

03068



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES**

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

**EFFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL Y
DIBUTIRIL AMP CICLICO SOBRE LA
TRANSDIFERENCIACION DE LAS CELULAS
CROMAFINES EN CULTIVO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

P R E S E N T A :

BIOL. BLANCA MARGARITA GOMEZ CHAVARIN

ASESOR: DR. ARTURO HERNANDEZ CRUZ

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A ti Andrés,
por el regalo diario de tu sonrisa,
por el brillo de tus ojo,
porque contigo he descubierto
un mundo lleno de amor y ternura
por.....
Gracias amor mio.**

**A mi madre,
por tu amor y apoyo constante
e incondicional**

**A mis hermanos Rocio y Alejandro
por sus consejos y apoyo, por compartir
conmigo los mejores regalos que les ha
dado la vida Rocy, Humberto, Alejandro
y Florencia.**

**Al Dr. Arturo Hernández,
Porque sus enseñanzas me han dejado mucho
mas que lo que puedo plasmar en esta tesis.**

**A los Doctores:
Marcia Hirari Urdanivia
Alejandro Zentella Dehes
Mauricio Diaz Muñoz
Miguel Angel Morales
Por haber aceptado ser miembro del Jurado
y por darme parte de su valioso tiempo en la
revisión de este trabajo.**

**Al Dr. Oscar Prospero y la Dra. Anabel Jimenez
Por permitirme formar parte de su grupo
de trabajo, pero sobre todo por su
invaluable amistad, en verdad muchas
gracias.**

**A mis amigos:
Alberto Salazar, Jose Luis Chávez, Criselda,
Irma, Edith, Gonzalo, Enrique, Dra. Ma.
Luisa Gómez y Lilia Robert.**

A los Doctores:

**Sofia Diaz Cintra
Keethe Wilms M.
Patricia Tato
Jaime Mass O.**

Por su apoyo en los momentos mas dificiles.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
ANTECEDENTES	
a) Diferenciación de las Células de las Crestas Neurales.....	4
b) Antecedentes y Características del NGF.....	8
c) Receptor del NGF.....	14
d) Señales de Transducción Inducidas por la Unión NGF- <i>trkA</i>	18
d.1) Vía Ras-MAPK.....	16
d.2) Participación de Ca^{2+}	19
d.3) Participación de Fosfolípidos y Activación de PKC.....	19
d.4) Vías Independientes de Ras.....	20
e) Señales de Transducción Inducidas por p75.....	21
f) Características del AMPc y su Vía de Transducción.....	22
g) Efectos de los Glucocorticoides.....	28
h) Proteínas de Citoesqueleto Neuronal como Marcadores Específicos de Neuronas.....	27
OBJETIVOS.....	29
MATERIAL Y METODOS	
a) Cultivo de Células Cromosómicas.....	32
b) Cultivo de Neuronas Simpáticas.....	32
c) Inmunocitoquímica con el Conjugado Avidina-Biotina-Peroxidasa.....	32
d) Inmunofluorescencia.....	33
e) Sistema de Adquisición y Análisis de Imágenes.....	34
RESULTADOS	
a) Análisis Morfométrico.....	39
b) Inmunofluorescencia de Antígenos Específicos de Neuronas	
b.1) Curso Temporal de la Expresión Inducida por NGF o AMPc.....	45
b.2) Curso Temporal Detallado de los Efectos de Exposición al NGF.....	50
b.3) Permanencia de los Efectos del NGF. Efectos de la Deprivación de Factor.....	50

b.4) Permanencia de los Efectos del AMPc. Efectos de la Deprivación del Agonista.....	56
b.5) Reversión de los Efectos del NGF por Dexametasona.....	56
b.6) Efectos Inhibitorios de la Dexametasona sobre los Efectos Inducidos por NGF.....	59
DISCUSION.....	65
CONCLUSIONES.....	71
APENDICE 1	
Proteínas de Citosqueleto como Marcadores Específicos de Neurona.....	73
APENDICE 2	
Características de un Microscopio de Fluorescencia.....	81
BIBLIOGRAFIA.....	88

ABREVIATURAS

A	Adrenalina
AC	Adenilato Ciclasa
aFGF	Factor de crecimiento fibroblastico acido
AB/AM	Antibioticos y antimicóticos
AMPc	Monofosfato ciclico de adenocina
[AMPc] _i	Concentración Interna de AMPc
bFGF	Factor de crecimiento fibroblastico basico
BSA	Albumina bovina
Ca ²⁺	Iones calcio
Ca ²⁺ -CRE	Elemento de Respuesta a AMPc y Ca ²⁺
CREB	Factor de Transcripción de Elemento de Respuesta a AMPc
CREB _κ	Cinasa Unida al Elemento de Respuesta a AMPc
CREB _β	Proteina Nuclear Unida al Elemento de Respuesta a AMPc
dbAMc	Dibutiril Monofosfato ciclico de adenocina
DG	Diacilglicerol
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELK1	Factor de Transcripción
FGF	Factor de crecimiento fibroblastico
FITC	Isotiocianato de fluoresceina
G	Proteína G
GC	Glucocorticoides
GDP	Guanosin Difosfato
GTP	Guanosin Trifosfato
IP ₃	Inositol trifosfato
IP ₃ R	Receptor a Inositol Trifosfato
K ⁺	Iones potasio
MAP2	Proteinas asociadas a microtubulos tipo 2
MAPK	Proteina Cinasa Activadora de la Mitosis
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Iones Sodio
NGF	Factor de Crecimiento Neural
NGF7S	Fracción del NGF con coeficiente de sedimentacion de 7S

NF-H	Neurofilamentos de Alto Peso Molecular
NF-L	Neurofilamentos de Mediano Peso Molecular
NF-M	Neurofilamentos de Bajo Peso Molecular
NFs	Neurofilamentos
NF68	Neurofilamentos 68 kDa
PBS	Solución de buffer de fosfatos y cloruro de sodio
Pd	Fosfodiesterasa
PK A	Proteína cinasa A (Dependiente de AMPc)
PK C	Proteína cinasa C
PK N	Proteína cinasa N (Dependiente de NGF)
PI-C	Fosfolipasa C
PI	Fosfatidilinositol
PIP ₂	Fosfatidilinositol Difosfato
PIP	Fosfatidilinositol Monofosfato
PIC _γ	Fosfolipasa C Gama
PNMT	Fenil etanolamin N metil transferasa
p ⁷⁵	Receptor de baja afinidad del NGF
RE	Reticulo endoplasmico
Shc	Proteína Acopladora del Complejo NGF-TrkA
SIF	Células pequeña intensamente fluorescentes
SA	Simpatoadrenales
TH	Tirosina hidroxilasa
trkA	Receptor de alfa afinidad del NGF
TPA o PMA	Forfol tetradecanoil acetato

RESUMEN

Las células cromafines de la glándula adrenal al exponerse *in vitro* al NGF o al dbAMPc se transdiferencian en células muy parecidas a las neuronas simpáticas, cuya principal característica es la formación de procesos o neuritas. Este proceso involucra un aumento de la expresión de proteínas del citoesqueleto (neurofilamentos) que son consideradas como marcadores neuronales. En este trabajo evaluamos la expresión de neurofilamentos de 68 kDa, como un indicador de la transdiferenciación de las células cromafines en un fenotipo similar al de las neuronas simpáticas. El análisis morfológico, previo a la evaluación de los neurofilamentos de 68 kDa, se realizó por inmunocitoquímica para la enzima PNMT y muestra que la disminución en el proceso de transdiferenciación de las células cromafines está estrechamente relacionado con la edad de los animales de los que se extraen estas células y la expresión de las proteínas de citoesqueleto se cuantificó utilizando una técnica de fluorescencia digital cuantitativa.

Los datos obtenidos indican que tanto el NGF7S como el dbAMPc aumentan el porcentaje de células cromafines que expresan PNMT+ y la longitud de los procesos formados por las mismas. Estos cambios están asociados con un aumento de la expresión de los neurofilamentos de 68 kDa, hasta alcanzar valores comparables a los de las neuronas simpáticas, con las que se hace una comparación. Estos cambios ocurren sin que las células cromafines dejen de sintetizar la enzima PNMT que las caracteriza.

También encontramos que el aumento en la expresión de los neurofilamentos de 68 kDa requiere de la presencia continua del NGF7S, es decir que una exposición transitoria al factor, no es un estímulo suficiente para que las células cromafines continúen avanzando en su transformación al fenotipo neuronal.

Por otro lado encontramos que la dexametasona, análogo del cortisol secretado por las células de la corteza adrenal, ejerce efectos inhibitorios sobre la acción del NGF7S pudiendo revertir los efectos neurogenizantes inducidos por el NGF7S.

En este trabajo demostramos que las células cromafines, tienen la plasticidad para transformarse de un fenotipo cromafin a neuronal y que ese fenotipo neuronal puede revertirse al fenotipo cromafin por medio de la dexametasona.

ANTECEDENTES

a) Diferenciación de las Células de las Crestas Neurales

Durante el desarrollo embrionario, los diferentes tipos de tejidos del organismo se forman a partir de complejos procesos mediante los cuales grupos celulares distintos siguen un programa dictado por el material genético que los lleva a especializarse para cumplir una determinada función. Este proceso se conoce como diferenciación celular y depende de señales intra y extracelulares que controlan la expresión de genes específicos.

Existen dos posibles programas de diferenciación, el primero, conocido como de diferenciación autónoma, se caracteriza por llevarse a cabo siguiendo un programa genético estricto e inalterable. El segundo tipo de programa, denominado diferenciación regulada por el entorno, es más plástico, y las señales provienen del microambiente que rodea a la célula. La contribución que tienen en el desarrollo estos dos tipos de programas varía entre especies y entre distintos tipos celulares de un mismo organismo.

