾

La picrotoxina es un alcaloide obtenido de las semillas de la planta llamada *Anamirta cocculus*, un arbusto que crece en las Indias orientales. Estas semillas algunas veces llamadas “frutas de pez”, ya que se usan para envenenar peces, proporcionan cerca de 1.4 % de picrotoxina. Es una mezcla a partes iguales de un agente activo, la picrotoxinina y un componente relativamente inactivo, la picrotina.⁽⁶⁶⁾

2.4.6. MECANISMO DE ACCIÓN

La picrotoxina es un poderoso estimulante del SNC, capaz de causar convulsiones en todas las especies animales estudiadas. Los datos disponibles indican que por lo menos parte de la acción estimulante del SNC que posee la picrotoxina depende de un antagonismo selectivo con un transmisor inhibitor en el cerebro (GABA). La Picrotoxina, Bicuculina y bencilpenicilina son convulsivantes capaces de bloquear los efectos del

GABA en diversas situaciones experimentales. El efecto de un estimulante del sistema nervioso central es reducir la inhibición más que facilitar directamente la excitación.^(67,68)

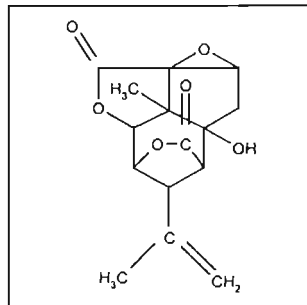


Figura 9. Picrotoxinina

2.4.7. ABSORCIÓN, DESTINO, EXCRESIÓN.

La picrotoxina se absorbe bien a partir del aparato gastrointestinal y de varias vías parentales. En la práctica clínica, se administra intravenosamente. Después de la inyección intravenosa hay un crecimiento gradual de la intensidad de la acción y el efecto máximo puede no alcanzarse sino hasta 10 a 15 minutos después. Es de gran importancia considerar esta fase de latencia durante el uso de la droga. No se conoce el metabolismo de la picrotoxina, ya que solo un poco de la droga se recupera en la orina; parece que es destruida en el cuerpo o se excreta por la bilis.^(66,67)

2.4.8. USO CLÍNICO.

La picrotoxina se ha utilizado en el tratamiento de dosis excesivas de depresores del SNC.⁽⁶⁷⁾

2.4.9. REACCIONES ADVERSAS.

Como ocurre con otros estimulantes convulsivos del SNC, la picrotoxina puede provocar intensas convulsiones, generalmente tónico clónicas y de tipo incoordinado. Estas pueden ir seguidas de coma o muerte. La respiración está muy aumentada. En el caso de la picrotoxina la estimulación respiratoria se observa principalmente con dosis muy cercanas a las que ya producen convulsiones. Los barbitúricos y otros depresores del SNC son útiles para tratar los trastornos por dosis excesivas de picrotoxina.⁽⁶⁷⁾

2.5. LAS SALES DE TETRAZOLIO Y EL MTT

La utilidad de las pruebas que utilizan la reducción del MTT para medir las tasas de proliferación celular, ha sido bien documentada en la literatura para muchas diferentes aplicaciones. Estas sales fueron utilizadas por primera vez en 1984 para la detección de la actividad de la deshidrogenasa y de otros sistemas enzimáticos de cultivos de linfocitos donde son generados equivalentes redox. Debido a éste hecho son una herramienta muy útil en la investigación académica y clínica y su uso se ha generalizado para cuantificar la proliferación celular o para evaluar la citotoxicidad, así como para medir la actividad metabólica y para muchas aplicaciones diagnósticas, tales como en investigaciones sobre el SIDA y cáncer, biología molecular y celular, diagnósticos enzimáticos y química clínica, inmuno-histoquímica, histología y patología.^(75,78)

De las sales de tetrazolio más conocidas se encuentra el nitroazul de tetrazolio (NBT), cuya reducción ocurre posiblemente por la interacción con la ubiquinona como un aceptor de electrones específico, el clorhidrato de trifeltetrazolio (TTC) y el clorhidrato de neotetrazolio (NT) donde ambas reducciones se ven estimuladas por el citromo c. Otra sal de tetrazolio muy conocida es el bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolio (MTT), que se utilizó en el presente trabajo. El MTT es una sal de monotetrazolio, la cual se ha visto que es transformada por el sistema succinato-tetrazolio reductasa, donde el principal sitio de unión en condiciones aeróbicas entre el MTT y la cadena respiratoria involucra a la citocromo oxidasa. Sin embargo como se verá más adelante, la reducción del MTT no es una reacción exclusiva de las mitocondrias.^(70,77,78)

El uso del aceptor de hidrógeno bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolio (MTT) en un ensayo colorimétrico fue inicialmente descrito por Mosmann ⁽⁷⁶⁾ para medir la citotoxicidad y la proliferación celular. Más adelante este ensayo se generalizó y se le comenzó a utilizar en la medición de actividad celular.

El utilizar una técnica sencilla como la reducción de sales de tetrazolio (en este caso MTT) para medir el crecimiento celular tiene grandes ventajas, además de que es más seguro con respecto a otras técnicas. Por ejemplo, el procedimiento es relativamente simple y el equipo que se utiliza generalmente está disponible en la mayoría los laboratorios, así mismo la técnica espectrofotométrica puede detectar cambios muy pequeños en el metabolismo celular. Es diferente a la prueba de viabilidad con azul tripano que es una forma muy simple de evaluar la integridad de la membrana celular (y así asumir la sobrevida o muerte celular). Por otro lado, aunque la medición de la proliferación celular con sustancias radiactivas ha sido muy aceptada, utilizando generalmente como marcador la timidina tritiada, éste método involucra grandes cantidades de tiempo y un gran riesgo de manejar manualmente sustancias radiactivas que son altamente cancerígenas y mutagénicas.

El uso de MTT depende de algunas variables que conviene tener en cuenta. Por ejemplo, en experimentos previos con líneas de células T citotóxicas, algunos autores ^(9,10) han demostrado que la sensibilidad del método colorimétrico depende de la línea celular utilizada. Este método colorimétrico es igual de sensible, como los ensayos con ³H – timidina, a pesar de que no depende de la medida de la radioactividad y por lo tanto es ideal en investigaciones de gran capacidad donde se manejan un gran número de muestras

individuales⁽⁸⁷⁾. Otras ventajas que presenta este método colorimétrico, es la rapidez de la reacción, además de que es sencillo, económico y reproducible, con un alto grado de sensibilidad al utilizar un lector de ELISA. ^(71,72,73)

El “formazán” es el producto de MTT reducido y su formación varía significativamente entre las distintas líneas celulares, tanto en la cinética de formación como en el grado de saturación. La actividad específica del MTT se ve significativamente influenciada por un número de parámetros y la mayoría de los autores sugiere que las condiciones de experimentación deben ser pre-establecidas o estandarizadas para minimizar la variabilidad en los resultados.

Las sales de tetrazolio son compuestos orgánicos heterocíclicos cuaternarios de amonio solubles en agua, que son convertidos por reducción a formazanos. Los formazanos son insolubles en agua, solubles en solventes orgánicos y no son autooxidables. A causa de estas propiedades, este grupo de compuestos han sido empleados en la medición de agentes reductores y como aceptores de electrones sobre catalizadores enzimáticos.⁽⁷⁴⁾

Las sales de tetrazolio que se utilizan principalmente en bioquímica y en biología celular, son derivados aromáticos de 1,2,3,4 tetrazol (sustituídos en posición 2,3 y 5).

Estas sales son precursores de color amarillento (amarillo-rojizo), que después de su reducción forman compuestos fuertemente pigmentados. En el caso del MTT, el formazano que se forma es de color morado.

