



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CUANTIFICACIÓN DE GEFIRINA EN LA ONTOGENIA DE
CEREBRO DE RATA POR INMUNOHISTOQUÍMICA Y
WESTERN BLOT”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ESTELA BERENICE FLORES CORNEJO

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2007.

**BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. H72917
No. Título _____
Clas TS 619.93
F 634 c



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CUANTIFICACIÓN DE GEFIRINA EN LA ONTOGENIA DE
CEREBRO DE RATA POR INMUNOHISTOQUÍMICA Y
WESTERN BLOT”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ESTELA BERENICE FLORES CORNEJO

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODALES

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
DIRECTORA

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
SINODAL

Dra. MA. ELENA VILLAGRÁN HERRERA
SINODAL

Q.B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Desarrollo del sistema nervioso y formación de hipocampo	2
II.2 Funciones del hipocampo	9
II.3 Comunicación interneuronal	11
II.4 Neurotransmisores inhibitorios	15
II.5 Gefirina	19
II.6 Enfermedades relacionadas con gefirina y sus receptores asociados	24
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	27
IV.1 General	27
IV.2 Específicos	27
V. METODOLOGÍA	28
V.1 Materiales	28
V.1.1 Material biológico	28
V.1.2 Materiales y reactivos	28
V.2 Métodos	28
V.2.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	28
V.2.2 Western Blot	29
V.2.2.1 Electroforesis SDS-PAGE	29
V.2.2.2 Transferencia	30
V.2.3 Inmunohistoquímica	31

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
VI. RESULTADOS	33
VI.1 Estandarización de la técnica de Bradford	33
VI.2 Western Blot	34
VI.3 Inmunohistoquímica	37
VII. DISCUSIÓN	41
VIII. CONCLUSIONES	45
IX. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Concentración de proteínas totales en los extractos de cerebro de rata por edad.	34
2	Volumen de carga para cada extracto de tejido.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Las fases de un óvulo fertilizado hasta una fase embrionaria de 32 células. Sección transversal de la blástula.	3
2	Aspecto dorsal de un embrión. Corte transversal de un embrión.	4
3	Una neurona y algunos tipos de neuroglia.	6
4	Localización del hipocampo.	8
5	Sección sagital del cerebro de rata.	10
6	Una sinapsis química.	12
7	Receptores asociados a proteínas G.	14
8	Modelo para la actividad dependiente del agrupamiento del receptor a glicina en el desarrollo de la membrana postsináptica.	20
9	Curva estándar para el ensayo de proteínas totales por el método de Bradford.	33
10	La figura muestra un gel de electroforesis de poliacrilamida, revelado con Azul de Coomassie.	35
11	Luminograma de gefirina.	36
12	Titulación de la marca inmunorreactiva obtenida con anticuerpo primario anti-gefirina.	37
13	Inmunohistoquímica de cortes coronales de hipocampo de cerebro de rata de 5 edades diferentes.	38
14	Se muestra la zona de hipocampo en cerebro de rata, amplificación 40 x de las secciones que presentan inmunoreactividad positiva a gefirina.	39
15	Cuantificación de gefirina por inmunohistoquímica en las distintas edades empleadas.	40

RESUMEN

La gefirina es una proteína de membrana periférica de 93 kDa, la cual se une a microtúbulos y participa en el anclaje de receptores a glicina y GABA_A en la membrana postsináptica de los mamíferos. En este trabajo se realizó Western Blot a las proteínas de cerebro de rata, en donde la gefirina se identificó con un anticuerpo policlonal por quimioluminiscencia. Con el fin de explorar la distribución de la gefirina durante la ontogenia en el hipocampo de rata, se emplearon métodos inmunohistoquímicos a partir de la edad de 18 días embrionarios hasta adulto, utilizando el mismo anticuerpo primario policlonal contra gefirina y se tiñó específicamente por un complejo peroxidasa ABC y diaminobencidina. En los experimentos en Western Blot en condiciones reductoras, los resultados indicaron una banda de 95 kDa +/- 5, correspondiente a la gefirina, con mayor concentración a los 5 y 11 días de edad (posnatal). La proteína indujo una marca inmunorreactiva diferencial en el hipocampo durante la ontogenia. Los resultados de este trabajo sugieren cambios ontogenéticos de la gefirina que pudieran asociarse a cambios en la diferenciación celular por su participación en la traducción de proteínas, así como su interacción en los procesos de señalización sináptica. Esto contribuye a que se puedan ampliar los conocimientos asociados con la formación del sistema nervioso y la posible participación del receptor a Glicina y GABA_A durante la ontogenia, para explorar en futuros trabajos los mecanismos de acción de dicha proteína en esta región del cerebro.

I. INTRODUCCIÓN

La gefirina se identificó originalmente como una proteína de membrana periférica copurificada con los receptores a glicina de mamíferos; es una proteína de 93 kDa que se une a microtúbulos y participa en el anclaje de receptores a glicina y GABA_A. Recientemente se ha encontrado que se une a proteínas que participan en la dinámica del citoesqueleto y la regulación de la eficiencia en la traducción de proteínas, así como en los procesos de señalización sináptica.

Estudios de gefirina en neuronas de hipocampo revelaron características acerca de su localización en una clase de células que no recibe sinapsis glicinérgica, por lo que se propuso que gefirina podría anclar receptores a GABA en sitios postsinápticos de neuronas en el hipocampo, justo como ancla receptores a glicina en las neuronas de médula espinal.

El estudio de la gefirina durante el desarrollo es importante para explorar si influye en la diferenciación celular, por las funciones que actualmente se le han asignado de su participación en la traducción de proteínas así como la dinámica del citoesqueleto, o bien si interviene en el control de la maduración y arborización de la red dendrítica por su unión a los receptores a glicina, por lo que la distribución de la proteína durante la ontogenia complementará las bases para la identificación de sus funciones en el hipocampo.

II. ANTECEDENTES

II.1 Desarrollo del sistema nervioso y formación de hipocampo.

En la generación de un individuo, una vez que se lleva a cabo la fecundación, se inicia en forma rápida la división mitótica celular del cigoto, llamada segmentación. Algunos días después de las segmentaciones sucesivas se produce una masa sólida de células denominada mórula. La mórula aumentada de tamaño se desplaza a través de las trompas de Falopio hasta la cavidad uterina; en ese momento se forma una masa hueca de células llamada blastocisto (Figura 1). En seguida de la segmentación, casi al decimocuarto día de desarrollo en el humano, las células se reagrupan formando nuevas asociaciones, como resultado de un profundo y todavía casi incomprendido proceso llamado gastrulación como parte de una serie de movimientos formativos ordenados, que dan por resultado la transformación de la blástula, en una gran gástrula de tres capas (Ebert y Sussex, 1977; Tortora y Anagnostakos, 2000). Es importante señalar que los embriones de la misma edad de fecundación no se desarrollan obligadamente con la misma rapidez, ya que en realidad hay diferencias importantes del índice de crecimiento aún en las primeras etapas del desarrollo (Langman, 1981).

La masa celular interna del blastocisto empieza a diferenciarse en las tres capas germinativas primarias: ectodermo; que forma la epidermis, órganos sensoriales y el sistema nervioso, endodermo; que forma el revestimiento epitelial del tracto digestivo, glándulas asociadas, aparato respiratorio y otros órganos, mesodermo; que forma el peritoneo, dermis de la piel, músculos, sistema vascular, esqueleto y otras partes del tejido conectivo. Así cada sistema de órganos puede estar compuesto de células de más de una capa germinal primaria (Barret y col., 1986; Tortora y Anagnostakos, 2000).

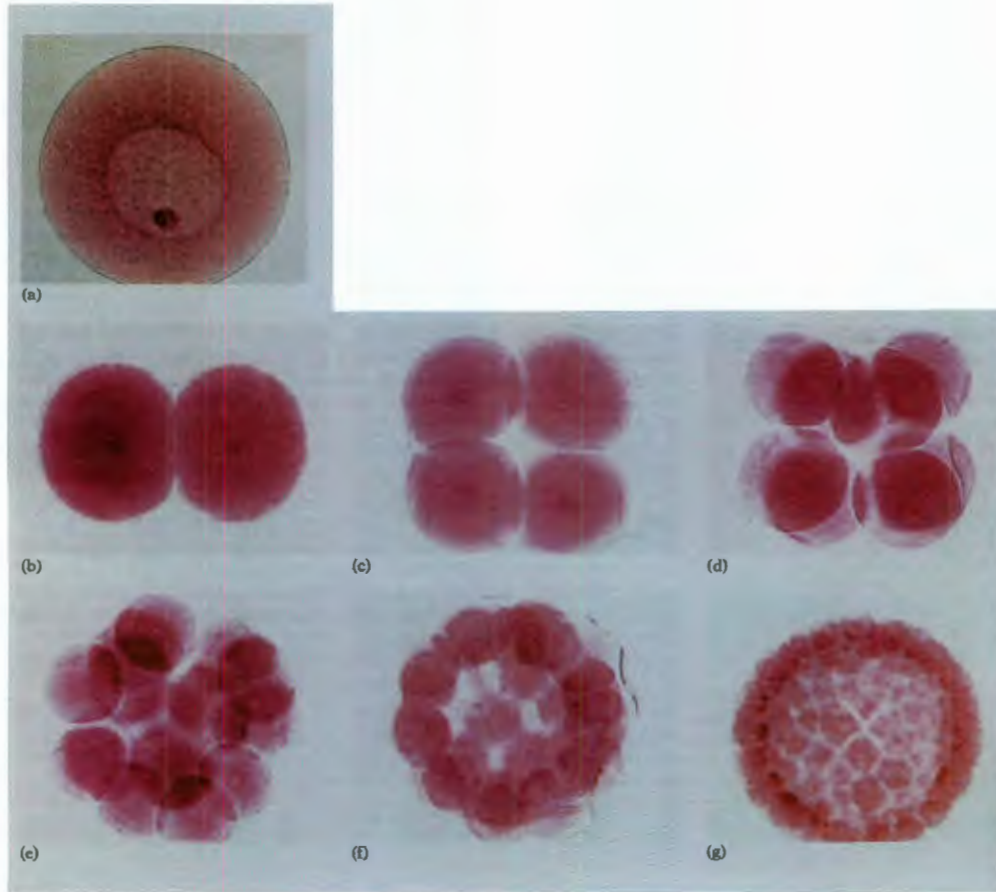


Figura 1 (a-f) Las fases de un óvulo fertilizado hasta una fase embrionaria de 32 células. (g) Sección transversal de la blástula (Barret y col., 1986).

Cuando termina la gastrulación, inicia el proceso de diferenciación primaria del sistema nervioso, la neurulación. A partir de la tercera semana el ectodermo, en el desarrollo del sistema nervioso humano, delante de la estría primitiva forma una capa gruesa de células llamada placa neural. El centro de la misma se hunde, de modo que deja un canal que se conoce como surco neural, mientras que los bordes levantados forman los pliegues neurales que se acercan por la parte anterior. Gradualmente esos extremos se reúnen, y resulta el tubo neural (Figura 2). La cavidad anterior de este tubo se convierte en los ventrículos cerebrales, y la cavidad posterior se extenderá a lo largo de la médula. La región encefálica es la primera en formarse y poco después la médula espinal (Ebert y Sussex, 1977; Villet, 1974).

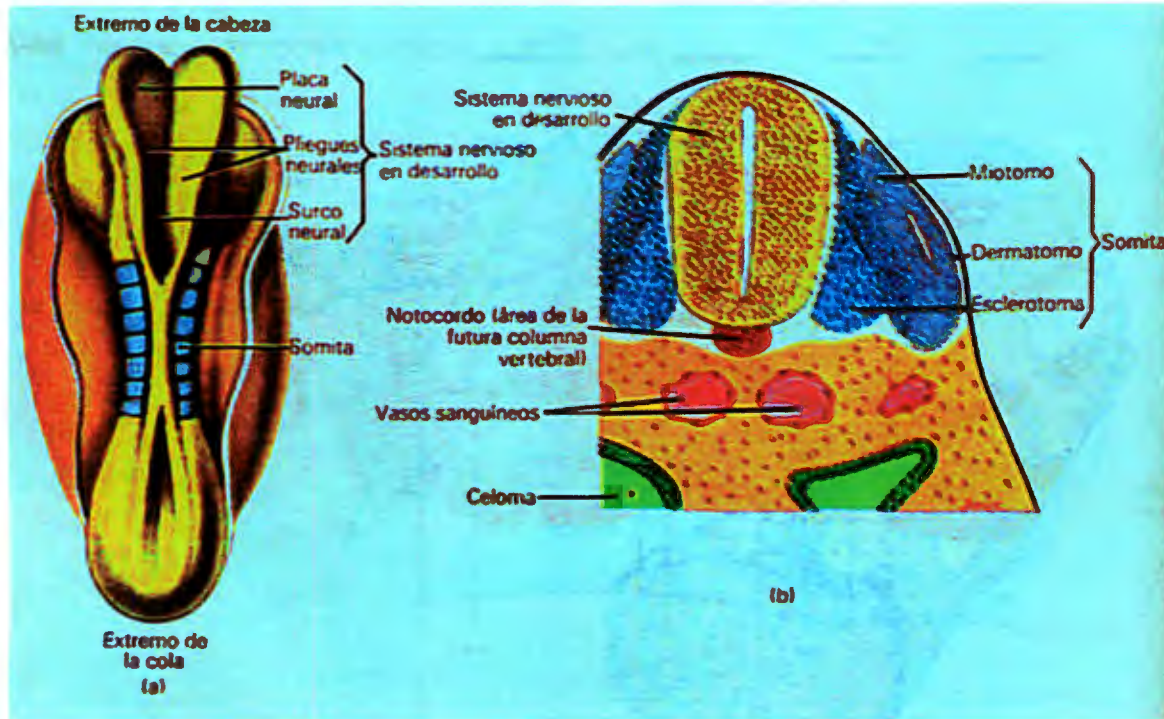


Figura 2. a) Aspecto dorsal de un embrión. Se indica la localización de las somitas. b) Corte transversal de un embrión. Se observa una somita (Tortora y Anagnostakos, 2000).

