



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL**

Sede Sur

Departamento de Farmacobiología

**Maestría en Neurofarmacología y
Terapéutica Experimental**

**Estimulación del proceso de diferenciación de células progenitoras
neurales por análogos estructurales de taurina**

Tesis que presenta

Med. Cir. Eva Marcela Solares Rioja

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En

**Neurofarmacología y Terapéutica
Experimental**

Directores de la tesis

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

Dr. Lenin David Ochoa de la Paz

Ciudad de México

Agosto, 2023

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 5 en el Centro de Investigación sobre el Envejecimiento del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a nombre del Dr. Emilio J. Galván y del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular de la Glía Unidad de Investigación UNAM-APEC. Asociación para Evitar la Ceguera en México I.A.P.

Agradecimientos

A mi director de tesis, el Dr. Emilio Galván Espinosa, gracias por la confianza y la oportunidad de formar parte del proyecto, por las enseñanzas, el apoyo y la paciencia durante mi proceso de formación. Gracias al Dr. Lenin Ochoa de la Paz por la oportunidad de llevar a cabo un proyecto nuevo, por la confianza y por formar esta productiva cotutoría.

A mi comité sinodal, formado por la Dra. Mónica Lamas y la Dra. Mónica Díaz. Por su tiempo, las preguntas y recomendaciones en cada avance, que enriquecieron la investigación.

A la Dra. Claudia González, por su tiempo y dedicación en la clase de análisis de resultados. Sus comentarios y observaciones sin duda hicieron que expandiera mi visión e interés acerca del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, por acogerme, apoyarme y enseñarme al llegar al laboratorio y durante toda la maestría. A nuestro técnico de laboratorio, Juanito, por su valioso apoyo y amistad. A Estefanía Gutiérrez, mi compañera y amiga de laboratorio, por compartirme su conocimiento siempre de una forma amable y paciente, por apoyarme y preocuparse en que el proyecto avanzara de manera adecuada.

A mis compañeros y amigos de la generación de maestría, por siempre mostrar un gran compañerismo y amistad. Gracias a Palmira, Diana y Juli, por apoyarme, motivarme y darme su amistad.

A mis amigos de toda la vida, que han estado siempre presentes, apoyándome y cuidándome en cada paso.

A las instituciones que hicieron posible este proyecto y apoyaron mi desarrollo, al CONAHCYT, al CINVESTAV y a la UNAM.

A mi hermosa y amada familia. A mis hermanos, Gaby, Marissa Armando y Orfeito por su apoyo y amor en todo momento. A mis sobrinos por siempre ser mis cómplices. A mi tía Angelina Rioja, por ser un apoyo invaluable para la familia.

Agradezco profundamente a mi papá, que, aunque ya no se encuentra presente en esta vida, su amor infinito siempre está conmigo y me acompaña cada día. A mi mamá, por ser mi más grande pilar en la vida, por ser mi más grande fan y creer en mí siempre, por amarme y apoyarme, toda la vida incondicionalmente.

A Marco, por ser un gran compañero de vida y el mejor equipo, por apoyarme y motivarme siempre a alcanzar mis sueños, por amarme, creer en mí e impulsarme a dar lo mejor.

Lista de abreviaturas

BBB (por sus siglas en inglés): Barrera hematoencefálica

BLBP (por sus siglas en inglés): proteína de unión a lípidos del cerebro

BrdU: Bromodesoxiuridina

CRMP4 (por sus siglas en inglés): Proteína 4 mediadora de respuesta a colapsina

DCX: Doblecortina

GD: Giro dentado

GFAP (por sus siglas en inglés): Proteína ácida fibrilar glial

HPA: Hipotálamo-pituitario-suprarrenal.

MMS (por sus siglas en inglés): Corriente migratoria medial

NPC (por sus siglas en inglés): Células Precursoras Neurales

NPC-SVZ (por sus siglas en inglés): Células progenitoras neurales de la Zona Subventricular

PSA-NCAM: Molécula de adhesión de células neurales

RGL (por sus siglas en inglés): Células derivadas de la glía radial

RMS (por sus siglas en inglés): Vía de migración rostral

RNS (por sus siglas en inglés): Especies reactivas de nitrógeno

ROS (por sus siglas en inglés): Especies reactivas de oxígeno

SGZ (por sus siglas en inglés): Zona subgranular

SVZ (por sus siglas en inglés): Zona Subventricular

TauCl: Taurina cloramina

VGCC (por sus siglas en inglés): Canales de calcio dependientes de voltaje

índice

Lista de abreviaturas.....	v
Lista de figuras y tablas	viii
Resumen	x
Abstract	xi
1. Introducción	1
1.1 Historia de la neurogénesis	1
1.2 Nichos neurogénicos.....	5
1.3 Neurogénesis en hipocampo.....	7
1.4 Neurogénesis en la zona subventricular.....	9
1.5 Taurina	12
1.5.1 Generalidades	12
1.5.2 Funciones.....	13
1.5.2.1 Función antioxidante	14
1.5.2.2 Función en la homeostasis del calcio	17
1.5.2.3 Función como osmoregulador	17
1.5.2.4 Función como neuroprotector.....	18
1.5.2.5 Taurina en los procesos neurogénicos.....	18
1.6 Transporte de taurina	20
1.7 Análogos estructurales de taurina.....	21
1.7.1 Homotaurina.....	21
1.7.2 Hipotaurina.....	23
1.7.3 Evidencias de los análogos estructurales de taurina en procesos neurogénicos ..	24
2. Justificación	24
3. Hipótesis.....	25
4. Objetivos.....	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. Metodología	25
5.1 Animales y diseño experimental	25
5.2 Cultivo celular primario	25
5.3 Ensayo de diferenciación celular de NPC-SVZ.....	26
5.4 Ensayos de inmunofluorescencia	27
5.5 Análisis cuantitativo de marcadores celulares	27

5.6. Análisis morfométrico de células DCX positivas	28
6. Análisis Estadístico	28
7. Resultados.....	29
7.1. Caracterización de neuroesferas derivadas de NPC SVZ	29
7.2. Expresión de marcadores celulares en NPC SVZ expuestas a	31
taurina, homotaurina e hipotaurina	31
7.3. Análisis morfométrico de células DCX positivas	35
8. Discusión	41
9. Conclusión	45
10. Perspectivas	46
11. Referencias.....	47

Lista de figuras y tablas

Introducción

Figura 1. Historia de la neurogénesis

Figura 2. Nichos neurogénicos

Figura 3. Corte coronal de la SGZ

Figura 4. Localización de los tipos celulares en la SGZ

Figura 5. Esquema representativo de la SVZ de ratón

Figura 6. Representación de la migración celular a través de la vía de migración rostral

Figura 7. Progresión en el linaje de las células de la SVZ

Figura 8. Vía de síntesis de la taurina

Figura 9. Representación del daño oxidativo

Figura 10. Comparación de la morfología neuronal

Figura 11. Representación de los mecanismos de internalización de taurina

Resultados

Figura 1. Modelo de obtención de neuroesferas

Figura 2. Neuroesferas primarias y secundarias obtenidas de NPCs-SVZ

Figura 3. Porcentaje de NPCs-SVZ diferenciadas en neuronas

Figura 4. Porcentaje de NPCs-SVZ diferenciadas en astrocitos

Figura 5. Análisis morfométrico de células DCX positivas expuestas a taurina

Figura 6. Análisis morfométrico de células DCX positivas expuestas a homotaurina

Figura 7. Análisis morfométrico de células DCX positivas expuestas a hipotaurina

Figura 8. Resumen del análisis de los análisis de Sholl

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 5 en el Centro de Investigación sobre el Envejecimiento del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a nombre del Dr. Emilio J. Galván y del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular de la Glía Unidad de Investigación UNAM-APEC. Asociación para Evitar la Ceguera en México I.A.P.

Resumen

Dada la relevancia de procesos fisiológicos como la senescencia, la neurogénesis continúa generando un interés considerable, y la posibilidad de regular el proceso neurogénico con compuestos relevantes para la neurodegeneración y el envejecimiento resulta un esfuerzo atractivo para la neurociencia. La taurina es un ácido sulfónico no esencial ampliamente distribuido en el sistema nervioso central, involucrado en múltiples procesos fisiológicos, incluida la diferenciación neuronal. Sin embargo, el papel de los homólogos de taurina, incluidas la homotaurina y la hipotaurina, en la diferenciación neuronal y neurogénesis es prácticamente desconocido.

En este trabajo de tesis demostramos los efectos de la homotaurina y la hipotaurina en la diferenciación neuronal. Se utilizaron ratones CD1 de 6 días de edad para obtener células progenitoras neuronales (NPC o *neural precursor cells* por sus siglas en inglés) de la zona subventricular (SVZ o *subventricular zone* por sus siglas en inglés). Se obtuvieron cultivos de neuroesferas de NPC-SVZ y se trataron con homotaurina (2.5 mM) o hipotaurina (10 mM). Se utilizaron ensayos de inmunofluorescencia y análisis morfométricos para evaluar la capacidad de estos análogos de taurina en la inducción de la diferenciación neuronal. Los ensayos de inmunofluorescencia revelaron que la homotaurina y la hipotaurina aumentan el número de células doblecortina positivas (neuronas inmaduras), en comparación con el grupo de control. El análisis morfométrico reveló que ambos análogos promueven la complejidad neuronal, aumentando el número de ramificaciones dendríticas. Este trabajo proporciona evidencia experimental de que los análogos de taurina son promotores de la diferenciación neuronal.

Abstract

Given the relevance of physiological processes such as senescence, neurogenesis continues to garner considerable interest, and the possibility of regulating the neurogenic process with compounds relevant to neurodegeneration and aging is an engaging endeavor for neuroscience. Taurine is a non-essential amino sulfonic acid widely distributed in the central nervous system, involved in multiple physiological processes, including neuronal differentiation. However, the role of the taurine homologs, including homotaurine and hypotaurine in the process of neuronal differentiation and neurogenesis is virtually unknown.

Here we show the effects of homotaurine and hypotaurine on the neuronal differentiation process. 6-day-old CD1 mice were used to obtain neuronal progenitor cells (NPC) from the subventricular zone (SVZ). Neurosphere cultures were obtained from NPC-SVZ and stimulated with homotaurine (2.5 mM) or hypotaurine (10 mM). Immunofluorescence assays and morphometric analyses were used to evaluate neuronal differentiation. Immunofluorescence assays revealed that homotaurine and hypotaurine increase the number of doublecortin-positive cells (immature neurons), compared to the control group. A morphometric analysis revealed that both analogs promote neuronal complexity, increasing the number of dendritic ramifications. This work provides experimental evidence that taurine analogs are promoters of neuronal differentiation.

1. Introducción

En los años precedentes a 1990, la idea de que el cerebro no incorporaba neuronas de nueva generación era un pensamiento ampliamente aceptado. Sin embargo, las investigaciones continuas en este campo determinaron la presencia de un proceso neurogénico activo en animales superiores, incluyendo los mamíferos, lo que permitió postular que el cerebro es un órgano con plasticidad y capacidad regenerativa. Desde entonces el interés en la neurogénesis sigue en aumento, dada su relevancia en diversos procesos fisiológicos como el envejecimiento. Por otro lado, la posibilidad de regular el proceso neurogénico con nuevos compuestos con potencial para actuar sobre blancos terapéuticos en enfermedades asociadas a la edad o procesos neurodegenerativos, trastornos neuropsiquiátricos o lesiones nerviosas, es un tema central de la terapéutica experimental.

1.1 Historia de la neurogénesis

La neurogénesis es el proceso de formación de nuevas neuronas en el cerebro y es fundamental para el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central a lo largo de la vida. A pesar de que la neurogénesis se ha estudiado por mucho tiempo, no fue hasta finales del siglo XX que el proceso pudo esclarecerse de una mejor manera. Los primeros estudios de neurogénesis fueron realizados por el pionero científico español Santiago Ramón y Cajal a finales del siglo XIX. En uno de sus postulados, Ramón y Cajal estableció que *“En el adulto, las vías nerviosas son algo fijo, terminado e inmutable. Todo puede morir, nada puede regenerarse”*, sin embargo, en este mismo escrito dejó claro que correspondía a las nuevas generaciones cambiar ese “cruel” decreto. Esto fue así, pues con el paso del tiempo, el interés en este campo fue incrementando, con investigaciones cuyos resultados han sido de gran importancia en el entendimiento de este proceso [20, 31].

A principios del siglo XX, investigadores comenzaron a estudiar a detalle el proceso de neurogénesis. A través de su investigación, el científico estadounidense Joseph Altman demostró que los mamíferos adultos podían generar nuevas neuronas en

sus cerebros. En 1962 Altman publicó un artículo trascendental en Science titulado "¿Se forman nuevas neuronas en el cerebro de los mamíferos adultos?". En sus experimentos, indujo la traumatización cerebral de ratas adultas introduciendo una aguja en el cuerpo geniculado lateral. Posteriormente, estas ratas fueron inyectadas con el marcador timidina tritiada, para identificar proliferación celular. Sus resultados fueron sorprendentes, pues mostraron la presencia de células marcadas en algunas neuronas y neuroblastos en el tálamo y la corteza, tanto en ratas sacrificadas entre un día y varios meses posterior a la lesión. Con estos resultados, Altman argumentó en su artículo, que la falta de división de neuronas diferenciadas no eximía la posibilidad de la presencia de neurogénesis en la adultez; pensó que un conjunto de células indiferenciadas podría fungir como la fuente de nuevas neuronas. Unos años después a su publicación, reafirmó sus hallazgos con nuevos experimentos, esta vez los realizó en gatos y ratas. Sin embargo, sus resultados fueron objeto de arduas críticas, y no recibieron la atención merecida hasta tres décadas después. No obstante, estos descubrimientos ayudaron a sentar las bases para una mayor investigación de la neurogénesis [19, 31].

El trabajo de Altman continuó enfocado en la neurogénesis y en el año de 1965 en conjunto con el científico Gopal Das, presentaron la primera evidencia histológica de la formación de células granulares en el giro dentado del hipocampo. Para este experimento, utilizaron ratas adultas a las que se inyectó timidina tritiada, sin embargo, esta vez la evidencia autorradiográfica se reforzó con pruebas histológicas. Los resultados derivados de este estudio sugerían la existencia de procesos de proliferación y migración celular. Tomando como base estos resultados, Altman llevo a cabo otra investigación en 1969, en donde identifico otra fuente potencial de generación de nuevas neuronas para el bulbo olfatorio. A la vía de migración de estas células, la denominó corriente migratoria rostral. Altman propuso que la proliferación celular en la zona subependimaria del ventrículo lateral con la posterior migración, podía reestablecer las neuronas del bulbo olfatorio.

Fernando Nottebohm fue un ornitólogo, cuya fascinación por las aves cantoras lo llevo a importantes contribuciones en el campo de las neurociencias. En 1983

Nottebohm y su estudiante Steven Goldman, se encargaron de administrar timidina tritiada a canarios por un periodo de 2 días, posterior a 5 semanas las aves fueron sacrificadas. Obtuvieron autorradiografías de los cerebros y observaron la presencia de varias células marcadas en el hiperpalio, esta región es un núcleo que resulta crucial para el aprendizaje y canto de las aves. Estos resultados le permitieron pensar que, tanto en las aves jóvenes como adultas, existía la producción de nuevas neuronas a lo largo de su vida [19, 31].

En los inicios de la década de los 90 algunos científicos se opusieron al veredicto de la comunidad científica general sobre la ausencia de neurogénesis, mediante diversos trabajos que hicieron que esta idea cobrara mayor fuerza. Aunado a esto, en esta época surgió una herramienta valiosa para el estudio de la proliferación celular, la bromodesoxiuridina (BrdU). El BrdU al ser un análogo de timidina puede unirse al ADN de células en división durante la fase S del ciclo celular. Esta herramienta representó una gran mejora en la metodología de la investigación en este campo [31].

Una de las investigaciones más importantes surgió en el año de 1998 a partir del trabajo del científico Peter Eriksson y su equipo, quienes sugirieron por primera vez el concepto de neurogénesis humana. Eriksson y su equipo realizaron un estudio post mórtem de pacientes que habían sido diagnosticados con cáncer. A estos pacientes se les inyectó BrdU con el objetivo de evaluar la proliferación de las células cancerosas. Al examinar los cerebros de estos pacientes, observaron que el marcaje para BrdU colocalizaba con marcadores neuronales, demostrando la proliferación de células neuronales en el giro dentado del hipocampo de cerebros humanos adultos. Este hallazgo fue crucial para probar que el cerebro es capaz de poder generar nuevas neuronas en la etapa adulta, además que también corroboró que las evidencias encontradas en roedores y primates también sucedían en humanos [20].

Posterior a esta publicación, surgieron muchas más con resultados que avalaban la

existencia de este proceso. Una de las más recientes se publicó en el 2019, cuyos resultados respaldaban la neurogénesis del hipocampo en humanos adultos. Esta investigación reveló la existencia de miles de neuronas inmaduras en diferentes grados de maduración en el giro dentado del hipocampo, hasta la novena década de la vida. Su importancia radica en que el estudio se llevó a cabo en condiciones estrictamente controladas y con métodos de procesamiento de tejidos de última generación. Además, dentro del informe los autores reportaron que la neurogénesis continua se redujo en pacientes con enfermedad de Alzheimer [20, 31].

Hoy en día, la neurogénesis es un área activa de investigación y los científicos están explorando formas de aprovechar su potencial con fines terapéuticos. Por ejemplo, se está estudiando como un tratamiento potencial para la depresión, la ansiedad y otros trastornos de salud mental. Los estudios también han sugerido que aumentar la neurogénesis a través de cambios en el estilo de vida, como el ejercicio físico y la dieta, puede ser beneficioso para la función cognitiva. En general, la historia de la neurogénesis es la de una comprensión cada vez mayor del papel que desempeña en el cerebro adulto. Su potencial para mejorar la salud mental, enfermedades neurodegenerativas, alteraciones relacionadas al envejecimiento y la función cognitiva ahora se están explorando activamente y pronto puede convertirse en una parte importante de la terapéutica.