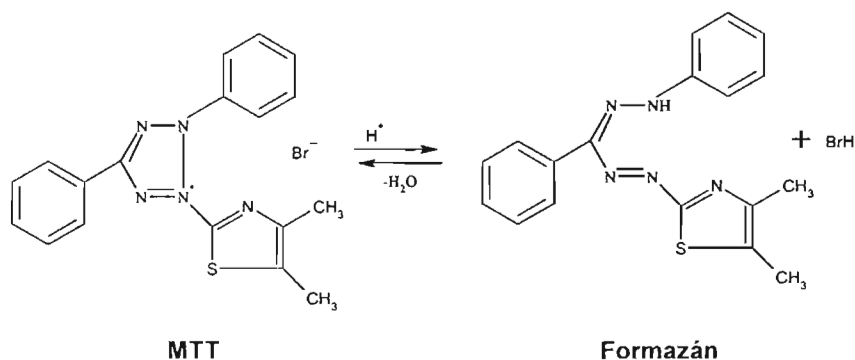


Figura 10. Reducción del MTT a formazán

Anteriormente se mencionó que el MTT es reducido por el sistema “succinato-tetrazolio reductasa”, el cual pertenece a la cadena respiratoria mitocondrial y es activo solo en células viables, pero la prueba del MTT no se considera un ensayo mitocondrial. A pesar de la plena aceptación de este ensayo, no se sabe exactamente la localización subcelular de los eventos bioquímicos involucrados en la reducción del MTT. Dicha reducción celular, se lleva a cabo principalmente en el citoplasma y probablemente involucre cofactores del nucleótido de piridina NADH y NADPH.^(77,78)

La participación de las mitocondrias en la reducción del MTT ha sido inferida por varios estudios con inhibidores respiratorios usando succinato como sustrato, pero la contribución de esta actividad sobre la reducción celular del MTT es aún desconocida. En 1963 Slater⁽⁷⁴⁾ utilizó inhibidores de la cadena respiratoria para demostrar que la reducción del MTT dependiente de succinato en homogenizados de hígado de rata ocurría en dos sitios de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ubiquinona Q y citocromo c). A partir de este hallazgo se ha tomado como evidencia que el MTT es reducido por mitocondrias activas de células viables.^(70,74,77)

Berridge y colaboradores⁽⁷⁷⁾, investigaron la localización subcelular de la reducción del MTT utilizando succinato NADH y NADPH como sustratos en una línea celular derivada de la médula ósea (32D). A concentraciones óptimas de los sustratos se observó que hay una mayor reducción del MTT con el NADH que con el succinato. También se observó que utilizando succinato, la reducción del MTT se lleva a cabo principalmente fuera de la mitocondria que en las fracciones mitocondrial y mitocondrial/lisosomal. Lo mismo ocurre cuando se utiliza NADH y el NADPH, pero en este caso las cantidades de MTT reducido en la fracción mitocondrial son mucho menores en comparación con el succinato. Para caracterizar la reducción del MTT por la fracción mitocondrial se utilizaron inhibidores de la cadena respiratoria para explorar cómo está involucrado el transporte de electrones en la reducción del MTT. Los resultados sugieren que cuando el succinato es usado como un aceptor de electrones, el 70-80% de la reducción mitocondrial del MTT ocurre subsecuente a la transferencia de electrones del citocromo c a la citocromo oxidasa.

En contraste con el succinato, la reducción mitocondrial del MTT dependiente de NADPH no fue afectado por ninguno de los inhibidores respiratorios probados, y la reducción dependiente de NADH solamente es inhibida por la clorpromazina (40-50%), lo que nos sugiere que la reducción del MTT se lleva a cabo principalmente de manera extramitocondrial e involucra mecanismos dependientes de NADH y NADPH que son insensibles a los inhibidores de la cadena respiratoria. Vistica⁽⁷⁷⁾ en 1991, estableció una correlación entre la concentración de la D-glucosa en los medios de cultivo y la reducción del MTT a formazán en diferentes líneas celulares de tumores. Él encontró que la concentración de la D-glucosa juega un papel importante en la reducción del MTT, ya que el transporte celular y el metabolismo constante de glucosa son esenciales para una máxima reducción de MTT, es decir que entre más extenso sea el metabolismo de la glucosa por parte de las células mayor será la cantidad de MTT reducido. Así mismo la disminución de la concentración celular de los nucleótidos de piridina NADH y NADPH se acompañó por una disminución concomitante en la producción de formazán.^(77,78,82)

Por otro lado, Nikkha⁽⁷⁸⁾ en 1992 y Shearman⁽⁷⁹⁾ en 1995 encontraron que el formazán derivado del MTT era depositado intracelularmente en forma granular alrededor del núcleo y en una incubación prolongada con MTT se formaban cristales de formazán en la superficie de la célula. Más adelante Yuanbin Liu y colaboradores encontraron que los sustratos relacionados con el NADH (tales como malato, glutamato o piruvato), son igualmente buenos para reducir lo mismo el MTT que el succinato en mitocondrias aisladas de cerebro de rata, pero que, como ya lo han mencionado otros autores, la mitocondria no tiene un papel exclusivo en la reducción del MTT.^(78,79,81)

El MTT no es permeable a las membranas lipídicas, aunque la permeabilidad puede variar según el tipo de célula, lo que sugiere que el MTT es introducido a las células a través de la endocitosis y es reducido por una flavina oxidasa susceptible a N-etilmaleimida (NEM). La endocitosis y la reducción del MTT aparentemente requieren de ATP y NADH generados a través de la glucólisis, lo cual explica el porqué la D-glucosa y los nucleótidos de piridina afectan la reducción del MTT.⁽⁷⁸⁾ El formazán se acumula en los compartimientos endosomal/lisosomal para después ser transportados a la superficie celular a través de la exocitosis. Ninguna de estas vesículas tiene que ver con la mitocondria, lo que sugiere que deben tener una importante función fisiológica.

Aún no está muy claro el sitio y el sistema enzimático involucrado en la reducción del MTT, por lo que no es muy fácil explicar las discrepancias existentes entre la prueba del MTT y los otros métodos para medir la proliferación celular y la viabilidad. Sin embargo, actualmente se realizan algunos estudios sobre la inhibición de la reducción celular del MTT con un indicador temprano específico de la enfermedad de Alzheimer. Las personas con este desorden tienen acumulaciones intracerebrales de la proteína β -amiloide, la cual actúa como neurotóxico en dicha enfermedad. Estos hallazgos están en estudios y pueden ayudar a clarificar el mecanismo por el cual la proteína β -amiloide inhibe la reducción del MTT y ayudarnos a comprender cuáles son los mecanismos específicos involucrados en la reducción del MTT y en la patogenia de la enfermedad.

CAPÍTULO III OBJETIVO E HIPÓTESIS

3.1. OBJETIVO

Conocer si los linfocitos del sistema inmune de los ratones modifican su actividad metabólica cuando se cultivan en presencia de la picrotoxina.

3.2. HIPÓTESIS

1.- Cuando los linfocitos de los ratones se cultivan en un medio al cual se le han añadido diferentes concentraciones de un antagonista del receptor para el GABA, (la picrotoxina), debe aumentar la actividad metabólica.

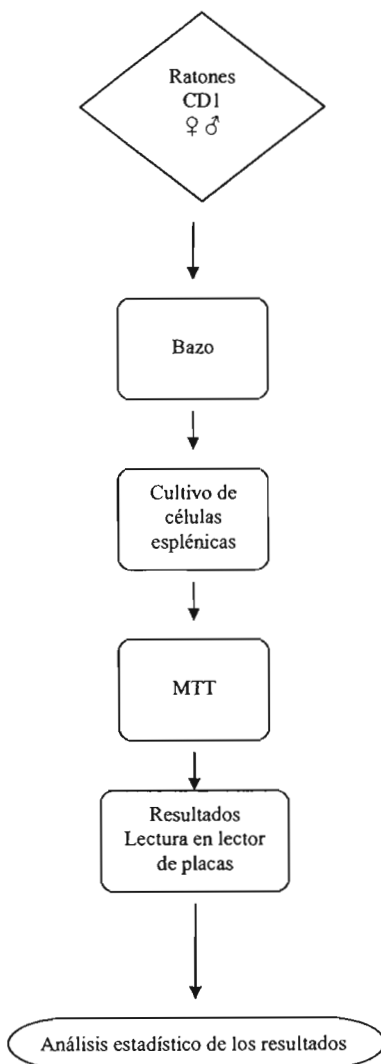
2.- Los linfocitos de los ratones que son estimulados con la picrotoxina aumentan su actividad metabólica de una manera diferente según la dosis de picrotoxina añadidas al medio de cultivo y según el sexo de los animales.

CAPÍTULO IV DISEÑO EXPERIMENTAL

Para estudiar el efecto de la picrotoxina sobre la capacidad para reducir el MTT en los linfocitos del bazo de ratones CD1, se utilizaron diferentes concentraciones de picrotoxina, y se trabajaron dos grupos de ratones, machos y hembras de aproximadamente 20-25g de peso. Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para posteriormente obtener las células del bazo, las cuales se ajustaron a 300,000 células/100 μ L, es decir a 3×10^6 cél/mL.

