



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CARACTERIZACION FUNCIONAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LAS
LINEAS CELULARES GABAERGICAS M213-20 y M213-20 CL-4,
PROVENIENTES DE LA EMINENCIA GANGLIONAR DE LA RATA
SPRAGUE-DAWLEY

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

M. en C. **Jana Aylim Mejía
Toiber**

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Maria Magdalena Giordano Noyola

Querétaro, México

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis padres Hugo Mejía y Martha Toiber, por darme la vida y por crecer junto conmigo.....

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Giordano, quien como tutora, respetó mi proceso de aprendizaje, apoyó a manos abiertas este proyecto y apuntaló su orden y persistencia necesarios para que se llevara a cabo este proyecto.

Al Dr. Peña, por su tiempo y sabios consejos antes de mi examen de candidatura.

Al Dr. Diaz y al Dr. Manuel quienes hicieron técnicamente posible este proyecto, por lo enriquecedor que resultó formar parte de tres laboratorios en lugar de uno.

A la Dra. Lourdes Massieu a quien tuve presente en todo momento durante la redacción de esta tesis.

A la Dra. Leticia Verdugo y al Dr. Iván Velasco, por sus correcciones y por tomarse el tiempo para realzar mi formación académica.

Este proyecto se llevó a cabo bajo la guía y sugerencias de la Dra. Martha Escobar y la Dra. Isabel Miranda, su apoyo llevaron a buen término este proyecto.

A Fernando y a Claudia, por la entereza en su trabajo y la importancia de las cosas sencillas sin por eso ser menores.

La crítica constructiva de la Dra. Verónica Rodríguez, en los seminarios y fuera de ellos, motivó mucho de la calidad de mi trabajo en el laboratorio de plasticidad Cerebral. Además, por que el conocimiento que he adquirido sobre las toxinas medio ambientales han hecho cambios significativos en mis hábitos alimenticios y porque estoy pensando seriamente en hacer una huerta orgánica libre de pesticidas.

A la Biol. Soledad Mendoza, por la petición de los reactivos solicitados para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Adriana González quien fungió como técnico para la realización del presente proyecto y a Anaid Antaramian por la absoluta apertura y disposición en el uso del equipo de la Unidad de Proteogenómica.

Este proyecto se llevó a cabo en el Instituto de Neurobiología, campus Juriquilla, UNAM, con el apoyo de CONACYT 40161-M y la beca de CONACYT 182421, que me fue otorgada durante toda mi estancia en Querétaro.

Me gustaría reconocer y agradecer el afecto de las personas que alteraron, gracias, el sigilo y recogimiento durante mi quehacer en la ciencia:

A Ignacio del Río, mi compañero de camino,

Mis siempre añorados amigos de los miércoles y por momentos de los jueves, por su fuerza, por las charlas neuro-psico-artísticas, a Avatar Flores, Yamani, Mónica López, Gerardo Piloni, Cristina Piñon y a las sombras que osaron enfadarnos y divertirnos tantas noches, acompañados a veces del sonido de una flauta transversa.

A Claudia Moreno, por ser una fuente inagotable de sonrisas, que el conejo, la lechuga y Maki no se olviden.

A Verónica Rodríguez,

Claudia Castillo gracias por ser un ejemplo de generosidad y amistad

Robert Mercadillo, que bueno que ya te caigo mejor!

A Nadia y Pamela, que el tiempo y la distancia no recoge mi cariño por ustedes.

Zeidy Muñoz, Corine Montes que quede aquí escrito que cuando cada quien acabe su postdoc, psinapsis resurga fortalecido.

A Jahir

A mis queridos alumnos con quienes adoro observar el cambio que la formación académica realiza en sus rostros y conducta, que ello resulte en beneficio a las demás personas.

INDICE	
1. INTRODUCCION	9
2. ANTECEDENTES	11
2.1 EPILEPSIA, NEUROTRANSMISION GABAERGICA Y TERAPIA GÉNICA	11
2.2 LÍNEAS CELULARES M213-2O Y M213-2O CL-4	15
2.3 NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
1.0 EXPERIMENTOS IN VITRO	28
Cultivos celulares	28
Pruebas de proliferación	28
Captura de GABA	28
Cuantificación de GABA y Glutamato Intracelular	29
Actividad de la GAD	30
Inmunocitoquímica	30
Microscopía electrónica	32
Ensayos de Liberación de GABA y Glutamato in vitro	32
Ensayo de Evaluación del Mecanismo de Liberación de GABA	33
Ensayo de Estimulación con Glutamato	33
2.0 EXPERIMENTOS IN VIVO	34
Animales y condiciones generales	34
Trasplantes	34
Microdiálisis	35
Histología	36
Cuantificación de GABA en muestras de microdialisis	37
Análisis estadístico de los datos	37
7. RESULTADOS	37
1.0 EXPERIMENTOS IN VITRO	37
Pruebas de proliferación celular	37
Captura de GABA	38
Actividad de la GAD y el GABA intracelular	42
Inmunocitoquímica	42
ELiberación de GABA de la clona M213-2O en respuesta a un estímulo despolarizante	45
Liberación de GABA de la M213-2O CL-4 por un mecanismo dependiente de calcio	47
El glutamato induce la liberación extracelular de GABA en la clona M213-2O CL-4	47
2.0 EXPERIMENTOS IN VIVO	50
Microdiálisis	50
Volumen del trasplante	56
9. DISCUSION	58
10. CONCLUSIONES	65
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	65
ANEXO 1	72
Determinación de la captura de GABA	72

ANEXO 2	73
Determinación de la actividad de la glutamato descarboxilasa	73
ANEXO 3	74
Inmunocitoquímica para proteínas intracelulares	74
ANEXO 4	75
Determinación de proteínas por el método de Bradford	75
ANEXO 5	76
Detección electroquímica para la cualificación de GABA in vitro e in vivo	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasol-4-propionato
ANDEVA	análisis de varianza
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CPP	3-(2-carboxipiperazina-4-yl)propil-1-acido fosfórico
DMEM	medio Dulbecco modificado del Eagle
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAD	glutamato descarboxilasa
GAERS	ratas epilépticas con crisis de ausencia de Estrasburgo
GLU	glutamato
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	Solución salina amortiguada de fosfatos
SNC	sistema nervioso central
SNr	sustancia nigra reticulata
SV-40	virus del simio 40

RESUMEN

En la terapia celular *ex vivo*, se emplean células modificadas a través de la ingeniería genética para promover la expresión de moléculas implicadas en padecimientos del SNC; es el caso de la línea celular M213-2O CL-4, que tiene insertado un plásmido basado en el virus de Epstein Barr, donde se localiza el gen de la glutamato descarboxilasa (GAD_{67}). La GAD_{67} es la enzima de síntesis del GABA, el neurotransmisor inhibitorio más ampliamente distribuido del SNC. Antecedentes sobre el uso de la línea celular M213-2O CL-4 indican que el trasplante de ésta a la SNr de ratas tratadas con agentes proconvulsivos, reduce las crisis epilépticas, en varios modelos experimentales. Debido a este hallazgo, en el presente proyecto se propuso hacer una caracterización funcional *in vitro* e *in vivo*, de la línea celular transgénica la M213-2O CL-4 y la clona original la M213-2O, con la finalidad de identificar cuáles son aquellas propiedades celulares que pudieran modificar el funcionamiento del cerebro huésped.

Los resultados obtenidos en este proyecto indican que el gen del antígeno T grande del SV40, alelo A58 sensible a la temperatura promueve la proliferación de ambas líneas celulares a temperaturas no mayores de 33°C. En cuanto a sus propiedades GABAérgicas se encontró que en la actividad enzimática de la glutamato descarboxilasa en la M213-2O CL-4 es 16 veces mayor en comparación con la línea celular original. Esto se refleja en un incremento de 33-veces más GABA intracelular de la M213-2O CL-4 en comparación con la M213-2O. Además ambas líneas celulares capturan [3H] GABA en condiciones *in vitro*, y en presencia de un inhibidor, el ácido nipecótico, la captura de GABA disminuye. La M213-2O CL-4 responde a un estímulo despolarizante dado por el Ringer con alto K^+ , glutamato y cero Mg^{2+} , liberando altas concentraciones de GABA al espacio extracelular en condiciones *in vitro*.

Las células responden al glutamato posiblemente a través de la activación de receptores de tipo AMPA/NMDA. El mecanismo de liberación del GABA es exocitótico ya que se previene cuando el medio Ringer contiene EGTA y no contiene Ca^{2+} . Los resultados indican que la línea celular M213-2O CL-4 es una línea celular GABAérgica funcional ya que sintetiza, libera y transporta GABA *in vitro*.

Con la finalidad de evaluar la funcionalidad *in vivo*, se recolectaron y cuantificaron los niveles de GABA en el líquido extracelular, usando un sistema de microdiálisis y de HPLC, de la SNr de ratas con 8 y 12 semanas de trasplante de la M213-2O y M213-2O CL-4. Los resultados de la evaluación *in vivo* indican que en la región de la SNr donde se localiza el trasplante de la M213-2O CL-4 de 8 semanas se liberan altas concentraciones de GABA al espacio extracelular después de un estímulo despolarizante con KCl. Este fenómeno se pierde a las 12 semanas de trasplante y dicho cambio se relaciona con la reducción en actividad de la GAD₆₇ a este mismo tiempo, pero es independiente del volumen del trasplante, descartando la posible pérdida celular. En conclusión la M213-2O CL-4 ha demostrado ser una línea celular GABAérgica funcional *in vitro* e *in vivo* por hasta 8 semanas después de ser trasplantada al cerebro de ratas Sprague Dawley y estas propiedades pueden subyacer a los efectos conductuales que se han descrito en otros estudios.

ABSTRACT

Ex vivo cell therapy employs modified cells through genetic engineering to induce expression of molecules that may be useful for the treatment of SNC diseases; this is the case of M213-2O CL-4, that was transfected with a plasmid vector, based on the Epstein Barr virus, that contains the human glutamate decarboxylase (GAD_{67}) gen. GAD_{67} is the enzyme required for the synthesis of GABA, the main inhibitory neurotransmitter in the SNC. Previous studies using M213-2O CL-4 cells showed that their transplant into the SNr of rats treated with proconvulsive drugs, reduced epileptic seizures in various experimental models. For this reason the purpose of the present project was to characterize, *in vitro* and *in vivo*, the functional properties of the transgenic cell line M213-2O CL-4 and the original clone M213-2O, with the intention of identifying the cellular properties that could be responsible for modifying the function of the host brain.

The results obtained in this project show that the SV40 temperature sensitive allele (A58) of the large T antigen promotes cellular proliferation of the original cell line, M213-2O and M213-2O CL-4 at temperatures below 33°C. Related with their GABAergic properties it was found that clone M213-2O CL-4 has an enzymatic activity of glutamate decarboxylase 16-fold greater compared with the original cell line. This corresponds to an increment of 33-fold more intracellular GABA in clone M213-2O CL-4 compared to M213-2O. Furthermore, both cell lines uptake [³H] GABA *in vitro*, and the uptake is inhibited by the presence of a selective blocker, nipecotic acid. M213-2O CL-4 respond to a depolarizing stimulus with Krebs high K⁺, glutamate or zero Mg²⁺, releasing high amounts of GABA to the extracellular milieu, in *in vitro* conditions.

Cells respond to glutamate possibly through AMPA/NMDA receptors. The results suggest an exocytotic mechanism of GABA release in view of the fact that it is prevented with a Ringer with EGTA and without Ca²⁺. The results show that the cell line M213-2O CL-4 is a functional GABAergic cell line since it synthesizes, releases and uptakes GABA *in vitro*.

With the determination to evaluate the *in vivo* functionality, we collected and quantified extracellular GABA levels from SNr of rats with 8 and 12 weeks transplants of the M213-2O y M213-2O CL-4, using microdialysis probes and a HPLC system. *In vivo* results shows that area of SNr

transplanted with M213-2O CL-4 8 weeks before, responds by releasing high extracellular GABA levels after a depolarizing stimulus. This response is lost in 12-week old transplants and this result correlates with a reduction in GAD₆₇ activity at the same time point, but it is independent of the transplant volume, suggesting that cells are not being lost. In conclusion, M213-2O CL-4 has been shown to be a functional GABAergic cell line *in vitro* and *in vivo* for as long as 8 weeks after transplantation into the SNr of Sprague Dawley rats; and that these properties may underlie the behavioral effects that have been reported before.

1. INTRODUCCION

El sistema nervioso central (SNC), encargado de orquestar las funciones corporales, puede verse dañado a lo largo de la vida de un individuo. De diversas formas se ha intentado reparar el daño cerebral; como resultado del desarrollo de la biología molecular, evolucionó la propuesta original de la terapia celular, que utiliza como vehículo a las propias células para transportar al SNC sustancias de las que carece, a la terapia celular *ex vivo*, en la que ya obtenidas las células, se modifican genéticamente y se resaltan o introducen características moleculares y químicas relacionadas a la etiología del padecimiento, como ejemplo se han introducido genes que como resultado final producen sustancias neurotransmisoras, factores neurotróficos, moléculas neuroprotectoras, etc (Baekelandt, et al., 2000).

Históricamente, se observa que los padecimientos caracterizados por la muerte neuronal selectiva de núcleos cerebrales, de evolución progresiva y para los cuales no existen tratamientos, han sido blanco para el uso de la terapia celular *ex vivo* (Mejia-Toiber, et al., 2009). Se trata de enfermedades neurodegenerativas, en primer lugar está la enfermedad de Parkinson, posteriormente la enfermedad de Huntington y de Alzheimer. Como resultado esperado de la muerte neuronal selectiva en estas enfermedades neurodegenerativas, la producción de neurotransmisores asociados a las células en proceso de neurodegeneración se altera, por ejemplo, las células dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta en relación con la enfermedad de Parkinson; las células espinosas medianas asociadas a la síntesis de GABA en el caso de la enfermedad de Huntington; y de células colinérgicas en la del Alzheimer, resultan afectadas en pacientes con estas patologías.

Hallazgos recientes de experimentos *post-mortem* con cerebros de pacientes que tuvieron la enfermedad de Parkinson y de Huntington indican que las células trasplantadas, de origen mesencefálico, y estriatal respectivamente, permanecen en algunos casos, por más de

una década, en el cerebro de estas personas (Bachoud-Levi, et al., 2000, Keene, et al., 2007, Kordower, et al., 2008, Mendez, et al., 2008).

Más recientemente la epilepsia, considerada antiguamente como la enfermedad sagrada, ha sido abordada a través de esta propuesta terapéutica (Loscher, et al., 2008). Particularmente en nuestro laboratorio se ha encontrado que el trasplante de una línea celular transfectada con la glutamato descarboxilasa, en la isoforma 67 (GAD₆₇), la M213-2O CL-4 resulta en la modulación de las crisis epilépticas, utilizando un modelo experimental en ratas (ver adelante) (Castillo, et al., 2008, Castillo, et al., 2006)

Si bien la sobrevivencia de las células trasplantadas es una característica fundamental para favorecer el efecto terapéutico en dichos padecimientos, la disponibilidad de células provenientes de fetos humanos ha derivado en cuestionamientos éticos, además, factores como la funcionalidad *in vitro* e *in vivo*, deben tomarse en cuenta ya que el resultado terapéutico en las personas que han recibido trasplantes, es discreto. La terapia génica *ex vivo*, plantea el uso de líneas celulares, es decir de células inmortalizadas (ver adelante), cuya disponibilidad y homogeneidad se da de manera constitutiva. Además, en esta propuesta se pueden manipular las características celulares y moleculares favorables, que resulten en una mejoría funcional de los trasplantes (Mejia-Toiber, enviado).

Algunas líneas celulares han sido transfectadas con genes que expresan las enzimas que regulan la síntesis de neurotransmisores, por ejemplo, la tirosina hidroxilasa (TH) (Wang, et al., 2006, Wolff, et al., 1989) la colina acetiltransferasa (Fisher, et al., 1993), y la GAD (Conejero-Goldberg, et al., 2000, Thompson, et al., 2000), estas últimas han sido utilizadas en modelos de epilepsia que a continuación se mencionarán a mayor detalle.

2. ANTECEDENTES

2.1 EPILEPSIA, NEUROTRANSMISION GABAERGICA Y TERAPIA GÉNICA

La epilepsia, uno de los desórdenes neurológicos conocidos más antiguos, se distingue por la presencia recurrente y espontánea de descargas eléctricas anormales e hipersincronizadas de grupos neuronales, cuyos componentes pueden analizarse a través de un estudio electroencefalográfico. El término epilepsia en realidad engloba a una gran variedad de trastornos, que sin embargo comparten una manifestación, las crisis epilépticas, que pueden ser de diversa índole, veáse la clasificación de la Liga Internacional contra la Epilepsia (Brown, 2005).

Este desorden resulta interesante de abordar desde la perspectiva de la terapia génica *ex vivo*, considerando que hasta un 40 % de los casos de personas con epilepsia llegan a considerarse de tipo refractario (Beleza, 2009) y en la mayoría de estos casos se tratará de epilepsia del lóbulo temporal (ELT). Según lo indican los registros electrográficos la ELT tiene un origen límbico, de ahí su nombre y se manifiesta histopatológicamente con esclerosis en el hipocampo (Blumcke, et al., 1999). Específicamente en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo son las regiones más afectadas, lo mismo en pacientes, como en animales en condiciones experimentales, tal como se demuestra en el modelo de crisis epilépticas inducidas por ácido kaínico (Hellier, et al., 1998). Además, se ha rastreado la activación de las neuronas de la región CA3 del hipocampo, por la administración de ácido kaínico, un excitador, y se ha observado que funciona como un marcapasos promoviendo la propagación de las crisis a la región CA1 y otras estructuras del sistema límbico (Ben-Ari and Cossart, 2000). Es posible que la alteración de los mecanismos inhibitorios neuronales mediados por el sistema GABAérgico, también puede desencadenar las crisis. En particular, se ha sugerido que la alteración de las eferentes inhibitorias, GABAérgicas, de

la sustancia nigra reticulata (SNr) promueve la propagación de las crisis epilépticas (Iadarola and Gale, 1982) (Fig 1).

En relación con la aplicación de la terapia génica *ex vivo*, en nuestro laboratorio y otros, se ha empleado para la modificación de la actividad de núcleos cerebrales y con ello la posible propagación de la actividad epileptógena. Para dicho acercamiento se han utilizado células genéticamente modificadas que inclinan a las células hacia un fenotipo GABAérgico. En un estudio se realizó un trasplante intranigral de la línea celular CN 1.4, que tiene insertado el gen de la GAD₆₅ y se observó que las ratas requerían un mayor número de estímulos para alcanzar la etapa 5 del *kindling*, un modelo de epilepsia, en la corteza entorrinal (Thompson, et al., 2000). Otro estudio mostró una disminución en el número de crisis espontáneas en las ratas con el trasplante de la línea celular la CN 1.4 en la SNr en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal (Thompson and Suchomelova, 2004). En trabajos previos se probó la capacidad de la línea M213-2O CL-4 (ver adelante) de aumentar el periodo de latencia de las crisis audiogénicas, cuando es trasplantada en el colículo inferior (Ross, et al., 2002) y de incrementar la latencia de las crisis tónico-clónicas, inducidas por ácido kaínico, así como de disminuir la severidad de las mismas cuando son trasplantadas en la SNr (Castillo, et al., 2006). Un estudio reciente señala que el trasplante de la M213-2O CL-4 en la SNr disminuye el porcentaje de ratas con crisis espontáneas inducidas por un insulto inicial con ácido kaínico, a las 4 y 12 semanas después de recibir el trasplante (Castillo, et al., 2008).