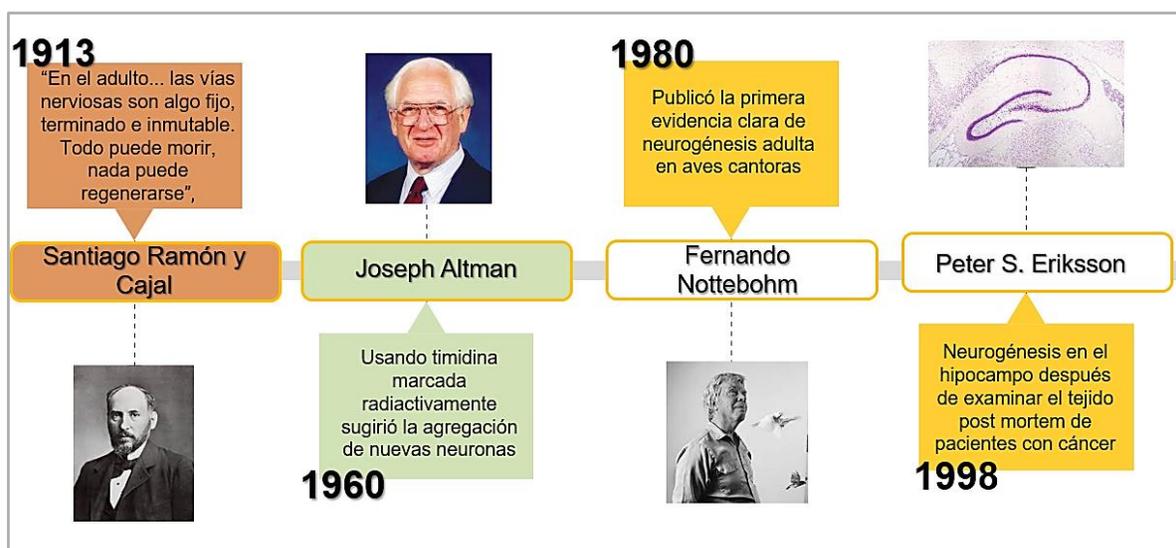


Figura 1. Acontecimientos relevantes en la historia de la neurogénesis.

1.2 Nichos neurogénicos

Los nichos neurogénicos son áreas especializadas en el cerebro donde las células precursoras neurales (*neural precursor cells*, NPC por sus siglas en inglés) pueden diferenciarse y formar nuevas neuronas. Estas áreas generalmente se ubican en el hipocampo, particularmente en la zona subgranular (*subgranular zone* o SGZ) del giro dentado (GD). Esta es una región del cerebro asociada con el aprendizaje y la memoria. Las NPC de la SGZ son capaces de dividirse y originar células amplificadoras, que generarán neuronas, cuyo destino será formar parte de la capa de células granulares, para integrarse en los circuitos hipocampales preexistentes. La otra región, es la zona subventricular (*subventricular zone* o SVZ por sus siglas en inglés), una región cerca de los ventrículos laterales del cerebro, donde las NPC se dividen constantemente. Análogamente las NPC de la SVZ pueden dividirse y migrar a través de la corriente migratoria rostral (*rostral migratory stream* por sus siglas en inglés RMS) hacia el bulbo olfatorio, en donde terminarán su diferenciación [4, 5, 20].

El estudio de los nichos neurogénicos tiene implicaciones para una variedad de trastornos neurológicos, ya que la capacidad de las nuevas neuronas para ser producidas e integradas en las redes neuronales existentes se ha relacionado con una mejor plasticidad cerebral y funcionamiento cognitivo. Como tal, la investigación sobre nichos neurogénicos puede conducir al desarrollo de tratamientos para una variedad de trastornos neurológicos, como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

Tanto la SVZ como la SGZ han sido ampliamente estudiadas y su capacidad neurogénica ha sido comprobada. Sin embargo, investigaciones recientes han sugerido la existencia de nuevas neuronas en otras regiones del cerebro de mamíferos adultos, éstas incluyen el hipotálamo, el cuerpo estriado, la sustancia nigra, la corteza prefrontal y la amígdala. A estas regiones las han postulado como “nichos novedosos”, mientras que a la SVZ y a la SGZ se les ha denominado como “nichos clásicos”. No obstante, este es un tema aún debatido, y que necesita ser

investigado con mayor profundidad. Algunos estudios han sugerido que estas nuevas neuronas se originan a partir de grupos de NPC ubicadas dentro de estas regiones del cerebro y que permiten una diferenciación local. Por otro lado, en otras investigaciones se ha demostrado la migración de neuronas desde la SVZ a estas regiones. Todavía falta esclarecer si el origen de estas NPC es propio de estos nichos, o si es debido a una migración desde la SVZ [22].

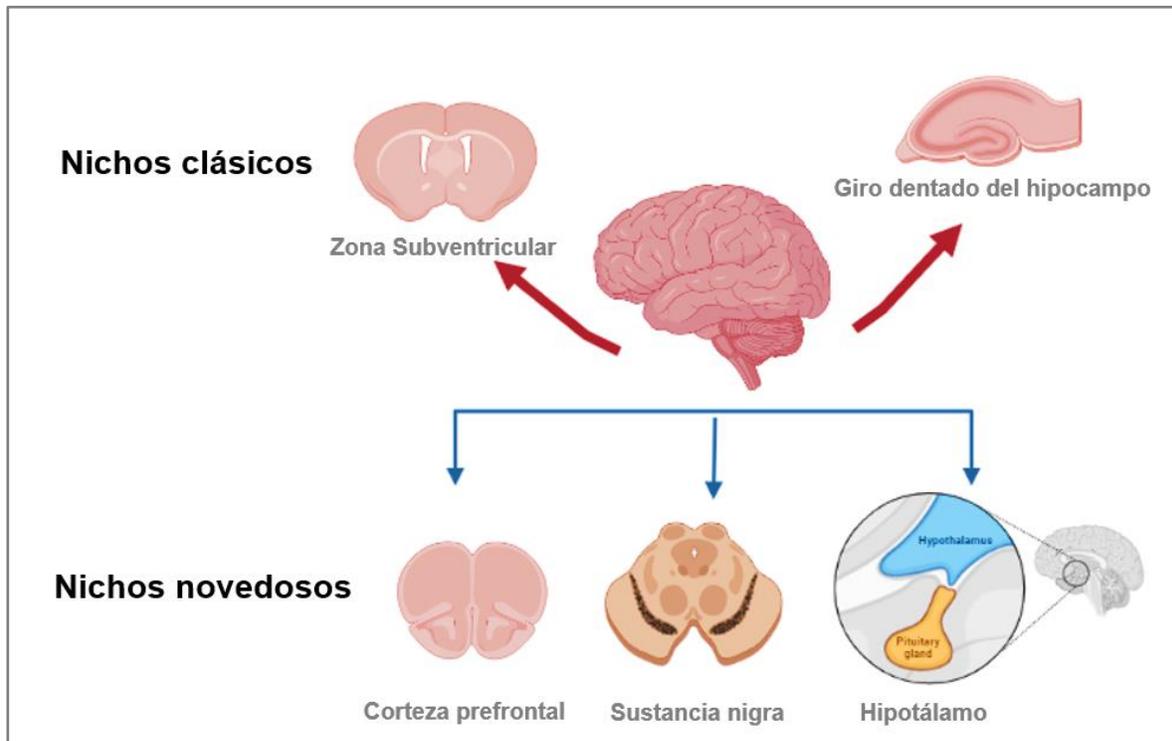


Figura 2. Nichos neurogénicos. Representación de las regiones clásicas y novedosas.

El hipotálamo es una parte vital del cerebro y desempeña un papel en el control de varias hormonas y en la regulación de procesos homeostáticos como el apetito, la sed y la temperatura corporal. En años recientes se ha propuesto como una región con actividad neurogénica. Se piensa que la neurogénesis en el hipotálamo puede relacionarse con varios procesos importantes, como la regulación del balance energético y almacenamiento de grasa, la ingesta de alimentos y el peso corporal. Otra de las regiones recientemente postuladas como un nicho novedoso, es la amígdala. La amígdala es una estructura cerebral que está involucrada en muchos aspectos de las emociones, incluidos el miedo, la agresión y el placer. Por lo que

se ha considerado que la neurogénesis puede desempeñar un papel en el condicionamiento del miedo y la respuesta al estrés. En el cuerpo estriado, la sustancia nigra y la corteza, el papel en el funcionamiento de las neuronas de nueva generación está menos claro. Por otro lado, a pesar de poder deducir las funciones de estas nuevas neuronas, aún no está claro si las NPC que se encuentran en estos nichos novedosos, pueden llevar a cabo funciones específicas además de participar en los procesos de recuperación posterior a una lesión, pérdida neuronal o neurodegeneración [22].

1.3 Neurogénesis en hipocampo

El hipocampo es una estructura que se encuentra ubicada dentro del lóbulo temporal medial y forma parte del sistema límbico. Tiene un importante papel en la modulación del estado anímico, en la memoria y el aprendizaje. Además, el hipocampo tiene una gran capacidad de plasticidad, tanto estructural como sináptica, y es una región neurogénica activa en las etapas embrionaria, neonatal y adulta. Durante el proceso de neurogénesis hipocampal, las neuronas recién generadas migran desde la SGZ del DG hasta la zona granular del DG, en donde serán capaces de terminar su maduración e integrarse a los circuitos neuronales existentes [20, 21].

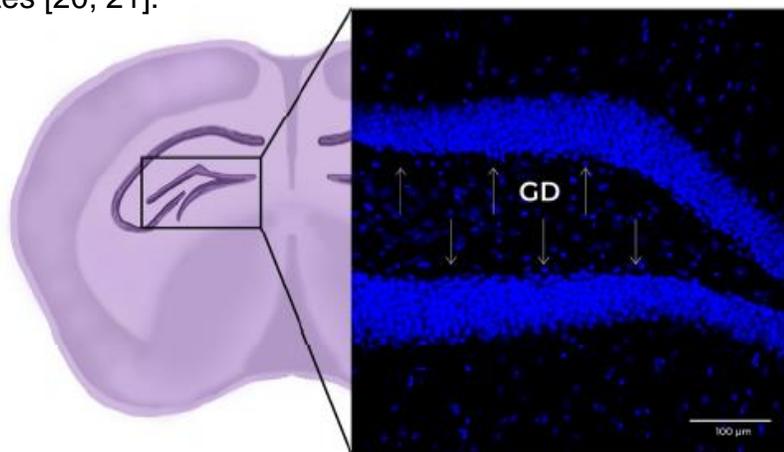


Figura 3. Corte coronal de la zona subgranular del GD. Detalle de la SGZ con el giro dentado marcado con flechas. (Modificado de Llorente V, et al. 2022).

Se ha pensado que las neuronas provenientes de la SGZ se relacionan con el desarrollo cognitivo dependiente del hipocampo, por lo que están involucradas en procesos como la memoria espacial y la separación de patrones neuronales asociados al establecimiento de memorias de trabajo, la regulación de la red inhibitoria GABAérgica y el sustento de la memoria social. También se ha explicado su participación en la respuesta y regulación del estrés por medio de una inhibición del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal (HPA) [22].

Existen diferentes tipos celulares en esta región que conservan una línea de progresión entre ellos. Las NPC se han identificado en el hipocampo como células similares a la glía radial (*radial glia-like cells*, por sus siglas en inglés RGL) o también conocidas como células tipo 1. Este tipo celular expresa a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que es un marcador de astrocitos, nestina (expresada en NPC) y Sox2. Los progenitores intermedios, nombrados también células tipo 2, tienen la característica de ser altamente proliferativos y expresar nestina y doblecortina (DCX), marcador de neuronas diferenciadas inmaduras. Las células tipo 2 darán origen a neuroblastos, llamados células tipo 3, que expresan DCX y a la molécula de adhesión de células neurales (*polysialic acid neural cell adhesion molecule*, por sus siglas en inglés PSA-NCAM), las células tipo 3 no expresan nestina. Los neuroblastos migran a lo largo de los vasos sanguíneos hasta la capa granular, donde finalmente se diferenciarán en neuronas granulares maduras [8, 22].

Los neuroblastos que han migrado comienzan a intentar establecer conexiones funcionales en la región CA3. Las neuronas inmaduras que son capaces de generar conexiones funcionales recibirán señales de neurotransmisores, además de factores tróficos que propiciarán la supervivencia neuronal. La maduración de las células granulares implica una serie de modificaciones que incluyen cambios en el tamaño, grosor, propiedades de membrana, ramificación dendrítica y cambios electroquímicos. También se desarrollan conexiones glutamatérgicas que serán electrofisiológicamente idénticas a las de neuronas existentes. Con estos cambios es como se realiza la integración funcional en el circuito hipocampal existente [5].

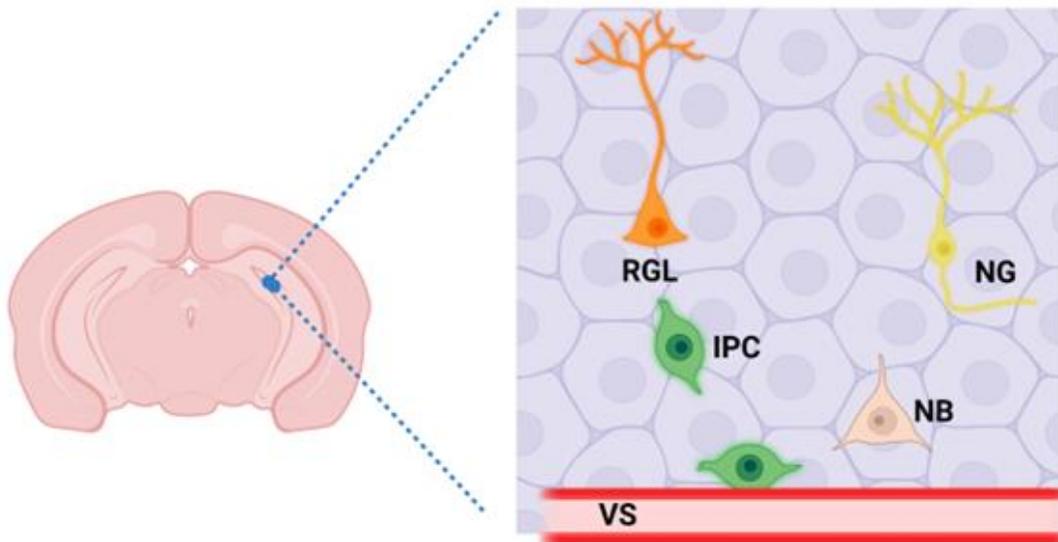


Figura 4. Esquema de la localización de los tipos celulares en la zona subgranular. RGL: células similares a glía radial. IPC: progenitores intermedios. NB: neuroblastos. NG: neurona granular inmadura. VS: vaso sanguíneo.

1.4 Neurogénesis en la zona subventricular.

La SVZ se ha descrito como un sitio de generación de nuevas neuronas en diferentes especies de mamíferos, entre éstas, los humanos. Está localizada en la pared lateral de los ventrículos laterales y se conforma de 5 diferentes poblaciones celulares, entre ellas: una monocapa de células endimarias o células tipo E, células amplificadoras transitorias (células tipo C, también conocidas como progenitoras intermedias), neuroblastos (o células de tipo A), células tipo astrocitos (conocidas como células tipo B) y células endoteliales que constituyen la microvasculatura. Estas células se encuentran en distintas etapas de diferenciación y se ha establecido una progresión de linaje, siendo las células tipo B las precursoras primarias, que pueden dividirse asimétricamente y generan progenitores amplificadores transitorios altamente proliferativos. Estos progenitores posteriormente dan lugar a neuroblastos migratorios que migran a través de la vía de migración rostral (*rostral migratory stream*, por sus siglas en inglés RMS), de

forma longitudinal a los vasos sanguíneos paralelos a la RMS. Se piensa que los vasos sanguíneos funcionan como andamios migratorios, y finalmente alcanzan el bulbo olfatorio. Estas células expresan la proteína asociada a microtúbulos DCX, además de la expresión de la proteína 4 mediadora de respuesta a colapsina (*Collapsin Response Mediator Protein 4*, por sus siglas en inglés CRMP4) que participa en la guía axonal. En el bulbo olfatorio se integran a la capa de células granulares, una pequeña proporción de estas células logra convertirse en neuronas granulares maduras. Las neuronas maduras pueden establecer conexiones con las células mitrales o en penacho del bulbo olfatorio [3,4, 12, 14].

Se ha visto que las células provenientes de la SVZ no solamente migran a través de la RMS, sino que también hay una corriente con destino a la corteza prefrontal, denominada corriente migratoria medial (*medial migratory stream*, por sus siglas en inglés MMS). Se postula la existencia de la MMS durante las primeras etapas del desarrollo posnatal, disminuye durante la infancia y está prácticamente ausente en la adultez [4].

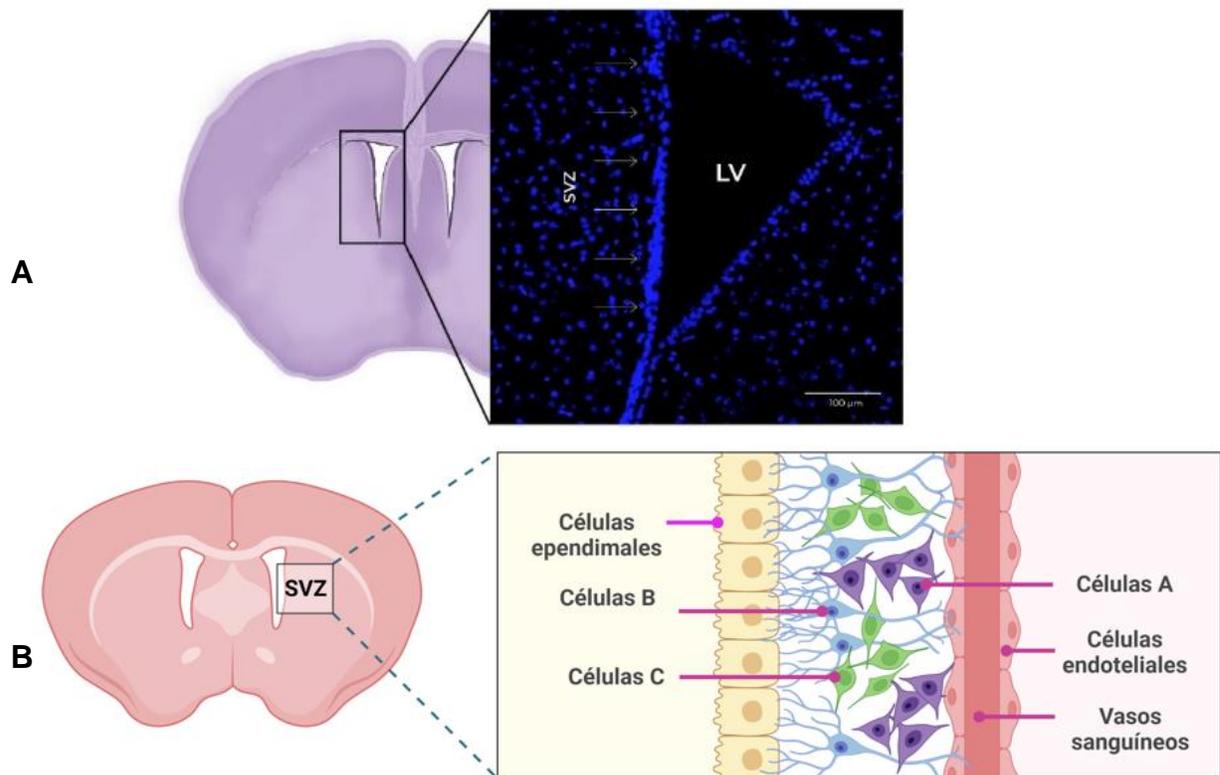


Figura 5. Esquemas representativos de la zona subventricular del ratón. A: Detalle de la SVZ con el ventrículo lateral (LV) marcado con flechas. (Modificado de Llorente V, et al. 2022). B: Localización de los diferentes tipos celulares de la SVZ.

