
2003A-2007A

396398743

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



BIOSENSORES INTERNOS PARA LA ESTIMACIÓN DE ACETILCOLINA

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE:
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

JORGE MANUEL ORTEGA IBARRA

Las Agujas, Zapopan, Jal. Diciembre de 2008



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1287/ C. C.BIOLOGÍA

C. Jorge Manuel Ortega Ibarra

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes**, opción **Tesis**: con el título: **“Biosensores Internos para la Cuantificación de Acetilcolina”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director el/la **Dra. Silvia Josefina López Pérez** y como asesor el/la **Dr. Alberto Morales Villagrán**.

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
Las Agujas, Zapopan., 30 de enero de 2008.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

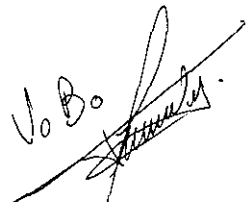
A.A.
M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de Tesis e informe, opción tesis con el título: "Biosensores Internos para la Estimación de Acetilcolina" que realizó el pasante Jorge Manuel Ortega Ibarra con número de código 396398743, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las agujas, Zapopan; Noviembre/24/2008



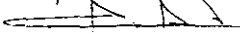

Vo Bo



 Firma

Dra. Silvia Josefina López Pérez
 Directora del trabajo,


 Firma

Dr. Alberto Morales Villagrán
 Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Martha Catalina Rivera Cervantes		24/Nov/2008.
Dr. Jacinto Bañuelos Pineda		24/Nov/2008
Dr. Jorge Juárez Gonzáles		27/Nov/2008
Supl. M.C. Luis Alfredo Burgos Rivas		31/12/2008

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Neuroquímica y Neurofisiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Silvia Josefina López Pérez y la asesoría del Dr. Alberto Morales Villagrán, con financiamiento parcial del PROMEP (EXB-086)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Silvia Josefina López a quien expreso mi más sincero agradecimiento, además por contar con su amistad y guía. Pues me ayudó mucho no solo en la tesis, si no en prepararme como estudiante y finalmente como biólogo.

Asimismo expreso mi agradecimiento al Dr. Alberto Morales Villagrán, por su inestimable colaboración y sus acertadas observaciones, en las calibraciones de los biosensores y su ayuda en todos los detalles electroquímicos de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por su colaboraciones, apoyo, compañía y ayuda. Gracias a Veronica Palomera, Cuauhtémoc Sandoval, Flavio García, Raúl Beltrán, y Elith Valencia Villalvazo.

De manera especial agradezco a Wendy Juárez por su amor y compañía.

A quienes me dedicaron su amor, cariño y me trajeron a este mundo

Mis padres

Carlos Ortega y Martha Ibarra

Resumen

El desarrollo de métodos para determinaciones rápidas y sensibles de neurotransmisores provee una información invaluable sobre su dinámica en el Sistema Nervioso (SN). Uno de los neurotransmisores de interés es la acetilcolina (ACh), debido a su participación en el control de la temperatura y presión de la sangre, la coordinación motora, el aprendizaje y la memoria, y se asocia con algunas enfermedades, como Alzheimer y Parkinson. La metodología clásica para la determinación de ACh es la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), que sin embargo presenta falta de correlación temporal entre el evento de liberación del neurotransmisor y el tiempo de colecta de cada muestra, por lo que cada fracción representa la suma de todos los eventos de liberación verificados en un tiempo determinado (generalmente, varios minutos). Para solventar esto, se han desarrollado herramientas más precisas, como los biosensores electroquímicos basados en la detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se utilizan para estimar la concentración de analitos específicos con un grado notable de precisión y en escalas de tiempo cercanas a la fisiológica, con las ventajas de que ofrecen una detección continua en un periodo de tiempo determinado, su costo es bajo, y se pueden construir con materiales de fácil acceso. En este trabajo se presenta el diseño y valoración de un biosensor electroquímico, que incluye las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y colina oxidasa (ChOx), que generan H_2O_2 proporcionalmente a la cantidad de ACh presente en el medio. Los resultados *in vitro* mostraron linealidad y sensibilidad en un rango de concentraciones de ACh adecuado para su estimación en el SN, además de un alto nivel de especificidad por el neurotransmisor. Las pruebas *in vivo* permitieron observar incrementos en el nivel extracelular de ACh cuando se estimuló la liberación inespecífica de neurotransmisores en el cerebro de los animales de experimentación. A pesar de que el diseño del biosensor que se presenta en este trabajo aún plantea problemáticas no resueltas del todo, representa una herramienta para discriminar diferentes cantidades de ACh en el medio, con una buena resolución temporal y de una forma más sencilla que la HPLC, además de que sus dimensiones reducidas facilitan su manejo y disminuyen el daño en el tejido donde se inserta. Por lo anterior, este diseño podría constituir una alternativa de interés para el estudio de la dinámica cerebral de la ACh, en situaciones normales y patológicas de interés.

ABREVIATURAS

SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
Na	Sodio
K	Potasio
mV	Mini Volts
GABA	Ácido γ -aminobutírico
AMP	Monofosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
Ach	Acetilcolina
Ch	Colina
CAT	Colina acetiltransferasa
AchE	Acetilcolinesterasa
nAChR	Receptor de Acetilcolina tipo nicotínico
ChOx	Colina oxidasa
PI	Fosfato de inositol
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
SRB	Sistema de reconocimiento biológico
4-AP	4-aminopiridina
Glu	Glutamato
Aa	Ácido aspártico
AOx	Ascorbato oxidasa
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada

INDICE

Introducción	2
Antecedentes	8
Biosensores electroquímicos	11
Características de la celda electroquímica	12
4-aminopiridina	13
Planteamiento del problema	16
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
Materiales y método	19
Preparación del biosensor	19
Calibración de la celda electroquímica	20
Experimentos <i>in vivo</i>	21
Resultados	23
Construcción del biosensor	23
Evaluación de biosensores <i>in vitro</i>	23
Resultados <i>in vivo</i>	28
Discusión	32
Conclusiones	37
Referencias	38

INTRODUCCION

La capacidad de un organismo de sobrevivir y mantener la homeostasis depende en gran medida de su capacidad de respuesta a estímulos externos, tales como temperatura, humedad o presencia de depredadores, así como a estímulos internos, como hambre, presión y temperatura interna. En todos los animales, excepto el filum porifera, la respuesta a estímulos depende en gran medida del sistema nervioso (SN), que recibe la información, la integra y emite una respuesta. En vertebrados en general, el SN se divide en: 1) sistema nervioso central (SNC), formado por el encéfalo y la médula espinal, estructuras que representan el nivel de integración en el organismo; y 2) sistema nervioso periférico (SNP), constituido por los nervios craneales y espinales. El SN se compone de dos tipos celulares principales: las neuronas o células nerviosas, y las células gliales o neuroglia. La neurona se considera la unidad funcional del SN, ya que está especializada en recibir información, transmitir impulsos eléctricos y generar respuestas que influyen en otras células (Noback y col. 2005).

Las células gliales son morfológicamente y fisiológicamente distintas de las neuronas. En general, ellas se destinan al mantenimiento de las neuronas: protección y soporte. Se conocen como células gliales a los astrocitos (que sostienen y mantienen la estructura parenquimatosas, intercambian metabolitos con las células nerviosas, intervienen en la conformación de la barrera hematoencefálica y participan de manera activa en los procesos de reparación del tejido), los oligodendrocitos y las células de Schwann, (producen y

mantiene la mielina que recubre a los axones de las células nerviosas dentro del SNC y del SNP, respectivamente) (Guenard y col. 1994).

Una de las principales características del SN es su capacidad de respuesta, que pone de manifiesto la complejidad de la función nerviosa, y que depende en su mayoría de las neuronas. Todas las neuronas utilizan señales eléctricas basadas en cambios en la diferencia de concentración de iones entre el espacio extra e intracelular, principalmente de sodio (Na^+) y potasio (K^+), que producen un potencial eléctrico a través de la membrana de las neuronas. Cuando las concentraciones de Na^+ y K^+ están en equilibrio, se considera que el potencial de membrana está en reposo (Zigmond y col. 2004; Lamas, 2005). La integración de las señales externas, determinan un cambio en el potencial transmembranal que podría producir la apertura inicial de los canales de Na^+ sensibles al voltaje presentes en la membrana (despolarización); cuando el voltaje llega a un cierto valor (aproximado a +40 mV), se induce la apertura de canales de K^+ sensibles al voltaje, cuyo efecto es la repolarización de la membrana. La ocurrencia secuencial de estos eventos se le denomina potencial de acción. (Haines, 2003; Kandel y col. 2001).

Cuando se genera el potencial de acción este se propaga a lo largo del axón, hasta llegar a una región específica, llamada sinapsis, donde se establece la comunicación inter-neuronal. Existen dos tipos de sinapsis:

- Eléctrica: donde la señalización depende de corrientes iónicas que cruzan de una neurona a otra a través de uniones comunicantes, modificando el potencial de reposo de la neurona post-sináptica.