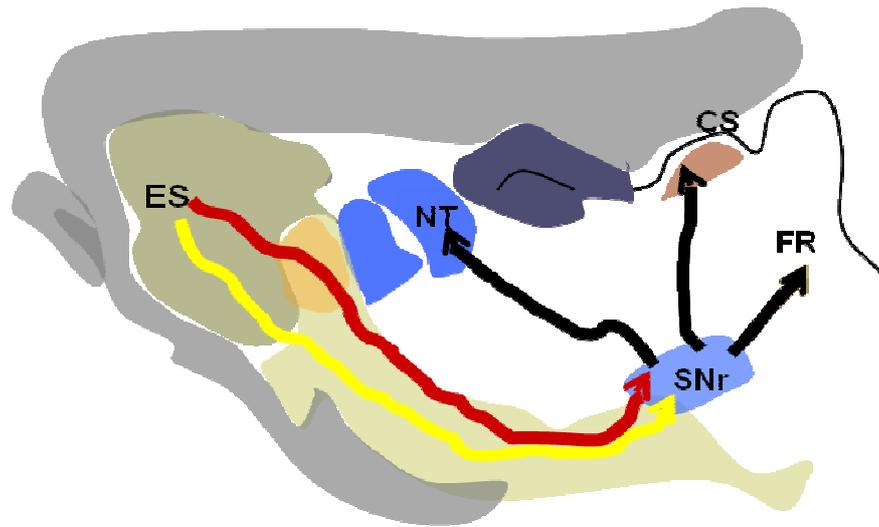


Fig.1 La SNr es una estructura mesencéfalica conformada por células GABAérgicas de proyección (Chevalier, et al., 1981) con morfología multipolar y fusiforme. La actividad de este núcleo se encuentra regulada por el estriado (ES) a través de la vía directa (línea amarilla) y de la vía indirecta (línea roja). En la vía directa el estriado envía proyecciones inhibitorias a la SNr mediadas por GABA, por su parte, la vía indirecta envía proyecciones excitatorias a la SNr mediadas por glutamato. Esta última vía es polisináptica, por lo que en primera instancia el estriado inhibe al globo pálido externo el cual desinhibe al núcleo subtalámico, que finalmente libera glutamato en la SNr. La activación de la vía directa, por un lado, promueve la inhibición de las neuronas de la SNr y como consecuencia se interrumpe la liberación de GABA en el colículo superior (CS), los núcleos talámicos (NT) y la formación reticular (FR), por lo que estos núcleos blancos se desinhiben (Deniau and Chevalier, 1992). En cambio la activación de la vía indirecta, promueve la activación de las neuronas nigrales, lo que resulta en la liberación de GABA en sus núcleos blanco. En la proyección nigro-colicular se asocian los axones de la SNr con las láminas intermedias y profundas del colículo superior, en la nigro-talámica con los núcleos ventral medial y parafascicular del tálamo y finalmente en la proyección nigro-reticular con el núcleo pedúnculo pontino y el núcleo peribraquial ventral de la formación reticular (Deniau and Chevalier, 1992).

En conclusión, estos estudios sugieren que las crisis epilépticas pueden ser controladas incrementando el tono GABAérgico en la sustancia nigra reticulata, a través del trasplante de células que expresen la enzima de síntesis del GABA.

Inclusive, un estudio indica que el trasplante de células estriatales fetales, típicamente GABAérgicas, en la SNr disminuye la severidad de crisis de manera temporal, en un modelo de kindling amigdalino; así como el umbral a las crisis parciales y a la aparición de las primeras crisis generalizadas en un modelo de kindling amigdalino (Loscher, et al., 2008).

Para reforzar la relación del GABA con la prevención de las crisis en la SNr, es importante mencionar que un estudio demostró que el implante intracerebral de matrices de polímero liberadoras de GABA en la SNr suprime las crisis generalizadas solamente mientras el neurotransmisor es liberado (Kokaia, et al., 1994). En otro estudio se probó que la aplicación de muscimol, un agonista GABAérgico, en la SNr bloquea las extensiones tónicas de las patas traseras provocadas por un estímulo eléctrico, de acuerdo con el modelo de electroshock máximo, así como el componente tónico-clónico por la aplicación de pentilenetetrazol, un estimulante no selectivo, y por bicuculina, un antagonista GABAérgico (Iadarola and Gale, 1982). Adicionalmente, se lesionó a la SNr por electrólisis o por la administración de una dosis alta de ácido kaínico y se observó el bloqueo de las crisis en un modelo de electroshock máximo y por la administración de bicuculina (Garant and Gale, 1983).

De los estudios farmacológicos, de lesión y de trasplantes, anteriormente descritos, se sugiere que la disminución en la actividad de la SNr tiene un efecto antiepiléptico (Veliskova and Moshe, 2006). Además, estos estudios indican que al incrementar el tono GABAérgico en la SNr disminuyen las crisis epileptiformes de varios tipos, aunque no está todavía bien descrito cuál es el circuito neuronal involucrado en estos efectos. De particular interés para este proyecto, son los estudios que demuestran que el trasplante de células productoras de GABA, la

llamada terapia celular *ex vivo*, es útil para el control de crisis epileptiformes en diversos modelos animales.

2.2 LÍNEAS CELULARES M213-2O y M213-2O CL-4

A continuación describiremos el origen y algunas de las características conocidas de la línea celular M213-2O CL-4 estudiada a mayor profundidad en el presente proyecto. Para mayor información de los beneficios en el uso de líneas celulares ver (Mejia-Toiber, enviado)

La clona M213-2O CL-4 se derivó de la M213-2O, proveniente de la eminencia ganglionar de embriones (E14-E15) de ratas Sprague Dawley. Esta región cuenta con dos características que resultaron de interés para la creación de una línea celular con características de células inmaduras GABAérgicas; cuenta con una lámina subventricular de proliferación ubicada en la región ventral del telencéfalo de los embriones y además da origen a células GABAérgicas, en regiones como el hipocampo, la corteza cerebral y ganglios basales (Petanjek, et al., 2008).

Con las células obtenidas de los cultivos primarios y utilizando técnicas de ingeniería genética para inducir la proliferación celular de manera continua, se obtuvo una línea celular inmortalizada. Para esto se utilizó como vector viral el antígeno T grande del SV40, alelo a58 sensible a la temperatura (Tegtmeyer, 1975).

El mecanismo implicado en la proliferación celular, inducida por el SV40 está ligado a su inhibición de las proteínas p53 y pRb; cuya función celular, es la inducción de la muerte celular (Stewart, et al., 2001) (Fig.2).

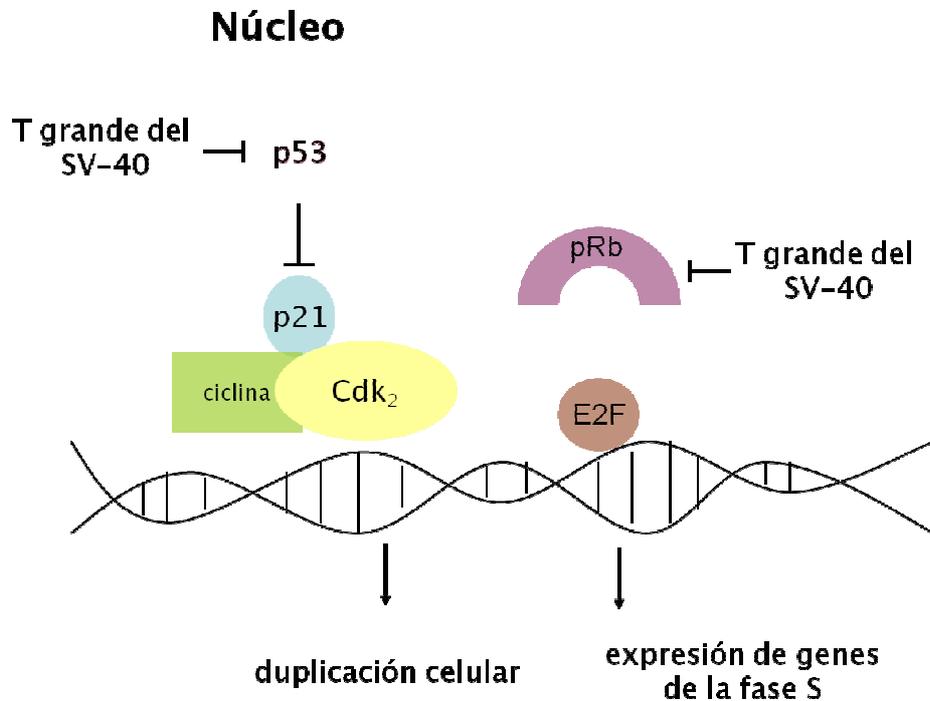


Fig. 2. El antígeno T grande del SV40, es un oncogén que promueve la proliferación celular. El mecanismo de acción implicado incluye la inhibición de la proteína p53 que actúa como un factor de transcripción para la proteína p21 quien regula de manera negativa a las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), enzimas que promueven la entrada de las células a la fase S del ciclo celular, como consecuencia se promueven la reparación del DNA, o bien comienzan procesos apoptóticos que llevan a la muerte celular. Por ello, el efecto del antígeno T grande del SV40 llevaría a la falla en estas respuestas y por lo tanto a la proliferación celular. Otro blanco del SV40 es la proteína pRb la cual al encontrarse activa, inhibe la expresión de genes de la fase S en asociación con la proteína E2F de regulación génica promoviendo de esta forma la proliferación celular (Morgan, 2002).

Si bien la M213-20 prolifera continuamente en condiciones *in vitro*, el alelo A58 sensible a la temperatura promueve la proliferación celular cuando éstas se cultivan a una temperatura permisiva (33°C),

mientras que el aumento en la temperatura, en una condición no permisiva (39.5°C) previene la duplicación celular; como consecuencia las células desarrollan características más complejas, como el aumento en la longitud de sus procesos celulares (Giordano, et al., 1993, Giordano, et al., 1996).

La dependencia de la temperatura en relación a la capacidad proliferativa de esta línea celular, ha mostrado ser benéfica para su uso en modelos experimentales de epilepsia donde como resultado de su trasplante al SNC no se ha reportado la presencia de tumores (Castillo, et al., 2008, Castillo, et al., 2006, Giordano, et al., 1996, Ross, et al., 2002).

Una vez establecida la línea celular M213-20, con las que se obtienen cultivos homogéneos y con la finalidad de sobresaltar sus características GABAérgicas, se manipularon genéticamente a través de un plásmido basado en el virus de Epstein-Barr, de estos experimentos se obtuvieron varias clonas de entre las cuales se seleccionó la Cl-4 ya que mostró un incremento de 44 veces más contenido de GABA total en comparación con la línea celular progenitora (Tabla 1). Un medio selectivo que contiene higromicina permite que con la exposición a este antibiótico se seleccione a las células resistentes, es decir a las que contienen el transgen. El vector utilizado, el pREP10, contiene un sitio de origen de replicación, un promotor basado en el virus del sarcoma de Rous y adicionalmente expresa el antígeno nuclear EBNA que permite la replicación extracromosómica. La transfección se llevó a cabo utilizando lípidos catiónicos como agente de transfección.

Adicionalmente, se probó que la Cl-4, contiene el mensajero de la GAD trasfectada y los estudios inmunocitoquímicos muestran la sobreexpresión de la GAD y que es capaz de responder ante un estímulo despolarizante como KCl (Conejero-Goldberg, et al., 2000). Debido a la transfección realizada en la M213-20 CL-4 podemos decir que tienen potencialmente la capacidad de funcionar como células GABAérgicas.

En relación a las características que expresan estas líneas celulares, se han hecho estudios inmunocitoquímicos, neuroquímicos y

moleculares. Primero se mencionarán los resultados encontrados en el caso de la M213-2O, los cuales indican su etapa de desarrollo y su funcionalidad *in vitro*. Estudios realizados por Giordano (Giordano, et al., 1993, Giordano, et al., 1996) y Castillo (2008) sugieren que las células se encuentran en un estado previo entre células precursoras y neuronas maduras. Los resultados mostrados en la tabla 1, indican de manera concluyente que las células no son células progenitoras, ya que son tanto negativas a filamentos intermedios como la nestina (Gilyarov, 2008), la vimentina (Houle and Fedoroff, 1983) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), esta última presente sólo en células gliales y en células progenitoras de la zona subventricular (Zhu and Dahlstrom, 2007). Tampoco cuentan con proteínas de neuroblastos, como la doblecortina (DCX), cuya función se relaciona con la organización y estabilización de los microtúbulos de las células en migración (Gleeson, et al., 1999), de manera que tampoco se trata de células precursoras. En la siguiente etapa de desarrollo celular, comienza la diferenciación celular, hacia un fenotipo neuronal o glial.

En el SNC existen dos tipos celulares, las neuronas y la glia, sin embargo, previamente se mencionó que eran negativas a la GFAP, pero se mostraron positivas a la proteína asociada a los microtúbulos (MAP-2),

una fosfoproteína encargada de conferir estabilidad al soma y a las dendritas de las neuronas, por lo que su presencia sugiere hasta cierto punto un linaje neuronal para la M213-2O.

Tabla 1. Características inmunocitoquímicas, neuroquímicas y moleculares de las líneas celulares M213-2O y M213-2O CL-4

<i>Estudios</i>	<i>M213- 2º</i>	<i>M 213-2O CL-4</i>
<i>Inmunocitoquímicos</i>		
<i>Vimentina*</i>	-	?
<i>Neurofilamento fosforilado (SMF 1)</i>	+	?
<i>Neurofilamento fosforilado (SMF 2)</i>	-	?
<i>Neurofilamento fosforilado (SMF 3)</i>	-	?
<i>Neurofilamento 68 kDa</i>	-	?
<i>Neurofilamento 160 kDa</i>	-	?
<i>Neurofilamento 200 Kda</i>	-	?
<i>MAP-2</i>	+ -	?
<i>GFAP</i>	-	-
<i>GAD</i>	+ -	++
<i>Nestina</i>	-	?
<i>N-CAM**</i>	-	?
<i>NeuN</i>	-	-
<i>DCX</i>	-	-
<i>Estudios neuroquímicos</i>		
<i>Transportadores</i>	+	?
<i>Niveles intracelulares de GABA</i>	2.44 $\mu\text{mol} \pm 0.57/\text{g}$ de proteína	188 $\pm 46.8 \mu\text{mol/g}$ proteína
<i>Niveles extracelulares de GABA</i>	$\approx 3.5 \text{ nM/mg}$ proteína	$\approx 0.7 \mu\text{mol/g}$ proteína
<i>Actividad de la GAD</i>	?	?
<i>Estudios moleculares</i>		
<i>Expresión de la hGAD GAD-67 por RT-PCR</i>	-	+

MAP-2, proteína asociada a los microtúbulos, GFAP, proteína ácida fibrilar glial, GAD, glutamato descarboxilasa, N-CAM, molécula de adhesión celular neuronal, NeuN, proteína nuclear específica de neuronas, DCX, doblecortina, RT-PCR, reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa.

*Filamento intermedio en fibroblastos

**Presentes durante el desarrollo de la neurona (Soroka, et al., 2008)

Aunado a este hallazgo, Giordano et al., (Giordano, et al., 1996) encontró la presencia del neurofilamento fosforilado 1 (SMF1), que forman parte de los filamentos intermedios de las dendritas y axones que una vez fosforilados, se sugiere proveen de estabilidad al axón (Sihag, et al., 2007) (Tabla 1).

Debido a la importancia del neurotransmisor para el presente proyecto, a continuación se hará una breve exposición del sistema GABAérgico.

2.3 NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA

A finales del siglo XIX, Santiago Ramón y Cajal, propuso la teoría neuronal, en la que establecía que las neuronas se encontraban separadas entre sí y se comunicaban en regiones conocidas como sinapsis. Posteriormente, el hallazgo hecho por Otto Loewi en 1921, indicaba que los impulsos nerviosos eran transmitidos a través de sustancias químicas.

Estos resultados señalaban la naturaleza química de la comunicación neuronal, dichas sustancias químicas son conocidas con el nombre de neurotransmisores. Entre ellos se encuentran los aminoácidos neurotransmisores, como el glutamato, aspartato y el ácido gamma amino butírico (GABA), este último es un aminoácido no esencial considerado como el principal neurotransmisor inhibitor del SNC.

La enzima de síntesis del GABA, la GAD, posee una estructura homodimérica y la reacción se lleva a cabo en un paso único, que requiere fosfato de piridoxal como cofactor (PLP), y al glutamato como sustrato, obteniéndose CO_2 como co-producto (Martin, et al., 2000). Hay dos isoformas de esta enzima, la GAD_{65} y la GAD_{67} , y sus nombres provienen de su masa molecular que corresponde a ~65 y ~67 kDa respectivamente. Estas enzimas difieren en algunas características, en principio, el gen que las codifica, en el caso de la GAD_{65} se localiza en el cromosoma 10 y el de la GAD_{67} , en el cromosoma 2 del humano. La secuencia de aminoácidos de la GAD humana se conoce desde 1992, la GAD_{65} y GAD_{67} coinciden en un 65 % (Bu, et al., 1992), esto puede

explicar por qué las características de la GAD₆₅ y de la GAD₆₇ difieren en los aspectos que a continuación se describirán.

La distribución heterogénea de ambas enzimas indica que la GAD₆₅ se encuentra localizada primordialmente en las terminales nerviosas, mientras que la GAD₆₇ se localiza en las terminales nerviosas, el soma y las dendritas (Esclapez, et al., 1994). Además, estas isoenzimas difieren en su unión y requerimiento por el PLP, la GAD₆₅ se convierte en apoenzima, es decir en enzima sin co-factor como resultado de la síntesis de GABA. Se ha calculado que el 93% de la GAD₆₅ se encuentra en este estado inactivo. En comparación, la GAD₆₇ se encuentra en un 72% en forma de holoenzima, es decir en enzima activa. Con base en estos hallazgos se sugiere que el principal aporte de GABA al cerebro, es derivado de la actividad de la GAD₆₇ (Martin, et al., 2000, Soghomonian and Martin, 1998). Un estudio reciente que determinó por cristalografía la estructura de estas enzimas, explica que el sitio catalítico, ubicado en el centro del dominio de unión al PLP, en la GAD₆₇ está cubierto, en cambio en la GAD₆₅ éste es móvil. Esto significa que al terminar la reacción, se libera el cofactor, lo que da como resultado la autoinactivación de la GAD₆₅. Este fenómeno promueve la síntesis de GABA, prioritariamente a través de la GAD₆₇ que no requiere PLP adicional, para que se lleve a cabo la reacción (Fenalti, et al., 2007). En apoyo a la teoría de que la GAD₆₇ aporta la mayor cantidad de GABA al cerebro, Asada y cols (Asada, et al., 1997) encontró que en el cerebro de ratones GAD₆₅ -/- no se modificó el contenido de GABA, aunque se incrementó la susceptibilidad a las crisis epilépticas. Sin embargo, se encontró que los ratones GAD₆₇ -/-, si bien morían rápidamente por un defecto en el cierre del paladar, la mutación de la enzima reducía significativamente el contenido de GABA en el cerebro (Asada, et al., 1996).

Una vez que el GABA es sintetizado, su almacenamiento vesicular requiere al transportador vesicular de GABA (VGAT), (Wojcik, et al., 2006). En este sentido se encontró que si bien sólo la GAD₆₅ posee una estructura capaz de asociarse a membranas vesiculares (Jin, et al., 2003)

la GAD₆₇ puede formar heterómeros con la GAD₆₅ y así contribuir al llenado de las vesículas de las neuronas GABAérgicas (Kaufman, et al., 1991). Estos resultados sugieren que el GABA liberado por exocitosis, puede provenir de la síntesis de GABA, a partir tanto de la actividad de la GAD₆₅ como de la GAD₆₇.

Para que el efecto inhibitorio del GABA se lleve a cabo, es fundamental su liberación al espacio sináptico. La liberación de los neurotransmisores puede ocurrir de manera inducida o espontáneamente.

