



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Caracterización del efecto de taurina sobre los receptores
GABA_B durante la diferenciación de células progenitoras neurales
de la zona subventricular”**

T E S I S

Que presenta:

M. en C. Nadia Estefanía Gutiérrez Castañeda

Para obtener el Grado de:

DOCTORA 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

Septiembre, 2024

Este trabajo de Investigación se realizó en el departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en conjunto con la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Emilio Javier Galván Espinosa y del Dr. Lenin David Ochoa de la Paz. Este trabajo estuvo apoyado por el proyecto PAPIIT-UNAM IN221823 y por CONAHCYT con el número de beca 783563.

Dedicatoria

“A mi papá que vive en mi corazón y siempre está presente, a mi mamá por su amor incondicional , a mi hermana por llenar mi vida y a mi sobrina que le da color. ”

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis tutores de tesis **Dr. Emilio Javier Galván Espinosa** y **Dr. Lenin David Ochoa de la Paz** por su asesoría, paciencia, y orientación a lo largo de este camino. Especialmente al Dr. Emilio por motivarme a seguir adelante, e inspirarme a alcanzar nuevos horizontes en mi formación académica.

A mi sínodo, **Dra. Claudia González Espinosa**, **Dra. Mónica Lamas Gregori**, **Dra. Janet Murbartián Aguilar**, **Dr. Eduardo Martínez Martínez**, les agradezco sinceramente por su tiempo, sus observaciones y sus atinados comentarios que enriquecieron significativamente este trabajo.

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio por su amistad, y apoyo que hicieron que este trayecto fuera más llevadero y gratificante. Especialmente a mis amigas **Eva** y **Gabriela**, quienes con su compañía y amistad me devuelven la fortaleza, confianza y valentía.

Índice

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	1
1 NEUROGÉNESIS	1
1.1 NEUROGÉNESIS ADULTA	2
1.2 NEUROGÉNESIS EN LA ZONA SUBVENTRICULAR	3
2 NEURITOGÉNESIS	7
2.1 REGULACIÓN DE LA NEURITOGÉNESIS	11
3 RECEPTORES GABA	12
3.1 RECEPTOR GABA_A	12
3.2 RECEPTOR GABA_B	14
3.3 EL PAPEL REGULADOR DEL GABA EN LA NEUROGÉNESIS ADULTA	17
3.4 INTERACCIÓN DE LOS RECEPTORES GABA _A Y LOS RECEPTORES GABA _B	18
4 TAURINA	19
4.1 PARTICIPACIÓN DE TAURINA DURANTE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL	22
II JUSTIFICACIÓN	23
III HIPOTESIS	23
IV OBJETIVO GENERAL	23
V OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
VI METODOLOGÍA	24
CULTIVO DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES DERIVADAS DE LA ZONA SUBVENTRICULAR DEL CEREBRO DE RATÓN (CPN-ZSV).	24
TRATAMIENTO CON TAURINA DURANTE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN	25
ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA	26
ANÁLISIS CUANTITATIVO DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL	27
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA ARBORIZACIÓN DENDRÍTICA DE CÉLULAS POSITIVAS PARA DCX Y MAP2	27
REGISTROS DE PATCH-CLAMP DE CÉLULA COMPLETA	28
DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES INTRÍNSECAS	29

DETERMINACIÓN DE CORRIENTES MACROSCÓPICAS	29
ENSAYO DE LA DISPONIBILIDAD DE CALCIO	30
VII RESULTADOS	31
CARACTERIZACIÓN DE LAS NEUROESFERAS OBTENIDAS DE LA ZSV	31
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EFECTIVA DE TAURINA PARA LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL	34
EFFECTOS DE LA TAURINA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN ASTROCÍTICA Y NEURONAL EN LAS CPNS	35
EL TRATAMIENTO CON TAURINA PROMUEVE EL DESARROLLO DE LA MORFOLOGÍA NEURONAL EN LAS CPNS	38
EL TRATAMIENTO CON TAURINA INDUCE RESPUESTAS ELECTROFISIOLÓGICAS EN LAS CPNS	42
EL BLOQUEO DEL GABA_AR INHIBE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN	49
LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES GABA_B NO ESTIMULA EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CPNS DE LA ZSV.	54
EL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES GABA_B FAVORECE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL, LA COMPLEJIDAD Y EL NÚMERO DE NEURITAS DE CPN ZSV.	59
EL AUMENTO DE CALCIO INTRACELULAR ES NECESARIO PARA EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL MEDIADO POR TAURINA.	64
CAMKII, ERK1/2 Y SRC SON DETERMINANTES EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL POR TAURINA	66
DISCUSIÓN	69
EL TRATAMIENTO CON TAURINA PROMUEVE LA MADURACIÓN NEURONAL	70
LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL MEDIADA POR TAURINA REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES GABA_A	71
EL GABA_BR EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CPN ZSV	73
MODULACIÓN DE CORRIENTES MEMBRANALES POR TAURINA	76
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	77
CONCLUSIÓN GENERAL	78
PERSPECTIVAS	79
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	80

Índice de Figuras

Figura 1. Principales regiones neurogénicas en el cerebro adulto del ratón.	2
Figura 2. Sitios de neurogénesis en el cerebro de roedores y humanos adultos.	3
Figura 3. Tipos celulares presentes en el nicho de la ZSV adulta.	4
Figura 4 Esquema representativo de la neuritogénesis	9
Figura 5 Representación de la estructura del GABA_AR.	14
Figura 6 Representación esquemática del heterodímero GABA_BR y el acoplamiento de sus subtipos a efectores en sinapsis centrales.	15
Figura 7. Estructura química de la taurina	19
Figura 8 Vía para la síntesis de taurina a partir de metionina y cisteína.	20
Figura 9 Microfotografías representativas en campo claro de las neuroesferas obtenidas de la ZSV del cerebro de ratón.	32
Figura 10 Expresión de marcadores de células precursoras neurales en neuroesferas secundarias derivadas de la zona subventricular.	33
Figura 11. Expresión de las subunidades del GABA_BR en las neuroesferas secundarias derivadas de la zona subventricular.	34
Figura 12. Curva dosis-respuesta de taurina para la generación de células tipo neuronal.	35
Figura 13 efecto del tratamiento con taurina en la expresión de GFAP en las CNPs derivadas de la ZSV.	36
Figura 14 . El tratamiento con taurina (10 mM) incrementa la expresión de DCX en las CNPs derivadas de la ZSV..	37
Figura 15 El tratamiento con taurina (10 mM) incrementa el numero de neuronas maduras en las CNPs derivadas de la ZSV.	38
Figura 16 El tratamiento con taurina (10 mM) favorece el desarrollo de la morfología neuronal en las CNPs derivadas de la ZSV. 1.	40
Figura 17. El tratamiento con taurina (10mM) promueve la diferenciación neuronal y estimula la complejidad dendrítica.	41
Figura 18. Propiedades electrofisiológicas de las CPNs diferenciadas tratadas con taurina.	43
Figura 19. El tratamiento con taurina induce la maduración neuronal.	44
Figura 20. Propiedades cinéticas de las espigas de las CPNs diferenciadas..	46
Figura 21 Propiedades de las corrientes macroscópicas de las CPNs diferenciadas.	48
Figura 22. El bloqueo farmacológico del GABA_AR disminuye el numero de células DCX+ en las CPN de la ZSV..	50
Figura 23. El bloqueo farmacológico del GABA_AR inhibe el crecimiento de neuritas en las CPN de la ZSV.	51

Figura 24. El bloqueo farmacológico del GABA_AR disminuye la complejidad dendrítica. A)	52
Figura 25. Propiedades de las corrientes macroscópicas de las CPNs diferenciadas tratadas con PTX.	53
Figura 26. La estimulación farmacológica del GABA_BR no tiene efecto en el número de células DCX+ en las CPNs de la ZSV. A)	55
Figura 27. La activación del GABA_BR con baclofen no estimula el proceso de diferenciación de las CPNs de la ZSV.	56
Figura 28. La activación farmacológica del GABA_BR no estimula la complejidad dendrítica.	57
Figura 29 Propiedades de las corrientes macroscópicas de las CPNs diferenciadas tratadas con baclofen.	58
Figura 30. El bloqueo farmacológico del GABA_BR incrementa el número de células DCX+ en las CPNs de la ZSV.	59
Figura 31 Figura 31. El bloqueo del GABA_BR con CGP 55845 estimula el proceso de diferenciación de las CPNs de la ZSV.	61
Figura 32 El tratamiento con taurina (10mM) + CGP (5 μM) promueve la diferenciación neuronal y estimula la complejidad dendrítica.	62
Figura 33. Propiedades de las corrientes macroscópicas de las CPNs diferenciadas tratadas con PTX.	63
Figura 34. La diferenciación mediada por taurina requiere de la movilización de calcio intracelular para el proceso de diferenciación y crecimiento de neuritas en las CPNs.	66
Figura 35 Participación de las cascadas de señalización en el proceso de diferenciación y crecimiento de neuritas de CPN ZSV mediado por taurina.	68
Figura 36 Representación esquemática de los posibles mecanismos necesarios para la diferenciación de células precursoras neurales de la ZSV mediada por taurina.	75

Abreviaturas

1. AHP. - Hiperpolarización posterior
2. AMP.- Adenosínmonofosfato
3. AMPc.- AMP cíclico
4. BDNF.- factor neurotrófico derivado del cerebro
5. BSA.- Albúmina de suero bovino
6. CaMK II .- Proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina
7. CD1.- Clúster de diferenciación tipo 1
8. Cm.- capacitancia de la membrana
9. CO₂.- Dióxido de carbo
10. COOH.- Carboxilo terminal
11. CPNs.- Células precursoras neurales
12. CREB. - cAMP response element-binding
13. DCX.- Doblecortina
14. E1.- Células ependimales multiciliadas
15. E2.- Células ependimales multiciliadas
16. EGF .- Factor de crecimiento epidermal
17. ERK1/2: Cinasa 1/2 regulada por señal extracelular
18. FGF.- Factor de crecimiento de fibroblastos
19. GABA.- Ácido gamma-aminobutírico
20. GDP.- Guanosíndifosfato
21. GFAP.- Proteína ácida fibrilar glial
22. GTP.- Guanosintrifosfato
23. IF.- Inmunofluorescencia
24. IPSCs.- Corrientes postsinápticas inhibitorias rápidas
25. KCC2.- Cotransportador K^+/Cl^-
26. MAP2.- proteína 2 asociada a microtúbulos
27. MAPK/ERK.- Proteínas cinasas activadas por mitógenos
28. NH₂.- Amino terminal

29. NKCC1.- Cotransportador Na^+ - K^+ - 2Cl^-
30. PA.- Potencial de acción
31. PBS.- Buffer fosfato salino
32. PKA .- proteína cinasa dependiente de AMPc
33. PMD.- pendiente máxima de despolarización
34. PMR.- pendiente máxima de repolarización
35. PMR.- Potencial de membrana en reposo
36. PTX.- Picrotoxina
37. RN.- Resistencia de entrada
38. SNC.- Sistema nervioso central
39. VGAT.-Transportador vesicular de GABA
40. VSCC.- canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje
41. Vth.- el umbral de voltaje de la membrana
42. ZSG.- Zona subgranular
43. ZSV.- Zona subventricular

RESUMEN

El proceso de diferenciación neuronal integra múltiples señales que inducen cambios transcripcionales, morfológicos y electrofisiológicos, estas señales modifican las propiedades de las células precursoras neurales durante su proceso de proliferación, maduración y migración. Se ha identificado un número importante de neurotransmisores y biomoléculas que sirven como señales moleculares para desencadenar, regular y guiar este proceso. En este sentido, la taurina, un aminoácido no esencial, modula el proceso de diferenciación neuronal. En este trabajo, describimos el efecto de la taurina a través de su interacción con el receptor ionotrópico GABA_A y el receptor metabotrópico GABA_B durante el proceso de diferenciación neuronal y las propiedades electrofisiológicas de las células precursoras neurales. La taurina estimuló la generación de neuritas y favoreció la complejidad dendrítica de estas células. Esto estuvo acompañado de cambios electrofisiológicos que reflejan la madurez de estas neuronas. A nivel farmacológico, el bloqueo del receptor ionotrópico GABA_A inhibió estos efectos, mientras que la estimulación del receptor metabotrópico GABA_B no tuvo efectos positivos en el proceso de diferenciación mediado por taurina. Sorprendentemente, el bloqueo del receptor GABA_B con CGP 55845 estimuló el crecimiento de neuritas, aumentó la complejidad dendrítica y mejoró la cinética de las corrientes de membrana de las células precursoras neurales, por lo que estos receptores podrían tener roles bidireccionales y posiblemente antagonistas en la regulación del crecimiento y maduración neuronal. Además, mostramos que la movilización de Ca²⁺ intracelular y la activación de diferentes cascadas de señalización mediadas por las cinasas CaMKII, ERK1/2 y Src son fundamentales en este proceso. Los efectos de la taurina en el proceso de diferenciación están asociados a la movilización de Ca²⁺ intracelular y la subsiguiente activación de cascadas de señalización intracelular, ya que la quelación de calcio intracelular con BAPTA-AM y la inhibición de CaMKII, ERK1/2 y Src inhibieron el crecimiento de neuritas de las células precursoras neurales de la zona subventricular.

ABSTRACT

The process of neuronal differentiation integrates multiple signals that induce transcriptional, morphological, and electrophysiological changes. These signals modify the properties of neural precursor cells during their proliferation, maturation, and migration. A significant number of neurotransmitters and biomolecules have been identified as molecular signals that trigger, regulate, and guide this process. In this context, taurine, a sulfur-containing non-essential amino acid widely expressed in the mammalian brain, modulates the neuronal differentiation process. In this work, we describe the effect of taurine through its interaction with the ionotropic GABA_A receptor and the metabotropic GABA_B receptor during the neuronal differentiation process and the electrophysiological properties of neural precursor cells. Taurine stimulates the generation of neurites and promotes the dendritic complexity of these cells, accompanied by electrophysiological changes that reflect the maturity of these neurons. At the pharmacological level, inhibiting the ionotropic GABA_A receptor prevents these effects, whereas activating the metabotropic GABA_B receptor does not enhance the taurine-induced differentiation process. Surprisingly, the blockade of GABABR with CGP 55845 stimulates neurite outgrowth, dendritic complexity, and the membrane current kinetics of neural precursor cells. Therefore, these receptors may have bidirectional and possibly antagonistic roles in the regulation of neuronal growth and maturation. The mobilization of intracellular Ca²⁺ and the activation of different signaling cascades mediated by CaMKII, ERK1/2, and Src kinase are fundamental in this process. The effects of taurine on the differentiation process entails the mobilization of intracellular Ca²⁺ and the activation of subsequent intracellular signaling pathways. The chelation of intracellular calcium using BAPTA-AM and the inhibition of CaMKII, ERK1/2, and Src kinase hindered neurite outgrowth in neural precursor cells from the subventricular zone.

INTRODUCCIÓN

1 Neurogénesis

La neurogénesis es el proceso a través del cual se generan nuevas neuronas funcionales a partir de células precursoras neurales (CPNs) (G. L. Ming & Song, 2005). A principios del siglo XX, cuando las bases de la neurociencia se establecieron, se creía que el número de neuronas dentro del sistema nervioso central (SNC) no cambiaría durante la vida, esto debido a la compleja estructura cerebral, la gran cantidad de neuronas, las intrincadas conexiones que hay entre ellas y la falta de mejoría después de enfermedades neurodegenerativas o en casos de lesión. Altman y Das (1965), utilizando experimentos con ^3H -timidina, proporcionaron las primeras pruebas que indicaban que podrían producirse nuevas neuronas en el cerebro de la rata. Además, se demostró la presencia de células marcadas en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales, así como la migración de estas células hacia el bulbo olfatorio a través de una estructura que se denominó “vía migratoria rostral” (Altman, 1969). Estos descubrimientos abrieron la oportunidad de tratar de aprovechar la neurogénesis en adultos con la intención de reparar el daño producido en el tejido nervioso. Además, la neurogénesis en adultos representa una forma adicional de plasticidad en el cerebro de los mamíferos, desafiando la creencia de que esta capacidad disminuía significativamente durante o después del desarrollo. Actualmente, sabemos que en los mamíferos las neuronas se generan de manera continua y funcional, integrándose en las redes neuronales existentes en el cerebro adulto a lo largo de toda la vida del organismo. Como se muestra en la Figura 1, la neurogénesis en adultos ocurre principalmente en dos áreas del SNC: la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado en el hipocampo (Eriksson et al., 1998; Kuhn et al., 2018; G.

li Ming & Song, 2011). Las CPNs se encuentran distribuidas en todo el SNC y se caracterizan por propiedades celulares muy particulares, como un alto índice de proliferación, la capacidad de autorenovarse y diferenciarse en diversos tipos celulares.

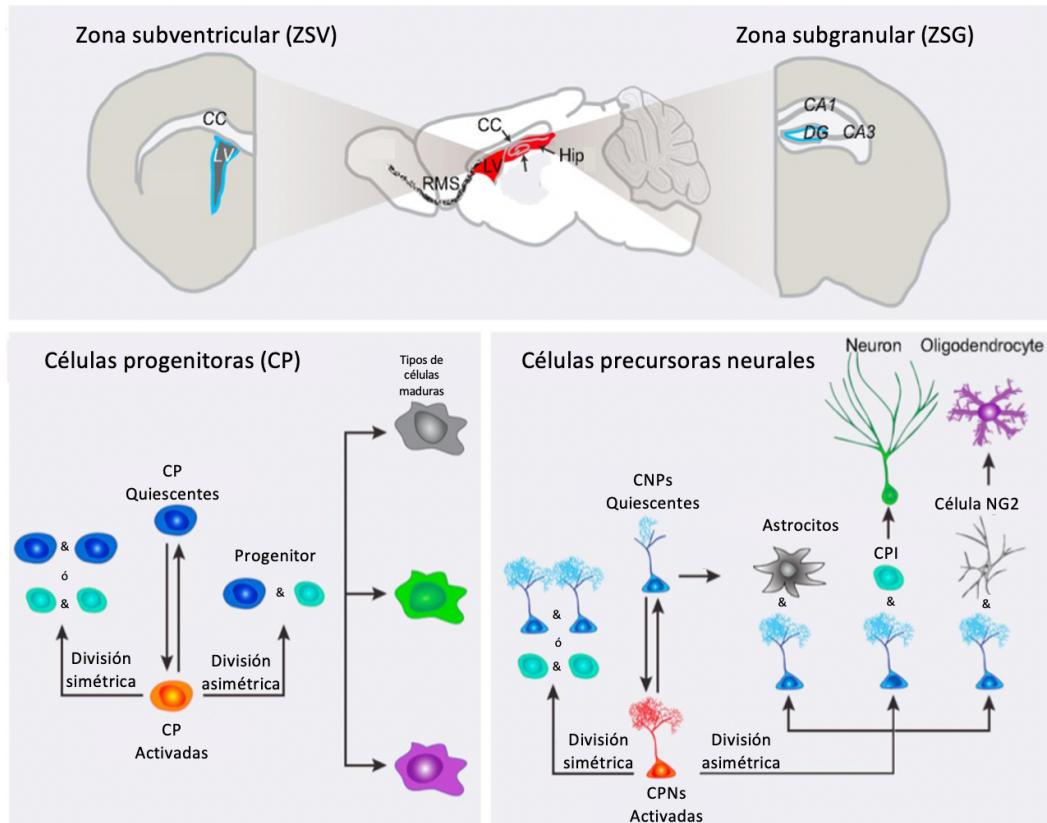


Figura 1. Principales regiones neurogénicas en el cerebro adulto del ratón. En la parte superior se muestran la SZV y la ZSG en secciones coronales y sagitales del cerebro del ratón. En los recuadros inferiores, los progenitores neuronales presentes en la ZSV y la ZSG. Adaptado de Bond, Ming y Song (Bond et al., 2015).

1.1 Neurogénesis adulta

De manera general, se han descrito los dos nichos neurogénicos adultos más importantes en el cerebro del roedor: la ZSV de los ventrículos laterales y la ZSG del giro dentado del hipocampo (Bond et al., 2015). Sin embargo, estudios recientes muestran actividad neurogénica en las paredes del tercer ventrículo (Dietrich & Horvath, 2012; Lee & Blackshaw, 2012). Otras

investigaciones sugieren el potencial neurogénico de otras regiones cerebrales, que bajo ciertas circunstancias pueden activarse y producir células gliales y neuronas. Por ejemplo, los astrocitos del cuerpo estriado poseen un potencial latente de células progenitoras que se activa después de un accidente cerebrovascular que genera células gliales y neuronas (Figura 2) (Magnusson et al., 2014).

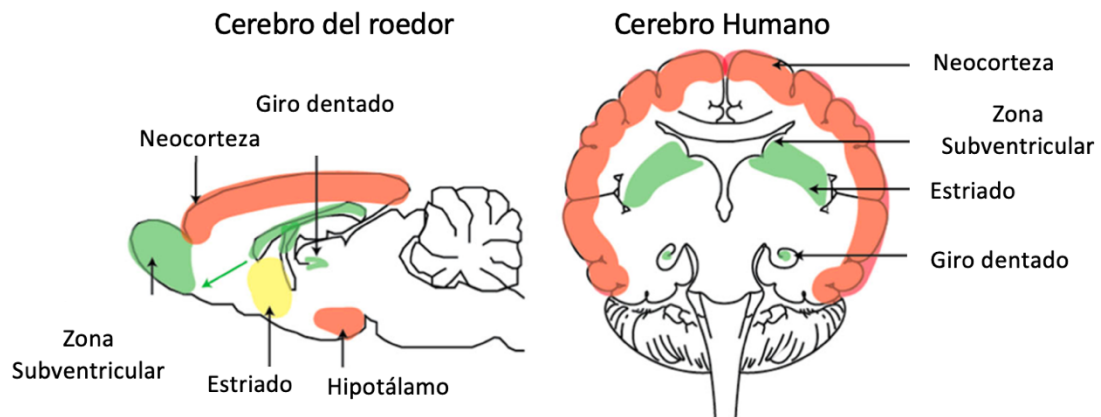


Figura 2. Sitios de neurogénesis en el cerebro de roedores y humanos adultos. Las regiones en las que ocurre neurogénesis a lo largo de la vida (color verde), en respuesta a una lesión (color amarillo), o en las que no ocurre neurogénesis (color rojo). Figura modificada de Company of Biologists, de Magnusson & Frisen (Magnusson et al., 2014).

1.2 Neurogénesis en la zona subventricular

La composición celular del nicho neurogénico de la ZSV es compleja, no solo por la variedad celular sino también por la localización y las interacciones celulares que ejercen entre ellas (Figura 3). Estas células comparten muchas propiedades con los astrocitos, por ejemplo, la expresión de marcadores de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) o la proteína SOX2 (Doetsch et al., 1997a; Lim & Alvarez-Buylla, 2016). Sin embargo, también expresan Nestina, un marcador asociado con células progenitoras neurales (Doetsch et al., 1997a). Las CPNs de la ZSV entran en contacto directo con el ventrículo y están rodeadas de células endoteliales que forman la llamada "estructura de

roseta". Las CPNs de la ZSV son mayormente inactivas, pero pueden activarse por varios factores, que inducen la división asimétrica para autorrenovarse. Las principales células que podemos encontrar en esta zona son las células A, B, C y E (Figura 3).

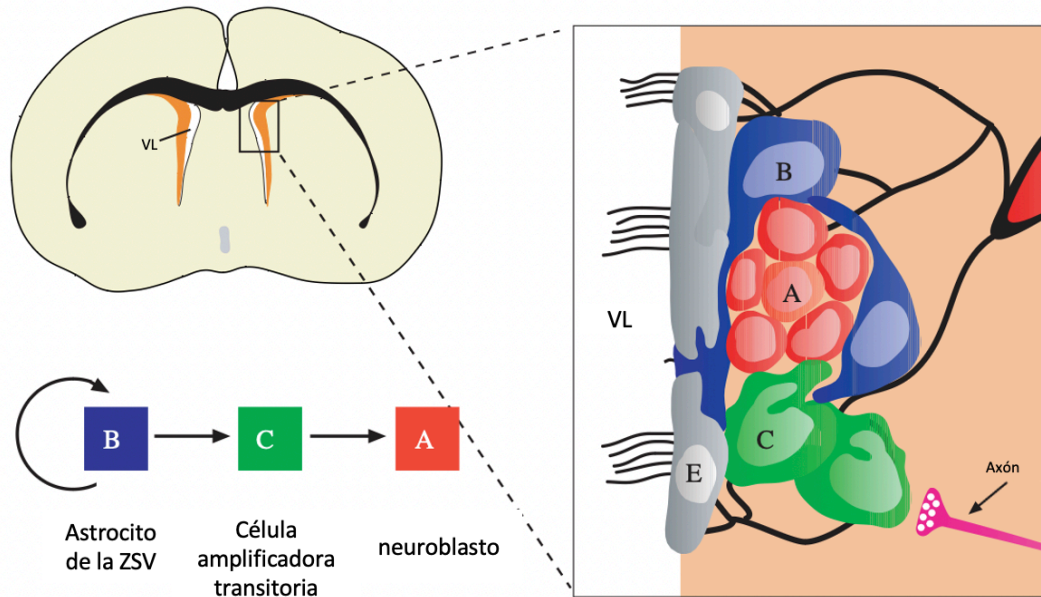


Figura 3. Tipos celulares presentes en el nicho de la ZSV adulta. Esquema de una sección frontal del cerebro de un ratón adulto que muestra la ZSV adyacente al ventrículo lateral representado en naranja. Muestra los tipos celulares presentes, las células B (azul) los neuroblastos o células A (rojo) las células C (verde). La ampliación de la derecha muestra la relación entre las células en esta región y algunos elementos del nicho de la ZSV. Tomado de Riquelme 2007 (Riquelme et al., 2008) .

Células E

Las células E o células endociliares, se encuentran tapizando las paredes del ventrículo en contacto directo con el líquido cefalorraquídeo. Se clasifican en función del número de cilios que presentan: células endociliares multiciliadas (E1) y células endociliares biciliadas (E2) (Pastrana et al., 2009; Raponi et al., 2007). La estructura de las paredes ventriculares presenta una organización planar, donde los pequeños procesos apicales de las células B1 se encuentran internalizados en una estructura de roseta formada por las células endociliares (Mirzadeh et al., 2008). Estas células expresan receptores a

GABA, lo que puede sugerir que los procesos de proliferación y diferenciación que ocurren dentro de este núcleo neurogénico podrían estar modulados por este neurotransmisor.

Células B

Las células B pueden dividirse en función de su localización y morfología en dos tipos: células B1 y células B2. Las células B1 son astrocitos que derivan de la glía radial durante el desarrollo; solo un pequeño porcentaje de estas células se encuentra proliferando activamente y se estima que aproximadamente 700 células B1 proliferan al día en la ZSV adulta del ratón (Ponti et al., 2013). Las células B2 derivan en células C con gran capacidad proliferativa; además, expresan diferentes receptores para factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), que intervienen en la regulación de los fenómenos de neurogénesis (Doetsch et al., 2002; Mudò et al., 2009). En cuanto a su morfología, estas células presentan un núcleo poco denso y un citoplasma de contorno irregular rico en filamentos intermedios (Doetsch et al., 1997a). Presentan un extremo apical que contiene un cilio primario sin motilidad y que está en contacto con el líquido cefalorraquídeo. Las células B2 se sitúan rodeando a los neuroblastos que migran de la ZSV formando túneles que facilitan la migración de los neuroblastos hacia el bulbo olfatorio (Doetsch et al., 2002; Mudò et al., 2009).

Células C

Estas células se generan a partir de la división asimétrica de las células B y posteriormente dan lugar a las células A. Presentan una tasa proliferativa superior al resto de células del nicho neurogénico, por lo que son consideradas como progenitoras de rápida amplificación o proliferación (Doetsch et al., 1997a; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). Se estima que las células C se

dividirán tres veces antes de generar a las células A (Ponti et al., 2013). Morfológicamente, son células densas, lisas y con un núcleo que presenta varios nucléolos visibles e invaginaciones (Doetsch et al., 1997a). En la ZSV se encuentran agrupadas y en contacto con vasos sanguíneos y neuroblastos que migrarán hasta alcanzar el bulbo olfatorio.

Células A

Las células A son la población más abundante de la ZSV; son neuroblastos que se originan de la división de las células C. Presentan una morfología bipolar y un núcleo muy grande y eucromático (Doetsch et al., 1997). Una característica importante de estas células es que proliferan durante el proceso migratorio y que, además, el 55% de estos neuroblastos se dividirá al menos una vez en la ZSV del cerebro adulto (Doetsch et al., 1997a; Wichterle et al., 1997). Los neuroblastos se incorporan al bulbo olfatorio a través de la vía migratoria rostral, principalmente como interneuronas GABAérgicas. Migran envueltos por astrocitos que forman una red de caminos interconectados en la vía migratoria rostral, en forma de cadenas hacia el bulbo olfatorio (Doetsch et al., 1997a; Lois & Alvarez-Buylla, 1993). Una vez que llegan al bulbo olfatorio, los neuroblastos migran radialmente a su posición final y se diferencian en interneuronas (Lim & Alvarez-Buylla, 2016). Se estima que, en el cerebro de ratón adulto, se generan aproximadamente 10,000 células diarias y que son necesarios entre 3 y 4 días para la formación de células A, a partir de las células B1 (Ponti et al., 2013).

Otros tipos celulares presentes en este nicho neurogénico son la microglía y las células epiteliales de la vasculatura. La función de la microglía en el proceso neurogénico está aún por definir; sin embargo, se sabe que la microglía en condiciones normales libera al medio citocinas o moléculas tróficas que pueden regular el proceso de neurogénesis (Ekdahl et al., 2009; Pérez-Rodríguez et al., 2021; Thored et al., 2009).