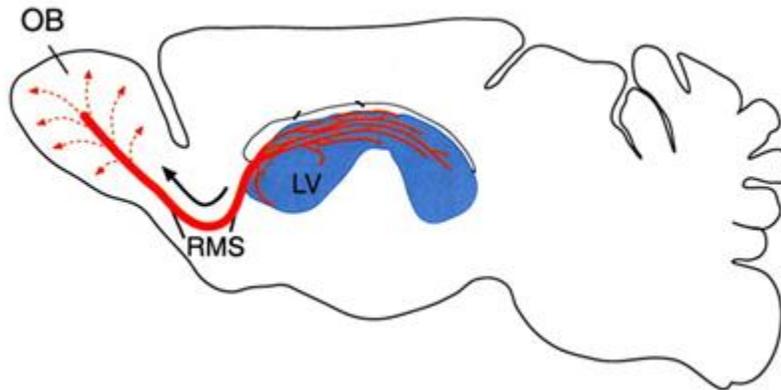


Figura 6. Representación de la migración celular a través de la vía de migración rostral (RMS). LV: ventrículos laterales; OB: bulbo olfatorio. (Modificado de Llorente V, et al. 2022)

Las células tipo B poseen procesos celulares que tienen contacto con los capilares cerebrales y la capa de células E que reviste la pared ventricular. Esta disposición sugiere que este tipo celular recibe estímulos por contacto directo tanto de la microvasculatura como de las células tipo E. Sí bien, las células tipo B son postuladas como los progenitores primarios, estas células no permanecen amorfas e indiferenciadas del todo, sino que exhiben una morfología que se asemeja a la de astrocitos diferenciados. Al igual que los astrocitos expresan GFAP, también expresan al transportador de glutamato aspartato, a la proteína de unión a lípidos del cerebro (*brain lipid-binding protein*, por sus siglas en inglés BLBP) y en estado activado son positivas a nestina. Una característica importante de las células B es que su población no es homogénea, aún en el mismo estado de activación y en el subtipo neuronal que se diferenciarán. La heterogeneidad de estas células radica en su localización dentro del nicho. Mientras que las células tipo B provenientes de la pared septal presentan una inclinación a un destino que origine oligodendrocitos, las células de la pared lateral generan neuronas [4].

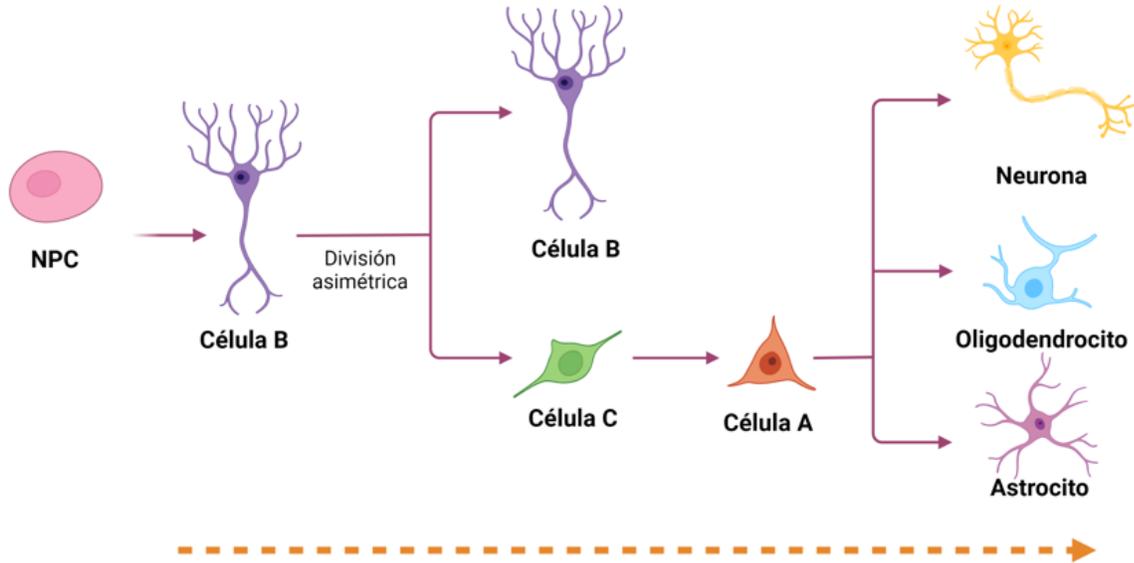


Figura 7. Progresión en el linaje de las células del nicho de la SVZ.

La SVZ es la región responsable de la mayor producción de células neuronales en las fases densa embrionaria y adulta, generando progenitores altamente proliferativos. Esta zona es más activa desde el nacimiento hasta alcanzar una organización más madura, alrededor de los 15 días posteriores al nacimiento. Un estudio realizado por Walker y cols. en el 2014, tuvo la finalidad de comparar cultivos de la SVZ y de la SGZ. Sus resultados demostraron que las células precursoras derivadas de la SVZ proliferaban más rápido y formaban neuroesferas más grandes que las células precursoras derivadas de la SGZ. Mientras que las neuroesferas derivadas de SVZ generalmente se podían cuantificar después de 6 a 7 días en cultivo, las neuroesferas derivadas de la SGZ solo se pueden cuantificar después de 10 a 12 días. Además, demostraron que el número de neuroesferas que se pueden generar a partir de esta región es casi 10 veces mayor [35].

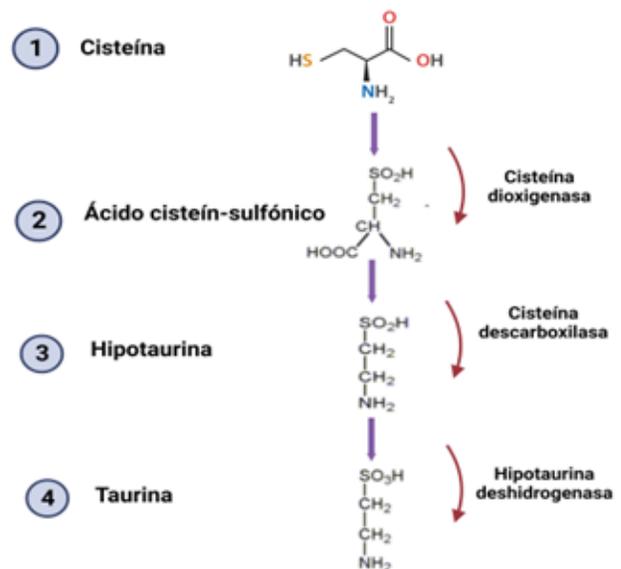
1.5 Taurina

1.5.1 Generalidades

La taurina es un sulfo-aminoácido no esencial en mamíferos, pues no forma parte de la estructura de las proteínas, se encuentra libre en el citosol y es metabólicamente inerte. La taurina es muy abundante en las células animales,

particularmente en los tejidos excitables; los órganos donde se encuentran las mayores concentraciones de taurina son el cerebro, corazón, retina y músculo esquelético. El cerebro expresa las concentraciones más altas de taurina durante el desarrollo, cuando las concentraciones de otros aminoácidos tienden a ser bajas. Posteriormente, las concentraciones de taurina van disminuyendo de tal manera que en la etapa adulta sus concentraciones son cinco veces menores que en el desarrollo. Las concentraciones de taurina se mantienen en el organismo de dos maneras. La primera, mediante el proceso de biosíntesis endógena a partir de aminoácidos que contienen azufre, a través de la vía metabólica de metionina-cisteína, que se encuentra principalmente en hígado y en otros órganos como los riñones, cerebro y tejido adiposo. El segundo mecanismo es a través de la participación de un transportador específico de taurina (TAUT/SLC6a6), que permite la absorción intestinal de taurina proveniente de la dieta, que es la principal fuente de este aminoácido no esencial. La biosíntesis de taurina se produce partir del aminoácido metionina, que, pasando por la cisteína, originará al ácido cisteína-sulfónico (CSA), para posteriormente dar lugar al precursor hipotaurina, que finalmente será convertido en taurina [3, 17, 28].

Figura 8. Vía de síntesis de la taurina.



1.5.2 Funciones

La taurina es un aminoácido que se encuentra naturalmente en el cuerpo y es uno de los aminoácidos más importantes para la salud humana. Está involucrado en muchos procesos biológicos, incluida la estabilización de la membrana celular,

como antioxidante, neuroprotector, osmoregulador y en la homeostasis del calcio [2].

1.5.2.1 Función antioxidante

Los mecanismos antioxidantes han sido el principal mecanismo adaptativo desarrollado por los organismos, que les ha permitido poder sobrevivir en un ambiente rico en oxígeno. Estos sistemas antioxidantes, son los encargados de proteger a las células de los daños provocados por las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, por sus siglas en inglés ROS) y por las especies reactivas de nitrógeno (*reactive nitrogen species*, por sus siglas en inglés RNS). Además, estos sistemas de protección también tienen una función al proporcionar las condiciones óptimas para la señalización celular y la adaptación a los mecanismos estresores. Éstos son variados, y trabajan en conjunto para proteger del daño celular [33].

La taurina ejerce funciones antioxidantes por medio de mecanismos diferentes. Contribuye manteniendo la integridad de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, bajo condiciones de estrés; puede estabilizar las membranas biológicas, inhibir enzimas generadoras de ROS; favorece la transcripción de factores para la producción de enzimas antioxidantes y la eliminación directa de radicales libres.

La capacidad de la taurina para eliminar de forma directa los radicales libres ha demostrado ser escasa, debido a que su reactividad con los radicales hidroxilo, superóxido y con el peróxido de hidrógeno es muy baja. Sin embargo, se ha demostrado que tiene esta función, en concentraciones que oscilan de 15-60 mM, en varios sistemas *in vitro*. Si bien, varios estudios establecen estos rangos de concentración como las necesarias para esta actividad, existen otras investigaciones que han encontrado concentraciones menores. Se ha visto que taurina tiene una capacidad para captar radicales de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) dosis dependiente, con CI_{50} (concentración que inhibe el 50% de la

generación de radicales libres) de 1.2 Mm. En este mismo estudio, se observó que la reacción de taurina con radicales alquilo, hidroxilo y superóxido fue de 1.7 mM, 1.9 mM y >8 mM, respectivamente. Además, también se ha observado que tanto la taurina, como la hipotaurina, al reaccionar con aniones superóxido pueden formar una molécula llamada peroxitaurina. Esta molécula a demostrado ser un producto semi estable, que puede degradarse a taurina en presencia de agua [10].

También se ha observado que la taurina es capaz de reaccionar con el ácido hipocloroso, formando el compuesto taurina cloramina (TauCl). Esta molécula es menos dañina que el ácido hipocloroso, además regula a la baja el factor de transcripción NF- κ B, en consecuencia, se anula la producción de varios mediadores proinflamatorios [10].

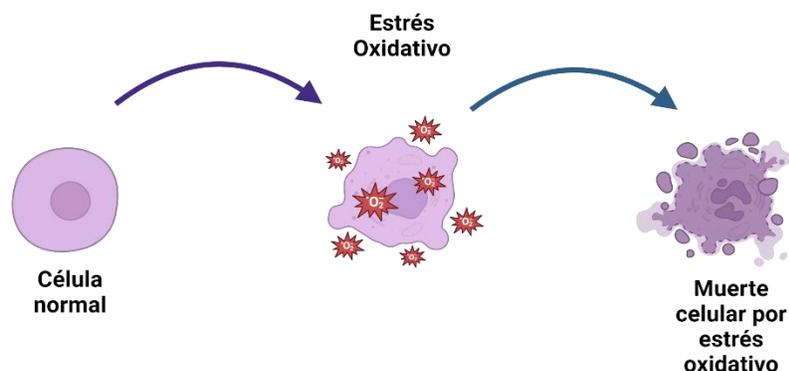


Figura 9. Representación del daño ocasionado por estrés oxidativo en una célula.

En la célula, las mitocondrias producen la mayor cantidad de radicales libres, al tener un gran consumo de oxígeno, además de poseer una variedad de enzimas productoras de ROS. Se ha visto que una variedad de escenarios que incluyen ambientes estresores para la célula puede causar disfunción mitocondrial con aumento en la producción de ROS y daño del ADN mitocondrial. La taurina se encuentra en altas concentraciones (20-30 mM) en la mitocondria, lo que permite pensar que ejerce funciones importantes a este nivel. La taurina también interviene en la correcta traducción y expresión de proteínas de la cadena respiratoria

mitocondrial. La proteína MTO1 en la mitocondria, participa en la síntesis proteica a través de la regulación y la modificación del ARN-t. En este sentido, la taurina participa en las modificaciones traduccionales ejercidas por MTO1. En un estudio realizado en ratones, se observó la letalidad embrionaria debido a la pérdida de la proteína MRO1 y las consecuentes modificaciones en el ARN-t mitocondrial realizadas por taurina. Podemos decir que la taurina participa manteniendo la homeostasis proteica, regulando la traducción en la mitocondria, es por ello que su agotamiento puede condicionar alteraciones en las modificaciones del ARN-t. Las alteraciones en el ARN-t inducen la producción de ROS y favorecen la disfunción mitocondrial, en este sentido, la taurina podría potenciar el efecto antioxidante y disminuir la producción de ROS [10].

Por otro lado, la taurina reduce el daño oxidativo al disminuir la oxidación de los lípidos de membrana. Taurina también contribuye con el proceso de estabilización de las membranas celulares conservando la permeabilidad al agua y a los distintos iones bajo condiciones de estrés. Un estudio reportó que durante el almacenamiento (5°C) de líquido seminal de buey, taurina (50mM) incrementó la actividad de las enzimas antioxidantes, además de disminuir la oxidación de lípidos de membrana y evitar la salida de colesterol de las membranas celulares [14,10].

El poder antioxidante de taurina también está relacionado con su capacidad de disminuir la cantidad de enzimas productoras de radicales libres. Una de estas enzimas es la xantino oxidasa y existe evidencia de que la taurina puede aminorar la actividad de esta enzima. En un estudio realizado en cardiomiocitos, se observó que, al ser sometidos a estrés, la taurina disminuyó la oxidación de lípidos de membrana y la actividad de la xantino oxidasa, además mejoró la actividad de las enzimas antioxidantes (referencia).

Otras de las enzimas involucradas en la producción de radicales libres son las pertenecientes a la familia de NADPH oxidasas. Se ha pensado que taurina puede interferir en la actividad de estas enzimas al regular el contenido de NADPH. En un estudio realizado por Li y cols. se sugiere la inhibición de la NADPH oxidasa en

cardiomiocitos estimulados por norepinefrina, y con esto la disminución de la generación de ROS citosólicos y de la apoptosis generada por éstos [10].

1.5.2.2 Función en la homeostasis del calcio

Los niveles de calcio (Ca^{2+}) libre intracelular se encuentran en cantidades minúsculas, debido a su secuestro en reservas internas, como el retículo endoplásmico (RE), los reservorios mitocondriales y mediante el bombeo al espacio extracelular por la bomba de calcio ATPasa. En el caso de las neuronas, cuando éstas son estimuladas por el glutamato ocurre un aumento importante en los niveles de Ca^{2+} intracelular. El aumento intracelular de Ca^{2+} se da en primer instancia por la apertura de canales iónicos sensibles a voltaje de calcio. Los canales de Ca^{2+} que facilitan el influjo de este ion son los canales dependientes de voltaje (*voltage-gated calcium channel*, por sus siglas en inglés VGCC) como lo son los canales tipo L, N y P/Q. Simultáneamente, el influjo de calcio se da a través de los receptores de glutamato tipo NMDA; mediante el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y por la liberación de Ca^{2+} a partir de los reservorios intracelulares que almacenan al mismo.

Se ha reportado que uno de los mecanismos por los que taurina disminuye el aumento de Ca^{2+} provocado por glutamato, es a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que actúa de modo inverso y ocasiona una inhibición en la entrada de Ca^{2+} . También se ha observado que la metilación de los fosfolípidos decremента su actividad, y taurina disminuye la actividad de la fosfolípido N-metiltransferasa, que resulta en un incremento en la salida de Ca^{2+} por medio del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, reduciendo la cantidad de Ca^{2+} intracelular. Adicional a este mecanismo, taurina puede evitar la liberación de Ca^{2+} de los almacenes internos y abolir a los VGCC de tipo L, N y P/Q [25].

1.5.2.3 Función como osmoregulador

La homeostasis celular, depende en gran medida de la regulación del volumen celular. El volumen se encuentra sujeto a cambios osmóticos, regulados por estímulos intracelulares y extracelulares. En las neuronas, la regulación de este proceso está directamente ligada al flujo de los iones, que influye en cambios en la

polaridad de la membrana. Se ha visto que la taurina puede actuar como un zwitterión (molécula que puede ionizarse de manera positiva o negativa, es eléctricamente neutra), ayudando a la regulación de la osmolaridad. En cultivos celulares de astrocitos y neuronas, concentraciones de hasta 10 mM de taurina no han provocado alteraciones en el volumen celular. De tal manera que la síntesis de taurina es estimulada en ambientes hipertónicos, sin embargo, se ha considerado que esta acumulación de taurina podría ser consecuencia de una expresión aumentada de TauT, promoviendo la captación de taurina, más que por su síntesis. Por otro lado, en condiciones hipotónicas, se favorece la liberación de taurina [33].