En el primero de los casos la liberación ocurre una vez que el potencial de acción arriba a la terminal axónica y entonces se libera el neurotransmisor sincrónicamente en múltiples terminales de una misma neurona. Este fenómeno se desencadena una vez que el cambio en el potencial de la membrana provoca la apertura de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, ubicados en la presinapsis; la entrada de Ca²⁺ induce la movilización de las vesículas ancladas a las zonas de liberación, es decir al sitio activo de la neurona. Una vez que las vesículas se fusionan con la membrana presináptica de la neurona, su contenido, el neurotransmisor, es liberado al espacio sináptico, en un fenómeno conocido como exocitosis (Holz, 2006). Este tipo de liberación inducida por el arribo del potencial de acción a la terminal sináptica es dependiente de Ca²⁺ (Katz and Miledi, 1967), sin embargo en este sistema se ha descrito un tipo de liberación independiente de Ca²⁺ mediada por transportadores de GABA dependientes de Na⁺ (Sitges, et al., 1993).

Por otro lado, la liberación espontánea, ocurre de manera azarosa, y en ausencia del potencial de acción, por lo que no depende de la presencia de Ca²⁺ para llevarse a cabo (Augustine and Kasai, 2007).

Una vez que el neurotransmisor es liberado al espacio sináptico es necesario que se una a proteínas especializadas, llamadas receptores, cuya activación resulta en una cascada de eventos moleculares que representan la respuesta de la célula al neurotransmisor. Los receptores se han clasificado de acuerdo a sus propiedades farmacológicas,

bioquímicas y electrofisiológicas. Así, tenemos en el grupo de los receptores ionotrópicos, los GABA-A y los GABA-C y al grupo de receptores metabotrópicos pertenecen los receptores GABA-B. Todos ellos son activados por GABA, que es el ligando endógeno (Olsen, 2006).

Estudios farmacológicos de los receptores GABA-A indican que fármacos agonistas como el muscimol actúan en el mismo sitio de acción que el GABA y en sitios alostéricos se unen fármacos como las benzodiazepinas, picrotoxina, barbitúricos, esteroides y anestésicos volátiles como el halotano y antagonistas como la bicuculina (Olsen, 2006). Estos receptores, tienen una estructura pentamérica, donde cada subunidad cuenta con cuatro dominios α -hélice (M1-M4), siendo los M2, los que forman principalmente el canal central del receptor permeable al Cl⁻. Cada subunidad tiene un peso molecular de 50-60kDa y se clasifican en, α -1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ , siendo la combinación de α 1 β 2 γ 2, la más ampliamente distribuida en las neuronas GABAérgicas del cerebro (Olsen and Sieghart, 2008). Cada subunidad cuenta con un dominio extracelular largo, cuatro dominios transmembranales y una unión intracelular larga entre el dominio tres y cuatro.

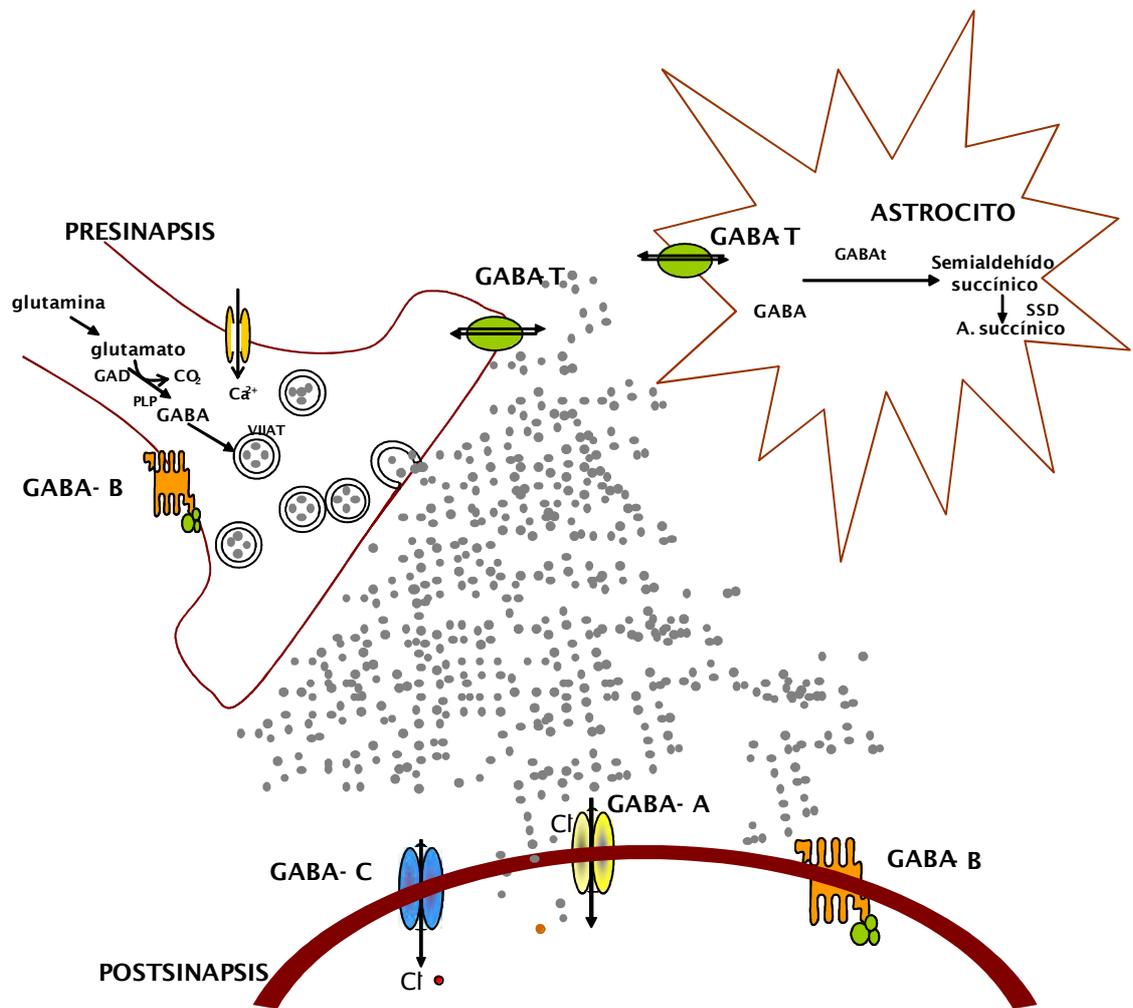


Fig. 2. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitor del SNC. Este se sintetiza en la presinapsis, a partir del glutamato, la GAD descarboxila al glutamato formando finalmente al GABA. Una vez sintetizado, es vesiculizado y posteriormente al arribar el potencial de acción a la terminal sináptica, los canales de calcio dependientes de voltaje, se abren, permitiendo la entrada de dicho ión al interior celular, lo cual induce la movilización de las vesículas sinápticas a la membrana celular, vertiendo su contenido al espacio sináptico. Una vez que el GABA ha sido liberado, puede estimular a dos grandes tipos de receptores, los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos, los GABA-A y GABA-C se encuentran conformando un canal permeable a iones. Cuando el GABA activa a cualquiera de estos receptores se abre su canal permitiendo la entrada del ión Cl⁻ al interior celular. La entrada de Cl⁻ hiperpolariza a las células alejándolas del umbral de disparo. Por su parte, los receptores metabotrópicos, los GABA-B, están formados por siete segmentos transmembranales y se encuentran acoplados a proteínas G y transducen cascadas de segundos mensajeros. Los transportadores de GABA se encuentran en la presinapsis y en la glia y se encargan de terminar con la neurotransmisión GABAérgica. Estos utilizan como fuerza motriz, el gradiente de Na⁺, para trasportar al GABA junto con un Na⁺ al interior de la célula. Una vez dentro, el GABA es metabolizado a semialdehído succínico a través de la GABA trasaminasa. El semialdehído succínico es convertido en ácido succínico por la semialdehído succínico deshidrogenasa (Olsen, 2006).

Los estudios electrofisiológicos de los receptores a GABA-A indican que la activación de este receptor incrementa la conductancia a Cl^- en la membrana, y conduce a la célula a un estado de hiperpolarización que aleja a las células del umbral de disparo, causando la inhibición neuronal. Los receptores tipo GABA-C pertenecen al grupo de los receptores ionotópicos, sin embargo estos son insensibles al antagonista de GABA-A, la bicuculina y tampoco son modulados por las benzodiazepinas ó barbitúricos, como los receptores GABA-A; estos receptores son sensibles a la picrotoxina y a los neuroesteroides (Olsen and Sieghart, 2008). Estas diferencias se deben a que cuentan con un subunidad recientemente descubierta, la ρ (1-3). Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en la retina (Olsen and Sieghart, 2008).

Por otro lado, los receptores a GABA-B se localizan tanto en la membrana postsináptica como en la presináptica, y pertenecen al grupo de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Los receptores tipo GABA-B provocan el cierre de los canales de Ca^{2+} . Adicionalmente, estos receptores en la postsinapsis causan corrientes sinápticas inhibitorias al encontrarse anclados a canales de K^+ , con ello la liberación del neurotransmisor disminuye (Olsen, 2006).

Una vez liberado al espacio sináptico, las concentraciones de GABA oscilan entre 50 y 150 mM; la neurotransmisión GABAérgica termina con la remoción del GABA a través de los transportadores dependientes de Na^{2+} , ubicados en la membrana neuronal y glial, estos transportadores han sido denominados en la rata como los rGAT1-4 (Foster and Kemp, 2006). Todos ellos comparten una estructura similar de doce segmentos transmembranales y en cuanto a su distribución los rGAT-1 y GAT-4 se localizan principalmente en terminales nerviosas, los GAT-2 en la glia y los rGAT-3 en el plexo coroideo (Borden, 1996). La estequiometría de estos transportadores indica que la recaptura del GABA es electrogénica ya que cada molécula de este neurotransmisor es trasportado junto con 2 iones Na^+ y un ión Cl^- . Una vez que el GABA se encuentra en el interior de las neuronas o de la glia, éste es

metabolizado en semialdehído succínico, a través de la reacción catalizada por la GABA transaminasa y finalmente éste es convertido a succinato por la deshidrogenasa del ácido succínico (Borden, 1996) (Fig.2).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por lo anteriormente descrito, en el presente proyecto se propone hacer la caracterización de la línea celular transfectada con la GAD₆₇, la M213-2O CL-4, que ha demostrado ser eficaz en la modulación de las crisis epilépticas en algunos modelos experimentales de este desorden.

Ningún estudio hasta la fecha ha demostrado directamente el mecanismo de acción de dicha línea celular; por ello, el propósito de este estudio es evaluar las características de los trasplantes intranigrales de la línea celular M213-2O CL-4, que potencialmente funcionan como células sobreproductoras de GABA. Por ello se determinarán las características de síntesis, liberación y captura del GABA *in vitro* y se estudiarán las características de síntesis y liberación del GABA en el sitio del trasplante. De esta forma nos planteamos la siguiente pregunta experimental ¿Presentará la línea celular M213-2O CL-4 una sobreproducción de GABA *in vitro* y después de ser trasplantada a la SNr de la rata?

Los resultados de este trabajo contribuirán a la comprensión de los mecanismos a través de los cuales actúan los trasplantes intracerebrales, y a la comprensión de la función de la SNr en la prevención de las crisis epilépticas.

4. HIPÓTESIS

La línea celular transgénica, la M213-20 CL-4 muestra actividad enzimática de la GAD, sobreproducción del GABA, captura de este neurotransmisor y una liberación dependiente de estímulo en condiciones *in vitro* y después de ser transplantada al cerebro de la rata se incrementan los niveles de GABA extracelular en la región del trasplante.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si la línea celular, la M213-2O CL-4 presenta características de células GABAérgicas en condiciones *in vitro* y una vez trasplantadas en la SNr de la rata, incrementan los niveles de GABA extracelular en la región del trasplante.

Objetivos Particulares experimentos in vitro

1. Determinar la proliferación celular en relación con la temperatura y la expresión del antígeno T grande del SV-40
2. Determinar las características inmunocitoquímicas gliales o neuronales, de las líneas celulares
3. Cuantificar el contenido intracelular de GABA
4. Determinar la actividad y la expresión de la GAD
5. Determinar la presencia de sistemas de captura del GABA
6. Cuantificar la liberación de GABA inducida por alto KCl y por glutamato
7. Evaluar el mecanismo de liberación del GABA
8. Determinar los tipos de receptores implicados en la liberación de GABA inducida por glutamato
9. Determinar los niveles extracelulares de glutamato

Objetivos Particulares experimentos in vivo

1. Determinar el volumen del trasplante
2. Determinar la actividad de la GAD
3. Determinar los niveles de GABA en muestras del sitio del trasplante

Determinar las

6. MATERIALES Y MÉTODOS

1.0 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Cultivos celulares

Las líneas celulares fueron cultivadas en un medio DMEM-F12 (1:1 Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A) con 10% de suero fetal bovino (FCS, Gibco) y 1% penicilina/estreptomicina (Gibco). Los cultivos se llevaron a cabo en frascos de 75-cm² fueron mantenidos a una temperatura de 33°C y 5% CO₂. En el caso de la línea celular M213-20 CL-4, los cultivos se mantuvieron en un medio que contenía adicionalmente Higromicina B (200 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A), como medio selector.

Pruebas de proliferación

Las líneas celulares M213-20 y M213-20 CL-4 se propagaron en un medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina en cajas de cultivo mantenidas a 33°, 37°, y 39°C con 5% de CO₂. Las células fueron cultivadas por seis días, a la misma densidad, en cajas de seis pozos. La sobrevivencia celular fue determinada en cuatro pozos a través del método de exclusión del colorante azul de tripano. El promedio de células viables fue calculado a cada temperatura.

Captura de GABA

Para medir la captura de GABA, las líneas celulares M213-20 y M213-20 CL-4 fueron cultivadas y el día del experimento lavadas con amortiguador Tris-Krebs (pH 7.4), éste contenía 144 mM de NaCl, 50 mM de KCl, 1.2 mM de MgSO₄, 1.2 mM de CaCl₂, 1.2 mM de NaH₂PO₄, 15 mM de Tris, y 10 mM de glucosa. Las células fueron incubadas por 10 min en 200 µl de ácido 4-amino-n-[2,3-³H] butírico (100 nM) con una actividad específica de 94 Ci/mmol (Radiochemical batch analysis, GE Healthcare, UK). El ácido nipecótico (0.1 mM) se adicionó en algunos

pozos para inhibir la actividad de los transportadores (Aldrich, USA). Los pozos fueron lavados con el amortiguador e incubados por 10 min con 250 μ l de ácido sulfosalicílico al 10%. Al final de la incubación, se adicionaron 750 μ l de H₂O a cada pozo, y la suspensión fue transferida a viales con 10 ml del coctel de centelleo. La radioactividad fue cuantificada utilizando un contador de centelleo (Beckman, Coulter LS 6500, Multi Purpose Scintillation Counter, USA) (Anexo 1).

Cuantificación de GABA y Glutamato Intracelular

Los niveles de GABA y glutamato fueron medidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC 1100 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) utilizando el método de fase reversa, con ayuda de una columna cromatográfica, C18 column (ESA HR 80, 4.6 x 80 mm; 3 μ m) en un sistema de detección electroquímica (Coulchem III, USA). Las muestras fueron derivadas con una mezcla de ortoformaldehído y 2-mercaptoetanol (Castillo, et al., 2008). Se utilizó como fase móvil amortiguador de sodio (50 mM) en una solución con metanol al 25 % a pH 6.75, con un flujo de 1.2 ml/min. Los niveles de GABA y glutamato fueron calculados de acuerdo a estándares externos. Las muestras se corrieron por duplicado y la concentración de cada muestra fue expresada en μ mol por g de proteína. Para determinar el GABA total cada línea celular fue cultivada en frascos de 25-cm². Cuando alcanzaron el 90% de la confluencia, se les agregó 35% de ácido sulfosalicílico. Después de 20 min, las células fueron separadas de los frascos con un separador y puestas en tubos almacenados toda la noche a 4°C. Después de la centrifugación a 1129 *g* por 5 min (850 *g*, Sorvall MC-12V, Thermo Scientific, Waltham MA, USA) se recolectó el sobrenadante y fue mantenido a -70°C hasta su posterior análisis por HPLC. La concentración de proteínas en los *pellets* se calcularon de acuerdo al método de Bradford, utilizando a la albúmina como estándar (Anexo 4).

Actividad de la GAD

La actividad total de la GAD fue cuantificada con ácido L-[1-¹⁴C]glutámico como sustrato utilizando un sistema para atrapar el ¹⁴CO₂ descrito previamente (Diaz-Munoz and Tapia, 1988). Las células fueron homogenizadas en Na₂HPO₄ (50 mM); la reacción contenía una mezcla de 65 µl del homogenado (~15 mg/ml proteína), 87 µl de fosfato de piridoxal-5'-fosfato (0.5 mM), 40 µl de ditiotreitól (1.13 mM), 7 µl de glutamato, y 5 µl de 1-[1-¹⁴C]-Glu (10 mM, 0.05 µCi), en un volumen total de 350 µl con pH 7.4. Las muestras fueron incubadas en un baño en movimiento a 37°C por 1 h para permitir la liberación de ¹⁴CO₂, que era atrapado en 50 µl de hidróxido de hiamina (4 mM). La reacción fue terminada por la adición de 83 µl de H₂SO₄ (2.5 N), y la incubación se continuó por 45 min para asegurar la total liberación de CO₂. El control negativo (blanco) no contenía células. La radioactividad retenida en el hidróxido de hiamina se cuantificó 12 h después del experimento, para minimizar el quemado de la muestra, en frascos con 10 ml de coctel de centelleo, utilizando un contador de centelleo (Beckman, Coulter LS 6500, Multi Purpose Scintillation Counter, USA).

La actividad de la GAD se expresó en nmol de ¹⁴CO₂ liberado por mg de proteína en 1 h, y los resultados se muestran con la media ± error estándar de seis muestras. La proteína fue determinada utilizando el método de Bradford (Anexo 4).

Inmunocitoquímica

Para la determinación de la apariencia morfológica y expresión de proteínas neuronales y gliales, las células se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio (24X50 mm, Corning, México) para verificar la expresión de la glutamato decarboxilasa, en su isoforma 67, GAD₆₇ (ratón anti GAD₆₇, MAB5406, Chemicon, CA, USA; 1:3000), la proteína ácida fibrilar glial, GFAP (anti conejo GFAP, H-50, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; 1:1000), la β-tubulina (ratón, anti-beta tubulin E7 Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa; 1:1000), el antígeno T grande del virus de simio-40 (por sus siglas en inglés, SV-

40) (anti ratón antígeno T-grande del SV40, BD Pharmingen, CA, USA; 1:500, 1:1000), y el marcador neuronal nuclear, NeuN (anti ratón NeuN, MAB377, Chemicon, CA, USA; 1:1000); los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 (5 mM, 30 min; Molecular Probes, OR, USA), utilizando técnicas de inmunotinción. Brevemente, el medio fue aspirado, las células incubadas en 4% de paraformaldehído por 10 min y lavadas (3 X 15 min) con amortiguador de fosfato en salina (PBS, 0.1 M, pH 7.4), incubado con Tween (0.3 %) por 10 min a -20°C y lavadas (3 X 15 min) con PBS, incubadas en suero de caballo (10 %) por 10 min, incubados con el anticuerpo primario toda la noche, lavados con suero de caballo (10 %) en PBS (5X3 min), e incubados con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-ratón IgG Fluor, Millipore CA, USA, 1:200; anti-conejo IgG (H+L), conjugado a FITC, Zymed, CA, USA, 1:200; o biotinilado anti- ratón IgG, Vector laboratories, CA, USA, 1:600) por 120 min a temperatura ambiente, posteriormente lavados con PBS con suero de caballo al 10 % (5 X 3 min).

En el caso del uso de anticuerpos biotinilados, los cubreobjetos con las células, se incubaron por 90 min con el complejo ABC (Vectastain™Elite ABC standard kit), y se expusieron a diaminobenzidina 50 µM (Sigma) por 5-10 min, la reacción fue intensificada con una solución de 0.1 % de níquel (Sigma). Los cubreobjetos con las células fueron cuidadosamente montados en portaobjetos; en el caso de las muestras preparadas para la inmunofluorescencia, los cubreobjetos fueron montados con Vectashield/DABCO como medio de montaje (Vector laboratories, CA, USA) o resina (Permount, Fisher) para las secciones reveladas con diaminobenzidina (Anexo 5).