El programa de diferenciación regulada por el entorno involucra la interacción entre células adyacentes y juega un papel crítico en el desarrollo del sistema nervioso central. Las interacciones locales entre células del sistema nervioso se llevan a cabo a través de la unión de moléculas señalizadoras extracelulares moléculas receptoras localizadas en la membrana de la(s) célula(s) blanco. Un complejo sistema de mensajeros intracelulares está involucrado en llevar a cabo la respuesta apropiada a estos mensajeros extracelulares. Un problema central de la neurobiología del desarrollo es entender los mecanismos celulares y moleculares que generan la diferenciación, la diversidad y la plasticidad del sistema nervioso. Las células que componen las crestas neurales constituyen uno de los ejemplos mejor estudiados. Estas células son pluripotenciales (es decir, pueden generar una gran variedad de tipos celulares) antes y un poco después de su migración del tubo neural. La figura 1 ilustra la progenie derivada de las células de la cresta neural.

Hasta ahora se desconocen los mecanismos por los que las células, inicialmente pluripotenciales eligen su destino final. Se ha sugerido que este evento puede producirse aleatoriamente, o bien que puede gobernarse por un programa genético que se enciende durante el desarrollo, ya sea por señales ambientales o por señales intrínsecas tales como como los factores de transcripción en coordinación con factores ambientales.

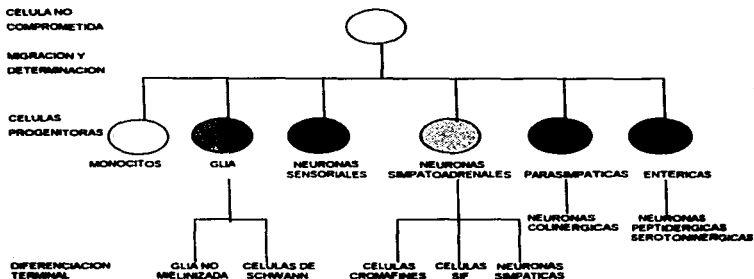


Figura 1 Tipos Celulares que se originan de las Crestas Neurales

Un grupo de células de la región dorsal del tubo neural al migrar siguen diferentes vías que originan varios linajes, entre ellos el linaje simpatoadrenal que es el objeto de interés de este trabajo (véase figura 2).

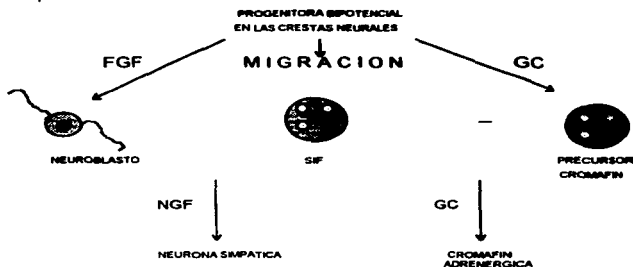


Figura 2 Diferenciación de la Células Progenitoras Simpatoadrenales

Cada población celular de las crestas neurales, muestra un destino específico que puede alterarse por cambios en el medio ambiente (Le Dourarin, 1982). La migración de las células del linaje simpatoadrenal se inicia ventralmente a partir del ápice del tubo neural hacia la aorta dorsal. Estas células se agregan y diferencian por un lado, en una cadena simpática primordial en la que hay células que coexpresan marcadores típicos de neuronas ó de células cromafines (localizadas al final del desarrollo en la médula adrenal). Las células que permanecen en el primordio de ganglio simpático pierden los marcadores cromafines, en tanto que las que continúan migrando más ventral y caudalmente dan origen al primordio de la glándula adrenal y pierden los marcadores neuronales. Por procesos de maduración y como resultado de la influencia de factores microambientales, las células simpatoadrenales terminan diferenciándose ya sea en células cromafines o en neuronas simpáticas (Doupe, 1965a).

Existe un tercer tipo de células, las llamadas células pequeñas intensamente fluorescentes (SIF, por sus siglas en inglés), también son miembros de este linaje y cuya fluorescencia se debe al alto contenido de catecolaminas. Al término del desarrollo, éstas células, poco abundantes y con características intermedias entre las de las neuronas simpáticas y las células cromafines, se localizan en los ganglios simpáticos. Los tres tipos celulares del linaje simpatoadrenal sintetizan y almacenan catecolaminas, aunque difieren en varias otras características. Por ejemplo, las neuronas simpáticas forman dendritas, cuyo citoesqueleto está formado por microtúbulos y neurofilamentos. Estos últimos, de hecho, son considerados como marcadores específicamente neuronales (ver apéndice 2). En cambio, las células cromafines, no forman procesos ni expresan neurofilamentos y además poseen la enzima fenil-etanolamin-N-metil transferasa (PNMT), que participa en la síntesis de adrenalina (A). Las células SIF en cultivo pueden interconvertirse fenotípicamente por señales ambientales ya sea en células cromafines o en neuronas simpáticas. Estas señales pueden ser los glucocorticoides (GC) o el factor de crecimiento neural (NGF), respectivamente (Jacobson, 1991). Se piensa que la presencia de estos dos factores durante el desarrollo embrionario determina el fenotipo alcanzado por las células del linaje simpatoadrenal.

La hipótesis de que las células cromafines y las neuronas simpáticas se originan a partir de un progenitor embrionario común ha recibido un fuerte apoyo por estudios que han demostrado que las células SIF pueden interconvertirse en uno u otro tipo celular, es decir *in vitro* pueden convertirse en neuronas simpáticas por exposición a NGF o en

células cromafines si se exponen a GC. (Doupe, 1985b). Si las células SIF son expuestas simultáneamente a la combinación de GC y NGF se favorece el fenotipo SIF, por lo que se ha propuesto que probablemente la diferenciación de las células cromafines y las neuronas simpáticas ocurra a través de una célula intermedia parecida a las SIF que podrían ser los progenitores embrionarios de ambos tipos celulares.

Al inicio de su diferenciación y migración, las células progenitoras simpatoadrenales carecen de sensibilidad al NGF, porque no expresan el RNA mensajero que codifica para su receptor (*trkA*). Este receptor es un componente esencial de la señal de transducción del NGF (ver más adelante). Se piensa que otros factores del medio ambiente, como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF; Green, 1987) y la interleucina 6 (Sato, 1988), favorecen *in vivo* la expresión de receptores a NGF (Stein, 1988). El bFGF puede inducir la proliferación y el crecimiento de neuritas de las células progenitoras simpatoadrenales *in vitro*, pero es incapaz de promover su sobrevivencia a largo plazo. Esto sugiere que el FGF promueve la proliferación y la diferenciación inicial de estas células, aumentando, a su vez la expresión de receptores para el NGF. Posteriormente, el NGF actuaría como un factor de diferenciación y sobrevivencia. El efecto del FGF puede mimetizarse por despolarización membranar. En las células cromafines *in vitro*, el factor de crecimiento fibroblástico induce proliferación y diferenciación neuronal inicial (Claude, 1988; Stein, 1988), sin embargo una vez establecidos estos cambios tempranos, este factor es incapaz de mantener la sobrevivencia, como lo hace el NGF (Stemple, 1988).

En 1985, Doupe demostró que las células cromafines *in vitro* expuestas a NGF por algunas semanas se transformaban en células morfológica y antigénicamente indistinguibles de verdaderas neuronas simpáticas (Doupe, 1985, véase también Unsicker, 1978). Este proceso constituye un ejemplo de transdiferenciación, fenómeno en el cual ocurre un cambio fenotípico, por cambios en la programación genética de las células, sin que para ello sea necesaria la síntesis de DNA o división celular. Las transformaciones que se llevan a cabo durante la transdiferenciación celular pueden en algunos casos ser en forma estable e irreversible, en ocasiones desaparecen totalmente las características de las células originales, sin que por ello se considere a las células resultantes como anormales. (Okabe, 1991). En el caso de las células cromafines, el NGF induce primeramente división celular y posteriormente la formación de neuritas (Lillien y Claude, 1985). Estos efectos se clasifican dentro de los efectos tempranos y tardios,

respectivamente de este factor. La conversión al fenotipo neuronal involucra la inducción de genes específicos de neuronas y la síntesis de *de novo* de proteínas (Anderson y Axel, 1986). Los efectos del NGF sobre las células cromafines pueden manifestarse incluso en células de animales adultos (Tischler, 1993). Una evidencia en favor del modelo de diferenciación neuronal de las células cromafines por NGF lo constituyen experimentos en los cuales se les inyectó crónicamente NGF a ratas preñadas. Este indujo en los embriones el reemplazo de las células cromafines por neuronas simpáticas (Aloe y Levi-Montalcini, 1979). Estos datos sugieren que el NGF es una de las señales ambientales de mayor importancia *in vivo* en el control de la diferenciación neuronal de las células de linaje simpatoadrenal. Todos los efectos mencionados sugieren fuertemente que el NGF es indispensable para la diferenciación y sobrevivencia de las células simpatoadrenales tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los efectos del NGF han sido estudiados con más detalle en células PC12, línea celular derivada de un tumor de médula adrenal de rata ampliamente empleadas como un modelo de diferenciación neuronal. En ausencia de NGF, estas células poseen propiedades fenotípicas similares a las de las células cromafines: Síntesis y liberación de catecolaminas y sensibilidad al NGF. Sin embargo, cuando son expuestas al NGF, dejan de dividirse e inician su diferenciación a células similares a las neuronas simpáticas. Esta diferenciación se acompaña del crecimiento de neuritas, la aparición de propiedades excitables, la síntesis y liberación de noradrenalina y la expresión de proteínas de citoesqueleto consideradas como marcadores neuronales (Romano, 1987; Aletá, 1989; Ista, 1993; Yang, 1996).

b) Antecedentes y Características del NGF

A mediados de 1948, Elmer Bueker y Victor Hamburger, encontraron luego de transplantar un sarcoma de ratón en la membrana coraalantoidea en un embrión de pollo, que los ganglios sensoriales y simpáticos del sistema nervioso periférico incrementaban su tamaño. Simultáneamente los procesos neuronales de ganglios vecinos invadían el tumor y se ramificaban masivamente. Rita Levi-Montalcini y Victor Hamburger postularon que el tumor elaboraba una sustancia difusible que afectaba el crecimiento neuronal que nombraron "factor de crecimiento neural (NGF)".