Las células obtenidas de cada ratón se cultivaron por triplicado en microplacas de cultivo de 96 pozos, en presencia de diferentes dosis de picrotoxina, también se incluyeron pozos control por triplicado para cada experimento. La determinación de la actividad metabólica fue medida a través de la técnica del MTT, leyendo su reducción en cada suspensión celular en un lector de placas de ELISA.

Diseño experimental:



CAPÍTULO V MATERIAL Y METODOS

5.1. ANIMALES.

Se utilizaron ratones CD-1 de ambos sexos, con un peso corporal entre 20 y 25g. Los animales fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Química (UNAM), los animales se mantuvieron en grupos separados por sexo, en jaulas de policarbonato, donde recibieron agua y alimento libremente.

Para el empleo y manejo de los ratones se tuvo en cuenta los procedimientos recomendados en las Guías de consulta para el cuidado y el uso de los animales de experimentación.⁽⁸²⁾

5.2. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DEL BAZO.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se introdujeron en alcohol al 70% (para desinfectar la piel) e inmediatamente se llevaron a la campana de flujo laminar previamente sanitizada donde se les abrió la cavidad abdominal y se procedió a extirparles el bazo.

5.3 EXTRACCIÓN DE LOS LINFOCITOS

El bazo se colocó en una caja Petri colocada sobre sobre hielo, con 5 mL de solución salina balanceada de Hanks. Posteriormente se extrajeron las células con 5 mL de solución de Hanks contenidos en una jeringa estéril con aguja fina, perforando por un extremo y perfundiendo el órgano inyectándole la solución por el otro extremo.

Una vez obtenida la suspensión, los linfocitos se colectaron en un tubo de centrifuga estéril y se centrifugaron a 2000 rpm por 3 minutos para lavarlos. Una vez transcurrido el tiempo de lavado se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón. El lavado se realizó dos veces más con solución salina balanceada de Hanks. Una vez terminado los lavados se resuspendieron nuevamente las células y se les agregó 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado.

5.4. CUENTA Y AJUSTE CELULAR.

Las células obtenidas del bazo se contaron para poder ajustarlas a 3×10^6 céls/mL y determinar la viabilidad inicial. Para ello, se tomó una alícuota de 20 μ l de la suspensión de linfocitos y se mezcló con un volumen igual de la dilución de azul tripano al 0.4%, y se homogenizó la suspensión.

Para determinar la cantidad de células presentes por mililitro de suspensión en el medio RPMI suplementado así como su viabilidad se utilizó un hematocitómetro o cámara de Neubauer, y se procedió acontandolas en un microscopio óptico.

Se tomó una alícuota de 20 μ l de la suspensión anterior y se llenaron cuidadosamente ambas cámaras del hematocitómetro.

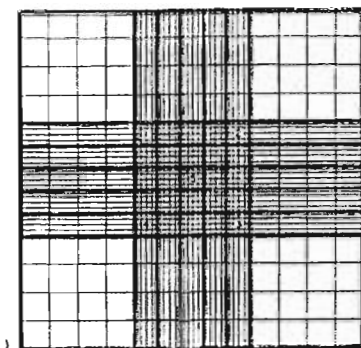


Figura A esquema de la cuadrícula de la cámara de Neubauer

El conteo de las células se llevó acabo de la siguiente forma:

Los nueve cuadros grandes de la cámara de Neubauer se dividen, a su vez, en 25 cuadros más pequeños. Las células se cuentan en cinco de los cuadros chicos: los cuatro de los extremos y el del centro. Las células muertas se tiñen de azul, de tal forma que la diferencia entre la células vivas y las células muertas se distingue notablemente.

Se cuentan las células que tocan el borde superior y el borde izquierda del perímetro de cada cuadro grande, como aparece en la figura B. No se cuentan las células que tocan el borde inferior y la línea derecha del perímetro de cada cuadro grande.

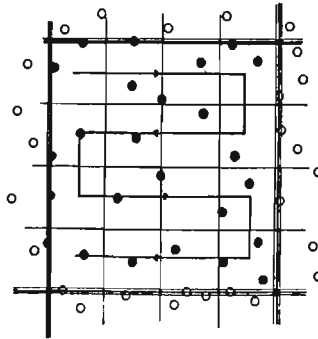


Figura B esquema del conteo de la cuadrícula de la cámara de Neubauer.

El número de células viables en la suspensión se calculó utilizando la siguiente fórmula :

$$\frac{\text{No. Promedio de células contadas} \times 25 \times 10^4 \times 2}{5} = \text{células /mL}$$

Donde : 25 es el número de subdivisiones que tiene la cuadrícula chica

10^4 es el factor de conversión de la cámara de Neubauer

5 es el número de cuadros en el que se contaron las células

2 es el factor de dilución

Una vez contadas las células, la suspensión fue ajustada a 3×10^6 células/mL.

5.5 CULTIVO DE LAS CÉLULAS.

La suspensión de células provenientes de cada ratón se sembraron por triplicado en microplacas de cultivo de 96 pozos bajo condiciones de esterilidad. A cada pozo se le agregaron 100µL de la suspensión celular previamente ajustada por lo que cada pozo recibió 3×10^5 células. Posteriormente, a cada pozo se le adicionó la dosis de picrotoxina correspondiente.

Las dosis de picrotoxina usadas fueron: 0.20, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 10, 20, 40, 80, 100 ng, para cada serie de suspensión celular proveniente de cada ratón se dejaron tres pozos que contenían únicamente 100 µL de la suspensión celular para que nos sirvieran para medir la actividad basal de las células. Las microplacas se incubaron a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂, en una incubadora, durante 51 horas.

5.6. REDUCCIÓN DEL MTT

Transcurridas las primeras 48 horas de incubación, a cada pozo de la microplaca se le adicionaron 12µL de la solución de MTT a una concentración de 5mg/mL. La placa se incubó durante 3 horas más a 37° C y 95% de humedad, con el fin de que se forme el formazán por la reducción del MTT.

Una vez transcurridas las tres horas, las células se trataron con 100 µL de solución de lisis, que contiene dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% en HCl 0.01N, esto hace que se rompan las células y los cristales de formazán se disuelvan. Transcurrida media hora más se midió la absorbancia en cada pozo a 490 nm utilizando un lector para microplacas marca Dynex.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las absorbancias obtenidas por la reducción del MTT a formazán por los linfocitos esplénicos provenientes de los ratones machos y hembras, que fueron cultivados en presencia y ausencia de las 10 diferentes dosis de picrotoxina se analizaron mediante el análisis estadístico de ANOVA, con un nivel de significancia de 95%, usando el programa Prism 4.

CAPÍTULO VI RESULTADOS

6.1. VIABILIDAD CELULAR

Las diferentes cantidades de picrotoxina añadidas al medio de cultivo en donde se incubaron los linfocitos esplénicos provenientes de ratones CD1 machos y hembras no modificaron significativamente los porcentajes de viabilidad en relación a los linfocitos control que no la recibieron. (gráficas 1 y 2).

En las hembras los porcentajes de viabilidad de los linfocitos cultivados en presencia de la picrotoxina se encontraron entre el 40% y 50%, después de las 51 horas de incubación mientras que en los linfocitos sin ella presentaron en promedio un 30%. (gráfica 1). En los machos, se mantuvo un promedio del 50% de viabilidad en los linfocitos del bazo cultivados con PTX, alcanzando un 22%. (gráfica 2). Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas según el género.

6.2. REDUCCIÓN DE MTT.

La reducción del MTT en los linfocitos cultivados y tratados con PTX parece aumentar con respecto a los cultivados de los linfocitos sin tratamiento, en casi todas las dosis probadas. (gráficas 3 y 4)

Los linfocitos no tratados reducían muy poco el MTT después de 2 días de incubación con una densidad óptica promedio de 0.2 unidades. Pero, al añadir la picrotoxina, los valores se elevaron 3 a 4 veces más según la dosis y el sexo. (gráficas 3 y 4). Los machos mostraron

los valores más altos de formación de formazán, cuando sus linfocitos del bazo se expusieron a la PTX (gráfica 4) en comparación a los linfocitos de las hembras.

6.2.1. REDUCCIÓN DE MTT SEGÚN LAS DOSIS.

La reducción del MTT en los linfocitos del bazo cultivados con concentraciones bajas y altas de picrotoxina mostró un aumento casi del triple con respecto al valor obtenido por las células en condiciones basales. El aumento en la reducción del MTT se observa en concentraciones bajas tanto para los ratones macho así como para los ratones hembra.