Microscopía electrónica

Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron separadas de las cajas petri y fijadas por 2 h a 4°C con una solución de glutaraldehído al 3% en 0.1 M de amortiguador de ácido cacodílico y post fijadas con OsO₄ al 2%, con el mismo amortiguador. Posteriormente, las células fueron deshidratadas en etanol y sumergidas en Epon. Los bloques fueron

seccionados (60 nm) con la ayuda de un ultramicrotomo y montados en una rejilla de cobre de 300 hilos y teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Posteriormente, fueron observados en el microscopio electrónico (JEOL JEM 1010) a 20,000 X, 100,000X y 200,000X.

Ensayos de Liberación de GABA y Glutamato *in vitro*

Los niveles de GABA liberados fueron medidos por HPLC como se describió anteriormente. Las células fueron cultivadas en cajas de seis pozos hasta alcanzar el 90% de confluencia. El medio fue entonces aspirado, y las células lavadas con solución salina estéril (NaCl 0.9%); posteriormente se añadieron 500 μ l de solución Ringer (4 mM KCl, 1.0 mM $MgCl_2$; 1.8 mM $CaCl_2$; 3.0 mM NaH_2PO_4 ; 140 mM NaCl; 10 mM HEPES; 5 mM glucosa, pH 7.4) que se retiró 5 min después, con esta condición se obtuvo la basal de GABA y glutamato; entonces se añadió el Ringer con 50 mM de KCl y 94 mM de NaCl y se retiró 15 min después. El sobrenadante fue recolectado y congelado a $-70^\circ C$ hasta su posterior análisis por HPLC. Para la determinación de proteínas, las células fueron despegadas de los platos de cultivo y las proteínas fueron determinadas por el método de Bradford (Anexo 4).

Ensayo de Evaluación del Mecanismo de Liberación de GABA

Las células fueron incubadas por 5 min con un Ringer bajo en KCl (4 mM) para obtener los niveles basales, posteriormente las células fueron incubadas en una solución Ringer que contenía alto KCl (50 mM) con Ca^{2+} (1.8 mM $CaCl_2$), ó un Ringer con EGTA (1 mM) y sin Ca^{2+} (substituido por $MgCl_2$). El medio condicionado fue recolectado cuatro veces a intervalos de 5 min. Las muestras fueron almacenadas a $-70^\circ C$ hasta su análisis cromatográfico. Las células de cada pozo fueron resuspendidas en solución salina y utilizadas para la determinación de proteínas, utilizando el método de Bradford (Anexo 4).

Ensayo de Estimulación con Glutamato

La liberación de GABA fue evaluada después de la estimulación por glutamato (100 μM) (Pin and Bockaert, 1989) , ácido kainico (400 nM; Sigma, Chemicon, Co; St. Louis MO, EUA) , y después de la incubación por 15 min con una solución Ringer sin MgCl_2 (Ringer 0 Mg^{2+}). En otro experimento, las células fueron previamente incubadas, por 10 min, con el antagonista glutamatérgico de tipo NMDA, el ácido 3-(2-carboxipiperazina-4)propil-1-fosfónico (CPP) (10 μM) (Sigma) y el antagonista glutamatérgico de tipo AMPA/kainato el 6-ciano-7-nitroquinoxaline-2,3-diona (CNQX) (10 μM), antes de la estimulación con glutamato. Para la liberación de GABA, el medio condicionado fue recolectado después de 10 minutos y almacenado a -70°C hasta el análisis cromatográfico. Las células de cada pozo fueron resuspendidas en salina y utilizadas para la determinación de proteínas por el método de Bradford (Anexo 4).

2.0 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Animales y condiciones generales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley, con un peso de 200-350gr. Estos animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y con un ciclo de luz-oscuridad 12:12. Los animales contaron con alimento y agua *ad libitum*.

Trasplantes

Las células cultivadas fueron dissociadas con tripsina y se incubaron en 5 μM de bisbenzimidida (Hoechst 33342) durante 30 min, para su posterior localización en el tejido. A continuación las células se lavaron y resuspendieron dos veces en medio DMEM/F-12 libre de suero.

Se realizaron trasplantes duales bilaterales de 300,000 células/ $2\mu\text{l}$ cada uno, dicha cantidad de células se incrementaron 1/3 parte más en comparación a un estudio anterior del laboratorio, para asegurar que la sonda de microdiálisis quedara rodeada de células trasplantadas (ver

adelante) (Castillo, et al., 2006). Para ello se anestesió a las ratas con una mezcla de ketamina/xilacina (70mg/kg y 6mg/kg respectivamente). Una vez anestesiadas se montaron en un aparato estereotáxico, con la barra dental en la posición -3.3. El cráneo se expuso con la ayuda de un bisturí. El trasplante se realizó en la SNr, las coordenadas fueron obtenidas del atlas de Paxinos y Watson (1980), AP -5.2, L±2.0, V -7.6 y AP -5.3, L±2.0, V -7.2 a partir de la duramadre. Una vez localizado el sitio, se hicieron los trépanos correspondientes con un taladro dental, los orificios generados tuvieron de 1-2 mm de diámetro. Posteriormente, con una jeringa Hamilton de un calibre 27 colocada en un inyector manual se hicieron los cuatro depósitos de células. Una vez inyectada la suspensión celular, se dio un tiempo de difusión de 2 min por cada depósito y al finalizar se suturó la herida.

Se formaron tres grupos de animales, un grupo que recibió trasplantes de la línea celular M213-2O CL-4, otro de la línea celular M213-2O y otro que recibió solamente vehículo (medio de cultivo sin penicilina ni suero). Todos los grupos se dividieron en dos, la mitad de los animales se prepararon para microdiálisis a las 8 semanas (n=10) y la otra mitad (n=10) para los trasplantes a las 12 semanas.

Microdiálisis

Para los estudios de microdiálisis se utilizaron cánulas (CMA/11 14/01 cupr, CMA, USA) de 1 mm, el poro de la membrana corresponde a 6000 daltons. Las ratas fueron anestesiadas utilizando un sistema de anestesia específico para el isoflurano (SBH Scientific, Canadá). Primero las ratas fueron anestesiadas en la cámara de inducción al 2% de isoflurano, una vez anestesiadas se colocaron en el estereotáxico acoplado a una boquilla que dispensaba el isoflurano al 1.6% y a 2 L/min de aire médico a 14.7 PSIA. Los animales montados en el estereotáxico, fueron monitoreados y mantenidos a una temperatura constante de 37 °C (CMA/150, CMA, USA). La cánula de microdiálisis fue insertada en la SNr tomando las coordenadas de Thompson (2000) AP - 5.1 mm, L ± 2.0 mm y DV -7.6 mm.

Como medio de perfusión se utilizó un medio Ringer-Krebs a una concentración de 118 de NaCl, 4.7 de KCl, 1.2 de KH_2PO_4 , 1.2 de MgSO_4 y 2.5 de CaCl_2 (mM), a un flujo de $1\mu\text{l}/\text{min}$, el tiempo de cada colecta fue de 30 minutos por lo que se obtuvo un volumen final de $30\mu\text{l}$ en cada una de las muestras.

Se dejó un tiempo de estabilización de 1 h, y se recolectaron las siguiente tres fracciones en un tiempo total de 1.5 h, estas muestras se utilizaron para determinar la concentración basal de GABA, posteriormente se perfundió por 30 minutos un medio Ringer-Krebs con alto KCl (100 mM) sustituido equimolarmente por el NaCl, y se tomaron las tres fracciones siguientes.

El medio Ringer Krebs fue perfundido utilizando un tubo de 0.65 mm de diámetro externo por 0.12 mm de diámetro interno (MF-5164, BASi, USA) conectado al tubo de entrada de la cánula de microdiálisis; mientras que el tubo de salida de la cánula se conectó a otro tubo acoplado a un microcolector (CMA/142, CMA, USA).

Histología

Al finalizar el experimento de la microdiálisis, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente (i.p) con una sobredosis de pentobarbital sódico. Se perfundió a la rata intracardialmente con 250 ml de solución salina al 0.9% seguida de 250 ml de solución fijadora de formaldehído al 4 % disuelto en amortiguador de fosfatos (0.1 M), pH 7.3. Después de extraídos, los cerebros se suspendieron durante 24 h en la misma solución fijadora. Se transfirieron a sacarosa al 20% por 24 h, y posteriormente a sacarosa al 30% otras 24 h. La sacarosa se disolvió en amortiguador de fosfatos (10 mM), pH=7.3. Se realizaron cortes histológicos consecutivos de $40\mu\text{m}$ de toda la SNr por medio de un crióstato (Leika CM3050S, USA).

Para la determinación del volumen de trasplante, se tomaron fotografías en un microscopio óptico de fluorescencia (Nikon Eclipse E-600, USA) de todos los cortes que mostraban núcleos azules fluorescentes usando un filtro para DAPI (UV-2A, Ex330-380 DM 400

BA420) al nivel de la SNr. Se determinó manualmente el área del trasplante con las imágenes capturadas por medio de un sistema de análisis de imágenes (ImageJ 1.43u). El volumen del trasplante (V) se calculó utilizando la fórmula de Cavalieri, $V=T.\sum A_i$, (C.V. Howard, 1998) a partir de la sumatoria de las áreas con núcleos fluorescentes en cada corte ($\sum A$), multiplicadas por el grosor de éstos (T). Posteriormente, los cortes fueron teñidos utilizando la técnica de violeta de cresilo, para el análisis morfológico de las células.

Cuantificación de GABA en muestras de microdialisis

La determinación cromatográfica se realizó por detección electroquímica en fase reversa. Se utilizó una bomba (Agilent Technologies) acoplada a un detector electroquímico (Coulochem II) y una columna ESA, inc (ESA HR 80).

Se empleó el método descrito anteriormente, utilizando mayor sensibilidad en los electrodos; se manejó una sensibilidad de 10nA y las determinaciones se hicieron a temperatura ambiente.

Análisis estadístico de los datos

Para el análisis de los resultados se hicieron análisis de varianza de una y dos vías (ANDEVA) seguidos de la prueba de Fisher's PLSD. Para comparaciones entre grupos se hicieron pruebas t. Los resultados se consideraron estadísticamente diferentes al 0.05. En algunos experimentos se utilizaron datos normalizados a los niveles basales.

7. RESULTADOS

1.0 Experimentos *in vitro*

Pruebas de proliferación celular

La línea celular M213-2O fue inmortalizada con el alelo A58 del SV40 T grande sensible a la temperatura (Conejero-Goldberg, et al., 2000). Este retrovirus permite la expansión de las células a una temperatura permisiva de 33°C, mientras que la proliferación se reduce a una temperatura no permisiva (39.5°C) (Takacs-Jarrett, et al., 1998). Los análisis inmunocitoquímicos muestran núcleos positivos para el anticuerpo para el antígeno T grande del SV40 en la línea celular M213-

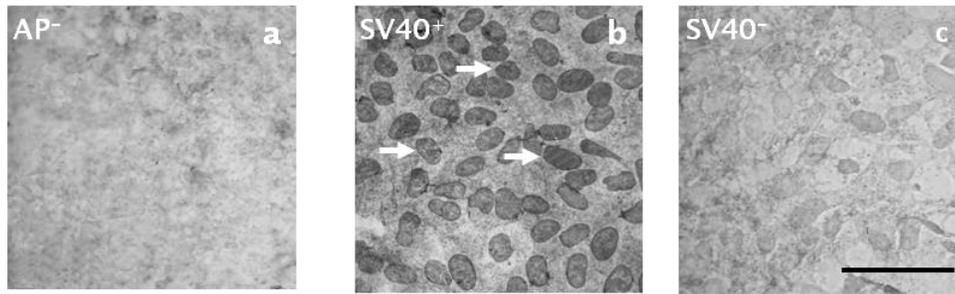


Fig. 4. Immunocitoquímica para el SV40, el gen responsable de la inmortalización de ambas líneas celulares, la M213-2O CL-4 mostró tener los núcleos positivos a 33 ° C (b) y a 39.5°C (c). Se observó una tinción negativa cuando las células eran incubadas sin el anticuerpo primario (AP-) (a) (barra=100 m).

2O CL-4 cultivada a 33°C y negativos a 39.5°C a los cuatro días de cultivo (Fig. 4).

Como se esperaba la proliferación se redujo de manera significativa cuando la temperatura incrementó de 33° a 37° y 39.5 °C tanto en la línea celular M213-2O como en la M213-2O CL-4 [F(2,18)=7.13, $p < 0.05$, seguido de un prueba de Fisher's PLSD] (Fig. 5). No se encontraron diferencias significativas entre las líneas celulares en su respuesta a la temperatura, y no hubo una interacción significativa entre las líneas celulares y la temperatura.

Captura de GABA

Ambas líneas celulares la M213-2O y M213-2O CL-4 muestran la capacidad de capturar GABA del medio extracelular después de ser incubadas con [³H] GABA (100 nM), y esta captura en ambas líneas es inhibida por el ácido nipecótico (100 M), un inhibidor selectivo de los transportadores de GABA.

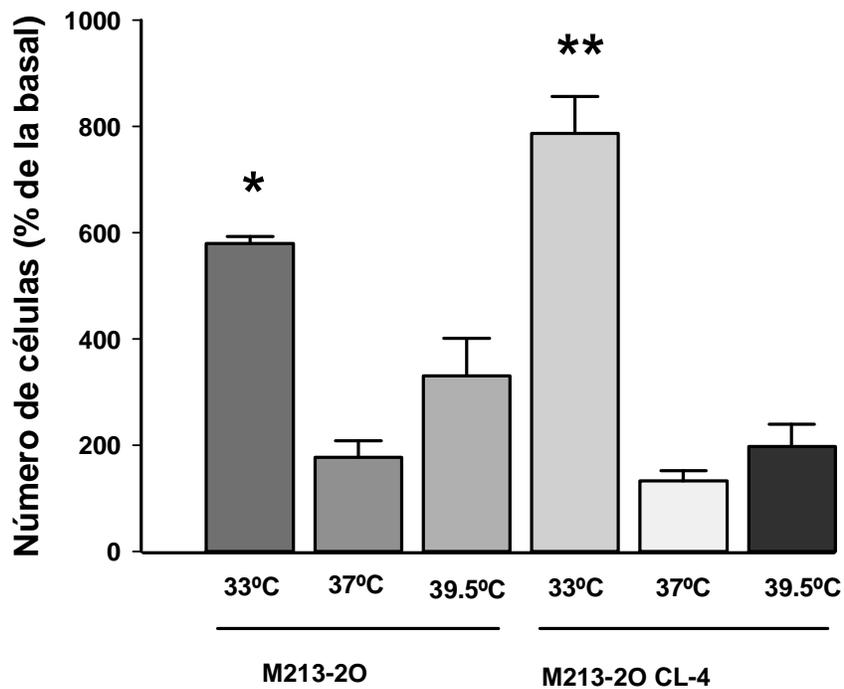


Fig 5. Proliferación celular en las líneas celulares inmortalizadas con el alelo A58 del SV-40 sensible a la temperatura. Se observa el porcentaje de incremento en el número de células de las líneas celulares M213-2O y M213-2O CL-4 después de seis días de cultivo, a diferentes temperaturas de incubación. Las células fueron cultivadas (8625/9.6 cm²) y mantenidas a una temperatura permisiva de 33°C, a 37°C, y a una temperatura no permisiva de 39.5°C. Cuarenta y ocho horas después fueron tripsinizadas y contabilizadas para obtener la línea base y mantenidas en condiciones *in vitro* por otros cuatro días. Se encontraron diferencias significativas entre la temperatura permisiva y temperaturas más altas de acuerdo a la prueba de Fisher PLSD , *Significativamente diferente de 37° y 39.5°C, p<0.005, **Significativamente diferente de 37°C y 39.5°C, p<0.0001, (N=4).

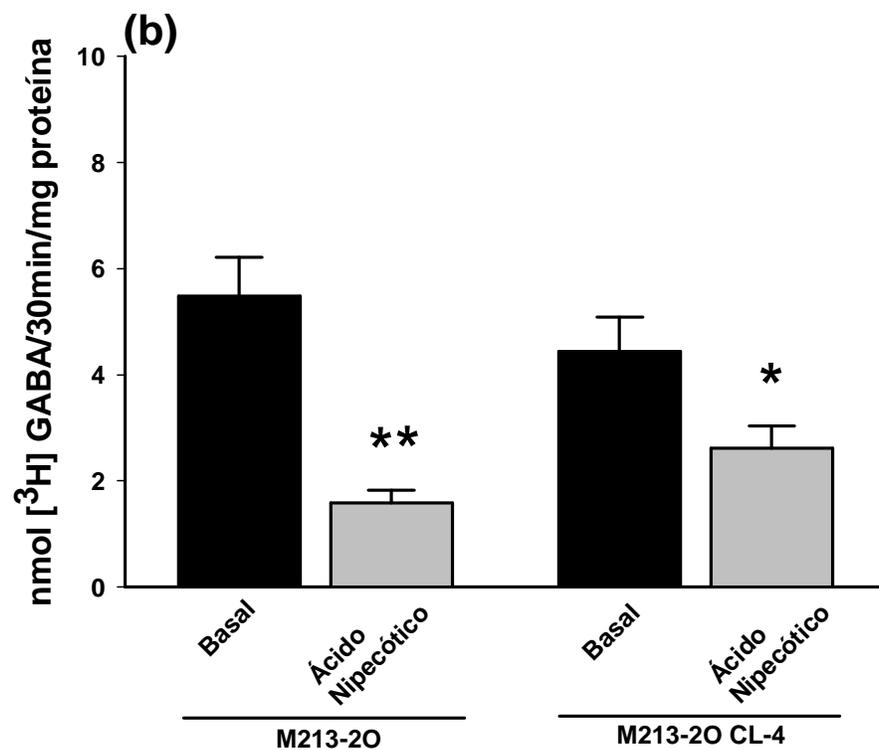
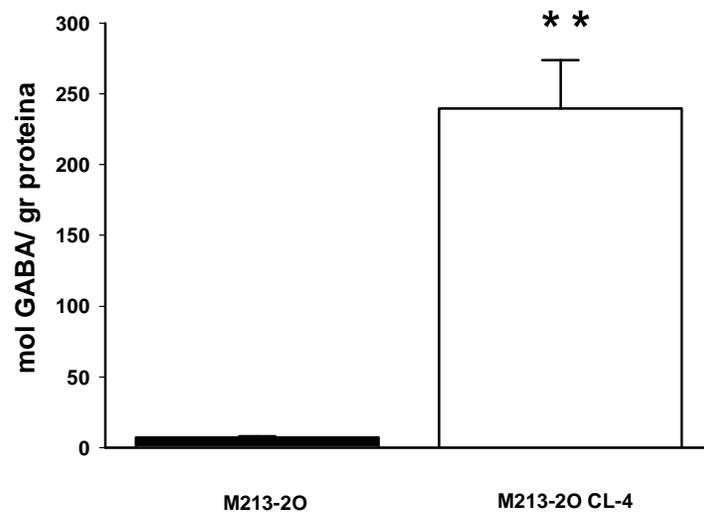


Fig. 6. Captura de [³H]-GABA (100nM) por la línea celular M213-20 y M213-20 CL-4 en condiciones basales (barras negras) y con ácido nipecótico (100 M) (barras grises). La captura de [³H]-GABA disminuyó cuando el ácido nipecótico fue adicionado. *Significativamente diferente en comparación con la condición basales, $p < 0.05$ y ** $p < 0.005$, (N=6).

a



b

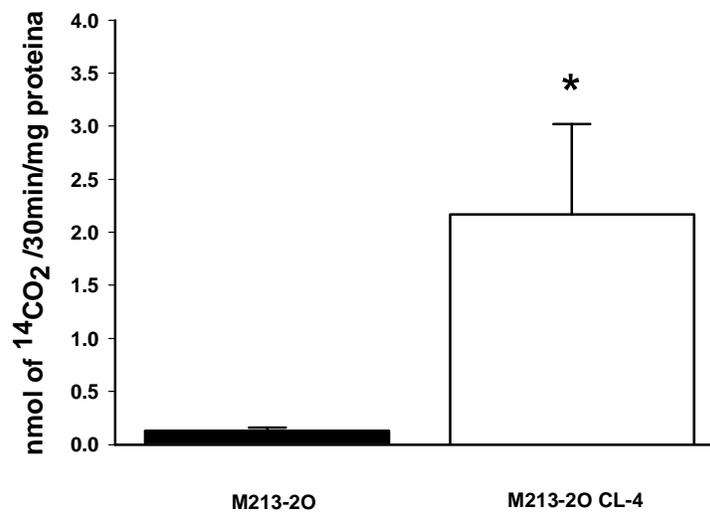


Fig. 7. El contenido intracelular de GABA está relacionado con la actividad de la enzima que lo sintetiza. (a) Se muestra el contenido intracelular de GABA de las líneas celulares M213-2O y M213-2O CL-4, ** Significativamente diferente de la M213-2O $p < 0.005$ (N=30). (b) Actividad de la GAD en la M213-2O y la M213-2O CL-4, * Significativamente diferente de la M213-2O $p < 0.05$ (N=6).