- Química: donde el impulso nervioso induce la liberación de moléculas neuroactivas denominadas neurotransmisores, que se liberan al espacio intersináptico, desde la terminal presináptica, uniéndose a receptores específicos para cada neurotransmisor en la terminal post-sináptica, modificando así el potencial de reposo de la neurona post-sináptica (Kandel y col., 2001), produciendo una respuesta despolarizante o hiperpolarizante. En la hendidura sináptica el exceso de neurotransmisor se inactiva por medio de enzimas o transportadores (Haines, 2003). La transmisión química en la sinapsis se divide en cuatro etapas: 1) síntesis de sustancia transmisora, 2) almacenamiento y liberación del transmisor, 3) interacción del transmisor con un receptor en la membrana post sináptica, y 4) eliminación del transmisor de la hendidura sináptica (Kandel y col, 2001).

Los neurotransmisores pueden agruparse según la familia bioquímica a la que pertenecen, en:

1) Aminas biogénicas: catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina) e indolaminas (serotonina), que en el SNC modulan funciones como la estabilidad emocional, la memoria, el humor, el apetito y el sueño, y en el SNP intervienen en la termorregulación, el control del flujo sanguíneo y los mecanismos del dolor, entre otros (Grace, 1998).

2) Aminoácidos: GABA (ácido γ -aminobutírico), glutamato, N-acetil-aspartato y glicina. El GABA y la glicina son aminoácidos que tiene un efecto post-sináptico predominantemente inhibitor; el glutamato y el aspartato son predominantemente excitadores.

3). Purinas: AMP (monofosfato de adenosina), ADP (difosfato de adenosina) y ATP (trifosfato de adenosina). Los efectos del ATP se han relacionado con la nocicepción, en particular, su acción sobre la activación de receptores P2X. Es importante recordar que grandes cantidades de ATP pueden liberarse desde el espacio intracelular como resultado de una lesión. Las purinas actúan como mediadoras de la muerte neuronal, debido a que ocasiona inflamación celular (Flores y col. 2006).

4) Neuropeptidos: Intervienen en la modulación del ritmo circadiano (Chen y Van den Pol, 1996), además la vasopresina y el factor liberador de corticotropina participan en la neurobiología de la depresión y en los trastornos de ansiedad, a través de sus interacciones funcionales, antagónicas o sinérgicas, con moléculas semejantes, y mediante la modulación de los sistemas clásicos de neurotransmisión (Pinto, 2004)

5) Acetilcolina (Ach): al igual que su metabolito colina (Ch), que también tiene funciones de neurotransmisor (Alkondon y col. 1997), participan en diversas funciones en el SNC, como son la memoria y el aprendizaje (Jerusalinsky y col. 1997), así como en el desarrollo y mantenimiento de adicciones (Jennifer y col. 2008), además de que el déficit de Acetilcolina ha sido considerado como un factor importante relacionado con la enfermedad de Alzheimer (Patricio, 2005).

La Ach es un compuesto que fue identificado por primera vez en 1914 por Henry Hallett Dale y después confirmada como neurotransmisor por Otto Loewi. La Ach se forma a partir de acetato y colina en los botones sinápticos, por acción de la enzima colina acetiltransferasa (CAT) (Gotti y col., 1997). Una vez sintetizada, la Ach se transporta al interior de las vesículas sinápticas para posteriormente liberarse por exocitosis (Südhof, 1995). La Ach liberada al

espacio sináptico actúa sobre sus receptores, que pueden ser nicotínicos o muscarínicos, o puede ser hidrolizada por la acción de la acetilcolinesterasa (AChE). La acción post-sináptica dependerá del tipo de receptor estimulado (Tohyama y Takatsuji, 1998)

Los receptores de Ach tipo nicotínicos (nAChR) en los vertebrados son miembros de una superfamilia de canales ionotrópicos operados por ligando, que producen una respuesta celular inmediata y que tienen como principal agonista al alcaloide del tabaco nicotina (Lukas y col. 1999). Existen evidencias de diversos tipos de receptores Ach nicotínicos (nAChR) que están presentes en el SNP, SNC y en otros tipos de tejidos; en células, como: los linfocitos, fibroblastos, células neuroendocrinas pulmonares, espermatozoides, granulocitos y placenta, así como también en la mayor parte de los órganos sensoriales. En la unión neuromuscular, los nAChR están constituidos por cinco subunidades: dos α 1, una β 1, una γ y una δ . Cada una de estas subunidades son familias compuestas por varias proteínas con alto nivel de similitud; así, de las subunidades tipo α se han clonado nueve tipos diferentes (α 1- α 9), de las β cuatro (β 1-4), y una respectivamente de las γ , δ y (Flores y Segura, 2005 y Vásquez y Bonilla, 2004). Los receptores nicotínicos presentes en el cerebro, son más sencillos que los de la unión neuromuscular, y están constituidos solamente por subunidades α y β , con siete variantes de la subunidad del tipo α y tres de la β , que pueden formar múltiples combinaciones (Flores y segura, 2005).

Los receptores muscarínicos son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. De acuerdo al análisis de sus secuencias nucleotídicas, han sido identificados cinco tipos de genes, los cuales se

acoplan preferencialmente a la inhibición de la adenilciclasa (subtipos m2 y m4) o a la producción de fosfatidil inositol (PI) (subtipos m1, m3 y m5) (Hume 1990). Las evidencias farmacológicas sugieren la existencia de cuatro subtipos de receptores muscarínicos (M1-M4) sobre la base de los perfiles de afinidad de los antagonistas selectivos. La identificación de los receptores denominados M1, M2 y M4 se basó principalmente en estudios realizados con atropina y pirenzepina (Malcom y col. 1998), por su parte, los M3 han sido identificados mediante la utilización de compuestos marcados con tritio (Felder, 1995)

En el SNP, gran parte de los receptores muscarínicos participan en el proceso de contracción muscular, la secreción glandular y la modulación de la tasa y esfuerzo cardiaco; en el SNC existen evidencias de que estos receptores participan en la regulación de la temperatura, la regulación cardiovascular y la memoria. El interés en establecer la clasificación de los receptores muscarínicos radica en la gran cantidad de funciones y en su amplia localización, así como en su alto potencial terapéutico en investigaciones relacionadas con la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, asma, desordenes en la motilidad intestinal, músculo cardiaco y funciones de la vejiga. (Malcom y col. 1998).

ANTECEDENTES

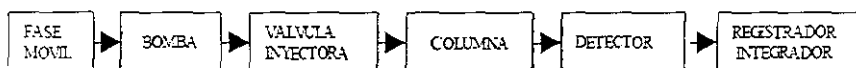
En varias de las investigaciones actuales que se realizan en el área de las neurociencias, se estudia el comportamiento de los neurotransmisores tanto en el SNP y SNC, ya sea para comprender su funcionamiento o para explicar su participación en eventos patológicos como pueden ser la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, etc. Para lograr este tipo de conocimientos es importante contar con herramientas precisas para analizar la dinámica de cada uno de los neurotransmisores. Una de las herramientas que se encuentra en desarrollo, y que tiene cada vez mas aceptación en una variedad creciente de áreas de investigación científica, son los biosensores, que se utilizan como herramientas para estimar la concentración de analitos específicos con una grado notable de precisión y en escalas de tiempo cercanas a la fisiológica (Wilson y col, 2005). A la fecha, existen algunos trabajos donde se han utilizado biosensores para estimar las concentraciones de ciertos compuestos en el SNC, como glucosa (Cheng 2003) y ácido glutámico (Hu y col, 1994), principalmente, con la ventaja de que ofrecen una detección continua en un periodo de tiempo determinado, además de que su costo es bajo, y se pueden construir con materiales simples y de fácil acceso. Estas ventajas dan pie a buscar aplicar una metodología semejante para cuantificar otro tipo de moléculas de interés biológico en el cerebro, en este caso el neurotransmisor Acetilcolina.

Tradicionalmente, la cuantificación de los niveles de Ach en el espacio extracelular del cerebro se realiza mediante la metodología de micro diálisis, combinada con cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Mizuno y col.

1991, Day y col. 1991, Mizoguchi y col. 2001). Bajo este esquema, se implanta en una región cerebral determinada una sonda de diálisis, con la cual se recogen los analitos de interés en el interior de la membrana de diálisis, mediante intercambio con una solución que carece de ellos. La colecta se divide en fracciones que posteriormente se inyectan en un sistema de HPLC.