2 Neuritogénesis

La formación de neuritas es esencial en el neurodesarrollo y se divide en dos fases celulares sucesivas: el inicio del crecimiento neurítico y el posterior alargamiento de las neuritas. Este proceso marca la ruptura inicial en la simetría morfológica de la célula, facilitando la polarización neuronal. En las primeras etapas que preceden a la neuritogénesis, las neuronas presentan una forma redonda y una superficie uniforme y lisa. Los filopodios y lamelipodios, ricos en actina, emergen y se estabilizan mediante microtúbulos, dando lugar a las prolongaciones neuríticas. Conforme avanza la polarización celular y las células adquieren una morfología neuronal madura, las neuritas se diferencian en un axón y múltiples dendritas (Craig & Banker, 1994; Dotti et al., 1988). La maduración de las neuritas es un paso necesario para la morfogénesis neuronal. Las etapas iniciales de formación de neuritas influyen en etapas posteriores como la arborización y la formación de sinapsis, lo cual es vital para establecer conexiones cerebrales adecuadas (Figura 4) (Reese & Drapeau, 1998). La forma altamente polarizada de una neurona madura requiere que todas las etapas de la morfogénesis neuronal se desarrollen correctamente. Por ello, la neuritogénesis es posiblemente la fase determinante de la morfogénesis neuronal, ya que establece las bases de las que dependen las etapas siguientes.

La formación de neuritas es controlada por numerosas vías que convergen en objetivos comunes, permitiendo que una neurona en desarrollo extienda y establezca nuevos procesos en su superficie. Durante la neuritogénesis, es fundamental que se lleven a cabo funciones importantes como el reordenamiento del citoesqueleto, la coordinación entre actina y los microtúbulos, la adición a la membrana plasmática, la adhesión celular, la síntesis de proteínas y la interacción entre el citoesqueleto y la membrana plasmática (Gonçalves et al., 2016; Sainath & Gallo, 2015; Schelski & Bradke, 2017). La iniciación de las neuritas es la primera etapa de la morfogénesis

neuronal. Como mencionamos anteriormente, este proceso es responsable de romper la simetría morfológica de la neurona inicialmente esférica y estabilizar los precursores de las neuritas inmaduras, mientras que el alargamiento de las neuritas se relaciona más con la adición de membrana y la extensión adicional de estos procesos estabilizados.

Antes de que inicie la formación de neuritas, una neurona inmadura debe generar una asimetría interna para designar los sitios de protrusión desde los cuales se extenderán las neuritas futuras (Santos et al., 2002). La generación de esta asimetría interna depende de señales intracelulares y externas, que designan regiones específicas dentro de la célula en donde se va a llevar a cabo la extensión de las neuritas (Feng et al., 2016; Gärtner et al., 2012). Esta fase temprana de la diferenciación neuronal no se encuentra descrita en su totalidad. Se ha descrito que la redistribución de actina cortical en grandes agregados precede a la neuritogénesis y determina los sitios de iniciación de las neuritas (Q. Zhang et al., 2016).

La iniciación de la formación de neuritas comienza con la extensión de filopodios y lamelipodios ricos en actina, que evolucionan hasta convertirse en dendritas maduras. Aunque aún no se describe completamente cómo se organiza el citoesqueleto de actina para formar estas estructuras iniciales, se han propuesto dos modelos para tratar de explicar la iniciación de neuritas: el modelo de filamento de *novo* y el modelo de elongación convergente. El modelo de filamentos de *novo* sugiere que la nucleación y elongación de las fibras de actina surge en una sola dirección, seguida de la reticulación en haces de actina, y que este proceso es responsable de la formación de filopodios (Vignjevic et al., 2006). Por otro lado, el modelo de elongación convergente propone que las redes de filamentos de actina ramificados dentro de los lamelipodios se alargan y se agrupan en filopodios (Svitkina et al., 2003). Ambos modelos no son excluyentes entre ellos, por lo que pueden ocurrir dependiendo del tipo de célula específica o de factores y estímulos

ambientales. Las estructuras ricas en actina son bastante dinámicas y deben estabilizarse mediante la invasión de microtúbulos, lo que previene el colapso de la estructura y es seguido por una rápida extensión a medida que los procesos maduran hasta convertirse en una neurita (Cornell et al., 2016).

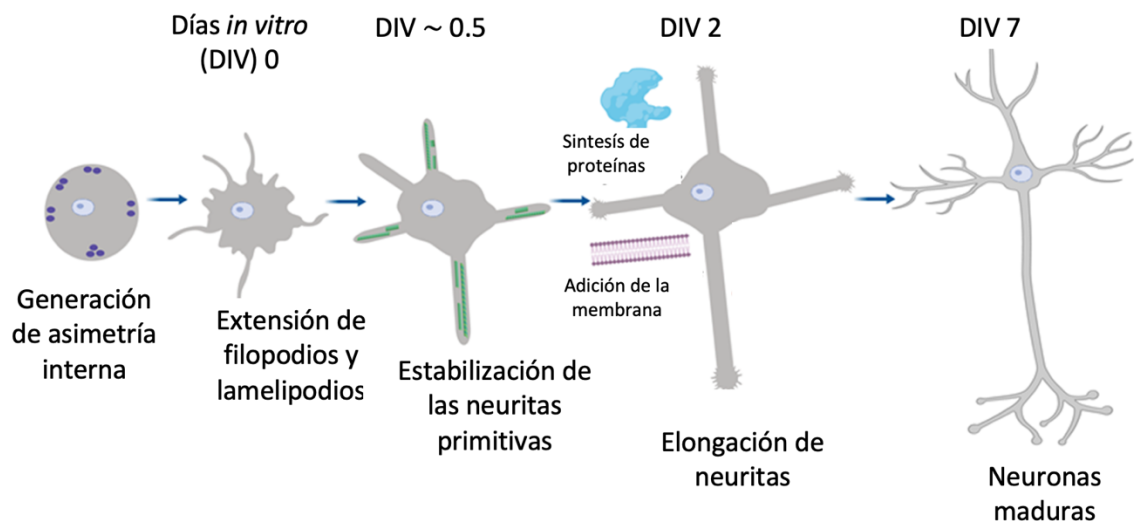


Figura 4 Esquema representativo de la neuritogénesis. Las neuronas inmaduras presentan una forma redonda y simétrica con una superficie lisa y uniforme antes de que de inicio la neuritogénesis. La asimetría celular interna se genera mediante mecanismos de señalización que determinan las ubicaciones de iniciación de las neuritas. Los filopodios y lamelipodios ricos en actina emergen y se estabilizan mediante microtúbulos para convertirse en neuritas primitivas, rompiendo la simetría morfológica de la célula y conduciendo a la polarización neuronal. Durante la elongación de las neuritas, procesos como la adición de membrana plasmática, el transporte intracelular y la síntesis de proteínas son cruciales, ya que la neurona extiende sus neuritas y aumenta su área superficial. A medida que se desarrolla la morfología neuronal madura, las neuritas se diferencian en un axón y múltiples dendritas. Tomado de Benisson, 2020 (Benisson et al., 2020).

Los conos de crecimiento neuronal en las primeras neuritas estabilizadas guían a las neuritas en desarrollo hacia sus respectivos objetivos. Estos conos de crecimiento se encuentran en los extremos distales de todas las neuritas y son áreas dinámicas y especializadas compuestas de lamelipodios y filopodios ricos en actina (Dwane et al., 2014; Mueller, 1999).

La migración neuronal se logra mediante la formación, el mantenimiento y la transformación constante y dinámica de los microtúbulos y actina en respuesta

a señales extracelulares y a señales de polaridad intracelular. La morfología del árbol dendrítico se desarrolla principalmente durante el período embrionario; sin embargo, las dendritas son muy dinámicas y mantienen la morfología general con diversos mecanismos hasta la edad adulta. Las alteraciones que puedan suceder en el crecimiento dendrítico o la falla de los mecanismos para mantener su morfología pueden dar como resultado un funcionamiento aberrante de la red neuronal.

La señalización de Ca^{2+} es indispensable en la inducción de los cambios de forma celular, la formación de sinapsis, la neuritogénesis y muchos otros procesos celulares (Sogawa et al., 2000)

Por ejemplo, la proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK II) es un mediador de la señalización de Ca^{2+} en el sistema nervioso y participa en la remodelación activa del citoesqueleto (Sogawa et al., 2000). CaMK II tiene un papel importante tanto en la iniciación como en el alargamiento de las neuritas (Sogawa et al., 2000). Por otra parte, las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK) producen una cascada de señalización activada por una variedad de ligandos y receptores involucrados en muchos procesos, incluida la diferenciación celular. La señalización MAPK/ERK es esencial para todas las etapas de la morfogénesis neuronal: iniciación, elongación, ramificación, crecimiento axónico, y en la formación de sinapsis (Xiao & Liu, 2003). MAPK/ERK es un regulador del destino celular y su señalización contribuye al compromiso de una célula con el proceso de proliferación o con el proceso de diferenciación (Ryu et al., 2015). El papel de MAPK/ERK en la diferenciación neuronal radica en su contribución a los mecanismos de señalización que regulan la iniciación de las neuritas.

El AMP cíclico (AMPc) y la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) también desempeñan funciones importantes en el proceso de crecimiento neurítico durante el desarrollo. El AMPc promueve la regeneración en una

variedad de tipos de neuronas y envía señales a través de PKA, que a su vez activa la expresión de ERK1/2 (Wan et al., 2011). El mecanismo de acción de MAPK/ERK en el alargamiento de las neuritas se ha debatido ampliamente y ahora se ha demostrado que participa en la regeneración mediada por AMPc en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Xiao & Liu, 2003).

2.1 Regulación de la neuritogénesis

Entre las funciones más importantes del cerebro de los mamíferos se encuentra su capacidad para adaptarse rápidamente a las circunstancias externas. El cerebro de los mamíferos es extremadamente plástico, lo que facilita la adaptación (Lledo et al., 2006). Una característica destacable del cerebro de los mamíferos es su plasticidad. Como resultado de experiencias previas, se forman nuevas sinapsis y se modifican las existentes, lo que influye en el procesamiento de nueva información (Green & Bavelier, 2008). La neurogénesis en adultos representa un nuevo nivel de plasticidad en el cerebro adulto, permitiendo la modificación de redes neuronales preestablecidas mediante la incorporación de nuevas células que, al menos inicialmente, son más plásticas en comparación con las neuronas generadas durante la embriogénesis (Gonçalves et al., 2016; Lledo et al., 2006).

Se han identificado múltiples factores intrínsecos y extrínsecos que influyen en el proceso de neurogénesis y neuritogénesis (Aimone et al., 2009). Diferentes rutas de señalización, factores de transcripción y reguladores genéticos activan y controlan estos procesos en etapas adultas. Ming & Song, (2011) indican que la neurogénesis embrionaria y adulta comparten similitudes significativas en las rutas de señalización, involucrando factores de transcripción como Mash1 y Notch. Alteraciones en los neurotransmisores que controlan el desarrollo cerebral pueden afectar la neurogénesis adulta. Además, estos sistemas de neurotransmisores pueden ser regulados mediante manipulación farmacológica (G. li Ming & Song, 2011).

3 Receptores GABA

El neurotransmisor GABA es el neurotransmisor inhibitor predominante en el cerebro de los mamíferos. GABA está presente en ambos nichos neurogénicos y participa en la regulación de la neurogénesis. Tanto en la ZSV como en la ZSG, GABA regula la activación y proliferación de las CPNs (Liu et al., 2005; Song et al., 2014, 2016).

El GABA se sintetiza y libera desde una población grande y heterogénea de neuronas, con muchas proyecciones locales llamadas interneuronas. La neurotransmisión GABAérgica es esencial para modular y sincronizar las redes neuronales (Mann & Paulsen, 2007). Es sintetizado a partir del ácido glutámico e internalizado en vesículas sinápticas a través del transportador VGAT (Bowery & Smart, 2006). El GABA ejerce su función a través de dos tipos de receptores específicos: los receptores ionotrópicos GABA_A, que son canales iónicos controlados por ligando, y los receptores metabotrópicos GABA_B, que se encuentran acoplados a proteína G (Nicoll & Alger, 1979).

3.1 Receptor GABA_A

Los receptores GABA_A pertenecen a la familia "Cys-loop" o receptores activados por ligando, son proteínas heteropentaméricas que pueden tener en su composición diferentes combinaciones de estas 19 subunidades: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π y ρ 1-3 (Cutting et al., 1991; Davies et al., 1997; Schofield et al., 1989; Ymer et al., 1989). La composición de subunidades del receptor se muestra en la Figura 5 y es relevante ya que determina la localización subcelular, la cinética o la farmacología.

Los receptores GABA_A son canales iónicos permeables a los iones Cl⁻. Las neuronas maduras expresan el transportador KCC2, que determina el gradiente electroquímico de iones Cl⁻ en las neuronas, expulsando iones Cl⁻ desde la célula, lo que lleva a una menor concentración intracelular de Cl⁻. La unión de GABA al receptor determina una entrada de Cl⁻ en la célula, lo que

conduce a una hiperpolarización de la membrana celular. Así, en las neuronas maduras el GABA actúa como neurotransmisor inhibitorio. Los progenitores neuronales y las neuronas en proceso de maduración expresan el transportador NKCC1 y tienen una concentración intracelular de Cl⁻ más alta en comparación con el espacio extracelular (Ge et al., 2007), por lo tanto, el GABA produce una despolarización cuando se une al GABA_AR en neuronas inmaduras. Durante el proceso de maduración neuronal, la expresión del transportador NKCC1 va disminuyendo mientras que el transportador KCC2 comienza a expresarse, lo que lleva a una inversión del gradiente de Cl⁻ y, como consecuencia, se presenta un cambio de acción; el GABA pasa de ser despolarizante y activadora a ejercer una acción hiperpolarizante e inhibitoria (Ge et al., 2007; Kaila et al., 1993). Los receptores GABA_A se localizan tanto sináptica como extrasinápticamente. Los primeros se activan mediante altas concentraciones de GABA liberadas en la hendidura sináptica y generan corrientes postsinápticas inhibitorias rápidas (IPSCs) (Brickley et al., 1999; Kullmann et al., 2005). Los receptores GABA_A extrasinápticos son activados por el exceso de liberación de GABA desde las sinapsis cercanas y median la inhibición tónica. La inhibición GABAérgica fásica y tónica apoya diferentes funciones en el curso de la neurogénesis. Por ejemplo, la inhibición tónica en las células progenitoras tiene un efecto antiproliferativo, mientras que la inhibición fásica en las células amplificadoras transitorias promueve la supervivencia (Song et al., 2002).

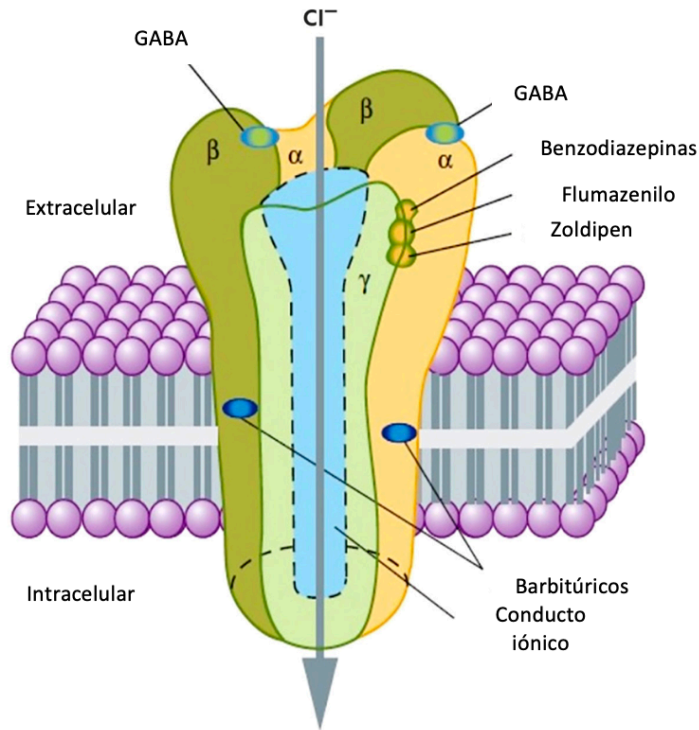


Figura 5 Representación de la estructura del GABA_AR. El receptor ionotrópico inhibitor GABA_A consta de cinco subunidades que juntas forman un canal de cloruro (Cl⁻) activado por ligando y la ubicación de los sitios comunes de unión de agonistas y antagonistas. Tomado y modificado de Katzung, 2018.

3.2 Receptor GABA_B

Los receptores metabotrópicos GABA_B son miembros de la súper familia de receptores acoplados a proteínas G y son responsables de mediar efectos de acción lenta, ya que actúan sobre segundos mensajeros intracelulares a través del sistema de adenilato ciclasa y los canales de Ca²⁺ y K⁺.

Los receptores GABA_B se conforman estructuralmente por dos subunidades (heterodímero), cada subunidad cuenta con 7 dominios transmembranales, un NH₂ terminal en la región extracelular, donde se encuentra el sitio de unión al agonista (GABA, baclofén) y antagonistas (flaclofeno, CGP) y un COOH terminal intracelular, que contiene un dominio de aminoácidos que conforman

un asa para la unión de las dos subunidades como se ilustra en el esquema de la Figura 6 (Filip y Frankowska, 2008).

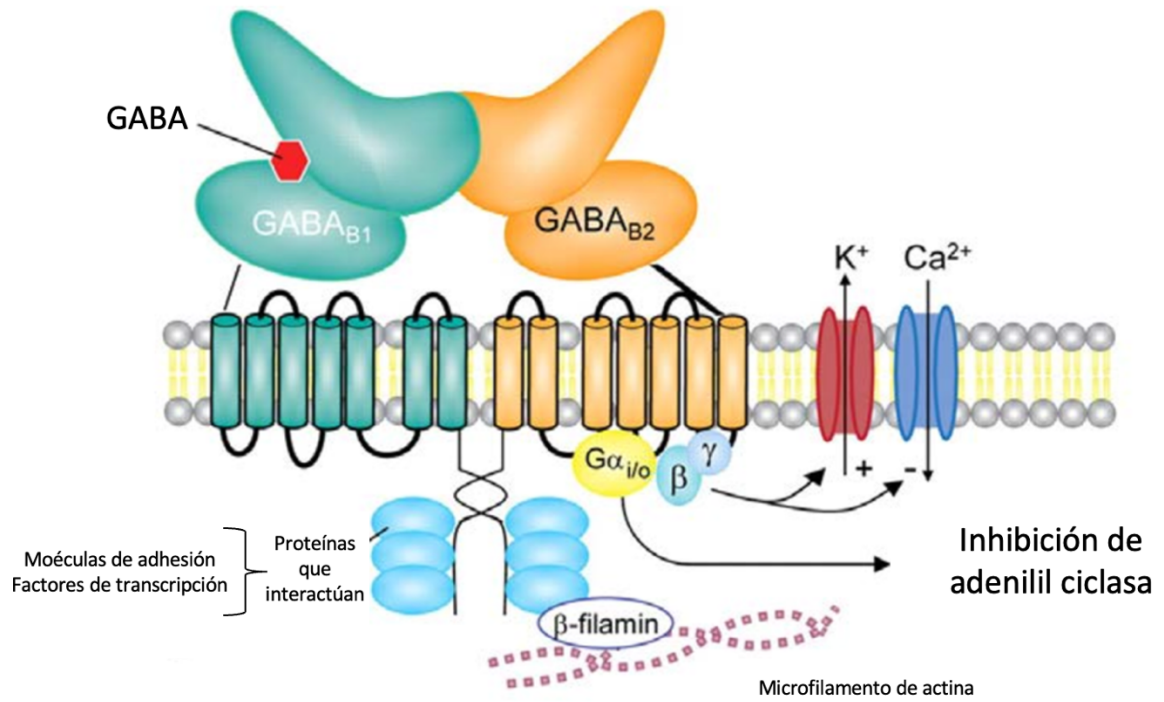


Figura 6 Representación esquemática del heterodímero GABA_BR y el acoplamiento de sus subtipos a efectores en sinapsis centrales. El GABA_BR funcional está formado por dos subunidades, GABA_{B1} y GABA_{B2}. Ambas subunidades contienen grandes dominios extracelulares N-terminales (N), siete dominios transmembrana conectados por tres bucles intracelulares y tres bucles extracelulares, y un C-terminal intracelular. El dominio N-terminal de GABA_{B1} contiene un sitio de unión para el agonista (GABA) y para el modulador alostérico positivo endógeno (Ca²⁺). Las dos variantes de empalme más comunes de GABA_{B1} (GB1a y GB1b) difieren en la presencia de dos dominios sushi (SD) en el N-terminal de GABA_{B1}. Tomado de Fernandes Gomes (2019) (Gomes et al., 2019).

Los receptores GABA_B se activan de manera selectiva por baclofén y son insensibles a moduladores como las benzodiazepinas y a los antagonistas de los receptores GABA_A (Bowery & Smart, 2006). El descubrimiento de estos receptores se realizó gracias a su insensibilidad a bicuculina, un antagonista clásico de los receptores GABA_A.

La unión de GABA conduce a un cambio conformacional del receptor, que se transmite a la subunidad Gα de la proteína G, lo que lleva al intercambio de

GDP por GTP (Bettler et al., 2004; Ulrich & Bettler, 2007). La subunidad $G\alpha$ unida a GTP se disocia de las otras dos subunidades de la proteína G, las subunidades β y γ . La subunidad $G\alpha$ activa a la fosfolipasa C o inhibe la enzima AC, que reduce los niveles de AMPc, lo que a su vez conduce a la inactivación de PKA. Estas dos vías activadas por $G\alpha$ son centros importantes de señalización celular y pueden regular diferentes procesos como la expresión de proteínas, la movilización de vesículas o la modulación de la actividad de canales iónicos (Franek et al., 1999; Rosenbaum et al., 2009). Además, la subunidad $G\beta\gamma$ puede inhibir los canales de Ca^{2+} y activar los canales GIRK, principalmente los canales Kir3 (Bowery & Smart, 2006)

Aunque se ha reportado que la localización de los receptores $GABA_B$ es en el soma celular, algunos estudios mencionan su presencia en dendritas y espinas neuronales (Kulik et al., 2006) que reciben una variedad de señales inhibitoras, (Beaulieu & Somogyi, 1990). En estas estructuras, los $GABA_B$ R también activan a los canales GIRK (Kulik et al., 2006; Lüscher et al., 1997). La activación de los canales de K^+ aumenta la conductancia de la membrana y evoca una corriente inhibitora. Estos efectos suprimen las respuestas postsinápticas (Morrisett et al., 1991), limitan la propagación del potencial de acción e inhiben los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje (VSCC), que son la principal fuente de señales de potenciales de acción en las espinas y dendritas (Carter & Sabatini, 2004).

Los receptores $GABA_B$ pueden localizarse tanto presinápticamente como postsinápticamente. Los $GABA_B$ R presinápticos inhiben la liberación de neurotransmisores al modular negativamente los canales de Ca^{2+} activados por voltaje, mientras que los receptores postsinápticos conducen a la formación de IPSCs lentos. Los receptores $GABA_B$ son esenciales para muchos procesos importantes como el aprendizaje, la cognición y la ansiedad, y se ha demostrado que modulan la neurogénesis en adultos (JM et al., 1999; Rosenbaum et al., 2009).

3.3 El papel regulador del GABA en la neurogénesis adulta

La neurogénesis adulta está regulada por múltiples factores, y los receptores GABA son importantes en esta regulación. Tanto en la ZSV como en la ZSG, las células precursoras neurales expresan receptores GABA_A (Liu et al., 2005; J. Song et al., 2012). En la ZSV, el GABA que es producido por los neuroblastos y liberado por las terminales de las neuronas estriatales, se une a los GABA_AR en la superficie de las células precursoras neurales y reduce su proliferación (Liu et al., 2005; J. Song et al., 2012; Young et al., 2014). También en la ZSG, se demostró que los GABA_AR de las CPNs expresan predominantemente las subunidades $\alpha 5$, $\beta 3$ y $\gamma 2$. Las CPNs de la ZSG no muestran corrientes sinápticas espontáneas o evocadas en respuesta a la estimulación de campo del GD (Song et al., 2012). Sin embargo, Song y colaboradores (2012) mostraron la presencia de respuestas a GABA en las CPNs de la ZSG y las corrientes mejoraron al inactivar el transportador de recaptación de GABA GAT1, lo que indica un exceso de liberación de GABA desde las sinapsis cercanas. Las corrientes de GABA registradas en las CPNs de la ZSG se potencian con diazepam, lo que indica la presencia de las subunidades $\gamma 2$ en los receptores GABA_A (Song et al., 2012). La administración de diazepam redujo significativamente la proliferación de las CPNs promoviendo su inactividad. La eliminación condicional de la subunidad $\gamma 2$ en las CPNs redujo su capacidad de respuesta a la activación y aumentó la producción de células progenitoras y células gliales. Este fenotipo no fue rescatado por la administración de diazepam, lo que indica una participación directa de la subunidad $\gamma 2$ en la regulación del GABA_AR y en la elección del destino de las CPNs e la ZSG (Song et al., 2012).

La regulación proporcionada por el GABA podría ser muy adecuada para "marcar el tiempo" en las neuronas diferenciadas en adultos. La regulación del nicho por GABA podría determinar un aumento en el número de neuronas

producidas en un momento determinado, y al mismo tiempo inhibiría o disminuiría la producción de neuronas adultas (J. Song et al., 2012, 2014).

3.4 Interacción de los receptores GABA_A y los receptores GABA_B

Los GABA_AR son canales ionotrópicos permeables a Cl⁻ que generan una corriente iónica rápida, mientras que los GABA_BR inducen una modulación sostenida y a largo plazo a través de la activación de segundos mensajeros (Lüscher et al., 1997). Existe una diferencia en la distribución celular entre los GABA_BR y GABA_AR, por ejemplo, los GABA_BR se encuentran en dendritas de las células piramidales del hipocampo de rata, mientras que los GABA_AR se pueden ubicar tanto en dendritas (hendidura sináptica) como en el soma. Esto significa que los GABA_AR y GABA_BR presentes en dendritas pueden activarse por liberación sináptica de GABA y, considerando las características del GABA_BR, su activación podría modular la eficacia de los potenciales postsinápticos inhibidores rápidos mediados por los GABA_AR (Newberry & Nicoll, 1985). En algunas situaciones, el GABA liberado de forma espontánea o a través de un potencial de acción único, genera un potencial postsináptico inhibitorio rápido mediado por los GABA_AR. En contraste con esto, se necesita una estimulación más fuerte para provocar el potencial inhibitorio lento, lo que sugiere que el GABA liberado en la hendidura sináptica difunde y activa los GABA_BR presinápticos acoplados a los canales GIRK (Newberry & Nicoll, 1985).

Trabajos realizados por Balasubramanian y cols. (2004) indican que la activación de los GABA_AR que contienen la subunidad $\gamma 2$ puede, potencialmente, inducir la internalización de los GABA_BR a través de una interacción entre la subunidad $\gamma 2$ y el GABA_BR (Balasubramanian et al., 2004). De igual forma, se ha reportado que los GABA_BR también pueden influir en la expresión de los GABA_AR regulando la secreción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lo que, a su vez, aumenta la expresión de

los GABA_AR que contienen subunidades β 2-3 (Kuczewski et al., 2011). Estos experimentos sugieren un complejo mecanismo de coordinación durante la respuesta neuronal a GABA, y que dependería de la composición estructural de los receptores expresados en el sitio.

4 Taurina

La taurina es un β -aminoácido zwitterónico (Huxtable, 1992) aislado por primera vez de la bilis de toro en 1827 por Friedrich Tiedemann y Leopold Gmelin. La taurina es diferente del resto de los aminoácidos por tres características principales. Primero, el grupo carboxílico es sustituido por un grupo sulfónico; además de no formar parte de la estructura de proteínas y ser metabólicamente inerte, es decir, no participa en ningún ciclo metabólico, a excepción de la formación del ácido taurocólico para el metabolismo de los lípidos. En las células nerviosas, la concentración intracelular de taurina es mayor en un rango de 500:1 respecto al espacio extracelular (Huxtable, 1992).

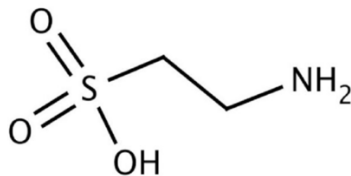


Figura 7. Estructura química de la taurina

En humanos, la principal fuente de taurina se encuentra en la dieta. Sin embargo, también puede ser sintetizada a partir de la cisteína, aunque la cantidad de taurina obtenida por esta vía es limitada. Además de la ingesta dietética, la taurina endógena se origina principalmente a partir de tres vías sintéticas en el cuerpo (Figura 8). La primera es la vía del ácido cisteinosulfínico, que incluye tres reacciones enzimáticas secuenciales de la cisteína: la cisteína dioxigenasa, que da origen al ácido cisteinosulfínico; la sulfinoalanina descarboxilasa, que forma hipotaurina; y la hipotaurina

deshidrogenasa, que da origen a la taurina (Sumizu, 1962). La segunda es la vía de transulfuración, que convierte la homocisteína en cistationina mediante la cistationina β -sintasa; a partir de la cual, la cistationina gamma-liasa convierte la cistationina en cisteína, que ingresa nuevamente a la primera vía de síntesis (Ripps & Shen, 2012). La tercera fuente de taurina es el producto final degradante de la coenzima A, que es la cisteamina, en la que partimos de la oxidación de la hipotaurina por la 2-aminoetanotiol dioxigenasa y también entra en la primera vía de síntesis (Dominy et al., 2007).

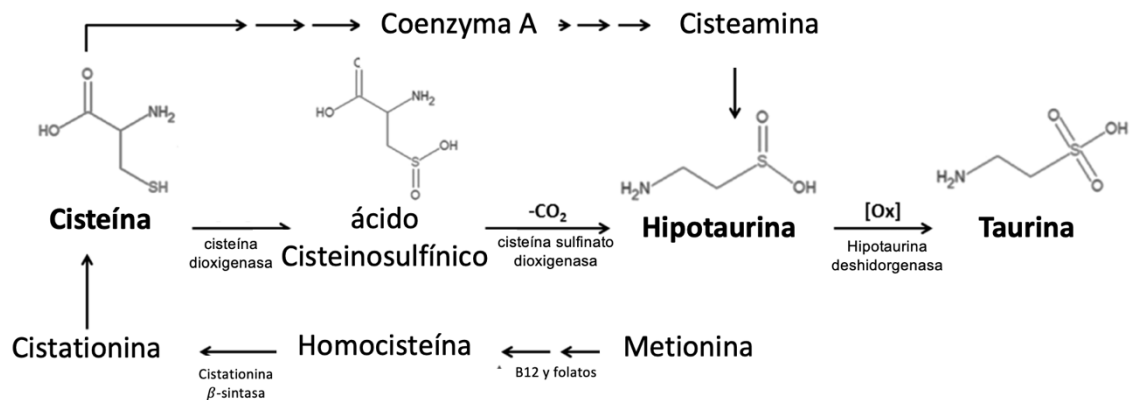


Figura 8 Vía para la síntesis de taurina a partir de metionina y cisteína. Tomado de DeLuca (2015) (De Luca et al., 2015).