Dicho inhibidor redujo la captura en un 71% en la M213-2O [$t_{(10)} = 5.02$, $p < 0.005$] y un 41 % en la M213-2O CL-4 [$t_{(10)} = 2.33$, $p < 0.05$] (Fig.

6). No hubo diferencias entre las líneas celulares ya sea en la captura del neurotransmisor o en la condición de inhibición por el ácido nipecótico.

Actividad de la GAD y el GABA intracelular

El GABA intracelular fue cuantificado por cromatografía de alta resolución (Fig. 7a), con lo que se confirmó que la M213-2O CL-4 contiene significativamente más GABA intracelular (más de 33 veces) ($239.68 \text{ mmol/g proteína} \pm 33.84$) que la M213-2O ($7.11 \text{ mmol/g proteína} \pm 1.05$) [$t_{(4)}=6.86$, $p<0.005$].

La M213-2O CL-4 mostró significativamente más actividad de la GAD, más de 15 veces ($2.17 \pm 0.85 \text{ nmol } ^{14}\text{CO}_2/\text{h/mg protein}$) en comparación con la M213-2O ($0.14 \text{ nmol} \pm 0.03 \text{ } ^{14}\text{CO}_2/\text{h/mg proteína}$ [$t_{(10)}=2.39$, $p<0.05$]) (Fig. 7b).

Inmunocitoquímica

Se puede observar que la línea celular la M213-2O (Fig. 8 a) y la M213-2O CL-4 (Fig. 8b) mostraron una morfología de tipo multipolar con procesos extendidos. El estudio de inmunofluorescencia *in vitro* (Fig. 8 d, 8 c) indica que las clonas M213-2O y M213-2O CL-4 expresan beta-tubulina (verde), una proteína del citoesqueleto, y fueron negativas a GFAP y NeuN (datos no mostrados). La inmunofluorescencia para la GAD fue evidente sólo en la clona M213-2O CL-4 en comparación con la M213-2O (Fig. 8e, 8f). La microscopía electrónica muestra la presencia del núcleo, nucleolo, retículo endoplásmico, mitocondria, aparato de golgi, vesículas y uniones intercelulares en la M213-2O (Figs. 9 a, c) y la M213-2O CL-4 (9 b, d).

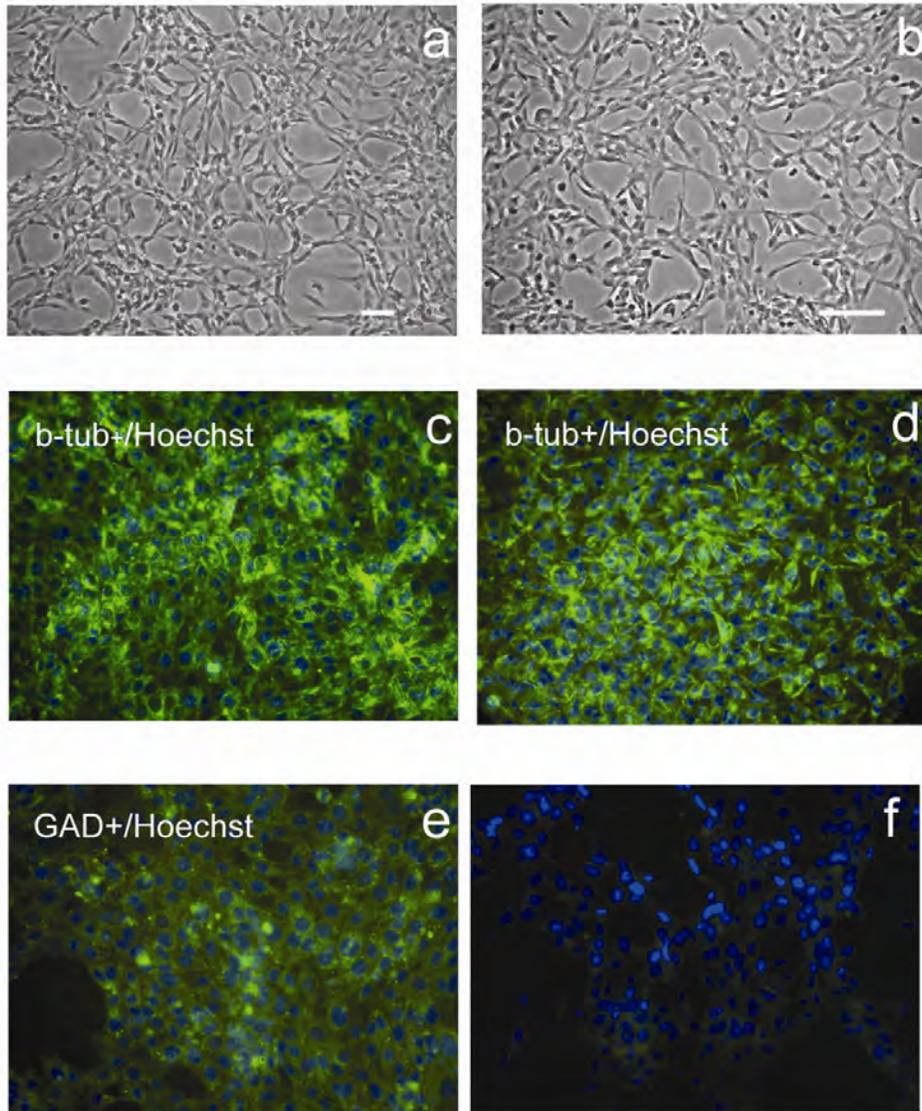


Fig. 8. Expresión de proteínas y morfología de las clonas M213-2O y M213-2O CL-4. Contraste de fase de las clonas M213-2O CL-4 (a,c,e) y M213-2O (b,d,f) muestra la morfología multipolar y los procesos extendidos de ambas líneas celulares (barras=50 m). Inmunofluorescencia indirecta para la β -tubulina (verde), una proteína del citoesqueleto y los núcleos fluorescentes por el Hoechst 33342 (núcleos azules) en la clona M213-2O CL-4 (c) y la M213-2O (d). Inmunofluorescencia indirecta para la GAD-67 muestran la sobreexpresión de esta enzima en la M213-2O CL-4 (e) en comparación con la M213-2O (f) (barras=50 m).

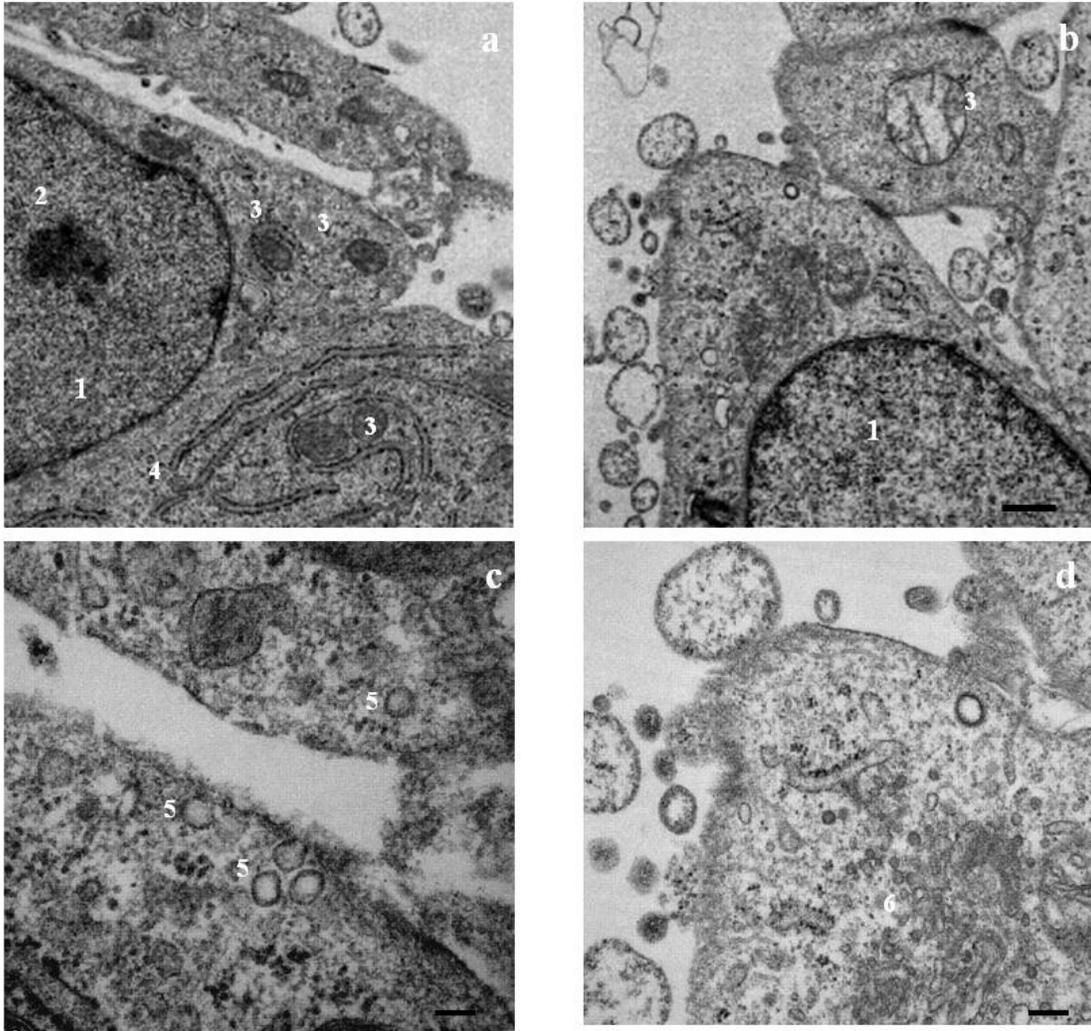


Fig. 9. Microscopia electrónica de la M213-2O (a, c) y la M213-2O CL-4 (b,d) mostrando el núcleo (1), nucleolo (2), mitocondria (3), cisternas del retículo endoplásmico (4), vesículas (5), aparato de golgi (6) (barra a,b=0.5 μ m; barra c=0.1 μ m; barra d=0.2 μ m).

Liberación de GABA de la clona M213-2O en respuesta a un estímulo despolarizante

Se determinó la liberación de GABA al espacio extracelular por la M213-2O CL-4 en respuesta a varios estímulos despolarizantes. En contraste con la clona de origen, la línea celular, M213-2O CL-4 liberó GABA en respuesta al incremento en los niveles de K^+ extracelular. La

concentración extracelular de GABA incrementó de 1.35 ± 0.35 mol/g proteína a 4.12 ± 0.37 mol/g después de 15 min de alto KCl (50mM). Si bien ambas líneas celulares tienen actividad de la GAD y contienen GABA intracelular, la clona M213-2O no liberó GABA en respuesta al alto KCl (Fig. 10). El análisis estadístico, el ANDEVA de dos vías mostró un efecto significativo de interacción (línea celular x condición) [$F_{(1,16)}=25.04$, $p<0.01$]), un efecto significativo de la línea celular (línea celular original M213-2O, y la M213-2O CL-4, $F_{(1,16)}=34.6$, $p<0.0001$), y un efecto significativo de la condición (línea basal, 15 min después del alto KCl, $F_{(1,16)}=12.78$, $p=0.05$).

Dados estos resultados, los siguientes experimentos se llevaron a cabo sólo con la clona M213-2O CL-4.

En contraste con los resultados obtenidos con GABA, los niveles de glutamato extracelular en la condición basal detectados de la clona M213-2O CL-4 (5.66 ± 0.88 mol/g protein), no hubo diferencias significativas después de la estimulación por alto K^+ (50 mM) (2.8 ± 0.28 mol/g proteína).

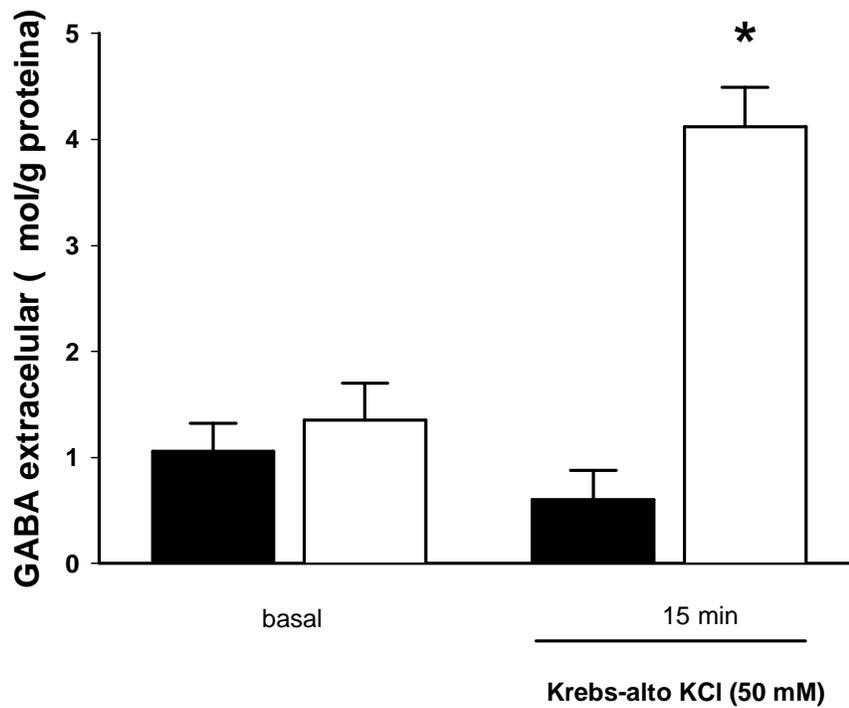


Fig 10. La M213-2O CL-4 libera GABA al espacio extracelular en respuesta a un estímulo. La clona M213-2O (barras negras) fue cultivada con DMEM:F12, 1% penicilina-estreptomina hasta alcanzar la confluencia en frascos de 25 cm² a una temperatura de 33°C (N=5). La clona M213-2O CL-4 (barras blancas) fue cultivada en las mismas condiciones pero con un medio selectivo que contenía higromicina B (200 I/ml). La clona M213-2O mantuvo niveles similares de GABA después de la exposición al Ringer Krebs-alto KCl (50mM) por 15 min comparado con los niveles basales (KCl: 4mM). La clona M213-2O CL-4 mostró significativamente mayores niveles de GABA extracelular a los 15 minutos de la exposición a Krebs-alto KCl comparado con los niveles basales. Las barras representan la media \pm EEM de los niveles de GABA extracelular.

*Significativamente diferente de la condición basal [Prueba de Fisher PLSD, $p < 0.001$; N=5].

Liberación de GABA de la M213-2O CL-4 por un mecanismo dependiente de calcio

Para la liberación de GABA se requiere de la entrada de Ca^{2+} a la célula, lo que desencadena la liberación de tipo exocitótico de este neurotransmisor. Encontramos que la liberación de GABA de la M213-2O CL-4 es como se indica en la Fig. 11, un proceso dependiente del calcio extracelular. La M213-2O CL-4 mostró significativamente mayores niveles de GABA extracelular de los 5-20 min después de la exposición a un medio Ringer-Krebs alto KCl con Ca^{2+} , encontramos que la meseta en la respuesta ocurre a los 5 min (7.14 ± 2.9 mol/g proteína) seguido de un decremento gradual de la curva que va del minuto 10 en adelante (6.94 ± 2.80 mol/g proteína; min 15, 4.89 ± 1.90 mol/g proteína; y min 20, 4.31 ± 1.70 mol/g proteína). En contraste, no hubo cambios en los niveles extracelulares después de la incubación de esta clona en un Ringer-Krebs alto KCl sin Ca^{2+} . El análisis de dos vías, ANDEVA mostró un efecto significativo de interacción, tiempo x condición [$F_{(3,30)} = 16.24$, $p < 0.001$], un efecto significativo de la condición con el Ringer-Krebs alto KCl con Ca^{2+} vs el Ringer-Krebs alto KCl sin Ca^{2+} [$F_{(1,30)} = 20.04$, $p = 0.01$], y un efecto significativo del tiempo de incubación [$F_{(3,30)} = 15.32$, $p < 0.001$]. La Fig. 11 muestra los niveles extracelulares de GABA en porcentaje de la línea basal, en ambas condiciones, Ringer-Krebs alto KCl con Ca^{2+} y Ringer-Krebs alto KCl sin Ca^{2+} a lo largo de 20 minutos.

El glutamato induce la liberación extracelular de GABA en la clona M213-2O CL-4

La Fig. 12 muestra que la incubación con glutamato (100 μM) indujo la liberación de GABA de la línea celular M213-2O CL-4, y este efecto es estadísticamente diferente (8 ± 0.26 mol GABA/g proteína) comparado con los niveles basales (3 ± 0.77 mol GABA/g proteína).

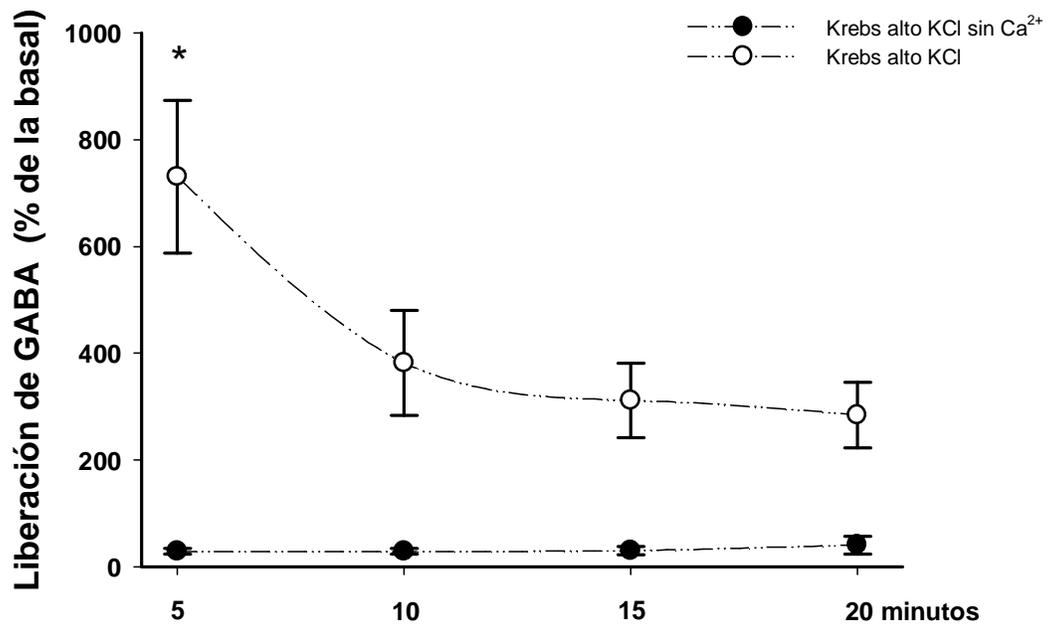


Fig. 11. La liberación de GABA en la línea celular M213-20 CL-4 es excitotónica. Esta clona fue expuesta a diferentes concentraciones de Ca²⁺ en el Ringer, los datos fueron normalizados respecto a su línea base. La clona M213-20 CL-4 mostró significativamente mayores niveles de GABA extracelular de los 5-20 minutos después de la exposición a un Ringer-Krebs alto KCl (50mM) con Ca²⁺ alcanzando el pico a los 5 minutos y mostrando una disminución gradual del minuto 10 hacia adelante, esto en comparación con el Ringer-Krebs alto KCl sin Ca²⁺.