La cromatografía es un método físico de separación y lectura basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. Además se constituye de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos, y que regularmente se encuentra empaquetada dentro de una columna cilíndrica de longitud variable. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, en la cromatografía se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos para eluir los compuestos de la fase estacionaria. Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también muy numerosas, y para eluir las moléculas es necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede sustituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente. Los compuestos que se eluyen de la columna pasan a un sistema detector, de naturaleza variable. Un equipo para HPLC con detección electroquímica puede representarse por el siguiente esquema:

BIBLIOTECA CUCBA



La válvula inyectora representa la vía de inyección de las muestras, que son arrastradas por la fase móvil a través de la columna que contiene la fase estacionaria, hacia el detector electroquímico, donde el analito se oxida en una celda electroquímica a un potencial determinado, produciendo elementos electro activos y señales eléctricas proporcionales a la cantidad de analito en la muestra. Las señales eléctricas se envían al sistema de registro/integración, que a su vez genera una gráfica de voltaje vs tiempo.

Si bien la técnica de HPLC es de uso general en laboratorios especializados, presenta algunas desventajas, como la falta de correlación temporal entre el evento de liberación del neurotransmisor de interés y el tiempo de colecta de cada muestra, que en la mayoría de los casos es de varios minutos, por lo que se obtiene la suma de todos los eventos de liberación en ese tiempo. Además, un experimento típico de micro diálisis intracerebral dura cuando menos 2 horas, tiempo en el cual se obtiene un número considerable de muestras, mismas que requieren hasta 30 minutos para obtener el cromatograma de cada una de ellas, por lo que el tiempo invertido para cuantificar las muestras de un solo experimento se convierte también en una gran desventaja asociada a esta metodología.

En el caso específico de Ach, ésta no genera directamente elementos electro activos que puedan ser analizados mediante su oxidación en la celda electroquímica de un equipo convencional de HPLC, por lo que es necesario el uso de un reactor enzimático que se acopla a la columna para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir de la degradación de Acetilcolina por las enzimas acetilcolinesterasa y colina oxidasa. Este tipo de metodología es

costosa y requiere de personal con experiencia para realizar el procedimiento de manera exitosa.

Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos desarrollaron en la década de 1960s con el trabajo pionero de Clark y Lyons, (1960), y recientemente se han empleado en una gran variedad de aplicaciones, como son la determinación de glucosa, la detección de alcohol en vinos, detección de ácido láctico en leche etc. (Wilson y col. 2005). El biosensor electroquímico es un dispositivo que contiene dos componentes básicos conectados en serie: un sistema de reconocimiento biológico (SRB) que identifica a la molécula de interés, y un transductor fisicoquímico (Daniel y col. 1999). El SRB utiliza un mecanismo bioquímico para producir una señal química o física proporcional a la concentración del analito, con un alto nivel de sensibilidad y selectividad para el analito que será medido (Wilson y col. 2005). La parte del transductor fisicoquímico sirve para transformar la señal del SRB a una señal generalmente eléctrica, mediante una transferencia direccional (de no eléctrica a eléctrica). Finalmente, en el biosensor electroquímico el SRB y el transductor fisicoquímico están en una sola unidad de tamaño pequeño, en la cual el elemento de reconocimiento biológico esta en contacto espacial con el elemento transductor.

La característica mas relevante de los biosensores electroquímicos es la correlación que presentan entre la concentración de las especies electroactivas y la tasa de proporción del analito degradado por el SRB (Daniel v col. 1999), es decir la intensidad de la señal producida por la especie

electroactiva generada es proporcional a la concentración del analito. La reacción electroquímica suele ser mucho más rápida que la enzimática, por lo tanto no se puede considerar un paso limitante del mecanismo global.

Características de la celda electroquímica

Los biosensores electroquímicos deben formar parte de una celda electroquímica, que consta de tres electrodos: el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar. El biosensor cumple la función del electrodo de trabajo, pues es donde se encuentra el SRB, que detecta el analito y desarrolla la reacción biocatalítica, seguida por una reacción redox; el electrodo auxiliar provee la carga de neutralización complementaria, mientras que el electrodo de referencia, produce un potencial fijo y estable contra el cual se mide el potencial del electrodo de trabajo como se observa en la figura 1.

Los biosensores electroquímicos basados en enzimas incorporan éstas moléculas como SRB, inmovilizadas de cierta manera sobre el electrodo de trabajo, que funciona entonces como el transductor fisicoquímico. Específicamente, las enzimas de la familia de las oxidasas detectan su sustrato de una forma específica, y generan elementos entre los que se encuentra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), susceptible de oxidarse sobre el material del electrodo de trabajo (Hu, 1994; Mitchell, 2004; Morales-Villagrán 2008) (figura 2).

El desarrollo de biosensores electroquímicos se debe a las ventajas que presentan, como son la **alta sensibilidad** para el análisis de ciertos analitos como por ejemplo, la glucosa (Cheng, 2003). **La alta selectividad**, que

asegura que el dispositivo interactuare exclusivamente con el analito de interés y no con otros de propiedades similares. Esto se consigue mediante elementos de reconocimiento específicos (Wilson y Gifford, 2004). **Resolución espacial/temporal**, que constituye uno de los puntos de importancia debido que las interacciones biológicas ocurren en cuestión de segundos o milisegundos. Los biosensores electroquímicos tienen un rango de detección de segundos, debido a que los componentes del SRB (como las enzimas) presentan un tiempo de biocatalización generalmente muy rápido (Wilson y Gifford, 2004). **Bajo costo** de producción, pues en general, estos sistemas pueden fabricarse a escala industrial, lo cual redundaría en un considerable abaratamiento de los costos de producción. A pesar de ello, la disponibilidad limitada de algunas enzimas y la existencia de fases críticas en su construcción (procesos de inmovilización) dificultan, en algunos casos, la fabricación de biosensores en masa.

4-Aminopiridina

La 4-aminopiridina (4-AP) es un inhibidor de los canales de potasio dependientes de voltaje, cuya inactivación retarda el cierre de los canales de calcio, aumentando la concentración de este ión en el citoplasma, lo que se traduce en un aumento en la liberación de neurotransmisores, independientemente de la sustancia mediadora de la liberación, del tipo de sinapsis (Thesleff, S. 1980). Su efecto se ha caracterizado en varias preparaciones, incluyendo neuronas, músculo cardíaco y células del sistema inmunológico (Hara y col, 1980, Choquet y Korn, 1992, Morales-Villagran y col, 1999).

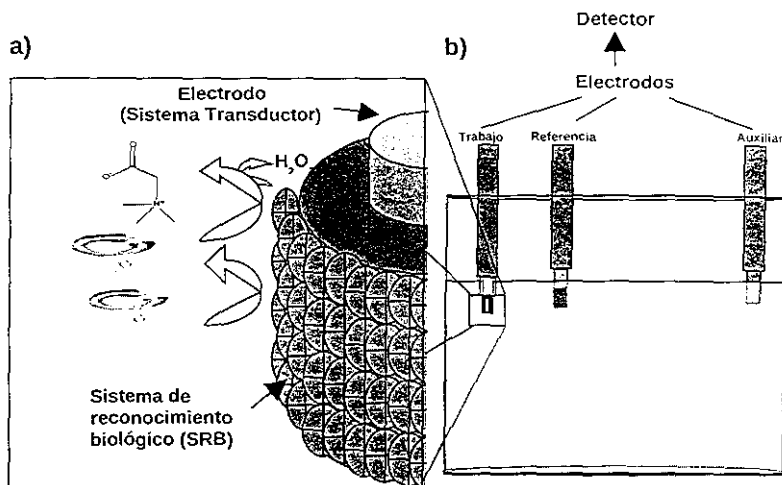


Figura 1: el panel (b) muestra un esquema de una celda electroquímica, formada por el conjunto de tres electrodos: el de trabajo, el de referencia y el auxiliar, sumergidos en una solución acuosa. Un biosensor electroquímico puede construirse recubriendo el electrodo de trabajo con un SRB, como se observa en el panel (a).

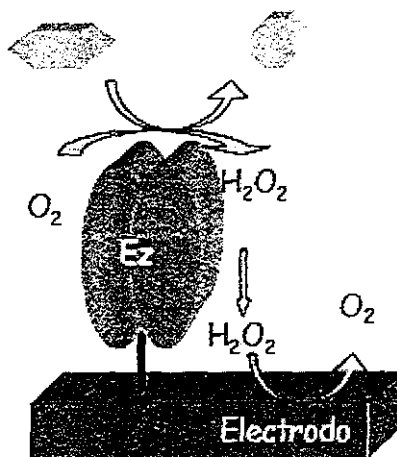


Figura 2. El esquema muestra la reacción de una enzima oxidasa, que al metabolizar un analito adecuado genera un producto susceptible de oxidarse sobre electrodo de trabajo, a un potencial determinado.