1.5.2.4 Función como neuroprotector

Existen diversos estudios que demuestran la actividad neuroprotectora de la taurina en múltiples escenarios fisiológicos. En modelos animales de lesiones cerebrales traumáticas y de accidente cerebrovascular isquémico, la taurina ha podido disminuir el proceso de neuroinflamación. Además, la taurina ha exhibido propiedades neuroprotectoras debido a su rol inhibitorio en el sistema nervioso, reduciendo la frecuencia de las convulsiones en un modelo animal de epilepsia. En modelos de neuroinflamación que simulan una infección bacteriana, la taurina ha tenido una actividad anti-apoptótica, aunado a una disminución en la activación de la microglía. Asimismo, en modelos de neuronas mantenidas in vitro, la taurina ha mostrado propiedades protectoras contra la excitotoxicidad mediada por glutamato [33].

1.5.2.5 Taurina en los procesos neurogénicos.

La taurina también ha demostrado tener actividad favoreciendo los procesos de neurogénesis. En un estudio realizado por Jakaria y cols. que tuvo el objetivo de evaluar el papel de la taurina en el proceso de proliferación de NPC-SVZ, se determinó que la concentración más efectiva fue de taurina para favorecer el proceso de proliferación es 10 mM. Los resultados principales mostraron que los cultivos tratados con taurina tuvieron un aumento de 73% en el índice de proliferación de NPC-SVZ a las 24 horas, en tanto este índice se incrementó a 120% a las 96 horas. Estos resultados permitieron a los autores concluir que la taurina tiene una implicación favorable en el proceso de neurogénesis [17].

Por otra parte, un trabajo de investigación de nuestro grupo de investigación evaluó el efecto de la taurina en el proceso de diferenciación de NPC-SVZ a través de la interacción con receptores ionotrópicos de GABA tipo A ($GABA_{A}R$). Para valorar las células diferenciadas en neuronas, se utilizó el anticuerpo doblecortina como marcador. El tratamiento de NPC-SVZ con taurina (10 mM) o con GABA (100 μ M) favoreció el alargamiento somático y el crecimiento de neuritas, fenómeno que favoreció el desarrollo de una morfología tipo neuronal; mientras que el bloqueo del receptor con el antagonista selectivo picrotoxina indujo una reducción en el número de neuritas secundarias y terciarias y una disminución en la longitud de las neuritas primarias. Los resultados de este estudio demostraron por primera vez que la activación de los $GABA_{A}R$ es un paso fundamental en el proceso morfogénico y el crecimiento de neuritas. Asimismo, los registros electrofisiológicos realizados en el mismo trabajo mostraron que estas neuronas desarrollan propiedades cinéticas similares a los potenciales de acción de neuronas maduras. Estos resultados, permitieron a los autores postular a la taurina como un importante promotor de la diferenciación de NPC-SVZ [13].

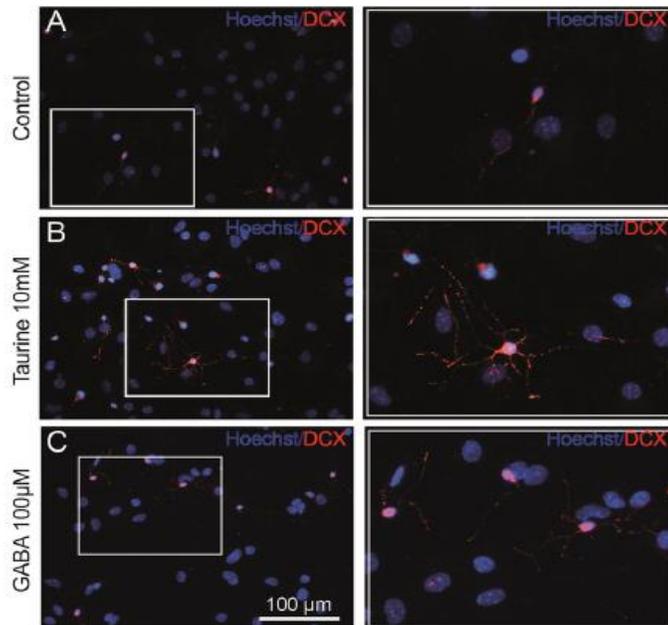


Figura 10. Comparación de la morfometría neuronal. A: neuronas control; B: Neuronas tratadas con Taurina 10 Mm; C: neuronas tratadas con GABA 100 μ M. (Modificado de Gutiérrez-Castañeda, et al. 2023)

1.6 Transporte de taurina

Las concentraciones de taurina en el organismo varían según la edad, de manera que su biosíntesis es alta en etapas prenatales y neonatales, sin embargo, durante la edad adulta estas concentraciones disminuyen, llegando a registrarse las concentraciones más bajas en ancianos. Los estados patológicos también afectan las concentraciones de taurina pues se ha observado que en condiciones de trauma, sepsis e infecciones, la concentración de taurina disminuye de manera considerable. La taurina proveniente de la dieta se absorbe en primera instancia en el intestino delgado y posteriormente los enterocitos la dirigen a la circulación portal. Al llegar al hígado, la taurina ayuda a regular el metabolismo hepático y finalmente es transportada a la circulación sistémica para llegar a otros órganos y tejidos. La taurina es una molécula hidrofílica, que no puede atravesar las membranas celulares sin la ayuda de sistemas de transporte. Por lo tanto, para que la taurina pueda cruzar la barrera hematoencefálica (*blood brain barrier*, por sus siglas en inglés BBB) e ingresar al parénquima cerebral, requiere de un sistema de internalización. Este sistema está dado principalmente por dos componentes, el transportador de taurina y los canales aniónicos regulados por volumen (*volumen-regulated anion channel*, por sus siglas en inglés VRAC) [32].

Por su parte el transportador de taurina (TauT) forma parte de la familia SLC6, en particular también es conocido como SLC6A6. Es un transportador dependiente de Na^+ y Cl^- , de alta afinidad y baja capacidad. Este transportador requiere de uno a tres iones de Na^+ para poder llevar a cabo el transporte de taurina, desde la periferia al interior del parénquima cerebral, razón por la cual, cualquier reducción en el gradiente de Na^+ , afecta la unión de taurina al transportador. Por otra parte, los VRAC son activados por cambios en el volumen celular y en la actividad eléctrica. Por esta razón se ha sugerido que la internalización de la taurina esta mediada por TauT, mientras la salida de taurina se regula principalmente por los VRAC. Además, se ha observado que la expresión génica de TauT está regulada por diversas condiciones como lo son el estrés oxidativo. Se ha observado que en enfermedades neurodegenerativas y en procesos inflamatorios, las concentraciones de taurina se encuentran disminuidas, aunado a que el sistema de transporte no funciona de

manera óptima, lo que disminuye aún más las concentraciones de taurina [26].

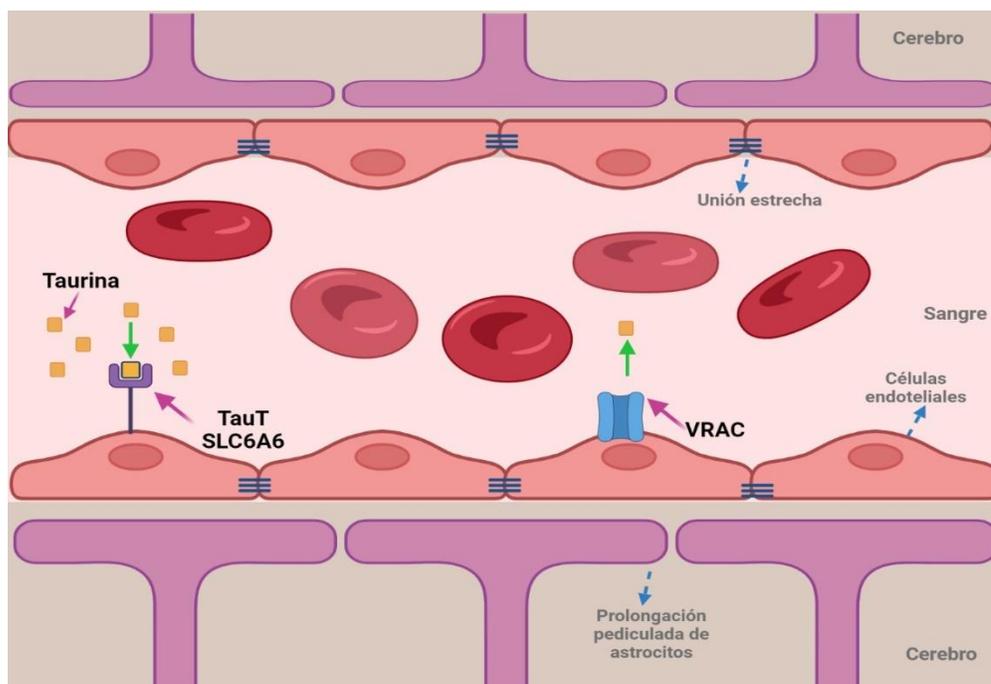


Figura 11. Representación del sistema de internalización de la taurina a través de la BBB. TauT se encarga principalmente de la entrada de taurina, en tanto, VRAC de su salida.

1.7 Análogos estructurales de taurina.

1.7.1 Homotaurina

La homotaurina es un compuesto que se encuentra de manera natural en las algas rojas y se diferencia estructuralmente de la taurina debido a la presencia de un grupo metilo adicional. La homotaurina tiene actividad neuroprotectora en modelos *in vivo* e *in vitro*, además de exhibir actividad anticonvulsivante, y ha sido utilizada como tratamiento auxiliar de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. En dichos estudios, la homotaurina ha sido denominada bajo el nombre farmacéutico de tramiprosato [1,6,11]. Los efectos benéficos se han visto particularmente en la enfermedad de Alzheimer. En estudios preclínicos se observó una disminución en la agregación de la placa fibrilar amiloide. Además, ha exhibido efectos antiinflamatorios. En cultivos neuronales, la homotaurina ha tenido

efectos neuroprotectores, disminuyendo la activación de algunas familias de caspasas inducidas por el péptido β -amiloide ($A\beta$), evitando la mortalidad celular [1,18]. Se han realizado varios estudios clínicos en pacientes con Alzheimer, tratados con tramiprosato. Uno de estos estudios, incluyó a 1052 pacientes, con distinto grado de deterioro, de leve a moderado, en quienes se administraron dosis de 100 mg o 150 mg de tramiprosato durante 78 semanas. Los resultados mostraron una tendencia a la mejora con el tratamiento en la escala de evaluación para la enfermedad de Alzheimer, además de demostrar una disminución significativa de la pérdida de volumen hipocampal, en comparación con el grupo placebo [1]. Otro estudio observacional retrospectivo, tuvo el objetivo de evaluar el tratamiento con homotaurina durante un año en 245 pacientes con enfermedad de Alzheimer con deterioro cognitivo moderado. Dentro de los resultados se observaron mejoras significativas en la puntuación de las evaluaciones cognitivas (Mini-Mental State Examination, MMSE). Los autores postularon a la homotaurina como un tratamiento sintomático potencial en los síntomas cognitivos [23]. En otro estudio, se observó que la homotaurina proporcionó neuroprotección en modelos *in vitro* e *in vivo* de accidente cerebrovascular isquémico [35].

El perfil de seguridad de la homotaurina ha sido evaluado en programas no clínicos y en 16 ensayos clínicos. En estos estudios revelaron a la homotaurina con un perfil bastante seguro, en donde los efectos adversos fueron mínimos, presentándose principalmente náuseas y vómitos [23].

En un trabajo que buscó identificar moléculas con propiedades antifibrillogénicas con potencial para disminuir la toxicidad inducida por $A\beta$ en cultivos neuronales, determinó que ciertas moléculas de bajo peso molecular, entre las que se encontraban la homotaurina, podían cruzar la barrera hematoencefálica. Sí bien, el sistema de internalización de la homotaurina no se encuentra totalmente caracterizado, se ha visto que puede cruzar más fácilmente la barrera hematoencefálica en comparación con otras moléculas, como la taurina. En este mismo estudio, se observó que el tiempo de vida media de la homotaurina en el

cerebro fue de 16-48 horas, mientras que en plasma fue de 2-4 horas [20].

1.7.2 Hipotaurina

En el caso de la hipotaurina, éste es el precursor inmediato de la taurina dentro de su biosíntesis, por lo que puede ser encontrado en cualquier célula o tejido que contenga taurina. La hipotaurina actúa como un antioxidante más eficaz que la taurina. Disminuye la oxidación de lípidos membranales, evitando la formación de radicales lipídicos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados, además de ejercer una importante regulación en la activación de la enzima superóxido dismutasa. En algunos estudios han postulado que la hipotaurina es un antioxidante más eficaz que la propia taurina. La hipotaurina puede reaccionar con el radical hidroxilo, el ácido hipocloroso y otros agentes oxidantes, con constantes de velocidad de 100 a 10 000 veces mayores que la taurina. Incluso, la reacción del radical hidroxilo con hipotaurina es capaz de generar taurina, de manera *in vitro*. Además, la hipotaurina puede generar a la molécula peroxitaurina al reaccionar con el superóxido; esta molécula semi estable es menos dañina que el anión superóxido, y puede convertirse a taurina en presencia de agua [10, 11].

La hipotaurina puede ser internalizada por el mismo sistema de transportes que la taurina, por TauT. En un estudio realizado con el objetivo de evaluar los transportadores de hipotaurina, comparándolos con el transporte de GABA y taurina, se observó que hipotaurina también puede ser transportada por los transportadores de GABA GAT 1, GAT 2 y GAT 3. Los resultados mostraron que GAT 1 puede transportar tanto a GABA como a hipotaurina, aunque la captación de hipotaurina es 10 veces menor que la de GABA, mientras que la captación de taurina a través de este transportador fue prácticamente inexistente. TauT mostró una captación significativa para taurina e hipotaurina, en tanto la captación de GABA fue discreta. Para el caso de GAT 3, existió una captación importante de GABA, la captación de hipotaurina fue 5 veces menor que la de GABA, pero no existió para taurina. GAT 2, mostró captación significativa para las tres moléculas, sin embargo, la captación de GABA e hipotaurina fue dos veces mayor en comparación con taurina. Estos resultados demostraron que los principales transportadores de hipotaurina son

TauT y GAT 2, no obstante, existió una mejor captación por todos los transportadores para hipotaurina que para taurina, lo que representa una alternativa de entrada en caso de que los sistemas de internalización principales se encuentren alterados [26].

1.7.3 Evidencias de los análogos estructurales de taurina en procesos neurogénicos

En una investigación realizada en el laboratorio, se determinó el rol de la homotaurina e hipotaurina en el proceso de proliferación de NPC-SVZ. Para cada análogo de taurina se utilizaron tres concentraciones diferentes (2.5 mM, 10 mM y 30 mM). Se determinó que la concentración más efectiva para homotaurina fue de 2.5 mM y para hipotaurina de 10 mM. Se realizaron ensayos de bromodesoxiuridina (BrdU) para evaluar el índice de proliferación de las NPC-SVZ. Los resultados mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células BrdU positivas en los cultivos tratados como homotaurina e hipotaurina. Existió un incremento de 73% para el caso de homotaurina a su concentración más eficaz de 2.5 mM, mientras que el incremento fue de un 37% para el caso de hipotaurina, a su concentración más eficaz de 10 mM. Estos resultados permiten sugerir que ambos análogos fungen como promotores del proceso de proliferación de NPC-SVZ [14].

2. Justificación

Las enfermedades neurodegenerativas, neuropsiquiátricas, las lesiones nerviosas y las alteraciones neurológicas asociadas al envejecimiento, son padecimientos con una alta tasa de incidencia, cuyo tratamiento retrasa la progresión, pero no revierte el daño. Es por ello, por lo que resulta prioritario la investigación en moléculas que puedan actuar sobre estos trastornos de manera más directa. La taurina presenta grandes beneficios en procesos fisiológicos y entidades patológicas, sin embargo, dada su dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica, es factible pensar en la posibilidad de que sus análogos, dada su similitud estructural mimeticen dichas actividades, e incluso puedan potenciarlas, representando una alternativa al uso de taurina. Al ser esta un área con pocos indicios y evidencias, existe un gran campo exploratorio para la ciencia. Es por ello, que es importante abundar en el estudio de

estos análogos y sus actividades.

3. Hipótesis

Los análogos estructurales de taurina (hipotaurina, homotaurina) favorecerán el proceso de diferenciación de las NPC-SVZ.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar si los análogos estructurales de taurina favorecen la diferenciación de células progenitoras neurales.

4.2 Objetivos específicos

- I. Determinar la expresión de marcadores de células neurales (doblecortina) y astrocitos (GFAP) durante el proceso de diferenciación celular, en cultivos de NPC SVZ disgregadas y tratadas con homotaurina.
- II. Determinar la expresión de marcadores de células neurales (doblecortina) y astrocitos (GFAP) durante el proceso de diferenciación celular, en cultivos de NPC SVZ disgregadas y tratadas con hipotaurina.
- III. Evaluar la morfología celular y los procesos de crecimiento de neuritas primarias, secundarias, terciarias y de orden superior inducidas en las NPC SVZ expuestas a homotaurina.
- IV. Evaluar la morfología celular y los procesos de crecimiento de neuritas primarias, secundarias, terciarias y de orden superior inducidas en las NPC SVZ expuestas a hipotaurina.

5. Metodología

5.1 Animales y diseño experimental

La investigación se realizó con estricto apego a los lineamientos del Comité de Ética Institucional y la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio NOM-062-ZOO 1999. Además de la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.2 Cultivo celular primario

Para obtener NPC-SVZ, se utilizó un total de 12 ratones CD1 de 6 días de edad,

distribuidos en 3 grupos experimentales. De cada grupo experimental (4 ratones) se obtuvo un cultivo. Los animales fueron donados por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, una vez recogidos del bioterio, fueron transportados al laboratorio, donde se decapitaron al llegar. Se realizó la extracción del cerebro, seguidamente se aisló la SVZ. El tejido seleccionado se colocó en un medio especial DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12. Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.), se disoció mecánicamente y se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm. Posterior a la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, y el botón de tejido obtenido se resuspendió y cultivó en un medio para favorecer la proliferación. El medio de cultivo DMEM/F12 se suplementó con B27, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Las células se mantuvieron en el medio de proliferación, en una incubadora a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. El cultivo fue reestimulado con EGF y FGF () cada 72 horas, con la finalidad de promover el crecimiento de las neuroesferas y mantener las células indiferenciadas [36]. Después de 7 días, las neuroesferas primarias se disgregaron de manera mecánica, se centrifugaron y se repitió la metodología utilizada para sembrar las neuroesferas primarias. Se dejaron en la incubadora en las condiciones mencionadas por 7 días, las neuroesferas obtenidas se denominaron neuroesferas secundarias.