La porción anterior del tubo neural que formará el encéfalo, se hace mucho mayor que la porción posterior; su crecimiento es tan rápido que la región cefálica se inclina hacia abajo a nivel del extremo anterior del disco embrionario. A la quinta semana de la evolución están ya preformadas todas las regiones encefálicas, prosencéfalo, mesencéfalo y telencéfalo, o cerebros anterior, medio y posterior, respectivamente; dos semanas después empiezan a sobresalir las proyecciones que serán los grandes hemisferios cerebrales. Los diferentes nervios motores, encefálicos y medulares, se extienden a partir de esos orígenes, pero los nervios sensitivos son de otra procedencia. Ya que los pliegues neurales se han unido para formar el tubo neural, unas porciones de tejido nervioso, conocidas como crestas neurales, quedan dispuestas a cada lado del mismo. Estas prolongaciones se extienden hacia abajo desde su posición original, y forman los ganglios de las raíces posteriores de los nervios raquídeos y las neuronas simpáticas posganglionares. De las células sensitivas de los ganglios de las raíces posteriores salen dendritas a los

órganos de los sentidos, y axones a la médula espinal. Otras células de crestas neurales emigran y forman las células medulares de las glándulas adrenales, las células de la vaina del neurilema de las neuronas periféricas y otras estructuras (Villem, 1974).

Una vez formado, el sistema nervioso se considera uno de los centros de integración y control principales del cuerpo; el sistema nervioso sirve para llevar a cabo tres funciones amplias: sensorial, integrativa y motora. A través de la sensación, la integración y la respuesta, el sistema nervioso se puede dividir en dos grandes ramas, el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. El sistema nervioso central (SNC) es el centro de control para todo el sistema nervioso y consiste de cerebro y médula espinal. El sistema nervioso periférico se puede dividir en sistema aferente y en sistema eferente. El sistema aferente consiste de células nerviosas que se encargan de la información de los receptores en la periferia del cuerpo hacia el SNC. El sistema eferente consiste de células nerviosas que llevan información del SNC hacia los músculos y las glándulas. El sistema eferente se subdivide en sistema nervioso somático y en sistema nervioso autónomo. El sistema nervioso somático (SNS) consiste de neuronas eferentes que conducen impulsos del SNC hacia el tejido muscular esquelético. El sistema nervioso autónomo, en contraste contiene neuronas eferentes que conducen impulsos del SNC hacia el tejido muscular liso, el cardíaco y las glándulas; por lo general se le considera involuntario. Las vísceras reciben fibras nerviosas de dos divisiones del sistema nervioso autónomo: la división simpática y la división parasimpática (Tortora y Anagnostakos, 2000).

El SNC analiza la información que nos proporcionan los receptores localizados en todo el cuerpo humano y especializados en inmediata conexión con el medio ambiente. El sistema nervioso está compuesto de dos tipos principales de células: neuronas y neuroglía (Tortora y Anagnostakos, 2000; Tresguerres, 1999).

El SNC humano contiene cerca de 100 mil millones de neuronas y también contiene de 10 a 50 veces esa cantidad de células gliales. Las neuronas o células

nerviosas son el bloque básico para la construcción del sistema nervioso; son células altamente especializadas sensibles a varios estímulos que los convierten a impulsos nerviosos y los conducen a otras neuronas, fibras musculares o glándulas.

La mayor parte de las neuronas consiste en tres porciones básicas: cuerpo celular, dendritas y axones (Figura 3). El cuerpo celular o también llamado pericarion contiene el núcleo y otros organelos. Las dendritas se extienden hacia afuera del cuerpo celular y se ramifican de manera extensa conduciendo impulsos hacia las células del cuerpo, el axón se divide en ramas terminales, cada una de las cuales termina en un botón sináptico, los cuales contienen vesículas en donde se almacenan los transmisores (Ganong, 2002; Tortora y Anagnostakos, 2000).

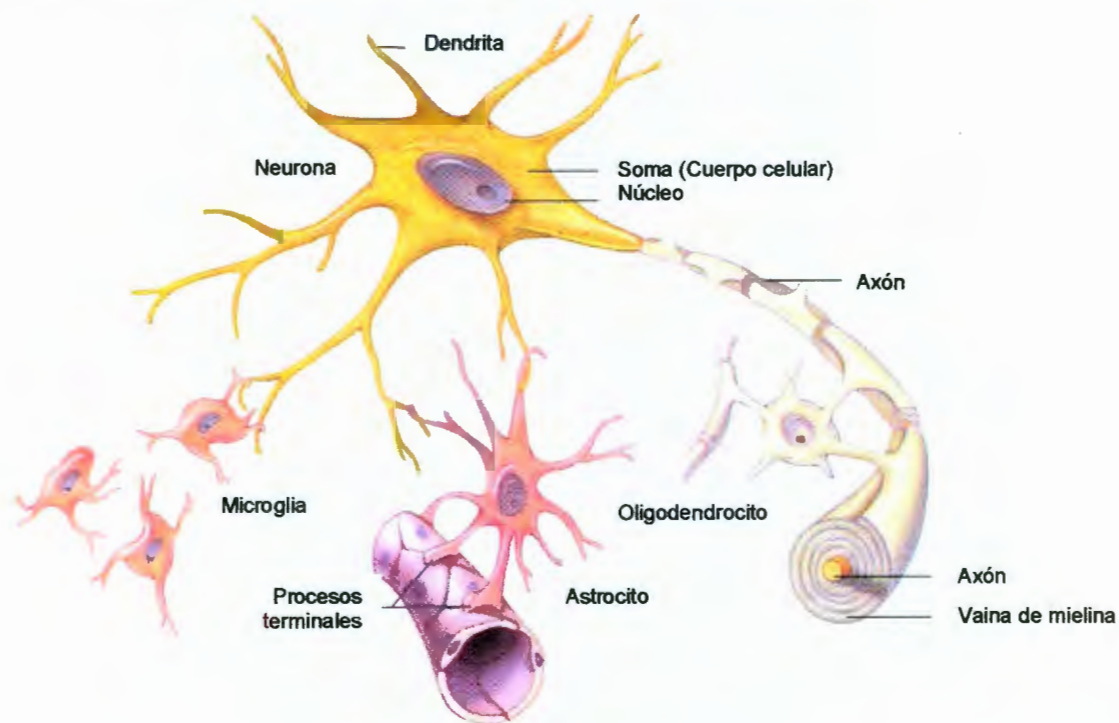


Figura 3. Una neurona y algunos tipos de neuroglía. Las neuronas conducen impulsos nerviosos. La microglía llega a ser móvil en respuesta a estímulos. El astrocito se sitúa entre las neuronas y los capilares. La mielina se forma por oligodendrocitos cubriendo fibras alrededor del cerebro y médula espinal –células de Schwann (Mader, 2004).

Los axones que están fuera del SNC, se encuentran rodeados por una estructura de capas múltiples; esta estructura es una cubierta que recibe el nombre de vaina de mielina. La vaina de mielina está producida por unas células aplanadas que se llaman neurolemocitos o células de Schwann localizadas a lo largo de los axones. Las células de Schwann que recubren los axones de los nervios periféricos se clasifican como glía. En el SNC existen tres tipos principales de glía. La microglía que tiene la función de remoción de productos de desecho del metabolismo neuronal o de restos celulares después de una lesión o de la muerte celular, los oligodendrocitos que están relacionados con la formación de la mielina y los astrocitos que debido a su potencial de membrana tienen una función de amortiguador espacial de K^+ y de captación de neurotransmisores, producen sustancias que fungen de guía para la migración neuronal durante el desarrollo y ayudan a conservar los nutrientes neuronales (Ganong, 2002; Tortora y Anagnostakos, 2000).

El cerebro se desarrolla muy rápido durante los primeros años de vida. El crecimiento se debe en su mayor parte a un aumento del tamaño de las células ya presentes, proliferación y crecimiento de las células de neuroglía, el desarrollo de los contactos entre las neuronas, la arborización dendrítica y finalmente, la mielinización de los diversos fascículos de fibra (Tortora y Anagnostakos, 2000).

En una etapa muy temprana del desarrollo evolutivo del encéfalo, el hipocampo se convirtió probablemente en un mecanismo neuronal de toma de decisiones, esencial para determinar la importancia y el tipo de importancia de las señales sensoriales que recibe el organismo. Una vez establecida esta capacidad vital de tomar decisiones, presumiblemente el resto del encéfalo empezó a recurrir a ella para la misma toma de decisiones. Si el hipocampo dice que una señal neuronal es importante, es probable que sea recordada. Es la parte alargada, medial, de la corteza temporal, que se pliega hacia arriba y hacia dentro para formar la superficie ventral del asta inferior del ventrículo lateral (Figura 4). Un extremo del hipocampo desemboca en los núcleos amigdalinos, y también se fusiona a lo largo

de uno de sus bordes con la circunvolución parahipocámpica, que es la corteza de la superficie ventromedial del lóbulo temporal (Guyton y Hall, 1997; Tresguerres, 1999).

La formación del hipocampo es una parte de la estructura allocortical. Citoarquitectónicamente, la formación esta dividida en cuatro áreas: giro dentado (GD), hipocampus o cornu ammonis, dividido en las áreas CA1, CA2 y CA3, el complejo subicular (subiculum, presubiculum y parasubiculum) y la corteza entorrinal (Djavadian, 2004).

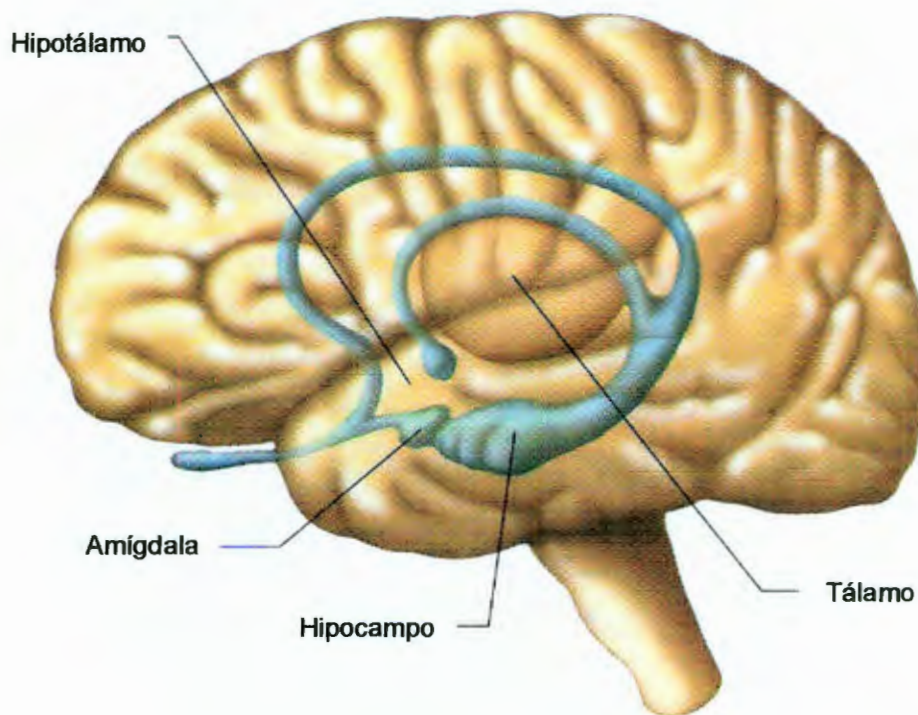


Figura 4. Localización del hipocampo. Las estructuras profundas dentro de cada hemisferio cerebral y los alrededores del diencefalo unen las funciones mentales altas como razonar (Mader, 2004).

Todas las partes de la formación del hipocampo son capas estructurales. El GD está construido de tres capas principales: molecular, células granulosas y células polimórficas. Las células granulosas, el tipo principal de las neuronas del GD, están

localizadas en la segunda capa donde están densamente condensadas, sin células gliales intercaladas entre ellas. El cono forma árboles dendríticos de células granulares que son dirigidas hacia la capa molecular que contiene también dendritas del cesto y células polimórficas, árboles axonales y pequeñas células estrelladas y en forma de candelabro. La mayoría de los tipos no granulares de neuronas (en forma de candelabro, cesto, musgosas, multipolares y fusiformes) son gabaérgicas y por consiguiente interneuronas inhibitorias (Djavadian, 2004).

II.2 Funciones del hipocampo.

El hipocampo y las estructuras contiguas del lóbulo temporal, las cuales se nombran en conjunto formación hipocámpica, tiene numerosas conexiones, principalmente indirectas, con muchas porciones de la corteza cerebral, así como las estructuras básicas del sistema límbico: la amígdala, el hipotálamo, el septum y los tubérculos mamilares. Casi cualquier tipo de experiencia sensorial activa por lo menos parte del hipocampo, y a su vez el hipocampo distribuye muchas señales eferentes al tálamo anterior, al hipotálamo y a otras partes del sistema límbico, principalmente a través del trígono, su principal vía de salida (Figura 5). Por tanto el hipocampo es un canal adicional a través del cual las señales sensoriales que penetran pueden conducir a reacciones conductuales apropiadas pero con propósitos diferentes. La estimulación de diferentes áreas del hipocampo puede causar casi cualquier patrón de conducta, como rabia, pasividad o impulso sexual excesivo. Otra característica del hipocampo es que es hiperexcitable y quizás una de las razones es que tiene un tipo de corteza diferente de la del resto del cerebro, con sólo tres capas de células nerviosas en algunas partes, en vez de las seis capas que se encuentran en otras zonas (Guyton y Hall, 1997).