En general, se cree que la 4-AP actúa sobre el lado citoplásmico del canal de potasio, para lo cual atraviesa la membrana plasmática y se une a cargas negativas fijas localizadas en la entrada del poro, muy cerca de la compuerta del canal, por el lado intracelular (Clay y col., 2001). Cuando se administra por vía intraperitoneal o intracerebral, la 4-AP induce crisis convulsivas en diferentes especies de mamíferos, con un patrón ya caracterizado, que incluye: hiperexcitabilidad, clonos de la cabeza y sacudidas tipo perro mojado, convulsiones clónicas y tónico-clónicas, presentándose en algunas ocasiones la muerte (dependiendo de la dosis) durante una convulsión tónica (Morales-Villagrán y col., 2008)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cuantificación de los niveles extracelulares de neurotransmisores es uno de los temas principales de las neurociencias, debido a su importancia en la función cerebral. Los neurotransmisores se liberan de las neuronas y son metabolizados en el espacio extracelular en fracciones de segundos, por lo que la técnica clásica para cuantificarlos (HPLC) generalmente presenta como primera desventaja una falta de relación temporal con respecto al evento fisiológico de liberación neuronal, debido a que los tiempos de colecta generalmente son de varios minutos.

Por otro lado, la metodología cromatográfica disponible para la determinación de Ach, no genera directamente elementos electro activos que puedan ser analizados mediante su oxidación en la celda electroquímica de un equipo convencional de cromatografía, por lo que es necesario el uso de un reactor enzimático para producir H_2O_2 a partir de la degradación de Acetilcolina por las enzimas acetilcolinesterasa y colina oxidasa. Este tipo de metodología es costosa y requiere de personal con experiencia en el uso del equipo para HPLC.

Los biosensores enzimáticos internos, acoplados a la detección electroquímica, han probado ser útiles para la cuantificación de ácido glutámico (Glu) en animales en libre movimiento, en donde se aprovecha la producción enzimática de H_2O_2 por la degradación del Glu. En este tipo de metodologías representa una solución viable, que ofrece una resolución temporal mas cercana a la fisiológica, debido a que el tiempo de detección esta en función de la velocidad de reacción entre la enzima y su sustrato. Por lo tanto, se puede aprovechar que la Ach genera H_2O_2 mediante la acción de

dos enzimas, que son la acetilcolinesterasa y la colina oxidasa, y la cantidad de H_2O_2 generada es también proporcional a la cantidad de Ach degradada, que es el principio que se utiliza en el reactor disponible comercialmente. Entonces, es posible cuantificar el H_2O_2 generado a partir de Ach, sobre un biosensor que contenga las enzimas antes mencionadas, cuyo diseño además, permita insertarlo directamente en el tejido cerebral, proporcionando una metodología más sencilla para la estimación de los niveles extracelulares de este neurotransmisor.

HIPOTESIS

Si la degradación enzimática de Ach produce proporcionalmente H_2O_2 , entonces un biosensor interno basado en enzimas, y sensible al H_2O_2 , puede utilizarse como herramienta para cuantificar Ach directamente en el tejido cerebral.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad de un biosensor interno construido en nuestro laboratorio, para la cuantificación de Ach en el cerebro de ratas despiertas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Validar la funcionalidad del biosensor mediante pruebas de calibración *in vitro*.
- 2.-Valorar el desempeño del biosensor *in vivo*, insertándolo en el cerebro de ratas adultas.

MATERIAL Y METODO.

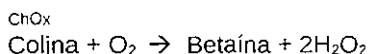
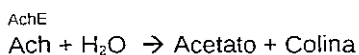
Preparación de biosensor.

Para la fabricación del biosensor, se tomó un alambre de platino de 125 μm de diámetro por 5 mm de longitud (AM System), que se insertó en el interior de un segmento de fibra hueca (Small-Parts Inc.) con el objeto de darle soporte, quedando 2 mm de platino expuesto. El otro extremo del platino se soldó a un segmento de alambre de cobre de 4 cm de longitud, el cual lleva en un extremo un pin eléctrico. Los puntos de soldadura se cubrieron con *termofit*. La sección expuesta de platino se cubrió con una solución de resina de naftión al 5% (SIGMA), se dejó secar 10 min a temperatura ambiente, y se le añadió una capa de acetato de celulosa al 5% (JT Baker) en una mezcla de acetona-etano (2:1, SIGMA). Después de 10 minutos de secado de esta matriz, se preparó una mezcla que contenía 400 μg de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE, *Electrophorus Electricus*, SIGMA C-3389-2ku) y colina oxidasa (ChOx, *alcaligenes*, SIGMA C-5896), 200 μg de ascorbato oxidasa (*Cucúrbita pepo*, SIGMA A-0157) con 5 mg de albúmina bovina (JT Baker) y 0.25 mg de gelatina de puerco disueltas en amortiguador de fosfatos (20 mM, pH 7). Una vez disueltas las enzimas, se le añadieron a la mezcla 5 μl de solución de glutaraldehído (SIGMA, G-5882) en amortiguador de fosfatos (1:25). Se almacenaron a -20°C hasta su uso. Adicionalmente se prepararon electrodos sin las enzimas AChE y ChOx, para utilizarlos como control.

De manera similar, se construyeron electrodos de referencia y auxiliares, para completar la celda electroquímica. Los primeros llevan un alambre de Ag/AgCl (AM System), y los segundos un alambre de acero inoxidable, en lugar del alambre de platino.

Calibración de la celda electroquímica.

Para fines de calibración ($n=20$), se formó una celda electroquímica sumergiendo un electrodo de trabajo (el biosensor), un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar en 40 ml de amortiguador de fosfatos 20mM, pH 7.4, en agitación constante y a temperatura ambiente. Los tres electrodos se conectaron a un detector electroquímico (BAS, LC-4B), cuya señal se recibió en una PC a través de un filtro electrónico (Antek Leyden, modelo Link), a fin de filtrar las frecuencias electrónicas que no provienen de la celda electroquímica. Se utilizó el software CSW versión 1.7 (Waters) para digitalizar la señal eléctrica. Una vez obtenida la señal basal, se añadieron alícuotas que elevaron la concentración de Ach en el vaso de calibración en 5, 10 y 20 μM ; la Ach añadida interacciona con el biosensor, en donde las enzimas AchE y ChOx la degradan hasta peróxido de hidrógeno (H_2O_2), de acuerdo con las siguientes reacciones:



El H_2O_2 genera una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de Ach degradada, a un potencial de oxidación positivo de 0.45 V, que el software registra en una gráfica de voltaje vs tiempo.

Para discriminar la interferencia que pudiera producir el ácido ascórbico presente en concentraciones altas en el tejido nervioso (Cammack, 1992), al oxidarse sobre el electrodo de platino, se añadió a los biosensores la enzima ascorbato oxidasa, que convierte esta molécula en ácido dehidroascórbico y H_2O , elementos que no son electro activos. Estos biosensores se calibraron

con adiciones de ácido ascórbico en el vaso de calibración, para alcanzar una concentración de 5, 10 y 20 μ M. Enseguida, se añadieron al vaso dos alícuotas consecutivas de Ach de 25 μ M.

Experimentos *in vivo*

Para la realización de este trabajo, se utilizaron 9 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso promedio de 270 gr al momento de su uso, que permanecieron bajo condiciones de bioterio, con ciclos luz-oscuridad de 12x12, una temperatura de 22 ± 2 y una humedad relativa del 50%, con libre acceso al agua y alimento. Los animales se anestesiaron con una mezcla de oxígeno y el anestésico volátil halotano, y se sujetaron al marco estereotáxico (Stoelting). La temperatura corporal durante la cirugía se mantuvo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Se practicó un corte longitudinal sobre la piel y se retiró el periostio hasta exponer el cráneo. Posteriormente, se marcó el punto de las coordenadas establecidas en el Atlas de Paxinos y Watson para el tálamo derecho (AP: -3.8, L= -2.8, V= -6) se realizó el orificio correspondiente y ahí se insertó el biosensor. El electrodo de referencia se colocó aproximadamente a 2 mm de distancia del biosensor, hacia lambda y el electrodo auxiliar se colocó contra lateral al biosensor, aproximadamente a la misma altura. Tanto el auxiliar como el de referencia se colocaron superficialmente en el tejido. Se realizaron tres perforaciones más para implantar tornillos de acero inoxidable, para dar firmeza al arreglo. El área de cirugía se cubrió con cemento dental, dejando expuestos los pines de los extremos de los electrodos.

Dos horas después de la cirugía, se conectaron los tres electrodos al detector electroquímico, se tomó el registro de línea base durante 20 minutos,

para obtener el valor de voltaje correspondiente a la concentración basal de Ach en el tejido. Luego se inyectó una solución acuosa de 4-AP (SIGMA, A-052) (grupo 1: 5 mg/kg de peso, n=3; grupo 2: 2.5 mg/kg de peso, n= 3) por vía intraperitoneal, para aumentar la liberación de Ach en el espacio extracelular. Después de cuando menos 1 h de la inyección de 4-AP, los animales se sacrificaron mediante una sobredosis de pentobarbital sódico, se realizó la disección del encéfalo para verificar visualmente la posición del biosensor.

Además, se utilizaron 3 animales a los cuales se les insertó un biosensor carente de AchE y ChOx, como controles.

RESULTADOS

Construcción del biosensor.

