



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL (CINVESTAV)**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**Componentes de la síntesis alterna de GABA en el ganglio de la raíz dorsal de  
mamífero**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**PRESENTA**

**BIOL. NATALIE JIMÉNEZ BARRIOS**

**TUTORES**

**DR. JOSÉ RODOLFO DELGADO LEZAMA**

**DR. BENJAMIN FLORÁN GARDUÑO**

**CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.**

**AGOSTO 2020**

## Contenido

Prefacio	4
Agradecimientos	5
Resumen	6
Abstract	8
Introducción	10
La transducción de los estímulos periféricos se realiza mediante las fibras aferentes primarias	10
El principal neurotransmisor inhibitor, el GABA	11
Importancia del GABA en el sistema nervioso periférico	12
Las células gliales satelitales se localizan en los ganglios de la raíz dorsal	13
Células gliales satelitales como fuente de GABA	15
Los somas de las neuronas sensoriales pueden sintetizar y liberar GABA	19
El GABA se sintetiza por medio de una vía característica de las neuronas	20
El GABA puede sintetizarse por vías alternativas	21
Planteamiento del problema	24
Hipótesis	24
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24
Método	25
Animales	25
Obtención de GRD	25
Expresión de genes involucrados en la síntesis y liberación de GABA	25
Localización de las proteínas involucradas en la síntesis y liberación de GABA	26
Resultados	28
Discusión	32
El gen <i>Maob</i> está presente en el GRD	32
El gen <i>Odc1</i> y la proteína ODC están presentes en el GRD	32

El GABA puede ser liberado por el canal Best1	34
Importancia del GABA en la glía del SN	35
¿El GABA se libera en las terminales axónicas de las neuronas sensoriales?	36
Papel del GABA presente en las neuronas sensoriales en el dolor neuropático	36
Perspectivas	38
Bibliografía	39

## **Prefacio**

Los experimentos realizados en el presente trabajo referentes a los ensayos de *PCR* y las inmunofluorescencias se llevaron a cabo en el laboratorio 55 del Departamento de Biología Celular (DBC) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

La tesis fue dirigida por el Dr. José Rodolfo Delgado Lezama y por el Dr. Benjamín Florán Garduño, profesores titulares del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias (DFBN). Asimismo, esta tesis se desarrolló bajo la asesoría del Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva y del Dr. Ismael Jiménez Estrada, profesores titulares del DBC y del DFBN, respectivamente.

## **Agradecimientos**

Agradezco el apoyo brindado por el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias y por el propio Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Agradezco también el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca académica con CVU 935751.

Asimismo, agradezco a Guadalupe Raya Tafolla, al Dr. Ricardo González Ramírez, a José Arturo Ávalos Fuentes y a Francisco Javier Paz Bermúdez por su apoyo y consejos en la parte experimental de esta tesis.

Finalmente agradezco al Dr. José Rodolfo Delgado Lezama, al Dr. Benjamín Florán Garduño, al Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva y al Dr. Ismael Jiménez Estrada por su tiempo y apoyo que fue incondicional para la conclusión de esta tesis.

## Resumen

El sistema nervioso recibe información de los estímulos externos e internos a través de las neuronas sensoriales que la transmiten a la médula espinal. Estas neuronas son pseudounipolares con una terminal periférica y otra central, con sus somas localizados en los ganglios de la raíz dorsal (GRD). Estas neuronas expresan un repertorio de receptores y canales iónicos que regulan su excitabilidad. Entre estos, se encuentran los receptores al GABA del tipo ionotrópico GABA<sub>A</sub> y el metabotrópico GABA<sub>B</sub>. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitor en el sistema nervioso. En particular en las neuronas sensoriales, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> despolariza las neuronas sensoriales debido a que el potencial de equilibrio del ion cloruro, es más positivo que el de la membrana en reposo. Las neuronas sensoriales expresan receptores GABA<sub>A</sub> sinápticos y extrasinápticos, así como receptores GABA<sub>B</sub> extrasinápticos. Los receptores GABA<sub>B</sub> y los GABA<sub>A</sub> extrasinápticos, específicamente los  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, están tónicamente activados por el GABA del medio extracelular, inhibiendo la liberación del neurotransmisor y reduciendo la excitabilidad de las fibras aferentes primarias, respectivamente. Sin embargo, se desconoce el origen celular del GABA que los activa. En el GRD, además de los somas de las neuronas sensoriales se localizan las células gliales satelitales que forman una envoltura alrededor del soma neuronal. Por lo tanto, estos dos tipos celulares son los candidatos para sintetizar y liberar GABA. En el cerebelo, las células gliales pueden sintetizar y liberar GABA, por lo tanto, es posible que el GABA que activa los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> de las neuronas sensoriales provenga de las células gliales satelitales. Está ampliamente documentado que, en el GRD, tanto en la rata como en la tortuga el [<sup>3</sup>H]GABA es capturado y liberado solo por las células gliales satelitales. No existe ninguna evidencia que muestre que la neurona sensorial realice este proceso. Además, la liberación se realizó en ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular y es dependiente del Ca<sup>2+</sup> intracelular. En particular, aquí se muestra en la tortuga que la liberación ocurre a través del canal de Bestrofinal, que se sabe permea GABA en las células gliales de Bergmann del cerebelo donde media la activación de una corriente GABAérgica tónica en las neuronas granulares. No obstante, a pesar de que las neuronas sensoriales no capturan GABA, se ha propuesto que contienen la maquinaria enzimática para sintetizar y liberar vesicularmente este transmisor. Por lo tanto, existe una controversia sobre cuál de las dos

células del GRD de los mamíferos sintetiza y libera el GABA que activa los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> extrasinápticos. El objetivo principal de este trabajo fue determinar si en el GRD se localiza la maquinaria molecular necesaria para la síntesis de GABA no convencional e identificar las células en las que se expresa. Empleando ensayos de *PCR* e inmunofluorescencia se encontró que los genes de *Maob* y *Odc1* se expresan en el GRD y que ODC parece localizarse en las neuronas sensoriales, mientras que DAO se expresa en las células gliales satelitales. No obstante, es necesario realizar más experimentos para confirmar estos resultados.

## Abstract

The nervous system receives information from external and internal stimuli through sensory neurons that transmit it to the spinal cord. These neurons are pseudounipolar with a peripheral and a central terminal, with their somas located in the dorsal root ganglia (DRG). These neurons express a repertoire of receptors and ion channels that regulate their excitability. Among these are GABA receptors of ionotropic GABA<sub>A</sub> and metabotropic GABA<sub>B</sub> types. GABA is the main inhibitory neurotransmitter in the nervous system. In sensory neurons, GABA<sub>A</sub> receptors activation depolarizes the membrane because the chloride ion's equilibrium potential is more positive than the resting membrane potential. Sensory neurons express synaptic and extra-synaptic GABA<sub>A</sub> receptors, as well as extra-synaptic GABA<sub>B</sub> receptors. GABA<sub>B</sub> and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors, specifically  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, are tonically activated by GABA from the extracellular medium, inhibiting the neurotransmitter's release and reducing the excitability of the primary afferent fibers. However, the cellular origin of GABA that activates them is unknown. In the DRG, in addition to the somas of sensory neurons, the glial satellite cells are located, forming an envelope around the neuronal soma. Therefore, these two cell types are the candidates to synthesize and release GABA. In the cerebellum, glial cells can synthesize and release GABA, therefore, the GABA that activates the GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors of sensory neurons may come from glial satellite cells. It is widely documented that in the DRG, in both rat and turtle, the [<sup>3</sup>H]GABA is captured and released only by the glial satellite cells. There is no evidence to show that the sensory neuron performs this process. Furthermore, the release was carried out in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> and is dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup>. In turtle [<sup>3</sup>H]GABA release was shown to occur through the Bestrophin 1 channel, which is known to permeate GABA in Bergmann glial cells of the cerebellum where it mediates the activation of a tonic GABAergic current in granular neurons. However, even though sensory neurons do not capture GABA, it has been proposed that they contain the enzymatic machinery to synthesize and release this neurotransmitter through vesicles. Thus, there is controversy over which of the two mammalian GRD cells synthesizes and releases GABA that activates the extrasynaptic GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. The aim of this work was to determine if the molecular machinery necessary for the synthesis of unconventional



GABA is in the DRG and to immunolocalize the cells in which it is expressed. Using *PCR* and immunofluorescence assays, it was found that the *Maob* and *Odc1* genes are expressed in the GRD and that ODC appears to be localized in sensory neurons, whereas DAO is expressed in glial satellite cells. However, further experiments are necessary to confirm these results.

## **Introducción**

Las experiencias sensoriales que incluyen sensaciones de tacto, presión o temperatura tienen una función protectora esencial para el cuerpo debido a que son indicadoras de posible daño que debe ser tratado. Dichas experiencias son detectadas por los receptores sensoriales, los cuales son sensibles a ciertos tipos de estímulos, como los mecanorreceptores, que responden a diversas clases de estímulos al tacto o los nociceptores, que responden a estímulos nocivos en tejidos periféricos. La información del estímulo detectada por los receptores sensoriales es transformada en una señal nerviosa por medio de las fibras aferentes primarias. Esta información sensitiva viaja en forma de potenciales de acción a través de las fibras aferentes que tienen terminales centrales que desembocan en el asta dorsal de la médula espinal, la cual se divide en láminas diferentes en donde las neuronas se agrupan. Posteriormente, la información en forma de potenciales de acción es transmitida hasta el tálamo y la corteza cerebral a través de vías ascendentes.

### **La transducción de los estímulos periféricos se realiza mediante las fibras aferentes primarias**

Las fibras aferentes primarias o neuronas sensoriales se encargan de transmitir la información procedente de los receptores sensoriales a la médula espinal. Las neuronas sensoriales son células pseudounipolares, poseen un axón único con una terminal periférica y otra central (Caspary & Anderson, 2003). Los somas de estas neuronas se localizan en los ganglios sensoriales, mejor conocidos como ganglios de la raíz dorsal (GRD). Estas neuronas carecen de dendritas y no reciben sinapsis en el soma además de poseer receptores para diversos neurotransmisores (Hanani, 2005).

Las fibras aferentes primarias pueden clasificarse en cuatro grupos, de acuerdo con el receptor sensorial que inervan, su diámetro y velocidad de conducción, como:  $A\alpha$ ,  $A\beta$ ,  $A\delta$  y C o como tipos I, II, III y IV cuando inervan los músculos y tendones (Bear *et al.*, 2006). El grupo de los propioceptores se conforma por las fibras  $A\alpha$  o tipos I-II que incluye a las más grandes en cuanto a diámetro (13-20  $\mu\text{m}$ ) y con mayor velocidad de conducción (80-120 m/s). Estas fibras no se encuentran en la piel, sino que se unen con el huso muscular y el órgano tendinoso de Golgi. El grupo de los mecanorreceptores engloba

a las A $\beta$  o tipos I-II que son fibras de diámetro y velocidad de conducción media (6-12  $\mu$ m y 35-75 m/s, respectivamente), estas fibras además de conectar con huso muscular y el órgano tendinoso de Golgi se unen a los receptores cutáneos. En el grupo de nociceptores se encuentran las fibras A $\delta$  y C o tipos III y IV, respectivamente. Las A $\delta$  o tipo III son fibras poco mielinizadas (con diámetro de 1-5  $\mu$ m) y con baja velocidad de conducción (5-30 m/s), mientras que las fibras C o IV carecen de mielina, por ello su diámetro y velocidad de conducción son menores en comparación con las otras fibras, entre 0.2-1.5  $\mu$ m y 0.5-2 m/s, respectivamente (Fig. 1).

