

ISBN: 970-27-0770-6

BIOSENSORES PARA EL ANALISIS DE NEUROTRANSMISORES EN ANIMALES NEONATOS

López-Pérez Silvia Josefina, Morales-Villagrán Alberto; Ortega-Ibarra Jorge Manuel
Laboratorio de Neuroquímica y Neurofisiología, Depto. de Biología Celular y Molecular, C.U.C.B.A.

El Sistema Nervioso (SN) de los mamíferos funciona en buena medida gracias a la existencia de moléculas químicas que se liberan de una neurona y se reciben en otra. A estas moléculas les llamamos neurotransmisores. Existen complejos mecanismos fisiológicos que se encargan de producir a los neurotransmisores en las neuronas pre-sinápticas, y de liberarlos en el espacio intersináptico. De igual forma, otros mecanismos igualmente complejos se encargan de recoger estas moléculas químicas y traducir su mensaje en un efecto sobre la neurona post-sináptica. Estos neurotransmisores median en gran medida las respuestas normales de las neuronas, que a su vez construyen las respuestas típicas de los organismos ante los estímulos.

Los neurotransmisores pueden ser de naturaleza excitadora (cuando su efecto en la neurona post-sináptica es producir un potencial de acción); inhibitoria (cuando producen la inhibición de un potencial de acción) o reguladora (cuando su tarea es potenciar o disminuir el efecto excitador o inhibitor). En el Sistema Nervioso Central de mamíferos (SNCm), el ácido glutámico (GLU) es el neurotransmisor excitador por excelencia, mientras que el principal neurotransmisor inhibitor es el ácido γ -aminobutírico (GABA). Existen varios neurotransmisores reguladores: dopamina (DA), acetilcolina (ACh), Norepinefrina (NE), Serotonina (5-HT), etc.

Durante la función cerebral normal, los neurotransmisores se liberan al espacio extracelular en respuesta a un estímulo despolarizante, que alcanza la terminal axónica de la neurona pre-sináptica. La despolarización produce la apertura de canales de calcio (Ca^{2+}) que son sensibles al cambio en el voltaje de la membrana neuronal. El Ca^{2+} que penetra al citoplasma induce la liberación de neurotransmisores, que salen directamente al espacio intersináptico. Una vez ahí, las moléculas neurotransmisoras pueden hacer contacto con sus receptores post-sinápticos, pueden difundir mas allá del espacio intersináptico, pueden ser degradados por mecanismos enzimáticos diseñados para realizar esa actividad, o pueden ser recapturados hacia la neurona pre-sináptica (figura 1).

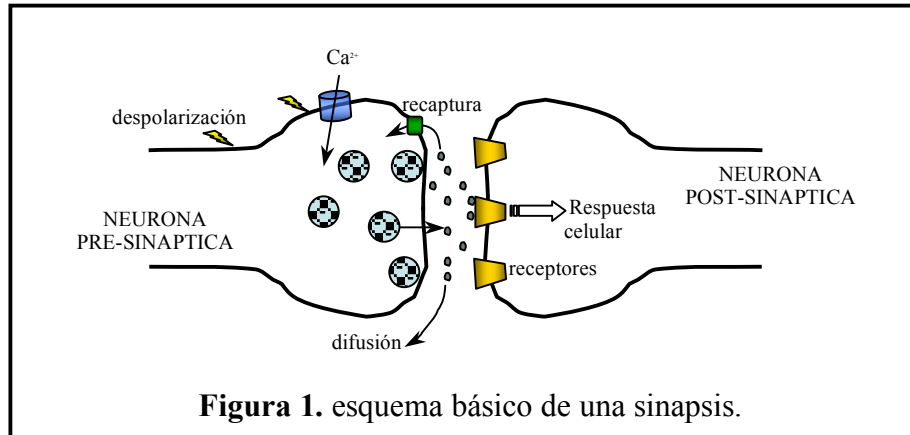


Figura 1. esquema básico de una sinapsis.