La figura 3 muestra un esquema de los biosensores que se construyeron para este trabajo, y una fotografía del mismo, donde se aprecian las dimensiones reales del dispositivo. La primera capa del biosensor se formó sumergiendo el alambre de platino en una solución de perfluorato de nafión al 5%. La experiencia mostró que una capa doble de nafión formada a temperatura ambiente retiene mejor el resto de los componentes. De la misma manera, se observó que la capa de acetato de celulosa resultó mejor si la solución se mantenía caliente, para formar una capa delgada y uniforme en toda su extensión. Esta capa se verificó visualmente en cada biosensor, mediante un microscopio estereoscópico, descartándose todos aquellos que presentaron grumos de acetato de celulosa. En cuanto a la capa de enzimas, una vez que estas se disolvieron en la mezcla de gelatina de puerco, albúmina de bovino y glutaraldehído, el proceso de recubrimiento del alambre de platino debió de ser muy rápido, pues después de unos minutos la mezcla se gelatiniza y las enzimas ya no se adhieren al acetato de celulosa.

Evaluación de biosensores *in Vitro*.

Se realizaron calibraciones de varios sensores, mediante la adición de alícuotas de Ach, que elevaron la concentración del compuesto en el vaso de calibración, de forma creciente, con incrementos de 5, 10 y 20 μM . La figura 4 muestra la gráfica de una calibración típica, en donde se observa el incremento en el voltaje como resultado de cada nueva adición de Ach, resultado en una

escalera donde cada peldaño representa una nueva alícuota. La respuesta para cada concentración se verificó por duplicado.

En la tabla 1 se resumen los datos numéricos del incremento del voltaje en cada adición de Ach, mientras que en la figura 5 se presenta la gráfica de regresión lineal correspondiente, misma que muestra una r^2 de 0.97. El tiempo requerido para que el biosensor mostrara la respuesta máxima después cada adición del analito fue de 23 ± 2 segundos.

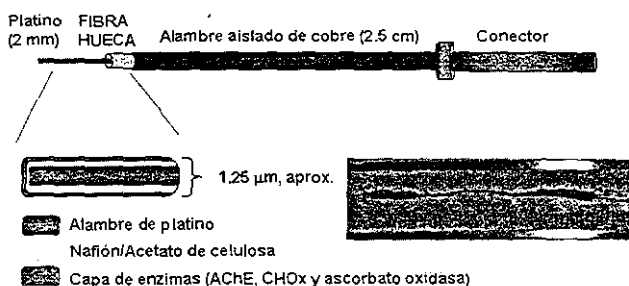


Figura 3. Se muestran los diferentes elementos que constituyen el biosensor, así como la capa que recubre el alambre de platino. La fotografía muestra las dimensiones reales de un biosensor.

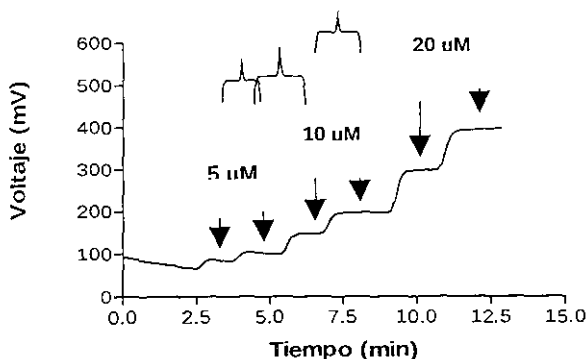


Figura 4. Calibración del biosensor para Ach. Cada peldaño representa la adición de una nueva alícuota al vaso de calibración, que genera un aumento proporcional en el voltaje.

CONC. μM ACh	Voltaje (mV)	MEDIA	D.E
5	21.03		
5	20.78	20.90	0.17677
10	48		
10	47.02	47.51	0.692964
20	97.92		
20	93.58	195.75	3.0688

Tabla 1. Muestra los valores de voltaje generados por las adiciones de ACh al vaso de calibración. Las medias se grafican en la figura 5.

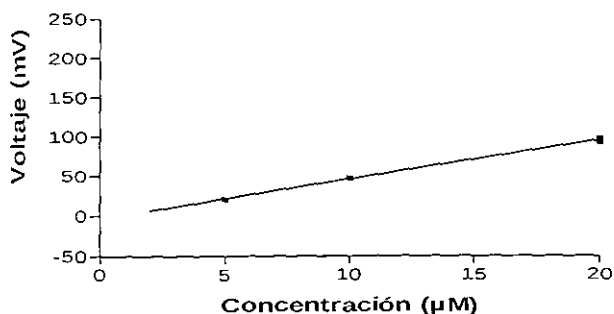


Figura 5. Regresión lineal de una calibración típica de un biosensor. Cada punto representa mediciones por duplicado. La r^2 en este caso es de 0.9977

En la figura 6 se muestran calibraciones de diferentes biosensores de un mismo lote, mismas que se realizaron en días diferentes. En estas gráficas se observa una respuesta similar entre ellos, lo que indica que una vez preparados, su respuesta es estable en un periodo de tiempo considerable, bajo las condiciones de almacenamiento descritas anteriormente. En este caso, se probaron biosensores de hasta 2 meses de preparación.

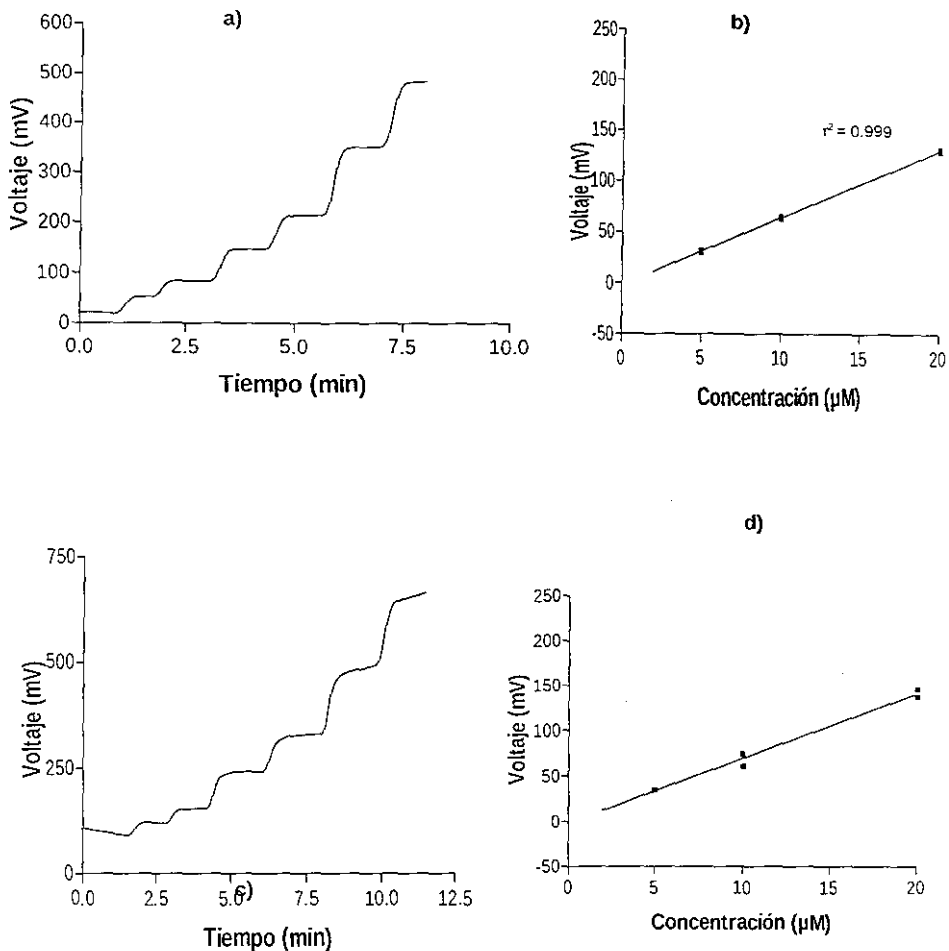


Figura 6: Calibraciones de biosensor de mismo lote, realizadas en días diferentes. Los valores que se obtuvieron fueron semejantes (paneles a y c), con valores de r^2 entre 0.99 y 0.98 (paneles b y d). Las gráficas de los paneles c y d se obtuvieron de un biosensor con un tiempo de congelación de un mes a -20°C .

Con el objeto de descartar posibles señales eléctricas inespecíficas producidas por interferencias mecánicas debidas al movimiento de los cables de la celda electroquímica dentro del vaso de calibración, u otro tipo de

interferencias ambientales, se prepararon algunos sensores con todos los componentes señalados en la sección de materiales y métodos, con excepción de las enzimas ChOx y AchE, y se probaron con el mismo esquema de calibración ya descrito: La figura 7 muestra el resultado de esta manipulación, en donde prácticamente no se observa ningún cambio significativo en el voltaje con las adiciones de Ach.