5.3 Ensayo de diferenciación celular de NPC-SVZ

Para el proceso de diferenciación de NPC-SVZ, las neuroesferas secundarias fueron disgregadas mecánicamente y se sembraron en 24 pozos pretratados con poli-D-lisina y medio de diferenciación. El medio de diferenciación se compone por DMEM/F12, suplementado con suero fetal bovino al 1% y B27 al 1%. Este medio se complementó con los análogos de taurina : homotaurina (2.5 mM) e hipotaurina (10 mM). Las concentraciones para cada análogo fueron tomadas con base en experimentos anteriores, donde se utilizaron estos análogos en el proceso de proliferación y se determinaron las concentraciones más eficaces. De tal manera, que existieron 4 condiciones experimentales: grupo control (sin tratamiento), control positivo (taurina 10 mM), homotaurina 2.5 mM e hipotaurina 10 mM.

Condiciones Experimentales	
Análogos	
Homotaurina	2.5 mM
Hipotaurina	10 mM
Control	
Taurina	10 mM

5.4 Ensayos de inmunofluorescencia

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos de duración cada uno, con solución salina tamponada con fosfato (PBS). La permeabilización se llevó a cabo con PBS + tritón 0.2% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró la solución de PBS- tritón, y se colocó una solución para bloqueo de PBS + tritón 0.2% + BSA (10 mg/ml), incubándose a temperatura ambiente por 1 hora. En seguida, las células fueron incubadas durante una noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: nestina (Cell Signaling Technology Cat# 4760, RRID:AB_2235913) [1:500], proteína fibrilar ácida glial (GFAP; Cell Signaling Technology Cat# 12389, RRID:AB_2631098) [1:500] y doblecortina (DCX; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-271390, RRID:AB_10610966) [1:500]. Posterior a la noche de incubación, se realizaron tres lavados con duración de 10 minutos cada uno, con PBS. Al finalizar el último lavado, se realizó la incubación con anticuerpos secundarios por 1 hora: Alexa Fluor-488 anti-conejo [1:500] para GFAP y Alexa Fluor-647 anti-ratón [1:500] para nestina y DCX. Terminada la incubación con los anticuerpos secundarios, se hicieron tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Al finalizar el último lavado se añadió una solución de DAPI (20 µg/mL) en agua destilada, para teñir núcleos, durante 15 minutos y dos lavados adicionales con agua destilada.

5.5 Análisis cuantitativo de marcadores celulares

Las microfotografías fueron obtenidas con el lector de placas multimodo de imágenes celulares Cytation™ 5. Con las microfotografías tomadas, se

seleccionaron de manera aleatoria cinco campos diferentes de cada pozo para cuantificar el número total de células (DAPI positivas) y células positivas para cada uno de los diferentes marcadores utilizados. Se determinó el porcentaje de células positivas para cada marcador (DCX y GFAP) con respecto al número total de células (DAPI +). Posteriormente se tomó como el 100% el porcentaje de células DCX+ y GFAP+ del grupo control, respecto a este porcentaje se determinó el porcentaje de células DCX+ y GFAP+ respectivamente, para los grupos de taurina, homotaurina e hipotaurina. Las imágenes de las células se procesaron con el software Gen5™ (BioTek Instruments Inc.).

5.6. Análisis morfométrico de células DCX positivas

Se seleccionaron al azar microfotografías de células DCX+, con una lente de aumento de 20X. Se analizaron células DCX+ para cada condición experimental. Se llevo a cabo el análisis de Sholl de 8 neuronas por condición experimental, a doble ciego, éste fue realizado en el software Image J, STN. Posteriormente se determinó el número de neuritas primarias, secundarias, terciarias y de orden superior en las diferentes condiciones experimentales. Las neuritas primarias se definen como aquellas que se originan directamente del soma; las neuritas secundarias y terciarias como aquellas que se originen a partir de neuritas primarias y secundarias, respectivamente, las neuritas de orden superior como aquellas que se originan a partir de dendritas terciarias en adelante.

6. Análisis Estadístico

El análisis se llevó a cabo mediante el software Graphpad Prism 8. Se realizó análisis de varianza de una vía (ANOVA) en los casos que lo ameritaron. Los gráficos representan la media \pm error estándar de la media. En los casos de comparación de dos grupos, se utilizó la prueba *t-Student*. Los resultados fueron considerados con significancia estadística cuando $P < 0.05$.

7. Resultados

7.1. Caracterización de neuroesferas derivadas de NPC SVZ

El ensayo de neuroesferas, es un modelo *in vitro* que sirve para la obtención y expansión de NPCs y representa una valiosa herramienta que permite estudiar las propiedades celulares en un ambiente controlado. Este modelo busca mimetizar las propiedades de las NPCs: capacidad de autorrenovación, proliferación y diferenciación a células de linaje neuronal [5, 9,13].

Las neuroesferas se obtuvieron de NPC- SVZ de ratones CD1 de 6 días de nacidos (figura 1) y fueron cultivadas en un medio de proliferación. Cada neuroesfera consiste en un aglomeramiento de NPCs de la SVZ, que conforman un agrupamiento esférico. Las neuroesferas primarias que se observan en la figura 1A, se formaron posterior a 7 días de crecimiento en el medio de proliferación; en el núcleo de la neuroesfera se observa una zona más oscura en relación con la periferia. Esto se debe a que existe una mayor dificultad de que los nutrientes lleguen a las células del centro, lo que ocasiona un mayor índice de apoptosis en esta zona [5].

Posteriormente se llevó a cabo un pase de cultivo, en donde las neuroesferas primarias se disociaron mecánicamente, fueron centrifugadas y colocadas nuevamente en medio de proliferación por 7 días más (figura 1B). Los experimentos posteriores se realizaron con neuroesferas secundarias, ya que experimentos previos en el laboratorio sugieren que esto evita una estructura desorganizada (neuroesferas primarias) y por senescencia (neuroesferas terciarias) [13]. Una vez estandarizada la obtención de neuroesferas secundarias, se determinó la presencia de marcadores celulares. En la figura 1C se observan los marcadores DAPI (identificación de núcleos celulares) y el marcador nestina, que corrobora la presencia de células progenitoras neurales.

alteraciones

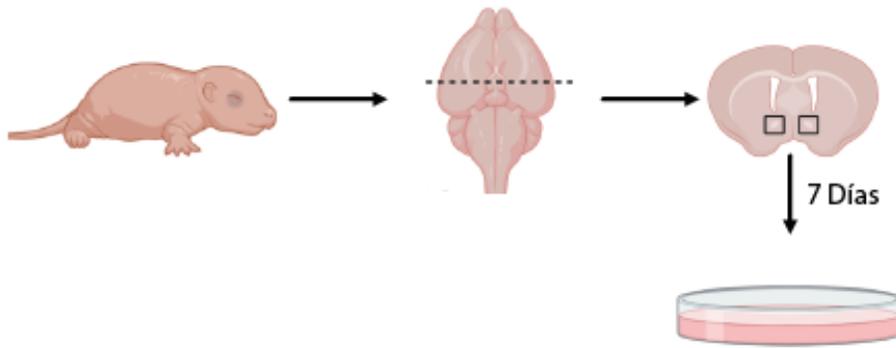


Figura 1. Modelo de obtención de neuroesferas.

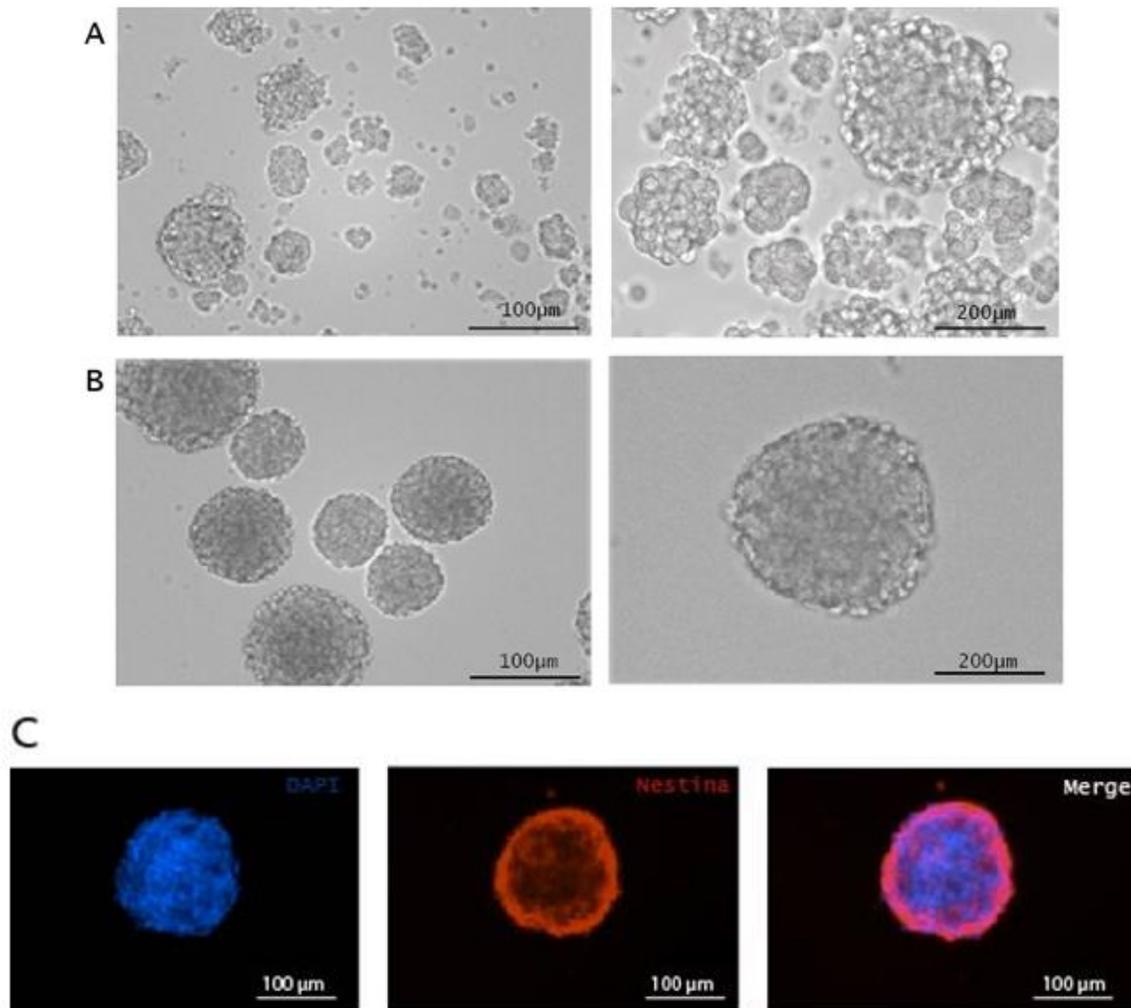
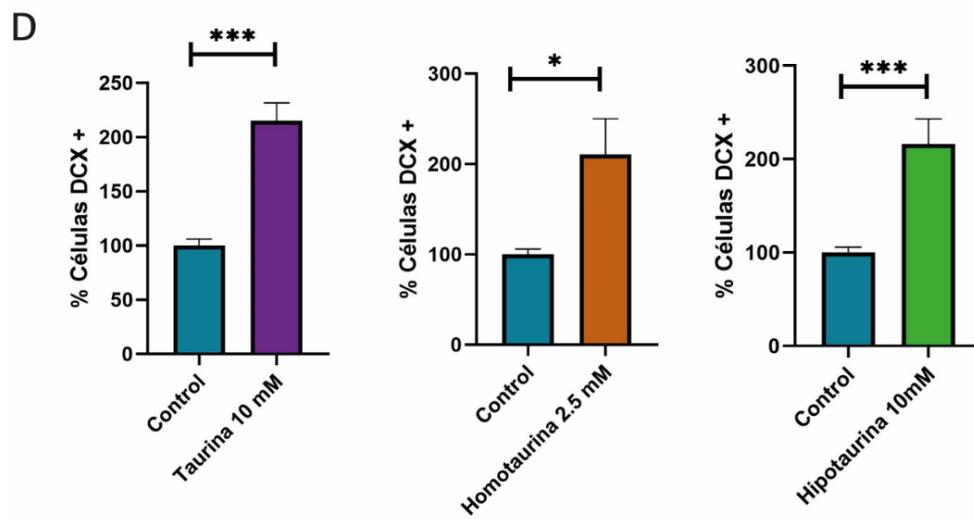
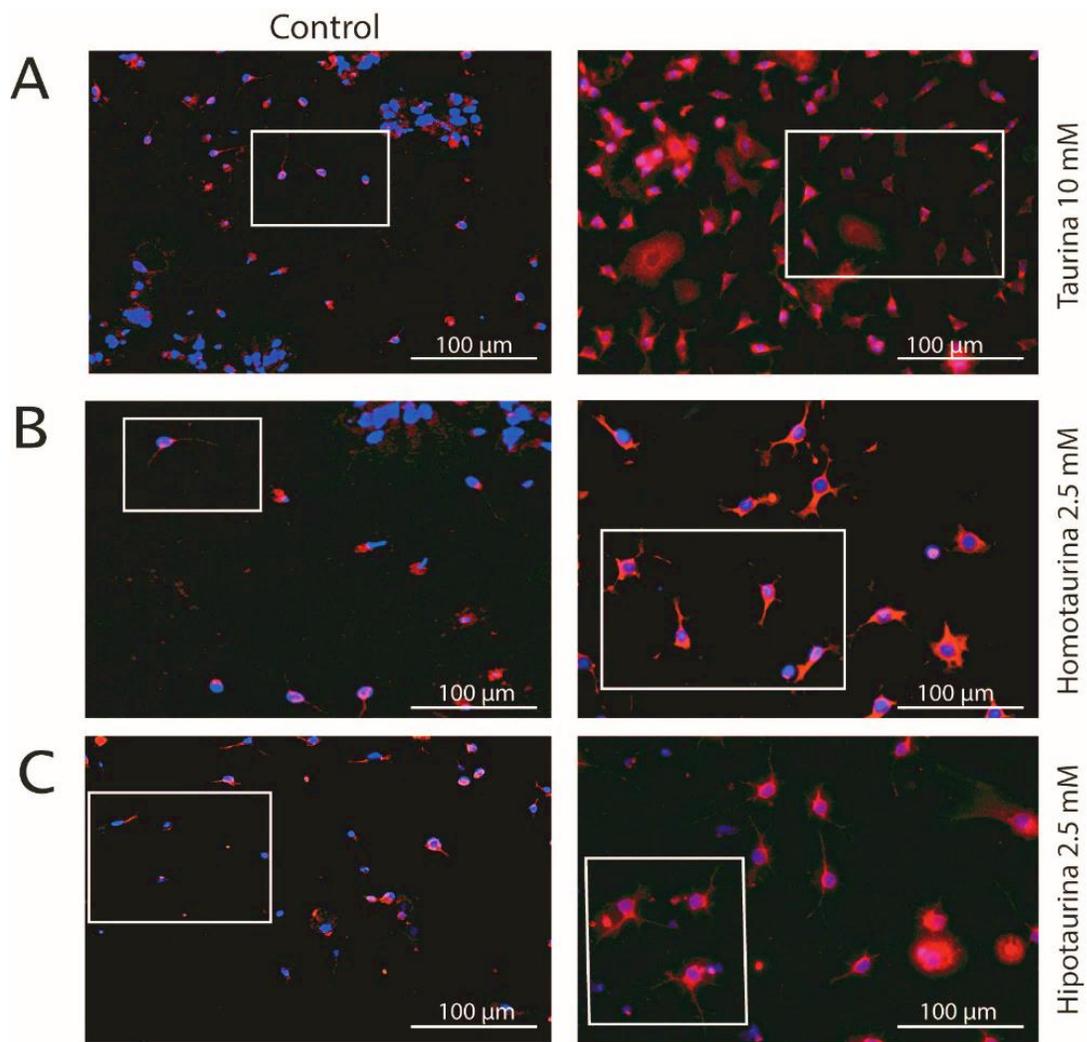


Figura 2. Neuroesferas primarias y secundarias obtenidas de NPCs-SVZ. Micrografías de imágenes representativas en microscopia de campo claro. A) neuroesfera primarias, B) neuroesferas secundarias. Las imágenes de la izquierda para ambos paneles corresponden a un aumento 10 X, las imágenes de la derecha corresponden a un aumento 20X. Marcadores celulares en NPCs-SVZ. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de una neuroesfera primaria. C) se observa a la neuroesfera con los núcleos celulares teñidos en azul y positivas a nestina en color rojo.

7.2. Expresión de marcadores celulares en NPC SVZ expuestas a taurina, homotaurina e hipotaurina

Se llevó a cabo la determinación de marcadores de NPC SVZ diferenciadas, utilizando el marcador DAPI para identificar núcleos celulares, y el marcador doblecortina (DCX), ya que estudios previos corroboran su utilidad como un marcador de neuronas. El propósito del marcaje con DCX fue determinar el porcentaje de células que se diferenciaron a tipo neuronal (expresión de DAPI y DCX) con respecto al tipo no neuronal (expresión solamente de DAPI). Para llevar a cabo el conteo de células DCX+, se seleccionaron de manera aleatoria cinco campos diferentes de cada pozo, para cuantificar el número total de células (DAPI+) y células positivas a DCX. Se determinó el porcentaje de células positivas a DCX con respecto al número total de células (DAPI+). Posteriormente, se consideró como un 100% el porcentaje de células DCX+ del grupo control, con base en este porcentaje se determinó el porcentaje de células DCX+ para cada tratamiento. Antes de realizar los ensayos de inmunofluorescencia, los cultivos fueron expuestos a taurina 10 mM (control positivo), homotaurina 2.5 mM e hipotaurina 10 mM durante un periodo de 14 días.