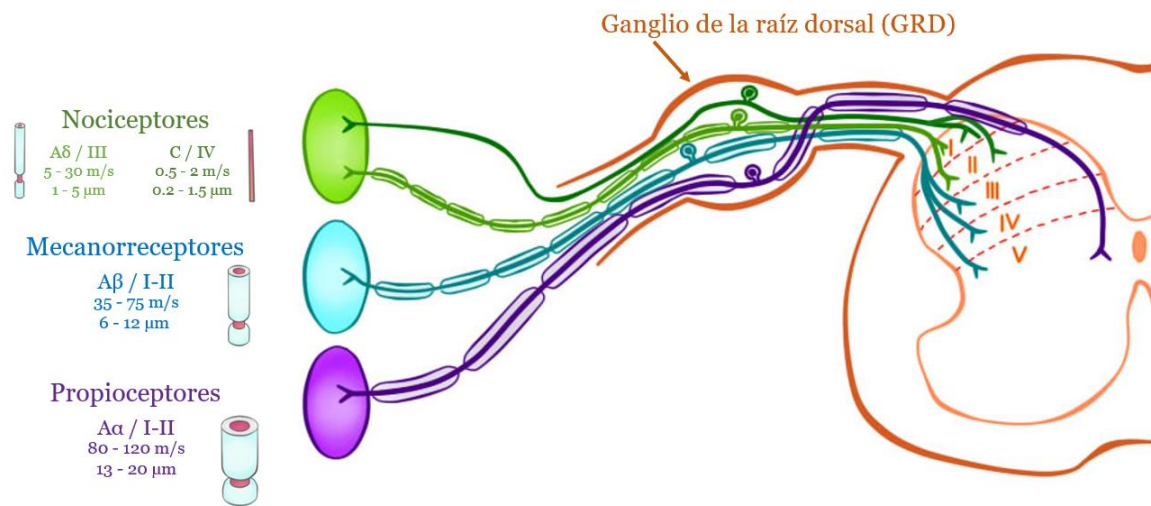


Fig. 1. Diferentes tipos de fibras aferentes primarias. Los somas de estas neuronas se localizan en el ganglio de la raíz dorsal (GRD; modificado de Caspary & Anderson, 2003). Las fibras A $\alpha$  o tipos I y II hacen contacto sináptico principalmente con neuronas de la lámina V; las fibras A $\beta$  o tipos I y II inervan principalmente neuronas de las láminas III, IV y V; las fibras A $\delta$  y C o tipos III y IV inervan principalmente neuronas de las láminas I, II y III.

### El principal neurotransmisor inhibitorio, el GABA

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso (SN). Existen dos tipos de receptores para este neurotransmisor, los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos comprenden al receptor GABA<sub>A</sub> (RGABA<sub>A</sub>) y al receptor GABA<sub>C</sub>, son receptores pentaméricos permeable al ion cloruro y

bicarbonato. El receptor metabotrópico GABA<sub>B</sub> (RGABA<sub>B</sub>) está acoplado a proteínas G (Bowery *et al.*, 2002).

### **Importancia del GABA en el sistema nervioso periférico**

En el SN central maduro, la activación de los RGABA<sub>A</sub> causa la entrada de iones Cl<sup>-</sup> al citoplasma generando la hiperpolarización de la membrana celular. Sin embargo, en las neuronas sensoriales, el GABA produce la despolarización de la membrana debido a que el potencial de equilibrio del ion cloruro ( $E_{Cl} = -35$  mV) es más positivo que el de la membrana en reposo (Alvarez-Leefmans *et al.*, 1998).

En las terminales centrales de las fibras aferentes primarias se expresan RGABA<sub>A</sub> sinápticos que son activados por neuronas GABAérgicas cuyos contactos axo-axónicos activan a estos receptores, produciendo una despolarización fásica que inhibe la liberación de neurotransmisor, fenómeno conocido como inhibición presináptica.

Los RGABA<sub>B</sub> se expresan a todo lo largo de las fibras aferentes primarias, cuando son activados por su agonista baclofén producen inhibición de la liberación de transmisor en las terminales centrales (Peshori *et al.*, 1998). Su acción está mediada por la inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup> (Eliot *et al.*, 1993). La activación de la inhibición presináptica se puede bloquear aplicando únicamente antagonistas de los RGABA<sub>A</sub> sinápticos, como picrotoxina (Rudomin & Schmidt, 1999; Bautista *et al.*, 2010). Esto indica que los RGABA<sub>B</sub> no son activados por el GABA liberado en las sinapsis axo-axónicas, sugiriendo que son receptores extrasinápticos (Peshori *et al.*, 1998).

Además del receptor extrasináptico GABA<sub>B</sub>, las fibras aferentes primarias también expresan receptores extrasinápticos  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> a lo largo de sus axones y el soma, tanto de las tortugas (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013), como de las ratas (Hernández-Reyes *et al.*, 2019; Bravo-Hernández *et al.*, 2016; Fig. 2). El receptor GABA<sub>B</sub> como el  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> están tónicamente activados por el GABA del medio extracelular, inhibiendo la liberación de transmisor (Peshori *et al.*, 1998) y reduciendo la excitabilidad de las fibras aferentes primarias (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013; Hernández-Reyes *et al.*, 2019), respectivamente. Sin embargo, se desconoce quién sintetiza y libera el GABA que los activa.

### Receptor $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> en la neurona sensorial

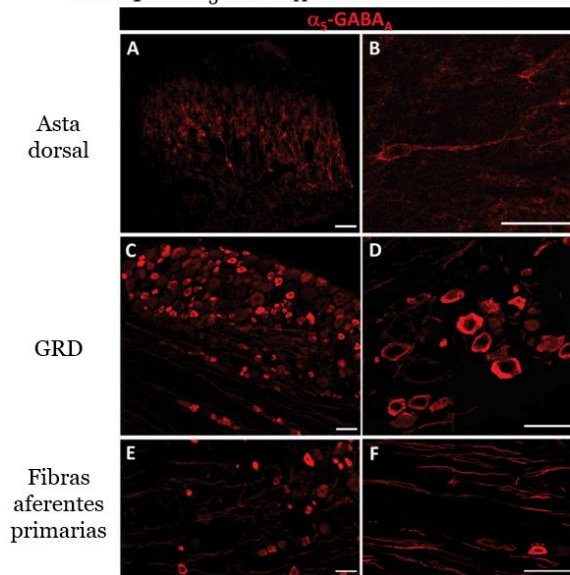


Fig. 2. Los receptores  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> se expresan en el asta dorsal, en el GRD y en las fibras aferentes primarias (barra de escala, 50  $\mu$ m; Bravo-Hernández *et al.*, 2016).

### Las células gliales satelitales se localizan en los ganglios de la raíz dorsal

Como se mencionó anteriormente, los somas de las neuronas sensoriales se localizan en el GRD, los cuales están rodeados por las células gliales satelitales (CGS), que como su nombre lo indica, forman parte de la glía del SN periférico (Hanani, 2005). Cada neurona sensorial tiene su propia envoltura formada de varias CGS, constituyendo la unidad neurona sensorial-CGS (Fig. 3; Hanani, 2005).

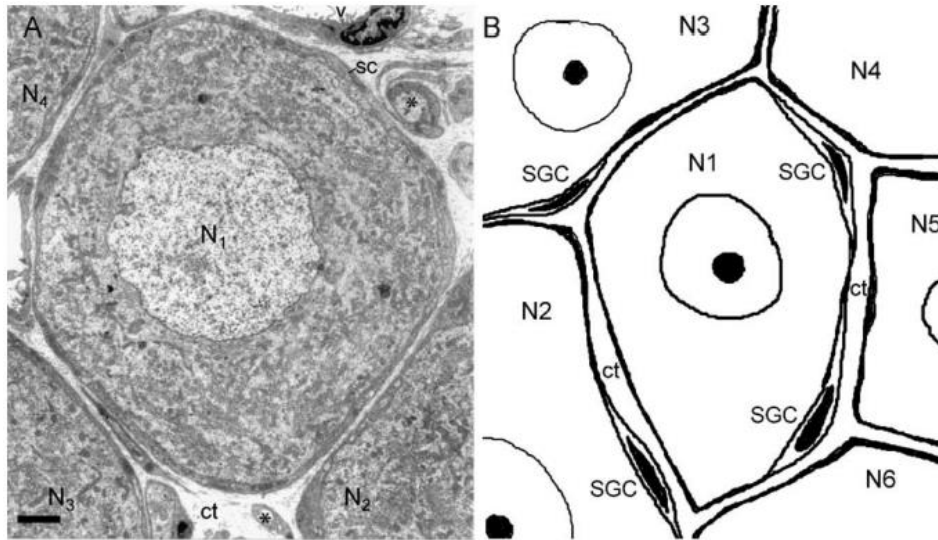


Fig. 3. La unidad neurona sensorial-CGS. (A) Una micrografía electrónica del GRD de ratón, que muestra la disposición de las CGS (sc) alrededor de las neuronas (N<sub>1-4</sub>). Las neuronas con sus CGS asociadas están separadas por un espacio de tejido conectivo (ct). El contorno exterior de la vaina glial es suave. Los asteriscos indican axones no mielinizados rodeados por células de Schwann. Barra de calibración, 2  $\mu$ m (Pannese *et al.*, 2003). (B) Diagrama esquemático que describe las relaciones anatómicas entre las neuronas (N<sub>1</sub> – N<sub>6</sub>) y las CGS en los ganglios sensoriales (Hanani, 2005).

Las CGS contienen moléculas como glutamina sintetasa, proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), receptor P2Y, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), transportador de GABA, entre otras (Hanani, 2005). Las CGS se vuelven reactivas ante el daño periférico de un nervio de tal manera que incrementan la expresión de GFAP de modo similar a como ocurre con los astrocitos.

Debido a que el GRD se conforma por células gliales incluyendo a las CGS así como por neuronas incluyendo a las sensoriales, es posible que el GABA que activa a los RGABA<sub>A</sub> y RGABA<sub>B</sub> provenga de alguna de estas células.

## Células gliales satelitales como fuente de GABA

Está documentado que el [ $^3\text{H}$ ]GABA puede ser capturado tanto por neuronas como por células gliales (Hösli *et al.*, 1972; Neal & Iversen, 1972; Gottesfeld *et al.*, 1973) de los ganglios cervicales superiores (Bowery & Brown, 1972), así como de los ganglios sensoriales de la raíz dorsal (Gottesfeld *et al.*, 1973).

El estudio de Gottesfeld *et al.*, (1973) realizado en GRD de rata y gato expuestos a [ $^3\text{H}$ ]GABA, determinó que los ganglios contuvieron valores similares a  $0.26 \mu\text{moles/g}$  de tejido de GABA y una actividad de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) de  $0.45 \mu\text{moles/g/h}$ . Además, por autoradiografía se encontró que la absorción de GABA en los GRD fue específica de este aminoácido y fue localizado exclusivamente en las CGS.

De manera similar, Schon & Kelly en (1974), realizaron autoradiografías en GRD de rata adulta expuestos a [ $^3\text{H}$ ]GABA. El GABA se localizó exclusivamente en las CGS que rodean a los cuerpos celulares neuronales sensoriales (Fig. 4). El GABA también se acumuló dentro de las células gliales que rodean a los axones no mielinizados y en los cuerpos de las células de Schwann de las fibras mielinizadas en los GRD.