La síntesis de taurina en el cerebro parece requerir la cooperación metabólica entre astrocitos y neuronas (Dominy & Stipanuk, 2004). En los cultivos de astrocitos se ha comprobado que, aunque la vía de conversión de cisteína a taurina permanece intacta, se acumula hipotaurina situación que no ocurre cuando se co-cultivan con neuronas, donde disminuye la hipotaurina y aumenta la taurina (Vitvitsky et al., 2011). Se ha demostrado que la taurina se distribuye en casi todos los tejidos de los animales y exhibe muchas funciones biológicas que incluyen, la osmorregulación, la estabilización de membranas, la modulación del calcio y tiene un efecto antioxidante (Murakami, 2015). Algunos mamíferos, por ejemplo, los felinos y los zorros, no son capaces de sintetizar taurina y la escasez de esta puede inducir directamente miocardiopatías, degeneración de la retina y defectos en la reproducción (Huxtable, 2000). La taurina tiene diferentes efectos biológicos en los

diferentes sistemas, está descrito que puede conjugarse con los ácidos biliares en el hígado, contribuyendo así a la excreción normal de bilis (Johnson et al., 1991). En el músculo esquelético, puede promover la excitación-contracción dependiente de iones de calcio, regular el volumen celular (Spriet & Whitfield, 2015) y mejora la diferenciación y el crecimiento del músculo esquelético (Miyazaki et al., 2013). En el sistema cardiovascular, modera la aterosclerosis y las enfermedades coronarias al reducir el nivel de apolipoproteína B100 y mejorar la eficacia de las contracciones cardíacas (Yanagita et al., 2008). También actúa sobre la insuficiencia cardíaca congestiva al aumentar la fuerza de contracción del músculo cardíaco. Recientemente, un metaanálisis sugirió que la taurina podría tener efectos antihipertensivos en humanos (Waldron et al., 2018). Además, mantiene la función renal normal regulando los osmolitos, el ciclo celular y la apoptosis (Chesney et al., 2010). Es indispensable para mantener el desarrollo normal de la retina (Froger et al., 2014) y la regulación del Ca^{2+} e inhibición de la señal de fosforilación de proteínas (Lombardini, 1991). Además, se ha reportado que el suplemento de taurina puede participar en la prevención contra algunas enfermedades como la obesidad (Murakami, 2015), la diabetes o el síndrome metabólico (Imae et al., 2014). En el cerebro, su papel es aún más complejo. La taurina es abundante en todas las regiones del cerebro, especialmente en la etapa del desarrollo embrionario (Agrawal et al., 1968). En el bulbo olfatorio adulto, que es también uno de los principales nichos neurogénicos en donde se preserva la neurogénesis, mantiene niveles elevados (Miller et al., 2000). Por lo tanto, la taurina se considera un factor trófico para el desarrollo del cerebro, promueve la proliferación de células cerebrales y protege de los daños inducidos por agentes tóxicos (Pasantés-Morales & Hernández-Benítez, 2010). Más recientemente, se ha sugerido que la administración de taurina podría atenuar algunas enfermedades neurodegenerativas (Menzie et al., 2014), como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, o la enfermedad de Huntington. En el sistema nervioso, debido a la falta de receptores específicos, la taurina desempeña funciones fisiológicas a

través de dos receptores principales: los receptores GABA y los receptores de glicina (Kilb & Fukuda, 2017).

4.1 Participación de taurina durante el proceso de diferenciación neuronal

La taurina interviene en los procesos de proliferación y diferenciación neuronal, procesos esenciales para el desarrollo y la plasticidad sináptica. Shivaraj y colaboradores demostraron que la taurina promueve la proliferación de las CPNs derivadas del hipocampo, en un modelo de isquemia cerebral (Shivaraj et al., 2012). La capacidad de la taurina para promover la proliferación de CPNs se ha vinculado a su influencia en diversas vías de señalización intracelular. Una de estas vías incluye la activación del receptor de glicina, que se sabe que está involucrado en la modulación de la excitabilidad neuronal y la neurogénesis (Hernández-Benítez et al., 2012). Además, la taurina activa al GABA_AR, contribuyendo a la regulación del equilibrio excitador-inhibidor en el cerebro en desarrollo. En modelos de cultivo celular de ratón, se ha observado que la suplementación con taurina aumenta la expresión de marcadores neuronales como la proteína microtubular asociada 2 (MAP2), marcador de diferenciación neuronal (Chen et al., 2017). Estos hallazgos sugieren que la taurina no solo promueve la proliferación de células progenitoras, sino que también podría facilitar su diferenciación en neuronas maduras y funcionales. Además, la taurina protege a las células progenitoras y a las nuevas neuronas en proceso de maduración del daño oxidativo y la excitotoxicidad. Esta protección es fundamental para mantener un entorno favorable que favorece la neurogénesis y la diferenciación neuronal (Schaffer et al., 2000). En el contexto del desarrollo del sistema nervioso, la taurina modula la sinaptogénesis. Se ha observado que induce la expresión de proteínas sinápticas y promueve la formación de sinapsis en cultivos neuronales, lo que sugiere que la taurina no solo es importante para la diferenciación neuronal,

sino también para la sinaptogénesis y la funcionalidad neuronal (Shivaraj et al., 2012)

II JUSTIFICACIÓN

En etapas postnatales, el potencial neurogénico está limitado a dos zonas del cerebro: la ZSG del giro dentado y la ZSV de los ventrículos laterales. Los nichos neurogénicos responden de forma dinámica a diversos estímulos genéticos y moleculares, favoreciendo el proceso de diferenciación neuronal y garantizando la provisión adecuada de neuronas. En este contexto, la taurina es un aminoácido que se encuentra en altas concentraciones en el cerebro de los mamíferos, participa en la proliferación, diferenciación y migración de células progenitoras durante el desarrollo embrionario. Como análogo estructural del neurotransmisor GABA, actúa como un agonista parcial, modulando la actividad de los receptores GABAérgicos. Por lo tanto, en este estudio se determinó el efecto de la taurina y la participación de los receptores a GABA durante el proceso de diferenciación de células progenitoras neurales provenientes de la zona subventricular del cerebro de ratón.

III HIPÓTESIS

La taurina modulará positivamente el proceso de diferenciación de células progenitoras neurales de la zona subventricular a través de los receptores GABA_B.

IV OBJETIVO GENERAL

Caracterizar por reconstrucciones neuronales morfométricas, electrofisiología, y aproximaciones moleculares, el efecto de taurina sobre los GABA_BR durante

el proceso de diferenciación de células progenitoras neurales provenientes de la zona subventricular del cerebro de ratón.

V OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar la presencia de las subunidades GABA_{B1} y GABA_{B2} en las neuroesferas derivadas de la ZSV.
2. Determinar el efecto de la taurina durante el proceso de diferenciación neuronal de las células precursoras derivadas de la ZSV.
3. Determinar la participación de los receptores GABA durante el proceso de diferenciación neuronal de las células precursoras derivadas de la ZSV.
4. Determinar las vías de señalización, a través del cual taurina y los receptores GABA participan en el proceso de diferenciación.

VI METODOLOGÍA

Cultivo de las células progenitoras neurales derivadas de la zona subventricular del cerebro de ratón (CPN-ZSV).

Para la obtención de CPNs, se utilizaron 4 ratones CD1 (RRID: IMSR_JAX:002962), mantenidos en un ciclo invertido de luz-oscuridad, de 6 a 8 días de nacidos. Los ratones se decapitaron, se extrajo el cerebro y se aisló la ZSV bajo el microscopio estereoscópico. El tejido obtenido de los 4 ratones se disoció mecánicamente, se colocó en medio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12. Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 r.p.m. El botón resultante se re suspendió y se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con B27 y factores de crecimiento (EGF, 20nM; FGF, 20nM). El cultivo se mantuvo a 37°C al 5% de CO₂, y se suplementó a las 72 horas con factores de crecimiento para mantener la proliferación y formación de

neuroesferas (primarias). Después de 7 días, se disgregaron con tripsina durante 5 minutos. Una vez separadas las células se resembraron y se mantuvieron a 37°C al 5% de CO₂ de 4 a 5 días hasta que volvieron a formar neuroesferas (secundarias), para posteriormente disgregarlas, y distribuir las de acuerdo con las distintas condiciones experimentales.

Tratamiento con taurina durante el proceso de diferenciación

Para determinar el efecto de la taurina sobre el proceso de diferenciación de las CPNs, las células disgregadas de las neuroesferas secundarias, se resembraron en cajas de 12 pozos pretratadas con Poli-*D*-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se cultivaron con DMEM/F12, SFB al 1% sin factores de crecimiento, en presencia o ausencia de taurina 10 mM. Para evaluar el papel de los receptores a GABA en el proceso de diferenciación, las células cultivadas se preincubaron durante una hora con picrotoxina (PTX) (100 μ M) antagonista del GABA_AR, CGP 55845 (5 μ M) antagonista del GABA_BR o con baclofen (100 μ M) agonista del GABA_BR, como se muestra en la Tabla 1. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% durante 14 días, según las condiciones experimentales que se muestran en la siguiente tabla.

Grupo control	Grupo Taurina
----	Taurina
CGP 55845	Taurina CGP 55845
CGP 55845	Taurina Baclofen
PTX	Taurina PTX

Tabla 1. Esquema de los diferentes grupos experimentales.

Para determinar la participación de diferentes cascadas de señalización en el proceso de diferenciación inducido por taurina a través de los receptores GABA, las células se cultivaron para diferenciación durante tres días y se preincubaron con BAPTA-AM (100 μ M) en un buffer de Krebs-Ringer sin calcio durante 30 minutos. Luego, se co-incubaron KN93 (10 μ M), FR180204 (10 μ M) y SrcI (1 μ M) en presencia de taurina (10 mM) durante siete días. Todos los fármacos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Ensayos de Inmunofluorescencia

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente; terminado el tiempo de fijación, se realizaron dos lavados con PBS 1X. Posteriormente, las células se permeabilizaron con PBS 1X-Tritón X-100 al 0.2% durante 30 minutos. Para el bloqueo de los sitios inespecíficos de interacción con el anticuerpo primario, las células se incubaron con buffer de bloqueo (1% de BSA en PBS1X-Tritón X-100 al 0.2%) durante una hora. Se adicionaron los anticuerpos primarios para Nestina (Cell Signaling Technology Cat# 4760, RRID: AB_2235913) [1:300], KI67 (Cell Signaling Technology Cat# 9027, RRID: AB_2636984) [1:100], Doblecortina (DCX, Abcam Cat# ab18723, RRID: AB_732011), GABA_BR1 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-166408, RRID: AB_2108175), GFAP Abcam Cat# AB53554, RRID AB_880202) y MAP2 (Cell Signaling Technology Cat# 8707, RRID: AB_2722660), los núcleos se marcaron con DAPI. Los anticuerpos se diluyeron en buffer de bloqueo y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X, al finalizar el último lavado se adicionaron los anticuerpos secundarios que están marcados con Alexa 488 y Alexa 594 a una dilución de (1:500) en PBS1X-

Tritón X-100 al 0.2% y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente protegidos de la luz, posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS1X, seguidos de la tinción con DAPI (10µg/ml) diluido en agua destilada durante 15 minutos, finalmente las células se lavaron dos veces con agua destilada y se montaron en portaobjetos con 10µl de medio de montaje Fluorogel. La captura de imágenes de las preparaciones se realizó utilizando el lector de placas de modo múltiple para imágenes celulares Cytation™ 5 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

Análisis cuantitativo de marcadores de diferenciación neuronal

Se obtuvieron microfotografías utilizando el lector de placas de modo múltiple para imágenes celulares Cytation™ 5 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) con un cubo de filtro de proteína fluorescente verde (GFP) (excitación 469/35 nm; emisión 525/39 nm; espejo dicróico 497 nm) y LED de 465 nm; un cubo de filtro Texas Red (excitación 586/15 nm; emisión 647/67 nm; espejo dicróico 605 nm) y LED de 590 nm; y un cubo de filtro 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (excitación 377/50 nm; emisión 447/60 nm; espejo dicróico 409) y LED de 365 nm. Se seleccionaron aleatoriamente microfotografías de cinco campos de cada cubreobjetos, y se cuantificó el número total de células positivas para DAPI y células positivas para los diferentes marcadores en los campos seleccionados. Las imágenes de las células se procesaron utilizando el software Gen5™ (BioTek Instruments Inc.). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas sobre el número total de células.

Análisis Morfométrico de la arborización dendrítica de células positivas para DCX y MAP2

Se obtuvieron microfotografías de células DCX+ de forma aleatoria. Se analizaron las células DCX+ para cada condición experimental. El número de

neuritas primarias, secundarias y terciarias, así como la longitud de las neuritas primarias, se determinaron con Gen 5 3.04. Se analizó la diferencia entre neuritas primarias, secundarias y terciarias en las diferentes condiciones experimentales. La cuantificación manual de la arborización dendrítica se realizó contando el número de dendritas primarias para cada neurona utilizando el software ImageJ con el complemento Sholl analysis v3.4.2. Las neuritas primarias se definieron como aquellas que se originaban directamente del soma; las neuritas secundarias y terciarias se definieron como aquellas que se originaban de las neuritas primarias y secundarias, respectivamente. Los colores de las reconstrucciones fueron modificados, con el programa Adobe Illustrator.

Registros de patch-clamp de célula completa

Las CPNs se mantuvieron 14 días en diferenciación sobre un cubreobjetos dentro de una placa Petri para transferirse a una cámara de registro de inmersión. Se visualizaron con óptica de contraste de interferencia diferencial infrarroja acoplada a un microscopio Nikon FN1 (Nikon Corporation, Minato, Tokio, Japón). Las CPNs se perfundieron continuamente con solución de Ringer a una velocidad de 3–4 mL/min⁻¹ con la ayuda de una bomba peristáltica (120S, Watson-Marlow, Wilmington, MA, USA). La composición de la solución de baño fue la siguiente (mM): 132 NaCl, 3.6 KCl, 1.5 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 HEPES y 10 D-glucosa; pH = 7.30–7.40; osmolaridad = 280-290 mOsm. La temperatura de la cámara de registro se mantuvo a 32 ± 1°C con un controlador de temperatura de un solo canal (TC-324C, Warner Instruments, Hamden, CT, USA). Las pipetas de patch se fabricaron a partir de vidrio borosilicato utilizando un tirador de micropipetas (P97, Sutter Instruments, Novato, CA, USA). El tirador se programó para obtener pipetas con una resistencia de punta de 3–5 MΩ cuando se llenaron con una solución intracelular que contenía lo siguiente (mM): 140 KCl, 1.1 EGTA, 10 HEPES, 3 Mg²⁺-ATP, 0.3 Na⁺-GTP y pH = 7.20–7.30. Los registros de célula completa se

realizaron con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, San José, CA, USA). Los datos adquiridos se digitalizaron a una frecuencia de muestreo de 20 kHz y se filtraron a 2 kHz con un Digidata 1322A (Axon Instruments, Palo Alto, CA, USA). Las señales se adquirieron y analizaron offline con el software pCLAMP 10.6 (Molecular Devices).

Determinación de Propiedades Intrínsecas

El potencial de membrana en reposo (RMP) se determinó después de la ruptura inicial de la membrana de la configuración de giga-sello a la configuración de célula completa en modo de fijación de voltaje. Después de 2–3 minutos de estabilización, se inyectó una serie de corrientes de voltaje negativas y positivas de -100 a +50 mV (500 ms, incrementos de 250 pA) para determinar la resistencia de entrada (RN) y la constante de tiempo de la membrana (τ_{memb}). La RN se calculó como el valor de la pendiente de una función polinómica de primer orden $f(x) = mx + b$ ajustada a la relación corriente-voltaje cerca del PMR. La τ_{memb} se determinó ajustando una función de decaimiento mono-exponencial a una respuesta de voltaje provocada por la inyección de un paso de corriente negativa (1 s, -30 pA). La capacitancia de membrana (C_m) se calculó como la relación de τ_{memb} a RN.

Determinación de Corrientes Macroscópicas

Se provocaron corrientes de membrana totales mediante la inyección de pulsos despolarizantes (-90 a +60 mV, pasos de 10 mV, 500 ms) desde un potencial de -70 mV. Se empleó el protocolo P/4 para restar corrientes de fuga en línea, y la calidad de la grabación se monitoreó en línea incorporando los siguientes criterios: corrientes de mantenimiento < 50 pA, RMP estable y resistencia de acceso (< 15 M Ω , < 20% de deriva). Para generar gráficos I-V, la amplitud de la corriente se midió ya sea en la amplitud máxima del pico o como el promedio en un intervalo de 100 ms en la corriente en estado estacionario.

Ensayo de la disponibilidad de Calcio

Para determinar el efecto de la taurina sobre el proceso de diferenciación de las CPN-ZSV, las células disgregadas de las neuroesferas secundarias, se sembraron en cajas de 12 pozos pretratadas con Poli-D-lisina y se cultivaron con DMEM/F12, SFB al 1%, sin factores de crecimiento, en presencia o ausencia de taurina 10 mM, con o sin inhibidores de los GABA_AR o GABA_BR como PTX, CGP 55845 o baclofen, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% durante 7 días con los tratamientos descritos anteriormente, en el día 7, las células diferenciadas se incubaron durante 30 minutos con BAPTA 10 μM, en Ringer Krebs libre de Ca²⁺, 20 mM cloruro de sodio, 5 mM cloruro de potasio, 1 mM cloruro de magnesio, 25 mM bicarbonato de sodio, and 5.5 mM D-glucosa, el pH se ajustó a 7.3. Después de los 30 minutos de incubación se removió el Ringer Krebs libre de calcio, y se colocó medio DMEM/F12 suplementado con 1% de SFB y 1% de B27. Tanto el grupo control como el grupo tratado con Taurina se incubaron con y sin inhibidores de los GABA_AR o GABA_BR (PTX, CGP 55845 o baclofen respectivamente).

VII RESULTADOS

Caracterización de las neuroesferas obtenidas de la ZSV

Los cultivos de neuroesferas de la ZSV son ampliamente utilizados para simular la capacidad proliferativa, autoregenerativa y de diferenciación de las CPNs. En las condiciones adecuadas, una sola célula progenitora es capaz de generar una neuroesfera debido a su alto índice proliferativo. Estas, crecen como estructuras esféricas que flotan libremente, conformadas por un determinado número de células individuales, que correlaciona positivamente con el tamaño de la neuroesfera y con los días del cultivo *in vitro*; su diámetro suele oscilar entre 100 y 200 μm (Svendsen et al., 1998). Este modelo artificial es capaz de evaluar la proliferación celular, la autorrenovación y la diferenciación potencial. Las neuroesferas de este estudio, se obtuvieron a partir de ratones CD1 en el sexto día posnatal y se cultivaron en medio DMEM/F12, suplementado con B27 (1%) y factores de crecimiento: EGF (20 nM) para promover la proliferación, y FGF (20 nM) que ayuda a mantener el estado progenitor. Las neuroesferas primarias, secundarias y terciarias se tomaron en los días 7, 12 y 17, respectivamente (Figura 9). A los 7 días de cultivo, las neuroesferas primarias mostraron un tamaño y morfología irregular, con la presencia de agregados celulares. Las neuroesferas secundarias (12 días de cultivo), son homogéneas entre ellas, con un tamaño $\approx 150 \mu\text{m}$, simétricas y con bordes regulares. Las neuroesferas terciarias (17 días de cultivo), presentan mayor tamaño, $\approx 200 \mu\text{m}$; sin embargo, el centro de la neuroesfera presentó centros necróticos, debido a la ausencia de nutrientes en esa zona, por lo que los experimentos realizados en este estudio, se limitaron a neuroesferas secundarias.

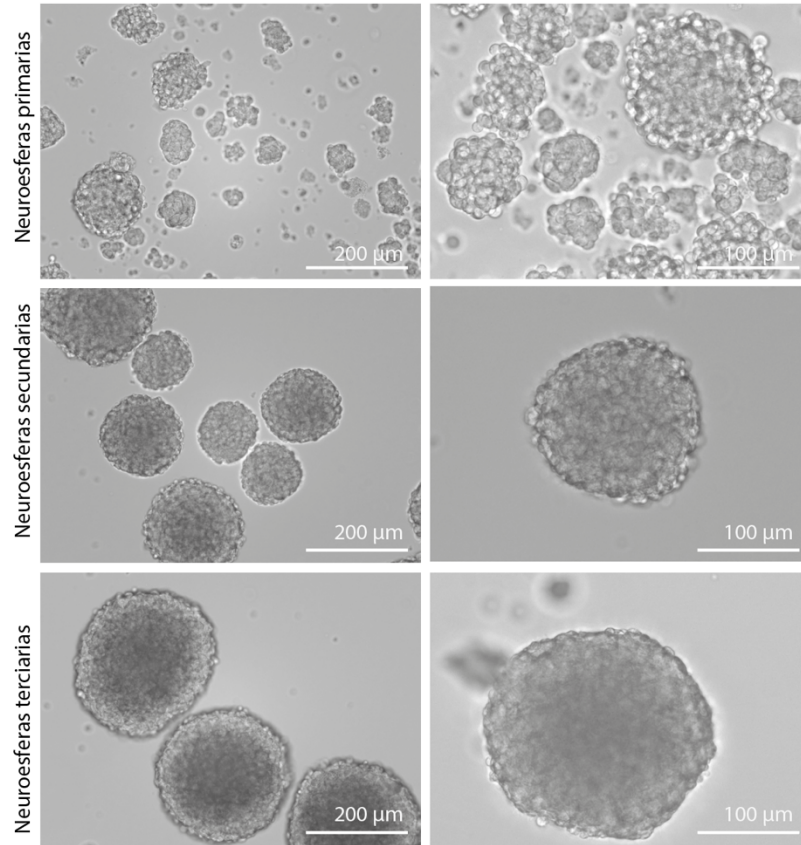


Figura 9 Microfotografías representativas en campo claro de las neuroesferas obtenidas de la ZSV del cerebro de ratón. En el panel superior se encuentran las neuroesferas primarias, en el panel de en medio las neuroesferas secundarias y en el panel inferior las neuroesferas terciarias. Las microfotografías en los paneles izquierdos fueron tomadas con un objetivo de 10x; panel derecho, 20x. Las neuroesferas se formaron a los 7, 12 y 17 días, respectivamente.

Para determinar tanto el estado progenitor como la capacidad proliferativa de las CPNs, se evaluó la expresión de marcadores mediante ensayos de inmunofluorescencia en neuroesferas secundarias. Estas expresan la proteína Nestina (un marcador de células progenitoras), y Ki67 (un marcador de proliferación). En esos experimentos los núcleos fueron marcados con DAPI. La presencia de estos marcadores confirman el origen progenitor y la capacidad proliferativa de las células (Figura 10).

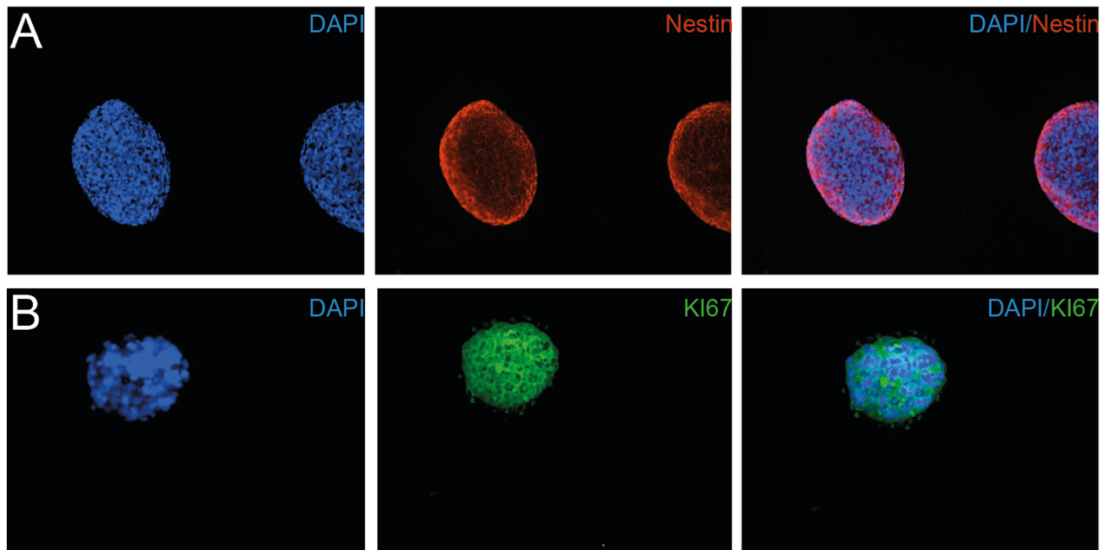


Figura 10 *Expresión de marcadores de células precursoras neurales en neuroesferas secundarias derivadas de la zona subventricular.* Marcaje por inmunofluorescencia de marcadores de células precursoras neurales y de proliferación en neuroesferas secundarias aisladas de la zona subventricular. Los núcleos de las células presentes en estas neuroesferas están marcados con DAPI. Las neuroesferas fueron inmunopositivas para A) nestina (rojo) y B) KI67 (verde), indicando la presencia de células progenitoras neurales y proliferación activa, respectivamente. Las microfotografías fueron capturadas con un objetivo de 20x y la barra de escala proporcionada es consistente en todos los paneles.

A continuación, determinamos la presencia de receptores GABA_B en las células presentes en las neuroesferas. Estos receptores metabotrópicos están compuestos por las subunidades GABA_{B1} y GABA_{B2}. Debido a que la subunidad GABA_{B1} contiene el sitio de unión a GABA y la subunidad GABA_{B2} está acoplada a la proteína G, fue necesario demostrar la presencia de ambas subunidades. Para este propósito, realizamos ensayos individuales de inmunofluorescencia para cada una de las subunidades, con el objetivo de detectar su expresión en las células que conforman las neuroesferas. Los resultados de estos ensayos revelaron la presencia de ambas subunidades de los receptores GABA_B en las células presentes en las neuroesferas, como se observa en la Figura 11. La detección de GABA_{B1} y GABA_{B2} en estas células sugiere que esta vía neurotransmisora podría regular la función neuronal en este modelo de cultivo.

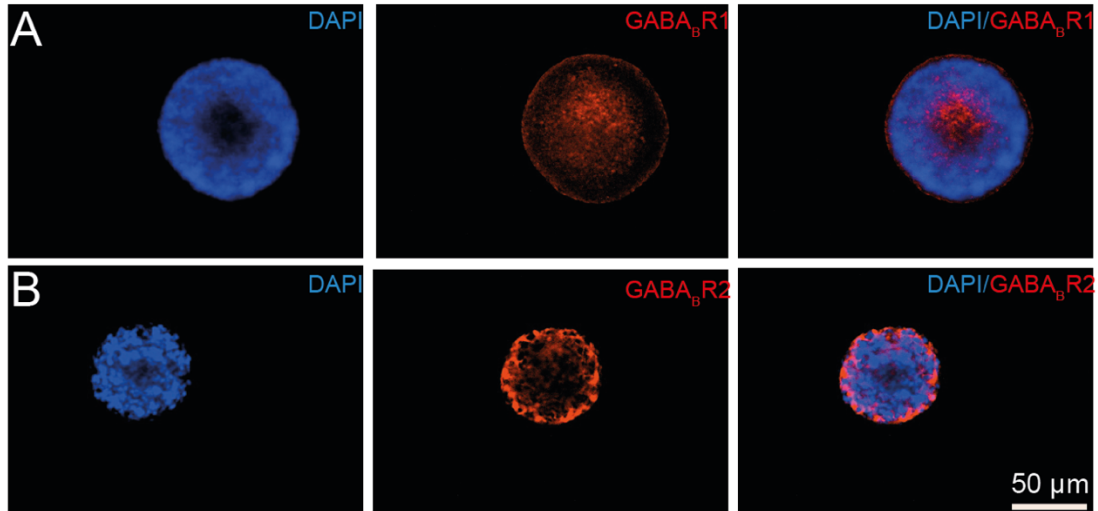


Figura 11. Expresión de las subunidades del GABA_BR en neuroesferas secundarias derivadas de la zona subventricular. Marcate por inmunofluorescencia de las subunidades del GABA_BR en neuroesferas secundarias aisladas de la ZSV. Las neuroesferas secundarias mostraron inmunoreactividad a las dos subunidades del GABA_BR, GABA_{BR1} (rojo) y GABA_{BR2} (rojo). Los núcleos de las células que conforman las neuroesferas se marcaron con DAPI. Todas las microfotografías fueron capturadas con un objetivo de 20x y la barra de escala proporcionada es consistente en todos los paneles.

Determinación de la concentración efectiva de taurina para la diferenciación neuronal

Las neuroesferas de CPNs se disgregaron mecánicamente con la finalidad de generar células individuales que fueron sembradas en placas de cultivo de 48 pozos pretratadas con poli *D*-lisina para favorecer la adhesión y la diferenciación neuronal. Para determinar la concentración óptima de taurina en la generación de células tipo neuronal, se realizó una curva dosis-respuesta. La Figura 12 muestra la evaluación de las siguientes concentraciones de taurina: 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 30 mM y 60 mM. Los resultados muestran que la concentración de taurina más efectiva para promover la generación de células tipo neuronal fue 10 mM, que es consistente con lo reportado previamente (Huang et al., 2018; Pasantés-Morales & Hernández-Benítez, 2010). Esta concentración fue la utilizada en los siguientes experimentos.