Así pues, es evidente que los neurotransmisores son esenciales para el funcionamiento normal del SN, aunque también se ven involucrados en la génesis de diversos padecimientos cerebrales, pues es común que las patologías que se originan en el SN se encuentren asociadas con alteraciones en las concentraciones cerebrales de algunos neurotransmisores.

El GLU tiene una función central dentro del SNCm, pues es una pieza clave en la generación y mantenimiento del potencial de acción, y es su liberación la que sostiene la activación de las redes neuronales que permiten funciones cerebrales tan complejas como el aprendizaje o la memoria. Sin embargo, la función del GLU es paradójica: por una parte es un motor que genera mucha de la actividad cerebral normal, pero por otra parte su presencia permanente en el espacio intersináptico puede ser letal: las neuronas no pueden permanecer bajo su influencia por periodos largos de tiempo, ya que la sobre-excitación glutamatérgica tiene la capacidad de producir daño y hasta la muerte de las células. Por esta razón, la evolución ha creado sistemas suficientemente eficientes para degradar o remover rápidamente el exceso de GLU del espacio intersináptico. Sin embargo, existen situaciones en las cuales la cantidad de moléculas de GLU es demasiado grande en un número importante de neuronas, de modo que los sistemas de degradación o remoción del GLU se ven rebasados, y entonces la sobre-excitación inducida por el neurotransmisor se traduce en respuestas neuronales patológicas, como la generación de un gran número de potenciales de acción que son mas frecuentes y poderosos que los normales. Cuando se registran las respuestas eléctricas de las neuronas, por medio de un electroencefalograma, esos potenciales anormales producidos por exceso de GLU generan un patrón epileptiforme.

Actualmente, la epilepsia se considera un síndrome de origen multifactorial, que puede presentar una variedad de manifestaciones clínicas. Puede presentarse en cualquier etapa de la vida, y en la mayoría de los casos no es posible conocer las causas. El cerebro de los recién nacidos es especialmente susceptible de generar esta patología, frecuentemente como causa de asfixia perinatal (1).

Dentro de la comunidad científica internacional existe un gran interés por explorar las causas básicas de generación de la actividad epileptiforme, lo que ha llevado a los investigadores a proponer metodologías cada vez mas finas para observar el comportamiento de los neurotransmisores en el cerebro, como respuesta a diferentes

agentes que pueden causar crisis epilépticas, esto por medio del uso de modelos animales de experimentación.

Una de las metodologías más utilizadas en los últimos años para cumplir este objetivo, es la microdiálisis intracerebral, que consiste básicamente en insertar una membrana porosa en alguna región del SNC. La membrana está en la punta de un sistema que permite el flujo constante de una solución semejante al líquido que baña el cerebro (líquido ceforraquídeo artificial; LCA) esta solución se mueve solo en el interior de la membrana, es decir, no se queda en el cerebro. Cuando las neuronas liberan cualquier molécula diferente de las presentes en el líquido ceforraquídeo, y si esta es lo suficientemente pequeña para penetrar por los poros de la membrana, entonces la molécula se diluye en el LCA que fluye por el interior de la membrana, y es captada en un microtubo colocado en la salida de la cánula de microdiálisis (figura 2); el tubo de colecta se cambia cada cierto tiempo. Posteriormente, las muestras se inyectan en un sistema cromatográfico de alta presión, donde las moléculas disueltas en las fracciones (tubos) recogidas se envían a un sistema electroquímico de detección que oxida el compuesto sobre un disco de grafito, que se denomina electrodo de trabajo. El electrodo de trabajo está acompañado de un electrodo de referencia cuyo potencial es fijo, y un electrodo auxiliar. Estos tres electrodos juntos constituyen la celda electroquímica.