(gráficas 5,6,7,8,9 y 10)

6.2.2. REDUCCION DE MTT SEGÚN EL SEXO.

La administración *in vitro* de diferentes concentraciones de picrotoxina a los linfocitos del bazo, provenientes de ratones de ambos sexos, muestra una tendencia a aumentar la producción de formazán con respecto a las células basales. Esta diferencia se hace más notoria para los ratones macho, a concentraciones bajas del agente convulsivante, en comparación a los ratones hembra. Lo mismo sucede para las dosis altas de picrotoxina, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa para todas las concentraciones utilizadas en ambos géneros. (gráficas 11 y 12).

En las hembras, las dosis bajas de PTX (0.2 ng *in vitro*), tienden a incrementar la reducción de MTT en los linfocitos del bazo, aunque no de manera significativa (gráfica 5), mientras que dosis altas (80 ng) de ella no la modifican (gráfica 6 y 7).

En los machos, la presencia de PTX en los cultivos de los linfocitos del bazo tuvo un comportamiento similar al de las células provenientes de las hembras, con tendencia a

incrementar la reducción del MTT a dosis bajas 0.2 ng (gráfica 8) y sin efecto a dosis más altas (80 ng), gráficas 9 y 10.

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A todos los valores promedio de la D.O en la prueba de MTT de cada experimento, tanto para machos como para las hembras, se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de $p < 0.05$, para determinar si las diferencias entre las células tratadas y las células no tratadas eran significativas o no.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla de ANOVA.

Tabla No 6. Análisis de varianza de los resultados de la reducción de MTT, en los ratones machos.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	f
Tratamientos (entre grupos)	10	0.564	0.0564	0.814
Error (dentro de grupos)	22	1.53	0.0693	
Total	32	2.09		

Aplicando el análisis de varianza se encontró una $f = 0.814$, siendo la F de tablas para este caso: $F_{0.05, 10, 22} = 2.74$.

$$\text{Donde; } f = 0.814 < 2.74 = F_{0.05, 10, 22}$$

Lo que demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, es decir no hay diferencias entre los grupos y las células básicas.

Tabla No 7 Análisis de varianza de los resultados de la reducción de MTT, en los ratones hembra

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Tratamientos (entre grupos)	10	0.352	0.0352	0.589
Error (dentro de grupos)	33	1.98	0.0599	
Total	43	2.33		

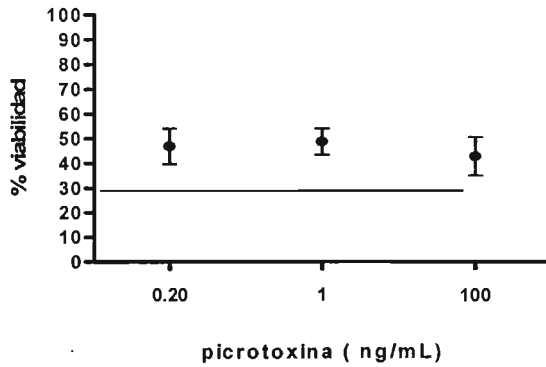
De acuerdo a este análisis, se encontró una $f = 0.589$, siendo la misma F de tablas para este caso: $F_{0.05, 10, 33} = 2.70$.

$$\text{Donde; } f = 0.589 < 2.70 = F_{0.05, 10, 33}$$

Lo que demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, es decir no hay diferencias entre los grupos y las células básicas.

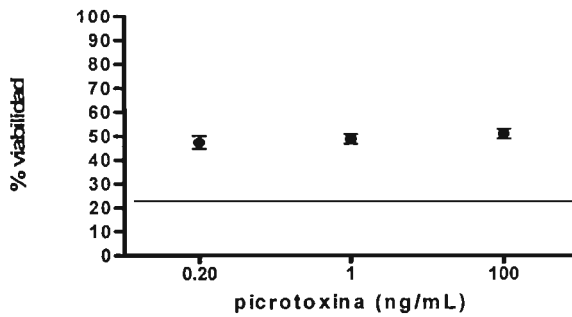
RESULTADOS

Hembras viabilidad



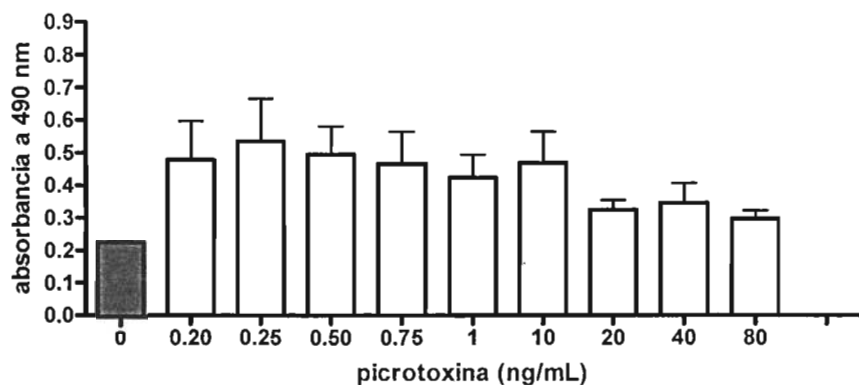
Gráfica 1. Gráfica que muestra el % de viabilidad de tres diferentes concentraciones de picrotoxina en linfocitos de hembras después de 51 horas de cultivo.

Machos Viabilidad (51 horas)



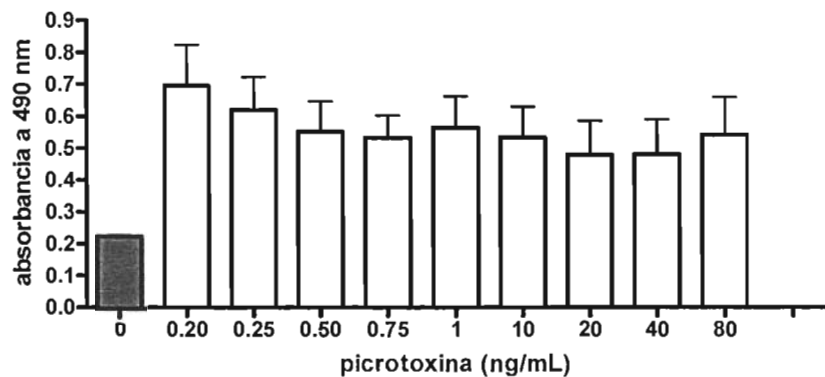
Gráfica 2. Gráfica que muestra el % de viabilidad de tres diferentes concentraciones de picrotoxina en linfocitos de machos después de 51 horas de cultivo.

Reducción de MTT en linfocitos esplénicos de ratonas, sin estimular.



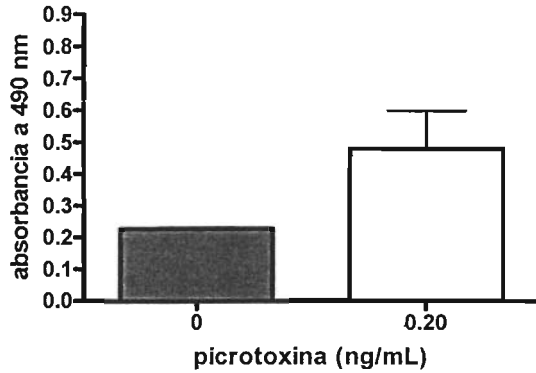
Gráfica 3. Reducción de MTT en cultivos de linfocitos del bazo, cultivados en presencia de 10 diferentes concentraciones de picrotoxina (Ptx). Las barras representan la media + el error medio estandar (EMS) de 5 experimentos.

Reducción de MTT en linfocitos esplénicos de ratones machos, sin estimular.



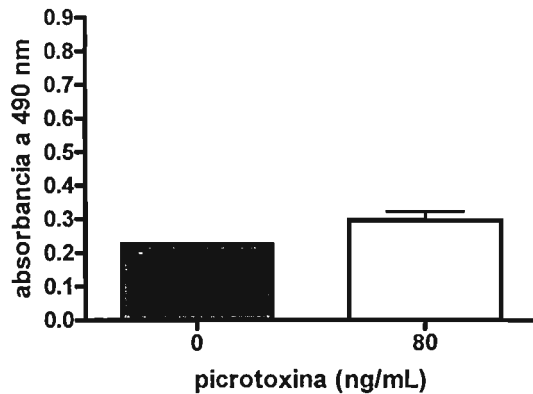
Gráfica 4. Reducción de MTT en cultivos de linfocitos del bazo, cultivados en presencia de 10 diferentes concentraciones de picrotoxina (Ptx). Las barras representan la media + el error medio estandar (EMS) de 5 experimentos.