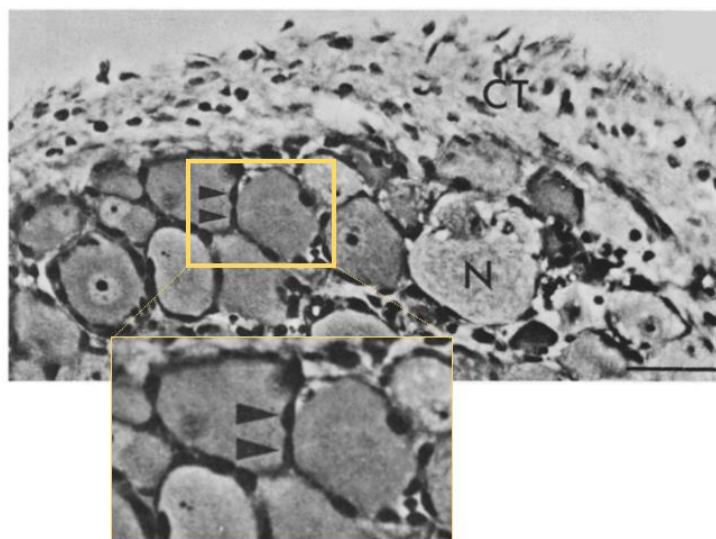


Fig. 4. Captura de [ $^3\text{H}$ ]GABA en CGS. Se muestra una imagen de autorradiografía en contraste de fases de ganglio sensorial de rata con  $10^{-6} \text{ M}$  [ $^3\text{H}$ ]GABA (Schon & Kelly, 1974a). Las acumulaciones marcadas de plata están sobre las CGS (cabeza de flecha). Los

cuerpos celulares (N) y el tejido conectivo (CT) están libres de plata. Tiempo de exposición, 1 semana. Barra de escala, 20  $\mu\text{m}$ .

Se ha reportado que la liberación de [ $^3\text{H}$ ]GABA en presencia de ácido 10-M-aminooxiacético (AOAA), inhibidor de la GABA transaminasa, se efectúa exponiendo los ganglios a concentraciones de potasio despolarizantes (Minchin & Iversen, 1974). En 1974, Minchin & Iversen para caracterizar los factores que afectan la liberación de aminoácidos de las CGS de ratas, investigaron los efectos de altas concentraciones de  $\text{K}^+$  que podrían causar despolarización y el flujo de salida de [ $^3\text{H}$ ]GABA y otros aminoácidos marcados de los ganglios sensoriales. Ellos encontraron que las células gliales en los GRD pueden responder a altas concentraciones de  $\text{K}^+$ , causando la despolarización y la posterior liberación de GABA, por un proceso que es dependiente de la concentración de calcio extracelular.

Resultados de nuestro laboratorio (Vargas-Parada, 2012) demuestran que la despolarización del GRD de tortuga (*Trachemys scripta spp*) libera [ $^3\text{H}$ ]GABA por altas concentraciones de  $\text{K}^+$  (Fig. 5A). Asimismo, se observó que dicha despolarización es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Fig. 5B) y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Fig. 5C). Aunado a ello, se encontró que la liberación de [ $^3\text{H}$ ]GABA se da a través del canal de bestrofina 1 (Best1; Fig. 5D).

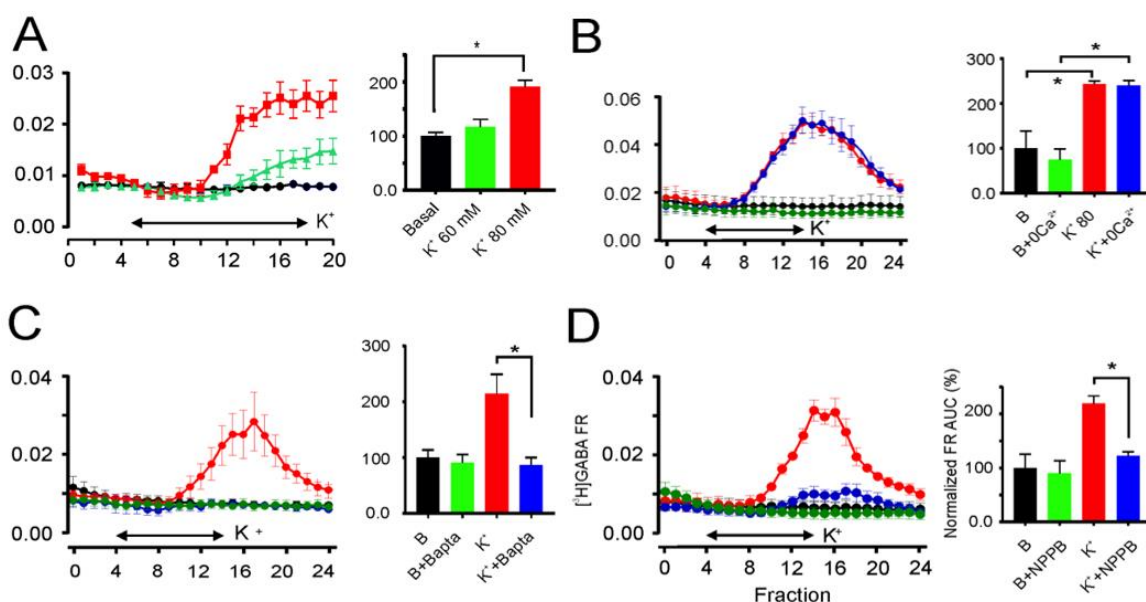




Fig. 5. Liberación de [<sup>3</sup>H]GABA del GRD de tortuga. A) Liberación de [<sup>3</sup>H]GABA causada por la despolarización efectuada por K<sup>+</sup> (60 y 80 mM). B) Liberación de [<sup>3</sup>H]GABA en presencia de 0 mM de Ca<sup>2+</sup> extracelular, dicha condición no afecta la liberación del neurotransmisor. C) Liberación de [<sup>3</sup>H]GABA en presencia de un quelante de Ca<sup>2+</sup> (BAPTA). En esta condición no se observa liberación del neurotransmisor. D) El bloqueo del canal Best1 con NPPB deprimió la liberación de [<sup>3</sup>H]GABA en comparación con la condición basal (Vargas-Parada, A., 2012).

### **El GABA puede ser liberado a través del canal Bestrofina-1**

Bestrofina 1 (Best1) es un canal aniónico activado por Ca<sup>2+</sup> intracelular, ensamblado como un pentámero y expresado en la membrana plasmática (Vaisey *et al.*, 2016). Best1 fue identificado en el epitelio pigmentario de la retina en donde la mutación del gen *BEST1* se relaciona con la distrofia macular viteliforme (Johnson *et al.*, 2017). Best1 se expresa en neuronas, células gliales, meninges y en células epiteliales del plexo coroideo (Oh & Lee, 2017). Se ha reportado que el canal Best1 permite la liberación de neurotransmisores como el glutamato (Park *et al.*, 2009) y GABA (Lee *et al.*, 2010). Además, se ha visto que el canal Best1 se expresa en células gliales como astrocitos (Fig. 6; Park *et al.*, 2009). Lee *et al.*, (2010), demostraron que la inhibición tónica de las células granulares del cerebelo está mediada por la liberación de GABA por la glía de Bergmann a través del canal Best1, ya que ésta se redujo en presencia del bloqueador NPPB. La permeabilidad de Best1 a GABA se determinó expresando el canal en células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293T) y se realizaron registros de patch-clamp de célula completa para medir el potencial de inversión de las corrientes iónicas resultantes. Posteriormente, los canales Best1 se activaron al máximo mediante una solución alta de Ca<sup>2+</sup> libre (~ 4.5 mM) dializada en la célula. Se encontró que el potencial de inversión de la corriente mediada por Best1 coincidía con el potencial de equilibrio previsto para Cl<sup>-</sup>, sugiriendo una corriente transportada por Cl<sup>-</sup> en estas condiciones, dicha corriente no se observó en presencia de NPPB y se mostró disminuida en ausencia total de Ca<sup>2+</sup> interno. Estos resultados se encontraron respaldados por el hecho de que las corrientes estaban ausentes en las células que no fueron transfectadas con Best1 y en las células con una mutación de residuos de triptófano a cisteína (W93C) en Best1 que bloquea el poro del canal de

aniones Best2. Por otro lado, la permeabilidad de GABA del canal Best1 se examinó reemplazando  $\text{Cl}^-$  en la solución intracelular con GABA lo que causó variaciones en el potencial de inversión dependientes de la concentración intracelular de GABA, lo que indica que la permeabilidad de GABA del canal Best1 es sustancial, aunque menor que la de  $\text{Cl}^-$ . Además, se analizó la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  del flujo de GABA midiendo la corriente (a  $-80$  mV) producida por diversas concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se encontró que el potencial de inversión de la corriente no varió en ninguna de las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que indica que la permeabilidad de GABA no se ve afectada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos autores demostraron también la inmunolocalización de GABA y Best1 en células gliales cerebelosas (Fig. 6C).

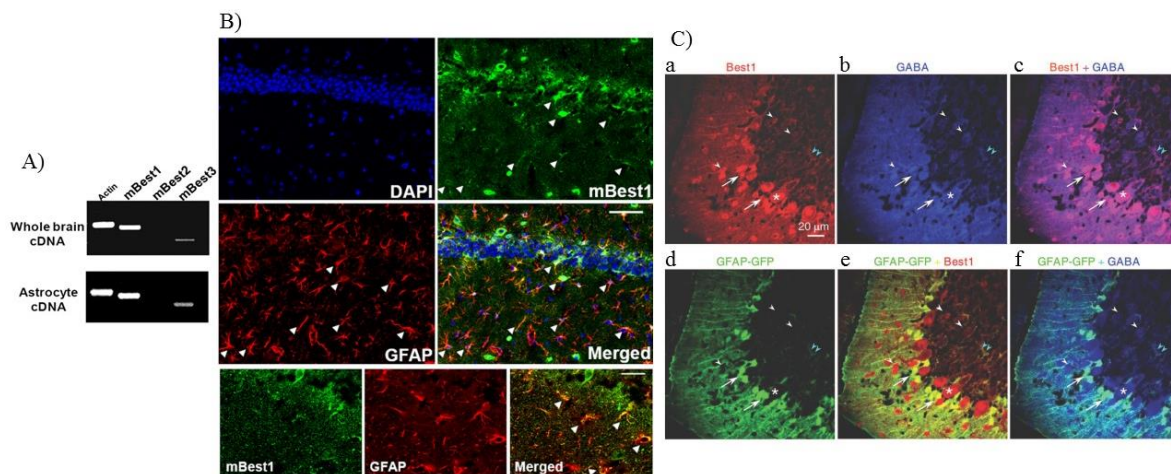


Fig. 6. Expresión del canal Best1 en astrocitos. A) Expresión de los genes de bestrofina de ratón (mBest1, mBest2 y mBest3) por *RT-PCR*. Se empleó cDNA de cerebro de ratón completo (cDNA de cerebro completo) o astrocitos cultivados (cDNA de astrocitos; Park *et al.*, 2009). B) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de mBest1 en células GFAP-positivas en la región del hipocampo CA1. Las puntas de flecha indican la colocalización de GFAP con mBest1, barra de escala, 50  $\mu\text{m}$ . Los paneles inferiores muestran el aumento de las imágenes de los paneles superiores, barra de escala, 10  $\mu\text{m}$  (Park *et al.*, 2009). C) Inmunotinción para Best1 (a), GABA (b) y GFP (d) en secciones de ratones transgénicos GFAP-GFP. Los pares de imágenes indicados se superponen en (c), (e) y (f). Best1 y GABA se coexpresaron en células de Purkinje (asterisco), interneuronas (puntas de flecha blancas), glía de Bergmann (flechas) y astrocitos lamelares (puntas de

flecha azul), pero no en células granulares. Todos los astrocitos positivos para GFP expresaron Best1 (E) y mostraron tinción de GABA (F; Lee *et al.*, 2010).

### Los somas de las neuronas sensoriales pueden sintetizar y liberar GABA

Más recientemente se ha propuesto que los somas de las neuronas sensoriales sintetizan y liberan GABA vesicular (Du *et al.*, 2017). Los autores muestran que las neuronas sensoriales expresan las enzimas que sintetizan GABA (Fig. 7).