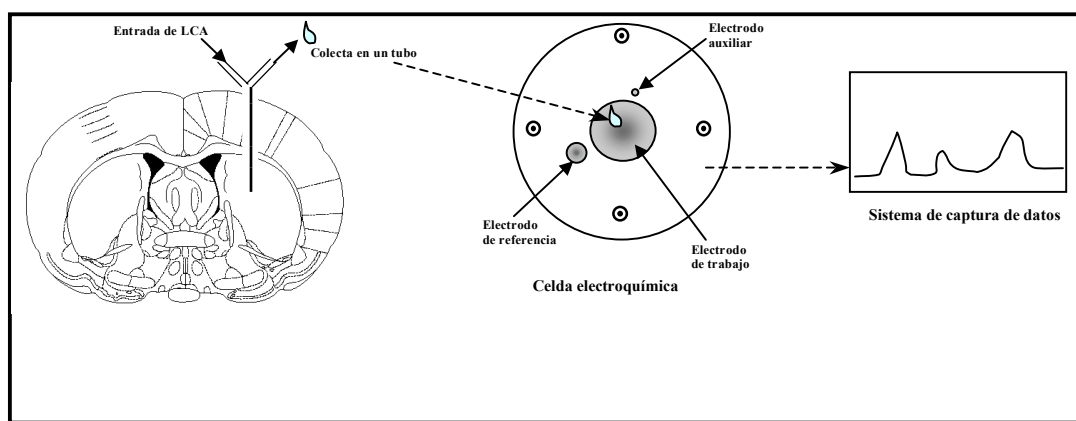


Figura 2. las muestras que se obtienen de la sonda de microdiálisis pasan a la celda electroquímica, y su oxidación sobre el electrodo de trabajo genera una gráfica de picos, cuya área es proporcional a la concentración del analito.

La oxidación del compuesto produce una corriente de electrones que se visualizan como un cambio en el potencial basal del electrodo de trabajo. Esto genera una gráfica donde se observa el cambio de potencial vs el tiempo. La magnitud del cambio es proporcional a la corriente generada por la oxidación del compuesto de interés, que a su vez es proporcional a la cantidad del compuesto que logró pasar a través de la membrana. A pesar de la valiosa información que puede obtenerse con la microdiálisis intracerebral, tiene la limitante de que es necesario obtener fracciones de varios minutos, para que la cantidad de muestra (generalmente unos cuantos microlitos) sea adecuada para cuantificar en el sistema cromatográfico. Si tomamos en cuenta que los neurotransmisores se liberan, realizan su función y se degradan en una fracción de segundos (generalmente unos cuantos milisegundos), entonces obtener muestras de varios minutos significa que se tendrá el

resultado de varios eventos de liberación de neurotransmisor, que sumados darán un resultado que no permitirá visualizar si durante el tiempo de muestreo hubo uno o varios eventos de liberación, ni la magnitud verdadera de estos.

Con el propósito de solventar estos problemas metodológicos, se comenzaron a diseñar los primeros biosensores recubiertos de enzimas, para analizar los movimientos de neurotransmisores en tiempo real: la idea básica es introducir los componentes de la celda electroquímica directamente en el tejido nervioso, de forma que los neurotransmisores sean degradados por enzimas específicas *in situ*, generando productos electroactivos directamente en el lugar y en el momento en que el neurotransmisor se libera. Para lograr esto, en el laboratorio de neuroquímica y neurofisiología del CUCBA hemos adoptado el diseño de Yibai Hu y cols. (2), que sirve para cuantificar la liberación de GLU.

El consiste en un alambre a base de platino cubierto por una matriz hecha de nafion y acetato de celulosa, que tiene adsorbida la enzima glutamato oxidasa, que, en presencia de O_2 , convierte al GLU en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido α -cetoglutárico. El H_2O_2 así producido, y que es proporcional a la cantidad de GLU presente, reacciona con el platino, y la señal generada se envía al sistema de captura y análisis de datos. Además de la glutamato oxidasa, es necesaria la presencia de la enzima oxidasa de ácido ascórbico, pues las grandes cantidades de este compuesto que normalmente se encuentran en el tejido nervioso podrían interferir en la cuantificación del GLU (figura 3a).