Reducción de MTT en linfocitos de ratones hembra, sin estimular, usando una dosis baja de Ptx.



Gráfica 5. Producción de formazán en cultivos de linfocitos del bazo, provenientes de ratones hembra en presencia de la dosis más baja de picrotoxina, en relación a los linfocitos no tratados. Las barras representan a la media + EMS de 5 experimentos. ($p > 0.05$).

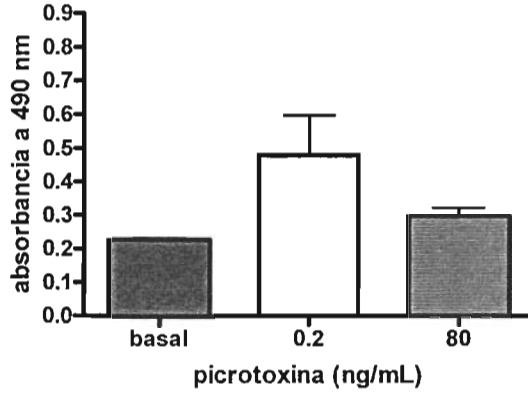
Reducción de MTT en linfocitos de ratones hembra, sin estimular, usando una dosis alta de Ptx.



Gráfica 6. Producción de formazán en cultivos de linfocitos del bazo, provenientes de ratonas, en presencia de una concentración alta de picrotoxina, en relación a los linfocitos no tratados. Las barras representan la media+ EMS de 5 experimentos. ($p > 0.05$).

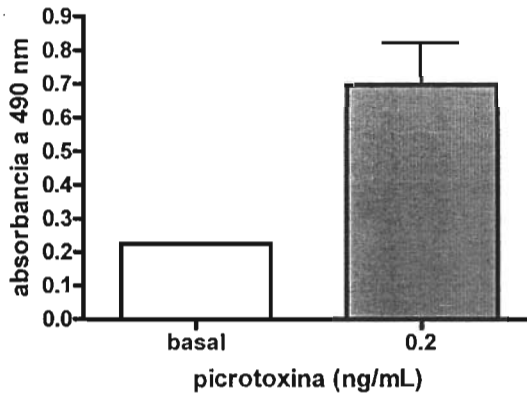
HEMBRAS

Reducción de MTT en células del bazo a concentraciones bajas y altas de Ptx



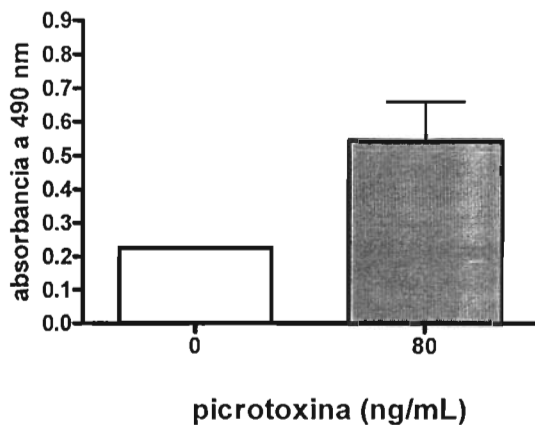
Gráfica 7- Producción de formazán en cultivos de linfocitos del bazo, provenientes de ratones hembra en presencia de una dosis baja y una dosis alta de picrotoxina, en relación a los linfocitos no tratados. Las barras representan la media + EMS de 5 experimentos. ($p > 0.05$).

Formazán en linfocitos de machos a cantidades bajas de Ptx



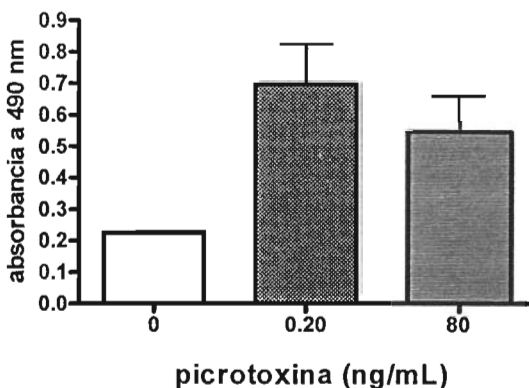
Gráfica 8. Producción de formazán en cultivos de linfocitos del bazo, provenientes de ratones macho en presencia de una dosis baja de picrotoxina, en relación a los linfocitos no tratados. Las barras representan la media + EMS de 5 experimentos. ($p > 0.05$).

Reducción de MTT en linfocitos del bazo de ratones macho, sin estimular, usando una dosis alta de Ptx.



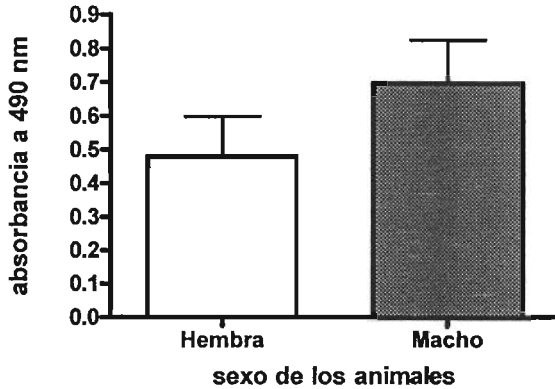
Gráfica 9. Producción de formazán en cultivos de linfocitos de ratones macho en presencia de una concentración alta de picrotoxina, en relación a los linfocitos no tratados. Las barras representan la media + EMS de 5 experimentos. ($p > 0.05$).

Reducción de MTT en linfocitos de ratones macho, sin estimular, usando dosis altas y bajas de Ptx.



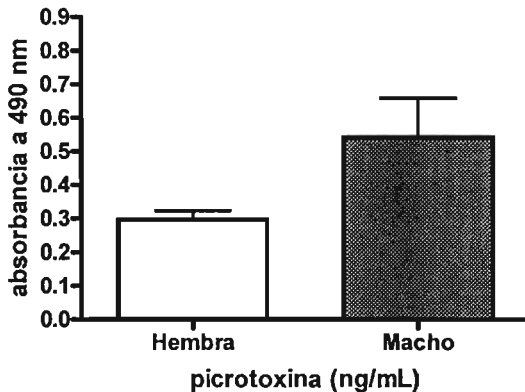
Gráfica 10. Producción de formazán en cultivos de esplenocitos de ratones machos, en presencia de una dosis baja y una dosis alta de Ptx, en relación a los linfocitos no tratados. Las barras representan la media + EMS de 5 experimentos. ($p > 0.05$).

Reducción de MTT en linfocitos del bazo de ratones machos y hembras no estimulados en presencia de Ptx (0.20 ng/mL)



Gráfica 11. Reducción de MTT en cultivos de linfocitos del bazo, sin estimular, provenientes de ratones machos y hembras, usando una concentración baja de Ptx (0.20 ng/mL). Las barras representan la media + EMS de 5 experimentos. ($p > 0.05$).

Reduccion de MTT en linfocitos del bazo de ratones machos y hembras, no estimulados, en presencia de Ptx (80 ng/mL)



Gráfica 12. Reducción de MTT en cultivos de linfocitos no estimulados provenientes de ratones machos y hembras, usando una concentración alta de Ptx (80ng/mL). Las barras representan la media + EMS de 5 experimentos. ($p > 0.05$).

CAPÍTULO VII DISCUSIÓN

En el presente trabajo se exploró la posibilidad de que la PTX modificara *in vitro* la actividad metabólica de los linfocitos del bazo de ratones, machos y hembras, mediante el método de la reducción del MTT. La picrotoxina es un antagonista no competitivo del receptor A para el neurotransmisor inhibitorio conocido como GABA, el cual se expresa normalmente en la membrana de las células del sistema inmune pueden expresar receptores para los neurotransmisores del sistema nervioso central.

El receptor para GABA_A (GABA_AR) también ha sido encontrado en el tejido periféricos que están fuera del sistema nervioso central, pero que se encuentran inervados y, por consiguiente, pueden estar sujetos al control o modulación del sistema nervioso. Sin embargo, ha sido más difícil encontrar los GABA_AR en células libres, de la sangre o fluidos biológicos que no están inervados. Unos pocos trabajos sugieren que los linfocitos de la sangre periférica pueden expresar el GABA_AR y que colocados en presencia de GABA y habiendo sido previamente estimulados con mitógenos, reducen reducen su actividad proliferativa.