* Significativamente diferente de otros tiempos (Prueba de Fisher PLSD, p<0.005;N=6).

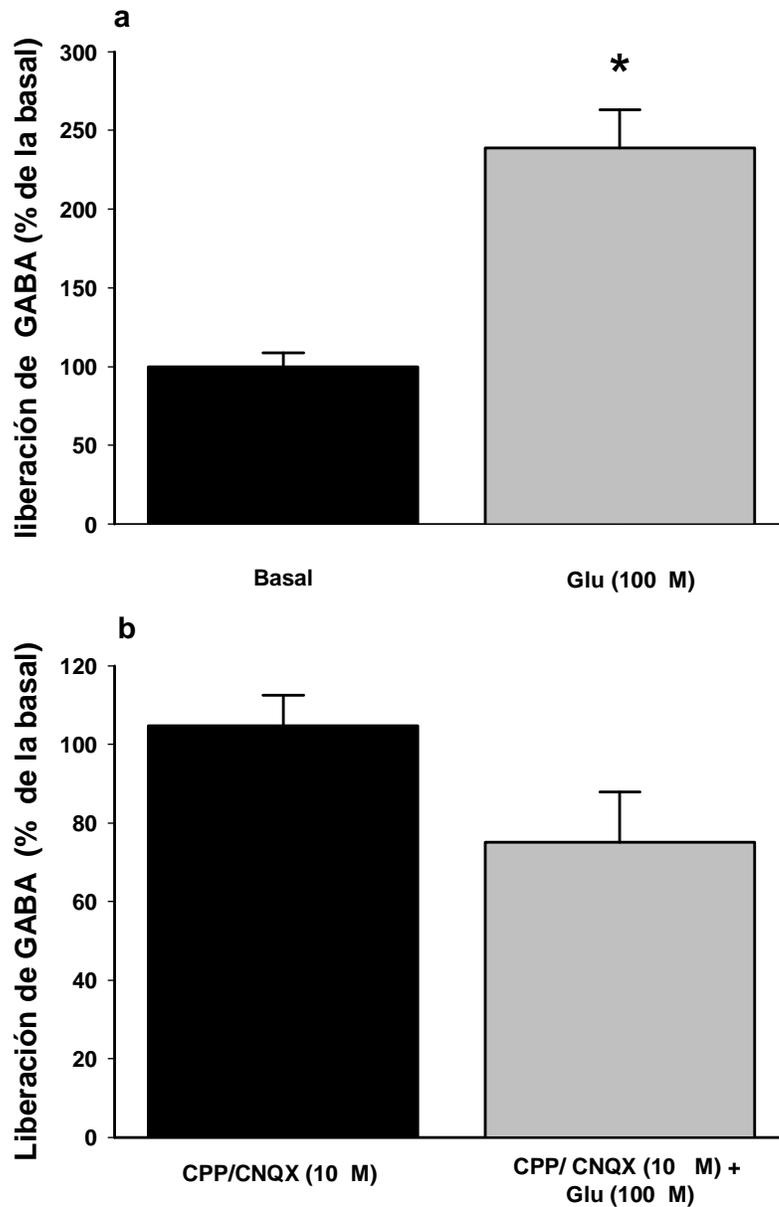


Fig.12. La liberación extracelular de GABA de la clona M213-2O CL-4, inducida por glutamato involucra receptores de tipo AMPA/NMDA (a) Niveles extracelulares de GABA para la línea celular M213-2O CL-4 después de 15-min de incubación con glutamato (100 μ M); [Prueba $t_{(10)} = -4.67, p < 0.001; N = 11$]. (b) La liberación de GABA se previene cuando la clona M213-2O CL-4 es preincubada con CPP/CNQX y glutamato (10 μ M). Las barras representan la media \pm EEM, en porcentaje respecto a la condición basal, [N=5]. *Significativamente diferente de los niveles basales, $p < 0.001$.

Con la finalidad de determinar cuáles receptores glutamatérgicos se relacionaban con la liberación de GABA, se evaluó el efecto de bloqueadores como el CNQX y el CPP, utilizados como antagonistas de los receptores ionotrópicos de tipo AMPA y NMDA, respectivamente. Los dos antagonistas fueron coaplicados por 10 min antes del glutamato (100 μ M). De acuerdo a estos experimentos, se encontró que ante la presencia de CPP y de CNQX, el glutamato no indujo la liberación de GABA (5.74 ± 0.44 , y 4.12 ± 0.70 mol GABA/g proteína, respectivamente; Fig. 12 b).

Ya que ambos receptores, los de tipo NMDA y no-NMDA, parecían modular la respuesta de la clona M213-2O CL-4 al glutamato, se activó al receptor de tipo NMDA de manera independiente. Esto se llevó a cabo eliminando el magnesio (0 Mg^{2+}) del Ringer. Encontramos que la liberación de GABA incrementó de manera significativa de 9.90 ± 1.51 a 21.42 ± 1.23 mol/g proteína [Prueba t (9)=-5.3, $p < 0.0005$], sugiriendo la participación de los receptores de tipo NMDA (Fig. 13).

Finalmente se evaluó la participación de los receptores de tipo kainato, y se encontró que el ácido kaínico no incrementa de manera significativa los niveles de GABA en el espacio extracelular (Fig. 14); por lo que parece ser mínima la participación de este tipo de receptores en la liberación de GABA inducida por glutamato.

2.0 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Microdiálisis

Para los experimentos *in vivo*, se utilizaron tres grupos de ratas macho Sprague Dawley, las cuales recibieron, vehículo, trasplantes de células con la línea celular la M213-2O ó M213-2O CL-4 en la sustancia nigra *pars reticulata*. Después de 8 ó 12 semanas se evaluó la liberación

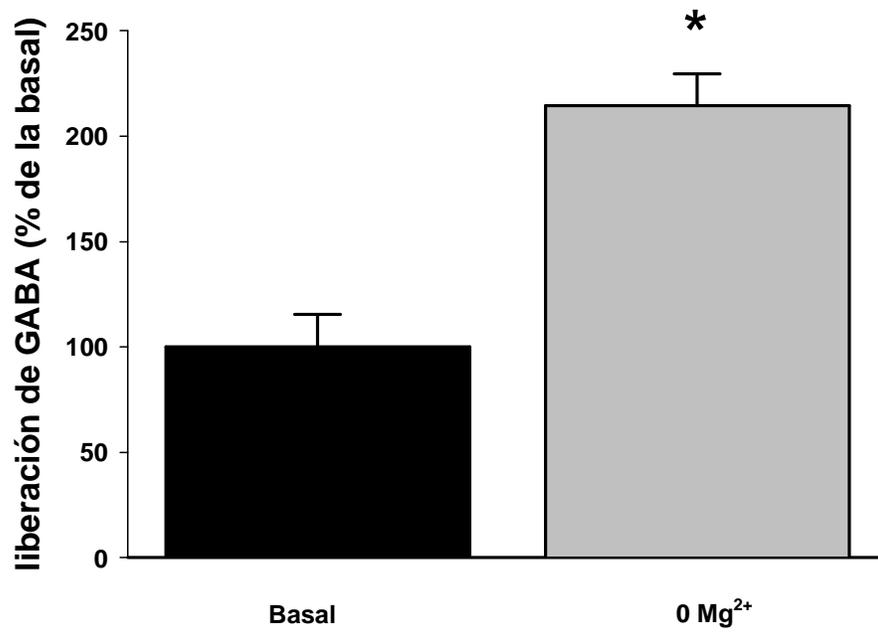


Fig. 13. La liberación de GABA regulada por glutamato involucra receptores de tipo NMDA. Se encontró un incremento significativo en los niveles de GABA cuando las células eran incubadas en un Ringer-Krebs sin Mg²⁺. Las barras representan la media ± EEM, en porcentaje con respecto a la condición basal, [N=5].

*Significativamente diferente de la condición basal, $p < 0.0005$.

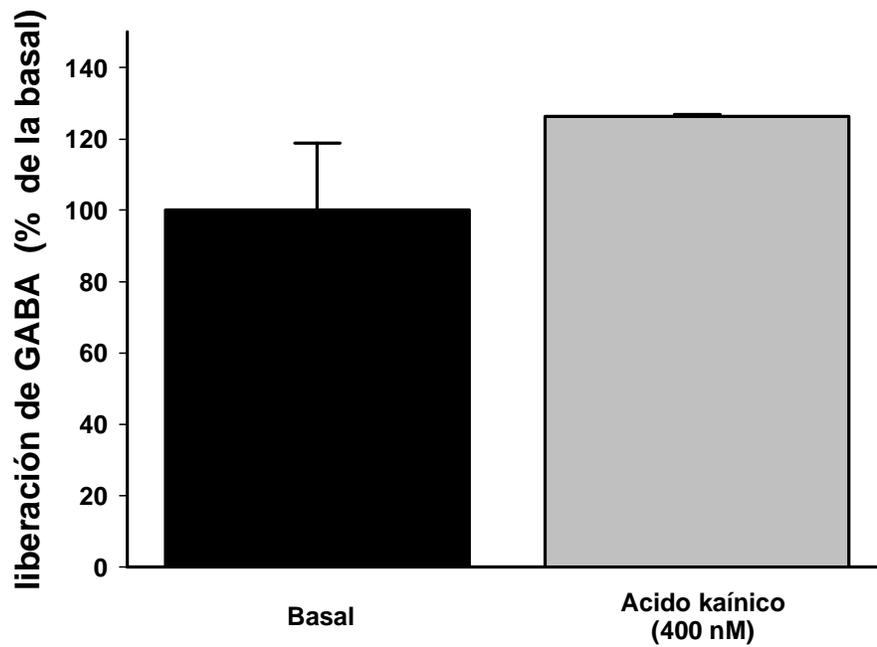


Fig. 14. Los receptores de tipo kaínico no están involucrados con la respuesta al glutamato de la clona M213-2O CL-4. El ácido kaínico no indujo un incremento en los niveles de GABA extracelular. Se muestran los niveles de GABA antes de estímulo (condición basal) y 15 min después de la incubación con ácido kaínico (400 nM) añadido al Ringer-Krebs. No se encontraron diferencias entre las condiciones. Las barras representan la media \pm EME, en porcentaje de cambio respecto a la condición basal, [N=6].

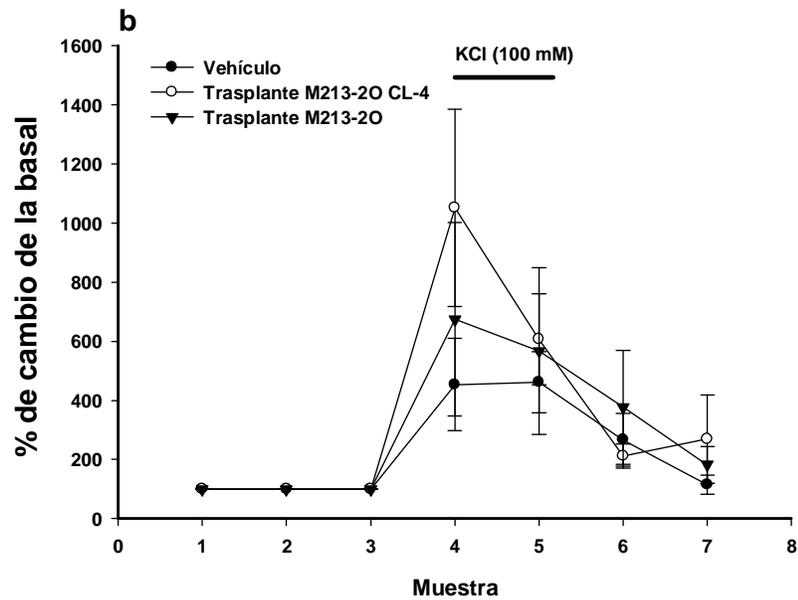
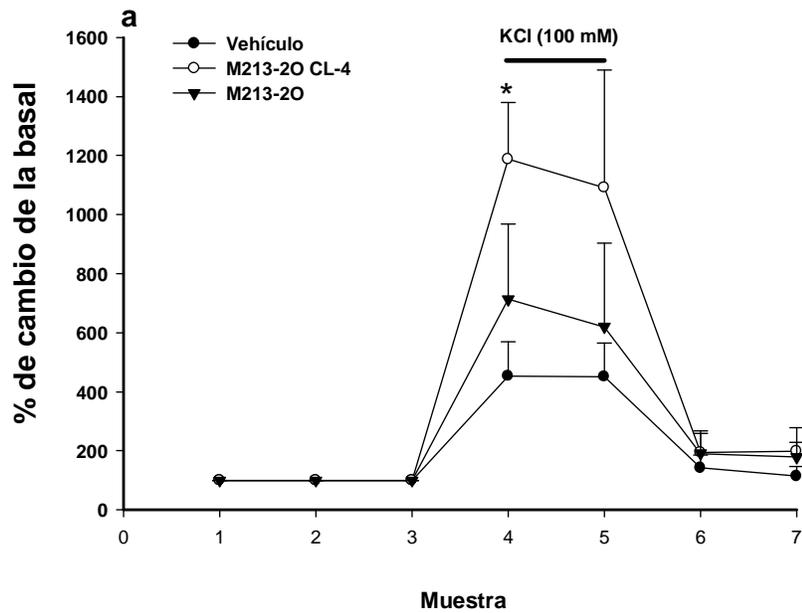


Fig. 15. Las ratas trasplantadas a las 8 semanas, con la línea celular M213-2O CL-4 responden liberando mayores concentraciones de GABA al espacio extracelular. Se determinó el porcentaje de cambio en los niveles de GABA en ratas vehículo, ó trasplante de 8 y 12 semanas de la línea celular la M213-2O y M213-2O CL-4. Se recolectaron tres fracciones de 30 minutos cada una con Krebs KCl (4mM), antes de estímulo con alto KCl (100 μ M) y tres fracciones posteriores al estímulo. En (a) se muestra la cuantificación del GABA obtenido de microdializados de ratas con trasplante de 8 semanas y en (b) a las 12 semanas.

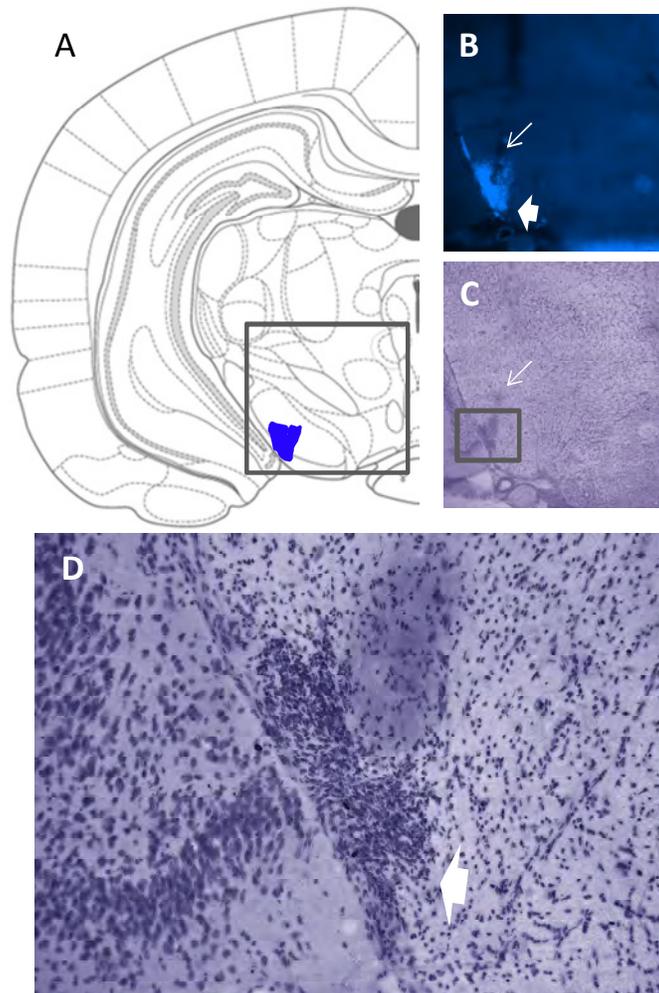


Fig 16. Microfotografías coronales a nivel de la SNr. En la sección (A) se presenta un corte coronal obtenido del atlas de Paxinos y Watson, en el que se sobrepuso en azul el área ocupada por el trasplante en la SNr. En la sección (B) se muestra el corte a nivel de la SNr, de una rata trasplantada con la M213-2O CL-4 8 semanas antes, visto bajo un filtro para DAPI (UV-2A) que permite detectar los núcleos fluorescentes con Hoechst, se muestran las células trasplantadas (cabeza de flecha), arriba de las cuales se observa el tracto hecho por la sonda de microdiálisis (flecha), con la que se recolectaron muestras para la cuantificación de GABA por HPLC. En (C) se muestra una microfotografía 4X, del mismo corte coronal, antes mostrado, teñido con violeta de cresilo, el recuadro muestra la zona de trasplante. En (D) se muestra una magnificación donde se aprecian las células trasplantadas agrupadas en la SNr.

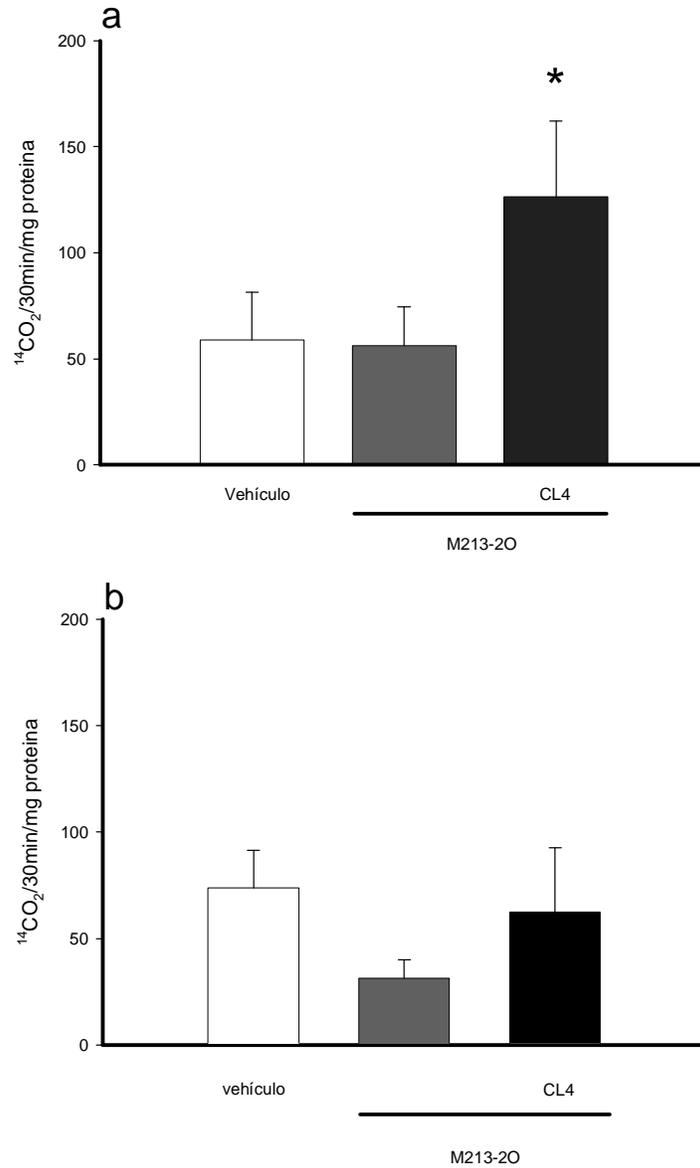


Fig 17. Cuantificación de la actividad de la GAD en el tejido trasplantado con la M213-20 y la M213-20 CL-4 a las 8 y 12 semanas después de su trasplante. (a) El transgen de la GAD 67 humana promueve un incremento en la actividad de la GAD solamente a las 8 semanas y esta se reduce 12 semanas después del trasplante (b).