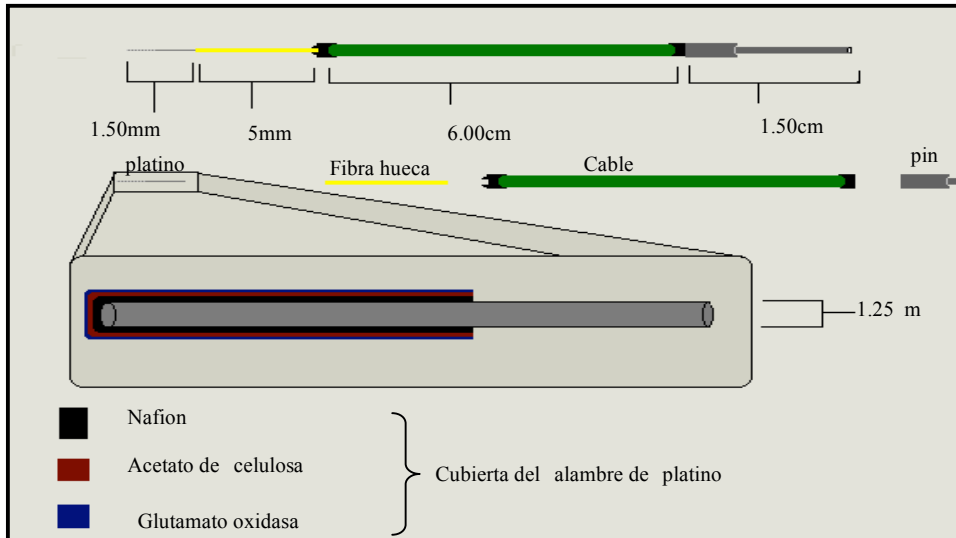


Figura 3^a. esquema de un biosensor. La cubierta del alambre de platino proporciona la especificidad.