Estudios posteriores apoyaron la idea de que este factor era difusible. Usando técnicas *in vitro* para mantener ganglios simpáticos y sensoriales en presencia del tumor

o extractos de éste, fue posible replicar los resultados obtenidos *in vivo*, observándose que el crecimiento de neuritas por los ganglios se incrementaba considerablemente.

Levi-Montalcini y Booker en 1960 trataron ratones recién nacidos con anticuerpos contra NGF y observaron que estos impedían el desarrollo normal de las neuronas simpáticas y periféricas.

Cohen en 1960, logró extraer, purificar y caracterizar al NGF a partir de la glándula submaxilar de ratón macho adulto que contiene considerables cantidades del mismo y del cual se han deducido sus propiedades físicas y químicas (Cohen, 1960). Una característica importante es la posibilidad de aislarlo en dos formas, la primera referida como NGF7S, que es una molécula de alto peso molecular, con dos copias de tres polipéptidos α , β y δ y la segunda preparación conocida como NGF2.5S que es biológica e inmunológicamente indistinguible de la subunidad β que se disocia del NGF7S. La actividad biológica del NGF reside en la subunidad β que es un dímero unido covalentemente, formado por dos péptidos idénticos de 118 aminoácidos. Las subunidades α y β (figura 3) del complejo 7S son características de la glándula submaxilar de ratón, ya que no se sintetizan en esta misma glándula en otras especies.

En 1989 Barde definió el término "factor neurotrófico" restringiéndolo a proteínas involucradas en la regulación de la sobrevivencia de las neuronas durante el desarrollo. Actualmente se sabe que los factores neurotróficos tienen otros efectos, además de existir gran cantidad de datos que sugieren que otros factores como el factor de crecimiento fibroblástico, el factor de crecimiento epidermal, el insulínico y las neurotrofinas 2, 3, 4 y 5 pueden mimetizar algunas funciones del factor neurotrófico. Por razones prácticas, se considera que para definir un factor neurotrófico, deben excluirse moléculas de membrana como receptores o aquellas que afectan al adhesión y sobrevivencia de las neuronas como son las hormonas tiroideas, esteroides, gangliósidos, etc. Por lo que se ha sugerido la siguiente definición: **Los factores neurotróficos son proteínas endógenas que regulan la sobrevivencia, crecimiento, plasticidad morfológica y síntesis de proteínas involucradas en diferentes funciones en las neuronas.** (Barde, 1989).

El NGF ejerce sus efectos en las células cromafines en dos fases, la primera incluye el proceso de mitosis o división celular y la segunda el inicio de la formación de neuritas. Se considera que la fase temprana involucra la expresión de genes y la fase

tardía se manifiesta con la síntesis de *novoo* de proteínas, la formación y mantenimiento de neuritas asociada con la diferenciación y la sobrevivencia celular.

A continuación la tabla 1 muestra en orden cronológico estudios sobre los efectos que diferentes factores ejercen en células PC12, neuronas simpáticas y sensoriales, y células cromafines.

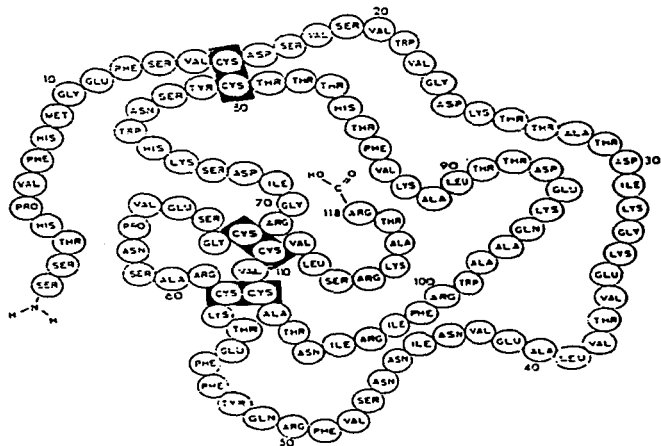


Figura 3 Secuencia de Aminoácidos de la Subunidad beta del NGF7S

Tabla 1 Cronología de la Investigación de los Efectos de Diferentes Factores sobre Células PC12, Neuronas Simpáticas, Neuronas Sensoriales, y Células Cromafines

1978	Schubert	El NGF incrementa los niveles de AMPc en las PC12, neuronas simpáticas y sensoriales, e induce el crecimiento de neuritas
1979	Fraizer	El AMPc mimetiza los efectos del NGF en neuronas simpáticas y sensoriales
1981	Unsicker	La resiembra de cromafines previamente expuestas a NGF o AMPc favorece su agregación y el número de ellas que forman neuritas es menor
1981	Ziegler	La resiembra de cromafines previamente expuestas a NGF o AMPc favorece su agregación y el número de ellas que forman neuritas es menor como ocurre con las PC12
1981	Gunning	La exposición simultánea a NGF y AMPc de cromafines, PC12 potencia el crecimiento de neuritas.
1982	Burnstein	El PMA activa PK-C y potencia el crecimiento de neuritas en las PC12 previamente expuestas a NGF
1982	Green	El aumento en las concentraciones internas de Ca ⁺⁺ son necesarias para la generación de neuritas y estabilización de filamentos de actina
1985	Heideman	La exposición simultánea a NGF y AMPc de las cromafines, PC12 y neuronas favorece su diferenciación.
1985	Heideman	En las PC12 el AMPc potencia los efectos del NGF e induce la extensión de neuritas
1987	Moskal	El PMA activador de PK-C induce el crecimiento de neuritas en el SNC
1988	Rydel	El NGF y AMPc actúan sinérgicamente, favoreciendo la sobrevivencia a largo plazo y la formación de neuritas en neuronas simpáticas y sensoriales de rata
1988	Rydel	El AMPc favorece la sobrevivencia a largo plazo y la formación de neuritas en las neuronas simpáticas y sensoriales de rata independientemente del NGF.
1988	Wakabe	La combinación de AMPc y NGF favorece la sobrevivencia a largo plazo de las neuronas simpáticas y sensoriales de pollo, así como también el AMPc induce la diferenciación y el crecimiento de neuritas en las células cromafines y en las células PC12
1988	Hall	La esfingosina inhibidor de PK-C bloquea el crecimiento de neuritas inducido por el NGF en las

		PC12
1988	Tischler	La diferenciación y el mantenimiento del crecimiento de neuritas inducidas por el AMPc en las cromafines es similar al observado en las PC12
1988	Koisumi	La staurosporina inhibe el crecimiento de neuritas en la células PC12
1989	Cho	El AMPc induce la extensión de neuritas de <i>novo</i> en las cromafines, PC12 y neuronas simpáticas.
1989	Golubeva	El NGF activa la adenilato ciclasa y disminuye la actividad de la GTPasa sin aumentar significativamente los niveles de AMPc intracelular
1989	Maher	El ortovanadato un inhibidor de fosfatasa que incrementa la fosforilación de tirosinas no es capaz de inducir por si solo el crecimiento de neuritas en las células PC12
1989	González	El AMPc estimula en las PC12 y cerebro la expresión de genes por activación de la PK-A
1990	Green	La 6-tioguanina inhibe la Pk-N y el crecimiento de neuritas en las PC12, neuronas simpáticas y sensoriales.
1990	Pacheco	El AMPc induce cambios pronunciados y rápidos en el fenotipo de las células cromafines de ratas fetales en cultivo
1990	Tischler	En las cromafines, PC12 y neuronas simpáticas el AMPc potencia los efectos del NGF
1990	Rogers	La entrada de Ca^{2+} inducida por Bay K-8644 en neuronas de ganglio cervical superior potencia el crecimiento de neuritas
1991	Meakin	Los efectos del NGF se deben al aumento en los niveles intracelulares de AMPc y/o activación de PK-A
1991	Tischler	En las cromafines, PC12 y neuronas simpáticas el AMPc potencia los efectos del NGF
1991	Catt	El NGF activa la PLC γ y fosforila fosfolípidos de membrana formando dos segundos mensajeros el diacilglicerol e IP $_3$.
1991	Herman	El AMPc induce el efecto neuritogénico, mitogénico y de sobrevivencia en las cromafines previamente expuestas a NGF y PMA sin embargo este último favorece el fenotipo cromafín. Si han sido expuestas previamente a NGF o forskolin se promueve la formación y el mantenimiento de neuritas. Las cromafines expuestas a PMA por dos semanas y sembradas con PMA, forskolin o su combinación, adquieren el fenotipo neuronal.
1991	Vetter	La PLC γ interactúa con trkA que activa la vía Ras-MAPK involucrada en la diferenciación de las PC12