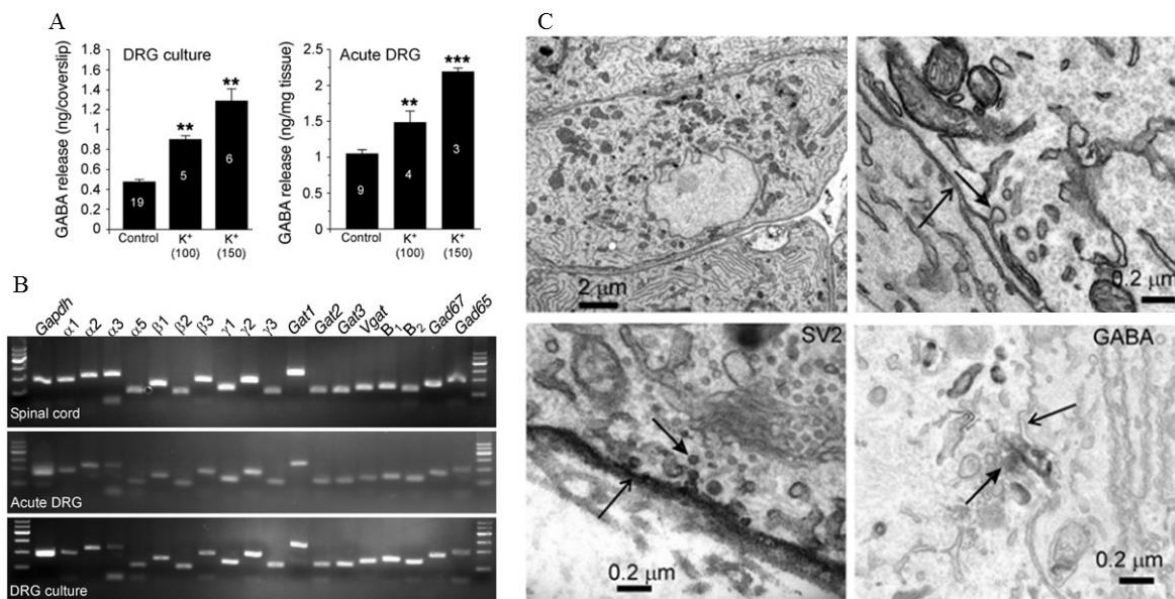


Fig. 7. Síntesis y liberación de GABA en las neuronas sensoriales. A) Liberación de GABA de cultivos celulares del GRD y de neuronas dissociadas del GRD. B) Expresión de genes involucrados en la síntesis de GABA por la vía neuronal y de las subunidades de RGABA<sub>A</sub> y RGABA<sub>B</sub>. C) Micrografías electrónicas de secciones del GRD. Superior izquierda, se muestran vesículas somáticas. Superior derecha, se puede ver una vesícula (flecha cerrada) fusionándose con la membrana (flecha abierta). Inferior izquierda, vesículas inmunorreactivas SV2 (marcador de vesículas sinápticas) (ejemplo indicado por la flecha cerrada) fusionándose con la membrana de la neurona (flecha abierta), que también es positiva para SV2. Abajo a la derecha, inmunoreactividad de GABA en vesículas (flecha cerrada). La flecha abierta indica la membrana neuronal (Du *et al.*, 2017).

## **El GABA se sintetiza por medio de una vía característica de las neuronas**

En las neuronas, la síntesis de GABA se produce a través de la  $\alpha$ -descarboxilación de L-glutamato por GAD, una reacción irreversible que depende de la disponibilidad del cofactor piridoxal-5 0-fosfato. Existen dos isoformas principales de GAD, una isoforma de 65 kDa (GAD65) y otra de 67 kDa (GAD67), de las que se hablará más adelante. El GABA puede encontrarse en la célula dentro de vesículas o en el citosol y ambos tipos son liberados por mecanismos diferentes (Soghomonian & Martin, 1998). Se ha reportado que GAD65 se localiza en el botón sináptico participando en la síntesis de GABA y su liberación ocurre a través de un mecanismo vesicular (Jin *et al.*, 2003), mientras que GAD67 media la síntesis de GABA citoplasmático (Soghomonian & Martin, 1998). Se sabe que los astrocitos son células GABAérgicas que expresan GAD-67 (Watanabe *et al.*, 2002).

Los niveles de GABA en la hendidura sináptica se regulan en parte por los astrocitos, ya que median el ciclo glutamato/GABA-glutamina (Fig. 8; Bak *et al.*, 2006). El GABA liberado en la terminal sináptica es capturado por los astrocitos a través del transportador de GABA (GAT) y se cataboliza a succinato por las enzimas mitocondriales GABA transaminasa (GABA-T) y succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH). El succinato posteriormente se convierte a glutamina (Gln) por la glutamina sintasa y la Gln se transporta a las neuronas donde se convierte en glutamato (Glu) a través de la acción de la glutaminasa activada por fosfato (PAG). Posteriormente, el GABA se sintetiza por la GAD a través del glutamato y se coloca en vesículas por el transportador vesicular de GABA (Vgat; Govindpani *et al.*, 2017).

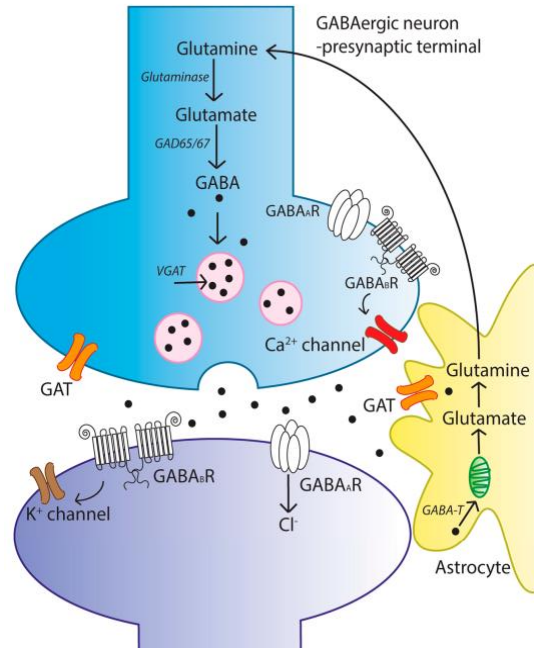


Fig. 8. Síntesis y liberación de GABA en las neuronas del SNC (Govindpani *et al.*, 2017).

### El GABA puede sintetizarse por vías alternativas

Yoon *et al.*, (2014) mostraron que en la glía el GABA puede ser sintetizado por la vía de degradación de la putrescina y que este proceso requiere de la enzima monoamina oxidasa B (MAOB). Las vías de síntesis de GABA a partir de putrescina comienzan con la desaminación de ésta por la diamina oxidasa (DAO) que lleva a la formación de GABA-aldehído para finalmente ser oxidada por la aldehído deshidrogenasa a GABA (Fig. 9, flechas verdes). Debido a que la actividad de la enzima diamina oxidasa (DAO) se ha encontrado únicamente en la periferia y no en el cerebro, las vías de síntesis de GABA a través de la putrescina son consideradas como exclusivas de tejidos periféricos (Watanabe *et al.*, 2002). No obstante, se ha calculado que la cantidad de GABA que puede ser sintetizada a través de la putrescina en el cerebro de ratones adultos es tan solo del 2 ó 3 %. En este trabajo se menciona que, en el cerebro en donde la actividad de la DAO es baja, la putrescina es acetilada a monoacetil-putrescina la cual después se convierte a GABA por la actividad de la monoamino oxidasa (MAO; Seiler, 1980) (véase Fig. 9).

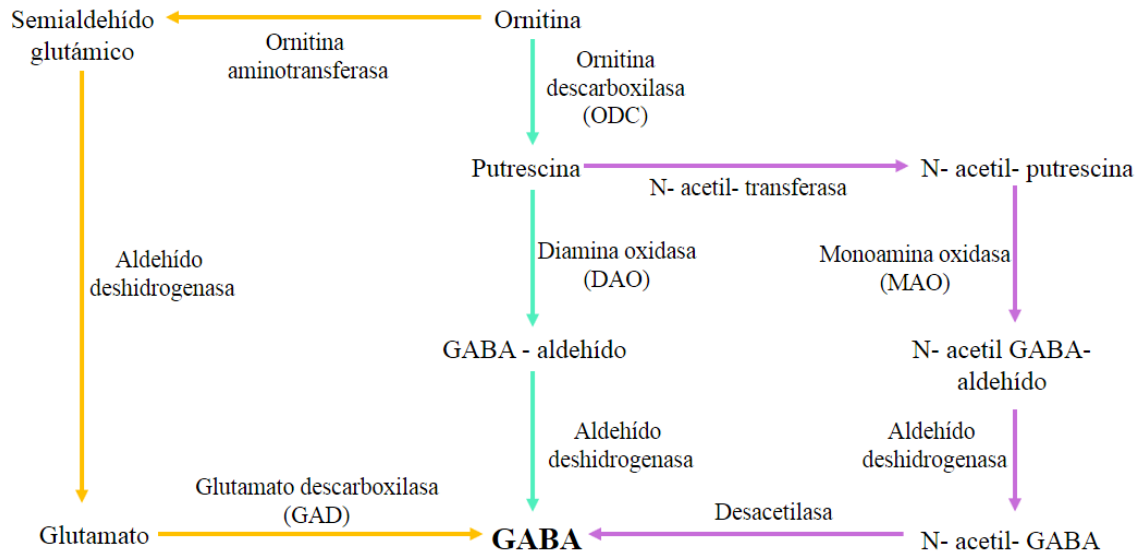


Fig. 9. Vía de síntesis de GABA a través de la ornitina y la putrescina (Watanabe *et al.*, 2002).

Otra vía de síntesis del GABA, es la del glutamato, en la cual se forma glutamato a partir de la ornitina y posteriormente el GABA es sintetizado del glutamato por la enzima GAD (Fig. 9, flechas amarillas). En mamíferos existen dos isoenzimas de GAD, la GAD65 y la GAD67, de 65 KDa y 67 KDa, respectivamente. Ambas son producidas por genes diferentes, el gen que codifica a GAD65 se encuentra en el cromosoma 10, mientras que el gen que codifica a GAD67 se encuentra localizado en el cromosoma 2 humano. GAD67 se expresa en el desarrollo embrionario mientras que GAD65 se expresa posteriormente, cuando se requiere de la neurotransmisión GABAérgica (Bender, 2012). GAD65 se localiza en las terminales nerviosas en donde forma complejo con el transportador de GABA (GABAT) vesicular y con otras proteínas necesarias para el empaquetamiento de GABA en vesículas sinápticas. Su principal función es la producción de GABA como un neurotransmisor (Watanabe *et al.*, 2002). GAD 67 se encuentra como proteína citoplasmática en neuronas y en tejidos no neuronales. Esta enzima sintetiza GABA como un neurotransmisor y como un factor trófico en la sinaptogénesis, para la derivación de GABA como en el ciclo de Krebs y como un regulador del potencial redox durante el estrés oxidativo (Bender, 2012). GAD67 es responsable de la síntesis de > 90 % de GABA (Watanabe *et al.*, 2002).

Ambas enzimas se regulan por fosforilación de forma distinta, GAD65 se activa por fosforilación catalizada por la proteína quinasa C mientras que GAD67 se inhibe por fosforilación catalizada por la proteína quinasa A (Bender, 2012).

## **Planteamiento del problema**

Los receptores extrasinápticos GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> se expresan a lo largo de la neurona sensorial regulando la excitabilidad celular y la liberación de transmisor, respectivamente. Sin embargo, se desconoce el origen del GABA que los activa. Existe una evidencia de que el soma de las neuronas sensoriales de ratas sintetiza y libera GABA vesicular. Por otro lado, se ha observado que la neurona sensorial no captura [<sup>3</sup>H]GABA, esto lo realiza únicamente la célula glial satelital tanto de la rata como de la tortuga. En particular, se ha comprobado que la célula glial satelital de tortuga es capaz de liberar [<sup>3</sup>H]GABA, en presencia de una concentración alta de K<sup>+</sup> de manera independiente del Ca<sup>2+</sup> extracelular, a través del canal de bestrofina1. Por lo tanto, existe una controversia sobre cuál de las dos células del GRD de los mamíferos es la que sintetiza y libera el GABA que activa los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> extrasinápticos que se expresan en los axones y somas de las neuronas sensoriales.