*Significativamente diferente de la condición vehículo, $p < 0.05$ (Prueba de Fisher PLSD ;N=5) y una tendencia en comparación con la M213-20, $p < 0.06$ (Prueba de Fisher PLSD ;N=5).

de GABA *in vivo* (Fig. 15a y b) utilizando sondas de microdiálisis colocadas en la región de trasplante.

El análisis de la cuantificación del GABA extracelular muestra que sólo a las 8 semanas después de recibir el trasplante de la M213-2O CL-4 en la SNr, se incrementan de manera estadísticamente significativa los niveles de GABA extracelular, cuando se perfunde con un Ringer-Krebs alto en KCl (100 mM) (Fig 15 a). Sin embargo, las ratas que recibieron el trasplante a las 12 semanas, no muestran diferencias en comparación con las ratas control (Fig 15 b). Como podrá observarse en la Fig 16, se consideran para el análisis estadístico solamente las ratas en las cuales las sondas de microdiálisis queda rodeada de células trasplantadas. En esta misma figura se podrá apreciar el trasplante de células al nivel de la SNr (Fig 16C), y se podrá apreciar la citoarquitectura utilizando una tinción con violeta de cresilo (Fig. 16 A y B), así como el área que cubre el trasplante en esta estructura (Fig. 16 D).

Se evaluó si había diferencias en la actividad de la GAD en los trasplantes intranigrales de ambas líneas celulares.

Como podrá observarse en la Fig 17a, a las 8 semanas hay un incremento significativo de los niveles de $^{14}\text{CO}_2$ en los trasplantes de la M213-2O CL-4, en comparación con animales trasplantados con el vehículo solamente o con la clona M213-2O; sin embargo a las 12 semanas esta diferencia se pierde (17b).

Volumen del trasplante

Para evaluar si la diferencia en la respuesta a la liberación de GABA a las 8 y 12 semanas de trasplante y en la actividad de la GAD se debía a la pérdida celular en el trasplante, se cuantificó el volumen del mismo. Como se podrá observar en la figura 18, no existen diferencias en el volumen del trasplante 8 y 12 semanas después de la cirugía cuando las ratas son trasplantadas con la M213-2O CL-4 ó con la M213-2O. Es decir que la reducción en la liberación de GABA no es el resultado de una disminución en el tamaño del trasplante.

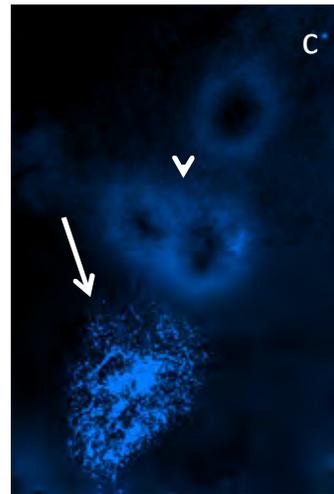
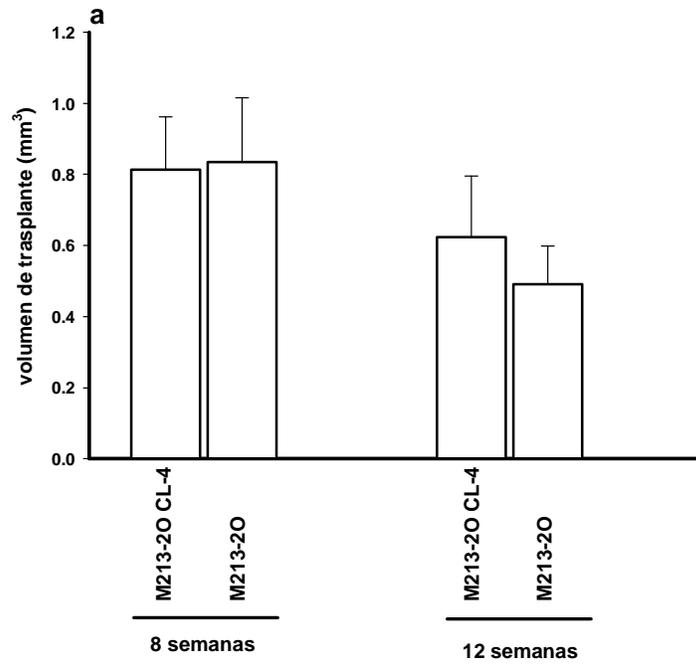


Fig 18. El volumen del trasplante de la M213-2O y M213-2O CL-4 en la SNr de ratas trasplantadas 8 y 12 semanas antes se mantiene del mismo tamaño a lo largo del tiempo, (N=7). Microfotografía representativa de la M213-2O CL-4 a las 8 (a) y 12 (b) semanas de tener el trasplante.

9. DISCUSION

Si bien la terapia celular tiene alrededor de 100 años de historia, ésta se han usado primordialmente en modelos de la enfermedad de Parkinson (Wijeyekoon and Barker, 2009), más recientemente, se propuso el uso de la terapia celular y de la terapia génica como tratamiento para la epilepsia. Esto considerando, como se mencionó, que hasta un 40 % de los pacientes no responden a la terapia farmacológica (Beleza, 2009). En referencia a los fármacos utilizados, particularmente la fenitoína y en menor proporción la carbamazepina, se han asociado con la hepatotoxicidad en los pacientes que reciben estos tratamientos (Bjornsson, 2008).

Resulta fundamental considerar los factores que determinan la funcionalidad de una línea celular, más aún si la terapia génica *ex vivo* es una estrategia útil en términos de calidad, seguridad y potencia en sus resultados, que justifiquen su estudio y sea considerada como una opción para el tratamiento de algunos padecimientos neurológicos.

Derivado del estudio de las líneas celulares M213-2O y M213-2O CL-4 describiremos las ventajas y desventajas encontradas a partir de su estudio, contrastados con la terapia celular.

Uno de los principales inconvenientes de la terapia celular vs terapia génica ha sido la disponibilidad de las células, como ejemplo se reportó el caso de una mujer con una historia clínica con la enfermedad de Parkinson por dos décadas, quien recibió el trasplante de tejido de 4 fetos humanos y se obtuvieron resultados moderados que se perdieron con el tiempo (Kordower, et al., 2008), evidentemente el origen de dichas células provenientes de fetos humanos ha resultado en inconvenientes éticos. En contraparte, se ha propuesto el uso de líneas celulares que se caracterizan por proliferar de manera continua y por mantener sus características homogéneas a lo largo del tiempo (ver Mejía-Toiber, enviado). En el presente estudio trabajamos con la línea celular M213-2O CL-4 derivada de la M213-2O inmortalizadas con el antígeno T grande del SV40 alelo A58 sensible a la temperatura. De los resultados anteriormente descritos se confirma la funcionalidad del gen,

es decir su capacidad de proliferación y su dependencia a la temperatura cuando ésta aumenta de 33°C a 37°C ó a 39.5°C. Esto resulta en una ventaja ya que estudios previos no han encontrado evidencia de tumores a las 2, 8, y 12 semanas después del trasplante y en este estudio tampoco se observó la presencia de tumores en el tejido de ratas trasplantadas con la M213-2O ó la M213-2O CL-4 (Castillo, et al., 2008, Castillo, et al., 2006, Ross, et al., 2002). En contraste existen reportes donde el uso de células madre genera tumores malignos 3 semanas después de ser trasplantadas al cerebro huésped (Erdo, et al., 2003).

Otra complicación tanto de la terapia celular y terapia génica *ex vivo* ha sido la inducción al fenotipo celular deseado, pues en estas se utilizan células embrionarias o bien células madre, con características indiferenciadas cuya principal meta ha sido la diferenciación por ejemplo, a un fenotipo neuronal dopaminérgico, colinérgico, GABAérgico etc (Bosch, et al., 2004, Hattiangady, et al., 2008, O'Keefe, et al., 2008). En relación con esto, en un estudio se diferenciaron células madre neurales con ácido retinoico y alto KCl (40mM), y se obtuvo un 74% de células con fenotipo neuronal GABAérgico. Además encontraron que las células diferenciadas contenían, capturaban y liberaban GABA *in vitro* y una vez trasplantadas al cerebro se identificaron proteínas vesiculares, que evidenciaron la formación de contactos sinápticos (Bosch, et al., 2004). En otro estudio se obtuvieron 69 % de células GABAérgicas que originalmente eran precursoras estriatales, pretratadas con inhibidores de caspasas y con el factor de crecimiento de los fibroblastos-2 (Hattiangady, et al., 2008). En el caso de las células con las que trabajamos y después de su caracterización encontramos que la M213-2O CL-4, la relacionada con el efecto antiepiléptico antes mencionado, es capaz de capturar GABA sugiriendo la presencia de los transportadores de este neurotransmisor. Al respecto se han reportado en la literatura a los GAT 1-4 (Foster & Kemp, 2006). Giordano *et al.* (1993) ya habían demostrado que la línea celular M213-2O capturaba GABA. En este proyecto confirmamos que la línea celular genéticamente

modificada, la M213-2O CL-4 también tiene esta propiedad. Como se esperaba, nuestros resultados indican que la línea celular M213-2O CL-4 expresa altos niveles de la GAD que muestra tener 16-veces más actividad que la presente en la clona original M213-2O y en consecuencia tiene 34-veces mayor contenido intracelular de GABA (Mejía-Toiber, aceptado). Ésta es una de las principales líneas celulares productoras de GABA reportadas en la literatura; Thompson and Suchomelova (2004) describieron a una línea celular de ratón que contiene el ADNc de la GAD₆₅, cuya expresión se encuentra regulada por la dependencia del plásmido a la tetraciclina, sintetiza 4.5 pmol GABA/mg protein. Wang (Wang, et al., 2006) reportó otra línea celular productora de GABA, la RMNE6, obtenida del mesencéfalo ventral de ratas (E13) inmortalizadas con el antígeno T grande del SV40 alelo A58 sensible a la temperatura. Esta línea celular libera $3.69 \pm 0.21 \mu\text{mol/l}$, y tiene $4.13 \pm 0.31 \mu\text{mol/l}$ GABA en el citoplasma. También fue importante determinar que la clona M213-2O CL-4 era capaz de liberar su contenido, es decir el GABA, en respuesta a un estímulo externo. En este estudio encontramos que la clona M213-2O CL-4 liberó GABA en respuesta a la estimulación por alto KCl, mientras que la M213-2O no mostró dicha respuesta, probablemente esta diferencia se deba al bajo contenido intracelular de GABA. También evaluamos la dependencia de la clona M213-2O CL-4 de liberar GABA de manera dependiente de calcio. El GABA puede liberarse a través de un mecanismo exocitótico, es decir dependiente de Ca^{2+} o bien a través del funcionamiento en reversa de los transportadores de GABA dependientes de Na^+ (Pin and Bockaert, 1989). Si bien se observaron vesículas a través del estudio de microscopia electrónica, es necesario colocalizar a la los trasportadores vesiculares de GABA con dichas vesículas, para aseverar el hallazgo. En un estudio evaluaron el funcionamiento en reversa de los transportadores de tipo GAT-1 y concluyeron que este estaba relacionado con el incremento de Na^+ y GABA citosólicos (Wu, et al., 2007). Sin embargo, basados en el hecho de que el alto K^+ indujo la liberación de GABA a través de un proceso dependiente del calcio

extracelular, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la liberación de GABA de la M213-2O CL-4 es de tipo excitotóxico.

Por otro lado, además de que los efectos benéficos de las células trasplantadas están directamente relacionados con su capacidad para expresar enzimas de síntesis de neurotransmisores, por ejemplo la TH o la GAD ó factores de crecimiento, la integración de las células al circuito del cerebro hospedero es fundamental para prolongar sus efectos a largo plazo. Como se mencionó, los resultados obtenidos de los experimentos *in vivo* donde se empleó la técnica de microdiálisis y análisis de HPLC reveló que la zona del trasplante responde significativamente ante el estímulo despolarizante incrementando la cantidad de GABA extracelular cuando las ratas reciben el trasplante 8 semanas antes. Además es probable que una vez trasplantada en la SNr, la clona M213-2O CL-4 sea capaz de liberar GABA por la inervación glutamatérgica proveniente del núcleo subtálmico (Fig. 1). Además se sabe que el glutamato se libera durante las crisis epilépticas (Pena and Tapia, 1999, Pena and Tapia, 2000). Si bien este incremento en los niveles extracelulares de glutamato se relaciona con la muerte neuronal de tipo excitotóxico (Pena and Tapia, 1999, Pena and Tapia, 2000), es probable que el incremento en los niveles extracelulares de glutamato activen a la células trasplantadas y promuevan la liberación de GABA, contribuyendo a la reducción de las crisis epilépticas. Como se mencionó anteriormente, la línea celular M213-2O CL-4 ha sido utilizada con éxito en la prevención de crisis epilépticas en algunos modelos de epilepsia (Castillo, et al., 2008, Castillo, et al., 2006, Ross, et al., 2002). De manera interesante, en estos modelos la clona de origen no tuvo efectos protectores (Castillo, et al., 2008, Castillo, et al., 2006), lo que sugiere que el efecto antiepileptogénico y anticonvulsivo de la línea celular M213-2O CL-4 se asocia a la expresión incrementada de la glutamato decarboxilasa 67, es decir al fenotipo GABAérgico de las células, al incremento de GABA en el sitio de trasplante y posiblemente a su interacción con circuitos neuronales del hospedero (Castillo, et al., 2008, Castillo, et al., 2006). En relación con otros estudios *in vivo*, los

trasplantes cerebrales de células estriatales y líneas celulares GABAérgicas en diferentes modelos animales de epilepsia han mostrado una disminución en la frecuencia y en la intensidad de las crisis (Castillo, et al., 2008, Castillo, et al., 2006, Thompson, et al., 2000). Como se mencionó previamente la SNr es una estructura subcortical capaz de modular el umbral a las crisis, sin embargo se desconoce la manera en que la actividad cortical es modificada (Lado and Moshe, 2008).

En apoyo a estas hipótesis, un estudio demostró que utilizando células estriatales para su trasplante en el estriado lesionado excitotóxicamente, restablecía los niveles de GABA y la liberación se regulaba por las aferencias glutamatérgicas y dopaminérgicas (Campbell, et al., 1993).

Es importante mencionar que los trasplantes de la clona M213-20 CL-4 no tienen efectos anticonvulsivos en los modelos animales estudiados. En nuestro laboratorio se encontró que el trasplante de esta clona en un modelo de epilepsia de ausencia genética en ratas de Estrasburgo (GAERS), no redujo las crisis de ausencia (en revisión por la revista). Hay que considerar que en los resultados positivos previos de los trasplantes de la M213-20 CL-4 son moderados, es posible que en modelos donde los circuitos implicados difieran de los circuitos involucrados en la ELT, por ejemplo en el modelo de las GAERS se encontraron más bien diferencias en los potenciales postsinápticos inhibitorios en el núcleo reticular del talámico a diferencia de otras regiones del tálamo, lo que sugiere una relación entre los circuitos talamocorticales y las crisis epilépticas (Bessaih, et al., 2006). También es posible que el incremento de los niveles de GABA en la SNr de estos animales, no haya sido suficiente para resultar en un cambio funcional, precisamente por las particularidades de este modelo.

Como se mencionó, en el presente estudio, el efecto del trasplante fue únicamente observado a las 8 semanas, como posible explicación del fenómeno, se encontró que sólo a las 8 semanas la actividad de la GAD de la línea celular M213-20 CL-4 estaba

incrementada de manera significativa en comparación con la línea celular M213-2O. La consistencia en la pérdida del efecto en la M213-2O CL-4 a las 12 semanas y el decremento en la función de la GAD sugieren la disminución en la sobrevivencia celular de las células trasplantadas, pérdida de expresión del trasgen e inmunogenicidad, entre otras posibles causas. Al evaluar el primer punto pudimos concluir que el volumen de trasplante se mantiene igual a las 8 y 12 semanas después de la cirugía. No se descarta que si bien el volumen de trasplante se mantiene, el número de células viables esté reducido. En cuanto a la pérdida del transgen, se hará un estudio por RT-PCR a diferentes tiempos. Finalmente, más recientemente se ha comenzado a aceptar que el cerebro no es del todo un sitio inmunoprivilegiado, ya que la microglia, pueden funcionar como células presentadoras de antígenos y los linfocitos pueden atravesar la barrera hematoencefálica cuando esta se daña mecánicamente durante el procedimiento del trasplante (Barker and Widner, 2004). Además el efecto inmunogénico, en estas células, no debe descartarse ya que en un estudio, usando a la M213-2O CL-4 como xenotransplantes, se produjo una fuerte reacción inmune en las primeras tres semanas, en ratas que habían sido sometidas al procedimiento de *Kindling* (encendido eléctrico). En el tejido trasplantado se observó la pérdida total de células aunado a la presencia de células inflamatorias, macrófagos y microglia activada, sugiriendo que algunas propiedades particulares de esta clona en el cerebro del huésped favorecen el rechazo del trasplante y con ello la falla en su función (Nolte, et al., 2008). Hay que destacar el hecho que la rápida respuesta inmune hace poco probable que la pérdida de la función de la M213-2O CL-4 a las 12 semanas se deba a un fenómeno inmunogénico ya que en nuestro estudio el volumen de trasplante, permanece igual a las 8 y 12 semanas.

Estudios *in vitro* indican que por cada duplicación celular se pierde del 2-4 % del plásmido cuando las células no son mantenidas en un medio selectivo (Ren, et al., 2006). Incluso es posible que ocurran cambios transcripcionales o postranscripcionales en las células que

cuentan con el virus de Epstein barr, es decir en la M213-20 CL-4. Además es necesario hacer un análisis histológico más cuidadoso, para evaluar la condición metabólica de las células de los trasplantes de 12 semanas. En futuros experimentos debe considerarse el desarrollo de líneas celulares trasplantables capaces de responder a estímulos externos, con capacidad de regular la liberación de sustancias neurotransmisoras y de integrarse al circuito del tejido hospedero como estas lo demuestran, así como modificar su función sin producir una respuesta inmunogénica y mantener los efectos de manera prolongada.

10. CONCLUSIONES

A continuación se mencionarán los hallazgos que permiten caracterizar a la línea celular de origen mesencefálico, la M213-20 CL-4, como células GABAérgicas funcionales *in vitro*: 1) Las células son negativas a la GFAP, característica de las células gliales 2) Algunas células son positivas al neurofilamento fosforilado 3) Las células son negativas al NeuN por lo que son células inmaduras 4) Las células presentan liberación de tipo excitotóxico, 5) La aplicación de un estímulo endógeno, por la incubación con glutamato (100 μ M), resultó en la liberación de altos niveles de GABA. Por otra parte, es posible que la liberación inducida de GABA involucre la expresión de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y AMPA, ya que las células liberan GABA por la incubación con un Ringer Krebs sin Mg^{2+} y no liberan GABA cuando se usan bloqueadores de estos receptores. Sin embargo este no fue el caso para los receptores tipo kaínico.