1991	Schaneng-King	La unión de NGF a trkA en las PC12 fosforila tirosinas por la actividad del propio receptor
1991	Sheng	El Ca^{++} media la inducción de genes en respuesta a la depolarización que genera a través de CREB que funciona como un factor de transcripción regulado por Ca^{++}
1992	Herman	Las cromafines expuestas por dos semanas a NGF se transdiferencian en neuronas se vuelven altamente dependientes de él
1992	Berg	La fosforilación en residuos de tirosina por el TrkA se inhibe con 5' metiltioadenosina así como el crecimiento de neuritas y a TrkA
1992	Ohmichi	La cinasa IP_3 interactúa con trkA que activa la vía Ras-MAPK involucrada en la sobrevivencia de las PC12
1993	Obermeier	La proteína adaptadora Shc interactúa con trkA que activa la vía Ras-MAPK involucrada en la diferenciación de las PC12
1993	Chen	En las PC12 tratadas con NGF se fosforila MAPK y se transloca al núcleo en donde diversos factores de transcripción son sus substratos.
1994	Berridge	El DG estimula la PK-C que junto con el Ca^{++} activan la vía Ras-MAPK en las PC12 tratadas con NGF
1994	Marshall	El GTP activa Ras y fosforila Raf en las PC12 tratadas con NGF induciendo la diferenciación celular.
1994	Cowley	Raf fosforila y estimula la proteína cinasa MEK1 cuya activación es necesaria y suficiente para ciertos aspectos de la diferenciación y crecimiento neuritas en las PC12 tratadas con NGF
1994	Frodin	La adición simultánea de NGF y AMPc potencia la activación de MAPK
1994	Frodin	El AMPc y PMA tienen acción sinérgica activan la PK-C que estimula a ERK1 y MAPK
1995	Young	La adición simultánea de NGF y AMPc potencia la activación de MAPK que induce la diferenciación en las PC12
1995	Rusanescua	La entrada de Ca^{++} a través de canales voltaje dependientes induce el crecimiento de neuritas en las PC12 por activación de la vía Ras-MAPK y la inducción de genes de respuesta temprana.
1995	Bonni	Una vez que el NGF activa la vía Ras-MAPK fosforila CREB que selectivamente activa genes de expresión tardía que tienen sitios de unión a CREB en regiones reguladoras
1996	Sun	El AMPc estimula la expresión de genes a través de la fosforilación de CREB
1996	Nakamura	La proteína adaptadora Shc en neuronas del sistema nervioso central y PC12 activa MAPK dependiente de Ras

c) Receptores del NGF

El mecanismo por el cual el NGF ejerce sus efectos no está bien entendido pero es claro que el NGF se une a receptores específicos de la membrana. En algunos casos el complejo NGF-receptor se internaliza y transporta hasta el núcleo (Yankner y Shooter, 1979). En todos los casos la unión del NGF con su receptor induce cambios en los niveles de varios sistemas de segundos mensajeros que determinan a su vez cambios en la expresión de genes, en la síntesis de proteínas y aumento en el crecimiento de neuritas y en la sobrevivencia celular.

La caracterización de los receptores de membrana para el NGF por Sutter en 1979 identificó un número pequeño de receptores de alta afinidad y otro de menor, dando origen a la nomenclatura de receptor lento o rápido, que corresponden al de alta (HNGFr o *trkA*) y de baja afinidad (LNGFr o *p75*), respectivamente. Se ha observado que el receptor de alta afinidad es el responsable de la actividad biológica del NGF y de su internalización.

Barbacid en 1993, propuso algunos modelos posibles del funcionamiento de estos receptores para el NGF sobre todo para el de alta afinidad que es a través del cual se inicia la señal de transducción.

Un modelo (figura 4a) propone que el receptor asociado a *trkA* requiere de la expresión de *p75*, esto permitió diseñar un modelo en el que el receptor de alta afinidad podría ser un complejo heterodimérico formado por una unidad *p75* y otra *trkA*, aunque no hay evidencias bioquímicas de su funcionamiento y en células PC12 mutantes en las que solo se induce la expresión de *p75* responden al NGF generando sitios de unión de alta y baja afinidad.

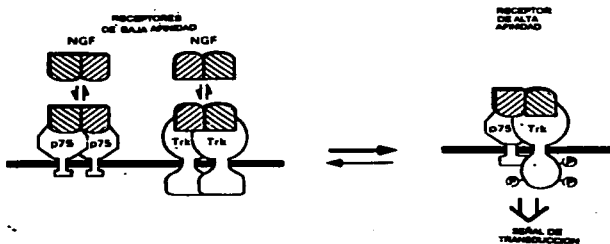
Un segundo modelo (figura 4b) propone que el receptor puede coexistir en un equilibrio dinámico entre estructuras monoméricas y homodiméricas, el complejo homodimérico produce la fosforilación de los residuos de tirosina que son producto de la unión del NGF con alta afinidad.

Actualmente se sabe que el *trkA* es el receptor para el NGF responsable tanto de la internalización del NGF y como el productor de la transducción de la señal.

Una vez unido el NGF a *TrkA* en las células PC12 y neuronas, se produce su dimerización, siendo el sustrato de este receptor las moléculas de tirosina, los primeros sitios de fosforilación son tres tirosinas localizadas dentro de la cinasa y posteriormente dos del dominio externo. Las tirosinas fosforiladas por *TrkA* sirven como un andamio

para reclutar proteínas adaptadoras y los aminoácidos de su alrededor como sitio de reconocimiento de moléculas efectoras.

a)



b)

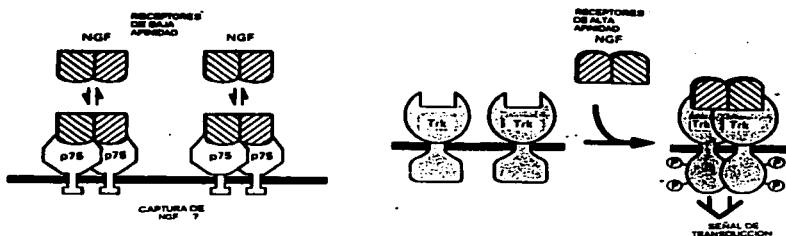


Figura 4 a) Modelo que Propone al Receptor de Alta Afinidad como un Complejo Heterodimérico b) Modelo que propone que trkA Coexiste en un Equilibrio Dinámico entre Estructuras Monoméricas y Homodiméricas.

d) Señales de Transducción Inducidas por la Unión NGF-trkA

Uno de los primeros eventos intracelulares que el NGF produce, es la modificación del estado de fosforilación de proteínas citoplásmicas y nucleares como: la tirosina hidroxilasa, una proteína nuclear de 30 kDa, una proteína soluble de 100 kDa ó Nsp100, y otra de 70 kDa, la sinapsina (Romano, 1987), proteínas de neurofilamentos (Aletta, 1989), proteínas de citoesqueleto (Landreth, 1987) y la proteína ribosómica S6 (Mutoh, 1992). El mecanismo de fosforilación de estas proteínas puede estar mediado por la activación de: el propio receptor de NGF trkA, la proteína cinasa C (Pk-C), la proteína cinasa dependiente de AMPc (Pk-A) o una proteína cinasa asociada a microtúbulos (Pk-MAP) (Sano, 1990). El mecanismo por el cual estas cinasas se activan involucra más de una vía de segundos mensajeros y hasta terceros mensajeros, como se muestra mas adelante en la figura 6.

d.1) Via Ras-MAPK

La unión de Shc al sitio que activa trkA inicia la vía conocida como de la cinasa Ras-MAP la cual es crítica para que el NGF induzca la diferenciación de las PC12. Shc, es una proteína adaptadora que participa en la activación de Ras en respuesta a factores de crecimiento, tiene dos dominios de unión a fosfotirosinas: un dominio SH2 en el extremo carboxil y otro (PBI) en el extremo amino (Ricketts, 1996). En neuronas y PC12, Shc esta involucrada en la activación de MAPK dependiente de Ras. Mientras la participación ubicua de Shc como un molécula adaptadora en la señal de trasducción se incrementa en el tejido nervioso, su expresión es sorprendentemente baja en el cerebro (Nakamura, 1996). Shc fosforila específicamente la tirosina 490 de trkA y sirve como proteína adaptadora que media la asociación de proteínas adicionales, la unión del dominio SH2 de Shc a la proteína Grb2 y de esta ultima con el factor de intercambio Sos, que intercambia GDP por GTP, activan a Ras. No se sabe si el complejo trkA, Shc, Grb2 y Sos, tiene únicamente la función de permitir que Sos acerque a la membrana plasmática a Ras. La translocación de estas proteínas del citoplasma a la membrana provocan la activación Ras, que es una proteína G de membrana activada por GTP (McCormick, 1994). La unión de GTP a Ras presente en las PC12 tratadas con NGF activa la cinasa Raf (cinasa de serina treonina) (Marshall, 1994), la activación de esta forma de Ras es crítica para que las neurotrofinas induzcan la diferenciación celular.

Al inyectar la forma activa de Ras a las PC12, se produce la diferenciación celular mimetizando los efectos del NGF (Bar-Sagi, 1985) y la introducción de anticuerpos contra Ras en las PC12 inhiben su diferenciación aún adicionando NGF (Hagag, 1986). Cuando Ras, Raf y trkA se coexpresan en un sistema de baculovirus Raf fosforila tirosinas, sin embargo la fosforilación de Raf que ocurre en residuos de tirosina no se ha detectado en PC12 estimuladas con NGF.