## **Hipótesis**

Las CGS presentes en el GRD de rata poseen la maquinaria molecular necesaria para la síntesis alterna de GABA y expresan la proteína Best1.

## **Objetivo general**

Evaluar la presencia del ARN, así como la inmunolocalización de las principales enzimas que participan en la síntesis alterna de GABA en el GRD de las ratas.

## **Objetivos particulares**

- Determinar la expresión genética de la maquinaria molecular que participa en la síntesis alterna y liberación de GABA.
- Localizar por inmunofluorescencia las células del GRD que expresan las proteínas involucradas en la síntesis y liberación de GABA, por la vía de la putrescina y Best1, respectivamente.



## **Método**

### **Animales**

Todos los experimentos se efectuaron con ratas Wistar macho de 200 -250 g. Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum* y fueron resguardados en condiciones de bioterio hasta el momento de la realización del experimento. Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (Cinvestav, Ciudad de México, México; Protocolo 0098-16).

### **Obtención de GRD**

Las ratas se decapitaron y se extrajeron los GRD lumbares 4, 5 y 6. Los GRD se procesaron de acuerdo con los procedimientos experimentales a realizar que se describen a continuación.

### **Expresión de genes involucrados en la síntesis y liberación de GABA**

La reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) es una técnica que permite obtener múltiples copias de una región determinada de ADN por medio de ADN polimerasa termoestable, Taq polimerasa y cebadores de ADN contra una región determinada del gen de interés. Para que la reacción se lleve a cabo se somete a ciclos de cambios de temperatura por tiempos determinados que permiten la síntesis del ADN.

La expresión del ARN del GRD se determinó por medio de *PCR* de punto final. El ARN total se extrajo de los GRD usando el reactivo TRIzol (15596026, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADNc, se utilizaron 5 µg de ARN de GRD y 2 µg de ARN de cerebro total y se sometieron a transcripción inversa con 1 µl de oligo-dT (500 µg / ml) y 1 µl (200 U) de la enzima RT del virus de la leucemia murina Moloney (No. 28025013, Invitrogen) en 20 µl de la mezcla de reacción a 37 ° C durante 1 h. La amplificación de ADNc se llevó a cabo mediante *PCR* en un volumen total de 50 µl, 3 µl de ADNc, 1 × tampón de *PCR* (Tris HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8,4), 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, MgCl<sub>2</sub>PBS 1,5 mM, 0.5 µM de cada cebador y 2.5 unidades de ADN polimerasa Taq (Invitrogen) en un termociclador de *PCR* (Thermo Fisher Scientific). Los cebadores oligonucleotídicos sintéticos utilizados para la

amplificación por *PCR* fueron diseñados con el software VectorNTI. *Actina* sentido 5'-AAGATGACCCAGATCATGTT-3' y antisentido 5'-GAGTACTTGCGCTCAGGAGG-3'. *Maob* de rata sentido 5'- ATGAGCAACAAATGCGATGT -3' y antisentido 5'-TCAACTTCATTCACCTTTATAGGTC-3'. *Aoc1* de rata sentido 5'-CAGACCCAGTACTCCCAGGA -3' y antisentido 5'-TGTAGAGGCTGCTGCTGTAG-3'. *Odc1* de rata sentido 5'- ATGGGCAGCTTTACTAAGGA -3' y antisentido 5'-TGTAGAGGCTGCTGCTGTAG -3'. *Vmd2* de rata sentido 5'-ATGACTATCACCTACACAAAC -3' y antisentido 5'-TAACATAGAAACCCAGAACG -3'. La reacción consistió en 30 ciclos de 94°C durante 45 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 1 min. Los productos de *PCR* se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 %, se tiñeron con bromuro de etidio y se analizaron bajo luz ultravioleta. La identidad del fragmento se confirmó mediante secuenciación automática.

### **Localización de las proteínas involucradas en la síntesis y liberación de GABA**

La inmunofluorescencia es una técnica que utiliza la especificidad de anticuerpos acoplados a marcadores fluorescentes por su antígeno y que al unirse permite la visualización de la distribución del mismo por medio de la marca fluorescente.

Para la obtención de las muestras que se procesaron para inmunofluorescencia, se perfundieron las ratas con *buffer* fosfato salino (PBS) frío durante 15 min aproximadamente y luego con 200 ml de paraformaldehído al 4% (PFA al 4%) frío, ambos fluidos se administraron por medio de una bomba peristáltica con un volumen de 3-8 ml/min.

Los GRD lumbares 4 a 6 se colocaron en PFA al 4% durante 24 h a 4°C. Después, los GRD se suspendieron en sacarosa al 10%, 20% y 30% en PBS durante 24 h a 4°C por cada concentración. A continuación, los GRD se lavaron tres veces con PBS en agitación durante 5 min cada uno y se permeabilizaron con tritón al 0.2% en PBS (PBS-T) durante 10 min. Nuevamente, se realizaron tres lavados con PBS, luego un lavado con SDS al 1% en PBS (PBS-SDS) por 5 min para después lavar tres veces más con PBS. Se bloqueó con albúmina sérica bovina libre de IgG al 5% en PBS-T (PBS-T-BSA) durante 30 min.

Seguido a ello, se marcaron los GRD con anti-NeuN (1:200); anti-Glutamina sintetasa (1:500); anti-Best-1 (1:50); anti-Monoamina oxidasa-B (1:1000); anti-Diamina oxidasa (1:1000) y anti-Ornitina decarboxilasa (1:1000) en PBS-T-BSA durante toda la noche a 4°C y se hicieron tres lavados con PBS. A continuación, se colocó *donkey* anti-*rabbit* Alexa-488 (1:200) o *sheep* anti-*mouse* Alexa-594 (1:200) por 1 h a 4°C PBS-T-BSA, se realizaron tres lavados con PBS y se montó el tejido en cubreobjetos. La especificidad de los anticuerpos se determinó por la inclusión de controles negativos para descartar la autofluorescencia o uniones no específicas de los anticuerpos. Las muestras se observaron por medio de un microscopio confocal (LEICA SP8).

## Resultados

Debido a que existe evidencia de que la producción de GABA glial se lleva a cabo por vías alternas de síntesis, se evaluó la presencia de las enzimas propuestas para la síntesis de GABA en el GRD. Se determinó la presencia de los genes que codifican a MAOB y ODC en el GRD y en el cerebro, este último como control de expresión (Fig. 10). Ambos genes están presentes en el GRD. El tamaño de la banda de *Maob* del GRD y de cerebro detectada en la electroforesis se encuentra entre los 200 y 300 pb, lo cual concuerda con el tamaño del gen amplificado (258 pb). Asimismo, el tamaño de la banda de *Odc1* del GRD y de cerebro detectada se encuentra también entre los 200 y 300 pb, lo que a su vez es consistente con el tamaño del gen amplificado (264 pb). La identidad molecular de estas bandas debe ser confirmada por medio del uso de herramientas genéticas como un análisis de restricción o por medio de secuenciación genética.

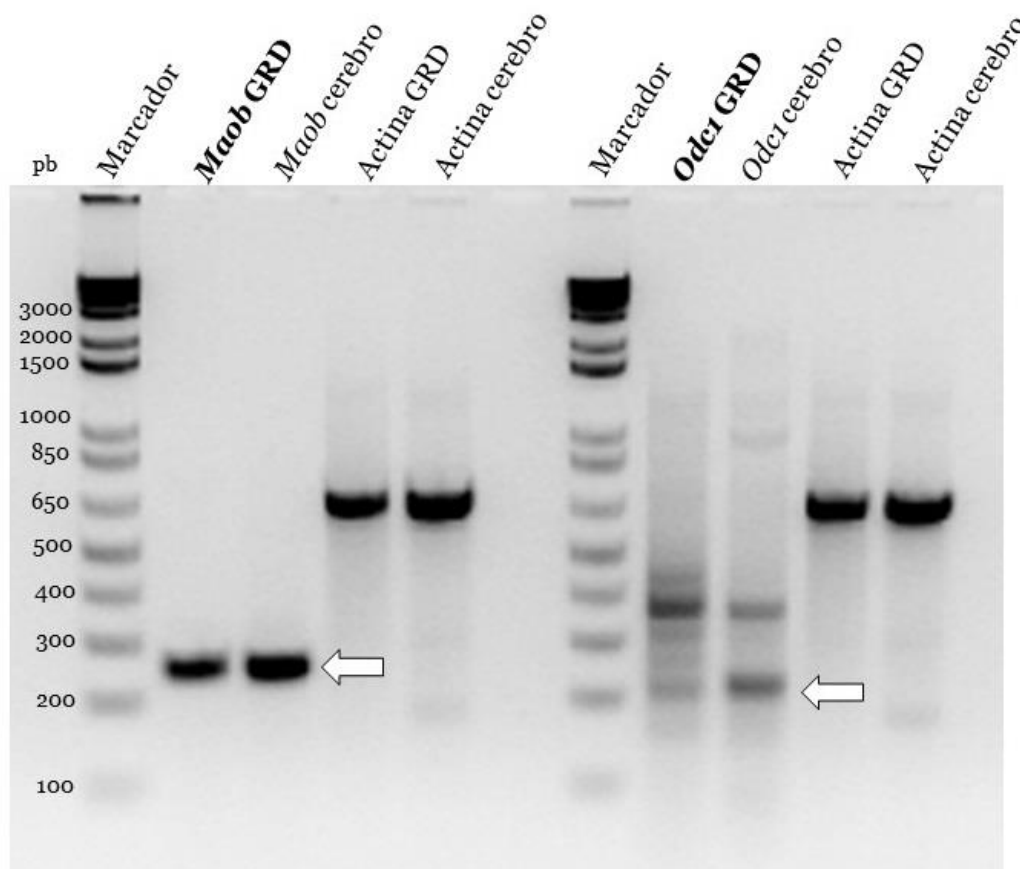


Fig. 10. Detección de genes que codifican a las proteínas involucradas en las vías de síntesis alterna de GABA en GRD y cerebro.

La ubicación celular de las moléculas involucradas en la síntesis alterna de GABA se realizó por medio de inmunolocalización. ODC se encontró en el soma de las neuronas marcadas con NeuN (Fig. 11). Esta enzima se localiza en el citoplasma de las neuronas del GRD. Es importante mencionar que el anticuerpo DAPI que marca núcleos se no se observa en los núcleos neuronales, por lo que se puede pensar que este anticuerpo indica la presencia de los núcleos de las células gliales. La marca del anticuerpo DAPI se observa alrededor de los somas neuronales marcados por NeuN y alrededor de la marca del anticuerpo ODC, con excepción de pocas células, por lo que se podría pensar que ODC solo se encuentra en el soma de las neuronas y no en las CGS que los rodean.