La codificación explícita de la memoria implica la asociada con el trabajo en los lóbulos frontales y un procesamiento singular en el hipocampo. La memoria de trabajo mantiene disponible la información por un periodo corto mientras decide qué

ha denominado central ejecutiva ubicada en la corteza prefrontal y dos “sistemas de ensayo”, un sistema verbal para la memoria verbal de retención y un sistema visoespacial paralelo para retener información visual y espacial de objetos. La central ejecutiva dirige la información en estos sistemas de ensayo. Las áreas de memoria de trabajo se conectan al hipocampo y a las porciones parahipocámpicas adyacentes de la corteza temporal medial. La destrucción bilateral de la porción ventral del hipocampo o la enfermedad de Alzheimer y procesos patológicos similares que destruyen sus neuronas CA1 causan trastornos en la memoria a corto plazo (Ganong, 2002).

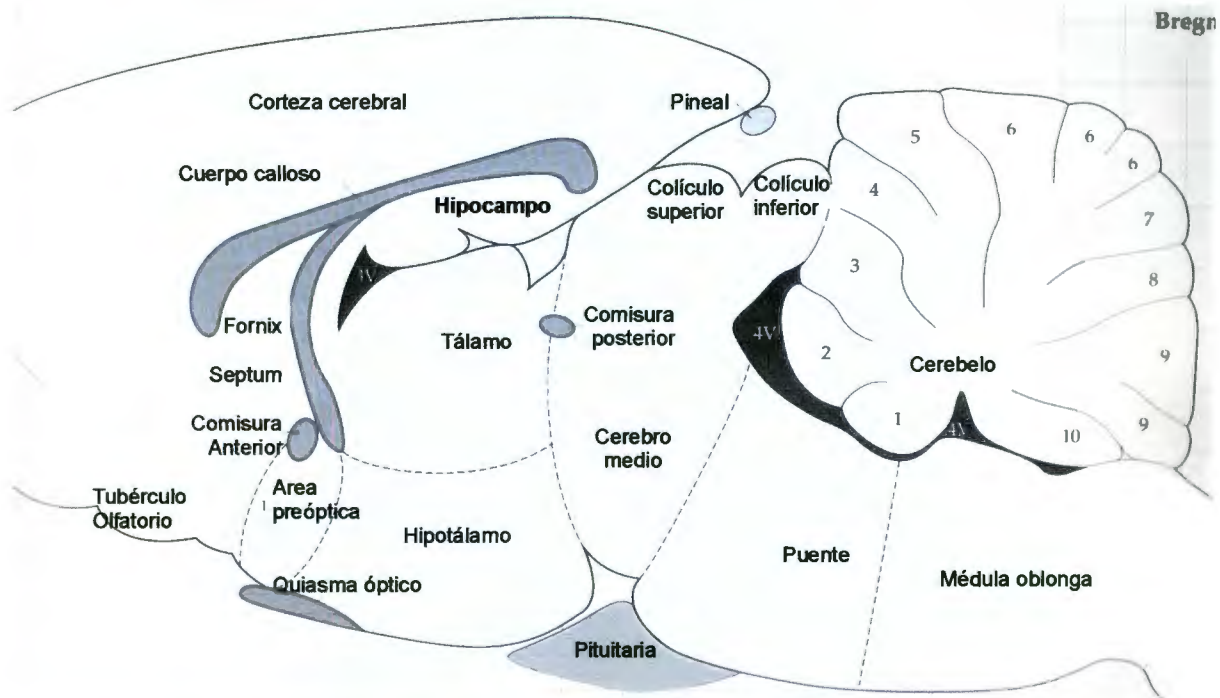


Figura 5. Sección sagital del cerebro de ratona. Se pueden observar casi todas las regiones mayoritarias del cerebro (Paxinos y Watson, 1998).

La moderna neurobiología nos lleva a entender la sinapsis como una propiedad que define la esencia de la neurona. Se podría decir que la neurona es una célula conectada con otra célula mediante sinapsis que median las señales específicas

hacer con ella. Ésta es la forma de memoria que nos permite, por ejemplo, observar

involucradas en las funciones del sistema nervioso tales como las respuestas reflejas, el aprendizaje o el comportamiento (Tresguerres, 1999).

II.3 Comunicación interneuronal.

Las señales neuronales se transmiten de una célula a otra a través de lugares especializados de contacto conocidos como sinapsis. El mecanismo habitual de transmisión es indirecto (sinapsis química). Las células se hallan aisladas eléctricamente una de otra, estando la célula presináptica separada de la célula postsináptica por una estrecha hendidura sináptica. Un cambio del potencial eléctrico en la célula presináptica desencadena la liberación de una pequeña molécula señal conocida como neurotransmisor, el cual se almacena en vesículas sinápticas rodeadas de membrana y se libera por exocitosis. El potencial de acción o impulso nervioso, puede transportar un mensaje sin atenuación desde un extremo de una neurona hasta el otro, a velocidades tan rápidas como 100 m/seg o más. Los potenciales de acción son consecuencia directa de la acción de los canales regulados por voltaje. El neurotransmisor difunde rápidamente a través de la hendidura sináptica y provoca un cambio eléctrico en la célula postsináptica a través de un canal iónico regulado por transmisor. Una vez el neurotransmisor ha sido secretado, es rápidamente eliminado ya sea por enzimas específicas de la hendidura sináptica bien por recaptura, tanto por la terminal nerviosa que lo ha liberado como por las células gliales vecinas. La recaptura está mediada por varios tipos de proteínas transportadoras de neurotransmisor dependientes de Na^+ . La rápida eliminación asegura la precisión espacial y temporal de la señalización en la sinapsis: evita que el neurotransmisor afecte a células vecinas y limpia la hendidura sináptica antes de que se produzca el nuevo pulso de liberación de neurotransmisor, de forma que a la célula postsináptica se le puede comunicar el ritmo, repetido y rápido, de los procesos señalizadores. La señalización a través de sinapsis químicas de este tipo (Figura 6) es mucho más versátil y adaptable que el acoplamiento eléctrico directo a través de uniones comunicantes en las sinapsis

eléctricas, también utilizadas por las neuronas aunque mucho menos frecuentemente (Alberts y col., 1996).

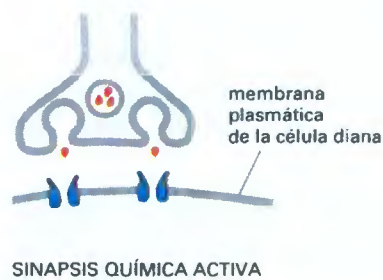
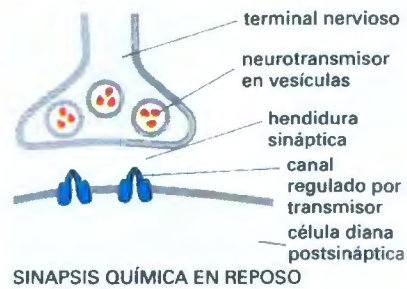


Figura 6. Una sinapsis química. Cuando un potencial de acción alcanza el terminal nervioso, estimula a dicho terminal a liberar su neurotransmisor que se halla contenido en vesículas sinápticas y se libera al exterior celular cuando las vesículas se fusionan con la membrana plasmática del terminal nervioso. El neurotransmisor liberado se une a los canales iónicos regulados por neurotransmisor concentrados en la zona sináptica de la membrana plasmática de la célula diana, abriéndolos (Alberts y col., 1996).

El sistema nervioso está formado por neuronas y glía; para llevar a cabo la comunicación neuronal se establece sinapsis entre las células. La integración presináptica en neuronas depende de posición y fuerza de las sinapsis excitatorias o inhibitorias y la postsináptica, del tipo, localización, número y/o composición de subunidades de las moléculas receptoras (Geiman y col., 2002).

La gran mayoría de las funciones del sistema nervioso las llevan a cabo las neuronas de las cuales su tarea fundamental es recibir, conducir y transmitir señales. La señalización celular requiere tanto moléculas señal extracelulares como un conjunto complementario de proteínas receptoras en cada célula, que les permiten unirlas y responder a ellas de una forma programada y característica. Las células

de los animales superiores se comunican mediante centenares de tipos de moléculas señal, pero sea cual fuere la naturaleza de la molécula señal, la célula diana responde mediante una proteína específica denominada receptor. Se une específicamente a la molécula señal, y entonces inicia una respuesta en la célula diana; muchas de las moléculas señal extracelulares actúan a concentraciones muy bajas y los receptores que las reconocen usualmente se unen a ellas con una elevada afinidad. En la mayoría de los casos los receptores son proteínas transmembranales de la superficie de las células diana; cuando se unen a una molécula señal extracelular (un ligando) se vuelven activos, de forma que generan una cascada de señales intracelulares que alteran el comportamiento de la célula. A veces, los receptores están situados en el interior de la célula diana, y el ligando señal entra a la célula para activarlos. Se conocen tres clases de proteínas receptoras de superficie celular: las asociadas a proteínas G, las asociadas a enzimas y las asociadas a canales iónicos. La mayoría de los receptores de superficie celular pertenecen a una de estas tres clases, que se definen en función del mecanismo de transducción que utilizan (Alberts y col., 1996).

Los receptores asociados a proteínas G (Figura 7) actúan indirectamente regulando la actividad de una enzima ligada a la membrana plasmática o un canal iónico, separados del receptor. La interacción entre el receptor y la proteína diana está mediada por una tercera proteína, llamada proteína reguladora que une GTP (o proteína G). La activación de la proteína diana altera la concentración de una o más pequeñas moléculas señal intracelulares o altera la permeabilidad de la membrana plasmática. Los mensajeros intracelulares actúan alterando el comportamiento de otras proteínas diana de la célula. Todos los receptores relacionados con proteínas G pertenecen a una súper familia de proteínas homólogas, que atraviesan 7 veces la membrana. La clonación de los cDNA humanos revela la existencia de al menos 24 proteínas α diferentes, 5 proteínas β y 6 proteínas γ . Las combinaciones de estas proteínas explican el gran número de proteínas G existentes (Alberts y col., 1996; Mathews y col., 2002).

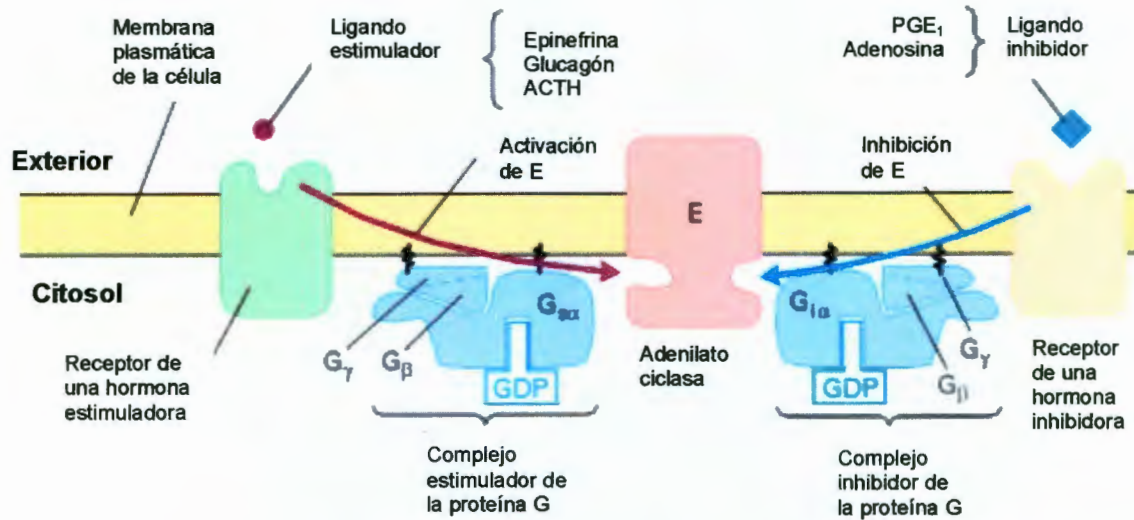


Figura 7. Receptores asociados a proteínas G. Este tipo de receptor puede estimular o inhibir la adenilato ciclasa. La unión de $G_{s\alpha}$ -GTP a la adenilato ciclasa activa la enzima (E), mientras que la unión de $G_{i\alpha}$ la inhibe. Las subunidades G_{α} y los receptores difieren aunque la subunidad $G_{\beta\gamma}$ es idéntica en ambas proteínas G (estimuladora e inhibidora). Algunas isoformas de adenilato ciclasa se iniben directamente por la subunidad $G_{\beta\gamma}$ (Lodish y col., 2000).

Cuando son activados por su ligando, los receptores asociados a enzimas actúan directamente como enzimas o están asociados a enzimas. La mayoría de ellos son proteínas que atraviesan la membrana una sola vez y que tienen el lugar de unión al ligando en el exterior de la célula y el lugar catalítico en el interior (Alberts y col., 1996).