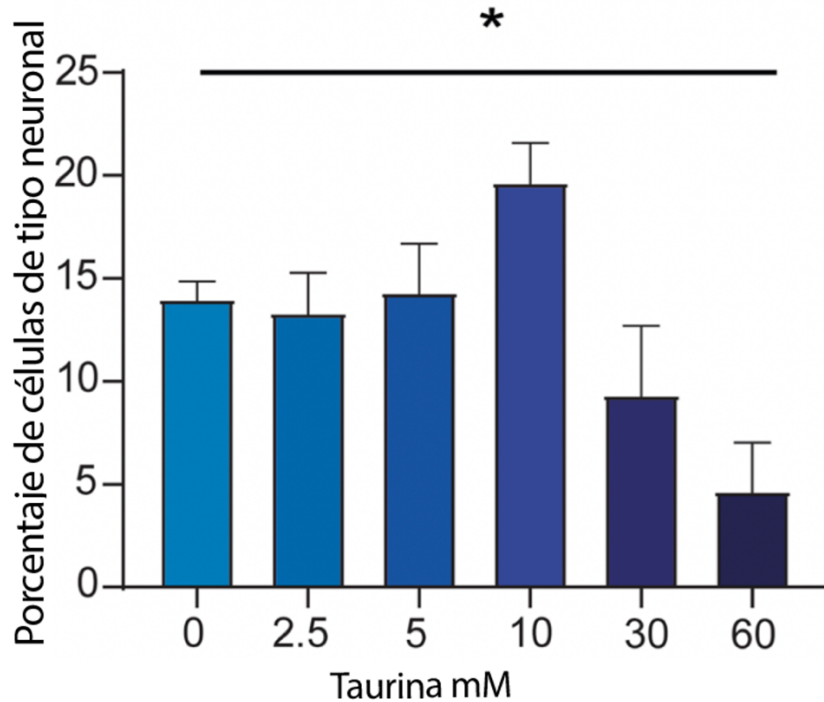


Figura 12. Curva dosis-respuesta de taurina para la generación de células tipo neuronal. Se evaluó la relación dosis-respuesta de taurina en células derivadas de la ZSV, utilizando concentraciones de 0, 2.5, 5, 10, 30 y 60 mM. Se determinó que la concentración más efectiva para generar células tipo neuronal fue de 10 mM.

Efectos de la taurina sobre la diferenciación astrocítica y neuronal en las CPNs

Los cultivos de CPNs derivadas de la ZSV son conocidos por su capacidad de diferenciarse en neuronas y células gliales, ya que los neuroblastos derivan de las células B que tienen como origen la glía radial (Doetsch et al., 1997b). Se ha observado que estas células tienden a diferenciarse en un mayor porcentaje hacia un linaje astrocítico, lo cual puede atribuirse a la memoria celular mantenida por estas células. Por ello, evaluamos por inmunofluorescencia el porcentaje de células diferenciadas en astrocitos mediante la detección de la proteína de GFAP, que es característica de los astrocitos. La Figura 13 muestra que el porcentaje de células GFAP+ en cultivos expuestos a taurina (10 mM) es del 65%, mientras que en el grupo control fue del 75%. Aunque no se observaron diferencias significativas entre

ambos grupos, se evidenció una disminución en el porcentaje de células GFAP+ en el grupo expuesto a taurina. Estos resultados, aunque no alcanzaron significancia estadística, son consistentes con hallazgos previos (Doetsch et al., 1997a), que sugieren una tendencia de las CPNs de la ZSV a diferenciarse hacia el linaje astrocítico.

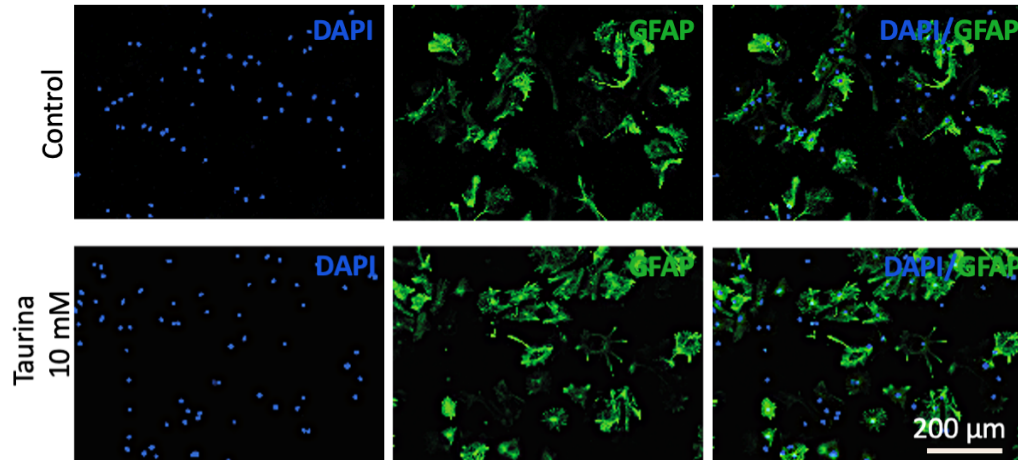


Figura 13 Efecto del tratamiento con taurina en la expresión de GFAP en las CNPs derivadas de la ZSV. El tratamiento con taurina (10 mM) disminuyó el porcentaje de células GFAP+ (65%) en comparación con el grupo control (75%), indicando un posible efecto de la taurina en la modulación de la diferenciación hacia un linaje neuronal en cultivos de CPNs de la ZSV.

Para evaluar el efecto de taurina sobre la diferenciación neuronal, las CPNs disgregadas y sembradas se trataron con taurina 10 mM, administrada cada 72 horas. Al finalizar este tiempo, evaluamos la expresión del marcador DCX mediante un ensayo de inmunofluorescencia (Figura 14). Los resultados revelaron un aumento significativo en la inmunopositividad a DCX en las células tratadas con taurina en comparación con el grupo control (Prueba de Mann-Whitney, $U = 4$; $p = 0.0019$, $n = 8$ para cada condición experimental).

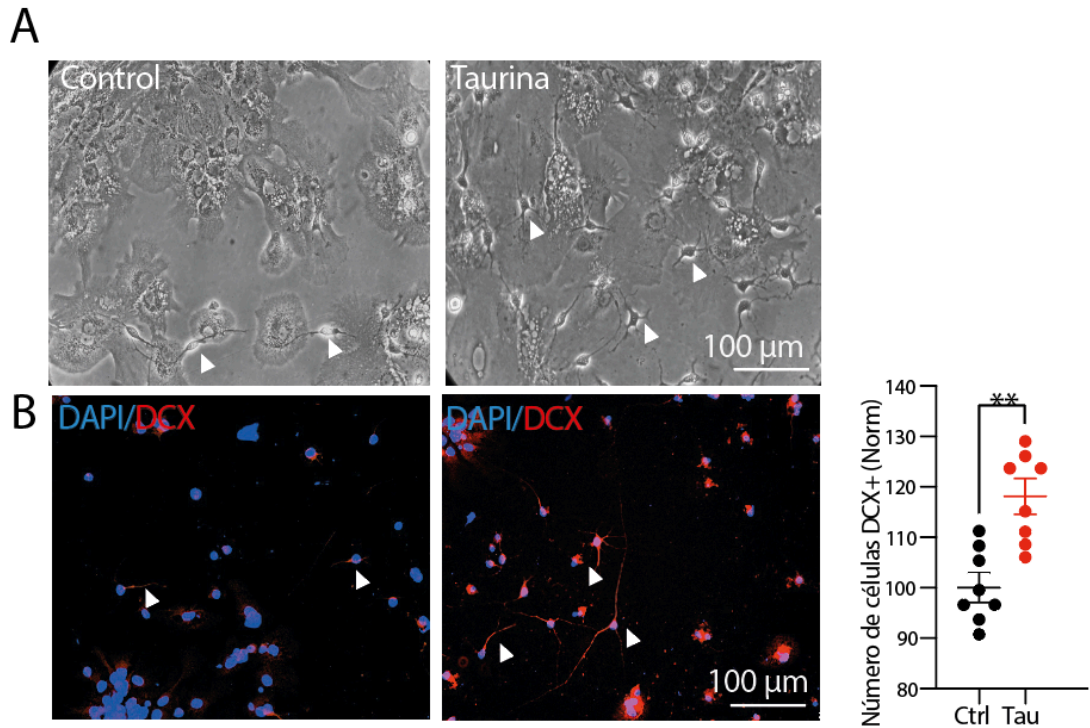


Figura 14 . El tratamiento con taurina (10 mM) incrementa la expresión de DCX en las CPNs derivadas de la ZSV. A) Microfotografía representativa en campo claro de células de control (panel derecho) y tratadas con taurina (10 mM) (panel izquierdo) después de 14 días de diferenciación. B) Microfotografía de las inmunofluorescencias que muestran la expresión de DCX (rojo), marcador de neuronas inmaduras, en las mismas condiciones. Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las cabezas de flecha en color blanco indican células con morfología neuronal. En el panel izquierdo se muestra la gráfica de dispersión que corresponde al porcentaje de células DCX + en las células control (negro) y en las tratadas con taurina (10 mM) (rojo) (n = 8 cultivos celulares para cada condición experimental); Prueba de Mann Whitney, ** p < 0.01.

Después, evaluamos si las células DCX+ expresan marcadores de neuronas maduras. La Figura 15, muestra la evaluación de la expresión de NeuN, una proteína nuclear expresada en la mayoría de las neuronas postmitóticas que nos permite evaluar el grado de maduración neuronal en los cultivos celulares. Generalmente, NeuN se expresa después de que ha disminuido la expresión de DCX. Las células tratadas con taurina (10 mM) mostraron un incremento en la inmunopositividad a NeuN (Prueba de Mann Whitney, U = 4.5 p < 0.03 n = 6 para cada condición).

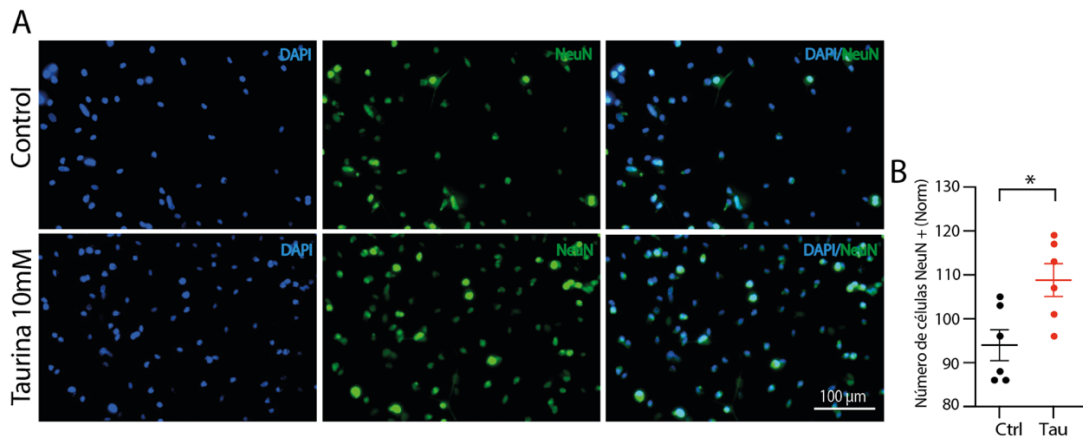


Figura 15 El tratamiento con taurina (10 mM) incrementa el número de neuronas maduras en las CPNs derivadas de la ZSV. A) Microfotografías de la inmunofluorescencia contra NeuN, marcador de neuronas maduras, en células control y tratadas con taurina (10 mM) después de 14 días de diferenciación. El panel de la derecha muestra los núcleos marcados con DAPI (azul). El panel central, núcleos NeuN+(verde). El panel izquierdo muestra el solapamiento de estas dos tinciones, por lo que los núcleos NeuN+ y DAPI+ se muestran en color turquesa. B) Gráfica de dispersión que muestra el porcentaje de células NeuN+ en las células control (negro) y en las tratadas con taurina (10 mM)(rojo) (n = 6 cultivos celulares para cada condición experimental); Prueba de Mann Whitney, * p < 0.05.

El tratamiento con taurina promueve el desarrollo de la morfología neuronal en las CPNs

Si la taurina promueve la morfología neuronal, entonces las células diferenciadas y tratadas con taurina (10 mM) deberán tener claras diferencias morfológicas comparadas con las células control. Consistente con este enunciado, las células tratadas con taurina desarrollaron prolongaciones o neuritas y mostraron una morfología tipo neuronal, donde incluso es posible distinguir el axón y las dendritas. En contraste, las células control presentaron protrusiones cortas con una sola neurita primaria originada directamente del soma y sin ramificaciones. Nuestros resultados muestran que la taurina estimula la expresión de marcadores neuronales y tiene un efecto mayor al inducir características tipo neuronal.

El análisis morfométrico de las células DCX+ nos ofrece información relevante sobre el proceso de diferenciación neuronal. La Figura 16A muestra que las

células tratadas con taurina (10 mM) presentaron un aumento en el número total de neuritas en comparación con el grupo de control. Específicamente, se observó un incremento significativo en el desarrollo de neuritas secundarias, terciarias y de orden superior en las células tratadas con taurina (Figura 16D). Este fenómeno sugiere que la taurina puede desempeñar un papel importante durante el desarrollo de la complejidad morfológica neuronal (Prueba de Mann Whitney, $U = 426$; $p < 0.001$). También se observó que la extensión de las neuritas terciarias y de orden superior se incrementó significativamente en comparación con el grupo de control (Figura 16E) (ANOVA de una vía; $p < 0.001$).

El aumento en el número de ramificaciones neurales en comparación con el grupo control refleja un fenómeno importante en el desarrollo neuronal: el desarrollo del árbol dendrítico. Este aumento en la complejidad morfológica de las células tratadas con taurina (10 mM), caracterizado por la presencia de múltiples ramificaciones, contrasta con la morfología limitada del grupo control, donde predominan las neuritas primarias largas sin puntos de ramificación evidentes.

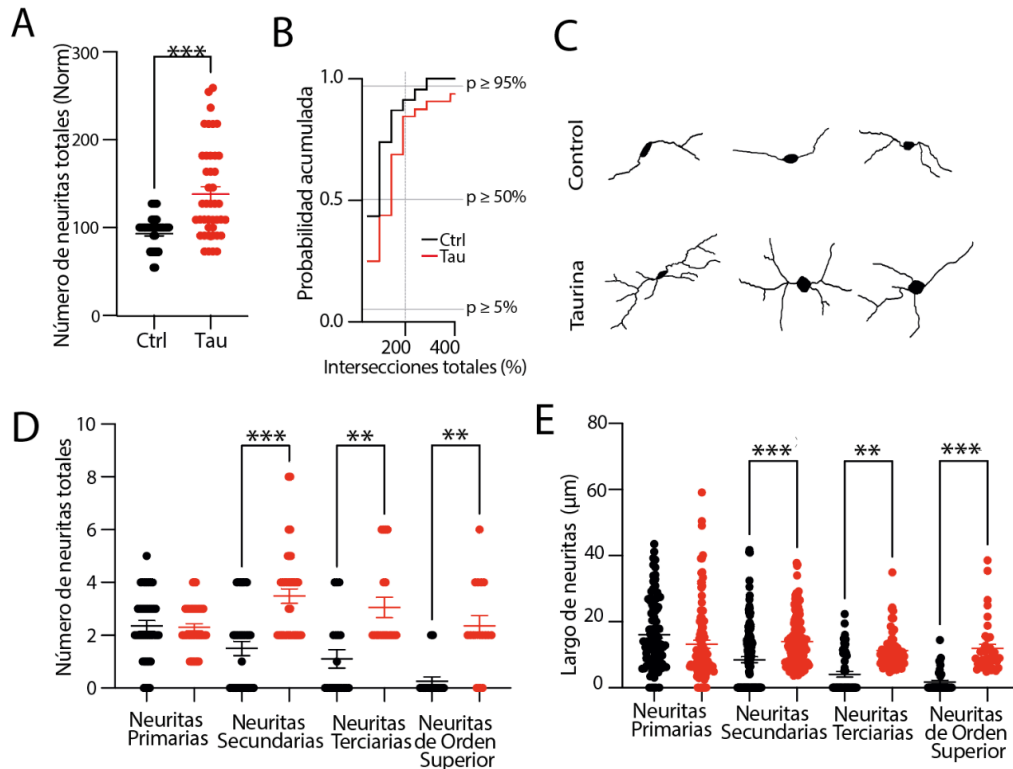


Figura 16 El tratamiento con taurina (10 mM) favorece el desarrollo de la morfología neuronal en las CPNs derivadas de la ZSV. A) Gráfico de dispersión con el número total de neuritas en las células DCX+ en la condición control (n = 36) y en las células tratadas con taurina (n = 40). B) Gráfico de probabilidad acumulada que resume el número de intersecciones de neuritas en las células de control comparada con las células tratadas con taurina. El desplazamiento hacia la derecha de las células tratadas con taurina refleja el aumento en el número de ramificaciones en las neuritas (n = 8 para cada condición experimental). C) Ejemplos de reconstrucciones digitales donde se muestra el aumento en el número de neuritas primarias, secundarias y terciarias en las células que fueron tratadas con taurina 10 mM. D) Gráfico de dispersión con el número total de neuritas primarias, secundarias, terciarias y de orden superior en las células control (n = 36) y las que fueron tratadas con taurina 10 mM (n = 40). E) Gráfico de dispersión del largo de las neuritas primarias, secundarias, terciarias y de orden superior en las células control (n = 36) y las que fueron tratadas con taurina 10 mM (n = 40). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Para evaluar la complejidad dendrítica, se realizaron análisis morfométricos de Sholl en 6 células diferenciadas y tratadas con taurina, así como en la condición control, por lo que se realizaron reconstrucciones digitales. Los círculos concéntricos se trazaron con una distancia de 10 μM y se sobrepusieron sobre las reconstrucciones digitales (Figura 17). El análisis de Sholl mostró diferencias importantes en la morfología neuronal entre los grupos experimentales. Mientras que las células del grupo control mostraron

morfología predominantemente unipolar con escasas neuritas, las células tratadas con taurina mostraron morfología multipolar con abundantes crecimientos neuríticos y una arborización compleja. El mayor número de intersecciones se resume en el gráfico que muestra el área bajo la curva (ABC) obtenida del análisis de Sholl (ABC en las células tratadas con taurina = $310.4 \pm 39.4\%$ comparadas con el control; t-test: $t(10) = 7.875$; *** $p < 0.001$, $n = 6$ para cada condición experimental).

Estos resultados, sugieren que la taurina actúa como un morfógeno en el proceso de diferenciación neuronal. Además, la transición de una morfología unipolar a una multipolar, junto con el aumento en la densidad y la extensión de las neuritas en las células tratadas con taurina (10 mM), sugiere un efecto positivo en la promoción y maduración neuronal durante la diferenciación de las células precursoras neurales.

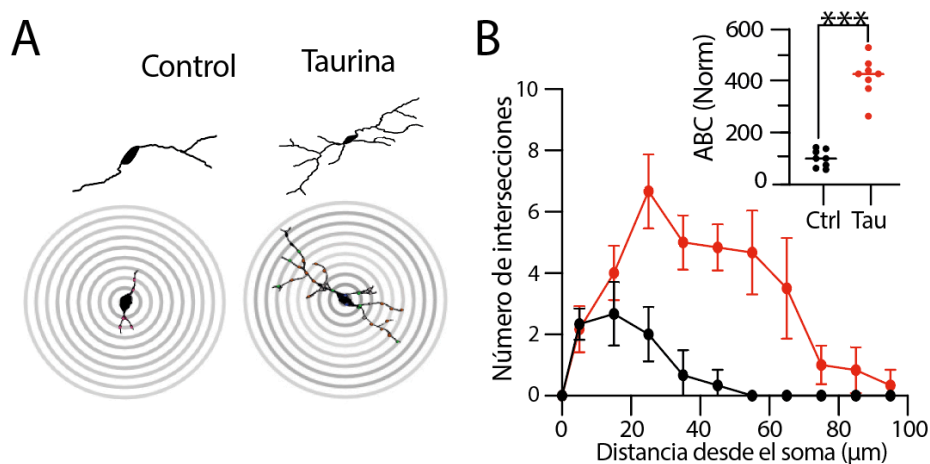


Figura 17. El tratamiento con taurina (10mM) promueve la diferenciación neuronal y estimula la complejidad dendrítica. A) Reconstrucciones digitales representativas y anillos concéntricos (distancia entre anillos = $10 \mu\text{m}$) utilizados para el análisis morfométrico tipo Sholl. B) Análisis tipo Sholl comparando el número de intersecciones de neuritas en la condición de control y en las células tratadas con taurina. En el recuadro superior se muestra el gráfico del área bajo la curva (ABC) que muestra el área total obtenida del análisis tipo Sholl realizado en las células de control y tratadas con taurina ($n = 8$ células DCX+) *** $p < 0.001$.

El tratamiento con taurina induce respuestas electrofisiológicas en las CPNs

Las células diferenciadas tratadas con taurina (10mM) expresan marcadores neuronales y presentan morfología más desarrollada con mayor complejidad dendrítica, lo que sugiere un estado de maduración neuronal. Por ello, determinamos las propiedades electrofisiológicas pasivas y activas de las CPNs, mediante registros de patch-clamp, en la modalidad de célula completa. Medimos las propiedades de la membrana de 14 células divididas en células control y tratadas con taurina (10 mM) (n = 7 para cada grupo).

En comparación con las células control, las células tratadas con taurina (10 mM) presentaron una disminución en las deflexiones de voltaje de membrana (Figura 18A), lo que indica una mayor funcionalidad de los canales iónicos activos cerca del potencial de membrana en reposo (PMR), posiblemente debido a la presencia de canales de potasio dependientes de voltaje. La Figura 18B muestra la relación corriente-voltaje, a partir de la cual determinamos que la taurina no alteró el PMR en comparación con las células control (PMR en: células control = -67.1 ± 4.7 mV; células tratadas con taurina = -69.4 ± 4.6 mV; ANOVA de una vía; $F(2,18) = 0.456$; $P = 0.641$). También, observamos una disminución importante en la resistencia de entrada somática (R_N) de las CPNs tratadas con taurina en comparación con las células control, consistente con la disminución en las deflexiones de voltaje debido a la mayor actividad de los canales iónicos cerca del PMR, que se muestra en la Figura 18C (R_N en: células control = 777.7 ± 87.66 M Ω ; células tratadas con taurina = 307.3 ± 22.55 M Ω , prueba de Tukey; $p < 0.001$; ANOVA de una vía; $F(2,18) = 21.040$; $p < 0.001$). Los cambios en la R_N fueron acompañados por un aumento en la capacitancia de la célula (C_m) (C_m en: células control = 34.6 ± 6.7 pF; células tratadas con taurina = 92.7 ± 8.7 pF; prueba de Tukey; $p < 0.001$; ANOVA de una vía; $F(2,18) = 10.860$; $p < 0.001$; Figura 18D). Además, la C_m fue mayor en las células tratadas con taurina, lo que corresponde con la regulación del

volumen celular mediada por taurina. Finalmente, no encontramos diferencias en la constante de tiempo de carga de membrana (t_{memb}) entre las condiciones experimentales (t_{memb} en células control = 25.7 ± 3.21 ms; en células tratadas con taurina = 27.8 ± 2.25 ms; ANOVA de una vía; $F(2,18) = 0.616$; $P = 0.550$; Figura 18E).

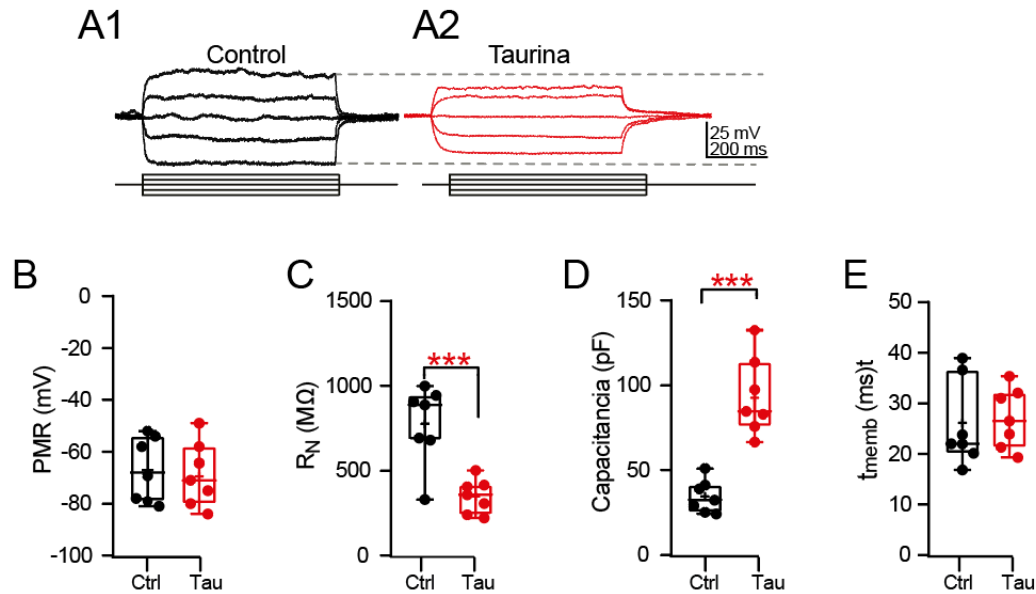


Figura 18. Propiedades electrofisiológicas de las CPNs diferenciadas tratadas con taurina. A) Respuestas representativas corriente-voltaje provocadas a -60 mV en células control (negro), y en las células tratadas con taurina (rojo). Es importante destacar la disminución de la respuesta de voltaje en las células tratadas con taurina, que se muestra con las líneas discontinuas. Diagramas de caja y experimentos individuales (círculos) que muestran: B) PMR, C) R_N somática, D) C_m somática, y E) t_{memb} de las células control, y las células tratadas con taurina ($n = 7$ células por grupo) *** $p < 0.001$.

Después, evaluamos las propiedades activas de la membrana de las células diferenciadas en condición control y en las células tratadas con taurina (10 mM). Se inyectaron pulsos de corriente crecientes para probar si una despolarización sostenida de la membrana desencadenaba un potencial de acción (PA). Las células control no presentaron PA, como se ilustra en la Figura 19, en donde solo dos células control produjeron un pequeño 'espícula'

sensible al voltaje ante una despolarización sostenida. En contraste, en respuesta a la corriente inyectada a las células tratadas con taurina (10 mM), se observó una descarga repetitiva de PA. El número de células que mostraron formas de onda similares a un PA frente a las células sin respuesta (relleno gris) se resume en los gráficos superiores de la Figura 19A. En las células de control, la proporción de células que solo generaron un 'espícula' fue del 28.57%; mientras que en las células tratadas con taurina el 85.71% respondieron con al menos un PA.

Además, es interesante que el PA observado en las células tratadas con taurina fue seguido por un postpotencial hiperpolarizante (*afterhyperpolarization* o AHP, por sus siglas en inglés) que se asemejaba a la AHP lenta dependiente de Ca^{2+} que sigue al PA en las neuronas maduras del SNC. El patrón de disparo observado en las dos condiciones experimentales y la fase de AHP resultante se ilustran en la Figura 19B. Además, mostramos el disparo repetitivo en términos de frecuencia de PA. La Figura 19C resume la frecuencia de PA en función de la corriente inyectada en las células de control y las tratadas con taurina (10 mM).

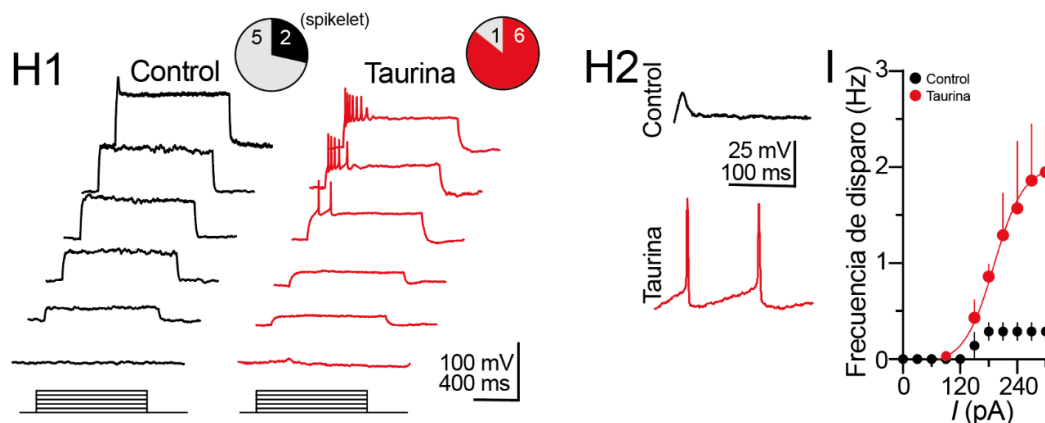


Figura 19. El tratamiento con taurina induce la maduración electrofisiológica neuronal. A) Respuestas representativas de voltaje evocadas a -60 mV. La despolarización sostenida desencadenó un 'espícula' en las células de control (rojo); mientras que en las células tratadas con taurina (rojo), se observó una breve ráfaga de potenciales de acción. Los gráficos superiores muestran la proporción de células capaces de generar un PA en respuesta a la inyección de corriente despolarizante. B) Ampliación de las espigas representativas

obtenidas en las dos condiciones experimentales. Las células tratadas con taurina (10 mM) mostraron una conductancia AHP bien definida tras el PA individual. C) Gráfico de la frecuencia máxima promedio de disparo de espigas en respuesta a pulsos de corriente despolarizantes para cada condición experimental.; ($n = 7$ células para cada grupo experimental).

La incubación con taurina (10 mM) modificó la cinética de la espiga o deflexión de voltaje rápida.. Este efecto es evidente en las espigas representativas de la Figura 20A. Como se mencionó anteriormente, la espiga control (o espícula) es pequeña y lenta, con una amplitud menor al del potencial de acción, sin AHP y requirió una despolarización fuerte para iniciarse. Por otro lado, las células tratadas con taurina (10 mM) produjeron espigas rápidas y regenerativas con una amplitud bien definida, seguidas por una AHP. Debido a esto, analizamos las propiedades cinéticas de las espigas regenerativas y comparamos los parámetros resultantes con valores obtenidos de potenciales de acción reales de interneuronas GABAérgicas. Primero, determinamos el umbral de voltaje de la membrana (V_{th}) para la iniciación de la espiga calculando su tercera derivada, un método matemático que identifica el umbral real del PA (Figura 20A). En comparación con las células control, encontramos que el tratamiento con taurina desplaza el V_{th} de la espiga a un potencial de membrana más hiperpolarizado, más cercano al V_{th} de un PA real, como se muestra en la Figura 20B (V_{th} de la espiga en células control = -21.1 ± 2.00 mV; células tratadas con taurina = -35.2 ± 1.44 mV; prueba de Tukey; $P = 0.005$; ANOVA de una vía; $F(2,9) = 9.352$; $P = 0.006$; V_{th} de PA real = -42.33 ± 1.54 mV; prueba de Tukey; $p < 0.001$; ANOVA de una vía; $F(3,14) = 15.840$; $p < 0.001$). A continuación, analizamos los parámetros cinéticos de las espigas utilizando una gráfica de desconvolución geométrica de voltaje o *phase Plot*. El panel izquierdo en la Figura 20C muestra una espiga de un PA real de una interneurona del hipocampo, y en el panel derecho, su phase plot. La figura 20D muestra los gráficos de superpuestos de las dos condiciones experimentales más un PA real (representado en color verde).