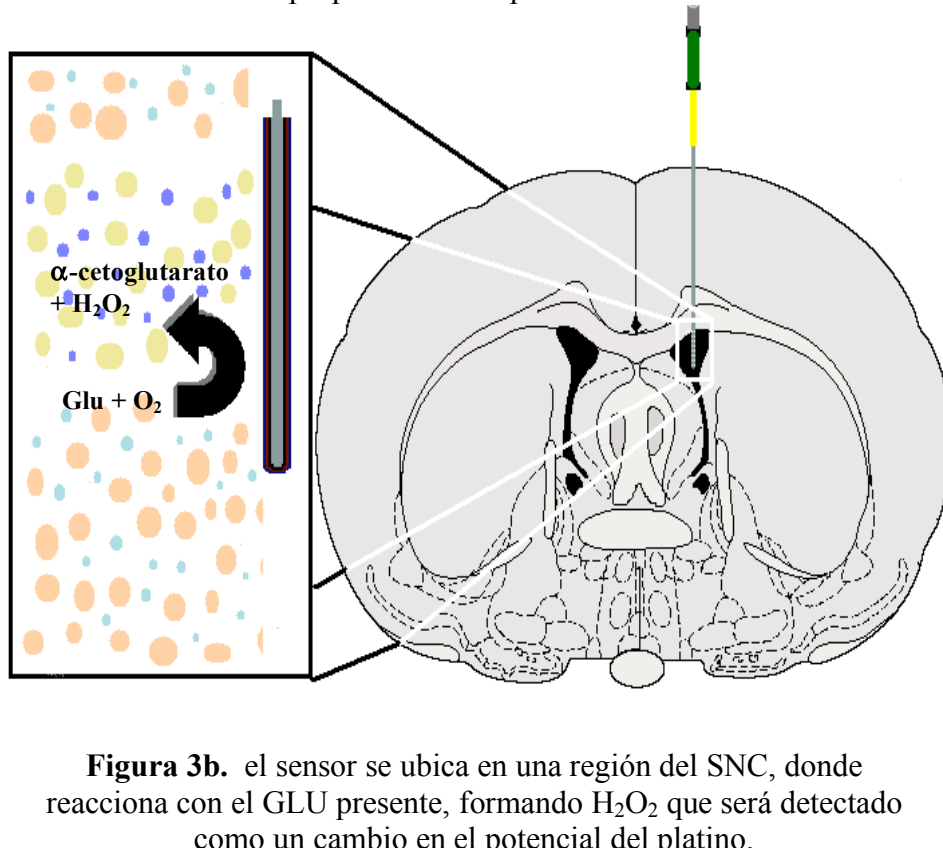
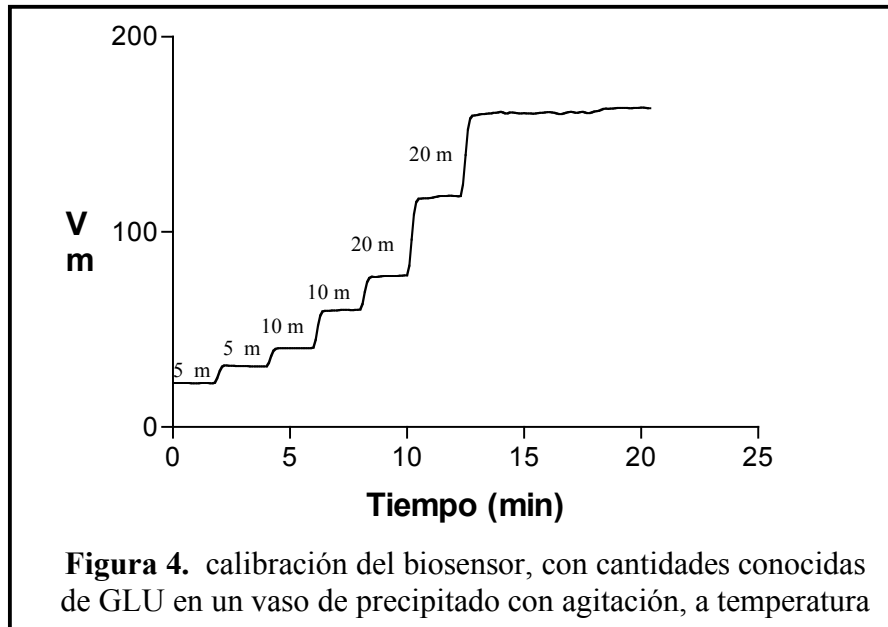


Figura 3b. el sensor se ubica en una región del SNC, donde reacciona con el GLU presente, formando H_2O_2 que será detectado como un cambio en el potencial del platino.

En este diseño, el alambre de platino funciona como el electrodo de trabajo, un alambre de plata ubicado en la cercanía funciona como el electrodo de referencia, y un alambre de acero inoxidable ubicado en la superficie del cráneo funciona como electrodo auxiliar. Todos estos alambres se colocan en el tejido nervioso del animal bajo cirugía