Los receptores asociados a canales, también conocidos como canales iónicos regulados por transmisor, participan principalmente en la rápida señalización sináptica entre las células excitables eléctricamente. Este tipo de señalización está mediada por un pequeño número de neurotransmisores que abren o cierran transitoriamente el canal iónico al que están unidos, alterando así la permeabilidad iónica de la membrana plasmática y, por lo tanto modificando la excitabilidad de la célula postsináptica. Estos receptores relacionados con un canal pertenecen a una familia de proteínas transmembrana que la atraviesan varias veces (multipaso) y

que son homólogas entre sí; pueden ser excitatorios o inhibitorios. Para el neurotransmisor excitatorio glutamato hay tres tipos generales de receptores: receptores de kainato (es un ácido aislado de algas marinas), los receptores del AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) y los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato). Se han identificado cuatro subunidades AMPA, cinco para kainato y seis subunidades de NMDA cada una codificada por un gen diferente. Los neurotransmisores inhibitorios, como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y la glicina, abren canales de Cl^- regulados por transmisor, suprimen la generación del potencial de acción al hacer la membrana postsináptica más polarizada. Los receptores para GABA y glicina están constituidos por numerosas subunidades (Alberts y col., 1996; Ganong, 2002).

II.4 Neurotransmisores inhibitorios.

La inhibición en el SNC puede ser postsináptica o presináptica. La inhibición postsináptica durante el curso de un potencial inhibitorio postsináptico se denomina inhibición directa porque no es consecuencia de descargas previas de la neurona postsináptica. También ocurren diversas formas de inhibición indirecta, que es la inhibición debida a los efectos de la descarga previa de la neurona postsináptica; por ejemplo la célula postsináptica puede ser refractaria a la excitación debido a que se acaba de disparar y está en el período refractario. Durante la posthiperpolarización también es menos excitable; en las neuronas de la médula, en especial después de disparos repetidos, esta posthiperpolarización puede ser grande y prolongada (Ganong, 2002).

Las sinapsis inhibitorias pueden tener variedad en los neurotransmisores contenidos presinápticamente (GABA, glicina o ambos) el tipo de receptor localizado postsinápticamente (GABA_A , receptores a glicina o ambos), la composición de sus subunidades, de su localización espacial, o ambas. Todas estas características afectan la función sináptica (Geiman y col., 2002).

Los neurotransmisores inhibitorios más importantes en el SNC son glicina y GABA. Ellos comparten el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios, pero usan distintos transportadores de membrana. El transportador de glicina esta dentro de las terminales presinápticas en la isoforma GlyT2 para el transportador neuronal de glicina, mientras el transporte de GABA esta mediado por el transportador neuronal GABA. Los niveles presinápticos de GABA también dependen de la actividad de la enzima que sintetiza GABA: descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). En neuronas de médula espinal, las terminales inhibitorias liberan cualquiera ya sea glicina o GABA, o ambos transmisores (Meier y col., 2004).

El GABA es el principal mediador inhibitor en el cerebro, donde es el transmisor del 20 % de las sinapsis del SNC; también se encuentra en la retina y es el mediador responsable de la inhibición presináptica. El GABA, que existe como gamma-aminobutirato en líquidos corporales, se forma por descarboxilación del glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), la cual se ha demostrado, con técnicas de inmunocitoquímica, estar presente en las terminaciones nerviosas en muchas partes del cerebro. El GABA se metaboliza principalmente por transaminación a semialdehído succínico y de ahí a succinato en el ciclo del ácido cítrico. La transaminasa del GABA (GABA-T) es la enzima que cataliza la transaminación. El fosfato de piridoxal, derivado de la piridoxina del complejo de la vitamina B, es un cofactor para GAD y GABA-T; además existe una recaptura activa de GABA a través del transportador del GABA. El transportador vesicular transporta el GABA a las vesículas secretoras y tiene 10 dominios transmembranales (Ganong, 2002).

Se han descrito tres tipos de receptores GABA: GABA_A, GABA_B y GABA_C. Los receptores GABA_A y GABA_B están ampliamente distribuidos en el SNC, mientras que en vertebrados adultos los receptores GABA_C casi sólo se encuentran en la retina. Los receptores GABA_A y GABA_C son canales iónicos conformados por cinco subunidades que rodean a un poro, al igual que los receptores nicotínicos para acetilcolina y muchos de los receptores de glutamato. En este caso, el ión que

puede pasar por el poro es Cl^- . Los receptores GABA_B son metabotrópicos y están acoplados a proteínas G heterotriméricas que aumentan la conductancia en los canales de K^+ , e inhiben a la adenilciclase, con lo que se retrae la entrada de Ca^{2+} a la célula. En términos regulares los receptores GABA_C se constituyen con pentámeros de tres subunidades ρ en varias combinaciones. Por su parte, los receptores GABA_A son pentámeros constituidos por varias combinaciones de seis subunidades α , cuatro β , cuatro γ , una δ y una ϵ , lo que los dota de propiedades por completo diferentes de una ubicación a otra.

Debido a su acción en los receptores de NMDA, la glicina tiene un efecto excitador en el cerebro; sin embargo, la glicina también es responsable en parte de la inhibición directa, sobre todo en el tallo cerebral y la médula espinal. Al igual que el GABA, actúa aumentando la conductancia del Cl^- ; su acción es antagonizada por la estricnina. El receptor para glicina responsable de la inhibición, un canal de Cl^- , es un pentámero compuesto de dos subunidades; la subunidad α de unión al ligando y la subunidad estructural β . En fechas recientes se presentó evidencia sólida de que tres tipos de neuronas participan en la inhibición directa en la médula espinal: neuronas que secretan glicina, neuronas que secretan GABA y neuronas que secretan ambos. Se presume que las neuronas que sólo secretan glicina tienen un transportador de glicina GLYT2; aquellas que sólo secretan GABA tienen GAD, y las que secretan glicina y GABA poseen ambos. Este último tipo de neurona reviste especial interés porque las neuronas parecen tener glicina y GABA en las mismas vesículas (Ganong, 2002).

La superficie de las membranas neuronales contiene una amplia variedad de canales iónicos y proteínas receptoras que facilitan la comunicación intercelular. Su distribución regulada requiere proteínas asociadas a receptores y elementos citoesqueléticos que parecen ser críticos para procesos de señalización. La gefirina corresponde a este grupo de proteínas asociadas al receptor membranal. Es una proteína de 93 kDa, nombrada gefirina del griego gamma epsilon phi upsilon rho alpha (Prior y col., 1992; Waldvogel y col., 2003). La gefirina fue originalmente

identificada como una proteína de membrana periférica que se purificaba con el receptor a glicina en mamíferos (Kneussel y Betz, 2000), y está fuertemente colocalizada con los receptores a glicina, aunque también parece involucrar los receptores GABA_A en sitios postsinápticos (Lévi y col., 2004).

La gefirina juega un papel importante en el agrupamiento de ambos, receptores a glicina (GlyRs) y los subtipos del receptor GABA_A α 1, α 2 y γ 2 subcolocalizados en la membrana postsináptica, (Waldvogel y col., 2003). Algunos estudios sugieren una interacción de la subunidad β 3 del receptor GABA_A con gefirina (Colin y col., 1998).

En el trabajo de inmunocitoquímica con fluorescencia realizado en neuronas de hipocampo de rata cultivadas de Craig y colaboradores (1996) el doble marcaje con gefirina y GAD reveló que los amplios agrupamientos de gefirina ocurrieron en sitios de contacto entre dendritas y axones gabaérgicos. Además GABA está presente a lo largo de los axones gabaérgicos, la enzima sintética GAD esta concentrada en terminales y de esta manera es una marca más específica para botones gabaérgicos. El doble marcaje confirma que esos sitios de amplia agrupación de gefirina son en efecto sinapsis gabaérgicas.

El decremento postnatal del número de agrupaciones de gefirina podría estar ligado al proceso de maduración involucrando modificaciones en la composición del receptor a glicina. Estos cambios en composición no sólo involucran a los receptores a glicina, los cambios en el desarrollo se han descrito para receptores excitatorios e inhibitorios. Para receptores GABA, se ha mostrado en ratas perinatales un cambio en el desarrollo entre las subunidades α 1 y α 2. Además se ha mostrado en cerebro de ratón adulto que la disminución de la subunidad α 5 previene la formación de complejo del receptor GABA_A. Al nacimiento la marca de gefirina inmunorreactiva se encontró en sitios postsinápticos o sinapsis tipo II. La casi exclusiva distribución postsináptica de gefirina fue confirmada por marcaje doble de sinapsina con gefirina. Por consiguiente, la gefirina podría tener un papel

clave en la organización de la sinapsis gabaérgica, y un cambio en el desarrollo de la composición del receptor del microdominio postsináptico podría inducir una baja regulación de la expresión de gefirina (Colin y col., 1998).

II.5 Gefirina.

La gefirina se ha caracterizado como proteína de anclaje, está unida físicamente a la subunidad β del receptor heteropentamérico de glicina y es la llave mediadora del receptor glicinérgico para anclaje y agrupamiento (Baer y col., 2003). En la superficie celular, el receptor a glicina no está asociado con gefirina. Las interacciones entre el receptor a glicina y gefirina cambian la distribución de gefirina dramáticamente dentro del citoplasma. En la superficie de las neuronas, el receptor a glicina $\alpha 1$ forma microagrupaciones en ausencia de interacción con gefirina (Hanus y col., 2004).

La gefirina está unida a la subunidad β del receptor a glicina y a tubulina simultáneamente y forma una estructura enrejada debajo de la membrana (Figura 8) para atrapar dinámicamente receptores a glicina reciclados (Baer y col., 2003).

Estudios de gefirina en neuronas de hipocampo revelaron características acerca de su localización, una clase de células que no recibe sinapsis glicinérgica (Craig y col., 1996).

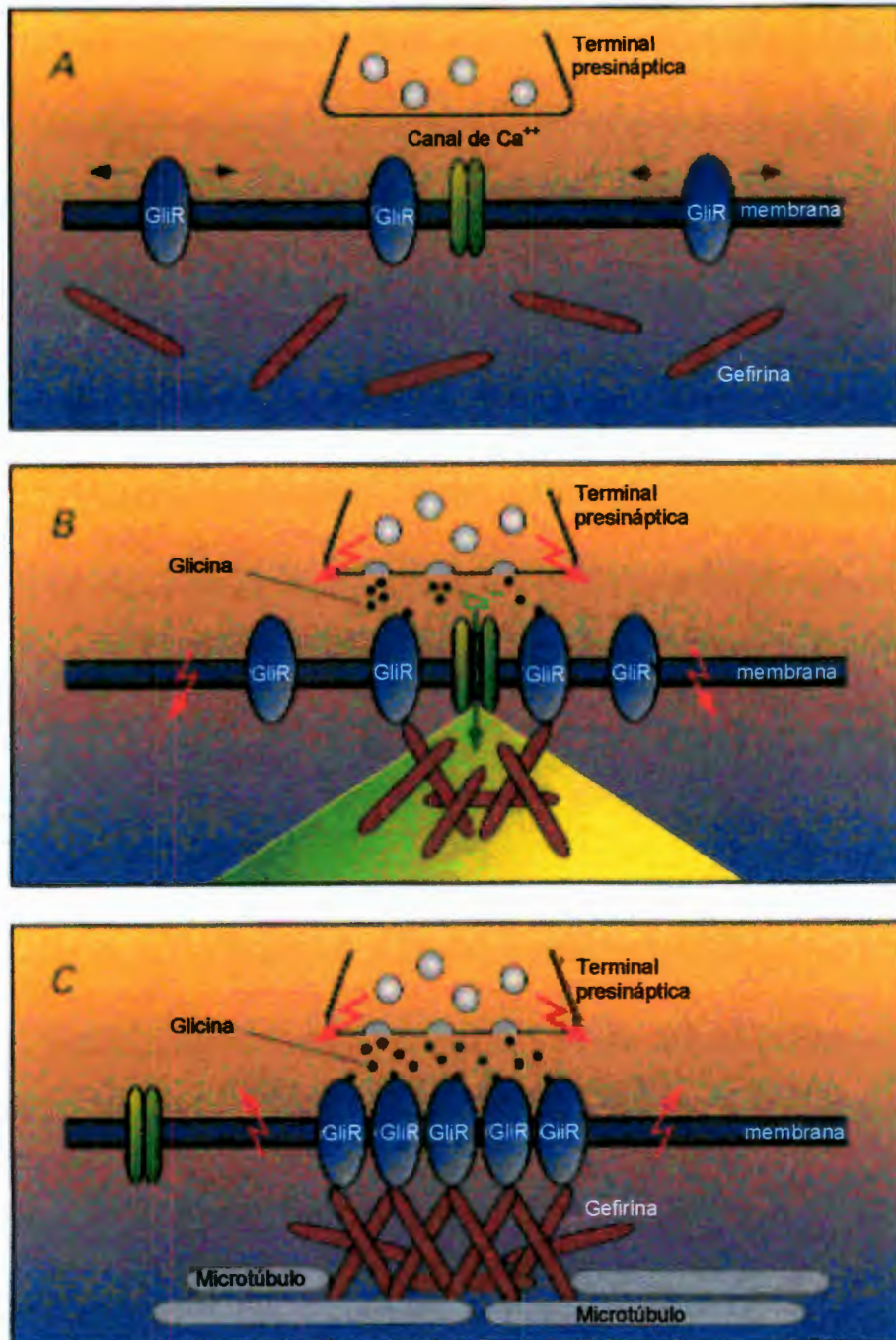


Figura 8. Modelo para la actividad dependiente del agrupamiento del receptor a glicina en el desarrollo de la membrana postsináptica (Kneussel y Betz, 2000). A, estado inmaduro: el receptor a glicina (GliR) está distribuido en la membrana plasmática de la célula postsináptica, mientras que gefirina está localizada en el citoplasma. B, iniciación de la agrupación de gefirina; liberación de glicina desde los terminales presinápticos. C, maduración: inmovilización del GliR durante el desarrollo de la membrana postsináptica por anclaje en el citoesqueleto subsináptico.