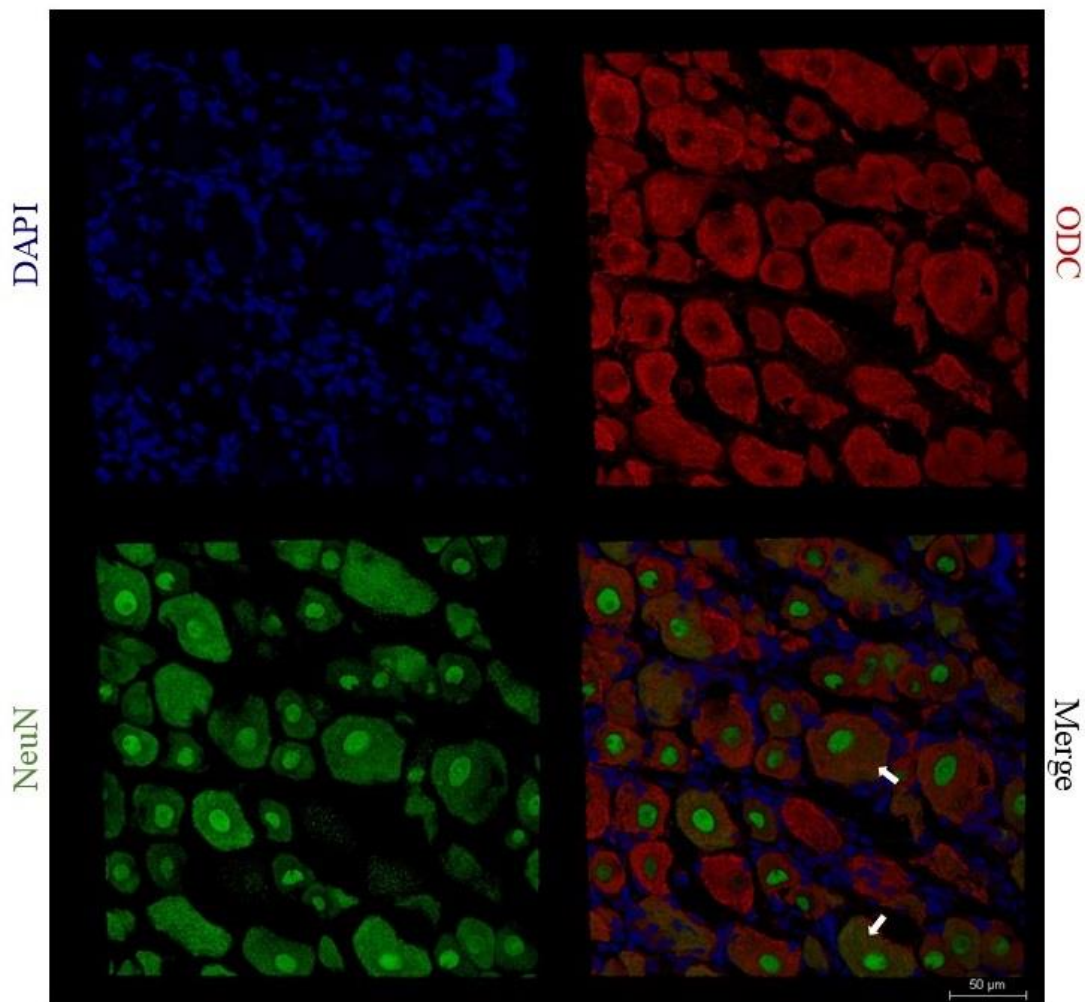


Fig. 11. Inmunolocalización de ODC en el GRD. La proteína ODC (rojo) parece encontrarse en el soma de las neuronas (verde) del GRD (flechas blancas). Con DAPI se marcaron los núcleos celulares (azul).

Por su parte, DAO se localizó en las CGS marcadas con glutamina sintetasa, una enzima característica de estas células (Fig. 12). Esta enzima se localiza en el citoplasma. En estas imágenes, la marca del anticuerpo DAPI que marca núcleos se observa en las células gliales marcadas con el anticuerpo glutamina sintetasa.

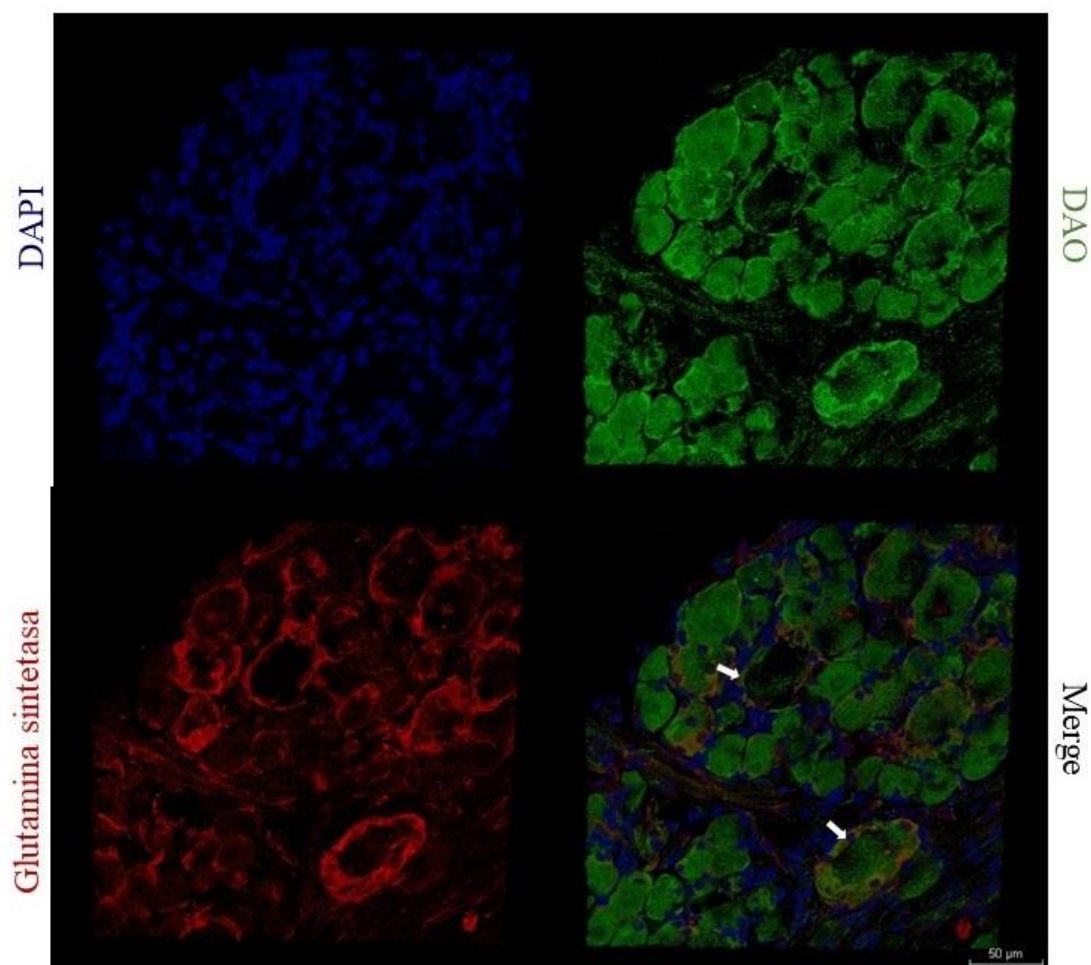


Fig. 12. Inmunolocalización de DAO en el GRD. DAO (verde) colocaliza con las CGS marcadas con glutamina sintetasa (rojo) indicado por las flechas blancas. Con DAPI se marcaron los núcleos celulares (azul).

Debido a la pandemia ocasionada por la enfermedad por coronavirus (*COVID 19*) causada por el coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave (*SARS-CoV-2*), los experimentos planteados en este trabajo no pudieron ser llevados a cabo en su totalidad. Los experimentos pendientes son la evaluación de los genes *Aoc1* y *Vmd2* por medio de

*PCR*, así como la validación de los resultados de los genes obtenidos por *PCR* por medio de secuenciación automática. Asimismo, faltan por realizar las inmunofluorescencias de MAOB y Best1 tanto en las neuronas como en las CGS, así como la inmunofluorescencia ODC en las CGS y de DAO en las neuronas. Además, queda pendiente la validación de los resultados obtenidos por inmunofluorescencia por medio de la utilización de siRNA contra los genes que codifican a las proteínas evaluadas.

## **Discusión**

El presente trabajo aporta evidencia inicial sobre de la presencia de las moléculas involucradas en la síntesis alterna de GABA en el GRD. Estas moléculas participan en la síntesis glial de GABA según lo reportado por trabajos previos (Lee *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2014).

### **El gen *Maob* está presente en el GRD**

A pesar de que en este trabajo se propuso evaluar la presencia de los RNAm de las moléculas que participan en la síntesis y liberación de GABA glial, fue posible identificar únicamente a *Maob* y *Odc1*, genes que codifican a MAOB y a ODC, respectivamente.

Se ha visto que la ausencia de MAOB por medio de silenciamiento genético con shRNA, un *knockout* de MAOB o por el tratamiento con el inhibidor de MAOB, seleginina, elimina las corrientes tónicas de GABA registradas en neuronas granulares de cerebelo y en neuronas espinosas medianas del estriado (Yoon *et al.*, 2014). La restauración de MAOB glial recupera las corrientes tónicas de GABA. Es posible que MAOB actúe de manera similar en el GRD, específicamente en la síntesis de GABA en las CGS (Fig.13). La participación de esta enzima en las neuronas sensoriales podría ser evaluada de manera similar a la propuesta en el trabajo anterior si no fuera porque en estas células no se ha observado la liberación de GABA con excepción del trabajo de Du *et al.*, 2017. Aunado a ello, en este último trabajo se muestra la posible síntesis y liberación vesicular en el soma de las neuronas del GRD, sin embargo, este hallazgo es contradictorio con a las autorradiografías publicadas por Schon & Kelly (1974a; 1974b) en las cuales el GABA se encuentra únicamente en las CGS y no en las neuronas.

### **El gen *Odc1* y la proteína ODC están presentes en el GRD**

Por otro lado, el gen *Odc1* fue encontrado en el GRD y por medio de inmunomarcaje se determinó su posible localización en el soma de las neuronas sensoriales. ODC cataliza la conversión de ornitina a putrescina, es posible que la función de esta enzima con respecto a la síntesis de GABA sea la producción de putrescina a partir de glutamato. Esto debido a que el glutamato podría ser reducido a glutamato- $\gamma$ -semi-aldehído utilizando ATP y NADPH y posteriormente ser aminado por la ornitina aminotransferasa para producir ornitina como sucede en el intestino delgado (Ross *et al.*, 1978; Henslee & Jones, 1982),



además de ello, las neuronas sensoriales son característicamente glutaminérgicas lo cual apoya la hipótesis anterior (Fig.13). Sin embargo, es necesario evaluar la presencia de ODC en las CGS, debido a que es posible que esta enzima se exprese también en estas células. Esto se realizará por medio de la inmunolocalización de ODC con glutamina sintetasa, enzima característica de las CGS.

### **La proteína DAO se expresa en las CGS**

De acuerdo con las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia, la enzima DAO se expresa en las CGS. Este hallazgo sugiere que la síntesis de GABA en las CGS podría llevarse a cabo a partir de la putrescina, debido a que DAO es la enzima encargada de convertir a la putrescina en GABA-aldehído y posteriormente a GABA por medio de la aldehído deshidrogenasa (Fig.13; Watanabe *et al.*, 2002). Seiler (1980) reportó que la putrescina en el cerebro del ratón se acetila y luego la monoamina oxidasa convierte la monoacetil-putrescina en GABA. En este trabajo se indicó que en el cerebro DAO tiene una actividad muy baja, sin embargo, se desconoce la actividad de esta enzima en el GRD. Una posibilidad podría ser que la actividad de MAOB en el cerebro sea realizada por DAO en el sistema nervioso periférico (SNP). Trabajos anteriores han reportado que en células en las que se ha visto la ausencia de GAD, la síntesis de GABA puede ser realizada por vías alternas en las que la putrescina es fundamental. Por ejemplo, por medio de inmunohistoquímica se demostró que las células de gastrina antropilóricas, en las cuales GAD no se detectó, producen GABA a través de la oxidación de putrescina catalizada por DAO (Hardt *et al.*, 2000).