Por esos antecedentes se propuso que *in vitro* la actividad metabólica de los linfocitos también se debe modificar al añadir al medio de cultivo un antagonista del GABA_AR como la PTX. Además se propuso que, según el género de los animales, se iban a encontrar diferencias entre la actividad metabólica de los linfocitos cultivados. Esta última proposición se basó en experimentos anteriores (83) que muestran como los esteroides

sexuales influyen en la expresión cerebral de los GABA_AR y que el GABA modifica la actividad cerebral del factor de transcripción dependiente del AMPc de una manera que depende del sexo de los animales (85).

Los resultados obtenidos mostraron que, tanto en los machos como en las hembras, la actividad metabólica de los linfocitos del bazo, cultivados y tratados con diferentes dosis de PTX, se incrementó en relación a la de los linfocitos que no recibieron ese mismo tratamiento, de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, a pesar de que la adición de cantidades pequeñas de PTX al medio de cultivo aumentó casi tres veces más los valores promedio de la absorbancia (como se puede ver fácilmente en la en las Gráficas 4 y 8) cuando se utilizaron linfocitos de ratones macho, esa diferencia no resultó significativa al aplicar las pruebas estadísticas de ANOVA. Probablemente la dispersión de los valores y el pequeño valor de N fueron la causa de esa falta de significancia estadística. Con un nivel de corte superior a $p < 0.05$, las diferencias resultan significativas

Al comparar los valores promedio que se obtuvieron utilizando linfocitos esplénicos de ratones de ambos sexos, se pudo observar que sistemáticamente la adición de PTX al medio aumentaba mucho más la cantidad de MTT que era reducida por las células no estimuladas que procedían de los animales macho y no de las hembras, tal como se puede ver en las Gráficas 11 y 12. De todos modos, también el valor promedio de reducción del MTT por los linfocitos de los animales hembra estuvo por arriba del valor promedio basal de los linfocitos de esos mismos animales que no fueron tratados *in vitro* con la PTX. Pero nuevamente, el análisis estadístico mostró que las diferencias según el género no eran significativas con $p < 0.05$.

Como se puede observar en las Gráficas 3 y 4, la dosis de PTX también influyó para modificar la actividad metabólica de las células cultivadas de una manera desigual y según el sexo de los animales. Así por ejemplo, en los cultivos de los linfocitos de los dos géneros de los animales, la adición de la PTX incremento la reducción del MTT en relación a los valores basales de las células que no fueron incubadas con el antagonista del GABA_AR. En los linfocitos de animales de ambos sexos, la adición al medio de cultivo de PTX en las dosis más bajas estimuló mucho mejor la actividad metabólica de las células, es decir permitió obtener valores de absorbancia más elevados. A medida que se fue aumentando la cantidad de PTX añadida al medio de cultivo, se pudo observar que iban disminuyendo los valores de absorbancia. Esta correlación inversamente proporcional se observó en los cultivos de los linfocitos de los animales de ambos sexos, aunque, a las mismas dosis, los valores fueron más elevados en las células de los animales machos que en las de las hembras.

Sin embargo, nuevamente en los experimentos anteriores, los resultados no mostraron que las diferencias entre dosis según el sexo fueron estadísticamente significativas y por tanto fueron interpretadas como una tendencia que, teóricamente, podría ser modificable más adelante al repetir los experimentos ajustando el modelo experimental.

La viabilidad de las células utilizadas fue un aspecto importante a evaluar en este trabajo. La razón es que si no se media simultáneamente la viabilidad, entonces los cambios en la reducción del MTT no se podía atribuir exclusivamente a un cambio en la actividad metabólica. Por consiguiente fue un requisito tener valores similares de células viables en los diferentes pozos donde los linfocitos eran incubados con diferentes dosis de

PTX. Este requisito se pudo cumplir a pesar de que inicialmente se pensó que la toxicidad de la PTX (es un agente epileptogénico o convulsivante en diversos modelos animales) podía reducir el número de células viables a medida que se aumentaran las cantidades del antagonista añadidas al medio de cultivo.

Los resultados mostraron que las dosis de PTX no modificaron la viabilidad, como se observa en las Gráficas 1 y 2. El porcentaje promedio de viabilidad al final del cultivo estuvo alrededor del 50% para los animales de ambos sexos cuyas células fueron tratadas con PTX, mientras que el porcentaje de viabilidad que presentaron las células colocadas en condiciones basales, sin PTX, estuvo cerca del 42%. Nosotros esperábamos lo contrario y no tenemos explicaciones para esta inversión moderada de los valores de la viabilidad, con la PTX.

Como la PTX no es un agente estimulante del metabolismo celular, sino solamente un antagonista que bloquea el efecto inhibitorio del GABA, los resultados obtenidos merecen una discusión y la presentación de las posibles razones por las cuales se pueda explicar cómo la adición de PTX incrementa la actividad metabólica de las células.

Se propone que el medio donde se cultivaron los linfocitos probablemente contiene GABA, ya que este neurotransmisor inhibitorio se encuentra normalmente en el suero y el medio de cultivo utilizado fue suplementado con un 10% de suero bovino fetal. De este modo los linfocitos normales cultivados en las condiciones estandar siempre van a estar bajo el efecto débilmente inhibitorio del GABA contenido en el medio. Solo en esas condiciones se puede explicar que al añadir la PTX se bloquea el flujo de iones de cloro al

interior de las células, las cuales entonces se desinhiben y aumentan su actividad metabólica y quedan con la capacidad de, aún en condiciones basales, reducir una mayor cantidad de MTT.

Aunque, por las razones ya mencionadas, el análisis estadístico no permitió mostrar que las diferencias observadas eran estadísticamente significativas, de todos modos son evidentes las tendencias que tienen los linfocitos a elevar la reducción del MTT después de ser incubados con la PTX y, al final, llegan a ser 2 y 3 veces mayores los promedios obtenidos experimentalmente en relación con los valores basales. Esto, sin lugar a dudas sugiere la existencia de un receptor para GABA en las células linfoides libres, cultivadas en ausencia de innervación. Si no existiera ese receptor, no habría diferencias entre los valores basales y los cultivos con picrotoxina. Todos estos resultados, preliminares, justifican que más adelante se utilice una metodología más avanzada para probar a un nivel de biología molecular, la existencia de este receptor sobre las células linfoides.

Es indudable que en este momento hacen falta más estudios, tanto poder comprender los resultados anteriores, como para conocer cuáles son las funciones de los linfocitos que resultan afectadas por su incubación con la PTX, cuál es el valor inductor del GABA presente en el microambiente de las células y, finalmente, cuál es la importancia de los neurotransmisores liberados en el SNC y en los nervios periféricos para modular la respuesta del sistema inmune, tanto para la conservación de la inmunidad como para el desenlace de las reacciones de hipersensibilidad como el asma y la autoinmunidad.

CAPÍTULO VIII CONCLUSIONES

1. La PTX, incubada con linfocitos esplénicos de ratones CD1, les aumenta 2-3 veces la actividad metabólica, medida a través de la prueba de reducción del MTT.
2. La PTX añadida al medio a diferentes dosis, no modifica la viabilidad celular medida 51 horas después de iniciar el cultivo.
3. El efecto de la PTX sobre la actividad metabólica de los linfocitos fue más evidente cuando se utilizaron células de ratones macho y menor con las células de ratones hembra.
4. La capacidad para estimular la reducción de la mayor cantidad de MTT se obtuvo con las dosis más bajas de PTX, mientras que las dosis más elevadas, aún cuando no afectaban la viabilidad celular, tendían a disminuir la actividad metabólica.
5. Se propone que la presencia de GABA en el medio de cultivo puede ser la explicación para que las células puedan incrementar su actividad metabólica en presencia de PTX.
6. A pesar de la amplitud de las diferencias, las pruebas estadísticas no mostraron que éstas fueran significativas cuando se utilizó el ANOVA con un nivel de corte= 0.05

CAPITULO IX BIBLIOGRAFIA

- 1) Klarlund, B.P and Hoffman-Goetz, L. Exercise and immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol. Rev.* 80:1055-1081, 2000.
- 2) Madden, K and Felten, D.L. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol. Rev.* 75:77-106, 1995.
- 3) Black, P. H. and Garbutt, L.D. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J. of Psychosom. Res.* 52:1-23, 2002.
- 4) Stead, R.H. Nerve remodeling during intestinal inflammation. *Ann. NY. Acad. Sci.* 664:443-55, 1992.
- 5) McKay, D.M and Bienenstock, J. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol. Today* 15(11): 533-8, 1994.
- 6) Baluk, P. Neurogenic inflammation in skin and airways. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2: 76-81,1997.
- 7) Nordlind, K, Libing, C, Ahmed, A.A., Ljungberg, A. and Liden, S. Immunohistochemical localization of interleukin-6-like immunoreactivity to peripheral nerve-like structures in normal and inflamed human skin. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 762:450-1, 1995.
- 8) Zhong, J. and Heumann, R. Lesion-induced interleukin-6 mRNA expression in rat sciatic nerve. *Ann. NY. Acad. Sci.* 762:488-90, 1995.
- 9) Felten, D.L, Felten, S.Y, Carlson, S.L., Olschowka, J.A., and Liunat, S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue *J. Immunol.* 135:755-765, 1985.