Una vez activada Raf, fosforila y estimula la actividad de una proteína cinasa MEK1 cuya activación es necesaria y suficiente para ciertos aspectos de la diferenciación y crecimiento de neuritas de las PC12, mientras la expresión de la forma negativa bloquea este efecto (Cowley, 1994). El único sustrato conocido de MEK1 es la proteína activadora de la mitosis MAPK, que es una cinasa reguladora de señales externas (ERKS). En las PC12 tratadas con NGF, MEK activada fosforila en residuos de treonina y tirosina de MAPK y la transloca al núcleo, los sustratos de MAPK son diversos factores de transcripción y la cinasa ribosómica S6 (Chen, 1993).

La Rsk (enzima que cataliza al fosforilación de S6) se han caracterizado en PC12 y fosforila factores de transcripción como Elk-1 y CREB, ambos regulan la expresión de genes de respuestas temprana y tardía (Blenis, 1993), se ha propuesto que esta vía adaptada al sistema nervioso genera proliferación y diferenciación celular.

Marshall en 1995, mostró numerosas evidencias de que el NGF y EGF inducen la vía Ras-MAPK con un curso temporal y cinética diferente en las PC12. Mientras el NGF activa la vía Ras-MAPK por varias horas en forma sostenida, el EGF la activa solo transitoriamente (Qiu, 1992). A esto se debe que cuando el receptor para EGF se expresa en PC12, se prolonga el tiempo para inducir Ras-MAPK y la diferenciación. Esta es la evidencia de que la cinética de activación es crítica para determinar la respuesta biológica.

La diferencia en la duración para que el NGF y EGF induzcan la respuesta Ras-MAPK, refleja diferencias a nivel de receptor, en los que fosfotirosinas específicas dentro del receptor a EGF que inician la vía de la cinasa Ras-MAPK se defosforilan rápidamente, mientras que las del TrkA se defosforilan más lentamente.

La capacidad del NGF para activar Ras-MAPK por varias horas puede explicar cómo este factor induce la diferenciación neuronal, la activación sostenida por la señal de Ras en las PC12 tratadas con NGF puede resultar en la fosforilación sostenida del factor transcripcional CREB, que selectivamente activa genes de expresión tardía que

tiene sitios de unión a CREB en regiones reguladoras (Bonni, 1995). Estos genes se activan en respuesta a NGF pero no a EGF y probablemente codifican para proteínas que contribuyen a la adquisición del fenotipo neuronal.

Al mutar *trkA* e interactuar con Shc se reduce la capacidad del NGF para inducir la actividad de MAPK (Stephens, 1994), se ha demostrado que en PC12 que no expresan *trkA* y no responden a NGF (Loeb, 1991), al transfectarse con *TrkA* normal se restaura la respuesta al NGF y se induce Ras, MAPK y la diferenciación neuronal. Cuando el *TrkA* mutado e incapaz de interactuar con Shc se introduce a PC12 sin *TrkA*, el tratamiento con NGF también induce Ras y MAPK, lo que sugiere que hay otras vías para inducir Ras.

Un mecanismo alternativa para activar Ras es la inducción de la PIC γ (fosfolipasa C γ) que fosforila la tirosina 785 (Y785) de *trkA*, al unirse Shc y Y785 fosforilada a Y490 de *trkA* que se ha mutado por fenilalanina, no se induce la señal Ras-MAPK en respuesta al NGF, lo que sugiere que al activar *trkA* e interactuar con PIC γ , una señal específica se transduce y activa Ras, la asociación Ras y PIC γ resulta en la fosforilación de tirosina y activación de PIC γ (Vetter, 1991).

La PIC γ activa genera diacilglicerol e inositol trifosfato (IP) $_3$, ambos se producen por la hidrólisis de fosfolípidos de membrana (Calt, 1991) y aumentan de 2 a 5 veces su concentración 5 min después de haberse adicionado NGF a las PC12 (Hasley y Jhonson, 1989) decayendo ligeramente después de 30 min (Altin y Bradshaw, 1990). El IP $_3$ al unirse a su receptor en el retículo endoplásmico provoca la liberación de Ca $^{2+}$ al citoplasma. Por otro lado se propone que el diacilglicerol estimula la PK-C, que por sí misma o junto con el Ca $^{2+}$, llevan a cabo la activación de la vía de la cinasa Ras-MAP en las PC12 tratadas con NGF (Berridge, 1993).

La delección de *trkA* en una secuencia altamente conservada elimina la activación de SNT sin afectar la fosforilación de *trkA*, Ras, PIC γ y la cinasa IP $_3$ por lo que SNT define otra vía de la actividad antimitogénica y neuritogénica del NGF (Peng, 1995). Una posibilidad es que SNT funcionara como un regulador transcripcional de genes que controlan el ciclo celular (Rabin, 1993).

d.2) Participación del Ca^{2+}

Rusanescu y cols. en 1995, encontraron que la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes inducen el crecimiento de neuritas en las PC12 y que existe una señal de transducción que el Ca^{2+} promueve que causa la activación de tirosinas cinasas y la fosforilación de tirosinas que resultan en la formación del complejo Shc/Grb2 que lleva a la activación de Ras y MAPK y consecuentemente la inducción de genes de respuestas tempranas.

El Ca^{2+} también ha sido implicado en los procesos de diferenciación en las PC12 ya que el NGF induce aumento de concentración de Ca^{2+} (Schubert, 1991; Lazarovich, 1998) y la liberación de norepinefrina en las células PC12 (Nikodijevic, 1978). El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ es necesario para la generación de neuritas (Greene y Tischler, 1982), la estabilización de los filamentos de actina (Lankfor, 1989) y la regulación de los conos de crecimiento (Kater, 1991). Se ha propuesto que la entrada de Ca^{2+} en las neuronas del ganglio cervical superior inducido por el agonista de canales de calcio Bay K-8644 potencia el crecimiento de neuritas (Rogers, 1990). En las células PC12 se incrementa la captura de Ca^{2+} después de 5 min de la adición de NGF. Esta entrada de Ca^{2+} puede inhibirse por bloqueadores de canales tipo L, por lo que se ha propuesto a estos canales como la vía de entrada de Ca^{2+} .

d.3) Participación de Fosfolípidos y Activación de PKC

La estimulación del metabolismo de fosfolípidos es un evento temprano en la señal de transducción activada por NGF como lo sugiere la rápida incorporación de $^{32}PO_4$ en el fosfatidilinositol estimulada por NGF en neuronas del ganglio cervical superior de rata (Lakshmann, 1978) y de fosfatidilcolina en las células PC12 (Traynor, 1982). Contreras y Guroff en 1987 mostraron que esta hidrólisis de los fosfolípidos de membrana para producir IP_3 es dependiente de la concentración extracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_o$) y que el aumento en la producción de IP_3 en las células PC12 y en las neuronas del ganglio cervical superior después de la adición de NGF es también responsable del incremento en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), además de incrementarse la actividad de la PkC (Cremis, 1986) que junto con el diacilglicerol (Nishizuka, 1988) regulan la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico al tiempo que se inducen otros metabolitos o potenciales segundos mensajeros (Catt, 1991). Existen

evidencias de que el IP_3 también participa en la entrada de Ca^{2+} por la membrana plasmática (Putney, 1990), desconociéndose como se regula esta entrada, pero sin duda es por una vía que conecta el espacio extracelular con el retículo endoplásmico de donde se libera Ca^{2+} (Berridge, 1990).

La adición de forbol tetradecanoil acetato (TPA o PMA), activador de Pk-C, potencia el crecimiento de neuritas en las células PC12 expuestas a NGF (Burnstein, 1982) e induce el crecimiento de éstas en neuronas en cultivo del sistema nervioso central obtenidas de cerebros de ratas fetales (Moskal, 1987). Por el contrario, la esfingosina, un inhibidor irreversible de la Pk-C bloquea el crecimiento de neuritas inducido por el NGF en las células PC12 (Hall, 1988). Sin embargo cuando la actividad de Pk-C se elimina por exposición prolongada de las células PC12 a esteres de forbol (Matthies, 1987) el crecimiento de neuritas por el NGF no se inhibe, lo cual sugiere que este proceso no depende únicamente de Pk-C (Reinhold, 1989).

Un grupo de genes llamados TIS cuya expresión se induce por PMA (Lim, 1987), pueden ser activados por las concentraciones fisiológicas de IP_3 y diacilglicerol (Nishizuka, 1986), y responden a factores de crecimiento que hidroliza fosfolípidos de membrana y producen IP_3 , DG y aumenta la $[Ca^{2+}]_i$. El NGF y el PMA aumentan las concentraciones intracelulares de sodio que potencian el crecimiento de neuritas e induce los genes TIS en las células PC12 (Kujubu, 1987), los que participan en los mecanismos tempranos de acción de los factores neurotróficos. Por otro lado el EGF tiene efectos mitógenos en las PC12 e induce el crecimiento de neuritas (Schubert, 1978), sin inducir la expresión de genes TIS (Kijubu, 1987). Uno de los genes TIS, el *c-fos* codifica para una proteína altamente fosforilada de 380 aminoácidos que se localiza en el núcleo, donde interactúa con miembros de proteínas de la familia *jun*. Las proteínas FOS y JUN forman una proteína activador de la transcripción de promotores, estos genes son importantes en la regulación de la transcripción de otros que controlan la proliferación y diferenciación celular (Sheng, 1990).

d.4) Vías Independientes de Ras

Varias respuestas fenotípicas inducidas por neurotrofinas ocurren independientemente de Ras. Se ha sugerido una vía por la cual el NGF promueve la excitabilidad eléctrica, aumenta la sobrevivencia y disminuye la proliferación celular. El NGF aumenta la actividad eléctrica en las PC12 regulando la transcripción de los

genes para canales de sodio, esta respuesta transcripcional ocurre aproximadamente después de 5 h de adición del NGF por un mecanismo independiente de Ras (Darcangelo, 1993). Se ha demostrado que la transcripción de canales de sodio se puede inducir por un pulso breve de NGF y también por γ interferón (Toledo-Aral, 1995). Este hallazgo da la posibilidad de que la inducción de los genes de canales de sodio pueden estar mediados por la vía Jak-STAT (tirosina cinasa-transductor de señal y activador de transcripción).