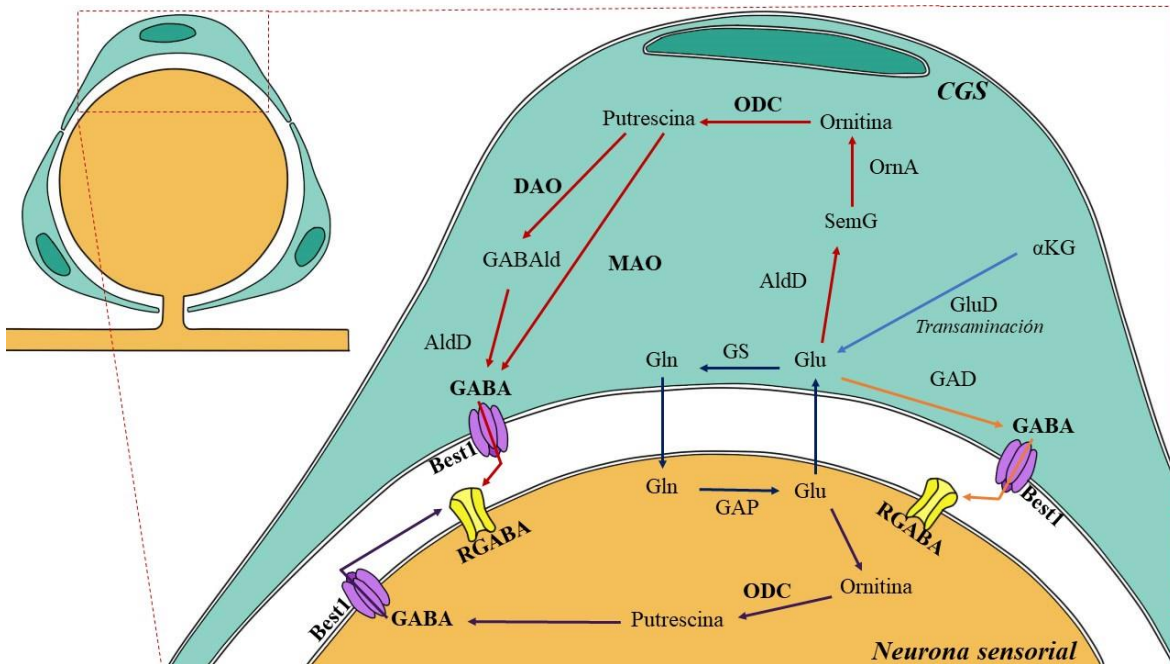


Fig.13. Posible mecanismo de síntesis de GABA en las CGS y en las neuronas con base en los resultados obtenidos en este trabajo y en investigaciones previas. Las abreviaturas usadas son las siguientes: Glutamato (Glu); Glutamina (Gln); Glutamina sintetasa (GS); Glutaminasa activada por fosfato (GAP); Glutamato deshidrogenasa (GluD); Aldehído deshidrogenasa (AldD); Semialdehído glutámico (SemG); Ornitina aminotransferasa (OrnA); GABA aldehído (GABAld);  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ KG).

La validación de los resultados obtenidos por inmunofluorescencia se puede llevar a cabo por medio de la detección de los antígenos a evaluar en modelos *knockout* de la proteína objetivo utilizando herramientas genéticas, como CRISPR o siRNA.

### **El GABA puede ser liberado por el canal Best1**

A pesar de que en este trabajo no se pudo determinar la presencia ni la localización del canal Best1 en el GRD, existen reportes en los que se demuestra que este canal interviene en la liberación de GABA glial (Lee *et al.*, 2010). Aunado a ello, también se ha señalado la expresión de Best1 en las neuronas sensoriales, en las cuales toma parte como un canal importante frente al daño axonal. Boudes *et al.*, en 2009 investigaron la corriente de  $\text{Cl}^-$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC) expresada en neuronas sensoriales adultas después de una lesión

nerviosa. Ellos encontraron que la lesión aumenta la expresión de Best1 en los GRD y que Best1 está implicado en la expresión de la CaCC inducida por lesiones en neuronas sensoriales. Este trabajo demuestra la expresión de Best1 en neuronas del GRD y que este participa en la regeneración nerviosa causada por axotomía.

Siendo así, evaluar la presencia y participación del canal Best1 en la liberación de GABA en el GRD podría señalar el origen celular de este neurotransmisor y permitir dilucidar las implicaciones fisiológicas del mismo.

### **Importancia del GABA en la glía del SN**

Asimismo, se ha visto que las células gliales son capaces de liberar GABA en el SNC y en el SNP. Además de las CGS en el SNP se encuentran otras células gliales, las células de Schwann, las cuales son responsables de la mielinización de los axones de las neuronas sensoriales. Estas células expresan al RGABA<sub>A</sub> (Faroni *et al.*, 2012) y al RGABA<sub>B</sub> (Magnaghi *et al.*, 2004; Corell *et al.*, 2014) al igual que en las CGS. El GABA es importante para las células de Schwann debido a que se ha visto que el RGABA<sub>B</sub> participa en la proliferación de las células de Schwann y en la mielinización (Corell *et al.*, 2014). Además, se piensa que el GABA, a partir del RGABA<sub>B</sub>, está involucrado en la regeneración axonal (Corell *et al.*, 2014). Corell *et al.*, en 2014 evaluaron la expresión y la participación de GABA y del RGABA<sub>B</sub> en la mielinización y en la regeneración de axones dañados. Ellos encontraron que tanto GABA como el RGABA<sub>B</sub> se expresan principalmente en células de Schwann no mielinizantes, que en los axones más mielinizados la expresión del RGABA<sub>B</sub>, de GABA y de GAD 65/67 disminuye y que el RGABA<sub>B</sub> se sobreexpresa en nervios degenerados, así como en el segmento distal del nervio ciático previamente seccionado. Estos resultados indican que tanto el RGABA<sub>B</sub>, GABA y GAD 65/67 intervienen en el proceso de mielinización y regeneración de los axones dañados. Es por ello por lo que el papel de las células de Schwann en la síntesis y liberación de GABA en el GRD debe ser considerado debido a que estas células también son capaces de almacenar GABA, aunque se desconoce si son capaces de sintetizarlo o si lo capturan del medio extracelular. Aunque a diferencia de las CGS, en las células de Schwann si se ha observado la presencia de GAD, sin embargo, no se ha evaluado si el GABA que contienen puede ser liberado y de ser así si es en cantidades suficientemente

altas como para activar a los receptores a GABA que se encuentran en las neuronas sensoriales.

Por su parte, se ha visto que en células progenitoras gliales O2A del nervio óptico en cultivo se lleva a cabo la síntesis de GABA a través de putrescina, en estas células no se encontró la expresión de GAD pero si se determinó el inmunomarcaje de GABA. Además, se mostró el incremento en la cantidad de GABA por HPLC cuando las células se colocaron en un medio enriquecido con putrescina (Barres *et al.*, 1990). Es posible que si GAD no se expresa en las CGS la síntesis de GABA pueda ser a través de este mecanismo.

### **¿El GABA se libera en las terminales axónicas de las neuronas sensoriales?**

A lo largo de las neuronas sensoriales se expresan receptores a GABA, sin embargo, hasta el momento no se sabe cuál es la fuente del neurotransmisor que activa a estos receptores. En el sistema nervioso central, la liberación neuronal de GABA es dependiente del  $Ca^{2+}$  extracelular y se realiza mediante vesículas que se fusionan con la membrana sináptica o mediante el GABAT (Storchak *et al.*, 2002). En el SNP, se ha visto que la liberación de GABA es independiente del  $Ca^{2+}$  extracelular y en cambio dependiente del  $Ca^{2+}$  intracelular (Vargas-Parada, 2012). Esto indica, que la liberación en el SNP no se realiza de manera convencional por medio de vesículas, debido a que la ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular no interviene en la liberación de  $[3H]GABA$  en el GRD de tortuga.

### **Papel del GABA presente en las neuronas sensoriales en el dolor neuropático**

En el SNP, el GABA tiene una participación relevante en procesos de dolor. Vit *et al.*, (2009) propusieron que el GABA producido por GAD65 transfectado mediante un adenovector reduciría el dolor en un modelo animal de dolor facial al actuar sobre los receptores de GABA en las neuronas del ganglio trigémino. La transfección produjo la expresión de GAD65 principalmente en las CGS y 6 días después hubo una disminución estadísticamente significativa del comportamiento del dolor en la prueba de formalina orofacial lo cual no se observó en las ratas control, este resultado llevó a los autores a concluir que la transfección de CGS en el ganglio del trigémino con el gen *GAD65* bloquea el comportamiento de dolor al actuar sobre los  $RGABA_A$  de las neuronas.

De igual manera, se han realizado investigaciones para determinar el papel de los receptores GABA<sub>A</sub> en el dolor. Particularmente, se encontró que el receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub>, el cual se encuentra implicado en el dolor neuropático causado por diabetes, modula en esta enfermedad la excitabilidad de las fibras aferentes primarias sin participar en la despolarización mediada por los receptores GABA<sub>A</sub> sinápticos. El receptor  $\alpha_5$ GABA<sub>A</sub> tiene un papel antinociceptivo en ratas sanas y, por el contrario, es pronociceptivo en ratas con dolor neuropático causado por diabetes e igualmente en estas últimas media la pérdida de la depresión dependiente de la frecuencia del reflejo de Hoffman (Hernández-Reyes *et al.*, 2019).

Asimismo, Du *et al.*, (2017) reportaron que la aplicación focal de GABA en el DRG reduce la transducción del dolor agudo *in vivo*. Estos autores administraron GABA, agonistas (muscimol y baclofén) y antagonistas (bicuculina) de los receptores GABA y bloqueadores de la recaptura de GABA directamente al GRD para investigar su influencia en la transmisión nociceptiva en un modelo *in vivo* en el que la sensación dolorosa se causó mediante la inyección en la pata trasera de rata del péptido inflamatorio nocivo bradiquinina (BK) o el agonista de TRPV1, capsaicina (CAP). La administración de GABA, muscimol, baclofén suprimió fuertemente el comportamiento nocifensivo inducido por la inyección ipsilateral de BK y CAP en la pata trasera. Aunado a ello, la infusión focal de GABA en el DRG alivió el dolor crónico *in vivo*. La administración de GABA en el GRD atenuó significativamente la hiperalgesia mecánica (A) y térmica (B) producida por la inyección plantar de Freund's Complete Adjuvant (CFA) y por lesión por constricción crónica (CCI) a un nervio ciático. Estos resultados sugieren que no solo el dolor agudo sino también el dolor crónico puede atenuarse mediante la focalización del sistema GABA en el DRG.

A pesar de la relevancia del GABA en el dolor en el SNP aún se desconoce su origen celular y con ello su mecanismo de síntesis.

En resumen, los resultados preliminares de este trabajo muestran que los genes *Maob* y *Odc1* se expresan en el GRD. Además, ODC se localiza en las neuronas sensoriales mientras que DAO se expresa en las CGS. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para confirmar estos resultados.

## **Perspectivas**

Se sugiere determinar la participación de las enzimas de la síntesis alterna de GABA en su liberación en el GRD de mamífero para así determinar si la presencia del GABA extracelular se da a través de este proceso y no por liberación vesicular.

Asimismo se recomienda llevar a cabo el protocolo de carga y liberación de [<sup>3</sup>H]GABA por despolarización causada por altas concentraciones de K<sup>+</sup> en el GRD de mamífero, así como la dependencia al Ca<sup>2+</sup> de dicha liberación, esto con el objetivo de conocer si este proceso también se lleva a cabo de la misma manera en mamíferos como ocurre en tortuga.

Inclusive se propone investigar la participación del canal Best-1 en la liberación de [<sup>3</sup>H]GABA en el GRD de mamífero de manera que se determine si este canal permite la liberación de GABA en el medio extracelular el cual activa a los receptores a GABA en la neurona sensorial.