Los resultados muestran el porcentaje de NPC SVZ diferenciadas en neuronas. El cultivo expuesto a taurina 10 mM (figuras 3A, 3D) exhibió un incremento significativo (*t-Student*, $P < 0.05$) del 115.1% de células DCX+ con respecto al control. En el caso del grupo con homotaurina 2.5 mM (figuras 3B, 3D) como tratamiento, presentó un aumento significativo (*t-Student*, $P < 0.05$) del 110.3% de células DCX+, comparado con el control. Los resultados con hipotaurina 10 mM (figuras 3C, 3D), también demostraron un incremento significativo (*t-Student*, $P < 0.05$) de 116.2% de células DCX+ contra el grupo control. Además, las células que estuvieron expuestas a taurina, homotaurina o hipotaurina mostraron diferencias morfológicas notables (figura 2E), con respecto a las células control. Estas células exhibieron una morfología tipo neuronal, con somas más grandes y morfología en su mayoría multipolar. Los resultados sugieren a los análogos de taurina como promotores de la diferenciación de NPCs-SVZ en neuronas.



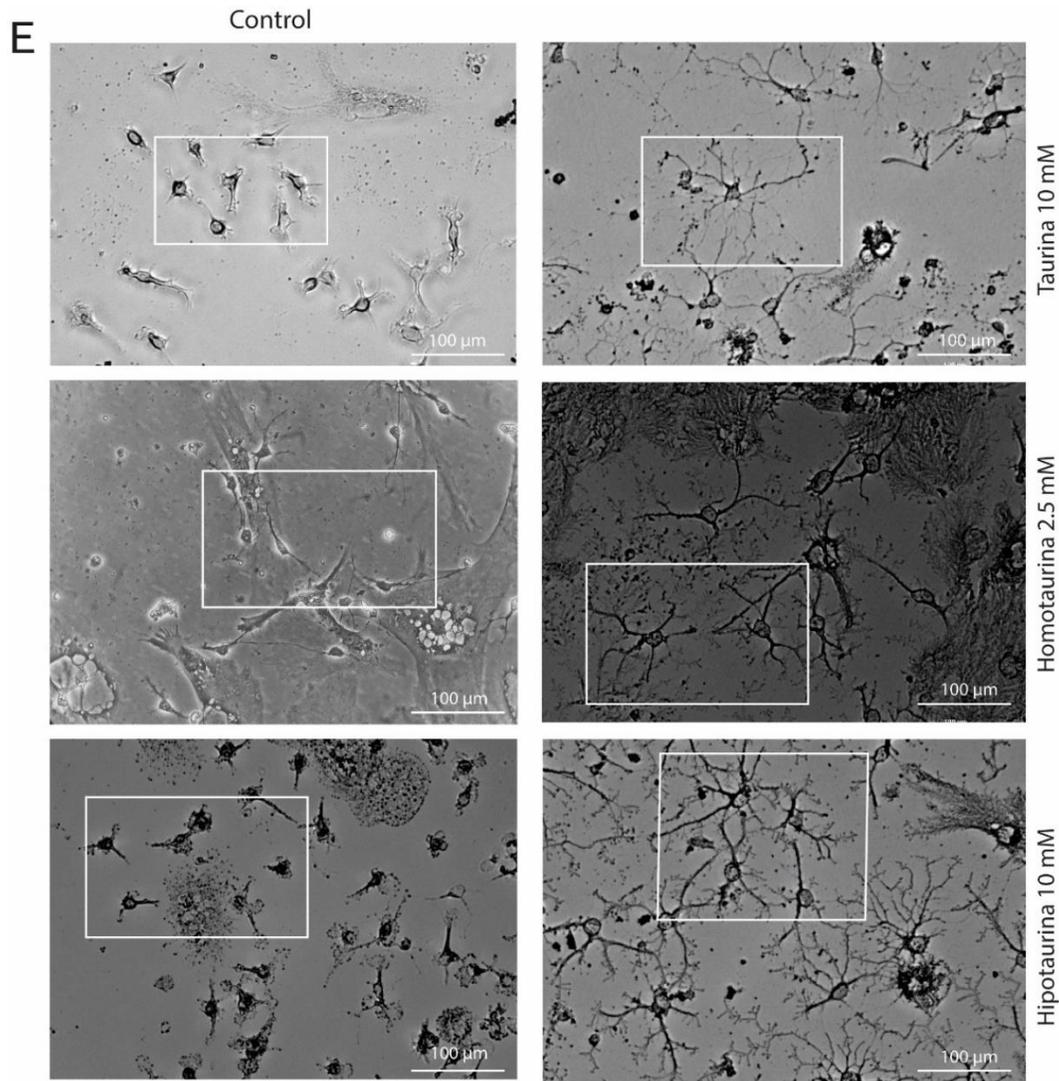
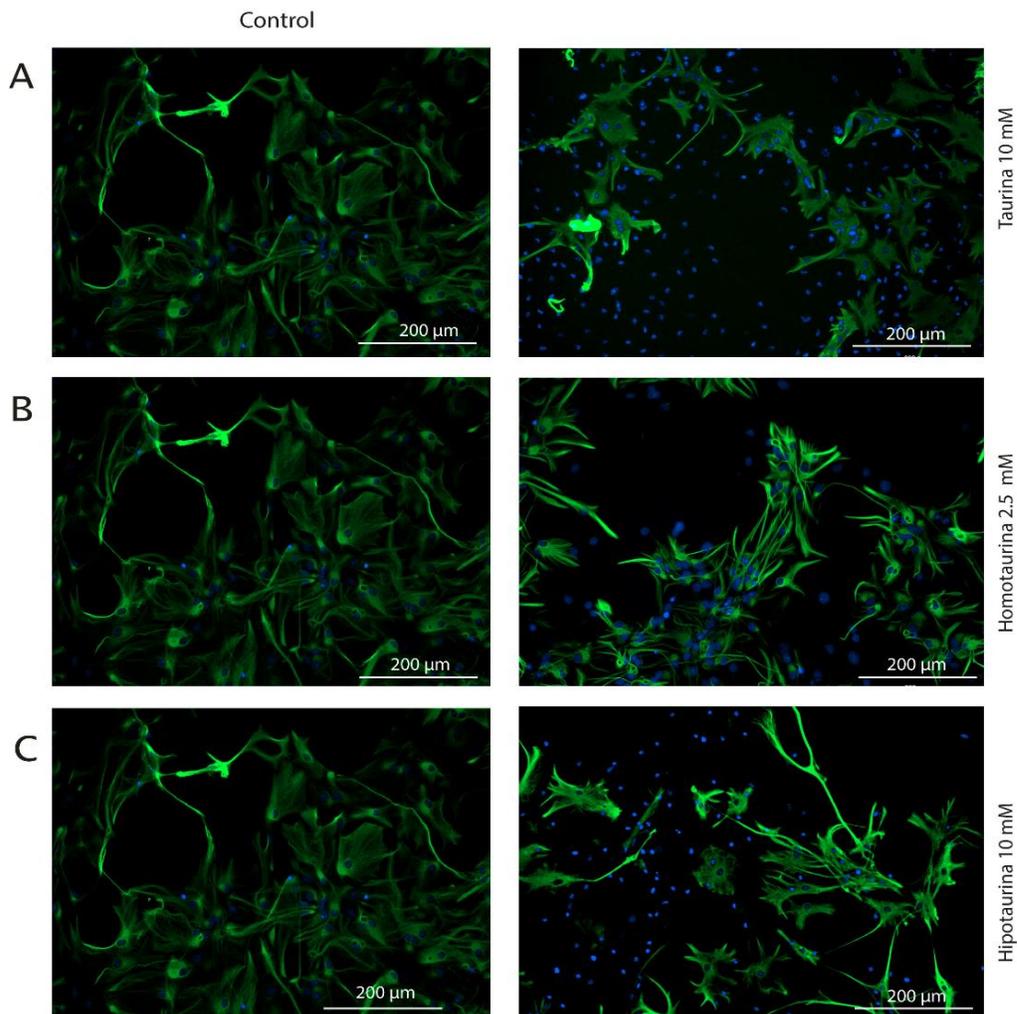


Figura 3. Porcentaje de NPCs-SVZ diferenciadas en neuronas. Micrografías de imágenes representativas de inmunofluorescencias con marcaje a DCX y DAPI. A) células DCX positivas en grupos control y taurina 10 mM, B) células DCX positivas en grupos control y homotaurina 2.5 mM C) células DCX positivas en grupos control e hipotaurina 10 Mm. D) barras que muestran los porcentajes de células DCX positivas en cada condición. n= 3 cultivos por condición experimental; representan la media \pm error estándar de la media; t- Student. *P<0.05. E) micrografías representativas de microscopia de campo claro que muestran la morfología generada con cada condición experimental.

Las NPC SVZ pueden diferenciarse en neuronas o células gliales, en el cultivo de neuroesferas se ha observado un mayor porcentaje de NPC diferenciadas hacia astrocitos [16]. Esto se debe a que el origen de las NPC que se diferencian, son células tipo B, conocidas como células tipo astrocito, lo que hace que las células mantengan una memoria celular. Para conocer el porcentaje de células

diferenciadas en astrocitos, en nuestros cultivos se realizó un marcaje con GFAP, y se realizó el conteo de células DCX + anteriormente descrito.

El porcentaje de células GFAP positivas en los cultivos tratados con taurina fue de 75.44% con respecto al grupo control con 100% (*t-Student*, $P < 0.05$) (figuras 4A, 5D). Para el caso de los cultivos tratados con homotaurina, el porcentaje de células GFAP+ fue de 75.53% (*t-Student*, $P < 0.05$) (figuras 4B, 5D). Mientras que con hipotaurina, sólo se observó un 58.07% de células GFAP+ (*t-Student*, $P < 0.05$) (figuras 4C, 5D). Consistente con previos estudios, se encontró que el mayor porcentaje de NPC SVZ se diferencian hacia el linaje astrocítico. Además, en estas células, se identificaron distintas morfologías astrocíticas, como la morfología estelar, con abundante citoplasma y morfologías alargadas.



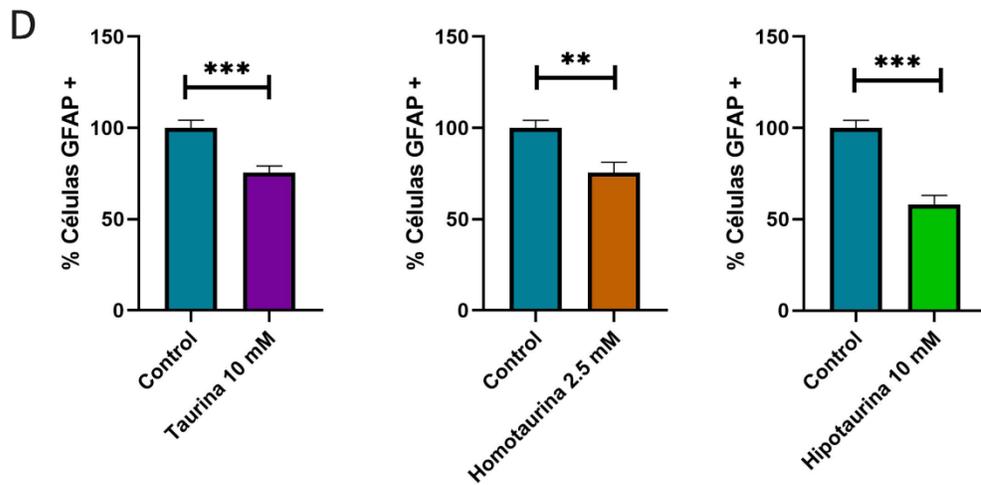
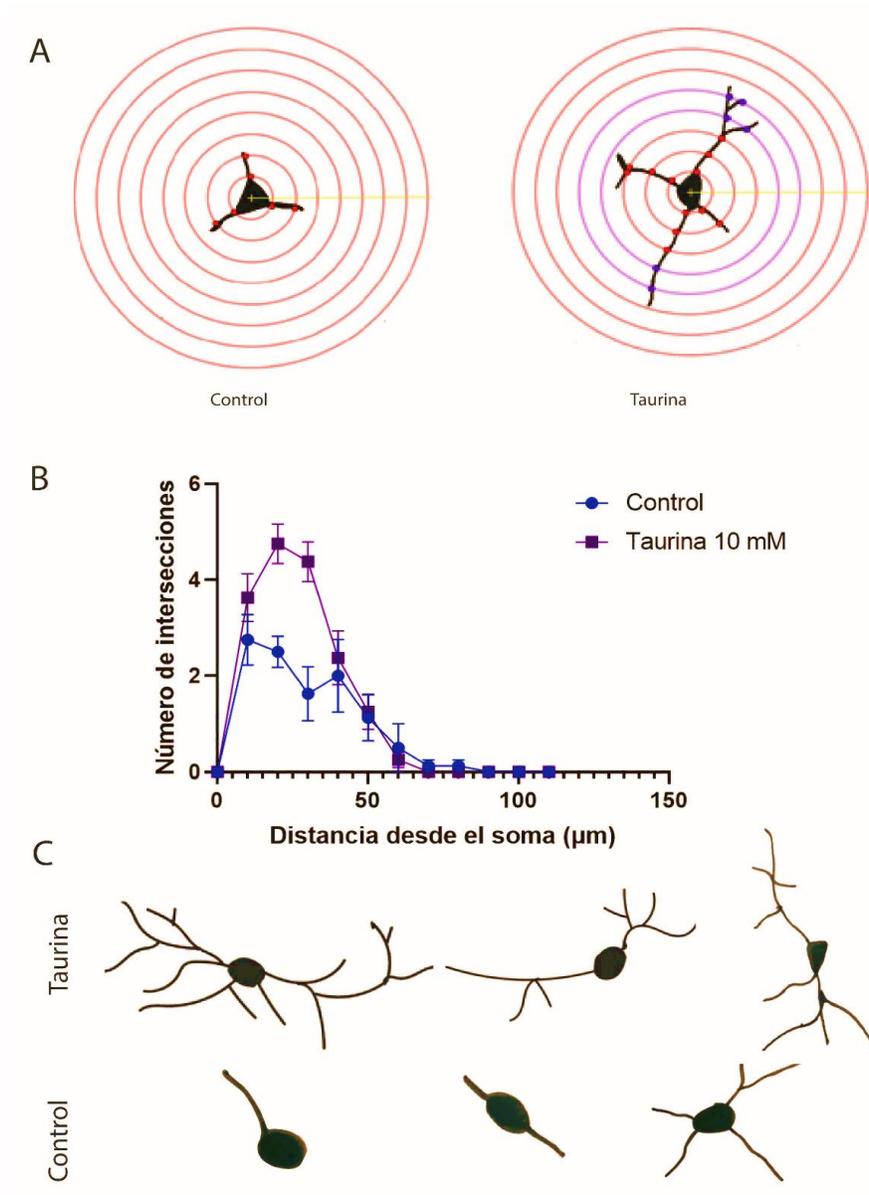


Figura 4. Porcentaje de NPCs-SVZ diferenciadas en astrocitos. Micrografías de imágenes representativas de inmunofluorescencias con marcaje a GFAP y DAPI. A) células GFAP positivas en grupos control y taurina 10 mM, B) células GFAP positivas en grupos control y homotaurina 2.5 mM C) células GFAP positivas en grupos control e hipotaurina 10 Mm. D) barras que muestran los porcentajes de células GFAP positivas en cada condición. n= 3 cultivos por condición experimental; representan la media \pm error estándar de la media; t- Student. *P<0.05.

7.3. Análisis morfométrico de células DCX positivas

El análisis de Sholl es una herramienta que sirve para poder analizar de una forma más exacta la morfología neuronal, incluidas las prolongaciones dendríticas y los crecimientos axonales. Esto se logra mediante la medición del número de intersecciones dendríticas (o axonales) que se generan desde el soma, a través de círculos concéntricos a una distancia fija establecida. El análisis de Sholl permite definir el patrón de crecimiento y ramificación del árbol dendrítico en función del espacio radial donde se expanden las dendritas en crecimiento. Realizamos análisis de Sholl para cada condición experimental; se seleccionaron al alzar micrografías representativas de 8 células tipo neuronal para cada condición. Al realizar la comparación de los grupos de tratamiento contra el control, es evidente la marcada diferencia entre las morfologías celulares. Las células del grupo control exhibieron una morfología en su mayoría bipolar, con núcleos pequeños. Además, en estas células el número de neuritas primarias, secundarias y terciarias fue menor, mientras que las dendritas de orden superior fueron inexistentes. En el caso de las células tratadas con taurina, homotaurina e hipotaurina, la morfología que presentaron fue más compleja (figuras 5, 6 y 7). La morfología celular fue multipolar en su mayoría, con núcleos grandes. El número de dendritas primarias, secundarias

y terciarias fue significativamente mayor, en comparación con el control (figura 5D). A diferencia del grupo control, en las tres condiciones experimentales si se pudieron cuantificar la presencia de dendritas de orden superior (figura 9). Con los resultados de estos análisis morfométricos, es posible sugerir a los análogos estructurales de taurina, como favorecedores de la complejidad neuronal, promoviendo la ramificación del árbol dendrítico, induciendo la maduración neuronal, medida por parámetros morfológicos.