Otra vía independiente de Ras implicada en la sobrevivencia de las PC12 es la de la cinasa IP_3 (que es un heterodímero de 85kDa con un dominio SH2, una subunidad reguladora y otra catalítica encargada de la fosforilación del anillo inositol en la posición 3') que fosforila la proteína SNT (del inglés, *suc associated neurotrophic factor induced tyrosine phosphorylated target*) dependiente de TrkA pero no de Ras, una vez fosforilada SNT se transloca al núcleo, donde funciona como factor que regula la transducción y la transcripción de genes que controlan el ciclo celular. Al adicionar inhibidores de la cinasa IP_3 , se promueve la apoptosis en las PC12 aun en presencia de NGF sugiriendo que su función es promover la sobrevivencia celular. La cinasa IP_3 forma parte de la señalización retrograda neuronal, es decir que es parte importante en el transporte de vesículas de membrana de la terminal axónica que es donde el complejo NGF-TrkA al ser internalizado activa la cinasa IP_3 .

e) Señales de Transducción Inducidas por p75

Además de la unión de las neurotrofinas a su receptor específico, éstas interactúan con un receptor común p75 (Rodríguez, 1992), al expresarse en células que responden a neurotrofinas ha sido implicado en la apoptosis (Rabizadeh, 1993) y la migración celular (Anton, 1994), y parece no ser necesario para muchos de los aspectos de las señales de las neurotrofinas. Esto lo sugieren varias evidencias, la primera es que algunas células que responde a neurotrofinas que expresan TrkA pero no p75 se diferencian (Knusel, 1994) segundo es que las PC12 mutantes que no expresan TrkA y solo expresan p75 no se diferencian en respuesta al NGF (Loeb, 1991) y tercero es que el NGF mutando que puede unirse únicamente al receptor TrkA y no a p75 pueden iniciar la diferenciación neuronal de las PC12 (Ibáñez, 1992).

No obstante que p75 no se requiere para la señal de neurotrofinas, su presencia modula la respuesta celular del NGF, por ejemplo la presencia de p75 parece aumentar

la sensibilidad de *trkA* al NGF. Esto ha sido demostrado porque en neuronas sensoriales de ratón cuyo gene de *p75* se ha eliminado requiere de altas concentraciones de NGF para sobrevivir y en una curva dosis-respuesta la presencia de *p75* potencia la respuesta al NGF. Además la coexpresión de *p75* y *trkA* en células precursoras neuronales, incrementa la fosforilación de *trkA* y aumenta la respuesta biológica del NGF cuando se compara con células que solo expresan *trk* (Verdi, 1994). Cuando la unión de NGF a *p75* se inhibe selectivamente, la unión de NGF a *trkA* también se reduce, así como otras respuestas biológicas típicas de las PC12 expuestas a NGF (Barrer, 1994).

En un estudio con fibroblastos 3T3 transfectados con el receptor *trkA* y la molécula *p75* mutada en un dominio extracelular, se encontró incrementada la sensibilidad de *trkA*. Sin embargo, no se sabe si *p75* modula la función de *TrkA* afectando la función del receptor directamente o activando otra vía, una posibilidad de que *p75* por sí mismo produzca una señal, ya que el pegado del NGF a *p75*, en ausencia de *trkA*, activa la vía de esfingomielinasa (Dobrowsky, 1994) y también genera respuestas biológicas específicas como cambios en la adhesión celular (Itoh, 1995).

La vía de la esfingomielinasa se caracterizó originalmente en la vía originada por TNF α y esto se debe a que *p75* está relacionado estructuralmente con el receptor *p55* del TNF α (Smith, 1994), no es sorprendente entonces que la activación de *p75* sea por la misma vía. El TNF α unido a su receptor produce la activación de una esfingomielinasa asociada a la membrana, que parte a la esfingomielina y produce ceramida y fosfololina. La ceramida se une y activa una proteína cinasa de 100 kDa y activa una cinasa de serina-treonina que a la fecha no se ha clonado (Joseph, 1994).

f) Características del dbAMPC y Señales de Transducción

El AMP es un segundo mensajero que también regula la transcripción y expresión de genes tempranos de a través de la fosforilación de factores de transcripción y represores. Los genes de respuesta tardía se inducen dependiendo de la síntesis lenta de proteínas después de la inducción de los genes de respuesta temprana, pero el mecanismo que lo regula se desconoce.

Existen abundantes evidencias de que el AMP cíclico (AMPC) tiene efectos similares a los del NGF sobre la diferenciación neural, en células PC12, neuronas simpáticas, neuronas sensoriales y células cromafines. En estos estudios se han utilizado análogos como el dibutilil AMPC (figura 5) que son altamente permeables en la

membrana, y una vez dentro de la célula forman dos derivados monobutíricos, uno de ellos inactiva a la fosfodiesterasa e incrementa la concentración intracelular del AMPc(O'Neill, 1975).

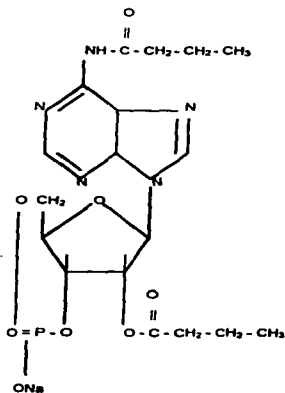


Figura 5 Estructura Molecular del dbAMPc (N⁶, 2'-O-Dibutiril Adenosin 3':5' Monofosfato Cíclico)

No obstante, el AMPc es solo uno de los múltiples mensajeros que participan durante la transducción de la señal iniciada por la unión del NGF a su receptor. (véase la tabla 1). Como se menciona los eventos bioquímicos promovidos por el NGF inducen cambios en el ciclo celular, neuritogénesis y sobrevivencia, que se manifiestan como alteraciones en la expresión de genes. Se ha observado que análogos de AMPc inducen la formación de procesos (Schubert, 1978), potencian el crecimiento de neuritas si se adiciona junto con NGF (Gunning, 1981; Heidermann, 1985; Frodin, 1994) y potencia la activación de la MAPK (Frodin, 1994, Young, 1994).

También se ha demostrado que la cinasa reguladora de señales extracelulares (ERK-1) y la proteína cinasa activador de la mitosis (MAPK), se activan/fosforilan en las PC12 en respuesta a señales extracelulares fosfodiesterasa (Young, 1994).

El AMPc estimula la expresión de numerosos genes a través de la fosforilación de CREB en la serina 133, la fosforilación en este sitio induce la expresión de genes específicos promoviendo la interacción entre CREB y la proteína nuclear CBP, sin embargo esta unión no es suficiente para la respuesta de transcripción del AMPc (Sun, 1995).

Se ha propuesto que la activación sostenida de la MAPK es necesaria para la diferenciación de las PC12, esa diferenciación puede inducirse por el CPT-AMPc (análogo de AMPc) que activa MAPK, también puede activarse por agentes que actúan a través de la adenilato ciclasa (Young, 1994). Por otro lado el AMPc también estimula en las PC12 y en el cerebro la expresión de genes por la activación de la PK-A (González, 1989) y esta media la fosforilación en Serina 133 del factor nuclear CREB. La transcripción dependiente de AMPc y la fosforilación de CREB es máxima después de 30 min y disminuye entre 4 y 6 hs después (Armstrong, 1995).

Se ha propuesto que el mecanismo por el cual Ca^{2+} media la inducción de genes en respuesta a la depolarización de la membrana es a través de CREB que ha demostrado funcionar como un factor de transcripción regulado por Ca^{2+} , CREB se fosforila en la serina 133 después de la depolarización de la membrana, al mutar este sitio, se incapacita a CREB a responder a Ca^{2+} , lo que sugiere que una señal eléctrica se transduce al núcleo, donde CREB funciona integrando las señales de Ca^{2+} y AMPc (Sheng, 1991). La figura 6 muestra las diferentes vías de transducción que se activan en las células por señales externas como el NGF, AMPc y Ca^{2+} , y que participan en la división, sobrevivencia y diferenciación de las células PC12, neuronas simpáticas y células cromafines