## Bibliografía

- Alvarez-Leefmans, F., Nani, A., & Márquez, S. (1998). Chloride transport osmotic balance and presynaptic inhibition. En P. Rudomin, R. Romo , & L. Mendell, *Presynaptic inhibition and neural control* (págs. 50-79). New York: Oxford University Press.
- Bak, L., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*, 98, 641–653. doi:10.1111 / j.1471-4159.2006.03913.x
- Barres , B., Koroshetz, W., Swartz , K., Chun , L., & Corey , D. (1990). Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron*, 4(4), 507-524. doi:10.1016/0896-6273(90)90109-s
- Bautista, W., Aguilar, J., Loeza-Alcocer, J., & Delgado-Lezama, R. (2010). Pre- and postsynaptic modulation of monosynaptic reflexby GABAA receptors on turtle spinal cord. *Journal of Physiology*, 588, 2621–2631. doi:10.1113/jphysiol.2010.188979
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2006). *Neuroscience: Exploring the Brain* (3ra ed.). Lippincott Williams y Wilkin.
- Bender, D. A. (2012). *Amino Acid Metabolism* (Third Edition ed.). John Wiley & Sons. doi:10.1002/9781118357514
- Boudes, M., Sar, C., Menigoz, A., Hilaire, C., Pequignot, M., Kozlenkov, A., Marmorstein, A., Carroll, P., Valmier, J., Scamps, F. (2009). Best1 Is a Gene Regulated by Nerve Injury and Required for Ca<sup>2+</sup> -Activated Cl<sup>-</sup> Current Expression in Axotomized Sensory Neurons. *Journal of Neuroscience*, 29(32), 10063–10071. doi:10.1523/jneurosci.1312-09.2009
- Bowery, N., & Brown, D. (1972).  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Uptake by Sympathetic Ganglia. *Nature New Biology*, 238, 89–91. doi:doi.org/10.1038/newbio238089a0

- Bowery, N., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J., Marshall, F., Raiteri, M., Bonner, T. I., Enna, S. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian  $\gamma$ -Aminobutyric Acid B Receptors: Structure and Function. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 247-264.
- Bravo-Hernández, M., Corleto, J., Barragán-Iglesias, P., González-Ramírez, R., Pineda-Farias, J., Felix, R., . . . Granados-Soto, V. (2016). The  $\alpha 5$  subunit-containing GABA A receptors contribute to. *Pain*, 157(3), 613–626. doi:10.1097/j.pain.0000000000000410
- Caspary, T., & Anderson, K. (2003). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), 289-297. doi:10.1038/nrn1073
- Corell, M., Wicher, G., Radomska, K., Dağlıkoca, E., Godskesen, R., Fredriksson, R., & Svenningsen, A. (2014). GABA and Its B-Receptor Are Present at the Node of Ranvier in a Small Population of Sensory Fibers, Implicating a Role in Myelination. *Journal of Neuroscience Research*, 93(2), 285–295. doi:10.1002/jnr.23489
- Du, X., Hao, H., Yang, Y., Huang, S., Wang, C., Gigout, S., Ramli, R., Li, X., Jaworska, E., Edwards, I., Deuchars, J., Yanagawa, Y., Qi, J., Guan, B., Jaffe, D. B., Zhang, H., Gamper, N. (2017). Local GABAergic signaling within sensory ganglia controls peripheral nociceptive transmission. *Journal of Clinical Investigation*, 127(5), 1741-1756. doi:10.1172 / JCI86812
- Eliot, L., Kandel, E., Siegelbaum, S., & Blumenfeld, H. (1993). Imaging terminals of Aplysia sensory neurons demonstrates role of enhanced  $Ca^{2+}$  influx in presynaptic facilitation. *Nature*, 361, 634–637. doi:10.1038/361634a0
- Faroni, A., Terenghi, G., & Magnaghi, V. (2012). Expression of Functional  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A Receptors in Schwann-like Adult Stem Cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 47(3), 619-630. doi:10.1007/s12031-011-9698-9
- Gottesfeld, Z., Kelly, J., & Schon, F. (1973). Uptake of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by sensory root ganglia. *British Journal of Pharmacology*, 3(47), 640.



- Govindpani, K., Calvo-Flores Guzmán, B., Vinnakota, C., Waldvogel, H., Faull, R., & Kwakowsky, A. (2017). Towards a Better Understanding of GABAergic Remodeling in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), E1813. doi:10.3390 / ijms18081813.
- Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Research Reviews*, 48(3), 457–476. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.09.001
- Hardt, J., Larsson, L., & Hougaard, D. (2000). Immunocytochemical evidence suggesting that diamine oxidase catalyzes biosynthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid in antropyloric gastrin cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48, 839-846. doi:10.1177/002215540004800612
- Henslee, J., & Jones, M. (1982). Ornithine synthesis from glutamate in rat small intestinal mucosa. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 219, 186–197. doi:10.1016/0003-9861(82)90148-5
- Hernández-Reyes, J. E., Salinas-Abarca, A., Vidal-Cantú, G. C., Raya-Tafolla, G., Elias-Viñas, D., Granados-Soto, V., & Delgado-Lezama, R. (2019).  $\alpha 5$ GABAA receptors play a pronociceptive role and avoid the rate-dependent depression of the Hoffmann reflex in diabetic neuropathic pain and reduce primary afferent excitability. *Pain*, 160(6), 1448–1458. doi:10.1097/j.pain.0000000000001515
- Hösli, E., Ljungdahl, Å., Hökfelt, T., & Hösli, L. (1972). Spinal cord tissue cultures—a model for autoradiographic studies on uptake of putative neurotransmitters such as glycine and GABA. *Experientia*, 28(11), 1342–1344. doi:10.1007/BF01965334
- Jin, H., Wu, H., Osterhaus, G., Wei, J., Davis, K., Sha, D., Floor, E., Hsu, C. C., Kopke, R. D., Wu, J. Y. (2003). Demonstration of functional coupling between  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4293–4298. doi:10.1073 / pnas.0730698100
- Johnson, A., Guziewicz, K., Lee, C., Kalathar, R., Pulido, J., Marmorstein, L., & Marmorstein, A. (2017). Bestrophin 1 and Retinal Disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 58, 45–69. doi:doi:10.1016/j.preteyeres.2017.01.006

- Lee, S., Yoon, B., Berglund, K., Oh, S., Park, H., Shin, H. S., Augustine, G. J., Lee, C. (2010). Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science*, *330*(6005), 790-796. doi:10.1126/science.1184334
- Loeza-Alcocer, E., Canto-Bustos, M., Aguilar, J., González-Ramírez, R., Felix, R., & Delgado-Lezama, R. (2013).  $\alpha$ 5GABAA receptors mediate primary afferent fiber tonic excitability in the turtle spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, *110*, 2175–2184. doi:10.1152/jn.00330.2013
- Magnaghi, V., Ballabio, M., Cavarretta, I., Froestl, W., Lambert, J., Zucchi, I., & Melcangi, R. (2004). GABAB receptors in Schwann cells influence proliferation and myelin protein expression. *European Journal of Neuroscience*, *19*(10), 2641–2649. doi:10.1111/j.0953-816x.2004.03368.x
- Minchin, M., & Iversen, L. (1974). Release of [ $^3$ H]gamma-aminobutyric acid from glial cells in rat dorsal root ganglia. *Journal of Neurochemistry*, *23*, 533-540. doi:10.1111/j.1471-4159.1974.tb06056.x
- Neal, M., & Iversen, L. (1972). Autoradiographic localization of  $^3$ H-GABA in rat retina. *Nature New Biology*(235), 217–218. doi:10.1038/newbio235217a0
- Oh, S., & Lee, C. (2017). Distribution and Function of the Bestrophin-1 (Best1) Channel in the Brain. *Experimental Neurobiology*, *26*(3), 113-121. doi:10.5607/en.2017.26.3.113
- Pannese, E., Ledda, M., Cherkas, P., Huang, T., & Hanani, M. (2003). Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: Increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. *Anatomy and Embryology*, *206*(5), 337–347. doi:10.1007/s00429-002-0301-6
- Park, H., Oh, S. J., Han, K. S., Woo, D. H., Park, H., Mannaioni, G., Traynelis, S. F., Lee, C. J. (2009). Bestrophin-1 encodes for the  $Ca^{2+}$ -activated anion channel in hippocampal astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, *27*(41), 13063- 13073. doi:10.1523 / JNEUROSCI.3193-09.2009

- Peshori , K., Collins, W., & Mendell, L. (1998). EPSP Amplitude Modulation at the Rat Ia-alpha Motoneuron Synapse: Effects of GABAB Receptor Agonists and Antagonists. *Journal of Neurophysiology*, 79(1), 181-189. doi:10.1152/jn.1998.79.1.181
- Ross, G., Dunn, D., & Jones , M. (1978). Ornithine synthesis from glutamate in rat intestinal mucosa homogenates: Evidence for the reduction of glutamate to gamma-glutamyl semialdehyde. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 85, 140–147. doi:10.1016/S0006-291X(78)80021-7
- Rudomin, P., & Schmidt, R. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Experimental Brain Research*, 129(1), 1-37. doi:10.1007/s002210050933.
- Schon, F., & Kelly, J. S. (1974a). Autoradiographic localisation of [3H]GABA and [3H]glutamate over satellite glial cells. *Brain Research*, 66, 275-288. doi:10.1016/0006-8993(74)90146-2
- Schon, F., & Kelly, J. S. (1974b). The characterisation of [3H]GABA uptake into the satellite glial cells of rat sensory ganglia. *Brain Research*, 66, 289-300. doi:10.1016/0006-8993(74)90147-4
- Seiler, N. (1980). On the role of GABA in vertebrate polyamine metabolism. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, 12, 411-429.
- Soghomonian, J., & Martin, D. (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: Why? *Trends in Pharmacological Sciences*, 19, 500–505. doi:10.1016/S0165-6147(98)01270-X
- Storchak, L. T. (2002). Ca<sup>2+</sup> -Dependent and Ca<sup>2+</sup> -Independent [3H]GABA Release from Rat Brain Synaptosomes: The Effect of Temperature. *Neurophysiology*, 34(5), 321-325. doi:10.1023/a:1023015517282
- Vaisey, G., Miller, A., & Long, S. (2016). Distinct regions that control ion selectivity and calcium-dependent activation in the bestrophin ion channel. *PNAS*, 113, E7399–E7408. doi:10.1073/pnas.1614688113

- Vargas-Parada, A. (2012). *Mecanismos de liberación de GABA por células gliales del ganglio de la raíz dorsal. Tesis de maestría*. Ciudad de México, México.: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Vit, J., Ohara, P., Sundberg, C., Rubi, B., Maechler, P., Liu, C., Puntel, M., Lowenstein, P., Castro, M., Jasmin, L. (2009). Adenovector GAD65 gene delivery into the rat trigeminal ganglion produces orofacial analgesia. *Molecular pain*, 5, 42. doi:10.1186/1744-8069-5-42
- Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., & Tamayama, T. &. (2002). GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs . *International Review of Cyrology*, 213, 1-47. doi:10.1016/S0074-7696(02)13011-7
- Yoon, B., Woo, J., Chun, Y., Chun, H., Jo, S., Bae, J., An, H., Min, J., Oh, S., Han, K. S., Kim, H., Kim, T., Kim, Y., Bae, Y., Lee, C. (2014). Glial GABA, synthesized by monoamine oxidase B, mediates tonic inhibition. *The Journal of physiology*, 592(22), 4951–4968. doi:10.1113/jphysiol.2014.278754



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

05 de agosto de 2020

**Arq. Hugo Flores Félix**  
**Subdirector de Posgrado**  
**Presente.**

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado para la tesis de maestría titulada: “Componentes de la síntesis alterna de GABA en el ganglio de la raíz dorsal de mamífero”, hacemos de su conocimiento que hemos revisado y aprobado la versión final de esta tesis, misma que el sustentante Jiménez Barrios Natalie entregará a la Secretaría Académica.

Sin más por el momento, le saludamos

**Atentamente**

**Dr. José Rodolfo Delgado Lezama**

**Dr. Benjamín Florán Garduño**

**Dr. Ismael Jiménez Estrada**

**Dr. Ricardo Félix Grijalva**

**Dr. Marcos Nahmad Bensusan**  
**Coordinador Académico del Departamento de**  
**Fisiología, Biofísica y Neurociencias**