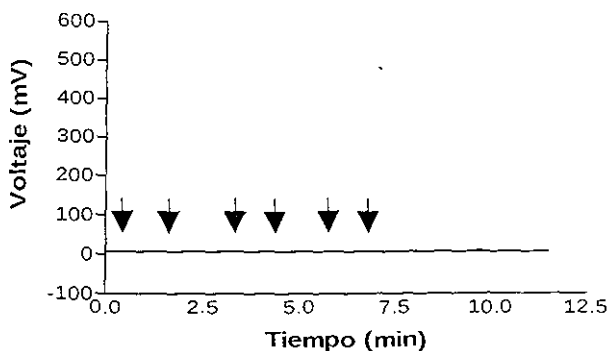


Figura 7: La gráfica muestra la ausencia de respuesta a la calibración de un biosensor cuando las enzimas ChOx y AchE se excluyeron del mismo. Las flechas señalan el momento en que se realizaron las adiciones.

La figura 8 muestra la calibración realizada con ácido ascórbico (Aa), donde se observa que esta molécula no genera señales eléctricas significativas, aunque si se observó un ligero aumento en el voltaje, al parecer inespecífico, pues no se observa como los escalones típicos de las calibraciones con Ach,

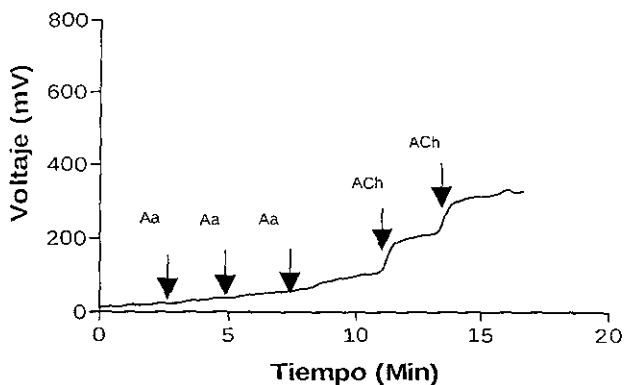


Figura 8: La gráfica muestra la ausencia de respuesta a la adición de alícuotas de ácido ascórbico con una concentración de 5, 10 y 20 μ M respectivamente. También se muestran 2 adiciones de Ach de 25 μ M, que producen los dos últimos escalones de la gráfica.

Resultados *In vivo*

Grupo 1 (n=3): una vez conectado la celda electroquímica que se colocó en el tejido cerebral del animal al detector electroquímico, según se describe en la sección de materiales y métodos, se esperó el tiempo necesario para obtener una línea base estable. A partir de ese momento se capturó la señal del biosensor durante 20 minutos aproximadamente. Posteriormente se inyectó la solución acuosa de 4-AP (5 mg/kg, i.p.), que al cabo de 10-20 minutos generó en los animales una serie de comportamientos típicos ya descritos para esta droga (Morales-Villagran y col, 2008): pilo erección, excitabilidad, movimientos masticatorios, clonos de cabeza, y extremidades y sacudidas “perro mojado”. Después de aproximadamente 40-50 min. de la inyección de 4-AP, se observaron convulsiones tónico-clónicas y pérdida de la postura. Además, a partir del minuto 50 después de la inyección de 4-AP se presentaron saltos repetitivos descontrolados, y en algunos casos la muerte.

El movimiento causado por el comportamiento de la rata en respuesta a la inyección de 4-AP causó alteraciones en la señal del biosensor (ruido electrónico); sin embargo, se observaron diferencias entre el registro de la línea base y el registro después de la inyección de 4-AP (figura 9), que consistieron en una señal de voltaje evidentemente más alto, en forma de intermitencias que se observaron aún más elevadas cuando la rata recibió una sobredosis de pentobarbital sódico (en el caso mostrado en la gráfica, aproximadamente a los 100 min post-inyección).

Grupo 2 (n=3): en el segundo grupo de animales, una vez obtenida una línea basal estable, se obtuvo un registro de 20 min en esas condiciones. Enseguida se les inyectó una dosis de 4-AP (2.5 mg/kg, i.p.) y se observaron

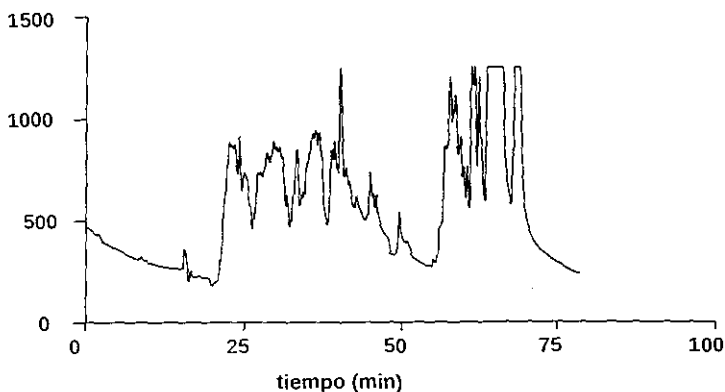


Figura 9. Se observa el registro de la señal de un biosensor insertado en el tálamo de un animal adulto. La gráfica muestra un incremento en la señal unos minutos después de la inyección de 4-AP en la flecha 1, que coincide en el tiempo con las primeras manifestaciones conductuales asociadas a la droga. Se observan voltajes aún mayores en coincidencia con el status epilepticus (después de los 100 min de registro). La flecha 2 indica el inicio de la inyección de pentobarbital para el sacrificio del animal.

las alteraciones conductuales de los animales, que consistieron en pilo erección, excitabilidad y movimientos masticatorios, iniciaron entre el minuto 20 después de la inyección. Alrededor del minuto 30 se observaron clonos en las extremidades delanteras y sacudidas “perro mojado”. En este grupo de animales no se presentaron convulsiones tónico-clónicas ni *status epilepticus*. En cuanto a la señal del biosensor, se observaron incrementos en el voltaje unos minutos después de la inyección, con intermitencias rápidas que alcanzaron un valor máximo de voltaje alrededor de los 55 min posteriores a la inyección de 4-AP. Después, el voltaje disminuye hasta niveles basales. Durante todo el tiempo los valores de voltaje obtenidos en este grupo fueron menores que los del grupo 1 (figura 10).

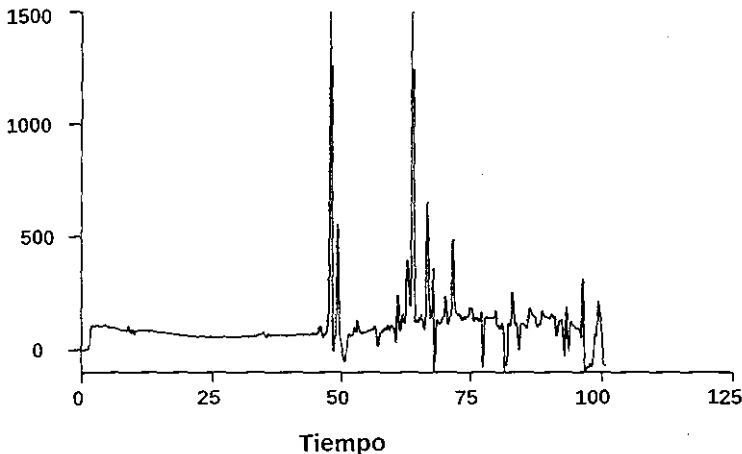


Figura 10. La gráfica muestra la señal de un biosensor insertado en el encéfalo de una rata del grupo 2. Se observan incrementos en el voltaje minutos después de la inyección de 4-AP, con valores máximos alrededor de los 55 min post-inyección, que luego decaen hasta valores basales. La flecha indica el momento de la inyección de 4-AP.

Finalmente, la figura 11 muestra el resultado típico de la inyección de 4-AP (5 mg/kg) en los animales ($n=3$) a los que se les implantó un biosensor carente de enzimas. Se observan algunas espigas de ruido electrónico (marcadas con asteriscos) que coinciden con movimientos bruscos del animal de experimentación, pero no se generó ningún cambio significativo en el voltaje durante todo el experimento.

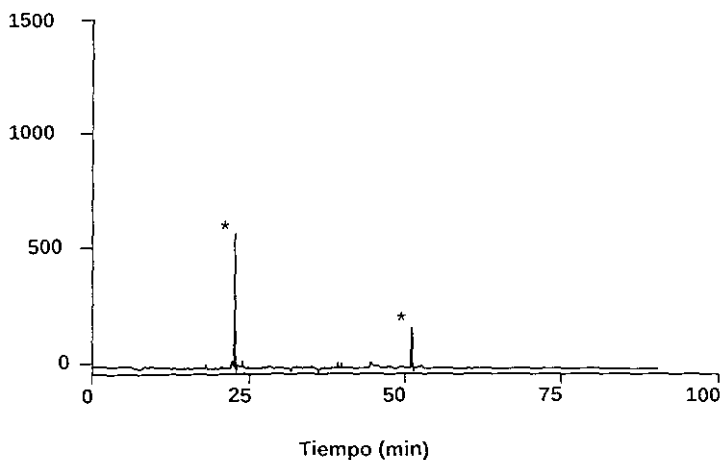


Figura 11 Se muestra el registro obtenido de un animal que recibió un biosensor carente de enzimas. Se observan espigas de ruido electrónico (marcadas con *), pero ningún cambio en el voltaje.