El marcaje en ratón y el tratamiento antisentido de cultivos de neuronas indican que la gefirina es esencial para la formación de la agrupación postsináptica del receptor a glicina en neuronas de médula espinal. La gefirina se une a la subunidad β del receptor de glicina, pero no hay ninguna evidencia clara para la unión directa de gefirina a los receptores de GABA_A. Los agrupamientos de receptores GABA_A pueden formar una sinapsis opuesta a terminales gabaérgicas en neuronas faltando gefirina. La agrupación en la mayoría de los receptores de las subunidades GABA_A $\alpha 2$ y $\gamma 2$ parecía ser menos pronunciado en neuronas con el knockout $-/-$ de gefirina.

La subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A está expresada únicamente por un subtipo de neuronas de hipocampo y es particular y fuertemente expresada por interneuronas. La gefirina es igual y altamente expresada en sinapsis gabaérgicas en neuronas piramidales e interneuronas y coagrupada con las subunidades del receptor GABA_A $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\gamma 2$. La gefirina es única y parcialmente requerida para agrupamientos sinápticos de receptores GABA_A $\alpha 2$ y $\gamma 2$ y no requerida para la localización de $\alpha 1$. La reducción del agrupamiento en la superficie de receptores GABA $\alpha 2$ y $\gamma 2$ no fue causada por ninguna reducción en la inervación gabaérgica en ausencia de gefirina (Lévi y col., 2004).

La gefirina inmunorreactiva se ha encontrado también en sinapsis gabaérgicas en médula espinal, retina, células cultivadas de hipocampo y neuronas corticales. Es más, la localización del receptor postsináptico GABA_A se encontró con marca de gefirina inmunorreactiva en regiones precisamente a un nivel ultraestructural. De cualquier modo la evidencia bioquímica para una asociación de receptores GABA_A con gefirina es todavía deficiente. Intentos para demostrar la unión de receptores GABA_A nativos para gefirina no han sido exitosos, aunque la cotrasfección de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A y gefirina dentro de células de mamífero resultó en colocalización intracelular de esas proteínas (Kneussel y Betz, 2000).

Los receptores a glicina están selectivamente agrupados a sinapsis gabaérgicas ya que la mezcla de sinapsis que descargan GABA y glicina y expresan receptores postsinápticos, GABA y glicina inducen corrientes que son más grandes en amplitud y mayor tiempo de duración comparadas con sinapsis que son o “GABA únicamente” o “glicina únicamente”, en un subtipo de neuronas de hipocampo y que estos agrupamientos son dependientes de gefirina, también muestran que al agregar artificialmente receptores GABA_A inducen la agrupación de gefirina por un mecanismo específico de la neurona (Geiman, y col., 2002; Lévi y col., 2004).

Craig y colaboradores deducen de sus resultados que la gefirina quizá funcione para anclar receptores GABA en sitios postsinápticos en neuronas de hipocampo, justo como ancla receptores glicina en neuronas de médula espinal, y de acuerdo con esa posibilidad, entonces parte de receptores GABA y glicina expresan una secuencia homóloga, pero no muestran homología con miembros de la familia del receptor glutamato. Gefirina inmunorreactiva en neuronas de hipocampo siempre se agrupa. Amplias agrupaciones de gefirina son localizadas selectivamente para sinapsis gabaérgicas pero no para glutamatérgicas, sus resultados sugieren que gefirina no esta involucrada en la agrupación del receptor a glutamato (Craig y col., 1996).

Varios subtipos de receptor excitador glutamato han sido encontrados para asociarse con componentes del citosol y citoesqueleto vía dominio PDZ mediado por interacciones entre proteínas. Esas interacciones no sirven únicamente para reclutar receptores glutamato ionotrópicos y metabotrópicos para la sinapsis, sino también para reunir cascadas de señalización y complejos enzimáticos al sitio de la sinapsis. Los receptores del neurotransmisor inhibitorio parecen usar una diferente proteína como mecanismo para ubicarse en el sitio sináptico. La gefirina ha mostrado tener un papel decisivo en la agrupación postsináptica de receptores a glicina y GABA_A, uniéndose a tubulina; sin embargo, recientemente también se encontró con una función en el metabolismo intermediario, además de unir

proteínas que han sido implicadas en la dinámica del citoesqueleto y en la regulación de la eficacia de la traducción.

Se han revelado nuevas interacciones entre gefirina, cambiando factores por proteínas G de familias Rho y Rac. El regulador traduccional RAFT I y la actina unida a proteínas como la profilina pueden integrar actividad dependiente y el factor trófico mediado por señales en el desarrollo de sitios postsinápticos (Kneussel y Betz, 2000).

Diversos estudios han reportado la presencia de proteínas postsinápticas de anclaje en compartimientos intracelulares conteniendo receptores para neurotransmisores. Este es el caso de rapsina para el receptor acetilcolina. En la unión neuromuscular rapsina escolta al receptor acetilcolina a lo largo de la ruta de secreción, sugiriendo esto la entrega del receptor a la superficie celular y/o a sinapsis que pueda ser regulada mediante esta preasociación con componentes del anclaje postsináptico. Entonces gefirina quizás interactúe con el receptor a glicina dentro del citoplasma, y probablemente a lo largo de la ruta de secreción, como lo hace la rapsina con el receptor acetilcolina.

El movimiento dependiente de microtúbulos de los agregados de gefirina formados en presencia de una interacción con el receptor a glicina, va más allá de la mención de que gefirina está asociada con los transportadores, recordemos que los microtúbulos son conocidos como facilitadores para la entrega de vesículas derivadas de transportadores TGN hacia el dominio apropiado en la membrana. La localización interna de gefirina con el receptor a glicina descrita, indica que gefirina pueda asociarse con el receptor a glicina a lo largo de la ruta de secreción. La aceleración de la acumulación del receptor a glicina en esas células puede reflejar los efectos combinados de la proteína en los procesos de exocitosis y endocitosis. Gefirina no amplifica únicamente la proporción de la acumulación del receptor en la membrana plasmática, también incrementa el número de receptores de los agrupamientos (Hanus y col., 2004).

La gefirina se une a tubulina con alta afinidad y ruptura de ambos, la actina y los microtúbulos del citoesqueleto en neuronas afecta la agrupación de gefirina en médula espinal pero no en neuronas de hipocampo (Fuhrmann y col., 2002).

En la inmunocitoquímica de médula espinal de rata, de las edades E13, 15, 17, 19, P0, P5, P10 y adulto, contra gefirina y el receptor a glicina, se observó que forman puntos inmunofluorescentes a lo largo de la membrana, pero no son equivalentes. Se muestra que gefirina inmunorreactiva (IR) al nacimiento es más numerosa que el receptor a glicina, mientras que en adulto la marca apareció equivalente, en P15 la marca fue similar mientras que al nacimiento gefirina IR fue significativamente mucho mayor que para el receptor a glicina IR. En P10 ambas densidades de marca llegan a ser equivalentes otra vez como de E15 a E17. El análisis cuantitativo confirmó el dramático incremento en la marca de gefirina entre E19 y P0 y el subsecuente decremento entre P0 y P10, así como la marca más alta de gefirina IR en P0 y P5. Así la marca del receptor a glicina IR durante el desarrollo incrementa firmemente, mientras que gefirina después de su drástico ascenso en P0 decrece hasta P10 y continua similar con el receptor a glicina aumentando hasta adulto (Colin y col., 1998).

II.6 Enfermedades relacionadas con gefirina y sus receptores asociados.

Los síndromes paraneoplásicos neurológicos incluyen una variedad de desórdenes en el sistema nervioso central o periférico que ocurren en asociación con cáncer pero no es el resultado de metástasis o compresión de un tumor. La enfermedad conocida como síndrome Stiff-Man (SMS) es un raro desorden adquirido del SNC caracterizado por rigidez y espasmos en el cuerpo muscular. La enfermedad se parece a una forma crónica de tétanos y afecta principalmente a las mujeres. La evidencia clínica y farmacológica sugiere que los resultados de SMS vienen de un deterioro de las rutas inhibitorias que controlan la actividad de motoneuronas del

tallo cerebral y médula espinal. Más del 60% de los pacientes con SMS tienen altos títulos de autoanticuerpos dirigidos contra la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), la enzima citosólica que sintetiza el neurotransmisor inhibitorio GABA en las terminales nerviosas de las neuronas secretoras de GABA. Sin embargo en un estudio en particular, el autoantígeno precipitado de aproximadamente 97 kDa por los anticuerpos del paciente migraron con gefirina y fue reconocida por un anticuerpo anti-gefirina. El autoantígeno de 97 kDa estuvo ausente en extractos de cerebro de un ratón knockout gefirina. La detección de autoanticuerpos contra gefirina en el paciente es de interés, considerando que la rigidez exagerada muscular en respuesta a estímulos sensoriales o emocionales, una característica común de SMS y una característica clínica de este paciente está presente en un ratón knockout gefirina y una hiperexplexia hereditaria que es un desorden genético asociado a mutaciones en el receptor a glicina, la proteína principal de unión a gefirina (Butler y col., 2000)

La autoinmunidad contra el GABA parece ser la causa del síndrome del hombre rígido (SHR), enfermedad caracterizada por rigidez muscular fluctuante pero progresiva y espasmos musculares dolorosos, tal vez debido a la deficiencia de GABA. Es interesante que la GAD también está presente en estructuras que semejan vesículas sinápticas en las células B secretoras de insulina del páncreas; además, el GABA puede ser el mediador parácrino en los islotes. La diabetes sacarina insulino dependiente (DMID, diabetes tipo I) es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la destrucción de las células B y los autoanticuerpos más abundantes en esta enfermedad se dirigen contra la GAD. Sin embargo el SHR es raro, mientras que la diabetes tipo I es frecuente y no todos los pacientes con SHR la tienen; así, todavía no se establece la relación entre las dos enfermedades.

Algunos individuos tienen reflejos hiperactivos de sobresalto (hiperexplexia), y por lo menos en algunos casos de este padecimiento, existe una sola sustitución de un aminoácido en el receptor inhibitorio de glicina (Butler y col., 2000; Ganong, 2002).

III. HIPÓTESIS

La marca inmunorreactiva (carboxilo-terminal) para la proteína gefirina está diferencialmente distribuida durante la ontogenia en el cerebro de rata.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Cuantificar la presencia de gefirina en el cerebro de rata por medio de Western Blot y observar su distribución en el hipocampo mediante inmunohistoquímica.

IV.2 Específicos

- Realizar la cuantificación de proteínas por el método de Bradford en las distintas edades en el cerebro total de rata y procesar los homogenados de cerebro por Western Blot.
- Efectuar los cortes coronales de los cerebros hasta localizar la zona correcta del hipocampo.
- Procesar la inmunohistoquímica de cerebro de rata en la zona de hipocampo de las diferentes edades.
- Cuantificar marca inmunorreactiva en el hipocampo de cerebro de rata.
- Comparar los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica con los de Western Blot de cerebro total de las diversas edades de rata.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

V:1.1 Material biológico

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de distintas edades: embriones de 18 días de gestación, ratas recién nacidas, de 5 y 11 días de edad postnatal y ratas adultas. Las ratas gestantes, lactantes, así como adultas de ensayo, se mantuvieron con alimento y bebida *ad libitum*, en ciclos de luz-oscuridad 12/12.

V.1.2 Materiales y reactivos

Se utilizaron reactivos para determinación de proteínas y electroforesis marca Biorad; los anticuerpos utilizados fueron de marca Santa Cruz y Chemicon.

V.2 Métodos

V.2.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Para reconstituir el estándar de albúmina sérica bovina (BSA), se adicionan 20 ml de agua desionizada y se mezclan hasta disolverse. Se preparan alícuotas y se almacenan a -20°C en tubos eppendorf de 2 ml.

La cuantificación se realiza mediante el procedimiento de microensayo de acuerdo al protocolo de Bio-Rad, en el inserto del protocolo "Bio-Rad Protein Assay" (Bradford, 1976). Se preparan 5 diluciones de proteína estándar la cual es representativa de la solución de proteína a examinar. El rango lineal del ensayo para BSA es de 1.2 a 10.0 µg/ml. Se colocan en total 800 µl de cada estándar o

solución problema dentro de una celda limpia y seca. Se adicionan 200 μ l del reactivo colorante concentrado a cada celda y se agitan. Se utiliza un blanco de proteína con sólo agua desionizada. Se incuba a temperatura ambiente por un tiempo mínimo de 5 minutos a un máximo de 1 hora. Se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. Se cuantifican las soluciones de proteína problema por triplicado.

V.2.3 Western Blot.

V.2.3.1 Electroforesis SDS-PAGE.

Se limpian los vidrios de la cámara de electroforesis para no impedir la polimerización de la acrilamida. Se atemperizan las soluciones en un baño de agua y se colocan los vidrios en las torres. Se prepara el gel resolventor al 12%, mezclando: 3.35 ml de H₂O desionizada y destilada, 2.5 ml de la solución B (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8) y 4 ml de la solución A (30% de Acrilamida; 0.8% de bis-acrilamida), sin agitar ya que se debe evitar la formación de burbujas. Se prepara el persulfato de amonio (PSA); la solución debe ser fresca preparada cada vez, hidratando 0.01 g en 100 μ l de agua desionizada (10%). Se agregan 100 μ l de la solución D (SDS 10%), 5 μ l de TEMED y 50 μ l de PSA al 10%. Se llena el espacio entre los vidrios hasta una altura de 2 cm antes del extremo del vidrio pequeño. Con la pipeta se cubre con agua la interfase para evitar el efecto sonrisa que es la formación de meniscos; se espera a que gelifique, se extrae el agua y se seca con un papel filtro. Se prepara el gel concentrador al 4%, se mezclan: 3.05 ml de H₂O desionizada y destilada, 1.25 ml de la solución B y 0.65 ml de la solución A, se mezcla lentamente y enseguida se agrega 50 μ l de la solución D, 12 μ l de TEMED y 25 μ l de PSA al 10%. Se introducen los peines, se aplica más solución hasta cubrir los bordes teniendo especial cuidado en no formar burbujas en el gel.