- 10) Felten, S, and Felten, D. Innervation of lymphoid tissue. In R. Ader, D.L. Felten, and S. Cohen (Eds), *Psychoneuroimmunology* (2ndEd.), p.27-69. San Diego. Academic Press. 1991.
- 11) Bishopric, N.H, Cohen, H. J, and Lefkowitz, R.J. Beta-adrenergic receptors in lymphocyte subpopulations. *J. Allerg. Immunol.* 65:29-33, 1980.
- 12) Madden, K.S, and Livnaat, S. Catecholamine action and immunology reactivity. In R. Ader, D.L. Felten, and (Eds.). *Psychoneuroimmunology* (2nd Ed.), p. 283-310. San Diego. Academic Press. 1991.
- 13) Carlson, S.L, Brooks, W.H., and Roszman, T.L Neurotransmitter lymphocyte interactions: dual receptor modulation of lymphocyte proliferation and production. *J. Neuroimmunol.* 24:155-162,1989.
- 14) Katz, P, Zaytoun, A.M., and Fauci, A.S. Mechanisms of human cell- mediated cytotoxicity. I. Modulation of natural killer cell activity by cyclic nucleotides. *Immunopharmacol.* 129:287-296,1982.
- 15) Maisel A.S, Harris C, Rearden C.A., and Michael M.C. Beta adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise. Alterations in normal individuals and patients with congestive heart failure. *Circulation.* 82:2003-2010,1990.
- 16) Moizeszowicz J. Actualización en la evaluación clínica de psicofármacos. *Acta Psiquiátrica y Psicológica de América Latina*, 21:41-51,1975.
- 17) Moizeszowicz J. Psicofarmacología psicodinámica II. Aspectos neuroquímicos, neuropsiquiátricos, y psicológicos. Buenos Aires. Paidós. 97-99,1988.
- 18) Moizeszowicz J. Psicofarmacología psicodinámica III. Nuevos enfoques clínico-terapéuticos. Buenos Aires Paidós. 121-125,1994.

- 19) Cooper, J. R, Bloom, F.E, y Roth, R. H. *The biochemical basis of Neuropharmacology*, 4th ed. Oxford University Press, N. Y. Oxford, 1982.
- 20) Nahorski, S. R., Kendall, D. A. and Batty, I. *Receptors and phosphoinositide metabolism in central nervous system. Biochem. Pharmac.* 35: 2.447-2.453, 1986.
- 21) Bloom, F. E. Neurohumoral and the Central Nervous System. In *The pharmacological basis of therapeutics*. Sexta Edición, Ed Mac millan. 235-257,1980.
- 22) Bullock, T. H. Spikeless neurons: where do we go from here ?. *Soc. Exp. Biol. Seminar. Serie 6*: 269-284,1980.
- 23) Grafstein, B, and Fromam D.S. Intracellular transport in neurons. *Pshysiol. Rev.* 60: 1167-1283, 1980.
- 24) Harold , I. K, Benjamín, J. S. Sinopsis de Psiquiatría. Ciencias de la Conducta. Psiquiatría Clínica. Ed Médica Panamericana. 120-123, 2001.
- 25) Jack, R., Cooper. *Las bases bioquímicas de la neurofarmacología*, Ed Manual Moderno. Cuarta Edición. México D.F. 37-48, 1984.
- 26) Bradford, H. F. *Fundamentos de Neuroquímica*, Ed Labor, primera edición, barcelona.113-145, 1988.
- 27) Jean, M. M., Alexandre Shualoff., 2^a Ed Polemos.
- 28).Lal, H. GABA neurotransmission: *Curr. Devel. Physiol. Neurochem. Brain Res. Bull*: 2-5, 1980.
- 29) Watkins, J. C. and Evans R. H. Excitatory amino acid transmitters. *Ann Rev Pharmacol Toxicol. Annual Reviews, Inc. Palo Alto. California.* 21:165-204,1981.

- 30) Kravitz, E.A, Kuffler, S.W, and Potter, D.D. Gamma-aminobutyric acid and their blocking compounds in Crustacea. Their relative concentrations in separated motor and inhibitory axons. *J. Neurophysiol.* 26:739-751,1963.
- 31) Otsuka, M. Gamma- amonobutyric acid and some other transmitter candidates in the nervous system. In, Pharmacology and the future of man.Proceedings of the fifth International Congress on Farmacology. Vol. 4. 186- 201,1973.
- 32) Alfred G y G, Theodore W. R, Alan, S. N. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Octava edición, 293-297,1994.
- 33) Macdonald, R. L. and McLean, M. J. Cellular bases of barbiturate and phenytoin anticonvulsant drug action. *Epilepsy.* 23: S7-S18,1982.
- 34) Salin Pascual, R, Ortega Soto. H.. Manual de Psicoquímica Bases Neuroquímicas y Psicofarmacológicas de la Psiquiatría y la Psicología. Primera Edición. México.Editorial Cedis. 65-72,1989.
- 35) Johnston , G. A. Neuropharmacology of amino and inhibitory transmitter, *Ann Rev. Pharmacol.* 18:269-290, 1978.
- 36) Logan, W. J, Snyder, S. H. Unique high affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in central nervous tissue of the rat, *Nature*, 234-297,1981.
- 37) Roberts , E. T, Chase, T. M. GABA in nervous sistem funtion. Nueva York Raven Press. Ed Tower
- 38) Morris, A. L, Alberto, D. M., Keith, F. K. Psicofarmacologia a los 30 años de progreso. Editorial Espaxs. Barcelona España. 6: 57-66, 1982.

- 39) Kaufman, D. L, Houser, C. R., and Tobin, A. J. Two forms of the GABA synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneural distributions and cofactor interactions. *J. Neurochem.* 56:720-723,1991.
- 40) McGeer, P. L, and Mc Geer, E. G. amino acid neurotransmission. In G. Siegel, B, Agranotf, R.W, Alberts, And P. Molinotf, Basic Neurochemistry, 4TH Ed New York, 311-332,1989.
- 41) Smith, K. E, Gustafson, E. L, Borden, L. A. GABA Receptors, Transporters and Metabolism, 63-72,1996.
- 42) Sitites DP. Stobo JD. Inmunología básica y clínica. Sexta Edición. El Manual Moderno. México. 55-65,1988.
- 43) William, B. P, Palmer, T. "Principles of drug action",134-144,1990.
- 44) Borman, J. Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *Trends Neurosci* 11:112, 1988.
- 45) Schoepp, D, Bockaert, J., Sladeczek, F. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory aminoacid receptors. *Trends Pharmacol. Sc.* 11:508-515,1990.
- 46) Flores, J, Africa, M. V. Farmacología Humana. Ediciones científicas y técnicas S. A. 2ª Edición Barcelona España. Ediciones Cientificas y Tecnicas. 24-30.
- 47) Bimbauner, L., Abramowitz, J, Yatani. Roles of G proteins in coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25:225-224,1990.
- 48) Breitwiser, GE. G protein-mediated ion channel activation. *Hypertension*, 17:684-692, 1991.