Discusión

El diseño de biosensores enzimáticos acoplados a un sistema de detección electroquímico (amperométrico) aún plantea problemáticas que no han sido resueltas del todo. En el caso del diseño que se presenta en este trabajo, la principal problemática es la inmovilización del SRB (las enzimas) sobre el transductor fisicoquímico (el alambre de platino). Al respecto, se han realizado una serie de ensayos previos que incluyen la electro polimerización de enzimas sobre discos de platino (Palmisano, 1997), la construcción de microcilindros a partir de fibras de carbono selladas, con un recubrimiento externo que incluye la enzima de interés (Cui, 2001), el atrapamiento de enzimas en capas de polímeros que luego se adhieren a alambres de platino (Llaudet, 2003), o el depósito de enzimas entre capas de nanotubos de carbono, que incluye el depósito previo de capas de oro para mejorar el desempeño del biosensor (Muguruma, 2008). La mayoría de estos intentos han mostrado su eficiencia en condiciones *in vitro*, pero su construcción se complica al incluir procedimientos como electropolimerización y elementos de alto costo (Kiba y col., 2003). Además, el diseño sobre superficies planas de diferentes materiales implica un uso off-line de los mismos, es decir, aún es necesario conectar estos diseños a algún sistema de colecta de muestras, lo que implica la pérdida de la dimensión temporal de la cuantificación.

La construcción del biosensor que se presenta en este trabajo fue preparado de acuerdo con el método descrito por Hu y col (1994) y Morales-Villagran y col (2008), en donde la primera capa corresponde a una de Nafión, que se consideró el material más apropiado dados los resultados previos obtenidos por Finbar (2003) con respecto a las propiedades de este material

en sensores de platino, que muestra un bloqueo casi completo de elementos que pueden ocasionar interferencias en sensores diseñados para mediciones en el SNC, como el ácido ascórbico. En nuestro biosensor, se incluyó además la ascorbato oxidasa, a fin de evitar la interferencia de esta molécula, por lo que las calibraciones realizadas con ácido ascórbico muestran que el biosensor es bastante insensible a este compuesto, pues aunque se observó una respuesta lenta al añadir Aa al vaso de calibración, que tal vez refleje un incremento gradual en el voltaje debido a una interacción mas lenta del ácido ascórbico con el electrodo de platino, la intensidad de esta respuesta comparada con la generada por Ach se puede considerar como despreciable. Además, se sabe que el nafión y el acetato de celulosa, por su carga negativa, pueden ejercer cierta repulsión electrostática de algunos neurotransmisores que también podrían causar interferencia, como la dopamina; sin embargo, pruebas previas realizadas con biosensores semejantes en nuestro laboratorio no muestran interferencia por dopamina o sus metabolitos ácido homovanílico y ácido 5-hidroxi-indol-acético. Por otra parte, la cubierta formada por la combinación de nafión y acetato de celulosa no tiene efectos significativos de permeabilidad sobre el O_2 y el H_2O_2 , lo que asegura que el peróxido producido en la reacción enzimática sobre el biosensor no tendrá una barrera importante para ser captado (Finbar, 2003; Hu y col. 1994).

Los biosensores que se utilizaron en este trabajo muestran una respuesta lineal en el rango en el cual fueron calibrados (entre 0 y 70 μM de Ach en el medio), rango que consideramos adecuado dadas las concentraciones del neurotransmisor que se han reportado en el tejido nervioso del rango μM (Taracheko y col. 2007; Xuesi y Felman, 2007) y que

son muy semejantes a las respuestas obtenidas en otros trabajos, con biosensores más complicados como el reportado por Mitchell (2004), que obtiene respuestas lineales hasta 100 μM de Ach, con un biosensor en el cual el electrodo de platino está dentro de un tubo de vidrio, a su vez lleno con una solución de electrolito (acetato de sodio y cloruro de sodio), arreglo que lo hace poco adecuado para su inserción en el tejido, ya que el vidrio podría romperse fácilmente.

En el desarrollo del trabajo, se observaron ciertas diferencias en cuanto al voltaje obtenido en respuesta a las adiciones de Ach al vaso de calibración: esto puede deberse a la concentración específica de Ach que finalmente queda atrapada en la punta de biosensor, que seguramente es diferente inclusive para biosensores del mismo lote. La normalización del procedimiento de cobertura deberá minimizar estas diferencias según se estandarice con el paso del tiempo.

En cuanto a las determinaciones *in vivo*, se trabajó con dos grupos de 4-AP, para conseguir la liberación inespecífica de neurotransmisores al espacio extracelular, incluida la Ach. Se manejaron dos grupos de animales con dosis de 5 y 2.5 mg/kg, ip. La dosis de 5 mg/kg produjo una liberación mayor de Ach que la de 2.5 mg/kg, según se observa en las gráficas correspondientes, mismas que indican que el biosensor fue capaz de discriminar diferentes cantidades de Ach en el medio, además de una dinámica particular de liberación para cada una de las dosis utilizadas. El principal problema que se presentó en esta fase del trabajo fue el ruido electrónico que se induce en el sistema por el movimiento del animal, pues a pesar de los intentos de filtrado de la señal proveniente del biosensor, no fue posible evitar

esta interferencia que no permite discriminar completamente la señal producida por el neurotransmisor. Aún así, es evidente la diferencia entre el registro obtenido en periodo basal, y el que se obtuvo minutos después de la inyección de la droga. Además, el inicio de las conductas previamente descritas para la 4-AP se correlacionan temporalmente con la aparición de las primeras elevaciones observadas en el registro, lo que sugiere que la Ach ya está presente en el espacio extracelular, disponible para ser degradada por las enzimas en el biosensor. El dato obtenido a partir de los biosensores que carecen de las enzimas AchE y ChOx, insertados en algunos animales, proporcionan una certeza de especificidad en cuanto a la detección exclusiva de Ach y no de otros compuestos que también se liberan por la 4-AP, como ácido glutámico o dopamina. El biosensor electroquímico presentado en este trabajo solo puede ser usado una vez en experimentos *in vivo*, ya que la estructura del biosensor y la capa que contiene las enzimas se daña severamente en el proceso de extracción del biosensor una vez utilizado dentro del cerebro de los animales. Por lo tanto, se considera como biosensor de un solo uso de acuerdo a la clasificación de biosensores electroquímicos recomendada por la IUPAC (Daniel y col, 1999).

Los biosensores que se construyeron para este trabajo mostraron una estabilidad de respuesta por un periodo de 30 días, almacenados a -20°C , aunque no se probó ninguno después de este tiempo. Esta estabilidad está evidenciada por las curvas de calibración que se realizaron, y que siguen mostrando una respuesta lineal, y valores de voltaje dentro de un rango aceptable, comparados con biosensores con menos tiempo de almacenaje. Este dato muestra que los biosensores pueden fabricarse y utilizarse con

suficiente confianza para el trabajo cotidiano dentro del periodo de tiempo mencionado.

En conclusión, el biosensor presentado en este trabajo representa una alternativa sencilla que al mismo tiempo ofrece una buena resolución temporal en la evaluación de los niveles extracelulares de Ach, y podría constituir una metodología valiosa para el estudio de la dinámica de Ach en situaciones normales y patológicas, sumando a esto sus dimensiones reducidas, que por un lado facilitan su manejo para insertarlo estereotáxicamente en un punto determinado del cerebro, y por otro disminuyen el daño en el tejido en el área de estudio.

CONCLUSIONES

- El biosensor construido para este trabajo, utilizado como electrodo de trabajo dentro de un arreglo de celda electroquímica, mostró una respuesta lineal, estable y prácticamente sin artefactos cuando se calibra con concentraciones crecientes de Ach.
- Este biosensor mostró nula sensibilidad a la presencia de compuestos que pueden causar interferencia, principalmente ácido ascórbico.
- La estabilidad de los biosensores se mantiene por periodos de hasta 30 días, almacenados a -20°C .
- No fue posible obtener una respuesta de biosensor a la Ach endógena (tálamo) libre de artefactos, debido a que las condiciones eléctricas del ambiente no fueron propicias para lograr este fin. Sin embargo se observa una relación directa entre el voltaje obtenido y la dosis de 4-AP, lo cual sugiere que el aumento observado en el voltaje es consecuencia directa de la liberación de Ach.