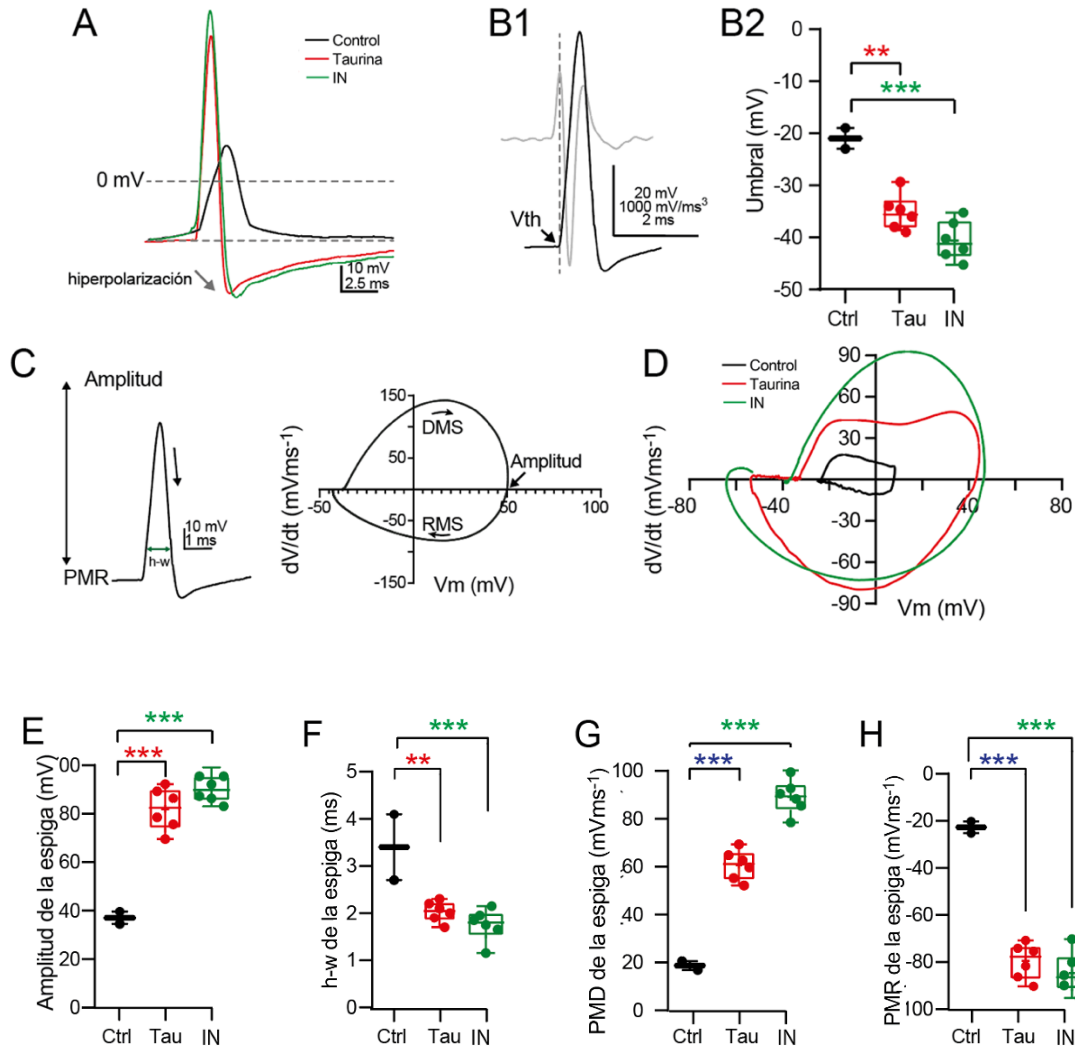


Figura 20. Propiedades cinéticas de las espigas de las CPNs diferenciadas. A) Espigas superpuestas de células control y células tratadas con taurina (10mM). El trazo en color verde corresponde a un PA real de una interneurona GABAérgica. Es importante resaltar el inicio lento, y la falta de AHP en el espícula de la condición control. En contraste, el tratamiento con taurina aumentó el inicio, la amplitud y la repolarización de la espiga. B) Ejemplos representativos de la primera y tercera derivadas (trazo gris y negro, respectivamente) de un PA real. El V_{th} para la iniciación del PA se determinó por el cambio de la tercera derivada de negativa a positiva. C) Diagramas de caja y experimentos individuales que muestran el V_{th} para cada grupo experimental, incluidos los valores obtenidos de un PA real (verde). El tratamiento con taurina desplazó el V_{th} a un potencial de membrana más hiperpolarizado. C) Ejemplo de un PA real de una interneurona GABAérgica y el phase plot resultante que indica los parámetros cinéticos medidos. PMD = pendiente máxima de despolarización; PMR = pendiente máxima de repolarización; h-w = ancho medio del pico. D) Diagramas de fase superpuestos de células control, células tratadas con taurina (10 mM), y un PA real. Gráficas de caja y experimentos individuales que resumen los parámetros cinéticos obtenidos de las espigas en cada condición experimental. El tratamiento con taurina: E) aumentó la amplitud de la espiga; F) disminuyó el h-w de la espiga; G) aumentó la PMD; y H) disminuyó la PMR, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

En comparación con las células control, el tratamiento con taurina (10 mM) aumentó la amplitud de la espiga (amplitud de la espiga en células control = 27.1 ± 2.55 mV; en células tratadas con taurina = 81.9 ± 3.58 mV; prueba de Tukey; $P = 0.001$; ANOVA de una vía; $F(2,9) = 14.330$; $P = 0.002$). Las CPNs tratadas con taurina (10 mM) tuvieron una amplitud más cercana a la amplitud real del PA (amplitud real del AP = 90.97 ± 2.12 mV; prueba de Tukey; $p < 0.001$; ANOVA de una vía; $F(3,14) = 20.940$; $p < 0.001$; Figura 21A). Consistente con este hallazgo, el ancho medio de la espiga (h-w) fue más corto en las células tratadas con taurina (10 mM), y en este grupo fue más cercano al h-w real del AP (h-w de la espiga en células control = 3.4 ± 0.70 ms; en células tratadas con taurina = 2.0 ± 0.09 ms; prueba de Tukey; $P = 0.009$; ANOVA de una vía; $F(2,9) = 9.198$; $P = 0.007$; h-w real del AP = 1.7 ± 0.14 ; prueba de Tukey; $p < 0.001$; ANOVA de una vía; $F(3,14) = 12.910$; $p < 0.001$; Figura 21B). Así mismo, la pendiente máxima de depolarización (o PMD) de la espiga, un parámetro que refleja la actividad de la conductancia de Na^+ dependiente de voltaje del PA, aumentó en las células tratadas con taurina (PMD en: células control = 18.7 ± 1.80 mV/ms; células tratadas con taurina = 58.1 ± 2.57 mV/ms, prueba de Tukey; $p < 0.001$; ANOVA de una vía; $F(2,9) = 32.260$; $p < 0.001$; MDS real del AP = 88.7 ± 2.88 mV/ms; prueba de Tukey; $p < 0.001$; ANOVA de una vía; $F(3,14) = 79.130$; $p < 0.001$; Figura 21C). También, calculamos la pendiente máxima de repolarización (PMR) como una medida indirecta de las conductancias de K^+ dependientes de voltaje que subyacen a la fase de repolarización del PA. En comparación con las células control, el tratamiento con taurina aumentó la velocidad de la PMR (PMR en: células control = -22.7 ± 2.50 mV/ms; células tratadas con taurina = -79.5 ± 3.08 mV/ms; prueba de Tukey; $p < 0.001$; ANOVA de una vía; $F(2,9) = 48.870$; $p < 0.001$; MRS real del AP = -84.7 ± 3.56 mV/ms; prueba de Tukey; $p < 0.001$; ANOVA de una vía; $F(3,14) = 42.630$; $p < 0.001$).

Por último, examinamos la expresión funcional de las corrientes macroscópicas expresadas por las CPNs. A diferencia de los experimentos previos, utilizamos el modo de fijación de voltaje, y aplicamos un protocolo que evoca secuencialmente una corriente entrante seguida de una corriente saliente. Como puede verse en la Figura 21, el tratamiento con taurina (10 mM) incrementó notablemente la corriente entrante en comparación con las células de control (corriente entrante en condición de control = $-76,2 \pm 24$ pA; en las células tratadas con taurina = $-248,1 \pm 36,3$ pA; prueba t; $p < 0,01$). Lo que sugiere un incremento en las corrientes entrantes de Na^+ dependientes de voltaje. Por otro lado, la corriente saliente exhibió dos componentes cinéticos: un pico de corriente de inactivación rápida seguido por una corriente sostenida que se asemeja a las corrientes neuronales de potasio I_A e I_D , respectivamente (Griego et al., 2021, 2022). Además, las células tratadas con taurina presentaron una mayor amplitud de la corriente saliente de inactivación rápida (corriente de inactivación rápida en la condición de control = $1.474,3 \pm 150$ pA; en las células tratadas con taurina = $2.621,4 \pm 42$ pA; prueba t; $p < 0,05$) y la corriente sostenida (corriente sostenida en la condición de control = 847 ± 111 pA; en las células tratadas con taurina = $1957,5 \pm 421$ pA). ; prueba t; $p < 0,05$).

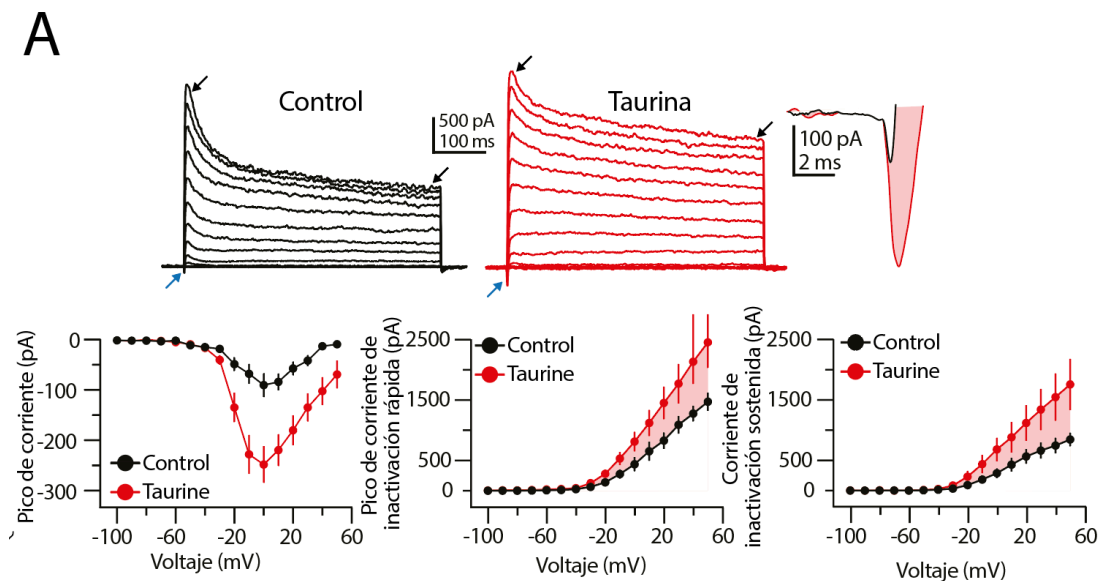


Figura 21 Propiedades de las corrientes macroscópicas de las CPNs diferenciadas. Trazos de corriente obtenidos en una célula control y una célula tratada con taurina (10mM).

Las flechas azules indican la corriente entrante, las flechas negras indican la corriente saliente de inactivación rápida y la corriente sostenida. En el panel derecho se muestra una ampliación de las corrientes entrantes. Trazo negro control; trazo rojo, corriente entrante tratada con taurina (10mM). En el panel inferior se muestra la gráfica de la dependencia del voltaje y la amplitud máxima de la corriente entrante. Panel central muestra la gráfica de la amplitud máxima del pico de la corriente saliente rápida. Panel derecho, amplitud de la corriente saliente sostenida. n = 12 células para cada condición experimental.

En conclusión, el tratamiento con taurina (10 mM) indujo cambios significativos en las propiedades electrofisiológicas de las CPNs. Las células tratadas con taurina (10 mM) mostraron una mayor funcionalidad de los canales iónicos membranales, una disminución en la resistencia de entrada somática, y un aumento en la capacitancia celular. Además, la taurina favoreció la generación de PA repetitivos, con características cinéticas que se asemejan a los potenciales de acción de las neuronas maduras. Estos resultados indican que la taurina es un potente inductor de la diferenciación fenotípica de las CPNs, transformándolas hacia un fenotipo similar al de neuronas con propiedades electrofisiológicas completas y funcionales.

El bloqueo del GABA_AR inhibe el proceso de diferenciación

Estudios previos han demostrado que el GABA_AR participa en el proceso de diferenciación de las CPNs (Tochitani et al., 2021). Con la finalidad de evaluar si el GABA_AR está involucrado en el proceso morfogénico mediado por taurina, las CPNs se preincubaron con PTX (100 μM) durante 60 minutos, terminado este tiempo se administró taurina cada 72 horas y se dejaron crecer durante un período de 14 días. El pretratamiento con PTX resultó en una reducción significativa en el número de células DCX+, marcador específico neuronal temprano (células DCX+ en presencia de taurina = 117.9 ± 3.93%; ANOVA de una vía; Prueba de Tukey; $p < 0.01$; en presencia de taurina + PTX = 73.49 ± 3.93%; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p < 0.001$; $F(2, 21) = 42.05$; $n = 8$ para cada condición experimental). La disminución en la cantidad de células DCX+

indica una posible interrupción en el proceso de diferenciación neuronal inicial, subrayando la importancia de la activación del GABA_AR en el mantenimiento y promoción del desarrollo neuronal temprano.

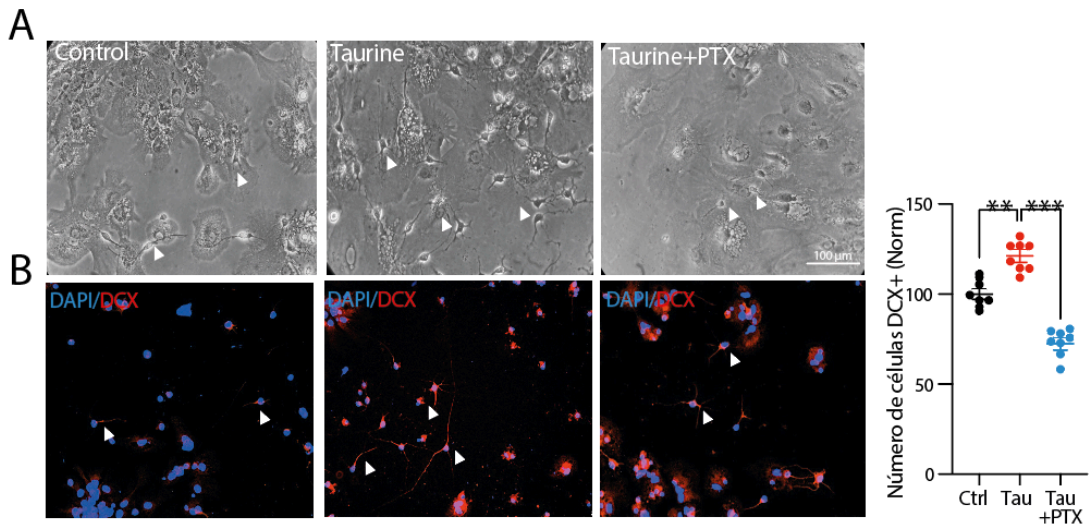


Figura 22. El bloqueo farmacológico del GABA_AR disminuye el número de células DCX+ en las CPN de la ZSV. A) Microfotografía representativa en campo claro de células de control (panel derecho), tratadas con taurina (10 mM) (panel de en medio) y tratadas con taurina (10mM) + PTX (100 μM) después de 14 días de diferenciación. B) Microfotografía de inmunofluorescencia mostrando la expresión de DCX (rojo), marcador de neuronas inmaduras, en las mismas condiciones. Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las cabezas de flecha en color blanco indican células con morfología neuronal. En el panel izquierdo se muestra la gráfica de dispersión que corresponde al porcentaje de células DCX+ en las células control (negro), en las tratadas con taurina (10 mM) (rojo) y en las células tratadas con taurina (10mM) + PTX (100 μM) (n = 8 cultivos celulares para cada condición experimental); ANOVA de una vía., **p < 0.01; ***p < 0.001.

En el análisis morfométrico, las células pretratadas con PTX (100 μM) y posteriormente tratadas con taurina mostraron una disminución estadísticamente significativa en el número total de neuritas y en la longitud de las neuritas primarias, así como la ausencia de neuritas terciarias y de orden superior (el número de neuritas totales en las células tratadas con taurina comparadas con las células control (n = 43) = 138.3 ± 8.1%; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; p < 0.001; taurina + PTX (n = 23) vs. células tratadas con taurina (n = 43) = 52.6 ± 7.6%; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; p < 0.001; F (2, 106) = 38.00).

Esta reducción se ejemplifica en las reconstrucciones digitales en las tres condiciones experimentales (Figura 23C), donde se observa la falta de desarrollo neuronal y de crecimiento dendrítico en las células tratadas con taurina + PTX; estas neuronas no presentan el mismo grado de arborización dendrítica ni extensión neuronal en comparación con las tratadas con taurina. De manera adicional, la Figura 23B muestra la distribución del número total de intersecciones en las tres condiciones experimentales en un gráfico de probabilidad acumulada, destacando nuevamente la importancia del GABA_AR en la morfogénesis y el desarrollo neuronal.

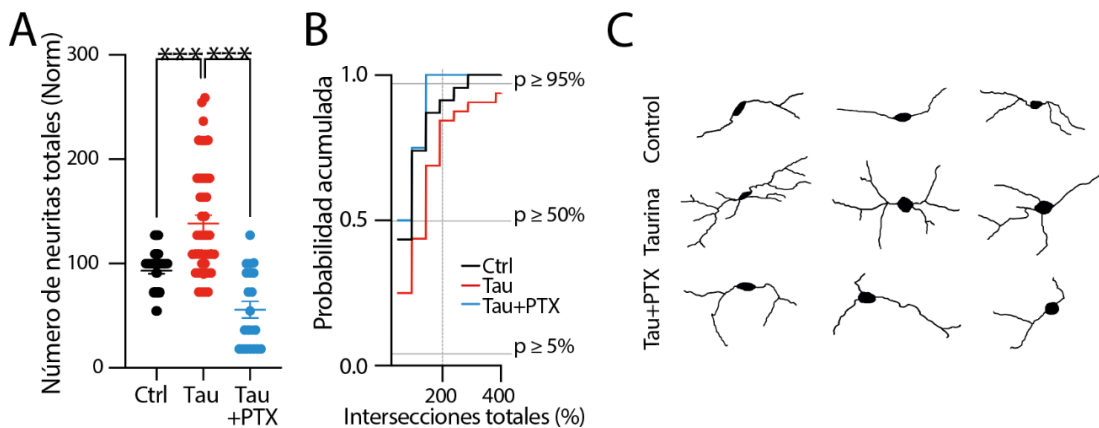


Figura 23. El bloqueo farmacológico del GABA_AR inhibe el crecimiento de neuritas en las CPNs de la ZSV. A) Gráfico de dispersión con el número total de neuritas en la condición de control ($n = 36$), en células tratadas con taurina ($n = 40$) y en células tratadas con taurina (10mM) + PTX (100 μ M) ($N = 27$). B) Gráfico de probabilidad acumulada que resume el número de intersecciones de neuritas en las células de control y las células tratadas con taurina comparado con células tratadas con taurina (10mM) + PTX (100 μ M). El desplazamiento hacia la izquierda de las células tratadas con taurina + PTX muestra la disminución en el número de intersecciones de neuritas cuando los GABA_AR fueron bloqueados C) Ejemplos de reconstrucciones digitales donde se muestra la disminución en el número de neuritas primarias, secundarias y terciarias en las células tratadas con taurina + PTX. ANOVA de una vía; *** $p < 0.001$.

Además, realizamos un análisis de Sholl para determinar la complejidad dendrítica en estas células, lo cual permitió observar con precisión los cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con PTX (100 μ M). Los resultados mostraron que las células tratadas con PTX (100 μ M) presentaban una

morfología predominantemente unipolar o bipolar, con neuritas que se originan directamente del soma. Estas células se caracterizaron por la presencia de un número limitado de neuritas y una escasez significativa de ramificaciones. Esto se resume en el gráfico de área bajo la curva (ABC). (ABC en las células tratadas con taurina = $310.4 \pm 39.42\%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p < 0.001$; ABC + PTX = $81.25 \pm 33.74 \%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p < 0.001$ F (2, 15) = 60.05; n = 6 para cada condición experimental.

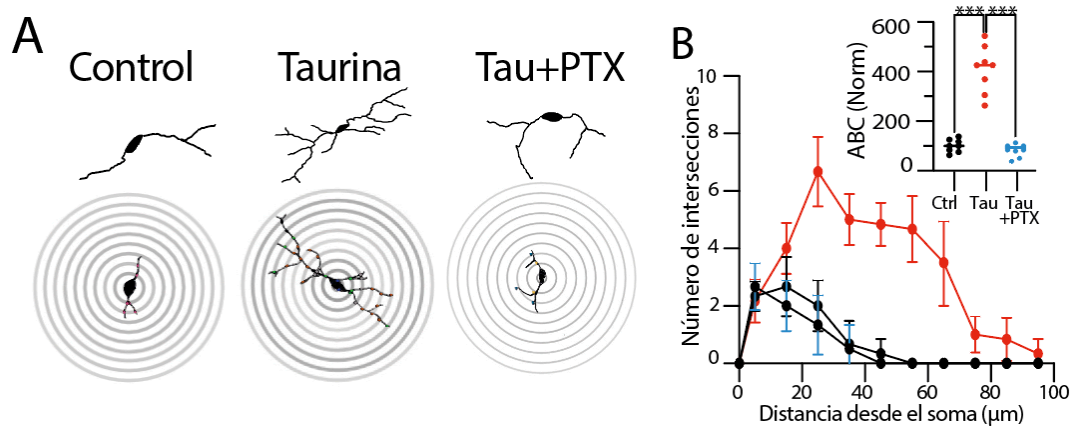


Figura 24. El bloqueo farmacológico del GABA_AR disminuye la complejidad dendrítica. A) Reconstrucciones digitales y anillos concéntricos (distancia entre anillos = 10 μm) utilizados para el análisis morfométrico tipo Sholl. B) Análisis tipo Sholl comparando el número de intersecciones de neuritas en condición control, en células tratadas con taurina y en células tratadas con taurina + PTX. En el recuadro superior se muestra el gráfico del área bajo la curva (ABC) que muestra el área total obtenida del análisis tipo Sholl realizado en las células de control, tratadas con taurina y tratadas con taurina + PTX (n = 8 células DCX+) ANOVA de una vía; *** p < 0.001.

La Figura 25 muestra la expresión funcional de las corrientes macroscópicas expresadas por las CPNs. En las células tratadas con taurina + PTX, la R_N no mostró un cambio significativo en comparación con las células control (R_N en células tratadas con taurina = $204.6 \pm 18.2 \text{ M}\Omega$; en taurina + PTX = $513.5 \pm 114 \text{ M}\Omega$; prueba t; $p < 0.01$). Asimismo, no se encontraron cambios en la capacitancia de membrana (C_m) de las células tratadas con taurina + PTX

comparado con las células tratadas solo con taurina (C_m en células tratadas con taurina = 47.39 ± 9.22 pF; en taurina + PTX = 55.10 ± 18.13 pF).

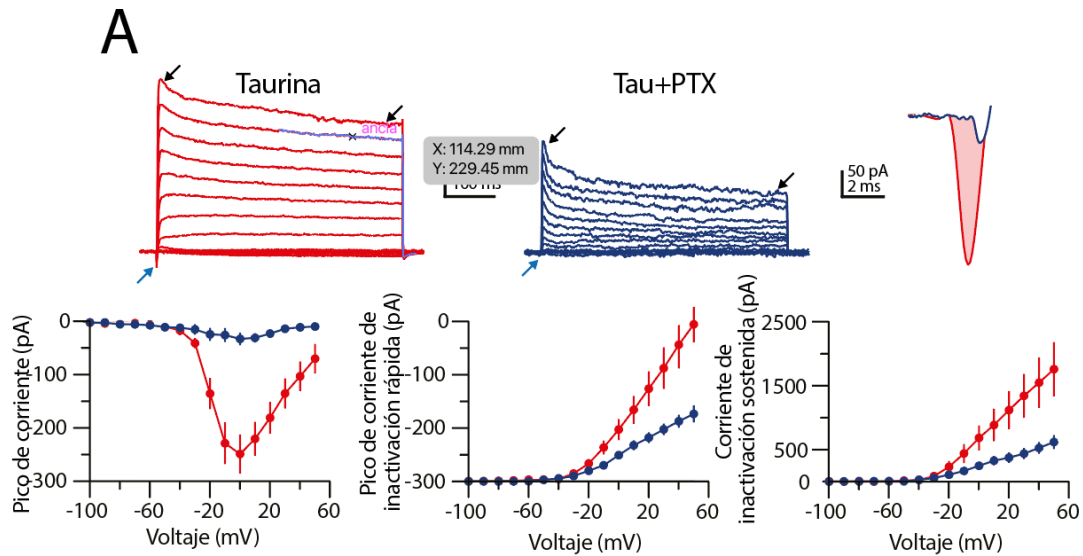


Figura 25. Propiedades de las corrientes macroscópicas de las CPNs diferenciadas tratadas con PTX. Trazos de corriente representativos, obtenidos en una célula tratada con taurina (10 mM) y una célula tratada con taurina (10 mM) + PTX (100 μ M). Las flechas azules indican la corriente entrante, las flechas negras indican la corriente saliente de inactivación rápida y la corriente sostenida. En el panel derecho se muestra una ampliación de las corrientes entrantes, el trazo azul muestra la célula tratada con taurina (10 mM) y el trazo rojo, corresponde a la corriente entrante de una célula tratada con taurina (10 mM) + PTX (100 μ M). En el panel inferior se muestra la gráfica de la dependencia del voltaje y la amplitud máxima de la corriente entrante. El panel central muestra la gráfica de la amplitud máxima del pico de la corriente saliente de inactivación rápida. En el panel derecho se muestra la amplitud de la corriente saliente sostenida.

Estos experimentos indican que la activación del GABA_AR es un paso esencial en el proceso morfogénico y en el crecimiento de neuritas mediado por la taurina. La inhibición farmacológica de los GABA_AR con PTX no solo disminuyó la expresión de DCX, sino que también afectó negativamente la complejidad morfológica de las neuritas, mostrando la importancia de este receptor en la mediación de los efectos promotores de la taurina sobre la diferenciación y maduración neuronal. Estos resultados subrayan el papel crítico de la señalización del GABA_AR en la regulación de la neurogénesis y la morfogénesis neuronal.

La activación de los receptores GABA_B no estimula el proceso de diferenciación de las CPNs de la ZSV.

Considerando que el GABA_AR juega un papel importante en el proceso de diferenciación mediado por taurina, y que las neuroesferas secundarias expresan ambas subunidades del GABA_BR, determinamos el papel del GABA_BR en la diferenciación de las CPNs. Las células disgregadas fueron preincubadas con baclofen (100 μM), agonista del GABA_BR, durante 60 minutos. Posteriormente, se les agregó taurina (10mM), y estos cultivos se mantuvieron durante 14 días, reapiando ambos tratamientos cada 72 horas. Al término de este período, se evaluó la expresión de DCX.

La activación del GABA_BR con baclofen (100 μM), en combinación con taurina (10mM) no modificó significativamente el número de células DCX+ en comparación con las células tratadas solo con taurina como se muestra en la Figura 26 (número de células DCX+ en presencia de taurina comparado con las células control = $117.9 \pm 4.38\%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p < 0.01$; en presencia de taurina + $106.3 \pm 4.38\%$; ns; $F(2, 20) = 8.33$; $n = 8$ para cada condición experimental).

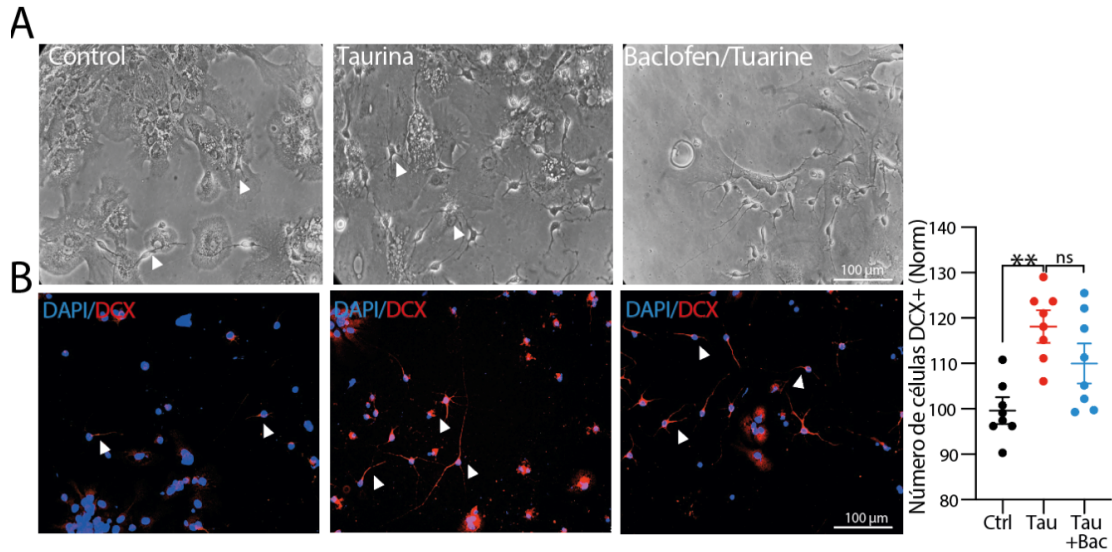


Figura 26. La estimulación farmacológica del $GABA_B R$ no tiene efecto en el número de células DCX+ en las CPNs de la ZSV. A) Microfotografía representativa en campo claro de células control (panel derecho), tratadas con taurina (10 mM) (panel de en medio) y tratadas con taurina (10mM) + baclofen (100 μ M) después de 14 días de diferenciación. B) Microfotografía de inmunofluorescencia mostrando la expresión de DCX (rojo), marcador de neuronas inmaduras, en las mismas condiciones. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las cabezas de flecha en color blanco indican células con morfología neuronal. En el panel izquierdo se muestra la gráfica de dispersión que corresponde al porcentaje de células DCX+ en las células control (negro), las tratadas con taurina (10 mM) (rojo) y las tratadas con taurina (10mM) + baclofen (100 μ M) (azul). ($n = 8$ cultivos celulares para cada condición experimental); ANOVA de una vía. ** $p < 0.01$.