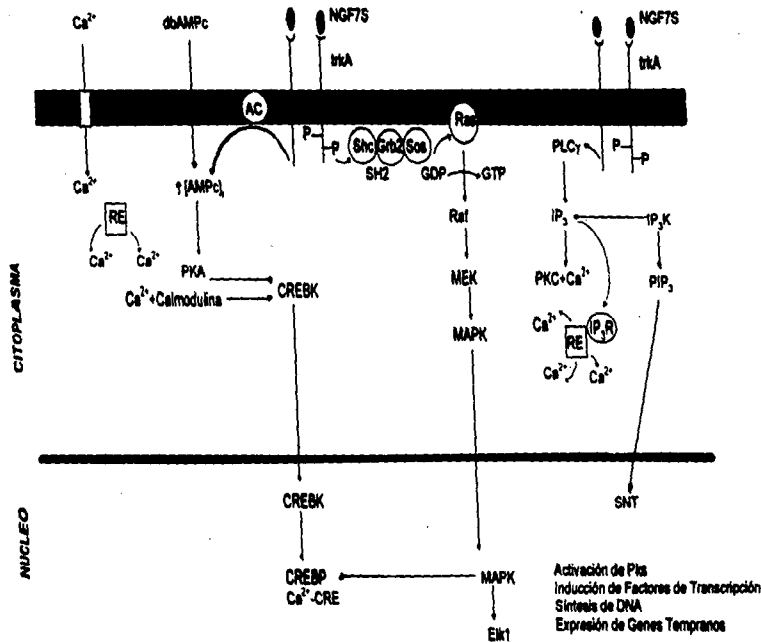


Figura 6 Transducción de Señales Inducidas por NGF7S, dbAMPc y Ca²⁺

[Ca²⁺], Iones calcio; dbAMPc, 8-Br-cAMP cíclico; NGF7S, Factor de crecimiento neural 75; trkA, Receptor de Alta afinidad para NGF; AC, Adenilato ciclasto; PLCγ, Fosfolipasa Cγ; CREBK, Fosforilación de CREB; EIk1, Factor de transcripción; SNT, Factor de transcripción de genes que controlan el ciclo celular; [AMPc], Aumento en la concentración de AMPc intracelular; IP₃, Inositol trifosfato; IP₃R, Canal de IP₃; IP₃R, Receptor para IP₃; PKC, Proteína quinaso C; RE, Elemento regulador; MAPK, Kinasa de la proteína asociada a mitosis; Ras, Proteína G; PIA, Proteína quinaso dependiente de AMPc; Ca²⁺-Calmodulina, Unión de Ca²⁺ a la calmodulina; Shc_{Grb2}Sos, Complejo que unido a trkA activado por NGF7S activa la proteína Ras; GDP, Guanosina difosfato; GTP, Guanosina trifosfato.

g) Efecto de Glucocorticoides

Contrariamente a lo que ocurre con el NGF y los análogos de AMPc en las PC12, las neuronas simpáticas y sensoriales, y las células cromafines, en las que ambos factores favorecen su neurogenización, los glucocorticoides son de gran importancia en la diferenciación y el mantenimiento del fenotipo cromafín, ya que no sólo son capaces de inhibir la transdiferenciación de las PC12 y células cromafines a neuronas simpáticas *in vitro*, sino que también se ha demostrado que son un factor que favorece su sobrevivencia (Doupe, 1985a). Los glucocorticoides actúan estimulando la expresión de la feniletanolmina N metil transferasa enzima que participa en la síntesis de la adrenalina a partir de noradrenalina y la expresión del gene que codifica para la síntesis de esta enzima en las células cromafines, pero no en las neuronas simpáticas. Simultáneamente los glucocorticoides actúan inhibiendo la diferenciación neuronal inducida por factores neurotróficos.

En 1978, Unsicker, demostró que el crecimiento de neuritas inducido por el NGF en células cromafines postnatales en cultivo, podía bloquearse o retrasarse por exposición a glucocorticoides. En base a estos hallazgos se ha propuesto que la alta concentración local de esteroides producidos por la corteza adrenal induce y mantiene el fenotipo endocrino de las células cromafines *in vivo* (Roos, 1991). Los efectos de los glucocorticoides parecen estar mediados a través de receptores intracelulares que controlan diferentes eventos durante el desarrollo. Estudios farmacológicos han demostrado que se requiere una dosis cinco veces mayor de glucocorticoides para inducir la mitad de la máxima expresión de PNMT, que para inhibir la mitad del máximo del crecimiento de neuritas, lo que indica que se requiere de mayores concentraciones de glucocorticoides para inducir la transcripción de PNMT, que para reprimir los genes específicos de neuronas.

Otras evidencias apoyan la hipótesis de los glucocorticoides constituyen una señal importante en la diferenciación. Por ejemplo, si las células progenitoras simpatoadrenales se cultivan por dos días en ausencia de glucocorticoides, un alto número de ellas extienden neuritas y no son capaces de expresar PNMT en respuesta a la adición posterior de glucocorticoides, como si la diferenciación neuronal estuviera comprometida. Si la diferenciación neuronal se suprime con progesterona durante un periodo inicial, un gran número de células precursoras pueden expresar PNMT. Así que

el primer paso para la diferenciación cromafín (la inhibición del compromiso neuronal) es un requisito para el segundo paso (la expresión de PNMT). Este mecanismo asegura que la adrenalina sea sintetizada solo por un grupo de células progenitoras que migraron primero a la glándula adrenal. Sin embargo una población relativamente pequeña (20%) de las células cromafines no expresan PNMT (Michelson y Anderson, 1992).

h) Proteínas del Citoesqueleto Neuronal como Marcadores Neuronales

Cochard en 1984, mostró que la expresión de neurofilamentos (NFs) en el sistema nervioso central de embriones de ratón, sigue un curso temporal característico. Las subunidades de neurofilamentos de bajo y medio peso molecular (NF-L y NF-M) aparecen casi simultáneamente y la de neurofilamentos de alto peso molecular (NF-H) se expresa en células postmitóticas. Los NFs aparecen tempranamente durante la diferenciación del sistema nervioso central y el periférico, teniendo una estrecha relación con la iniciación del crecimiento de los axones. Posteriormente se expresa la vimentina, coexistiendo con los NFs y proteínas relacionadas con la neurotransmisión.

Los neurofilamentos aparecen en el cerebro y la médula espinal en los embriones de rata de 10 y 11 días, y se extienden rostral y caudalmente en el cerebro y médula espinal, a los 12 días en somitas y a los 15 y 18 días en el romboencéfalo. Estudios inmunohistoquímicos de Cochard muestran que a los 9 días de gestación los somas se tiñen únicamente con NF-L y NF-M y en estados posteriores con NF-H, lo que sugiere que cada proteína tiene diferentes patrones de expresión durante el desarrollo embrionario en diferentes regiones del sistema nervioso central. Estos hallazgos son apoyados por Shaw, quien en 1982 encontró que en el sistema nervioso central los NF-H se expresan postnatalmente. En algunas neuronas las tres subunidades de NFs se expresan simultáneamente, cabiendo la posibilidad de una expresión secuencial en cierto tipo de neuronas. La correspondencia entre la formación de procesos y la expresión de neurofilamentos puede establecerse a nivel celular. Los neurofilamentos también abundan en el soma de neuronas postmitóticas cuyos procesos se han retraído o perdido.

Las células de las crestas neurales no expresan características adrenérgicas durante su migración. La síntesis de catecolaminas y sus enzimas TH y PNMT aparecen cuando las células están cerca de la aorta para formar la cadena simpática primaria. En el embrión de ratón la diferenciación catecolaminérgica se inicia a los 10 días en las

neuronas simpáticas, estado preciso en el que aparecen por primera vez células con neurofilamentos, lo que supone una correspondencia espacial y temporal muy estrecha que correlaciona la expresión del fenotipo neuronal y la producción y liberación del neurotransmisor.

Estudios hechos por Ehrlich en 1994 con inmunoquímica, demuestran que las células cromafines ratas fetales de entre 8 y 15 días coexpresan la PNMT y los neurofilamentos. En ratas postnatales y adultas estas mismas células pierden la expresión de los neurofilamentos.

La expresión de los genes para NF-L coinciden con la aparición de neuronas postmitóticas (Leconte, 1994). Análisis sobre el desarrollo del sistema nervioso central revelan que la expresión del RNAm para NF-L es cercanamente posterior a la diferenciación de neuronas de gran tamaño durante la neurogénesis postnatal. Las neuronas que se diferencian tempranamente como las piramidales, las del tallo cerebral y núcleo talámico expresan altos niveles de RNAm NF-L el primer día del nacimiento. Esta expresión temprana del RNAm NF-L se requiere para el mantenimiento de proteínas de neurofilamentos que se detecta en los axones de neuronas de gran calibre, mientras que las neuronas pequeñas que se diferencian tardíamente muestra una menor expresión del RNAm para NF-L (Kure, 1995).

Los neurofilamentos son el principal componente del citoesqueleto de los axones que tienen un alto grado de ordenamiento estructural compuesto por arreglos paralelos de filamentos de 10 nm unidos entre sí por puentes que controlan el espacio entre ellos, en donde la porción carboxil terminal de los NF-M están relacionadas con la formación de puentes ayudando al ensamblaje de los filamentos, a mantener su arreglo longitudinal, el espacio entre los filamentos y a mantener la estructura polarizada de las neuronas (Xu, 1994).

Recientes evidencias sugieren que el diámetro de los axones está controlado por el estado de fosforilación de los neurofilamentos (Starr, 1996) y que el ensamblaje de estos está dado principalmente por subunidades o pequeños oligómeros de NFs que son transportadas lentamente (Terada, 1996).

OBJETIVOS

Numerosas evidencias experimentales demuestran que las células cromafines postmitóticas tienen la capacidad de responder *in vitro* a factores tróficos como el NGF iniciando un proceso de diferenciación neuronal artificial que posee características comunes con el proceso de diferenciación neuronal fisiológico seguido durante el desarrollo embrionario por las células del linaje simpatoadrenal que dan origen a las neuronas simpáticas. Este proceso de diferenciación es mimetizado por drogas que elevan los niveles intracelulares de AMPc, el cual ha sido propuesto como un elemento de la cascada de señales que se inicia por la unión del NGF a su receptor. Entre los aspectos que no están suficientemente estudiados, es cuál es el curso temporal de los efectos del NGF. Por ejemplo, se desconoce cuál es la latencia de sus efectos, ni si éstos se inician gradualmente o en forma drástica. Tampoco se conoce si el NGF ejerce su acción de manera de swith (esto es, si una vez iniciada la diferenciación ésta continúa en forma independiente del estímulo que la encendió) o si se requiere la presencia continua del estímulo para que ésta prosiga. Lo mismo puede decirse de los efectos del AMPc.