Referencias

- Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX Choline is a selective agonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Journal of Neuroscience. Methods.* 9(12):2734-42, 1997. in *medical aspects.* 6 edition. Philadelphia. New York: Lippincott-Raven: 917-48, 1998.
- Cammack J., Ghasemzadeh B., Adams R. Electrochemical monitoring of brain ascorbic acid changes associated with hypoxia, spreading depression, and seizure activity. *Neurochemical Reserch.* 17:23-27, 1992.
- Choquet D. y H. Korn. Mechanism of 4-Aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *Journal of general Physiology.* 99: 217-240, 1992.
- Clay M. Armstrong and Andrey Loboda. A model for 4-aminopyridine actions on k channels: similarities to tetraethylammonium ion action. *Biophysical Journal* 81: 895-904, 2001.
- Contreras D. Modelos experimentales en epilepsia. *Rev. Neurol.* 30: 370-376, 2000.
- Daniel R. Thévenot, Klara Coth, Richard A. Durst y George S. Wilson. *Electrochemical Biosensor: Recommended Definition and Classification:* pure Applied. Chemistry. 71: 2333-2348, 1999.

- Day, J., Damsma, G., and Fibiger, H.C.. Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: An *in vivo* microdialysis study. *Pharmacology, Biochemical Behavior* 38: 723–729. 1991.
- Davis A. and Thomas J. Gould Associative Learning, the Hippocampus, and Nicotine Addiction. *Current Drug Abuse Reviews*. 1: 9-19, 2008.
- Enrique Llaudet, Niguel P. Botting, Joe A. Crayston, Nicholas Dale. A three-enzyme microelectrode sensor for detecting purine release from central nervous system. *Biosensors and Bioelectronics* 18: 43-52, 2003.
- Felder CC. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB Journal* 9:619-25. 1995
- Finbar O. Brown and John P. Lowry. Microelectrochemical sensor for *in vivo* brain analysis: an investigation of procedures for modifying Pt electrodes using Nafion. *The Analyst*.128: 700-705, 2003.
- Flores Soto M., Segura Torres JE. Estructura y función de los receptores Acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Revista Mexicana de neurociencias*. 6:315-326, 2005.
- Flores A. Galindo F. De la energética a la neurotransmisión: el adenosín trifosfato y sus receptores. *Revista de Neurología*. 43: 667-677, 2006.

- Hitoshi Muguruma, Yu shibayama, YAsunori Matsui. An amperometric biosensor based on a composite of single-walled carbon nanotubes, plasma-polymerized thin, and enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*. **23**:827-832, 2008.
- Hu Yibai, Kim M. Mitchell, Fakhrildeen N. Albahadily, Elias K. Michaelis and George S. Wilson. Direct measurement of glutamate release in the brain using a dual enzyme-based electrochemical sensor. *Brain Research* **625**:117-125, 1994.
- Hulme EC, Birdsall NJM and Buckley NJ Muscarinic receptor subtypes. *Annalist Review Pharmacology Toxicology*. **30**: 633–673,1990.
- Jerusalinsky D, E Kornisiuk, I Izquierdo, Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory process. *Neurochemical. Reserch*. **22**: 507-15, 1997.
- Jing Li and Yi Lu. A highly sensitive and selective catalytic DNA biosensor for lead ions. *Journal Chemical. Society*.**122**: 10466-10467, 2000.
- Jun Cui, Nadezhda V. Kulagina, Adrian C. Michael. Pharmacological evidence for selectivity of in vivo obtained with enzyme-based electrochemical sensor. *Journal of Neuroscience Methods* **104**:183-189, 2001.

- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM Principios de Neurociencia. 4ª. ed. Mc Graw-Hill Interamericana, España, 2001.
- Kiba N., Toyonari T., kato S, Tachibana M., Tani K, Koizume H., Masaharu E., and yonezawa E. Flow-Throu micro sensor using immobilized peroxide with chemiluminometric FIA system for determining hydrogen peroxide. *Analytical Science* **19**: 823-827, 2003.
- Kim M Mitchell. Acetylcholine and choline amperometrico enzyme sensor characterized in vitro and in vivo. *Analytical Chemistry* **76**: 1098-1106, 2004.
- Lamas J.A. Evolución del concepto de potencial de reposo neuronal. Aspectos básicos y clínicos. *Revista de neurologia.* **41**(9): 538-549, 2005.
- Malcom P. Caufield and Nigel J. M. . International Union of Pharmacology. XVII, Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacological Reviews.* **50**. 1998.
- Mizuno T., Endo Y., Arita J., and Kimura F. Acetylcholine release in the rat hippocampus as measured by the microdialysis method correlates with motor activity and exhibits a diurnal variation. *Neuroscience* **44**: 607–612.

- Mizoguchi K., Yuzurihara, M., Ishige, A., Sasaki, H., and Tabira, T. Effect of chronic stress on cholinergic transmission in rat hippocampus. *Brain Reserch*. 915: 108–111. 2001
- Morales-Villagran A., Medina-Ceja L., Lopez-Perez S. J. Simultaneous glutamate and EEG activity measurement during seizures in rat hippocampal region with the use of an electrochemical biosensor. *Journal of Neuroscience Methods*. 168: 48-53, 2008.
- Morales-Villagran A. López-Pérez S., Medina-Ceja L. Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique. *Neuroscience Letters*. 273 : 47-50. 1999
- Noback CR, Strominger NL, Demarest RJ. *The Human Nervous System: Structure and Function*. Humana Press, 2005
- Palmesano, G.E. Benedetto and C.G. Zambonin. Lactate amperometric biosensor base don an electrosynthesized bilayer film covalently immobilized enzyme. *The Analyst*. 122: 365-369, 1997.
- Patricio Fuentes G, Andrea Slachevsky Ch. Enfermedad de Alzheimer: Actualización en terapia farmacológica. *Revista Médica de Chile*. 133: 224-230, 2001.

- Ronald J. Lukas,¹ Jean-pierre Changeux, Nicolas le Novère, Edson x. Albuquerque, David J. K. Balfour, Darwin D. Berg, Daniel Bertrand, Vincent a. Chiappinelli, Paul B. S. Clarke, Allan C. Collins, John A. Dani, Sharon R. Sradly, Kenneth J. Kellar, Jon M. Lindstrom, Michael J. Marks, Maryka Quik, Palmer W. Taylor and Susan Wonnacott. International Union of Pharmacology. XX. Current Status of the Nomenclature for Nicotinic Acetylcholine Receptors and Their Subunits. *Pharmacological Reviews*. 51 (2), 1999.
- Pijanowska, W. S. Böhm, D. Olthuis, P. Bergveld. A flow-through amperometric sensor based on dialysis tubing and free enzyme reactors. *Biosensors and Bioelectronics*.16: 391-397, 2001.
- Sian J, Moussa BH, Riederer P, Gerlach M. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. In Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds. *Basical Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. 6 ed. Philadelphia. New York: Lippincott-Raven. 5: 917-948,1998.
- Südhof TC. The synaptic vesicle, a cascade of protein interactions. *Nature*. 375:645-653, 1995.
- Taek Dong Chunk. *In vitro* evaluation of the continuous monitoring glucose sensor with perfluorinated tetrafluoroethylene coatings. *Bulletin. Korean chemical Society*. 24: 514-51, 2003.

- Taraschenko O., Rubbinaccio Heather, Shulan M. Shulan, Glick D. and Maisonneuve M. Isabelle. Morphine-induced Changes in acetylcholine release in the interpeduncular nucleus and relationship to changes in motor behavior in rats. *Neuropharmacology*. **53**: 18–26. 2007
- Thesleff, S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience*. **58**: 1413-1419, 1980.
- Tohyama M., Takatsuji K., Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat. Oxford University Press, 1998.
- Vázquez-Palacios, H. Bonilla-Jaime. Receptores nicotínicos cerebrales y trastornos neuropsiquiátricos: *Revista de Neurología* **39** (12): 1146-1160, 2004.
- Victoria Fernández Pinto. Neuropeptidos. Nuevas perspectivas para el tratamiento de los trastornos depresivos y la ansiedad. *Revista de psicofarmacología*. **43**: 55-60, 2004.
- Wilson S., Giffort R. Biosensor for real-time in vivo measurements. *Biosensor and bioelectronics*, **20**: 2388-2403, 2004.

- Xuesi M. Shao and Felman L. Jack. Efficient measurement of endogenous neurotransmitters in small localized regions of central nervous systems *in vitro* with HPLC, *Journal of Neuroscience Methods*.**160**: 256–263, 2007.
- Yibai Hu, Kim M. Mitchell, Fakhrideen N. Albahadily, Elias K. Michaelis, George S. Wilson. Direct measurement release in the brain using a dual enzyme-based electrochemical sensor. *Brain research*.**659**: 117-12, 1994.
- Yu Lei, Priti Mulchandani, Wilfred Chen, Joseph Wang, Ashok Mulchandani. *Arthrobacter* sp. JS443-Based Whole Cell Amperometric Biosensor for p-Nitrophenol. *Electroanalysis*.**16**: 2030-2034, 2004.
- Yusuke Hara, Kenji Kitumura y Hiroshi Kuriyama Actions of 4-aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology*. **68**: 99 -106, 1980.