Además, la activación del $GABA_B R$ con baclofen redujo significativamente el crecimiento de neuritas (Figura 27) (número de neuritas totales en células tratadas con taurina en comparación con las células control ($n = 43$) = $138.3 \pm 8.1\%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; ns; en taurina + baclofen ($n = 20$) comparado con las células tratadas con taurina ($n = 43$) = $83.1 \pm 7.7\%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p < 0.001$; $F(2, 118) = 20.38$). El análisis morfométrico adicional reveló que las intersecciones de las neuritas también disminuyeron en la condición de taurina + baclofen (Figura 23C), donde se observa que las células tratadas con taurina + baclofen presentan una morfología simplificada parecida al control, con morfología principalmente bipolar con pocas prolongaciones neuríticas de extensión limitada.

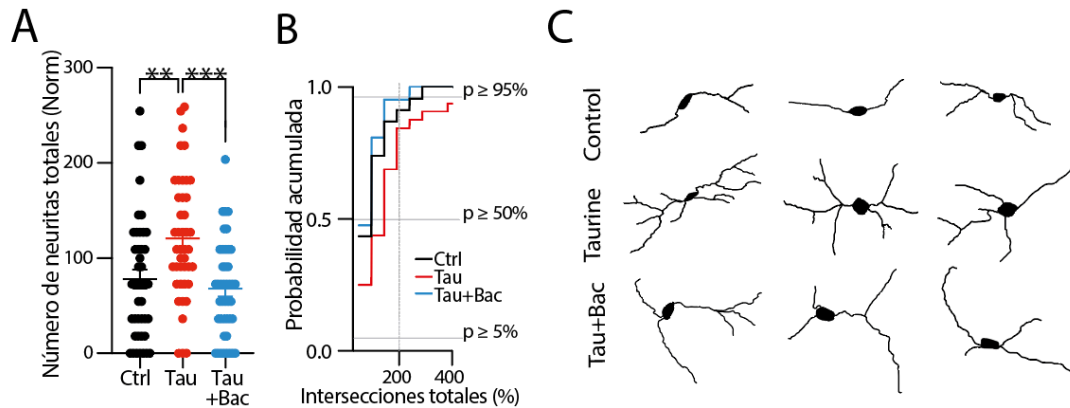


Figura 27. La activación del $GABA_B$ R con baclofen no estimula el proceso de diferenciación de las CPNs de la ZSV. A) Gráfico de dispersión con el número total de neuritas en control ($n = 36$); en células tratadas con taurina ($n = 40$) y en células tratadas con taurina (10mM) + baclofen (100 μ M) ($N = 37$). B) Gráfico de probabilidad acumulada con el número de intersecciones de neuritas en células control y en células tratadas con taurina comparado con células tratadas con taurina (10mM) + baclofen (100 μ M). El desplazamiento hacia la izquierda de las células tratadas con taurina + Baclofen que se mantiene similar a la condición control muestra que la activación del $GABA_B$ R no estimula el proceso de diferenciación neuronal. C) Ejemplos de reconstrucciones digitales donde se muestra la disminución en el número de neuritas primarias, secundarias y terciarias en las células tratadas con taurina + baclofen. ANOVA de una vía; *** $p < 0.001$.

El análisis de Sholl mostró que las células tratadas con baclofen presentaron un número significativamente menor de intersecciones en comparación con las células tratadas con taurina. Este análisis también incluyó el cálculo del área bajo la curva (ABC), la cual resultó ser considerablemente menor en las células tratadas con baclofen. Estos resultados sugieren que a diferencia de la taurina, el baclofen no promueve la morfogénesis y el desarrollo dendrítico en las células (Figura 28A) (ABC en presencia de taurine comparado con las células = $310.1 \pm 40\%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p < 0.001$; ABC en presencia de taurina comparado con las células tratadas con taurina + baclofen = $189.6 \pm 37.5 \%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p < 0.001$).

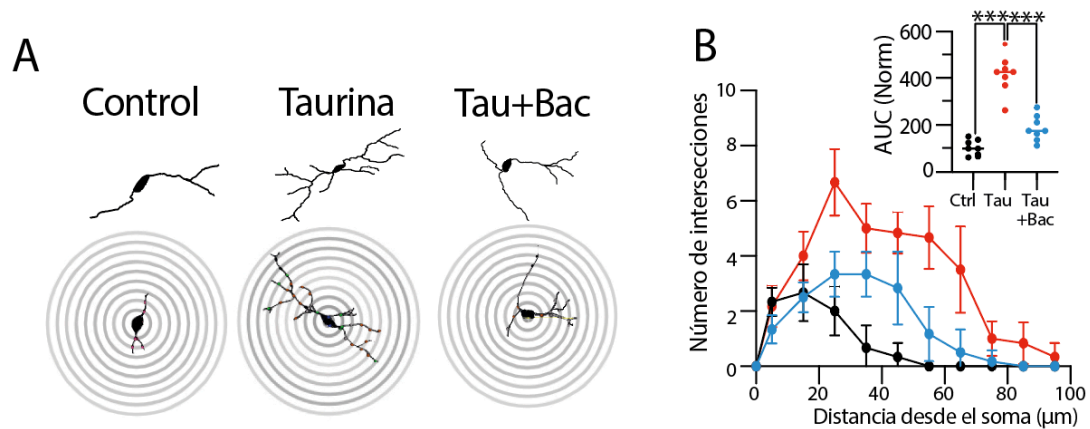


Figura 28. La activación farmacológica del $GABA_B$ R no estimula la complejidad dendrítica. A) Reconstrucciones digitales representativas y anillos concéntricos (distancia entre anillos = $10 \mu\text{m}$) utilizados para el análisis morfométrico tipo Sholl. B) Análisis tipo Sholl comparando el número de intersecciones de neuritas en la condición de control, en las células tratadas con taurina y en las células tratadas con taurina + baclofen. En el recuadro superior se muestra el gráfico del área bajo la curva (ABC) que muestra el área total obtenida del análisis tipo Sholl realizado en las células de control, tratadas con taurina y tratadas con taurina + baclofen ($n = 8$ células DCX+) ANOVA de una vía; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La falta de acción de la estimulación de los $GABA_B$ R no solo afectó el crecimiento dendrítico, sino que impactó las propiedades electrofisiológicas de las células. La estimulación con taurina resultó en un notable aumento en la corriente entrante (corriente entrante en células tratadas con taurina ($n = 6$) = $-248.09 \pm 36.30 \text{ pA}$; en células tratadas con taurina + baclofen ($n = 3$) = $-64.99 \pm 41.94 \text{ pA}$; prueba t: $t(7) = 3.24$; $p = 0.001$). Además, los componentes de la corriente saliente también se vieron afectados. (corriente de inactivación rápida en las células tratadas con taurina ($n = 6$) = $2,154.5 \pm 422 \text{ pA}$; en presencia de taurina y baclofen ($n = 3$) = $1,070 \pm 450 \text{ pA}$; prueba t: $t(7) = 2.13$; $p = 0.06$; (ns); corriente saliente sostenida en las células tratadas con taurina ($n = 6$) = $1,557.5 \pm 421 \text{ pA}$; en presencia de taurina y baclofen ($n = 3$) = $550 \pm 207 \text{ pA}$; prueba t: $t(7) = 2.07$; $p = 0.08$; ns); en presencia de taurina + baclofen, la resistencia somática de entrada (R_N) mostró un cambio significativo en comparación con las células tratadas con taurina. (R_N en células tratadas con taurina ($n = 6$) = $190.8 \pm 19.7 \text{ M}\Omega$; en células tratadas con taurina y baclofen ($n = 3$) = $463.3 \pm 66 \text{ M}\Omega$; prueba t: $t(7) = 5.49$; $p = 0.001$). No se encontraron

cambios en la capacitancia de membrana (C_m) de las células tratadas con taurina + baclofen en comparación con las células tratadas con taurina. (C_m en las células tratadas con taurina ($n = 6$) = 48.1 ± 9.22 pF; en taurina y baclofen ($n = 3$) = 43.84 ± 11.42 pF; prueba t: $t(7) = 1.55$; ns).

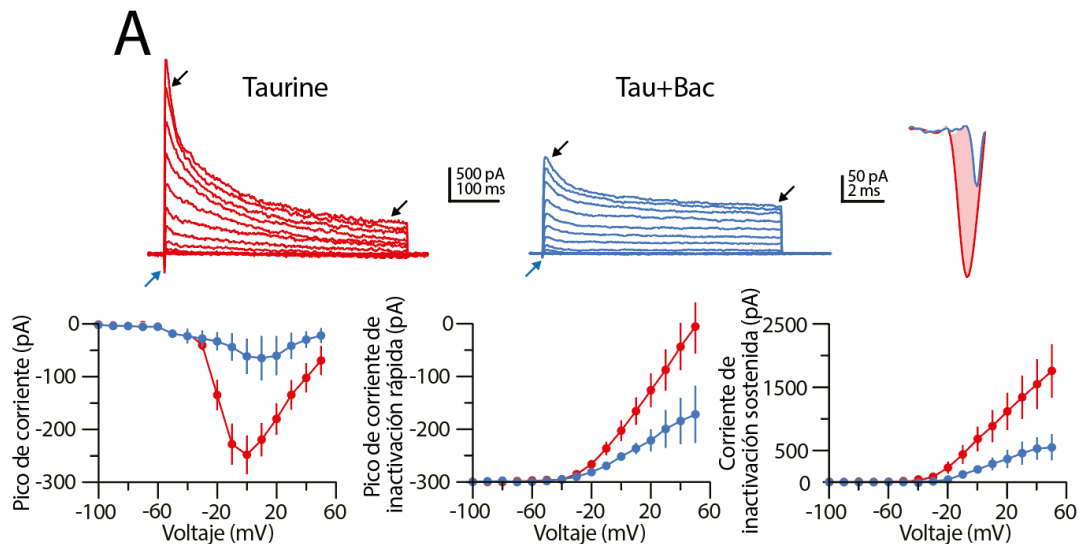


Figura 29 Propiedades de las corrientes macroscópicas de las CPNs diferenciadas tratadas con baclofen. Trazos de corriente representativos, obtenidos en una célula tratada con taurina (10 mM) y una célula tratada con taurina (10 mM) + baclofen (100 μ M). Las flechas azules indican la corriente entrante, las flechas negras indican la corriente saliente rápida inactivante y la corriente sostenida. En el panel derecho se muestra una ampliación de las corrientes entrantes, el trazo azul muestra la célula tratada con taurina (10 mM) y el trazo rojo, corresponde a la corriente entrante de una célula tratada con taurina (10mM) + baclofen (100 μ M) . En el panel inferior se muestra la gráfica de la dependencia del voltaje y la amplitud máxima de la corriente entrante. Panel central muestra la gráfica de la amplitud máxima del pico de la corriente saliente rápida inactivante. Ee en el panel derecho se muestra la gráfica que muestra la amplitud de la corriente saliente sostenida. $n = 12$ células para cada condición experimental.

En conjunto, estos resultados demuestran que la activación inducida por baclofen del $GABA_B$ R no contribuye al proceso de diferenciación neuronal de las CPNs de la ZSV ni a la expresión de corrientes macroscópicas. Por el contrario, la activación de $GABA_B$ R parece interferir con el crecimiento de

neuritas y la expresión funcional de canales iónicos, reduciendo la complejidad dendrítica y afectando negativamente la morfología neuronal.

El bloqueo de los receptores GABA_B favorece el proceso de diferenciación neuronal, la complejidad y el número de neuritas de CPN ZSV.

Después de evaluar los efectos del agonista del GABA_BR, evaluamos los efectos del bloqueo del GABA_BR en el proceso de diferenciación. Las CPNs fueron tratadas con CGP 55845 (5 μM), un antagonista selectivo de GABA_BR, en presencia de taurina (10 mM), durante 14 días, replicando el cotratamiento cada 72 horas. Al término de este tiempo, evaluamos la expresión de DCX. El bloqueo del GABA_BR con CGP 55845 aumentó el número de células DCX+ de manera similar a lo observado con taurina (células DCX+ en presencia de taurina comparadas con células de control = $117.9 \pm 3.60\%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p = 0.0002$; en presencia de CGP 55845 + taurina comparado con células tratadas con taurina = $117.2 \pm 3.60\%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p = 0.9775$; $F(2, 21) = 15.37$; $n = 8$ para cada condición experimental).

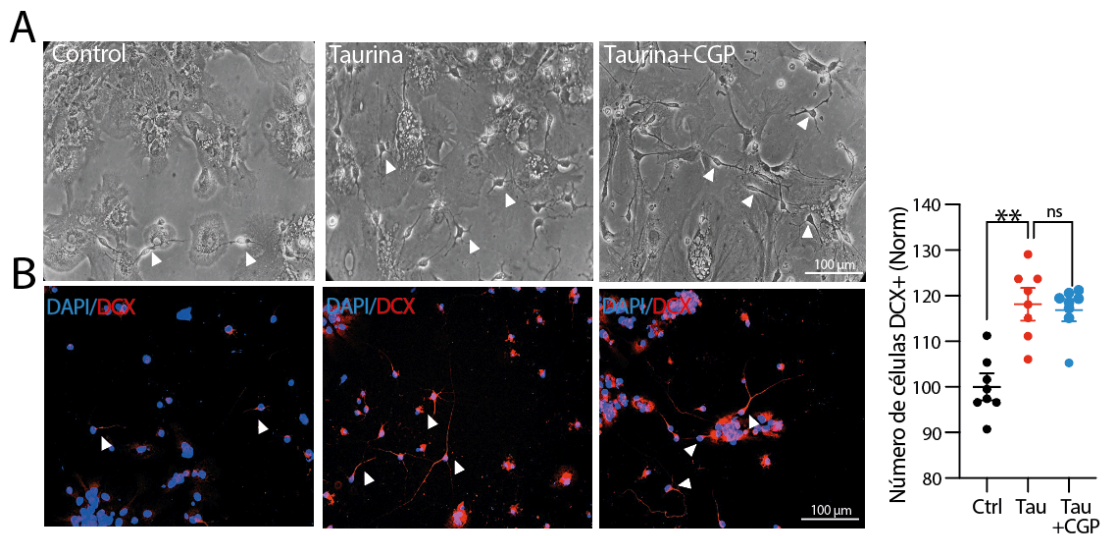


Figura 30. El bloqueo farmacológico del GABA_BR incrementa el número de células DCX+ en las CPNs de la ZSV. A) Microfotografía representativa en campo claro de células

*de control (panel derecho), tratadas con taurina (10 mM) (panel de en medio) y tratadas con taurina (10mM) + CGP 55845 (5 μ M) después de 14 días de diferenciación. B) Microfotografía de inmunofluorescencia mostrando la expresión de DCX (rojo), marcador de neuronas inmaduras, en las mismas condiciones. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las cabezas de flecha en color blanco indican células con morfología neuronal. En el panel izquierdo se muestra la gráfica de dispersión que corresponde al porcentaje de células DCX + en las células control (negro), las tratadas con taurina (10 mM) (rojo) y las y tratadas con taurina (10mM) + CGP 55845 (5 μ M) (azul). (n = 8 cultivos celulares para cada condición experimental); ANOVA de una vía. **p < 0.01.*

Además, estas células exhibieron un mayor número de neuritas (Figura 31A) (número total de neuritas en presencia de taurina comparado con células control = $138.3 \pm 8\%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p < 0.001$ (n = 43); en presencia de taurina + CGP 55845 (n = 30) comparado con las células tratadas con taurina = 127.2 ± 8.6 ; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p = 0.033$ (n = 43) ns; $F(2, 13) = 13.07$). Las neuritas en estas condiciones mostraron una morfología más compleja, con múltiples ramificaciones y un patrón dendrítico más elaborado en comparación con las células control, que generalmente presentaban una sola neurita o una morfología bipolar sin ramificaciones, como se había visto anteriormente. Además, las neuritas primarias y secundarias presentaron un incremento en la extensión neurítica en comparación con el grupo control (Figura 31E). La gráfica de probabilidad acumulada en la Figura 31B muestra la distribución del número total de intersecciones en las células control, tratadas con taurina, y tratadas con taurina + CGP 55845.

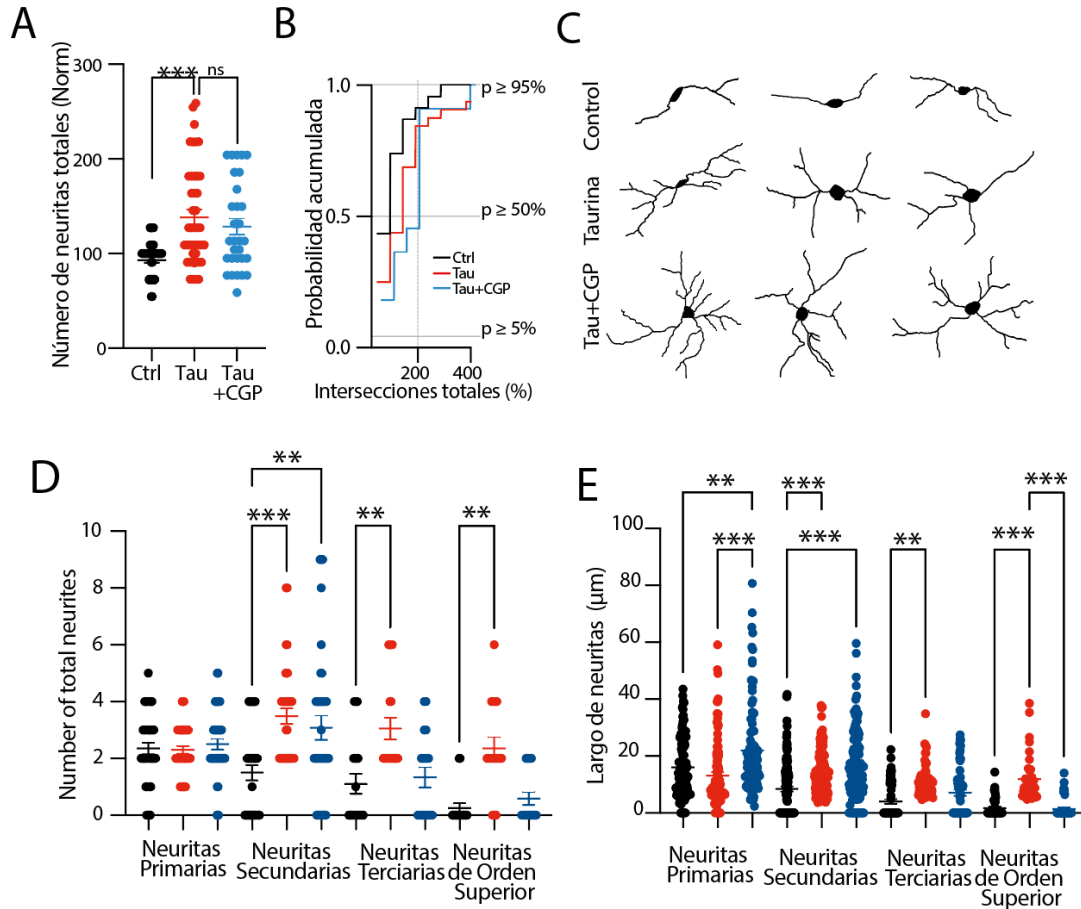


Figura 31 **Figura 31. El bloqueo del $GABA_B$ R con CGP 55845 estimula el proceso de diferenciación de las CPNs de la ZSV.** A) Gráfico de dispersión con el número total de neuritas en células $DCX+$ en control ($n = 36$); en células tratadas con taurina ($n = 40$) y en células tratadas con taurina + CGP 55845 ($n = 30$). B) Gráfico de probabilidad acumulada que resume el número de intersecciones de neuritas en las células de control comparada con las células tratadas con taurina. El desplazamiento hacia la derecha de las células tratadas con taurina y las que fueron tratadas con taurina + CGP 55845 refleja el aumento en el número de ramificaciones en las neuritas ($n = 8$ para cada condición experimental). C) Ejemplos de reconstrucciones digitales donde se muestra el aumento en el número de neuritas primarias, secundarias y terciarias en las tres condiciones experimentales. D) Gráfico de dispersión con el número total de neuritas primarias, secundarias, terciarias y de orden superior en las células control ($n = 36$), las células tratadas con taurina 10 mM ($n = 40$) y las células tratadas con taurina (10mM) + CGP5585 (5 µM). E) Gráfico de dispersión del largo de las neuritas primarias, secundarias, terciarias y de orden superior en las células control ($n = 30$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La Figura 32 muestra que las células tratadas con taurina + CGP 55845 presentan un número mayor de intersecciones en comparación con las células

control, similar a los resultados que obtuvimos con taurina. Este análisis también incluyó el cálculo del área bajo la curva (ABC), la cual resultó mayor en las células tratadas con taurina y las células tratadas con CGP 55845 (ABC en presencia de taurina comparado con las células control = $310.4 \pm 40\%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p < 0.001$; ABC en presencia de taurina + CGP 55845 comparado con las células tratadas con taurina = $516.7 \pm 45.55\%$; ANOVA de una vía; prueba de Tukey; $p < 0.001$; $F(2, 15) = 65.19$; $n = 6$). Morfológicamente, las neuritas de las células tratadas con CGP 55845 exhibieron una morfología tipo neuronal compleja, con crecimiento radial de neuritas y un patrón de ramificación más desarrollado que el observado en el grupo tratado con taurina.

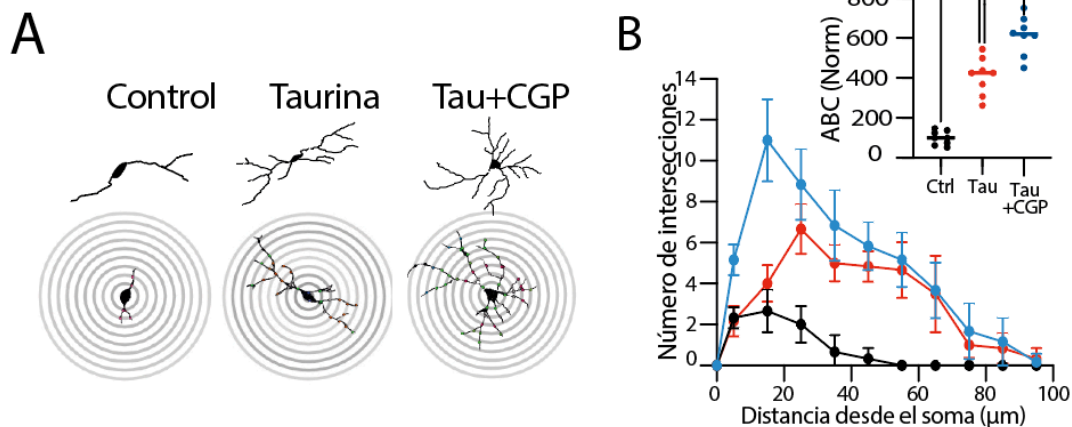


Figura 32 El tratamiento con taurina (10mM) + CGP (5 µM) promueve la diferenciación neuronal y estimula la complejidad dendrítica. A) Reconstrucciones digitales representativas y anillos concéntricos (distancia entre anillos = 10 µm) utilizados para el análisis morfométrico tipo Sholl. B) Análisis tipo Sholl comparando el número de intersecciones de neuritas en la condición de control y en las células tratadas con taurina. En el recuadro superior se muestra el gráfico del área bajo la curva (ABC) que muestra el área total obtenida del análisis tipo Sholl realizado en las células de control y tratadas con taurina ($n = 8$ células DCX+) ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Al realizar los registros electrofisiológicos, la amplitud de las corrientes entrantes no aumentó en presencia de CGP 55845 (corriente entrante en células tratadas con taurina ($n = 6$) = -248.09 ± 36.30 pA; en las células tratadas con taurina + CGP 55845 ($n = 3$) = -29.78 ± 2.84 pA; prueba t: $t(7) = 4.11$; $p = 0.004$; Figura 5G; flechas azules y trazos del extremo derecho). Por

otro lado, la amplitud de la corriente de inactivación rápida y la corriente persistente aumentaron en presencia de CGP 55845 (corriente de inactivación rápida en las células tratadas con taurina ($n = 6$) = $2,050.4 \pm 142$ pA; en presencia de taurina + CGP 55845 ($n = 3$) = 978.41 ± 181 pA; prueba t: $t(7) = 4.24$; $p = 0.01$; corriente saliente en estado estacionario en las células tratadas con taurina ($n = 6$) = $1,559 \pm 421$ pA; en presencia de taurina + CGP 55845 ($n = 3$) = $1,219.26 \pm 171$ pA; prueba t: $t(7) = 1.31$; $p = 0.23$). Con respecto a la resistencia de membrana (R_N), el tratamiento con taurina + CGP 55845 causó una ligera disminución ($\sim 19\%$) en comparación con las células tratadas solo con taurina (R_N en la condición de taurina ($n = 6$) = $465 \pm 55 \Omega$; en las células tratadas con taurina + CGP 55845 ($n = 4$) = $379.5 \pm 52 \Omega$; prueba t: $t(8) = 3.14$; $p = 0.01$). No se encontraron cambios en la C_m de las células tratadas con CGP 55845 (C_m en las células tratadas con taurina ($n = 6$) = 47.39 ± 9.22 pF; en taurina + CGP 55845 ($n = 4$) = 53.48 ± 12.1 pF; prueba t: $t(8) = 1.94$; ns).

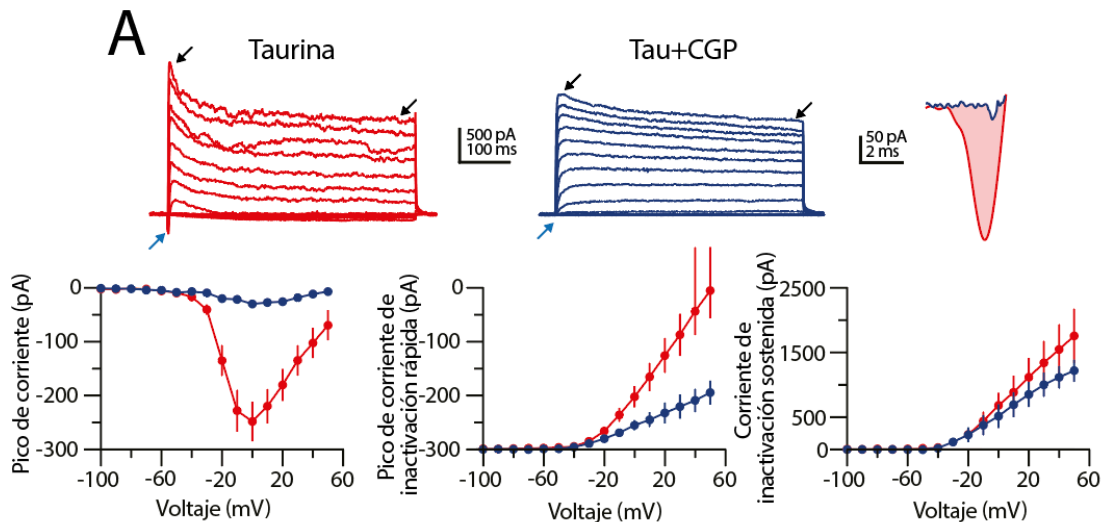


Figura 33. Propiedades de las corrientes macroscópicas de las CPNs diferenciadas tratadas con CGP 55845. Trazos de corriente representativos, obtenidos en una célula tratada con taurina (10 mM) y una célula tratada con taurina (10 mM) + CGP 55845 (5 μ M). Las flechas azules indican la corriente entrante, las flechas negras indican la corriente saliente de inactivación rápida y la corriente sostenida. En el panel derecho se muestra una ampliación de las corrientes entrantes, el trazo azul muestra la célula tratada con taurina (10 mM) y el trazo rojo, corresponde a la corriente entrante de una célula tratada con taurina (10mM) +

CG55845 (5 μ M). En el panel inferior se muestra la gráfica de la dependencia del voltaje y la amplitud máxima de la corriente entrante. Panel central muestra la gráfica de la amplitud máxima del pico de la corriente saliente de inactivación rápida. Panel derecho, amplitud de la corriente saliente sostenida.

En conclusión, nuestros hallazgos muestran que el bloqueo del GABA_BR con CGP 55845 en presencia de taurina incrementa significativamente la diferenciación neuronal. Este tratamiento no solo aumenta el número de células DCX+, sino que también mejora la complejidad morfológica de las neuronas, evidenciada por un mayor número de neuritas y ramificaciones de orden superior. Estas observaciones sugieren que la inhibición de GABA_BR potencia el desarrollo neuronal, facilitando una mayor extensión y ramificación de las neuritas. Sin embargo, este bloqueo también parece influir negativamente en algunas propiedades electrofisiológicas de las células, destacando la complejidad del papel de GABA_BR en la diferenciación y función neuronal.

[El aumento de calcio intracelular es necesario para el proceso de diferenciación neuronal mediado por taurina.](#)

Teniendo en cuenta que la taurina es un modulador de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular (Wu & Prentice, 2010) evaluamos si la movilización del Ca²⁺ puede participar en el proceso morfogénico de las CPNs mediado por taurina. Para evaluar esta hipótesis, los cultivos celulares se dejaron en diferenciación durante 3 días y se preincubaron con taurina + BAPTA-AM durante 60 minutos. La quelación de Ca²⁺ intracelular con BAPTA-AM redujo significativamente el número de neuritas mediado por taurina (Número total de neuritas en presencia de taurina (n = 41) para cada condición experimental en comparación con las células de control (n = 40) para cada condición experimental = 138.3 \pm 7.5%; $p < 0.001$; en presencia de taurina + BAPTA-AM (n = 23) para cada condición experimental en comparación con las células tratadas con taurina = 35.16 \pm 7.6%. $p < 0.001$; ANOVA de una vía, prueba de Tukey; F (2, 101) = 29.60). En el mismo sentido, el tratamiento con BAPTA-AM disminuyó la longitud total de las neuritas de las células tratadas con

taurina (longitud total de las neuritas en presencia de taurina ($n = 91$) = $27.4 \pm 1.5 \mu\text{m}$; $p < 0.001$; en presencia de taurina + BAPTA-AM ($n = 29$) = $11.5 \pm 2 \mu\text{m}$; $p < 0.001$; ANOVA de una vía, prueba de Tukey; $F(2, 194) = 20.07$). Los efectos de BAPTA-AM sobre el crecimiento de las neuritas se muestran en los diagramas tipo Sholl que se resumen en la gráfica de área bajo la curva (ABC en presencia de taurina en comparación con las células de control = $410.4 \pm 32.44\%$; $p < 0.001$; en presencia de taurina + BAPTA-AM en comparación con las células tratadas con taurina = $127.1 \pm 32.44\%$; $F(2, 15) = 56.17$; $n = 8$ para cada condición experimental).