Las muestras a utilizar provienen de cerebros de rata adulta, 11 días postnatal (p11), postnatal 5 días (p5), recién nacidas (p0) y embriones de 18 días. Se preparan las muestras para analizar en volúmenes totales, obteniendo los licuados de los homogenados de cerebro después de dejarlos en buffer de extracción en hielo con inhibidores de proteasas por 2 h. Para peines de 15 pozos y 1 mm de espesor, se trabaja con volúmenes máximos de proteína de 10 μ l ya que se agregan 10 μ l más del amortiguador de la muestra más el betamercaptoetanol (β ME) que por su viscosidad ayuda a que por efecto de densidad se evite al máximo la difusión hacia el buffer de corrida y por sus características químicas realiza una desnaturalización en las proteínas ya que realiza un corte en las cisteínas unidas por enlaces disulfuro. Se hierven las muestras por 5 minutos. Se monta la cámara de corrida con los geles asegurándose de que los empaques sellen bien, se enjuagan los geles con agua desionizada para quitar el gel no polimerizado y después se seca con papel filtro, se coloca la cámara dentro del tanque y se llena con buffer de corrida hasta arriba eliminando las burbujas, posteriormente se cargan los pozos con las proteínas de los distintos cerebros con un marcador de peso molecular marca Rainbow en cada gel. Se tapa el tanque con los electrodos y se conectan a la fuente de poder. Se enciende la fuente poder con un voltaje constante de 100 volts los primeros 20 minutos, hasta que se alinean todas las proteínas en el gel separador y 150 volts después hasta que las proteínas lleguen al final del gel. Se desconecta la fuente, se saca la cámara, y se despegan los vidrios con los separadores haciendo palanca. Se coloca en el buffer para transferencia durante 15 minutos.

V.2.3.2 Transferencia.

Una membrana Bio-Rad se humedece con solución de transferencia, se preparan los paquetes para transferencia, la placa de plástico negra se coloca hacia abajo, se acomoda sobre la placa una fibra, encima un papel filtro, se ubica el gel cuidando de que no haya burbujas entre la fibra y el gel, se ubica la membrana ya equilibrada con la solución de transferencia, quitando con cuidado todas las

burbujas, se monta otro papel filtro previamente saturado de amortiguador de transferencia, se alinea la fibra y se cierra el cassette. Se introduce el cassette con la cara negra orientada hacia lo negro de la cámara de transferencia, se agrega el búffer, se instala un agitador magnético en el fondo, también se emplea hielo (agua desionizada) para evitar que se caliente el sistema. Se tapa la cámara y se conecta la fuente de poder para comenzar la transferencia. Se corre a 200mA durante una hora, después de la transferencia, se desconecta la cámara, se saca el cassette y con mucho cuidado, utilizando guantes, se retira del complejo la membrana.

Se lava la membrana 3 veces en TPBS 10 minutos, se bloquea para evitar marca inespecífica, se enjuaga en TBPS 3 veces más, se le coloca el anticuerpo primario anti-gefirina en la dilución sugerida durante toda la noche (13 horas). Al día siguiente se enjuaga 3 veces durante 10 minutos con TPBS cada uno, se le agrega el anticuerpo secundario y posteriormente se enjuaga 3 veces con PBS por 10 minutos, al finalizar se revela la membrana mediante quimioluminiscencia.

V.2.2 Inmunohistoquímica.

Se lleva a cabo la extracción del cerebro de las ratas de las edades empleadas: adulto, 11 días postnatal (p11), postnatal 5 días (p5), recién nacidas (p0) y embriones de 18 días, se enjuaga con solución buffer de fosfatos (PBS 1X) dos veces, y el tejido se coloca en una solución de paraformaldehído (PFA) al 5% de 3 a 4 horas. Transcurrido este tiempo se enjuaga el cerebro con PBT 1X para lavar el exceso de PFA. Después se lleva a cabo la crioprotección en una solución de sacarosa al 30 %, incubando hasta que el tejido baja al fondo del tubo, aprox 24 h a 4°C. Ya fijado el tejido se dispone en un molde de papel aluminio conteniendo Tissue Tek, el tejido se conserva a -70° en donde el Tissue Tek se solidifica para así permitir efectuar los cortes en el crióstato marca Leica modelo CM1850.

Una vez que el crióstato se programa para la realización de los cortes a una temperatura de -20°C con varias horas de anticipación, se procede a realizar los cortes coronales. Se realizan varios cortes preliminares de cada cerebro observándose al microscopio marca Zeiss modelo Axioscop 2 plus hasta que se encuentra el hipocampo en la zona correcta. La inmunohistoquímica se llevó a cabo en dos días; se probaron las muestras de todas las edades con su respectivo negativo en las mismas condiciones.

El primer día, se prepara una cámara húmeda, se colocan las laminillas en la cámara húmeda, se enjuagan 3 veces con PBS durante 10 minutos cada lavado, después se bloquea la peroxidasa endógena. Se lavan las laminillas 3 veces con TPBS durante 10 minutos, se vuelve a bloquear para evitar marca inespecífica. Se realizan 3 enjuagues más con TPBS durante 10 minutos, en el último lavado se escurren las laminillas en papel absorbente. Se coloca a los cortes de tejidos el anticuerpo primario anti-gefirina en la dilución sugerida durante toda la noche (13 horas).

Al día siguiente se enjuagan 3 veces durante 10 minutos con TPBS cada uno, al final del último lavado se escurren las laminillas en papel absorbente, se adiciona el anticuerpo secundario y posteriormente se enjuagan 3 veces con PBS por 10 minutos.

La reacción se revela con DAB (Diaminobencidina) 25 mg por cada 100 ml de PBS más $35\ \mu\text{l}$ de H_2O_2 por 10 minutos aproximadamente o hasta que se aprecie una coloración marrón en los tejidos. La reacción se detiene por medio de un enjuague con agua desionizada. Se secan las laminillas con papel absorbente y se cubren con glicerol y cubreobjetos. Se observan al microscopio con cámara integrada en campo claro a 40X. Se realiza la cuantificación densitométrica mediante el software KS300 de Zeiss.

VI. RESULTADOS

VI.1 Estandarización de la técnica de Bradford

Se realizó la estandarización de la técnica de Bradford para cuantificar proteínas, utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína patrón; se prepararon 5 diluciones de proteína estándar de acuerdo al rango lineal para BSA (el fabricante recomienda un rango de 1.2 a 10 $\mu\text{g/mL}$). Se prepararon estándares con las siguientes concentraciones: 0, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$, obteniendo curvas (tres curvas por triplicado) con un coeficiente de regresión promedio de 0.9997198 (Figura 9).

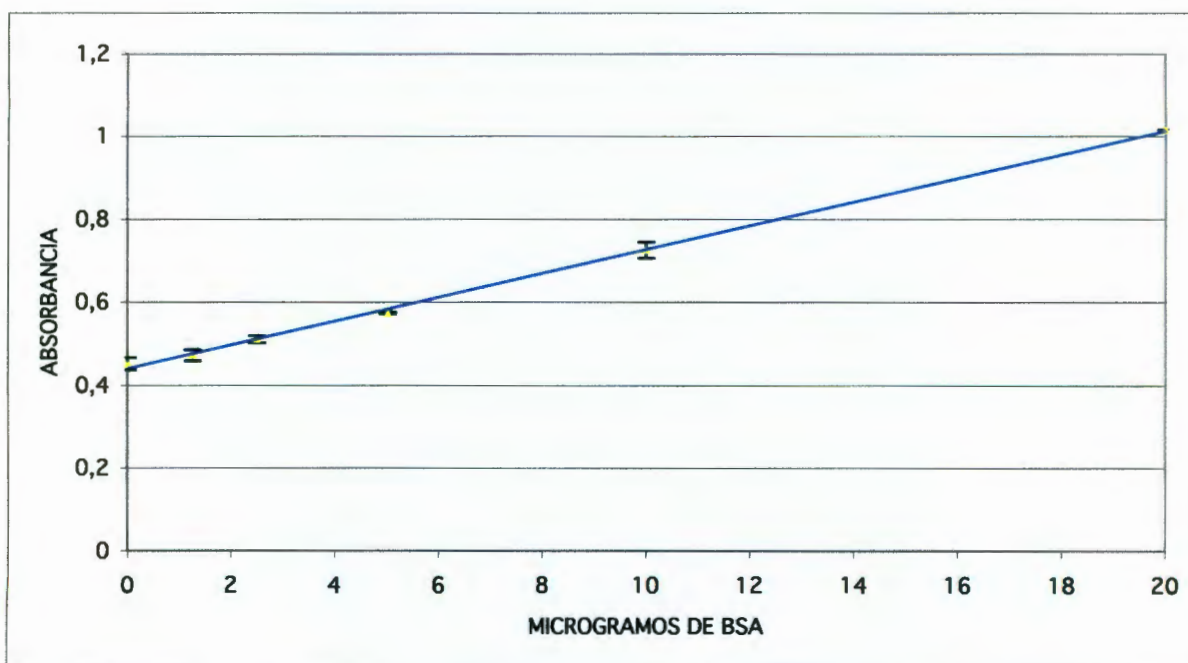


Figura 9. Curva estándar para el ensayo de proteínas totales por el método de Bradford. Se muestra una gráfica de la estandarización del método, con tres ensayos realizados por triplicado y de forma independiente; la línea azul representa su regresión lineal, datos promedio \pm d.e.

Una vez estandarizada la técnica se determinó la cantidad de proteínas totales en muestras de extracto de tejido cerebral de ratas de diferentes edades (Cuadro 1): embriones de 18 días (E18), recién nacidos (P0), ratas con 5 y 11 días de edad (P5 y P11), y ratas adultas (AD). La extracción de proteínas de los cerebros de rata se llevó a cabo tras la homogenización con 5 mL de amortiguador 50 mM Tris por gramo de tejido, en presencia de inhibidores de proteasas (Complete Mini Roche), con agitación durante 2 horas en hielo.

Cuadro 1. Concentración de proteínas totales en los extractos de cerebro de rata por edad: absorbancia en el ensayo, microgramos de proteína en 5 microlitros de una dilución 1:10 y su concentración original en el extracto con 5 mL de amortiguador / gramo de tejido.

EDAD	ABSORBANCIA	MICROGRAMOS (/5 μ L DILUCIÓN 1:10)	CONCENTRACIÓN ORIGINAL (μ g/ μ L)
E18	0.5830	5.00	10.01
P0	0.5885	5.20	10.40
P5	0.6115	6.00	12.03
P11	0.6000	5.61	11.21
AD	0.7050	9.32	18.64

VI.2 Western Blot

La estandarización de electroforesis se realizó con proteína BSA, como marcador de peso conocido en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y revelada con Azul de Coomasie (Figura 10). Una vez estandarizado el método, se prepararon los geles para la electroforesis discontinua vertical. Se prepararon dos geles, uno resolvidor y el otro concentrador con 12 y 4% de acrilamida respectivamente. Se corrieron las muestras con amortiguador sencillo y con β -mercaptoetanol, se corrió también un marcador de peso molecular (Rainbow Amersham). Para efecto de que las muestras se alinearan en el gel resolvidor, se

corrieron los primeros 20 minutos a 100 voltios (correspondiente al gel concentrador), y el resto de la corrida a 150 voltios.

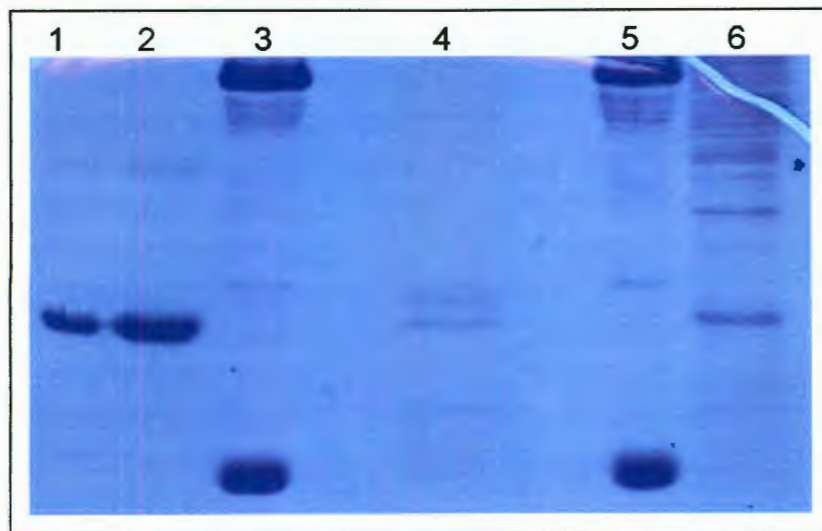


Figura 10. La figura muestra un gel de electroforesis de poliacrilamida, revelado con Azul de Coomassie. Carriles 1, BSA baja concentración; 2, BSA alta concentración; 3 y 5, Marcador alto peso molecular; 4, Marcador proteína BSA sin beta mercaptoetanol; 6, extracto de cerebro de rata.

Para la técnica de Western Blot, la efectividad del anticuerpo primario frente a distintas concentraciones de homogenado de cerebro de rata adulta se evaluó con la ayuda del slot-blot. Se bloqueó la membrana y colocaron las muestras de la siguiente manera: en las columnas del 1 al 12 las diluciones del homogenado de cerebro por duplicado: 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024, 1:4096. En las filas de la A a la H se colocaron las siguientes diluciones del anticuerpo contra gefirina, para las columnas A y B; 1:100, C y D; 1:200, E y F; 1:400 y G y H; 1:800. Se lavó 3 veces con TPBS y se colocó el segundo anticuerpo para su revelado posterior. La dilución 1:400 generó marca aceptable; se realizaron ensayos con dilución 1:500, los cuales también resultaron satisfactorios.