D

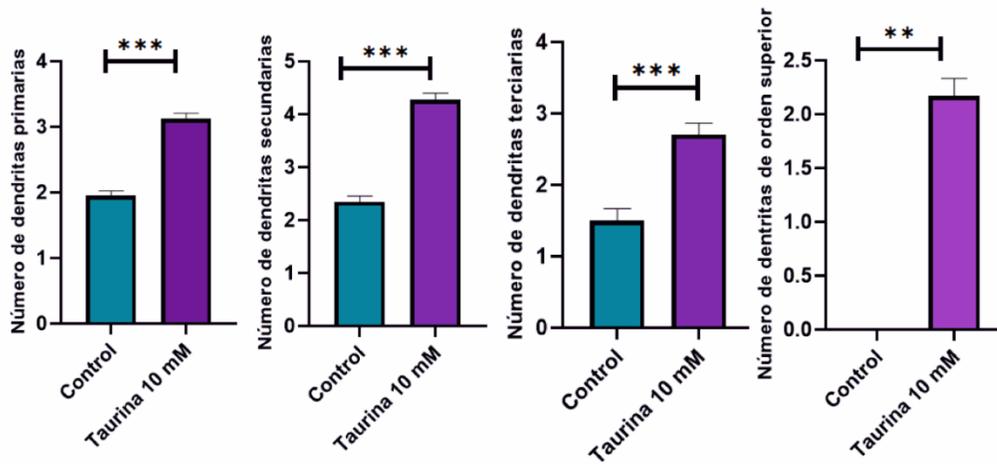


Figura 5. Análisis morfométrico de células DCX positivas expuestas a taurina. A) imágenes representativas que comparan los análisis de Sholl del grupo control y taurina. En el grupo expuesto a taurina se observa un mayor número de intersecciones a través de los círculos concéntricos, exhibiendo una morfología más compleja. B) gráfica que muestra el número de intersecciones de las 8 neuronas evaluadas para cada grupo. En el grupo tratado con taurina se observa un mayor número de intersecciones que se mantienen a lo largo de la distancia desde el soma. C) panel comparativo que muestra distintas morfologías celulares que fueron utilizadas para construir la gráfica para cada condición, se puede apreciar como en las distintas neuronas, las morfologías de células expuestas a taurina tienen un mayor número de neuritas. D) gráficas que muestran el número de dendritas primarias, secundarias, terciarias y de orden superior. El grupo expuesto a taurina tuvo un incremento significativo en el número de dendritas primarias, secundarias y terciarias. Además, en el grupo control no se observan dendritas de orden superior. n= 79 células por condición; representan la media \pm error estándar de la media; t- Student. *P<0.05

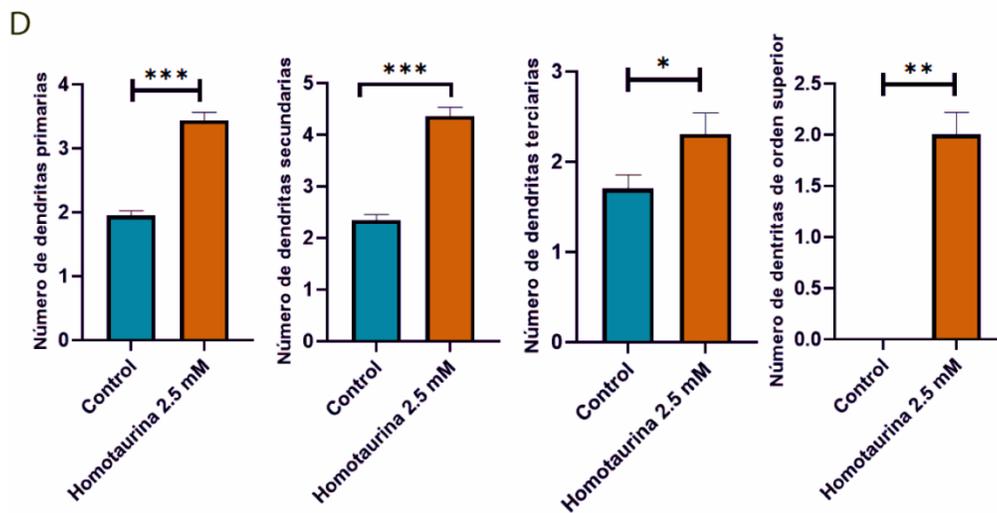
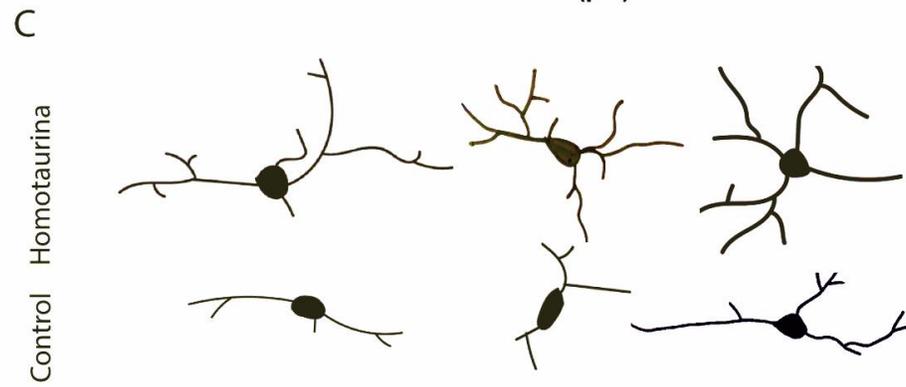
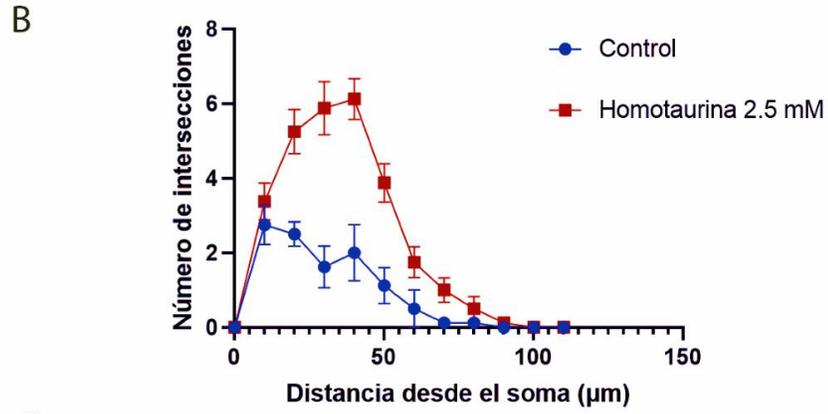
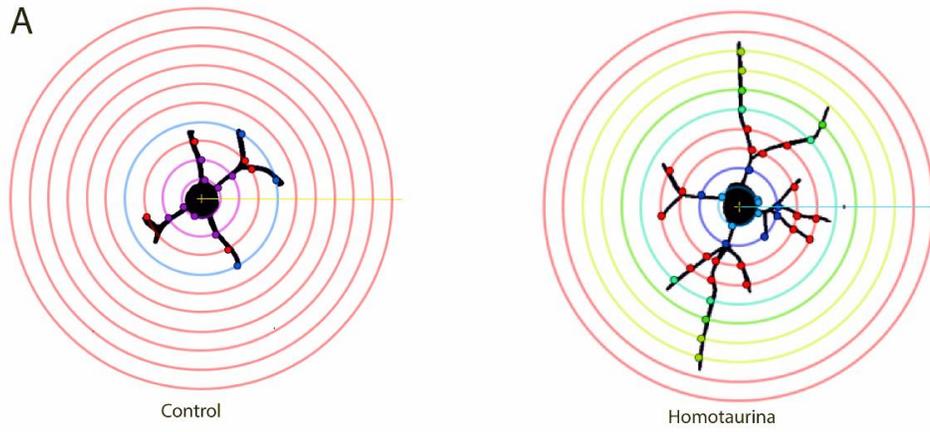
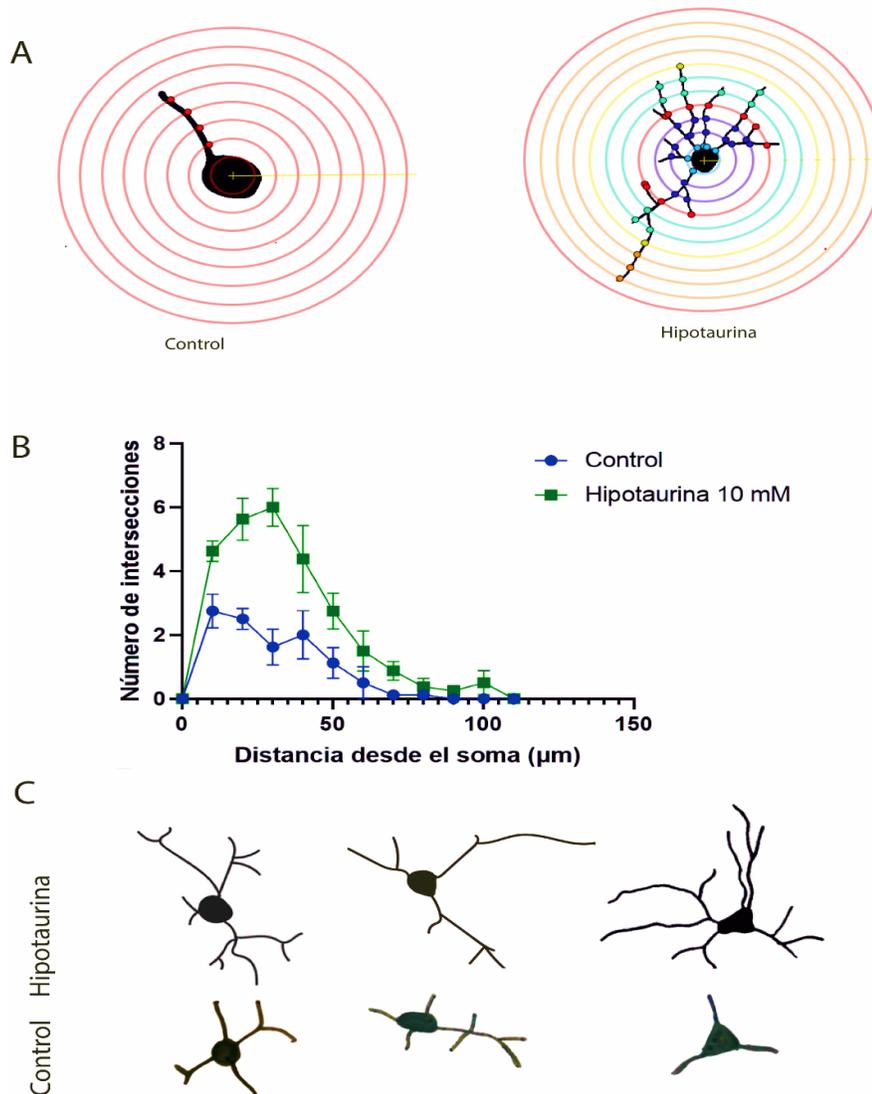


Figura 6. Análisis morfométrico de células DCX positivas expuestas a homotaurina A) imágenes representativas que comparan los análisis de Sholl del grupo control y homotaurina. En el grupo expuesto a homotaurina se observa un mayor número de intersecciones a través de los círculos concéntricos, exhibiendo una morfología más compleja. B) gráfica que muestra el número de intersecciones de las 8 neuronas evaluadas para cada grupo. En el grupo tratado con homotaurina, se observa un mayor número de intersecciones que se mantienen a lo largo de la distancia desde el soma .C) panel comparativo que muestra distintas morfologías celulares que fueron utilizadas para construir la gráfica para cada condición, se puede apreciar como en las distintas neuronas, las morfologías de células expuestas a homotaurina tienen un mayor número de neuritas. D) gráficas que muestran el número de dendritas primarias, secundarias, terciarias y de orden superior. El grupo expuesto a homotaurina tuvo un incremento significativo en el número de dendritas primarias, secundarias y terciarias. Además, en el grupo control no se observan dendritas de orden superior. n= 79 células control, 41 células homotaurina; representan la media \pm error estándar de la media; t-Student. *P<0.05



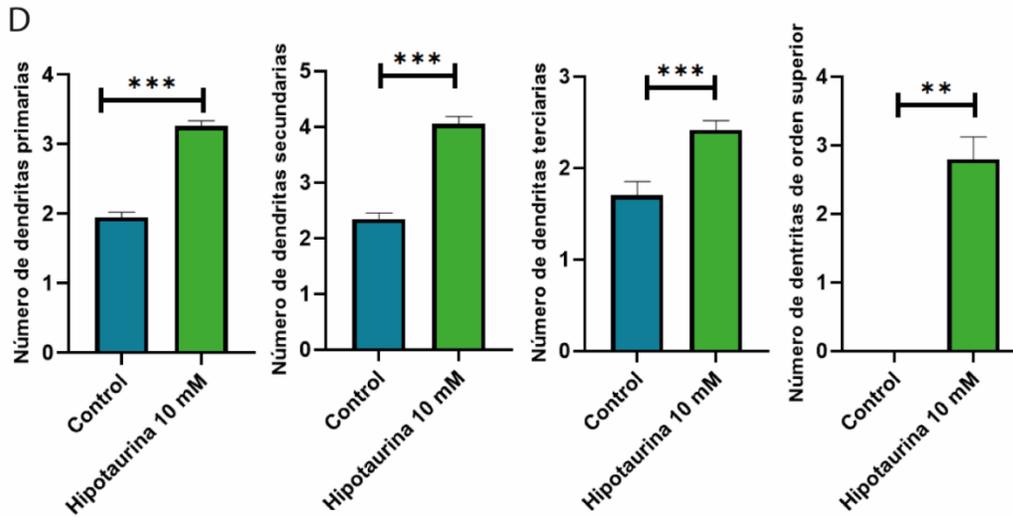


Figura 7. Análisis morfométrico de células DCX positivas expuestas a hipotaurina. A) imágenes representativas que comparan los análisis de Sholl del grupo control e hipotaurina. En el grupo expuesto a hipotaurina se observa un mayor número de intersecciones a través de los círculos concéntricos, exhibiendo una morfología más compleja. B) gráfica que muestra el número de intersecciones de las 8 neuronas evaluadas para cada grupo. En el grupo tratado con hipotaurina se observa un mayor número de intersecciones que se mantienen a lo largo de la distancia desde el soma. C) panel comparativo que muestra distintas morfologías celulares que fueron utilizadas para construir la gráfica para cada condición, se puede apreciar como en las distintas neuronas, las morfologías de células expuestas a hipotaurina tienen un mayor número de neuritas. D) gráficas que muestran el número de dendritas primarias, secundarias, terciarias y de orden superior. El grupo expuesto a hipotaurina tuvo un incremento significativo en el número de dendritas primarias, secundarias y terciarias. Además, en el grupo control no se observan dendritas de orden superior. n= 79 células por condición; representan la media \pm error estándar de la media; t- Student. *P<0.05

B

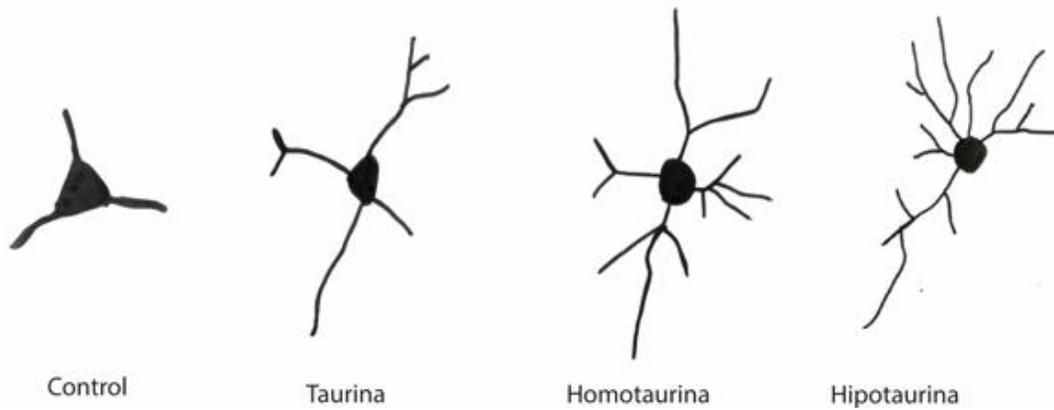


Figura 8. Resumen del análisis de los análisis de Sholl. A) gráfica que demuestra que, en los tres tratamientos, existe un mayor número de intersecciones dendríticas que se mantienen a lo largo del soma, en comparación con el grupo control. B) Panel con imágenes representativas de las morfologías celulares en cada condición experimental. Los grupos tratados exhiben una morfología más compleja que el grupo control.

8. Discusión

Los resultados de esta tesis de investigación proporcionan evidencia experimental de la capacidad de las NPC SVZ para generar células con marcadores y morfología neuronal al ser tratadas con los análogos estructurales de taurina, homotaurina e hipotaurina. Además, se observó una marcada diferencia entre las células generadas en el grupo control y las células de los grupos de tratamiento. Esto permite poder postular a estos análogos, como promotores de la diferenciación y de la morfología neuronal. La existencia de la neurogénesis ha sido un tema ampliamente debatido por mucho tiempo, sin embargo, actualmente es conocido que este proceso existe en áreas específicas del cerebro y que ocurre de manera continua a lo largo de la vida. Las NPCs derivadas de estas regiones, participan en los procesos de reparación y regeneración de tejidos neuronales [32]. Al generarse NPCs altamente proliferativas, con capacidad de producir neuronas, resulta interesante pensar en su papel como una posibilidad terapéutica en la regeneración neural. Asimismo, el poder identificar compuestos que puedan favorecer la diferenciación neuronal, resulta prioridad, pues permitiría recuperar la deficiencia de células neurales en enfermedades neurodegenerativas, lesiones nerviosas y en

alteraciones ligadas al envejecimiento. Existe evidencia reciente, que sugiere que una deficiencia en los niveles de taurina podría ser un promotor del envejecimiento, mientras que la suplementación con taurina puede incrementar el tiempo de supervivencia. Se midieron los niveles de taurina séricos en dos modelos animales y se suplementó la dieta de los animales con taurina por vía oral hasta el final de su vida. Los investigadores observaron que los animales alimentados con taurina sobreviven más que los ratones control. La media de vida de los ratones tratados se incrementó en un 12%. Lo que permitió señalar a los autores, a la taurina como una posibilidad de suplemento para aminorar los daños producidos por el envejecimiento [33].

Taurina, homotaurina e hipotaurina favorecen el proceso de diferenciación de NPCs-SVZ en células de tipo neuronal.

En nuestro trabajo, la exposición de NPC SVZ expuestas a homotaurina o hipotaurina promovió favorablemente la diferenciación de células que desarrollaron aspecto neuronal, tanto por su morfología como por la expresión de marcadores. Existe evidencia de que taurina promueve la diferenciación neuronal. En una investigación realizada con NPC SVZ, en nuestro equipo de trabajo, se demostró que la taurina promueve la diferenciación neuronal, ya que las células tratadas con taurina tuvieron un incremento en el porcentaje de células DCX+, un número mayor de ramificaciones dendríticas y propiedades electrofisiológicas similares a la de una neurona madura. Este mecanismo se lleva a cabo por medio de los receptores GABA-A, ya que su inhibición con picrotoxina, disminuye la diferenciación neuronal [13]. Es posible que la homotaurina e hipotaurina, dada la característica en su similitud estructural funcional, también ejerzan su acción mediante la activación de receptores GABA-A, proceso que favorecería la diferenciación de tipo neuronal. Durante la etapa de neuroblasto, el interior de la célula presenta una concentración más elevada de Cl^- que el exterior. Esto se debe principalmente a una sobreexpresión del cotransportador NKCC1, que permite la entrada de Cl^- al interior de la célula. Además de que existe una disminución de la expresión del cotransportador KCC2, que favorece la salida de Cl^- [31]. Estas dos condiciones

favorecen que la concentración de Cl^- sea elevada, haciendo el interior más negativo que el exterior. En neuronas maduras, estas condiciones son opuestas, por lo que las mayores concentraciones de Cl^- se encuentran en el exterior. La activación de los receptores ionotrópicos de GABA, tradicionalmente provocan una hiperpolarización de la neurona debido al influjo de Cl^- ; sin embargo, en los neuroblastos, dadas las características propias del neurodesarrollo, la apertura del poro del canal del receptor GABA_A , promueve la salida de este ion del interior celular, promoviendo un proceso de despolarización, que permite la entrada masiva de Ca^{2+} y posterior liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, que consecuentemente desencadena mecanismos moleculares y bioquímicos que favorecen el proceso de diferenciación neuronal. Una consecuencia adicional de esta activación neuronal es la estimulación de los mecanismos que subyacen el desarrollo de la complejidad morfológica del árbol dendrítico. Nosotros proponemos que los análogos de taurina podrían actuar mediante este mecanismo.