También realizamos ensayos de inmunofluorescencia contra la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) en los cultivos celulares expuestos a taurina + BAPTA-AM que se muestran en la Figura 34E. La inmunorreactividad a MAP2 es un fuerte indicador de morfología neuronal estable durante la maduración neuronal. Además de afectar el crecimiento de las neuritas, formulamos la hipótesis de que la quelación de Ca^{2+} con BAPTA afectaría negativamente la maduración neuronal. Como se esperaba, BAPTA-AM disminuyó la inmunorreactividad de MAP2 (inmunorreactividad a MAP2+ en presencia de taurina en comparación con células control = 134.6 ± 13.3 ; $p = 0.0525$; ns; en presencia de taurina + BAPTA-AM = $69.90 \pm 8.31\%$; $p < 0.001$; ANOVA de una vía, prueba de Tukey; $F(2, 15) = 23.53$; $n = 6$ para cada condición experimental). Estos experimentos demuestran que el proceso de diferenciación y maduración de CPN ZSV mediado por taurina requiere de la movilización de calcio intracelular.

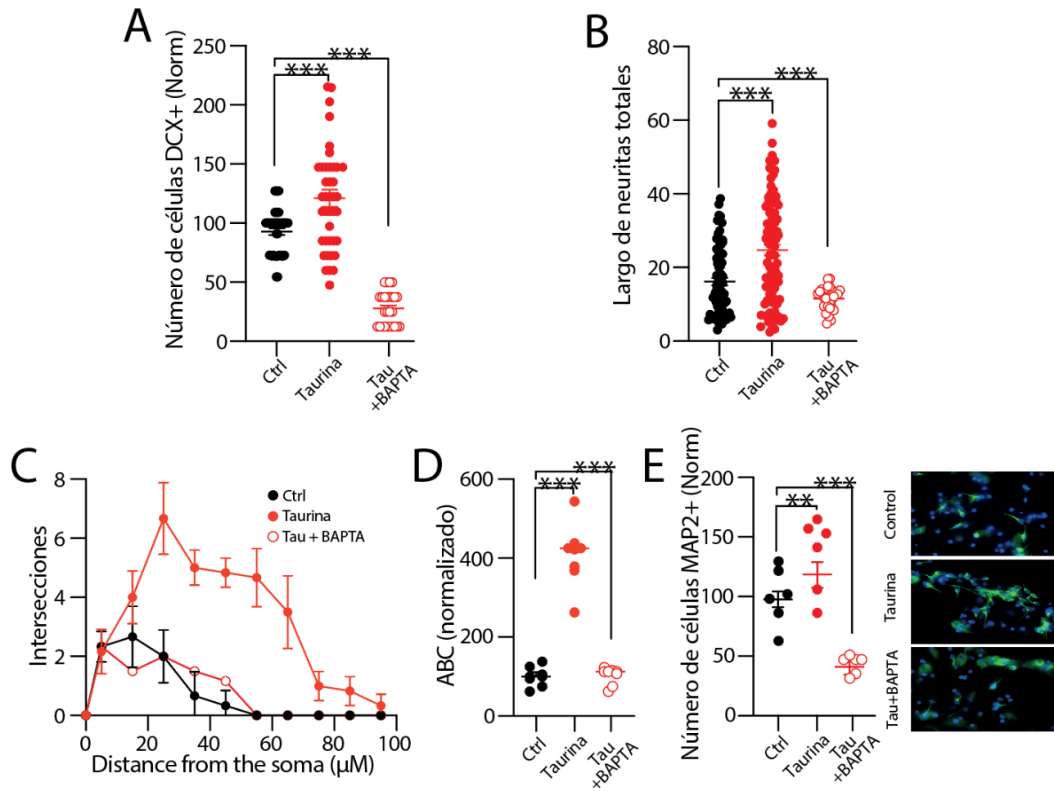


Figura 34. La diferenciación mediada por taurina requiere de la movilización de calcio intracelular para el proceso de diferenciación y crecimiento de neuritas en las CPNs. A) Gráfica de dispersión que muestra el número de neuritas en las tres condiciones experimentales. B) Gráfica de dispersión que muestra la longitud de las neuritas en las condiciones experimentales indicadas. La incubación con BAPTA inhibió el crecimiento de neuritas estimulado con taurina (control $n = 31$ células; taurina $n = 36$ células; taurina + BAPTA-AM $n = 12$ células MAP2+). C) Gráfica tipo Sholl que compara el número de intersecciones en las condiciones experimentales indicadas. D) Gráfico ABC que resume los hallazgos del análisis tipo Sholl ($n = 6$ células MAP2+). E) Microfotografías de ensayos de inmunofluorescencia contra MAP2 en células control, tratadas con taurina y taurina + BAPTA. El tratamiento con BAPTA redujo la inmunoreactividad a MAP2 ($n = 6$ células para cada condición experimental). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

CaMKII, ERK1/2 y Src son Determinantes en la Diferenciación Neuronal por Taurina

Las células en cultivo fueron preincubadas con taurina combinada con el inhibidor de la proteína cinasa II dependiente de calcio-calmodulina (CaMKII) KN93, el inhibidor de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) FR1805 o el inhibidor de la tirosina cinasa de la familia Src, SrcI. La inhibición de CaMKII, ERK1/2 y SrcI bloqueó la formación de neuritas estimulada con

taurina e inhibió el aumento en su longitud (número total de neuritas en presencia de taurina (n = 41) en comparación con las células control (n = 41) = $98.43 \pm 6.55 \mu\text{m}$; $p = 0.911$; en presencia de taurina + KN93 (n = 26) = $27.80 \pm 7.42\%$; $p < 0.001$; en presencia de taurina + FR 1805 (n = 21) = $37.98 \pm 7.94\%$; $p < 0.001$; en presencia de taurina + Src1 (n = 19) = $44.6 \pm 8.21\%$; $p < 0.001$; ANOVA de una vía, prueba de Tukey; $F(4, 142) = 38.39$). Asimismo, la inhibición de las cascadas de señalización afectó el número de intersecciones graficadas en el análisis tipo Sholl (Figura 7C) y el ABC resultante (ABC en presencia de taurina en comparación con las células de control = $410.4 \pm 24.6\%$; $p < 0.001$; en presencia de taurina + FR 1805 = $95.9 \pm 24.6\%$; $p < 0.001$; en presencia de taurina + Src1 = $106.3 \pm 24.6\%$; $p < 0.001$; ANOVA de una vía, prueba de Tukey; $n = 6$ para cada condición experimental; $F(4, 25) = 54.46$). Consistente con estos hallazgos, la inmunorreactividad de la cinasa MAP2 disminuyó drásticamente cuando estas cascadas de señalización fueron bloqueadas (células MAP2+ en presencia de taurina en comparación con las células de control = $134.6 \pm 13.3\%$; $p = 0.099$; ns; en presencia de taurina + KN93 = $61.6 \pm 12\%$; $p < 0.001$; en presencia de taurina + FR 1805 = $57.5 \pm 13.3\%$; $p < 0.001$; en presencia de taurina + Src1 = $52.3 \pm 13.3\%$; $p < 0.001$; ANOVA de una vía, prueba de Tukey; $F(4, 25) = 15.05$; $n = 6$ para cada condición experimental). En conjunto, estos resultados demuestran que CaMKII, ERK1/2 y la cinasa Src juegan un papel crucial en el proceso de diferenciación neuronal mediado por taurina. Específicamente, la inhibición de

estas cascadas de señalización impacta negativamente la morfología y complejidad del proceso de diferenciación de las CPNs.

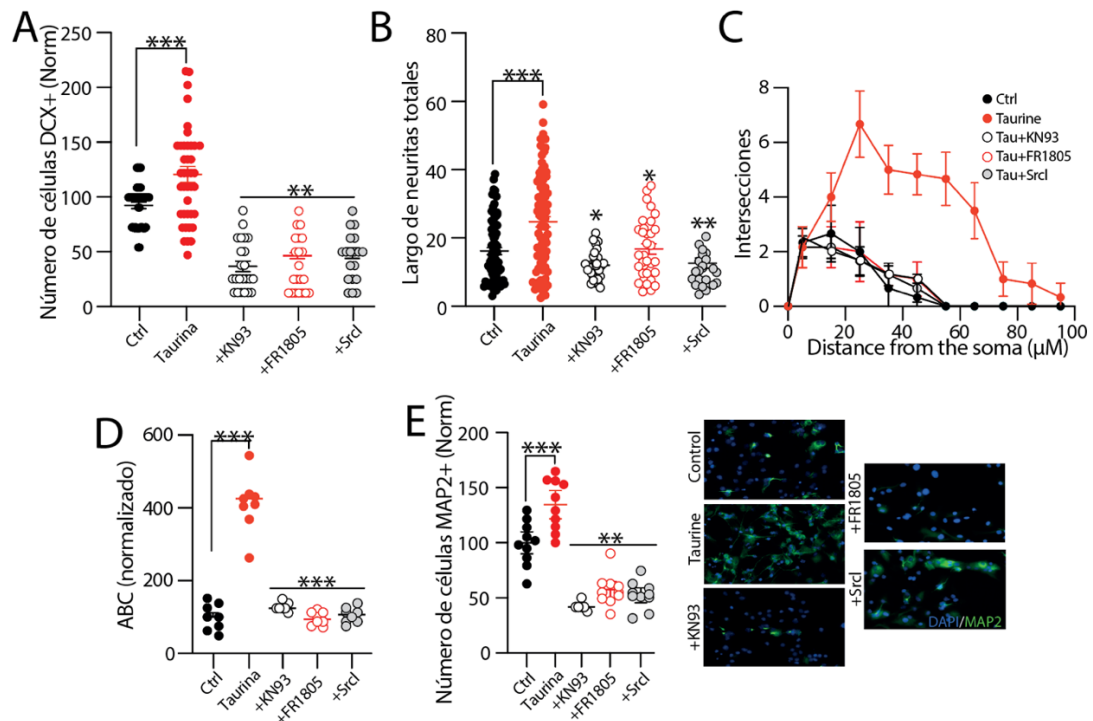


Figura 35 Participación de las cascadas de señalización en el proceso de diferenciación y crecimiento de neuritas de CPN ZSV mediado por taurina. A, B) Gráficas de dispersión mostrando el número total (A) y la longitud total de neuritas (B) de las CPNs tratadas con taurina (10 mM) o taurina + KN93, taurina + FR1805, y taurina + Src1. El bloqueo de estas cascadas de señalización impidió el crecimiento de neuritas inducido por taurina (células control $n = 25$; taurina $n = 42$ células; taurina + KN93 $n = 15$ células; taurina + FR1805 $n = 16$ células; taurina + Src1 $n = 19$ células MAP2+). C) Gráfica tipo Sholl que compara el número de intersecciones de neuritas en la condición control y el bloqueo de las cascadas de señalización indicadas ($n = 6$ células MAP2+). D) Gráfica del ABC mostrando el área total obtenida del análisis tipo Sholl realizado en las células control, en las células tratadas con taurina, y después del bloqueo de las cascadas de señalización indicadas ($n = 6$ células MAP2+ para cada condición experimental). E) Micrografías del ensayo de inmunofluorescencia contra MAP2 (verde) en células tratadas con taurina y taurina + los inhibidores de cascadas de señalización. Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). El bloqueo de CaMKII, ERK 1/2, o Src kinase redujo la inmunorreactividad a MAP2 ($n = 6$ cultivos celulares para cada condición experimental). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Discusión

La taurina es un aminoácido no esencial que se encuentra en altas concentraciones en el SNC, especialmente en el cerebro en desarrollo. Debido a esto, se ha sugerido que pudiera actuar como un regulador en el proceso de diferenciación neuronal, especialmente a través de su interacción con los receptores GABA_A y GABA_B (Kilb & Fukuda, 2017). El presente trabajo proporciona evidencia importante de que la taurina, actuando a través de estos receptores, estimula cambios morfológicos y funcionales en las células CPNs derivadas de neuroesferas de la ZSV. Más específicamente, la taurina, a través de la interacción que ejerce con los receptores GABA_A o GABA_B, controla el proceso de diferenciación, la formación de neuritas y la expresión funcional de corrientes iónicas en las CPNs. De igual manera, nuestros resultados demuestran, por primera vez, la presencia de las dos subunidades GABA_BR, GABA_{BR1} y GABA_{BR2}, en neuroesferas formadas por las CPNs aisladas de la ZSV, inmunopositivas para nestina y Ki-67, marcadores de células progenitoras y células en proliferación, respectivamente.

Previamente, se había reportado la presencia de receptores GABA_A en estas células. Por ejemplo, Liu y cols. (2005) demostraron que los receptores GABA_A están presentes en las células precursoras derivadas de la ZSV (Liu et al., 2005). Estos resultados resaltan la importancia del sistema GABAérgico en el mantenimiento y la regulación de las células precursoras neurales. Sin embargo, hasta ahora, no se había demostrado la presencia y función de los receptores GABA_B en estas células.

La identificación de las subunidades del GABA_BR en las CPNs que conforman las neuroesferas sugiere que los mecanismos de señalización mediados por GABA son altamente complejos. Mientras que los receptores GABA_A son canales iónicos permeables a Cl⁻ que generan respuestas rápidas, los receptores GABA_B son metabotrópicos y están involucrados en respuestas

lentas y prolongadas. Esto sugiere que la activación de los GABA_BR podría modular de manera sostenida, la proliferación, diferenciación y mantenimiento de las células precursoras neurales. Además, la presencia de ambos tipos de receptores GABA en las células precursoras neurales sugiere una regulación dual del microambiente neuronal por el neurotransmisor GABA, donde la señalización rápida y la modulación a largo plazo pueden estar coordinadamente reguladas.

El tratamiento con taurina promueve la maduración neuronal

Adicionalmente, nuestro trabajo demostró que la taurina tiene un papel significativo en la neurogénesis, aumentando el número de células DCX+ y favoreciendo el crecimiento y desarrollo de neuritas. Específicamente, la taurina promovió la complejidad dendrítica, lo que se traduce en maduración neuronal. Los cambios morfológicos en respuesta al tratamiento con taurina están acompañados por la expresión funcional de canales iónicos. Este resultado es muy importante porque, aunque estudios previos habían sugerido que la taurina podría actuar como un morfógeno induciendo la diferenciación neuronal (Hernández-Benítez et al., 2013), no se había demostrado hasta ahora que las células tipo neuronal tratadas con taurina expresaran canales iónicos maduros capaces de generar potenciales de acción.

La capacidad de generar potenciales de acción es una característica fundamental de las neuronas maduras y funcionales. La demostración de que las células tratadas con taurina pueden expresar estos canales iónicos y generar potenciales de acción resalta el efecto de la taurina no solo como un promotor de la diferenciación morfológica, sino también como un facilitador de la maduración funcional neuronal. El hecho de que los canales iónicos expresados en las células tratadas con taurina respondan diferencialmente a la activación o el bloqueo de los receptores GABA también sugiere una compleja interacción entre la taurina y el sistema GABAérgico.

La diferenciación neuronal mediada por taurina requiere de la activación de los receptores GABA_A

Nuestros resultados también indican que el proceso de maduración neuronal de las CPNs es sensible a PTX, por lo que este proceso está regulado por la activación del GABA_AR. Esto resalta la importancia del GABA_AR en el proceso de diferenciación y maduración neuronal, dado que la taurina, necesita interactuar con estos receptores, para inducir la maduración neuronal morfológica y la expresión funcional de canales iónicos. El papel del GABA_AR en el proceso de diferenciación neuronal se ha reportado antes. Por ejemplo, Liu y cols. (2005) demostraron que la activación del GABA_AR es necesaria para la proliferación y diferenciación de células precursoras neurales en la zona subventricular (Liu et al., 2005). Además, Wang y cols. (2014) reportaron que la señalización a través del GABA_AR modula la neurogénesis en el hipocampo adulto, sugiriendo que este receptor no solo es importante durante el desarrollo temprano, sino también en el mantenimiento del cerebro adulto (Wang et al., 2014). Este efecto es consistente con estudios previos que han mostrado que la taurina actúa como agonista del GABA_AR. La alta afinidad que presenta la taurina por el GABA_AR en comparación con el GABA en etapas tempranas puede explicar la eficacia con la que promueve estos cambios morfológicos y funcionales (Jia et al., 2008). También, la interacción de la taurina con el GABA_AR no solo promueve la diferenciación y maduración de las neuronas, sino que también influye en la expresión de subunidades específicas del receptor. En presencia de taurina, se ha observado una expresión aumentada de subunidades como $\alpha 2$ y $\beta 3$ del GABA_AR, que están asociadas con un aumento en la estabilidad y la funcionalidad de los canales iónicos, en el mismo sentido en un estudio con ratones alimentados crónicamente con taurina, se observó una reducción en la expresión de las subunidades $\beta 2/\beta 3$ del GABA_AR, subunidades que son necesarias para que se una PTX, antagonista del GABA_AR (Huang et al., 2004).

La importancia del GABA_AR en la diferenciación neuronal se ve reforzada por estudios que muestran que la activación de estos receptores puede influir en la expresión génica y la actividad de factores de transcripción que regulan la neurogénesis (Ge et al., 2007). La activación de los GABA_AR puede desencadenar la diferenciación neuronal a través del Ca²⁺ como segundo mensajero. Los análisis de imagen de Ca²⁺ en células progenitoras han demostrado que la aplicación de GABA induce una elevación en los niveles de Ca²⁺ en estas células. Los iones de níquel, que bloquean los canales de Ca²⁺ inhiben tanto el aumento de Ca²⁺ inducido por GABA como la expresión de NeuroD en estos progenitores (Tozuka et al., 2005) . Esta señalización interna de Ca²⁺ también altera la velocidad de migración de los neuroblastos en la zona subventricular (ZSV) (Bolteus & Bordey, 2004). En las primeras fases de la neurogénesis adulta, la activación tónica por GABA provoca solo un pequeño cambio en el potencial de membrana (Ge et al., 2007), insuficiente para activar la mayoría de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Sin embargo, las neuronas de nueva generación del giro dentado expresan altos niveles de canales de Ca²⁺ de tipo T activados a bajo voltaje, que pueden activarse a un valor cercano al potencial de membrana en reposo de las neuronas inmaduras (Ge et al., 2007). Por lo tanto, la activación tónica por GABA podría llevar a una despolarización de la membrana suficiente para activar a estos últimos. Una vez que las neuronas reciben entradas sinápticas GABAérgicas, la despolarización inducida por GABA podría activar otros canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, como los canales de tipo L. Estudios in vitro han demostrado que la activación de los canales tipo L en las CPNs promueve la diferenciación neuronal (L. Wang & Greenfield, 2009). En resumen, este resultado resalta el papel crítico del GABA_AR en los procesos de diferenciación y maduración de las CPNs de la ZSV. La interacción de la taurina con estos receptores promueve la maduración funcional, sugiriendo que la señalización mediada por GABA_AR es esencial para el desarrollo neuronal adecuado. Dado que todo el proceso de maduración fue sensible a

PTX, se reguló por la activación del GABA_AR (Gutiérrez-Castañeda et al., 2023).

También demostramos que la activación farmacológica de los receptores GABA_B en presencia de taurina no promueve el crecimiento de neuritas, el desarrollo de neuritas ni la expresión funcional de canales iónicos. Por el contrario, el bloqueo del GABA_BR con su antagonista específico CGP 35348 promovió la ramificación de neuritas y estimuló el desarrollo de neuritas secundarias, terciarias y de orden superior en las CPNs de la ZSV. Estos resultados sugieren un papel complejo y bidireccional de los receptores GABA ionotrópicos y metabotrópicos en el proceso de diferenciación y maduración de CPNs estimulados con taurina. En este contexto, proponemos que el GABA_AR promueve la diferenciación neuronal, mientras que el GABA_BR actúa como un regulador negativo de este proceso, asegurando así un equilibrio en el número de células progenitoras que permanecen en estado proliferativo. Esta posibilidad deberá ser explorada en experimentos.

El GABA_BR en el proceso de diferenciación de las CPNs de la ZSV

La investigación previa ha subestimado en gran medida la contribución del GABA_BR en el proceso de diferenciación de las CPNs. Por ejemplo, las CPNs embrionarias neocorticales expresan las subunidades GABA_{BR1} y GABA_{BR2}, y la activación farmacológica del receptor favorece la formación de neuroesferas derivadas de la neocorteza (Fukui et al., 2008). Además, la proliferación y supervivencia de las células recién generadas dependen de la activación del GABA_BR, y el bloqueo de estos receptores aumenta la neurogénesis en el hipocampo adulto (Felice et al., 2012). Estas observaciones fueron corroboradas por Giachino et al. (2014), quienes demostraron la expresión de GABA_BR en las CPNs hipocámpales y que el bloqueo del GABA_BR aumentaba la diferenciación de neuroblastos *in vivo*. Estos autores sugirieron que la señalización intracelular a través de GABA_BR inhibe la neurogénesis y

promueve la quiescencia de las CPNs (Giachino et al., 2014; Gustorff et al., 2021).

Consistente con estas observaciones, encontramos inmunorreactividad a las subunidades GABA_{BR1} y GABA_{BR2} en las neuroesferas derivadas de la ZSV. Dado que el GABA_BR es un receptor metabotrópico, sus efectos se atribuyen principalmente a la disociación de la proteína Gi o Go en las subunidades Gi α , Go α y G $\beta\gamma$ del complejo GABA_BR. En este contexto, después de la activación de GABA_BR, la subunidad Gi α inhibe a la AC, disminuyendo así los niveles de cAMP y la actividad de PKA, lo que disminuye el nivel de fosforilación de CREB nuclear (Ma et al., 2014). Los niveles reducidos de cAMP también interfieren con la funcionalidad de la actividad ERK/MAPK dependiente de cAMP, impactando negativamente en los niveles de fosforilación de CREB. Por lo tanto, es razonable suponer que el bloqueo de GABA_BR con CGP55485 produce una serie de efectos que favorecen la diferenciación neuronal. Primero, la inactivación de la subunidad Gi α puede aumentar los niveles de cAMP y la actividad de PKA, elevando los niveles de fosforilación de CREB (Lepski et al., 2013; X. Zhang et al., 2005). PKA, puede activar a MAPK, otra posible vía hacia la fosforilación de CREB (Pearson et al., 2001). Además, el bloqueo del GABA_BR resultaría en una elevación transitoria de Ca²⁺ intracelular, activando a CAMKII y, posteriormente, la fosforilación de CREB (Wayman et al., n.d.). Estos mecanismos reflejan la complejidad y la intercomunicación de las cascadas de señalización mediadas por los receptores GABA_A y GABA_B que regulan la diferenciación neuronal.

Es importante considerar que otros mecanismos también pueden estar involucrados en la acción de la taurina en el proceso de diferenciación. Por ejemplo, la taurina regula los receptores de glutamato y modula la señalización de Ca²⁺ intracelular, que son esenciales para regular el crecimiento y la diferenciación neuronal (L. Wang & Greenfield, 2009; Yang et al., 2019). Sin

embargo, estos mecanismos requieren investigación adicional, que quedaron fuera del alcance de este estudio.

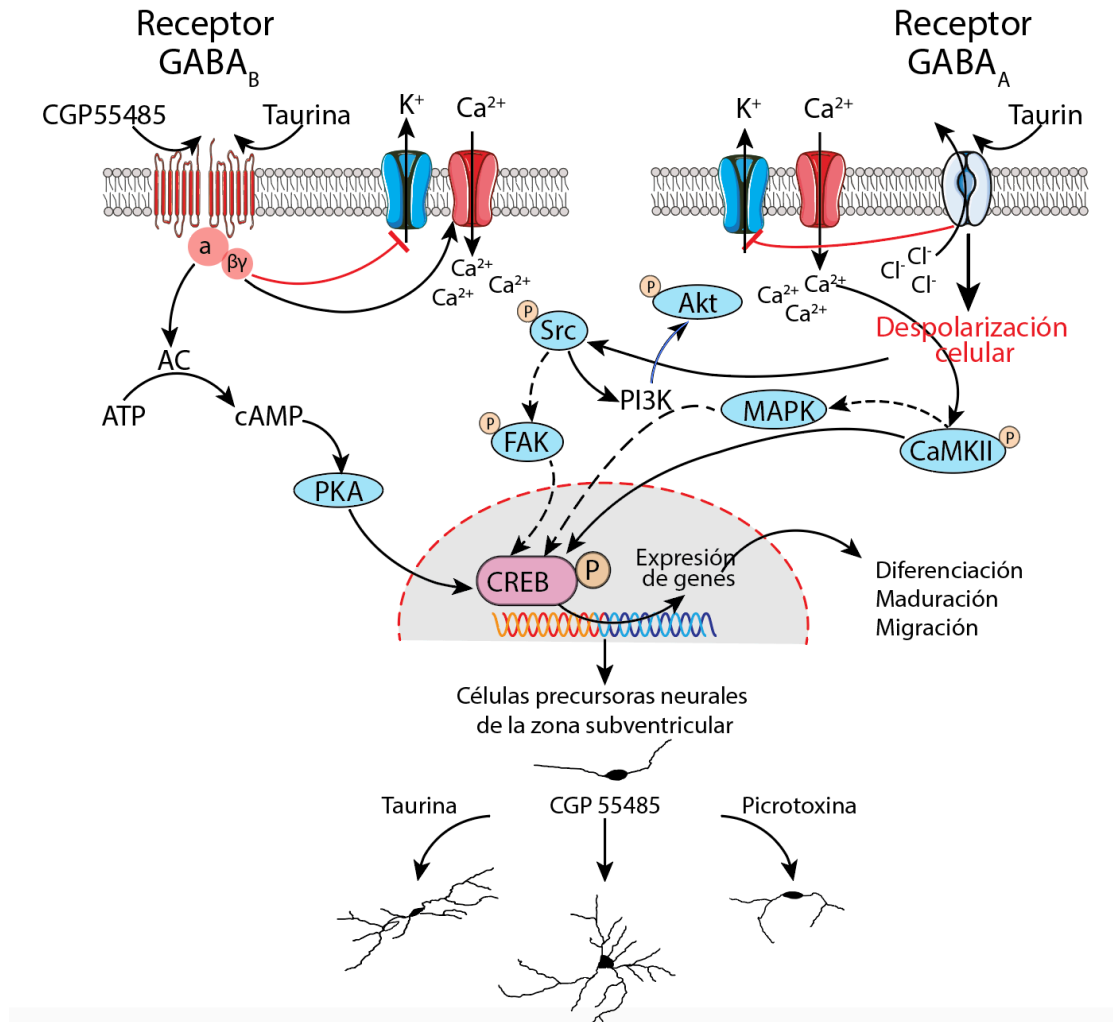


Figura 36 Representación esquemática de los posibles mecanismos necesarios para la diferenciación de células precursoras neurales de la ZSV mediada por taurina y efectos de la taurina, el CGP55485 y la picrotoxina en la maduración neuronal. La taurina se une al GABA_AR y promueve la extrusión de iones Cl^- y el bloqueo de canales de K^+ , favoreciendo la despolarización celular, la activación de canales de Ca^{2+} y la activación de CaMKII, que promueve la fosforilación del factor de transcripción celular CREB (p-CREB). La despolarización celular también activa la tirosina cinasa Src y fosforila a Akt, que está involucrada en la cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR. El bloqueo del GABA_BR acoplado a G_i/G_o con CGP 55845 puede aumentar la concentración de cAMP, posiblemente conduciendo a una mayor fosforilación de CREB a través de la activación de PKA o de las cascadas MAPK. Además, su acoplamiento a canales de Ca^{2+} a través de la subunidad $G\beta\gamma$ de la proteína G acoplada a GABA_BR puede permitir altos

niveles de Ca^{2+} intracelular, activando la vía de señalización CAMKII, continuando así la vía mencionada con los receptores $GABA_A$ que podrían finalmente inducir la activación de CREB.

Modulación de corrientes membranales por taurina

Otro hallazgo relevante de nuestro estudio es la modulación selectiva de las corrientes membranales en respuesta a los tratamientos con taurina. Aunque estudios previos han documentado el efecto agudo de la taurina sobre el potencial de membrana, la RN y el disparo de potenciales de acción en neuronas inmaduras y maduras, estos efectos se atribuyen a una modulación aguda del cloruro a través de los receptores de GABA y glicina (Belluzzi et al., 2004; Furukawa & Fukuda, 2023; Hosoi et al., 2022; Jiang et al., 2004; Sava et al., 2014). Esta posibilidad es poco probable en nuestro caso porque las CPNs fueron incubadas con taurina durante 14 días antes de cualquier manipulación experimental. Una posible explicación para la modulación electrofisiológica observada en nuestro estudio es que la taurina, a largo plazo, favorece el ensamblaje adecuado de canales iónicos en lugar de modular agudamente la conductancia del cloruro para alterar la cinética de las corrientes entrantes y salientes. Hipotetizamos que este efecto es una consecuencia adicional de la capacidad de diferenciación de la taurina; sin embargo, esta premisa requiere investigación adicional.

Estudios previos han demostrado que la corriente entrante registrada por el protocolo utilizado en nuestro estudio es sensible a la tetrodotoxina (TTX) (Martínez-Rojas et al., 2021), el antagonista selectivo de los canales de sodio sensibles a voltaje que generan el potencial de acción en el cerebro de mamífero. Lo que apoya la noción de que el proceso de diferenciación mediado por taurina de las CNPs implica la expresión membranal de canales de Na^+ . Por otro lado, la cinética de las corrientes salientes, asemejan a las corrientes de K^+ de inactivación rápida sensible a 4-AP y a la corriente

sostenida de K⁺ sensible a TEA registradas en neuronas reales (Griego et al., 2021, 2022). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la taurina tiene el potencial de modular selectivamente las corrientes salientes que determinan las propiedades pasivas de las células excitables. Aunque se necesitan experimentos adicionales para demostrar si la taurina tiene el potencial de estimular el ensamblaje adecuado de subunidades de canales iónicos, este estudio proporciona evidencia de que la taurina tiene propiedades tanto morfogénicas como electrofisiológicas para controlar el proceso de diferenciación y maduración de las células progenitoras neuronales.