- 49) Luddens, H., Wisden, W. Function and pharmacology of multiple GABA_A receptor subunits. *Trends Pharmacol. Sci.* 12:49-51,1991.
- 50) Johnston, G. A. R. GABA_C receptors Relatively simple transmitter-gated ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 17:319-323,1996.
- 51) Schofield, P. R., Darlison, M. G, Fujita, N. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. *Nature*, 328:221-227,1987.
- 52) McDonald, R. L, and Olsen, R. W. GABA_A receptor channels. *Ann. Rev. Neurosc.* 17:569-602, 1994.
- 53) Smith, G. B, and Olsen, R.W. Functional domains of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 162- 168, 1995.
- 54) Enna, S. J, and Bowery, N. G. The GABA receptors, 2nd Edición. Clifton. Humana Press. 28: 850-851, 1997.
- 55) Fritschy, J. M., and Mohler, H. GABA_A receptor heterogeneity in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 359:154-194, 1995.
- 56) Rudolph, U, Crestani, F. and Moler, H. GABA_A receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 22:188-194,2004.
- 57) Bonanno, G, and Raiteri, M. Multiple GABA_B receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 14:259-261,1993.
- 58) Bowery, N.G. GABA_B receptor pharmacology. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33:109-147.1993.
- 59) Enna, S. J. GABA receptor pharmacology. Functional consideration *Biochemical Pharmacol.* 30:907-909,1981.

- 60) Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor Shows a ligand- gated receptor super- family. *Nature*. 328:221-227, 1987.
- 61) Cooper, J. R, Bloom, F. E. and Roht, R. H. *The biochemical basis of neuropharmacology*, 5th ed. Oxford University Press, New York, 1986.
- 62) Cotman, C. W, Kahle, J. S, Miller, S, Ulas, J, Bridges, R. J. Excitatory amino acid neurotransmission. *Psychopharmacology*. The fourth Generation of progress. Eds Bloom F. E: 75-85,1994.
- 63) Koob, G. F, and Bloom, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Sciense*. 242:715-723, 1988.
- 64) Siggins, G. R. and Gruol, D. L. Mechanisms of tensmiteter action in the vertebrate central nervous system. *Handbook of Physiology*. American Physiological Society. Ed. Bloom. E.E. Vol IV. 1-114,1986.
- 65) John, A. Bevan. Fundamentos de Farmacología, Introducción a los principios de acción de los fármacos, 2^{da} Ed. 336-339,1982.
- 66) Wesley, G. K., Craig, B., Alice, R. Johnson. Farmacología Médica. 300-306,1993.
- 67) Charles, R. C. Robert, E. S. Farmacología Médica. Nueva Editorial Interamericana México. Primera Edición 483-493,1984.
- 68) Satel, S. L, Nelson, J. C. Sttimulants in the treatment of depression. *J Clin Pshychiatry*, 50:241-243, 1989.
- 69) Di Palma J.R. Farmacología Médica. Prensa Medica Mexicana. 512-520, 1980
- 70) Slater, TF. Sawyer, B, Srauli, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim*.

- Biophys. Acta. 77:383-393, 1963.
- 71) Green, L. M, Reade, J. L, Ware, C.F. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory Lymphokines. *J. Immunol. Meth.*70:257-268, 1984.
- 72) Carmichael, J, Mitchell, J.B, DeGraff, W.G. Chemosensitivity testing of Human lung cancer cell lines using the MTT assay. *J Cancer.* 6: 540-547, 1988.
- 73) Sargent, J.M., Taylor, C. G. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia. *J. Cancer.* 60 2:206-210, 1989.
- 74) Altman, F.P. Tetrazolium salts and formazans. *Prog. Histochem. Cytochem.* 9:1-56, 1976.
- 75) Tetrazolium Salts Highly sensitive colour indicators of enzymatic redox reactions. <http://www.serva.de/products/lates/tetrazolium.shtml>
- 76) Mosmann, T.R, Cherwinski, H, Bond, M.W. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-57,1986.
- 77) Berridge, M.V, Tan, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303:474-82, 1993.
- 78) Liu, Y. Peterson, D.A., Kimura, H. Mechanism of Cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducción. *J. Neurochem.* 59 (2): 581-593, 1997.

- 79) Shearman, M.S, Hawtin, S.R, Taylor, V.J. The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides. *J. Neurochem.* 65:218-27, 1995.
- 80) Vistica, D.T., Skehan, P., Scudero, D. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 51 (10):2515-20, 1991.
- 81) Nikkhah, G. Tonn, J.C., Hoffmann O. The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of central nervous system. Part I: Evaluation of test-specific variables. *J Neurooncol.* 13 (1):1-11, 1992.
- 82) Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain .* 16:109-110, 1983.
- 83) Jide, Tian, Cindy Chau, Tim G Hales. GABA_A receptors mediate inhibition of T cell responses. Department of Molecular and Medical Pharmacology. 96:21-28, 1999.
- 84) Auder, Anthony P, Perrot Sinal-Tara, And McCarty, M. Excitatory versus inhibitory GABA as a divergence point in steroid-mediated sexual differentiation of the brain. Department of Physiology, University of Maryland. 14:8059-8064, 2001.
- 85) Abbas, AK. *Inmunología Celular y Molucular.* Tercera edición. Ed interamericana Mc. Graw Hill. España. 4-15, 17-35, 124, 276-277, 299-308.
- 86) Iañez PE. *Curso de Inmunología General.* Departamento de Microbiología Universidad de granada, España. www.ugr.es/eianez/inmuno/programa97.htm

- 87) García T. F. Introducción a la inmunología. Departamento de Biología Celular, Facultad de Química, UNAM. 2000.
<http://depa.pquim.unam.mx/inmuno/entrada.html>
- 88) Stites D.P, Stobo J. D. Inmunología Básica y Clínica. Sexta edición. El Manual Moderno. México 1988. 1-10.
- 89) Roit I, Brostoff J, Male D. Inmunología Ed Harcourt Brace . Cuarta edición España 1997. 2.9-2.10, 8.4-8.16.

CAPÍTULO X APÉNDICE

a) ABREVIATURAS

Sustancia P.....	P
Epinefrina.....	E
Norepinefrina.....	NE
Hormona del crecimiento.....	GH
Natural Killer.....	NK
Adenosíntrifosfato.....	ATP
Sistema Nervioso Central.....	SNC
Ácido gamma amino butírico.....	GABA
Picrotoxina.....	PTX
Ác. glutámico descarboxilasa.....	GAD
Fosfato de Piridoxal.....	Vit B ₆
GABA- Transaminasa.....	GABA-T
Gamma hidroxibutirato.....	GBH
Gamma-amino Beta-Hidroxibutirico.....	GABOB
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- -2,5 difenil tetrazolio.....	MTT
Neotetrazolio.....	NT
Clorhidrato de trifeltetrazolio.....	TTC

b) SOLUCIONES Y REACTIVOS

Solucion de Hanks

KCl.....	0.40g
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O.....	0.09g
KH ₂ PO ₄	0.06g
NaHCO ₃	0.35g
CaCl ₂	0.14g
MgCl ₂ 6H ₂ O.....	0.10g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.10g
NaCl.....	8.0g
D-glucosa.....	1.0g

Agregar agua (SSI) para solubilizar y posteriormente ajustar a 1L.

Ajustar el pH a 7.2 – 7.4 con HCl 1M ó NaOH 1M.

Esterilizar por filtración con una membrana con poro de 0.22µm y guardar a 2-8 °C hasta su uso.

Medio de cultivo suplementado

Suero bovino fetal (Gibco).....	5 mL
(Inactivado a 56 °C, durante 30 minutos)	
Amortiguador HEPES (Gibco).....	0.25 ml
Aminoácidos no esenciales (Gibco).....	0.5 mL
Antibióticos (Gibco).....	0.5 mL
Bicarbonato de sodio.....	0.25 mL
Piruvato.....	0.5 mL

Agregar todo lo anterior a 42.5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), bajo condiciones de esterilidad.

Solución del MT

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT)5.0 mg/mL

El MTT se disuelve en 1.0 mL de solución salina isotónica (SSI) para obtener una concentración de 5mg/mL. Se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22µm y se guarda en un tubo Eppendorf protegido de la luz con papel aluminio a -20 ° C hasta su uso.

Solución de picrotoxina

Para la solución de picrotoxina se usó de un stock de 100,000pg/ μ L y, apartir de éste, se realizaron diluciones correspondientes para llegar a las concentraciones requeridas.

Solución de lisis

HCl 0.1N.....5mL

SDS 10%.....5g

Se disuelve el SDS en SSI se agrega el HCl y se afora a 50mL.

Solución azul tripano

Azul tripano al 4%, en solución salina isotónica.....5mL