En conclusión el estudio funcional llevado a cabo, señala a la M213-20 CL-4 como una línea celular de origen neuronal pero inmaduras, de tipo GABAérgico, sobreproductoras de este neurotransmisor y que son sensibles a un estímulo fisiológico, el glutamato. Asimismo, los resultados del estudio de microdiálisis indican que en el cerebro huésped estas células aumentan los niveles de GABA liberados ante un estímulo despolarizante. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que parte de los efectos funcionales de los trasplantes de esta línea celular están relacionados con la liberación de GABA por parte de las células.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R., Ji, F. Y., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., and Obata, K., 1996. Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem Biophys Res Commun* 229, 891-895.
2. Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R. G., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., and Obata, K., 1997. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6496-6499.
3. Augustine, G. J., and Kasai, H., 2007. Bernard Katz, quantal transmitter release and the foundations of presynaptic physiology. *J Physiol* 578, 623-625.
4. Bachoud-Levi, A. C., Remy, P., Nguyen, J. P., Brugieres, P., Lefaucheur, J. P., Bourdet, C., Baudic, S., Gaura, V., Maison, P., Haddad, B., Boisse, M. F., Grandmougin, T., Jeny, R., Bartolomeo, P., Dalla Barba, G., Degos, J. D., Lisovoski, F., Ergis, A. M., Pailhous, E., Cesaro, P., Hantraye, P., and Peschanski, M., 2000. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356, 1975-1979.
5. Baekelandt, V., De Strooper, B., Nuttin, B., and Debyser, Z., 2000. Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Mol Ther* 2, 540-554.
6. Barker, R. A., and Widner, H., 2004. Immune problems in central nervous system cell therapy. *NeuroRx* 1, 472-481.
7. Beleza, P., 2009. Refractory epilepsy: a clinically oriented review. *Eur Neurol* 62, 65-71.
8. Ben-Ari, Y., and Cossart, R., 2000. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 23, 580-587.
9. Bessaih, T., Bourgeois, L., Badiu, C. I., Carter, D. A., Toth, T. I., Ruano, D., Lambolez, B., Crunelli, V., and Leresche, N., 2006. Nucleus-specific abnormalities of GABAergic synaptic transmission in a genetic model of absence seizures. *J Neurophysiol* 96, 3074-3081.
10. Blumcke, I., Zusratter, W., Schewe, J. C., Suter, B., Lie, A. A., Riederer, B. M., Meyer, B., Schramm, J., Elger, C. E., and Wiestler, O. D., 1999. Cellular pathology of hilar neurons in Ammon's horn sclerosis. *J Comp Neurol* 414, 437-453.
11. Borden, L. A., 1996. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Int* 29, 335-356.
12. Bosch, M., Pineda, J. R., Sunol, C., Petriz, J., Cattaneo, E., Alberch, J., and Canals, J. M., 2004. Induction of GABAergic phenotype in a neural stem cell line for transplantation in an excitotoxic model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 190, 42-58.
13. Brown, A. R. R., 2005. Epilepsy and other seizures disorders. In: Victor, R. A. M., (Ed., Adams and Victor's. Principles of neurology. Mc graw hill, New York, pp. 1382.
14. Bu, D. F., Erlander, M. G., Hitz, B. C., Tillakaratne, N. J., Kaufman, D. L., Wagner-McPherson, C. B., Evans, G. A., and Tobin, A. J., 1992. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2115-2119.

15. C.V. Howard, M. G. R., 1998. Unbiased Stereology. Springer, New York.
16. Campbell, K., Kalen, P., Wictorin, K., Lundberg, C., Mandel, R. J., and Bjorklund, A., 1993. Characterization of GABA release from intrastriatal striatal transplants: dependence on host-derived afferents. *Neuroscience* 53, 403-415.
17. Castillo, C. G., Mendoza-Trejo, S., Aguilar, M. B., Freed, W. J., and Giordano, M., 2008. Intranigral transplants of a GABAergic cell line produce long-term alleviation of established motor seizures. *Behav Brain Res* 193, 17-27.
18. Castillo, C. G., Mendoza, S., Freed, W. J., and Giordano, M., 2006. Intranigral transplants of immortalized GABAergic cells decrease the expression of kainic acid-induced seizures in the rat. *Behav Brain Res* 171, 109-115.
19. Chevalier, G., Thierry, A. M., Shibazaki, T., and Feger, J., 1981. Evidence for a GABAergic inhibitory nigrotectal pathway in the rat. *Neurosci Lett* 21, 67-70.
20. Conejero-Goldberg, C., Tornatore, C., Abi-Saab, W., Monaco, M. C., Dillon-Carter, O., Vawter, M., Elsworth, J., and Freed, W., 2000. Transduction of human GAD67 cDNA into immortalized striatal cell lines using an Epstein-Barr virus-based plasmid vector increases GABA content. *Exp Neurol* 161, 453-461.
21. Deniau, J. M., and Chevalier, G., 1992. The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: distribution of projection neurons. *Neuroscience* 46, 361-377.
22. Diaz-Munoz, M., and Tapia, R., 1988. Regional brain GABA metabolism and release during hepatic coma produced in rats chronically treated with carbon tetrachloride. *Neurochem Res* 13, 37-44.
23. Erdo, F., Buhrle, C., Blunk, J., Hoehn, M., Xia, Y., Fleischmann, B., Focking, M., Kustermann, E., Kolossov, E., Hescheler, J., Hossmann, K. A., and Trapp, T., 2003. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 780-785.
24. Esclapez, M., Tillakaratne, N. J., Kaufman, D. L., Tobin, A. J., and Houser, C. R., 1994. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* 14, 1834-1855.
25. Fenalti, G., Law, R. H., Buckle, A. M., Langendorf, C., Tuck, K., Rosado, C. J., Faux, N. G., Mahmood, K., Hampe, C. S., Banga, J. P., Wilce, M., Schmidberger, J., Rossjohn, J., El-Kabani, O., Pike, R. N., Smith, A. I., Mackay, I. R., Rowley, M. J., and Whisstock, J. C., 2007. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nat Struct Mol Biol* 14, 280-286.
26. Fisher, L. J., Raymon, H. K., and Gage, F. H., 1993. Cells engineered to produce acetylcholine: therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 695, 278-284.
27. Foster, A. C., and Kemp, J. A., 2006. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 6, 7-17.
28. Garant, D. S., and Gale, K., 1983. Lesions of substantia nigra protect against experimentally induced seizures. *Brain Res* 273, 156-161.
29. Gilyarov, A. V., 2008. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* 38, 165-169.
30. Giordano, M., Takashima, H., Herranz, A., Poltorak, M., Geller, H. M., Marone, M., and Freed, W. J., 1993. Immortalized GABAergic cell lines derived from rat striatum using a temperature-sensitive allele of the SV40 large T antigen. *Exp Neurol* 124, 395-400.

31. Giordano, M., Takashima, H., Poltorak, M., Geller, H. M., and Freed, W. J., 1996. Constitutive expression of glutamic acid decarboxylase (GAD) by striatal cell lines immortalized using the tsA58 allele of the SV40 large T antigen. *Cell Transplant* 5, 563-575.
32. Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A., and Walsh, C. A., 1999. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23, 257-271.
33. Hattiangady, B., Rao, M. S., and Shetty, A. K., 2008. Grafting of striatal precursor cells into hippocampus shortly after status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 212, 468-481.
34. Hellier, J. L., Patrylo, P. R., Buckmaster, P. S., and Dudek, F. E., 1998. Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 31, 73-84.
35. Holz, W. R. F., K. S., 2006. Synaptic transmission and cellular signaling: an overview. In: George J. Siegel, R. W. A., Scott T. Brady, Donald L. Price, (Ed., Basic neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects. Academic Press, San Diego, CA, pp. 167.
36. Houle, J., and Fedoroff, S., 1983. Temporal relationship between the appearance of vimentin and neural tube development. *Brain Res* 285, 189-195.
37. Iadarola, M. J., and Gale, K., 1982. Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *Science* 218, 1237-1240.
38. Jin, H., Wu, H., Osterhaus, G., Wei, J., Davis, K., Sha, D., Floor, E., Hsu, C. C., Kopke, R. D., and Wu, J. Y., 2003. Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4293-4298.
39. Katz, B., and Miledi, R., 1967. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol* 189, 535-544.
40. Kaufman, D. L., Houser, C. R., and Tobin, A. J., 1991. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem* 56, 720-723.
41. Keene, C. D., Sonnen, J. A., Swanson, P. D., Kopyov, O., Leverenz, J. B., Bird, T. D., and Montine, T. J., 2007. Neural transplantation in Huntington disease: long-term grafts in two patients. *Neurology* 68, 2093-2098.
42. Kokaia, M., Aebischer, P., Elmer, E., Bengzon, J., Kalen, P., Kokaia, Z., and Lindvall, O., 1994. Seizure suppression in kindling epilepsy by intracerebral implants of GABA- but not by noradrenaline-releasing polymer matrices. *Exp Brain Res* 100, 385-394.
43. Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Olanow, C. W., and Freeman, T. B., 2008. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Mov Disord* 23, 2303-2306.
44. Lado, F. A., and Moshe, S. L., 2008. How do seizures stop? *Epilepsia* 49, 1651-1664.
45. Loscher, W., Gernert, M., and Heinemann, U., 2008. Cell and gene therapies in epilepsy--promising avenues or blind alleys? *Trends Neurosci* 31, 62-73.
46. Martin, D. L., Liu, H., Martin, S. B., and Wu, S. J., 2000. Structural features and regulatory properties of the brain glutamate decarboxylases. *Neurochem Int* 37, 111-119.

47. Mejia-Toiber, J., Castillo, C. G., and Giordano, M., 2009. [Cell and ex vivo gene therapy: advances in the treatment of central nervous system disorders]. *Rev Neurol* 49, 483-489.
48. Mendez, I., Vinuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., Tierney, T., Holness, R., Dagher, A., Trojanowski, J. Q., and Isacson, O., 2008. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med* 14, 507-509.
49. Morgan, D., Murray A., Hunt, t., Nurse, p., 2002. The cell cycle and programmes cell death. In: Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts & Peter Walter, (Ed., *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, pp. 984-1025
50. Nolte, M. W., Loscher, W., Herden, C., Freed, W. J., and Gernert, M., 2008. Benefits and risks of intranigral transplantation of GABA-producing cells subsequent to the establishment of kindling-induced seizures. *Neurobiol Dis* 31, 342-354.
51. O'Keeffe, F. E., Scott, S. A., Tyers, P., O'Keeffe, G. W., Dalley, J. W., Zufferey, R., and Caldwell, M. A., 2008. Induction of A9 dopaminergic neurons from neural stem cells improves motor function in an animal model of Parkinson's disease. *Brain* 131, 630-641.
52. Olsen, R. W., and Sieghart, W., 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 60, 243-260.
53. Olsen, W. R., & Betz, H., 2006. GABA and Glycine. In: George J. Siegel, R. W. A., Scott T. Brady, Donald L. Price (Ed., *Basic Neurochemistry Academic Press*, London, pp. 291-302.
54. Pena, F., and Tapia, R., 1999. Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem* 72, 2006-2014.
55. Pena, F., and Tapia, R., 2000. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* 101, 547-561.
56. Petanjek, Z., Dujmovic, A., Kostovic, I., and Esclapez, M., 2008. Distinct origin of GABA-ergic neurons in forebrain of man, nonhuman primates and lower mammals. *Coll Antropol* 32 Suppl 1, 9-17.
57. Pin, J. P., and Bockaert, J., 1989. Two distinct mechanisms, differentially affected by excitatory amino acids, trigger GABA release from fetal mouse striatal neurons in primary culture. *J Neurosci* 9, 648-656.
58. Ren, C., Zhao, M., Yang, X., Li, D., Jiang, X., Wang, L., Shan, W., Yang, H., Zhou, L., Zhou, W., and Zhang, H., 2006. Establishment and applications of epstein-barr virus-based episomal vectors in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 1338-1347.
59. Ross, K. C., Waldman, B. C., Conejero-Goldberg, C., Freed, W., and Coleman, J. R., 2002. Transplantation of M213-2O cells with enhanced GAD67 expression into the inferior colliculus alters audiogenic seizures. *Exp Neurol* 177, 338-340.

60. Sihag, R. K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T. B., and Pant, H. C., 2007. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res* 313, 2098-2109.
61. Sitges, M., Chiu, L. M., and Gonzalez, L., 1993. Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of [3H]GABA: inhibition by amiloride and verapamil. *Neurochem Res* 18, 1081-1087.
62. Soghomonian, J. J., and Martin, D. L., 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* 19, 500-505.
63. Soroka, V., Kasper, C., and Poulsen, F. M., 2008. Structural Biology of NCAM. *Neurochem Res*.
64. Stewart, C. L., Soria, A. M., and Hamel, P. A., 2001. Integration of the pRB and p53 cell cycle control pathways. *J Neurooncol* 51, 183-204.
65. Takacs-Jarrett, M., Sweeney, W. E., Avner, E. D., and Cotton, C. U., 1998. Morphological and functional characterization of a conditionally immortalized collecting tubule cell line. *Am J Physiol* 275, F802-811.
66. Tegtmeyer, P., 1975. Function of simian virus 40 gene A in transforming infection. *J Virol* 15, 613-618.
67. Thompson, K., Anantharam, V., Behrstock, S., Bongarzone, E., Campagnoni, A., and Tobin, A. J., 2000. Conditionally immortalized cell lines, engineered to produce and release GABA, modulate the development of behavioral seizures. *Exp Neurol* 161, 481-489.
68. Thompson, K. W., and Suchomelova, L. M., 2004. Transplants of cells engineered to produce GABA suppress spontaneous seizures. *Epilepsia* 45, 4-12.
69. Veliskova, J., and Moshe, S. L., 2006. Update on the role of substantia nigra pars reticulata in the regulation of seizures. *Epilepsy Curr* 6, 83-87.
70. Wang, J. J., Zhang, T., Niu, D. B., Wang, K., Li, K. R., Xue, B., and Wang, X. M., 2006. Doxycycline-regulated co-expression of GDNF and TH in PC12 cells. *Neurosci Lett* 401, 142-145.
71. Wojcik, S. M., Katsurabayashi, S., Guillemin, I., Friauf, E., Rosenmund, C., Brose, N., and Rhee, J. S., 2006. A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron* 50, 575-587.
72. Wolff, J. A., Fisher, L. J., Xu, L., Jinnah, H. A., Langlais, P. J., Iuvone, P. M., O'Malley, K. L., Rosenberg, M. B., Shimohama, S., Friedmann, T., and et al., 1989. Grafting fibroblasts genetically modified to produce L-dopa in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9011-9014.
73. Wu, Y., Wang, W., Diez-Sampedro, A., and Richerson, G. B., 2007. Nonvesicular inhibitory neurotransmission via reversal of the GABA transporter GAT-1. *Neuron* 56, 851-865.
74. Zhu, H., and Dahlstrom, A., 2007. Glial fibrillary acidic protein-expressing cells in the neurogenic regions in normal and injured adult brains. *J Neurosci Res* 85, 2783-2792.

12. ANEXOS

ANEXO 1

Determinación de la captura de GABA

1. Dejar que las células tengan una confluencia del 80 %
2. Lavar con salina (NaCl, 0.9 %)
3. Incubar 10 min con ácido 4-amino-n-[2,3-³H] butírico (100 nM) con una actividad específica de 94 Ci/mmol, 200 µl de GABA
4. Lavar 2 veces con el Ringer-Krebs
5. Incubar con SDS 10 %
6. Adicionar 750 µl de H₂O destilada en cada pozo
7. Tomar la solución y colocarla en los viales de centelleo
8. Contar con el contador de centelleo la radioactividad

ANEXO 2

Determinación de la actividad de la glutamato descarboxilasa

SOLUCIONES STOCK	PESO MOLECULAR	Concentración	Peso	Volumen final
Fosfato de piridoxal	247.1	2 mM	1.16 mg	2.34 ml
Ditiotreitol	154.25	10 mM	2.38 mg	1.54 ml
Na ₂ HPO ₄ , pH 6.4	141.96	0.5 M	7.098 g	50 ml
H ₂ SO ₄	98.08	30 N	14.71g	8.08 ml
Glutamato (Frío)	147.1	100mM	147 mg	1ml
			Blanco (sin células)	
SOLUCIÓN DE TRABAJO	Concentración	Células		
		μl	μl	
Fosfato de piridoxal	0.5 mM	88	88	
Ditiotreitol	1.13 mM	40	40	
Na ₂ HPO ₄ , pH 6.4	50 mM	30	35	
H ₂ SO ₄	2.5 N	83	83	
Glutamato frío en Na ₂ HPO ₄ 50Mm	2 mM	7	7	
Glutamato radioactivo 0.05 μCi	0.83 nmol	5	5	
Suspensión	-	65	-	
H ₂ O	-	32	92	
Volumen final	350	350	350	

1. Las células se despegan con el gendarme y se suspenden en 110 μl de Na₂HPO₄, pH 6.4, se toman 90 μl, se sonicán por 10 segundos y se añaden a la mezcla. El resto (20μl) se utiliza para la determinación de proteínas.
2. Una vez que se ha hecho la mezcla se mantiene por 30 min a 37°C en agitación.
3. Una vez que se ha hecho la mezcla se adiciona el H₂SO₄.
4. Se adicionan 50 μl de hiamina en la punta del eppendorf y se incuba a 37°C en agitación durante 45 min.
5. La adición del ácido termina con la reacción y durante la incubación se libera 14 CO₂.

ANEXO 3

Inmunocitoquímica para proteínas intracelulares

1. Aspirar el medio
2. Fijar con paraformaldehído al 4%, fresco y a temperatura ambiente por 10 min.
3. Retirar el paraformaldehído y lavar con PBS.
4. Permeabilizar las células con tween 0.3 %
5. Lavar con la solución prebloqueo (10 % de suero de caballo en PBS) 5-3X.
6. Incubar con la solución prebloqueo por 10 min.
7. Incubar con el anticuerpo primario 12-18 h a 4° C, diluido con la solución prebloqueo
8. Lavar con la solución prebloqueo 5-3X
9. Incubar con el anticuerpo secundario (1:200) 2 h a temperatura ambiente, diluido con la solución prebloqueo
10. Lavar con la solución prebloqueo 5-3X
11. Montar con vectashield.

ANEXO 4

Determinación de proteínas por el método de Bradford

1. Preparar la solución stock de albúmina sérica bovina (BSA) para la curva con una concentración de 0.1g/l. En solución comercial de BSA (1.44 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Tomar los diferentes volúmenes de las concentraciones requeridas. La curva se hace por triplicado.

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

3. Se agrega el reactivo Bradford (200 μl) a cada tubo.

Tubo	Concentración de BSA $\mu\text{g}/\text{ml}$	Volumen de BSA (μl)	Agua desionizada (μl)	Reactivo de Bradford (μl)
1	0	0	800	200
2	0.5	0.35	799.65	200
3	1.0	0.69	799.31	200
4	2.0	1.38	798.62	200
5	4.0	2.78	797.22	200
6	8.0	5.56	794.44	200
7	16.0	11.11	788.89	200
8 (muestra)	0	5	795	200

4. Al poner el reactivo Bradford se mezcla y se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos.

5. Graficar los valores de absorbancia (y) para extrapolar los valores sobre la curva de la muestra no conocidas (x).

ANEXO 5

Detección electroquímica para la cualificación de GABA *in vitro* e *in vivo*

1. Se prepara la fase móvil de la siguiente manera:

Amortiguador de fosfatos dibásico, 0.1 M

750 ml de H₂O

250 ml de Metanol (25 % final)

Ajustar a un pH de 6.75 con (ácido fosfórico)

Modo de preparación: Se pesa la sal, se mezcla con el H₂O hasta que se disuelve completamente, se agrega el metanol, al finalizar se utiliza un filtro 0.22 µm

2.-Se prepara la solución para derivar, esta solución stock dura 5 días máximo

0.027 gr de OPA

5 ml de β-mercaptoetanol

9 ml de buffer de tetraboratos, 0.1 M, pH 9.3,

3. Se prepara la solución de trabajo (1:4) diariamente de la siguiente manera:

250 µl de la solución de OPA

750 µl de buffer de tetraborato

5. Parámetros de sensibilidad para detectar GABA *in vitro*

E1 Electrodo de conteo 400mv 50nA

E2 Electrodo de trabajo 600mv 50nA

4. Parámetros de sensibilidad para detectar GABA *in vivo*

E1 Electrodo de conteo 400mv 10nA

E2 Electrodo de trabajo 600mv 10nA