Con base en la cuantificación de proteínas por Bradford de los extractos de tejido, se determinó el volumen correspondiente a 50 μ g de proteína (Cuadro 2), de manera que la cantidad depositada en cada pozo de la electroforesis fue equivalente.

Cuadro 2. Volumen de carga para cada extracto de tejido.

EDAD	CONCENTRACIÓN ORIGINAL ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	VOLUMEN EN μL PARA 50 μg
E 18	17.14	2.9
P 0	16.35	3.1
P 5	12.38	4.0
P 11	10.79	4.6
Adulto	11.08	4.5

Después de la transferencia se obtuvo la membrana, se lavó 3 veces con TPBS, se bloqueó para evitar marca inespecífica, se enjuagó 3 veces más, se colocó el anticuerpo primario anti-gefirina en la dilución 1:500 durante toda la noche, enjuagándose 3 veces al término con TPBS, se agregó el anticuerpo secundario 1:200, lavándose 3 veces y se reveló. El revelado de la membrana se llevó a cabo con diaminobencidina (DAB) y por quimioluminiscencia (Figura 11).

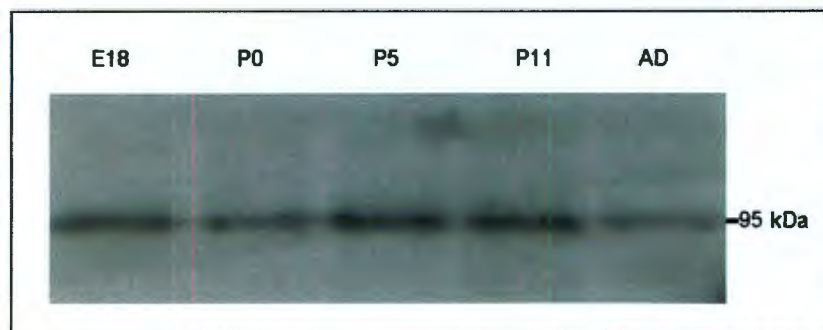


Figura 11. Luminograma de gefirina. Western Blot realizado a las proteínas de cerebro de rata, para separar e identificar a la proteína gefirina con anticuerpo policlonal, revelado por quimioluminiscencia. Se puede apreciar la presencia de una banda de proteína de aproximadamente 95 kDa, que corresponde al peso molecular de la gefirina. Embriones de 18 días (E18), recién nacidas (P0), postnatal 5 días (P5), 11 días postnatal (P11), y adulto (AD).

La separación de proteínas en el extracto de encéfalo de rata por electroforesis desnaturizante e identificación por Western Blot de la gefirina por anticuerpo específico resultó en una banda de 95 +/- 5 kDa en condiciones reductoras, presente en todas las edades estudiadas, pero con diferente proporción, siendo más alta en P5 y P11, seguida por E18, P0 y AD.

VI.3 Inmunohistoquímica

Se llevó a cabo la inmunohistoquímica de los cortes de cerebros de rata E18, P0, P5, P11 y AD. La tinción de los tejidos se realizó en 2 días procesando muestras de todas las edades con su respectivo control negativo en las mismas condiciones.

Como proceso previo, para elegir la dilución correcta del anticuerpo primario anti-gefirina en la técnica empleada, se cuantificó la marca inmunorreactiva obtenida en cortes de tejido adulto, con las siguientes diluciones: 1:50, 1:100 y 1:200 (Figura 12).

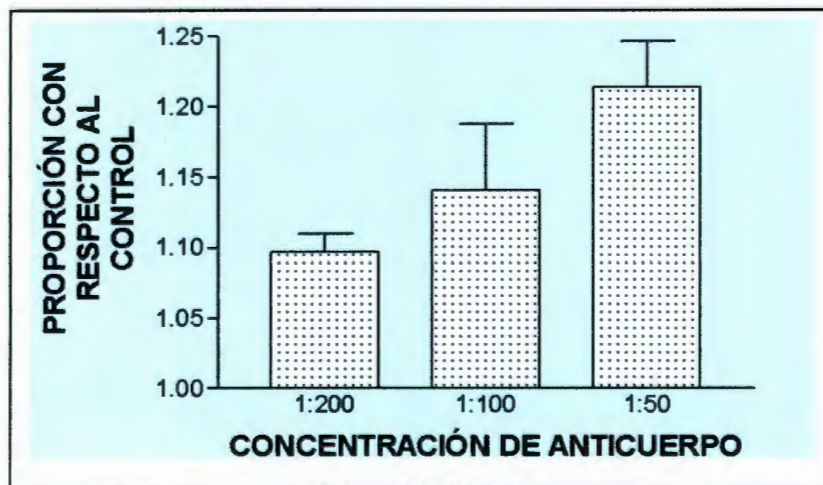


Figura 12. Titulación de la marca inmunorreactiva obtenida con anticuerpo primario anti-gefirina, para la metodología de inmunohistoquímica.

De manera semejante se tituló el anticuerpo secundario, en distintas concentraciones para corroborar que la marca inmunorreactiva obtenida fuera exclusiva del anticuerpo primario.

Las preparaciones se observaron al microscopio con cámara integrada en campo claro con objetivos de 2.5X y 40X (Figura 13).

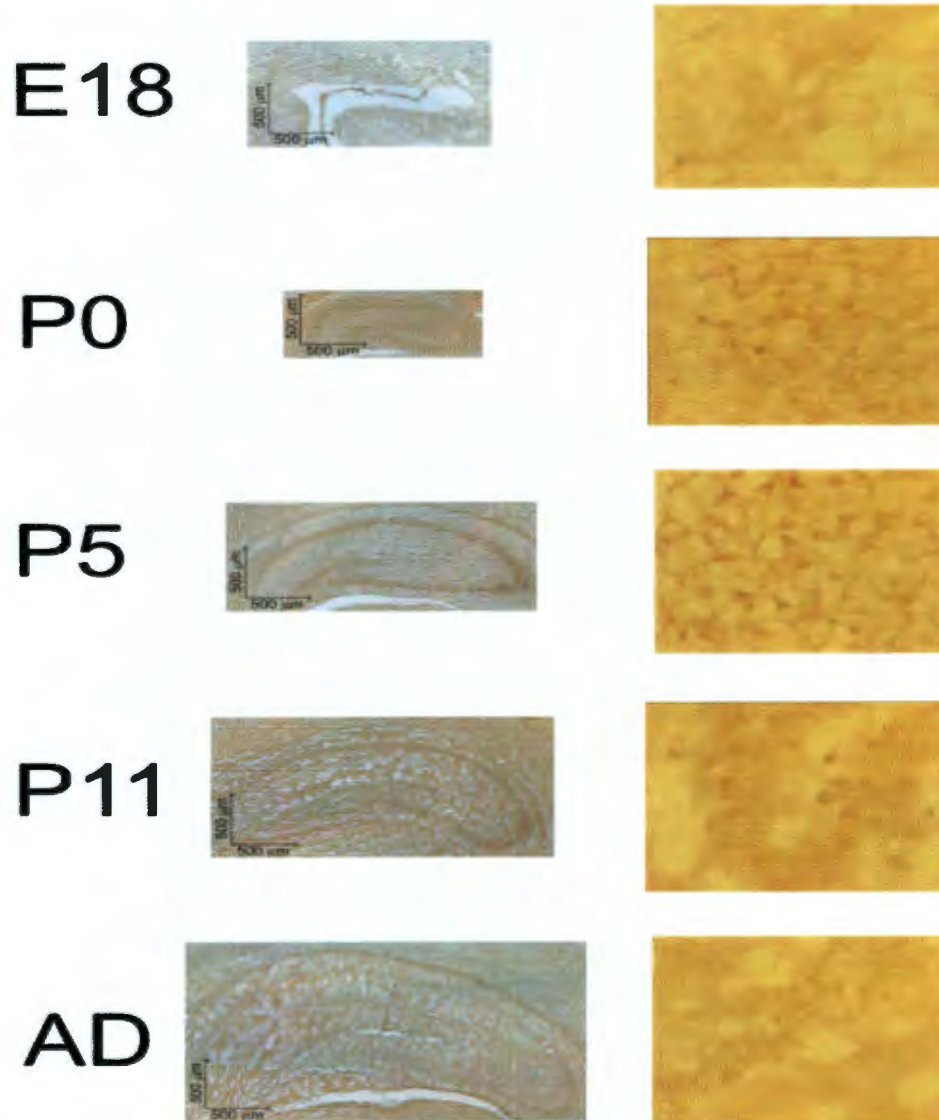


Figura 13. Inmunohistoquímica de cortes coronales de hipocampo de cerebro de rata de 5 edades diferentes: Embriones de 18 días (E18), recién nacidas (P0), postnatal 5 días (P5), 11 días postnatal (P11) y adulto (AD); a 2.5X del lado izquierdo de la figura. Barra de calibración 500 µm y su correspondiente imagen a 40X en la cual se puede observar la marca inmunorreactiva a detalle.

Se observa tinción en las neuronas piramidales de hipocampo, con diferente intensidad dependiendo de la edad analizada (Figura 14).

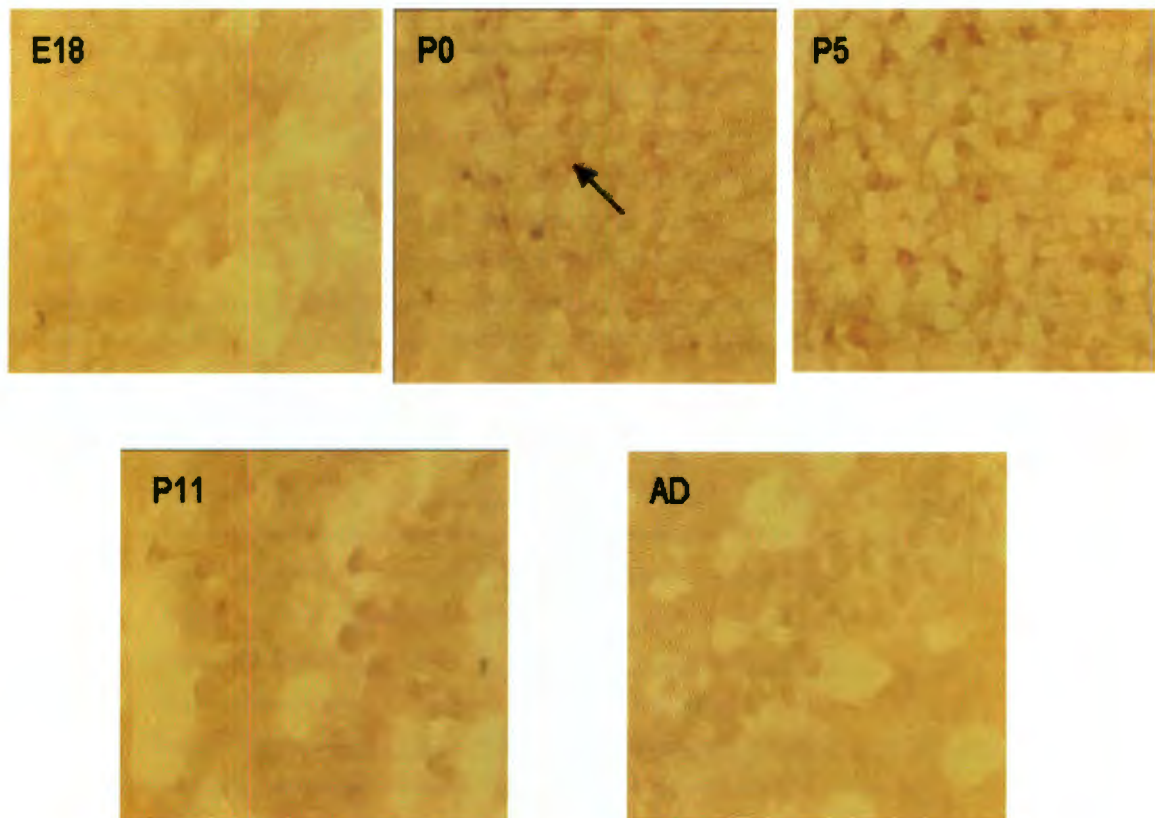


Figura 14. Se muestra la zona de hipocampo en cerebro de rata, amplificación 40 x de las secciones que presentan inmunorreactividad positiva a gefirina. Embriones de 18 días (E18), recién nacidas (P0), postnatal 5 días (P5), 11 días postnatal (P11) y adulto (AD). La marca inmunorreactiva se encuentra más definida en las células piramidales (flecha).

Se realizó la cuantificación densitométrica (Figura 15) de cortes teñidos de hipocampo de cerebro de rata de las distintas edades mediante el software KS300 de Zeiss, en las zonas CA1 y CA3, excepto en embriones de 18 días, ya que en esta edad el hipocampo no está bien diferenciado con lo cual los datos de la densitometría se expresaron en términos de CA1 únicamente; se realizó la cuantificación con 3 tomas consecutivas de cada zona.