Limitaciones del estudio

Este estudio presenta varias limitaciones que deben ser consideradas al analizar los resultados. En primer lugar, las neuroesferas utilizadas como modelo experimental representan un sistema artificial que involucra una mezcla de diferentes tipos celulares. Esto puede introducir inespecificidad, dificultando la interpretación específica de los efectos observados en las CPNs derivadas de la ZSV. Otra limitación que debe tomarse en cuenta es que no fue posible silenciar específicamente el GABA_BR mediante técnicas de transfección o edición genética. Esto habría permitido comprobar de manera directa y concluyente los efectos observados durante el bloqueo farmacológico del receptor.

Además, las células progenitoras neurales se tomaron de ratones en el día 6 de vida posnatal. Aunque esto proporciona una valiosa perspectiva sobre la neurogénesis en el desarrollo temprano, es importante evaluar si los hallazgos se reproducen en ratones de edad madura para comprender mejor la neurogénesis adulta. Este aspecto es importante para extrapolar los resultados a contextos de neurogénesis en el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas.

Otra limitación es que asumimos ciertos pasos importantes dentro de las vías de señalización analizadas en este estudio. Las vías mencionadas podrían no ser las funcionales, pues al ser un periodo de diferenciación de 14 días, pueden ocurrir muchos otros procesos que no fueron considerados en este estudio y no se tomaron en cuenta. Esta suposición introduce un grado de incertidumbre sobre la temporalidad de los eventos moleculares, las vías de señalización que participan y que podrían estar participando en los efectos observados sobre diferenciación y maduración neuronal.

Finalmente, otra limitación fue el número restringido de cultivos celulares disponibles para realizar registros electrofisiológicos. Contar con un mayor número de cultivos permitiría profundizar en los análisis de las propiedades electrofisiológicas de las células, proporcionando una comprensión más detallada de los mecanismos subyacentes en la diferenciación y maduración de las CPN ZSV.

Conclusión General

El aminoácido libre taurina desempeña un papel importante en el crecimiento de neuritas y en la expresión funcional de canales iónicos que determinan las propiedades pasivas de las células diferenciadas. Los resultados de este trabajo muestran que este efecto ocurre a través de la interacción de taurina con los receptores GABA, lo que genera la posterior activación de cascadas de señalización expresadas por las células precursoras neurales de la zona subventricular. Asimismo, nuestros resultados sugieren que el GABA, actuando a través de sus receptores ionotrópicos o metabotrópicos, tiene efectos opuestos que regulan la neurogénesis adulta en la zona subventricular. Hemos demostrado que la interacción de la taurina con los receptores GABA_A y GABA_B regula de manera bidireccional el proceso de diferenciación y maduración de las CPNs de la ZSV. Este proceso incluye no solo el crecimiento y ramificación de neuritas, sino también la expresión de canales

iónicos funcionales, que son indispensables para las propiedades electrofisiológicas de las neuronas maduras. La interacción de la taurina con los receptores GABA implica un aumento del calcio intracelular, que activa diversas cascadas de señalización, promoviendo así el crecimiento de neuritas.

Perspectivas

Evaluar el efecto de taurina durante el proceso de diferenciación en modelos *in vivo*, cultivos organotípicos en 3D o en modelos animales en diferentes etapas del desarrollo y envejecimiento.

Implementar edición génica como CRISPR/Cas9 para el silenciamiento específico del receptor GABA_B para confirmar el efecto de taurina en el proceso de diferenciación neuronal.

Evaluar la interacción molecular entre el receptor GABA_A y GABA_B, durante el proceso de diferenciación y maduración neuronal.

Determinar las vías de señalización activadas durante el proceso de diferenciación temporal con la finalidad de identificar adecuadamente que vías son activadas y describir los pasos adicionales que no se incluyeron en este trabajo.

Evaluar la sinaptogénesis y la integración funcional de las células recién generadas a los circuitos ya existentes.

Determinar la dependencia de la red neuronal local sobre las neuronas de nueva generación, en sus propiedades electrofisiológicas subumbrales y supraumbrales mediante registros electrofisiológicos.

Evaluar la participación de taurina y de los receptores a GABA en otros procesos importantes en el desarrollo neuronal como la proliferación y la migración neuronal.

Referencias Bibliograficas

- Agrawal, H. C., Davis, J. M., & Himwich, W. A. (1968). DEVELOPMENTAL CHANGES IN MOUSE BRAIN: WEIGHT, WATER CONTENT AND FREE AMINO ACIDS. *Journal of Neurochemistry*, *15*(9), 917–923. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1968.TB11633.X>
- Aimone, J. B., Wiles, J., & Gage, F. H. (2009). Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron*, *61*(2), 187–202. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2008.11.026>
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, *137*(4), 433–457. <https://doi.org/10.1002/CNE.901370404>
- Balasubramanian, S., Teissère, J. A., Raju, D. V., & Hall, R. A. (2004). Hetero-oligomerization between GABAA and GABAB receptors regulates GABAB receptor trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(18), 18840–18850. <https://doi.org/10.1074/JBC.M313470200>
- Beaulieu, C., & Somogyi, P. (1990). Targets and Quantitative Distribution of GABAergic Synapses in the Visual Cortex of the Cat. *The European Journal of Neuroscience*, *2*(4), 296–303. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.1990.TB00421.X>
- Belluzzi, O., Puopolo, M., Benedusi, M., & Kratskin, I. (2004). Selective neuroinhibitory effects of taurine in slices of rat main olfactory bulb. *Neuroscience*, *124*(4), 929–944. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.12.032>
- Bennison, S. A., Blazejewski, S. M., Smith, T. H., & Toyooka, K. (2020). Protein kinases: master regulators of neuriteogenesis and therapeutic targets for axon

- regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(8), 1511–1530.
<https://doi.org/10.1007/S00018-019-03336-6>
- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., & Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABAB receptors. *Physiological Reviews*, 84(3), 835–867.
<https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00036.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0030403170009.JPEG>
- Bond, A. M., Ming, G. L., & Song, H. (2015). Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*, 17(4), 385–395.
<https://doi.org/10.1016/J.STEM.2015.09.003>
- Bowery, N. G., & Smart, T. G. (2006). GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *British Journal of Pharmacology*, 147(Suppl 1), S109.
<https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706443>
- Brickley, S. G., Cull-Candy, S. G., & Farrant, M. (1999). Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(8), 2960–2973.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-08-02960.1999>
- Carter, A. G., & Sabatini, B. L. (2004). State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron*, 44(3), 483–493.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.013>
- Chen, V. C. H., Hsu, T. C., Chen, L. J., Chou, H. C., Weng, J. C., & Tzang, B. S. (2017). Effects of taurine on resting-state fMRI activity in spontaneously hypertensive rats. *PloS One*, 12(7).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0181122>
- Chesney, R. W., Han, X., & Patters, A. B. (2010). Taurine and the renal system. *Journal of Biomedical Science*, 17(Suppl 1), S4. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-S1-S4>
- Cornell, B., Wachi, T., Zhukarev, V., & Toyooka, K. (2016). Regulation of neuronal morphogenesis by 14-3-3epsilon (Ywhae) via the microtubule binding protein, doublecortin. *Human Molecular Genetics*, 25(20), 4405–4418.
<https://doi.org/10.1093/HMG/DDW270>
- Craig, A. M., & Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 267–310.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NE.17.030194.001411>
- Cutting, G. R., Lu, L., O'Hara, B. F., Kasch, L. M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D. M., Shimada, S., Antonarakis, S. E., Guggino, W. B., Uhl, G. R., & Kazazian, H. H. (1991). Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(7), 2673. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.7.2673>
- Davies, P. A., Hanna, M. C., Hales, T. G., & Kirkness, E. F. (1997). Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA(A) receptor subunit. *Nature*, 385(6619), 820–823. <https://doi.org/10.1038/385820A0>
- De Luca, A., Pierno, S., & Camerino, D. C. (2015). Taurine: The appeal of a safe amino acid for skeletal muscle disorders. *Journal of Translational Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S12967-015-0610-1>

- Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2012). Fat incites tanycytes to neurogenesis. *Nature Neuroscience*, *15*(5), 651–653. <https://doi.org/10.1038/NN.3091>
- Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997a). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *17*(13), 5046–5061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-13-05046.1997>
- Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997b). Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *The Journal of Neuroscience*, *17*(13), 5046. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-13-05046.1997>
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, *36*(6), 1021–1034. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01133-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01133-9)
- Dominy, J. E., Simmons, C. R., Hirschberger, L. L., Hwang, J., Coloso, R. M., & Stipanuk, M. H. (2007). Discovery and Characterization of a Second Mammalian Thiol Dioxygenase, Cysteamine Dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(35), 25189–25198. <https://doi.org/10.1074/JBC.M703089200>
- Dominy, J. E., & Stipanuk, M. H. (2004). New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H₂S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant. *Nutrition Reviews*, *62*(9), 348–353. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.2004.TB00060.X>
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A., & Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *8*(4), 1454–1468. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-04-01454.1988>
- Dwane, S., Durack, E., O'Connor, R., & Kiely, P. A. (2014). RACK1 promotes neurite outgrowth by scaffolding AGAP2 to FAK. *Cellular Signalling*, *26*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2013.08.036>
- Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2009). Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*, *158*(3), 1021–1029. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.06.052>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* *1998 4:11*, *4*(11), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Felice, D., O'Leary, O. F., Pizzo, R. C., & Cryan, J. F. (2012). Blockade of the GABA(B) receptor increases neurogenesis in the ventral but not dorsal adult hippocampus: relevance to antidepressant action. *Neuropharmacology*, *63*(8), 1380–1388. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2012.06.066>
- Feng, Z. Q., Franz, E. W., Leach, M. K., Winterroth, F., White, C. M., Rastogi, A., Gu, Z. Z., & Corey, J. M. (2016). Mechanical tension applied to substrate films specifies location of neurite genesis and promotes major neurite growth at the expense of minor neurite development. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *104*(4), 966–974. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.35627>

- Franek, M., Pagano, A., Kaupmann, K., Bettler, B., Pin, J. P., & Blahos, J. (1999). The heteromeric GABA-B receptor recognizes G-protein α subunit C-termini. *Neuropharmacology*, *38*(11), 1657–1666. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00135-5)
- Froger, N., Moutsimilli, L., Cadetti, L., Jammoul, F., Wang, Q. P., Fan, Y., Gaucher, D., Rosolen, S. G., Neveux, N., Cynober, L., Sahel, J. A., & Picaud, S. (2014). Taurine: the comeback of a nutraceutical in the prevention of retinal degenerations. *Progress in Retinal and Eye Research*, *41*, 44–63. <https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2014.03.001>
- Fukui, M., Nakamichi, N., Yoneyama, M., Ozawa, S., Fujimori, S., Takahata, Y., Nakamura, N., Taniura, H., & Yoneda, Y. (2008). Modulation of cellular proliferation and differentiation through GABA(B) receptors expressed by undifferentiated neural progenitor cells isolated from fetal mouse brain. *Journal of Cellular Physiology*, *216*(2), 507–519. <https://doi.org/10.1002/JCP.21422>
- Furukawa, T., & Fukuda, A. (2023). Maternal taurine as a modulator of Cl⁻ homeostasis as well as of glycine/GABAA receptors for neocortical development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *17*, 1221441. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2023.1221441>
- Gärtner, A., Fornasiero, E. F., Munck, S., Vennekens, K., Seuntjens, E., Huttner, W. B., Valtorta, F., & Dotti, C. G. (2012). N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. *The EMBO Journal*, *31*(8), 1893–1903. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2012.41>
- Ge, S., Yang, C. hao, Hsu, K. sen, Ming, G. li, & Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, *54*(4), 559. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2007.05.002>
- Giachino, C., Barz, M., Tchorz, J. S., Tome, M., Gassmann, M., Bischofberger, J., Bettler, B., & Taylor, V. (2014). GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. *Development*, *141*(1), 83–90. <https://doi.org/10.1242/DEV.102608>
- Gomes, F. I. F., Aragão, M. G. B., Bezerra, M. M., & Chaves, H. V. (2019). GABAergic transmission and modulation of anxiety: A review on molecular aspects. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, *6*(12), 9–16. <https://doi.org/10.21472/BJBS.061202>
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, *167*(4), 897–914. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.10.021>
- Green, C. S., & Bavelier, D. (2008). Exercising Your Brain: A Review of Human Brain Plasticity and Training-Induced Learning. *Psychology and Aging*, *23*(4), 692. <https://doi.org/10.1037/A0014345>
- Griego, E., Herrera-López, G., Gómez-Lira, G., Barrionuevo, G., Gutiérrez, R., & Galván, E. J. (2021). Functional expression of TrkB receptors on interneurons and pyramidal cells of area CA3 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, *182*, 108379. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2020.108379>
- Griego, E., Segura-Villalobos, D., Lamas, M., & Galván, E. J. (2022). Maternal immune activation increases excitability via downregulation of A-type potassium channels and reduces dendritic complexity of hippocampal neurons of

- the offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 105, 67–81.
<https://doi.org/10.1016/J.BBI.2022.07.005>
- Gustorff, C., Scheuer, T., Schmitz, T., Bühner, C., & Endesfelder, S. (2021). GABAB Receptor-Mediated Impairment of Intermediate Progenitor Maturation During Postnatal Hippocampal Neurogenesis of Newborn Rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2021.651072>
- 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), 2206–2219.
<https://doi.org/10.1007/S11064-023-03883-2>
- Hernández-Benítez, R., Ramos-Mandujano, G., & Pasantes-Morales, H. (2012). Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. *Stem Cell Research*, 9(1), 24–34.
<https://doi.org/10.1016/J.SCR.2012.02.004>
- Hosoi, Y., Akita, T., Watanabe, M., Ito, T., Miyajima, H., & Fukuda, A. (2022). Taurine depletion during fetal and postnatal development blunts firing responses of neocortical layer II/III pyramidal neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 806798.
<https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.806798/BIBTEX>
- Huang, X., Wu, W., Hu, P., & Wang, Q. (2018). Taurine enhances mouse cochlear neural stem cells proliferation and differentiation to spiral gangli through activating sonic hedgehog signaling pathway.
<https://doi.org/10.1080/15476278.2018.1477462>
- Huxtable, R. J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*, 72(1), 101–163. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1992.72.1.101>
- Huxtable, R. J. (2000). Expanding the circle 1975-1999: Sulfur biochemistry and insights on the biological functions of taurine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 483, 1–25. https://doi.org/10.1007/0-306-46838-7_1
- Imae, M., Asano, T., & Murakami, S. (2014). Potential role of taurine in the prevention of diabetes and metabolic syndrome. *Amino Acids*, 46(1), 81–88.
<https://doi.org/10.1007/S00726-012-1434-4>
- Jia, F., Yue, M., Chandra, D., Keramidis, A., Goldstein, P. A., Homanics, G. E., & Harrison, N. L. (2008). Taurine Is a Potent Activator of Extrasynaptic GABAA Receptors in the Thalamus. *The Journal of Neuroscience*, 28(1), 106.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3996-07.2008>
- Jiang, Z., Krnjević, K., Wang, F., & Ye, J. H. (2004). Taurine Activates Strychnine-Sensitive Glycine Receptors in Neurons Freshly Isolated from Nucleus Accumbens of Young Rats. *Journal of Neurophysiology*, 91(1), 248–257.
<https://doi.org/10.1152/JN.00106.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9K0010436160007.JPEG>
- JM, F., V, M., O, W., M, H., D, B., & H, M. (1999). GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *The European Journal of Neuroscience*, 11(3), 761–768. <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.1999.00481.X>
- Johnson, M. R., Barnes, S., Kwakye, J. B., & Diasio, R. B. (1991). Purification and characterization of bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase from human

- liver. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16), 10227–10233.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99213-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99213-6)
- Kaila, K., Voipio, J., Paalasmaa, P., Pasternack, M., & Deisz, R. A. (1993). The role of bicarbonate in GABAA receptor-mediated IPSPs of rat neocortical neurones. *The Journal of Physiology*, 464(1), 273–289.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1993.SP019634>
- Kilb, W., & Fukuda, A. (2017). Taurine as an Essential Neuromodulator during Perinatal Cortical Development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11.
<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2017.00328>
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 149–184.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.051508.135600>
- Kuczewski, N., Fuchs, C., Ferrand, N., Jovanovic, J. N., Gaiarsa, J. L., & Porcher, C. (2011). Mechanism of GABAB receptor-induced BDNF secretion and promotion of GABAA receptor membrane expression. *Journal of Neurochemistry*, 118(4), 533–545. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07192.X>
- Kuhn, H. G., Toda, T., & Gage, F. H. (2018). Adult Hippocampal Neurogenesis: A Coming-of-Age Story. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(49), 10401–10410.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2144-18.2018>
- Kulik, A., Vida, I., Fukazawa, Y., Guetg, N., Kasugai, Y., Marker, C. L., Rigato, F., Bettler, B., Wickman, K., Frotscher, M., & Shigemoto, R. (2006). Compartment-dependent colocalization of Kir3.2-containing K⁺ channels and GABAB receptors in hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(16), 4289–4297.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-05.2006>
- Kullmann, D. M., Ruiz, A., Rusakov, D. M., Scott, R., Semyanov, A., & Walker, M. C. (2005). Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 87(1), 33.
<https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2004.06.003>
- Lee, D. A., & Blackshaw, S. (2012). Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 30(8), 615–621.
<https://doi.org/10.1016/J.IJDEVNEU.2012.07.003>
- Lepski, G., Jannes, C. E., Nikkhah, G., & Bischofberger, J. (2013). cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience, SEP*.
<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2013.00155/ABSTRACT>
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018820>
- Liu, X., Wang, Q., Haydar, T. F., & Bordey, A. (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls GFAP-expressing progenitor proliferation. *Nature Neuroscience*, 8(9), 1179. <https://doi.org/10.1038/NN1522>

- Lledo, P. M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(3), 179–193. <https://doi.org/10.1038/NRN1867>
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 2074–2077. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.5.2074>
- Lombardini, J. B. (1991). Taurine: retinal function. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 16(2), 151–169. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(91\)90003-Q](https://doi.org/10.1016/0165-0173(91)90003-Q)
- Lüscher, C., Jan, L. Y., Stoffel, M., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1997). G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*, 19(3), 687–695. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80381-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80381-5)
- Magnusson, J. P., Göritz, C., Tatarishvili, J., Dias, D. O., Smith, E. M. K., Lindvall, O., Kokaia, Z., & Frisén, J. (2014). A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6206), 237–241. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.346.6206.237>
- Mann, E. O., & Paulsen, O. (2007). Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends in Neurosciences*, 30(7), 343–349. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2007.05.003>
- Martínez-Rojas, V. A., Arosio, D., Pennuto, M., & Musio, C. (2021). Clenbuterol-sensitive delayed outward potassium currents in a cell model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 473(8), 1213–1227. <https://doi.org/10.1007/S00424-021-02559-6>
- Menzie, J., Pan, C., Prentice, H., & Wu, J. Y. (2014). Taurine and central nervous system disorders. *Amino Acids*, 46(1), 31–46. <https://doi.org/10.1007/S00726-012-1382-Z>
- Miller, T. J., Hanson, R. D., & Yancey, P. H. (2000). Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 125(1), 45–56. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00160-9)
- Ming, G. L., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 223–250. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.28.051804.101459>
- Ming, G. li, & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4), 687–702. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.05.001>
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, 3(3), 265–278. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.07.004>
- Miyazaki, T., Honda, A., Ikegami, T., & Matsuzaki, Y. (2013). The role of taurine on skeletal muscle cell differentiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 776, 321–328. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6093-0_29
- Morrisett, R. A., Mott, D. D., Lewis, D. V., Scott Swartzwelder, H., & Wilson, W. A. (1991). GABAB-receptor-mediated inhibition of the N-methyl-D-aspartate component of synaptic transmission in the rat hippocampus. *Journal of*

- Neuroscience*, 11(1), 203–209. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-01-00203.1991>
- Mudò, G., Bonomo, A., Di Liberto, V., Frinchi, M., Fuxe, K., & Belluardo, N. (2009). The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. *Journal of Neural Transmission*, 116(8), 995–1005. <https://doi.org/10.1007/S00702-009-0207-Z>
- Mueller, B. K. (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 351–388. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.22.1.351>
- Murakami, S. (2015). Role of taurine in the pathogenesis of obesity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(7), 1353–1363. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201500067>
- Newberry, N. R., & Nicoll, R. A. (1985). Comparison of the action of baclofen with gamma-aminobutyric acid on rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *The Journal of Physiology*, 360(1), 161–185. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1985.SP015610>
- Nicoll, R. A., & Alger, B. E. (1979). Presynaptic Inhibition: Transmitter and Ionic Mechanisms. *International Review of Neurobiology*, 21(C), 217–258. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60639-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60639-X)
- Pasantes-Morales, H., & Hernández-Benítez, R. (2010). Taurine and brain development: trophic or cytoprotective actions? *Neurochemical Research*, 35(12), 1939–1943. <https://doi.org/10.1007/S11064-010-0262-8>
- Pastrana, E., Cheng, L. C., & Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), 6387–6392. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0810407106>
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153–183. <https://doi.org/10.1210/EDRV.22.2.0428>
- Pérez-Rodríguez, D. R., Blanco-Luquin, I., & Mendioroz, M. (2021). *brain sciences The Participation of Microglia in Neurogenesis: A Review*. <https://doi.org/10.3390/brainsci11050658>
- Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., & Alvarez-Buylla, A. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(11). <https://doi.org/10.1073/PNAS.1219563110/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201219563SI.PDF>
- Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., & Deloulme, J. C. (2007). S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*, 55(2), 165–177. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20445>
- Reese, D., & Drapeau, P. (1998). Neurite Growth Patterns Leading to Functional Synapses in an Identified Embryonic Neuron. *The Journal of Neuroscience*, 18(15), 5652. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-15-05652.1998>

- Ripps, H., & Shen, W. (2012). Review: Taurine: A “very essential” amino acid. *Molecular Vision*, *18*, 2673. /pmc/articles/PMC3501277/
- Riquelme, P. A., Drapeau, E., & Doetsch, F. (2008). Brain micro-ecologies: Neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1489), 123–137. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2006.2016>
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* *2009* *459*:7245, *459*(7245), 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature08144>
- Ryu, H., Chung, M., Dobrzyński, M., Fey, D., Blum, Y., Lee, S. S., Peter, M., Kholodenko, B. N., Jeon, N. L., & Pertz, O. (2015). Frequency modulation of ERK activation dynamics rewires cell fate. *Molecular Systems Biology*, *11*(11). <https://doi.org/10.15252/MSB.20156458>
- Sainath, R., & Gallo, G. (2015). Cytoskeletal and Signaling Mechanisms of Neurite Formation. *Cell and Tissue Research*, *359*(1), 267. <https://doi.org/10.1007/S00441-014-1955-0>
- Santos, J., Silva, D., Dotti, C. G., & Ottolenghi, C. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature Reviews Neuroscience* *2002* *3*:9, *3*(9), 694–704. <https://doi.org/10.1038/nrn918>
- Sava, B. A., Chen, R., Sun, H., Luhmann, H. J., & Kilb, W. (2014). Taurine activates GABAergic networks in the neocortex of immature mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(FEB), 69584. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00026/BIBTEX>
- Schaffer, S., Takahashi, K., & Azuma, J. (2000). Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids*, *19*(3–4), 527–546. <https://doi.org/10.1007/S007260070004>
- Schelski, M., & Bradke, F. (2017). Neuronal polarization: From spatiotemporal signaling to cytoskeletal dynamics. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *84*, 11–28. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2017.03.008>
- Schofield, P. R., Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Kettenmann, H., & Seeburg, P. H. (1989). Sequence and expression of human GABAA receptor alpha 1 and beta 1 subunits. *FEBS Letters*, *244*(2), 361–364. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80563-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80563-0)
- Shivaraj, M. C., Marcy, G., Low, G., Ryu, J. R., Zhao, X., Rosales, F. J., & Goh, E. L. K. (2012). Taurine induces proliferation of neural stem cells and synapse development in the developing mouse brain. *PloS One*, *7*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0042935>
- Sogawa, Y., Yoshimura, Y., Otaka, A., & Yamauchi, T. (2000). Ca(2+)-independent activity of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II involved in stimulation of neurite outgrowth in neuroblastoma cells. *Brain Research*, *881*(2), 165–175. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02838-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02838-9)
- Song, H. J., Stevens, C. F., & Gage, F. H. (2002). Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature Neuroscience* *2002* *5*:5, *5*(5), 438–445. <https://doi.org/10.1038/nn844>
- Song, J., Crowther, A. J., Olsen, R. H., Song, H., & Ming, G. (2014). A diametric mode of neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus via

- parvalbumin interneurons. *Neurogenesis*, 1(1), e29949.
<https://doi.org/10.4161/NEUR.29949>
- Song, J., Olsen, R. H. J., Sun, J., Ming, G. L., & Song, H. (2016). Neuronal Circuitry Mechanisms Regulating Adult Mammalian Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018937>
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M. A., Sun, G. J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z. J., Ge, S., Enikolopov, G., Deisseroth, K., Luscher, B., Christian, K. M., Ming, G. L., & Song, H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 2012 489:7414, 489(7414), 150–154. <https://doi.org/10.1038/nature11306>
- Spriet, L. L., & Whitfield, J. (2015). Taurine and skeletal muscle function. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(1), 96–101. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000135>
- Sumizu, K. (1962). Oxidation of hypotaurine in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 63(1), 210–212. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90357-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90357-8)
- Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S. ichiro, Vasiliev, J. M., & Borisy, G. G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *The Journal of Cell Biology*, 160(3), 409–421. <https://doi.org/10.1083/JCB.200210174>
- Thored, P., Heldmann, U., Gomes-Leal, W., Gisler, R., Darsalia, V., Taneera, J., Nygren, J. M., Jacobsen, S. E., Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2009). Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia*, 57(8), 835–849. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20810>
- Tochitani, S., Furukawa, T., Bando, R., Kondo, S., Ito, T., Matsushima, Y., Kojima, T., Matsuzaki, H., & Fukuda, A. (2021). *GABA A Receptors and Maternally Derived Taurine Regulate the Temporal Specification of Progenitors of Excitatory Glutamatergic Neurons in the Mouse Developing Cortex Maternally Derived Taurine Regulates Neural Progenitor Cell Specification Tochitani et al.* <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab106>
- Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., & Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47(6), 803–815. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2005.08.023>
- Ulrich, D., & Bettler, B. (2007). GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 298–303. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2007.04.001>
- Vignjevic, D., Peloquin, J., & Borisy, G. G. (2006). In vitro assembly of filopodia-like bundles. *Methods in Enzymology*, 406, 727–739. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)06057-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)06057-5)
- Waldron, M., Patterson, S. D., Tallent, J., & Jeffries, O. (2018). The Effects of Oral Taurine on Resting Blood Pressure in Humans: a Meta-Analysis. *Current Hypertension Reports*, 20(9). <https://doi.org/10.1007/S11906-018-0881-Z>
- Wan, G., Zhou, L., Lim, Q. E., Wong, Y. H., & Too, H. P. (2011). Cyclic AMP signalling through PKA but not Epac is essential for neurturin-induced biphasic ERK1/2 activation and neurite outgrowths through GFR α 2 isoforms. *Cellular Signalling*, 23(11), 1727–1737. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2011.06.007>

- Wang, B., Wang, Z., Sun, L., Yang, L., Li, H., Cole, A. L., Rodriguez-Rivera, J., Lu, H. C., & Zheng, H. (2014). The Amyloid Precursor Protein Controls Adult Hippocampal Neurogenesis through GABAergic Interneurons. *Journal of Neuroscience*, *34*(40), 13314–13325. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2848-14.2014>
- Wang, L., & Greenfield, L. J. (2009). Post-Hypoxic Changes in Rat Cortical Neuron GABA A Receptor Function Require L-type Voltage-Gated Calcium Channel Activation. *Neuropharmacology*, *56*(1), 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.004>
- Wayman, G. A., Lee, Y.-S., Tokumitsu, H., Silva, A., & Soderling, T. R. (n.d.). *Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.021>
- Wichterle, H., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*, *18*(5), 779–791. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80317-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80317-7)
- Wu, J. Y., & Prentice, H. (2010). Role of taurine in the central nervous system. *Journal of Biomedical Science*, *17*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-S1-S1>
- Xiao, J., & Liu, Y. (2003). Differential roles of ERK and JNK in early and late stages of neuritogenesis: a study in a novel PC12 model system. *Journal of Neurochemistry*, *86*(6), 1516–1523. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2003.01961.X>
- Yanagita, T., Han, S. Y., Hu, Y., Nagao, K., Kitajima, H., & Murakami, S. (2008). Taurine reduces the secretion of apolipoprotein B100 and lipids in HepG2 cells. *Lipids in Health and Disease*, *7*. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-7-38>
- Yang, J., Guo, H., Sun, D., Duan, J., Rao, X., Xu, F., Manyande, A., Tang, Y., Wang, J., & Wang, F. (2019). Elevated glutamate, glutamine and GABA levels and reduced taurine level in a schizophrenia model using an in vitro proton nuclear magnetic resonance method. *American Journal of Translational Research*, *11*(9), 5919. [/pmc/articles/PMC6789232/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31478232/)
- Ymer, S., Schofield, P. R., Shivers, B. D., Pritchett, D. B., Lüddens, H., Köhler, M., Werner, P., Sontheimer, H., Kettenmann, H., & Seeburg, P. H. (1989). Molecular studies of the GABAA receptor. *Journal of Protein Chemistry*, *8*(3), 352–355. <https://doi.org/10.1007/BF01674275>
- Young, S. Z., Lafourcade, C. A., Platel, J. C., Lin, T. V., & Bordey, A. (2014). GABAergic striatal neurons project dendrites and axons into the postnatal subventricular zone leading to calcium activity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(JAN). <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00010>
- Zhang, Q., Yu, Y., & Huang, X. F. (2016). Olanzapine Prevents the PCP-induced Reduction in the Neurite Outgrowth of Prefrontal Cortical Neurons via NRG1. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/SREP19581>
- Zhang, X., Odom, D. T., Koo, S. H., Conkright, M. D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Jacobsen, E., Kadam, S., Ecker, J. R., Emerson, B., Hogenesch, J. B., Unterman, T., Young, R. A., & Montminy, M. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(12), 4459–4464. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0501076102>