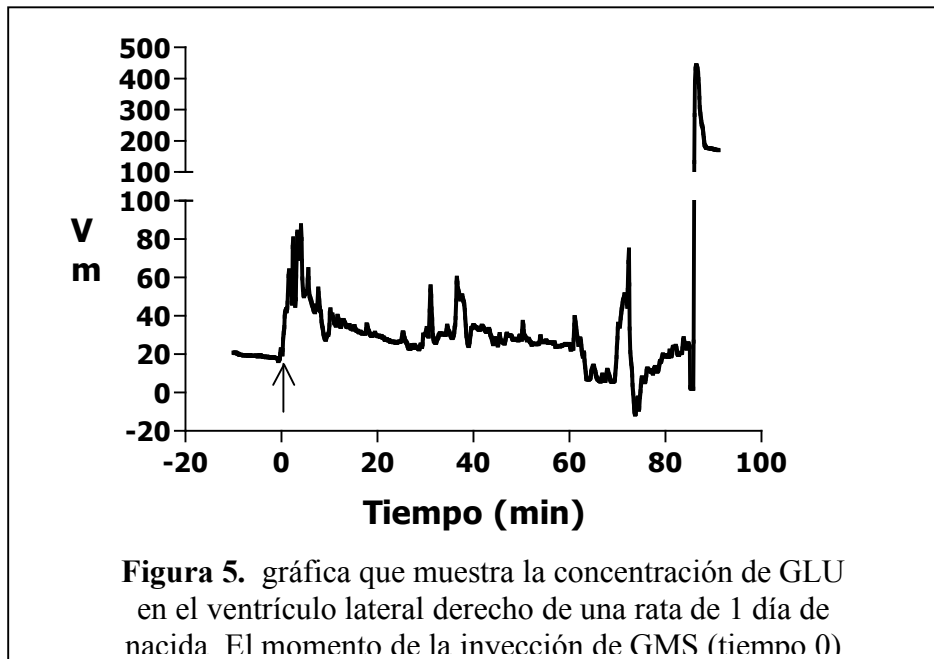
estereotáxica, que permite localizar un punto determinado del cerebro en un sistema de tres coordenadas (figura 3b).

Antes de insertar el biosensor en el cerebro, se realiza una calibración colocándolo el biosensor en un recipiente con un amortiguador de fosfatos, en donde se diluyen cantidades conocidas de GLU, que se cuantifican a través del biosensor (figura 4a).



Nuestro grupo de trabajo utiliza estos biosensores para monitorear los cambios de GLU en el cerebro de animales en la etapa neonatal. En la primera fase, hemos utilizado un modelo de inyección subcutánea de una solución de GLU en forma de sal monosódica (glutamato monosódico, GMS) en ratas wistar machos implantados con biosensores ubicados en el ventrículo lateral. Esto nos ha permitido observar que, a los pocos minutos de la inyección de GMS, los niveles intracerebrales de GLU aumentan considerablemente en el ventrículo. Posteriormente, los niveles de GLU se mantienen elevados con respecto a la basal previa a la inyección, por las siguientes 2 horas (figura 5).

La observación del comportamiento del animal nos muestra que a partir del primer aumento en el nivel de GLU, hay manifestaciones conductuales de tipo epileptiforme, que consisten en la extensión de las extremidades delanteras, contracción de la cola entre las patas traseras, pérdida del equilibrio, apertura-cierre de la boca, movimiento ondulatorio del cuerpo, golpeteo de la cabeza y presencia de orina. Después de dos horas, los animales se sacrifican por asfixia, momento en el que el biosensor detecta una acumulación importante de GLU, que después de la muerte del animal alcanza una meseta en la gráfica (figura 5).



Gracias al apoyo del Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), en nuestro laboratorio iniciaremos un proyecto de investigación donde utilizaremos los biosensores para observar los cambios en los niveles de varios neurotransmisores en animales neonatos que sufrirán asfixia perinatal, como una manera de abordar el estudio de las alteraciones bioquímicas que conducen al desarrollo de crisis epileptiformes en los recién nacidos, que pueden causar epilepsia perdurable y de difícil tratamiento. El camino en este proyecto debe llevarnos a la propuesta de alternativas terapéuticas que permitan abordar el problema de la epilepsia desde el punto de vista de los mecanismos básicos de generación de las crisis.

Referencias

- 1.- Volpe J. (2001). Neonatal Seizures. In: Neurology of the Newborn (Volpe J. Ed.), WB Saunders, Philadelphia, pp. 217-276.
- 2.- Hu Y.; Mitchell K.; Albahadily F.; Michaelis E.; Wilson G. (1994). Direct measurement of glutamate release in the brain using a dual enzyme-based electrochemical sensor. Brain Research 659:117-125.