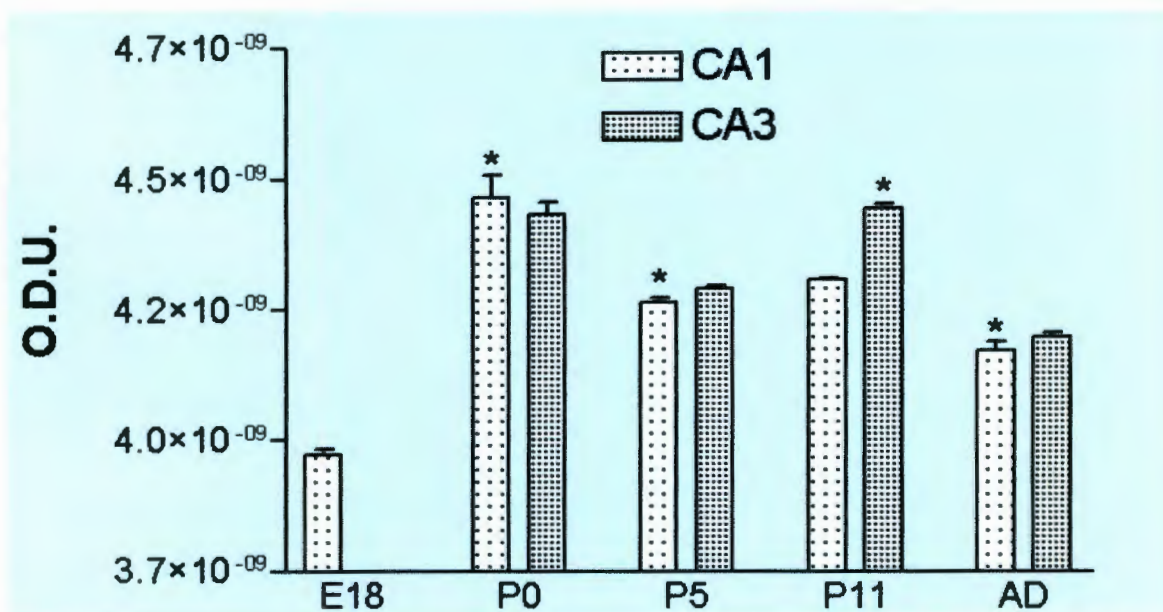


Figura 15. Cuantificación de gefirina por inmunohistoquímica en las distintas edades empleadas. O.D.U.: unidades de densidad óptica KS300. Embriones de 18 días (E18), recién nacidas (P0), postnatal 5 días (P5), 11 días postnatal (P11) y adulto (AD) en las zonas de hipocampo CA1 y CA3. Los asteriscos muestran diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a la columna precedente.

La inmunorreactividad en hipocampo según la edad resultó en orden decreciente P0, P11, P5, AD y E18. Existen diferencias en la marca del anticuerpo contra gefirina entre la zona de CA1 y CA3, presentando esta última, mayor inmunorreactividad excepto en P0 (excluyendo E18).

VII. DISCUSIÓN

Con el estudio de gefirina durante el desarrollo en homogenados de cerebro total por medio del Western Blot se exploró la distribución de la proteína durante la ontogenia encontrándose su presencia en todas las edades analizadas en proximidad con el método inmunohistoquímico realizado en cortes coronales de cerebro de rata en las zonas CA1 y CA3 de hipocampo.

Los resultados de este estudio indican una diferencia entre los dos métodos utilizados acerca de la presencia de gefirina; se encontró por medio de Western Blot la concentración más alta de gefirina en postnatal 5 (P5), siguiendo postnatal 11 y en menor proporción en embriones de 18 días, a diferencia del análisis por inmunohistoquímica, en donde la concentración más alta observada fue en ratas recién nacidas (P0) seguida de postnatal 11 y una marca inmunorreactiva menor para P5. Esto se debe primordialmente a que el estudio para el Western Blot fue llevado a cabo en cerebro total, y no es comparable directamente con la inmunohistoquímica que se realizó en cortes de hipocampo. La variabilidad de los dos métodos radica en que gefirina es expresada abundantemente en regiones del cerebro, no siendo exclusiva de la zona cerebral hipocámpica (Craig y col., 1996).

La distribución de gefirina aquí investigada es de importancia porque está fuertemente colocalizada con los receptores glicina y GABA_A en sitios postsinápticos (Lévi y col., 2004), y tiene un papel importante en el agrupamiento de ambos, receptores a Glicina (GIRs) y los subtipos del receptor GABA_A α 1, α 2 y γ 2 subcolocalizados en la membrana postsináptica (Waldvogel y col., 2003).

Respecto a lo encontrado para gefirina en hipocampo, en el cuerno ventral de médula espinal de rata, gefirina y receptor glicina forma puntos a lo largo del desarrollo en la membrana plasmática pero la cantidad de receptores no es equivalente a través del desarrollo (Colin y col., 1998), datos consistentes de la presencia no equivalente a lo largo de la ontogenia que se realizó en este estudio.

La presencia de gefirina a través de la ontogenia no muestra un incremento o decremento característico del nacimiento que fuera atribuible a un proceso de maduración neuronal en células de hipocampo dependiente de gefirina, como se había observado en otros estudios realizados en médula espinal de rata, en donde se observó un aumento dramático en gefirina entre E19 y P0, con un decremento subsecuente entre P0 y P10, mientras que el receptor glicina se vió incrementado constantemente durante el desarrollo siendo similares ambos el receptor a glicina y gefirina en etapa adulta, aunque la colocalización de gefirina y del receptor de glicina vista en sinapsis de médula espinal no es siempre observada en otras regiones del cerebro (Colin y col., 1998).

GABA es el transmisor inhibitorio predominante en el hipocampo, mientras que no se había evidenciado transmisión glicinérgica en hipocampo o en cultivos de hipocampo. Para valorar la posible asociación de gefirina con sinapsis no glicinérgicas, en cultivos de hipocampo se observó gefirina inmunoreactiva en todas las neuronas y en todas las etapas examinadas, desde 2 hasta 26 días en cultivo (Craig y col.,1996), lo que es consistente con nuestros resultados porque gefirina se encuentra expresada en todas las edades estudiadas.

Como lo menciona Craig y col. (1996), acorde con este estudio, probablemente los receptores de GABA y Glicina compartan significativamente secuencia homóloga y quizás cuando se ha encontrado a gefirina presente en axones y dendritas, se deba a que en esos sitios sea donde gefirina esta funcionando anclando alguna otra proteína de membrana para el citoesqueleto.

Para la hipótesis propuesta por Kirsch y Betz de que la gefirina forma puentes de unión entre los microtúbulos y receptores se puede pensar que esta proteína tenga un rol en la agrupación de los receptores en túneles dendríticos más fácilmente que en espinas, en las que faltan microtúbulos, y aún en túneles, la distancia entre la membrana plasmática y los microtúbulos es grande para ser puente una sola

molécula, aunque en evidencia reciente se encontró que la gefirina puede formar filamentos en fibroblastos quizás pudiendo llenar este espacio (Craig y col., 1996).

Respecto a la importancia del estudio de gefirina en hipocampo (Lévi y col., 2004) sorprendentemente se encontró que los receptores a glicina son selectivamente agrupados como en sinapsis gabaérgica en un subconjunto de neuronas de hipocampo y estos agrupamientos son dependientes de gefirina, siendo este el primer reporte indicando la agregación selectiva de los receptores de glicina en sinapsis gabaérgicas entre neuronas de hipocampo, se sugiere que la variabilidad en el grado de los agrupamientos del receptor a glicina entre las neuronas quizás puede resultar de diferentes expresiones de niveles de β , que es la subunidad que une gefirina.

Para finalizar, la exploración de la presencia de gefirina durante la ontogenia en hipocampo, como se observa no se puede relacionar directamente con la presencia de un neurotransmisor inhibitor solamente, pues sus funciones no se encuentran totalmente claras, además de que se han sugerido interacciones con otras rutas dentro de las funciones neuronales; por ello, el significado funcional del agrupamiento del receptor a glicina en sinapsis gabaérgicas en hipocampo no está claro actualmente (Lévi y col., 2004). Mientras que la cotransmisión usando ambos Glicina y GABA es común entre neuronas cerebrales y espinales, la transmisión inhibitoria rápida de hipocampo está completamente bloqueada por antagonistas selectivos del receptor GABA, al menos *in vitro*, por lo que el receptor Glicina localizado en sinapsis gabaérgica podría ser posicionado para maximizar, bajar o modular la transmisión sináptica.

En una estructura de sinapsis inhibitorias primordialmente dirigidas por GABA y sus receptores, como lo es hipocampo, encontramos no sólo la presencia de gefirina, sino también que su expresión varía durante la ontogenia y esta variación no es igual en distintas zonas del hipocampo, así como tampoco lo es con respecto del cerebro total. Este trabajo aporta información valiosa para la comprensión del

funcionamiento del Sistema Nervioso, particularmente de una estructura clave como lo es hipocampo. Aún queda por esclarecer si su presencia va más allá de la organización y estructuración en las sinapsis, y tiene mayor relevancia su participación en el metabolismo celular.

VIII. CONCLUSIONES

La gefirina se encuentra presente en la región de hipocampo de cerebro de rata, tanto en la zona CA1 como en la zona CA3.

La expresión de gefirina es diferencial en hipocampo de rata durante la ontogenia, y diferente a su vez en distintas zonas de hipocampo.

La expresión de gefirina en hipocampo es mayor en ratas recién nacidas y en ratas de 11 días de edad, que en ratas de 5 días de edad, ratas adultas o embriones de 18 días de gestación.

La expresión de gefirina en hipocampo es distinta de la expresión en cerebro total.

La expresión de gefirina en cerebro total es mayor en ratas de 5 y de 11 días de edad, que en embriones de 18 días de gestación, ratas recién nacidas o ratas adultas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. 3er. ed. Omega, España. 563, 584, 564, 572, 772, 773, 782, 783, 785.

Baer, K., Waldvogel, H.J., During, M.J., Snell, R.G., Faull, R.L., Rees, M.I. 2003. Association of gephyrin and glycine receptors in the human brainstem and spinal cord: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*. 122(3): 773-784.

Barret, J.M., Abramoff, P., Kumaran, A.K., Millington, W.F. 1986. *Biology*. 1er. ed., Prentice Hall, USA. 678, 707.

Bradford, M., 1976. *Anal. Biochem.* 72: 248.

Butler, M.H., Hayashi, A., Ohkoshi, N., Villman, C., Becker, C.M., Feng, G., De Camilli, P., Solimena, M., 2000. Autoimmunity to gephyrin in Stiff-Man syndrome. *Neuron*. 26: 307-312.

Colin, I., Rostaing, A., Augustin, A., Triller, A. 1998. Localization of components of Glycinergic Synapses During Rat Spinal Cord Development. *The journal of comparative neurology*. 398: 359-372.

Craig, A.M., Banker, G., Chang, W., McGrath, M.E., Serpinskaya, A.S. 1996. Clustering of Gephyrin at GABAergic but Not Glutamatergic Synapses in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 16(10): 3166-3177.

Djavadian, R.L. 2004. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 64: 189-200.

Ebert, J.D., Sussex, I. M. 1977. *Sistemas que interactúan en el desarrollo*. 1er. ed., Compañía Editorial Continental, S.A., México. 65, 66, 88.

Fuhrmann, J.C., Kins, S., Rostaing, P., Far, O.E., Kirsch, J., Sheng, M., Triller, A., Betz, H., Kneussel, M. 2002. Gephyrin interacts with dynein light chains 1 y 2, components of motor protein complexes. *The journal of neuroscience*. 22(13): 5393-5402.

- Ganong, W.F. 2002.** Fisiología Médica, 18a. ed. Manual Moderno, México. 57, 69, 70,100, 116, 117, 118, 119, 295.
- Geiman, E.J., Zheng,W., Fritschy, J.M., Alvarez, F.J. 2002.** Glycine and GABAA receptor subunits on Renshaw cells: relationship with presynaptic neurotransmitters and postsynaptic gephyrin clusters. *The journal of comparative neurology.* 444: 275-289.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. 1997.** Tratado de Fisiología Médica. 9a. ed., McGraw-Hill/interamericana, México. 820, 821.
- Hanus, C., Vannier, C., Triller, A. 2004.** Intracelular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *The journal of neurosciencie.* 24(5): 1119-1128.
- Kneussel, M., Betz, H., 2000.** Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *Journal of Physiology.* 525(1):3.
- Langman, J. 1981.** Embriología Médica, 4a. ed. Editorial Médica Panamericana, México. 47.
- Lévi, S., Logan, S.M., Tovar, K.R., Craig, A.M. 2004.** Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *The journal of Neuroscience.* 24 (1): 207-217.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2000.** *Molecular Cell Biology.* 4th ed., Freeman New York. 20: 18
- Mader, S. 2004.** *Human Biology.* 1a. ed., McGraw-Hill, México: 138.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G. 2002.** *Bioquímica.* 1a. ed., Addison Wesley/Pearson Educación, S.A. , España. 957.
- Meier, J., Grantyn, R. 2004.** A gephyrin-related mechanism restraining glycine receptor anchoring at GABAergic synapses. *The journal of neuroscience.* 24(6): 1398-1405.
- Paxinos, G., Watson, C. 1998.** *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 4a. ed., Academic Press. USA. 28.
- Prior, P., Schmitt, B., Grenningloh, G., Pribilla, I., Multhap, G., Beyreuther, K., Maulet, Y., Werner, P., Langosch, D., Kirsch, J. 1992.** Primary structure and

alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron*. 8(6): 1161-1170.

Tortora, G.J., Anagnostakos, N.P. 2000. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 6ta. ed., Oxford, México. 382, 383, 384, 386, 452, 484, 1175, 1176, A-50 .

Tresguerres, J.A.F. 1999. *Fisiología Humana*. 2ª. ed. McGraw-Hill/Interamericana, España: 37, 65, 192,

Villee, C.A. 1974. *Biología*. 6ta. ed., Interamericana, México. 547, 548, 566.

Waldvogel, H.J., Baer, K., Snell, R.G., During, M.J., Faull, R.L.M., Rees, M.I. 2003. Distribution of gephyrin in the human brain: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*. 116: 145-156.