Existe evidencia de la acción de homotaurina como un agonista de receptores GABA_A . Un trabajo evaluó el papel de la homotaurina y su interacción con los receptores GABA_A en un modelo de esclerosis múltiple y determinó que la homotaurina tiene una afinidad 3 veces mayor que el GABA por receptores GABA_A clásicos [7,35]. Esta mayor afinidad puede propiciar que los mecanismos de diferenciación inducidos a través de la interacción con receptores GABA ocurran de manera más eficaz a menores concentraciones. Además, los receptores GABA_A consisten en combinaciones pentaméricas de diferentes subunidades que determinan su funcionamiento en el SNC, por lo que es importante considerar su conformación. Además de que las distintas conformaciones de receptores GABA_A , varían acorde al estado de desarrollo. Durante etapas tempranas del neurodesarrollo, las subunidades α_2 , $\beta_2/3$ son prominentes mientras que la subunidad α_1 es escasa. A medida que avanza el desarrollo, las subunidades α_1 aumentan su expresión, en tanto las subunidades α_2 la disminuye, y la expresión de las subunidades $\beta_2/3$ no se altera [33]. Investigaciones publicadas sugieren a la taurina como un agonista débil de los receptores GABA_A , sin embargo, en estudios

más recientes se ha visto que su acción está ligada particularmente a la conformación de estos receptores. Los receptores con subunidades $\alpha 1$ o $\alpha 2$ tienen baja afinidad por la taurina, en tanto que, los constituidos por subunidades $\alpha 4$, $\beta 2$ y δ (tálamo) o $\alpha 6$, $\beta 2$ y δ (hipocampo) tienen una mayor afinidad por la taurina [28, 29]. En el caso de los análogos estructurales de taurina, existe poca información de su afinidad a los receptores GABA-A y su relación con la combinación de subunidades que los conforman. Una serie de ensayos competitivos sugieren que la homotaurina e hipotaurina compiten con GABA por su sitio de unión, además de mostrar que son agonistas parciales de los receptores GABAC-p1 [27]. Es probable que homotaurina e hipotaurina expresen afinidades distintas por receptores GABA_A, y por distintas conformaciones, y que dada esta afinidad ejerzan su acción, promoviendo la diferenciación. Además, es importante tomar en cuenta que, en nuestro modelo de cultivo, no conocemos los subtipos de receptores GABA_A que se estén expresando en las células tipo neuronal, lo que podría influir en el proceso de diferenciación. Resulta importante que, en investigaciones futuras se busque conocer la expresión de estos receptores, para poder hacer un análisis más a detalle, del mecanismo por el que los análogos están favoreciendo la diferenciación.

Por otro lado, es conocido que taurina también tiene afinidad por receptores de glicina. Las concentraciones de taurina y análogos utilizadas en este trabajo, aunque se encuentran dentro de rangos fisiológicos, son elevadas, lo que favorece que muchos mecanismos moleculares y bioquímicos se desencadenen, independientemente de su acción sobre receptores GABA. Por ejemplo, existe evidencia de que hipotaurina, también puede actuar sobre receptores glicinérgicos. En esta investigación, la inyección de hipotaurina intratecal en ratas, suprimió el dolor neuropático. Los autores sugieren que esta regulación nociceptiva se da mediante la activación de receptores de glicina [15]. Es factible pensar que los análogos también actúen por otros mecanismos, al a otros receptores como el de glicina.

Nuestros resultados, demuestran que los análogos de taurina promueven la

diferenciación de NPC-SVZ hacia el linaje neuronal; pues los datos obtenidos a través de marcadores neuronales y de la morfología, apoyan esta afirmación. No obstante, es prioritario pensar en probar que las células que en apariencia son neuronas, funcionen de manera similar a una neurona madura, por lo que es fundamental, que en investigaciones posteriores se realicen estudios electrofisiológicos que apoyen estos resultados.

Células astrocíticas en el cultivo de NPC SVZ

La evaluación de la población de NPC SVZ que se diferenciaron a astrocitos, fue mayor que las que se diferenciaron a células tipo neuronal. Esto coincide con investigaciones previas que mostraron que el porcentaje de células astrocíticas en este tipo de cultivo es de alrededor del 89.6% [16]. Sin embargo, el porcentaje de células diferenciadas en astrocitos, a pesar de que fue mayor que el tipo neuronal, fue más bajo en los grupos de tratamiento en comparación con el grupo control. Pensamos que esto puede deberse, a que esas células en lugar de diferenciarse en el linaje astrocítico, pudieron diferenciarse a células tipo neuronal, células que no fueron marcadas o células que murieron.

9. Conclusión

Los datos obtenidos en este trabajo nos permiten corroborar en primer lugar, la presencia de marcadores celulares como la nestina en el modelo *in vitro* de neuroesferas, es decir, validamos la presencia de células progenitoras neurales. También nos sugiere que los análogos estructurales de taurina, homotaurina e hipotaurina promueven la diferenciación de NPC SVZ, al incrementar el porcentaje de células DCX positivas, y aumentar la complejidad del árbol dendrítico de las células tipo neuronal generadas.

Al ser un proyecto exploratorio, existen muchos puntos aún por investigar, en especial aquellos relacionados con el probable mecanismo de acción. Sin embargo, al obtener resultados favorables, esto abre la puerta a que alguno de estos compuestos, en un futuro pueda ser útil en la terapéutica de padecimientos de índole neurológico.

10. Perspectivas

- Determinar las propiedades electrofisiológicas pasivas y activas de las células tratadas con homotaurina o hipotaurina.
- Determinar el efecto de los análogos en la maduración de las células neuronales generadas a partir de NCP, a través de registros electrofisiológicos.
- Explorar mecanismos adicionales a la acción sobre receptores GABA, mediante los cuales los análogos de taurina pueden favorecer la diferenciación neuronal.
- Investigar posibles sistemas de internalización de los análogos estructurales de taurina.
- Estudiar el porcentaje de conversión de hipotaurina a taurina.
- Evaluar parámetros farmacocinéticos de los análogos estructurales de taurina.

11. Referencias

1. Aisen, P. S., Gauthier, S., Ferris, S. H., Saumier, D., Haine, D., Garceau, D., Duong, A., Suhy, J., Oh, J., Lau, W. C., & Sampalis, J. (2011). Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - A randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the alphase study). *Archives of Medical Science*, 7(1). <https://doi.org/10.5114/aoms.2011.20612>
2. Andrade, S., Nunes, D., Dabur, M., Ramalho, M. J., Pereira, M. C., & Loureiro, J. A. (2023). Therapeutic Potential of Natural Compounds in Neurodegenerative Diseases: Insights from Clinical Trials. In *Pharmaceutics* (Vol. 15, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010212>
3. Baliou, S., Kyriakopoulos, A. M., Goulielmaki, M., Panayiotidis, M. I., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2020). Significance of taurine transporter (TauT) in homeostasis and its layers of regulation (review). *Molecular Medicine Reports*, 22(3). <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11321>
4. Cebrian-Silla, A., Nascimento, M. A., Redmond, S. A., Mansky, B., Wu, D., Obernier, K., Rodriguez, R. R., Gonzalez-Granero, S., Garcia-Verdugo, J. M., Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2021). Single-cell analysis of the ventricular-subventricular zone reveals signatures of dorsal and ventral adult neurogenic lineages. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.67436>
5. da Silva Siqueira, L., Majolo, F., da Silva, A. P. B., da Costa, J. C., & Marinowic, D. R. (2021). Neurospheres: a potential in vitro model for the study of central nervous system disorders. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 48, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06301-4>
6. Gervais F, Paquette J, Morissette C, Krzywkowski P, Yu M, Azzi M, Lacombe D, Kong X, Aman A, Laurin J, Szarek WA, Tremblay P. Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol Aging*. 2007 Apr;28(4):537-47. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.015. Epub 2006 May 3. PMID: 16675063.
7. Ghit, A., Assal, D., Al-Shami, A. S., & Hussein, D. E. E. (2021). GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. In

- Journal of Genetic Engineering and Biotechnology (Vol. 19, Issue 1).
<https://doi.org/10.1186/s43141-021-00224-0>
8. Gil-Perotín, S., Duran-Moreno, M., Cebrián-Silla, A., Ramírez, M., García-Belda, P., & García-Verdugo, J. M. (2013). Adult neural stem cells from the subventricular zone: A review of the neurosphere assay. *Anatomical Record*, 296(9). <https://doi.org/10.1002/ar.22746>
 9. Goto-Silva, L., Martins, M., Murillo, J. R., Souza, L. R. Q., Vitória, G., Oliveira, J. T., Nascimento, J. M., Loiola, E. C., Nogueira, F. C. S., Domont, G. B., Guimarães, M. Z. P., Tovar-Moll, F., Rehen, S. K., & Junqueira, M. (2021). Quantitative profiling of axonal guidance proteins during the differentiation of human neurospheres. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1869(8). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140656>
 10. Grove, R. Q., & Karpowicz, S. J. (2017). Reaction of hypotaurine or taurine with superoxide produces the organic peroxysulfonic acid peroxytaurine. *Free Radical Biology and Medicine*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.342>
 11. Gupta, R., Win, T., & Bittner, S. (2005). Taurine Analogues; A New Class of Therapeutics: Retrospect and Prospects. *Current Medicinal Chemistry*, 12(17). <https://doi.org/10.2174/0929867054546582>
 12. Gurok, U., Steinhoff, C., Lipkowitz, B., Ropers, H. H., Scharff, C., & Nuber, U. A. (2004). Gene expression changes in the course of neural progenitor cell differentiation. *Journal of Neuroscience*, 24(26). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0809-04.2004>
 13. Gutiérrez-Castañeda, N. E., González-Corona, J., Griego, E., Galván, E. J., & Ochoa-de la Paz, L. D. (2023). Taurine Promotes Differentiation and Maturation of Neural Stem/Progenitor Cells from the Subventricular Zone via Activation of GABAA Receptors. *Neurochemical Research*, 48(7). <https://doi.org/10.1007/s11064-023-03883-2>
 14. Guzmán Montoya M. (2021). Modulación por análogos estructurales de Taurina del proceso de proliferación en células progenitoras neurales de la

- zona subventricular. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
15. Hara, K., Nakamura, M., Haranishi, Y., Terada, T., Kataoka, K., & Sata, T. (2012). Antinociceptive effect of intrathecal administration of hypotaurine in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Amino Acids*, 43(1). <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1094-9>
 16. Hernández-Benítez, R., Ramos-Mandujano, G., & Pasantés-Morales, H. (2012). Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. *Stem Cell Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.02.004>
 17. Jakaria, M., Azam, S., Haque, M. E., Jo, S. H., Uddin, M. S., Kim, I. S., & Choi, D. K. (2019). Taurine and its analogs in neurological disorders: Focus on therapeutic potential and molecular mechanisms. In *Redox Biology* (Vol. 24). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101223>
 18. Kabir, M. T., Uddin, M. S., Jeandet, P., Emran, T. Bin, Mitra, S., Albadrani, G. M., Sayed, A. A., Abdel-Daim, M. M., & Simal-Gandara, J. (2021). Anti-Alzheimer's molecules derived from marine life: Understanding molecular mechanisms and therapeutic potential. In *Marine Drugs* (Vol. 19, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/md19050251>
 19. Kumar, A., Pareek, V., Faiq, M. A., Ghosh, S. K., & Kumari, C. (2019). Adult neurogenesis in humans: A review of basic concepts, history, current research, and clinical implications. In *Innovations in Clinical Neuroscience* (Vol. 16, Issues 5–6).
 20. Latif, S., & Kang, Y. S. (2022). Blood–Brain Barrier Solute Carrier Transporters and Motor Neuron Disease. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102167>
 21. Llorente, V., Velarde, P., Desco, M., & Gómez-Gaviro, M. V. (2022). Current Understanding of the Neural Stem Cell Niches. In *Cells* (Vol. 11, Issue 19). <https://doi.org/10.3390/cells11193002>
 22. Manzano, S., Agüera, L., Aguilar, M., & Olazarán, J. (2020). A Review on Tramiprosate (Homotaurine) in Alzheimer's Disease and Other

- Neurocognitive Disorders. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 11).
<https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00614>
23. Martorana, A., Motta, C., Koch, G., Massaia, M., Mondino, S., Raniero, I., Vacca, A., di Lorenzo, F., Cavallo, G., Oddenino, E., Pavanelli, E., Maniscalco, M., Montano, V., Mastropietro, A., Bellia, N. C., Ciravegna, E., la Rocca, M., Vitale, E., Lorico, F., Levi della Vida, G. (2018). Effect of homotaurine in patients with cognitive impairment: Results from an Italian observational retrospective study. *Journal of Gerontology and Geriatrics*, 66(1).
24. Menzie J, Pan C, Prentice H, Wu JY. Taurine and central nervous system disorders. *Amino Acids*. 2014 Jan;46(1):31-46. doi: 10.1007/s00726-012-1382-z. Epub 2012 Aug 19. PMID: 22903433.
25. Niklison-Chirou, M. V., Agostini, M., Amelio, I., & Melino, G. (2020). Regulation of adult neurogenesis in mammalian brain. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 14).
<https://doi.org/10.3390/ijms21144869>
26. Nishimura, T., Higuchi, K., Yoshida, Y., Sugita-Fujisawa, Y., Kojima, K., Sugimoto, M., Santo, M., Tomi, M., & Nakashima, E. (2018). Hypotaurine is a substrate of GABA transporter family members GAT2/Slc6a13 and TAUT/Slc6a6. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41(10).
<https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00168>
27. Ochoa-de la Paz, L. D., González-Andrade, M., Pasantes-Morales, H., Franco, R., Zamora-Alvarado, R., Zenteno, E., Quiroz-Mercado, H., Gonzales-Salinas, R., & Gúlias-Cañizo, R. (2018). Differential modulation of human GABA C -p1 receptor by sulfur-containing compounds structurally related to taurine. *BMC Neuroscience*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0448-6>
28. Ochoa-De La Paz, L. D., Gúlias-Cañizo, R., D'ábril Ruíz-Leyja, E., Sánchez-Castillo, H., Parodí, J., Mexicana De Neurociencia, R., & Ochoa-De La Paz, L. (2021). El papel del neurotransmisor GABA en el sistema nervioso central

- humano, fisiología, y fisiopatología. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 22(2).
29. Ochoa-de la Paz, L., Zenteno, E., Gullias-Cañizo, R., & Quiroz-Mercado, H. (2019). Taurine and GABA neurotransmitter receptors, a relationship with therapeutic potential? In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 19, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/14737175.2019.1593827>
 30. Owji, S., & Shoja, M. M. (2020). The History of Discovery of Adult Neurogenesis. In *Clinical Anatomy* (Vol. 33, Issue 1). <https://doi.org/10.1002/ca.23447>
 31. Peerboom, C., & Wierenga, C. J. (2021). The postnatal GABA shift: A developmental perspective. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 124). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.01.024>
 32. Rafiee, Z., García-Serrano, A. M., & Duarte, J. M. N. (2022). Taurine Supplementation as a Neuroprotective Strategy upon Brain Dysfunction in Metabolic Syndrome and Diabetes. In *Nutrients* (Vol. 14, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/nu14061292>
 33. Serrano-Regal MP, Bayón-Cordero L, Ordaz RP, Garay E, Limon A, Arellano RO, Matute C, Sánchez-Gómez MV. Expression and Function of GABA Receptors in Myelinating Cells. *Front Cell Neurosci*. 2020 Aug 21;14:256. doi: 10.3389/fncel.2020.00256. PMID: 32973453; PMCID: PMC7472887.
 34. Singh P, Gollapalli K, Mangiola S, Schraner D, Yusuf MA, Chamoli M, Shi SL, Lopes Bastos B, Nair T, Riermeier A, Vayndorf EM, Wu JZ, Nilakhe A, Nguyen CQ, Muir M, Kiflezghi MG, Foulger A, Junker A, Devine J, Sharan K, Chinta SJ, Rajput S, Rane A, Baumert P, Schönfelder M, Iavarone F, di Lorenzo G, Kumari S, Gupta A, Sarkar R, Khyriem C, Chawla AS, Sharma A, Sarper N, Chattopadhyay N, Biswal BK, Settembre C, Nagarajan P, Targoff KL, Picard M, Gupta S, Velagapudi V, Papenfuss AT, Kaya A, Ferreira MG, Kennedy BK, Andersen JK, Lithgow GJ, Ali AM, Mukhopadhyay A, Palotie A, Kastenmüller G, Kaeberlein M, Wackerhage H, Pal B, Yadav VK. Taurine deficiency as a driver of aging. *Science*. 2023 Jun

- 9;380(6649):eabn9257. doi: 10.1126/science.abn9257. Epub 2023 Jun 9. PMID: 37289866.
35. Tian, J., Dang, H., Wallner, M. et al. Homotaurine, a safe blood-brain barrier permeable GABAA-R-specific agonist, ameliorates disease in mouse models of multiple sclerosis. *Sci Rep* 8, 16555 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32733-3>
36. Walker, T. L., & Kempermann, G. (2014). One mouse, two cultures: Isolation and culture of adult neural stem cells from the two neurogenic zones of individual mice. *Journal of Visualized Experiments*, 84. <https://doi.org/10.3791/51225>
37. Wu, S., Yue, Y., Tian, H., Tao, L., Wang, Y., Xiang, J., Wang, S., & Ding, H. (2014). Tramiprosate protects neurons against ischemic stroke by disrupting the interaction between PSD95 and nNOS. *Neuropharmacology*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.04.010>
38. Zheng, W., Nowakowski, R. S., & Vaccarino, F. M. (2004). Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Developmental Neuroscience*, 26(2–4). <https://doi.org/10.1159/000082136>