Se sabe que durante el proceso de diferenciación las células inicialmente pluripotenciales van limitando el espectro de posibles fenotipos que pueden adoptar. Así, se supone que a partir de un cierto momento de su diferenciación las células se encuentran inexorablemente comprometidas a alcanzar un fenotipo determinado. Por ejemplo, las neuronas simpáticas que se diferencian fisiológicamente durante el desarrollo se encuentran comprometidas con su fenotipo neuronal, al grado de que requieren del aporte de factores tróficos para su sobrevivencia.

Un aspecto interesante que merece ser explorado, es el estudiar en el proceso artificial de diferenciación neural de las células cromafines, el grado de compromiso alcanzado en los diferentes estados. Es decir, hasta qué punto de la neurogenización inducida por el NGF todavía es posible revertir sus efectos, ya sea por su remoción del medio de cultivo o por la exposición a señales hormonales, como los glucocorticoides, que instruyen a la célula a adoptar un fenotipo cromafin. Preguntas similares pueden plantearse acerca de los efectos inducidos por análogos permeables del AMPc.

Finalmente aunque el NGF y el AMPc puedan inducir cambios similares en las características fenotípicas de las células cromafines, se desconoce si todos los efectos del NGF son mimetizados por el AMPc. Además de comparar el curso temporal de los efectos de ambos agentes, sería deseable saber si las células artificialmente convertidas en neuronas

simpáticas por ambos mecanismos se comportan de la misma manera, o si existen diferencias que puedan atribuirse a los distintos mecanismos de acción.

En los cambios que ocurren en el proceso de diferenciación artificial inducido por el NGF o dbAMPc o inhibido por la dexametasona se ven involucrados la expresión de genes que se encuentran inhibidos o reprimidos en las condiciones *in vivo* y que las proteínas MAP2 y NGF68, estas últimas consideradas marcadores neuronales, son proteínas productos de la expresión de *novos* de los genes que las codifican, y que una vez que se presentan resultan de gran importancia pues forman parte del citoesqueleto neuronal que no solo mantiene la morfología y polaridad de las neuronas que esta asociada con su adecuada conectividad y que también son las responsables del transporte de neurotransmisores que es lo que probablemente ocurra en los trasplantes y por ello se da la recuperación anatómico-funcional.

No obstante de existir otras herramientas que nos permitan cuantificar la expresión de estas proteínas como el uso de las PC12 e inmunoblot, nosotros utilizamos estas condiciones pues consideramos podría ser un modelo de diferenciación mas parecido a lo que ocurre *in vivo* y en este se evalúa lo que ocurre con mas precisión en cada célula diferenciada.

OBJETIVOS PARTICULARES

En este trabajo evalúa los efectos del NGF7S y del dbAMPc sobre la expresión de los NF68 como un parámetros de la transdiferenciación a neuronas simpáticas de las células cromafines, así como la reversión e inhibición que la dexametasona ejerce sobre los efectos inducidos por el NGF7S. La expresión de los NF68 se detectó utilizando anticuerpos marcados con FITC y se cuantifico en base a la técnica de fluorescencia digital cuantitativa.

Basados en los antecedentes mencionados, nuestros objetivos particulares fueron:

- 1) Establecer la dosis óptima de dbAMPc con la que una mayor número de células cromafines PNMT+ se transdiferencian.
- 2) Realizar un análisis morfométrico de las células cromafines provenientes de animales de 3, 10 y 30 días de edad. Estos cultivos se expondran crónicamente por 3, 8 15 día a NGF7S y dbAMPc, con el fin de establecer una comparación de la diferenciación inducida en las células por cada factor, así cómo la edad de los animales en la que se obtiene un

mayor porcentaje de cromafines PNMT+ transdiferenciadas y el tiempo de cultivo con el que se logra esta diferenciación.

- 3) Obtener datos basado en una técnica de fluorescencia digital cuantitativa utilizando anticuerpos marcados con FITC y validar el sistema para poder utilizarlo en la cuantificación de la expresión de los NF68 como marcador específico de la transdiferenciación neuronal
- 4) Establecer un curso temporal detallado de los efectos del NGF comparando éstos con los efectos de AMPc.
- 5) Estudiar como se afecta el curso temporal de los efectos del NGF, cuando este factor se retira del medio o cuando se adiciona dexametasona, factor inhibitorio de la diferenciación neuronal.
- 6) Averiguar si los glucocorticoides pueden inhibir o revertir los efectos del NGF7S, una vez que estos se han iniciado.
- 7) Conocer cuál es el tiempo durante el proceso de neurogenización en el cual este factor es mas eficiente para llevar a cabo su acción inhibitoria.

Nuestros resultados muestran que el NGF7S y el dbAMPc no sólo inducen cambios morfológicos en las células cromafines *in vitro* sino que también son capaces de inducir un curso temporal semejante, la expresión de marcadores neuronales como los neurofilamentos. Este marcador neuronal existe en cantidades apenas detectables en las células cromafines control, pero su expresión se induce luego de la exposición al NGF7S hasta alcanzar niveles comparables a los encontrados en las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior. La dexametasona ejerce efectos inhibitorios sobre la acción del NGF7S y revierte sus efectos una vez establecidos en un grado que depende del tiempo de exposición a dexametasona.

MATERIAL Y METODOS

a) Cultivo de Células Cromafines

Se extrajeron en condiciones de esterilidad ambas glándulas suprarenales de ratas Wistar macho de 10 días de edad y se colocaron en un caja de petri que contenía una solución Spinner sin Ca^{2+} (Sigma S-8011), 0.1% de albumina bovina (BSA) (Sigma, A8514) y 1ml/100 ml de antibióticos y antimicótico (AB/AM) a las dosis recomendadas (Sigma, A7292). Una vez extraídas las glándulas se eliminó la corteza de la médula suprarrenal bajo un microscopio de disección y se centrifugó 10 min a 800 rpm, el tejido resultante y se incubó con la solución de Spinner antes mencionada adicionada con: 2 mg/ml de colagenasa tipo I (Worthington CLS1) y 2 μ g/ml de DNasa tipo I (Sigma, DN-25). El tejido se disoció mecánicamente pasándolo por una pipeta pasteur y se incubó por 30 min a 37° C en un baño, transcurrido este tiempo el tejido se centrifugó 10 min a 800 rpm y se resuspende con una pipeta pasteur siliconizada en una solución que contenía 2 μ g/ml de DNasa tipo I y se lavó dos veces bajo las mismas condiciones de centrifugación. El botón se resuspendió en 1 ml de medio DMEM (Gibco, 430-1600EB) suplementado con: 10% de suero fetal bovino (Gibco, 26140-012), 2 mM de L-glutamina (Sigma, G7513), 4.5 μ g/ml de insulina (Sigma, I1881) y AB/AM, el cual se utilizó como medio normal o control. Se evaluó la viabilidad por exclusión de azul de tripano 4% (Gibco, 830-5250PE), obteniéndose más de un 90% de viabilidad celular, se procedió a establecer el cultivo.

Las cromafines se sembraron a una densidad de 1×10^6 células/ml en vidrio del no. 1 de grosor (Fischer, 12-542A) previamente lavado, esterilizado y finalmente recubierto con poli-L-lisina (Sigma, P5899) 0.10 mg/ml en una solución trizma (Sigma, trizma hidrociorada T1535 y base T-1410) 0.05 M y pH 7.4 a 36° C sobre cajas de cultivo de 24 pozos (Costar, 3513).

En las condiciones experimentales se utilizaron las dosis de sustancias que fueron adicionadas al medio de cultivo normal, siguiendo el protocolo que se explicara detalladamente en los resultados:

Factor de Crecimiento Neural 7S (NGF) (Sigma, N0513)	100 ng/ml
Dibutiril AMP Cíclico (dbAMPc) (Sigma, D0827)	1 mM
Dexametazona (Dx) (Sigma, D4902)	5 μ M

b) Cultivo de Neuronas Simpáticas

Se extrajeron en condiciones estériles, ambos ganglios cervicales de ratas Wistar macho de 10 días de nacidas y se colocaron en una caja de Petri que contenía una solución Hanks sin Ca^{++} ni Mg^{++} (Sigma, H2387) 0.1% de BSA, y 1ml/100 ml AB/AC, bajo microscopio de disección los ganglios se cortaron en 5 ó 6 porciones, para ser disociados en la misma solución Hanks con 0.1% BSA, que se adicionó con 1 mg/ml tripsina (Worthington, TRL) y 2 ug/ml de DNAsa, dejándose en estas condiciones por 30 min a 37° C en un baño, posteriormente el tejido se centrifugo 10 min a 800 rpm, se extrajo el sobrenadante y se trató con Inhibidor de tripsina 2 ug/ml (Sigma, T6522) en medio DMEM con 5% de suero fetal bovino por 5 min a 37° C y finalmente se incubaron con colagenasa tipo I y DNAsa por 20 min a 37° C, el tejido se disoció mecánicamente con una pipeta pasteur siliconizada y se lavó dos veces por centrifugación a 800 rpm por 10 min en solución Hanks, la suspensión celular se resuspendió en 1 ml de medio DMEM suplementado con: 10% de suero fetal bovino y se procedió a evaluar la viabilidad por exclusión de azul de tripano, estableciéndose los cultivos al encontrar más del 90% de viabilidad.

Las células se sembraron a una densidad de 1×10^6 células/ml sobre cubreobjetos de vidrio del no. 1 tratados como se mencionó anteriormente sobre cajas de cultivo de 24 pozos, en el medio DMEM con 10% de suero fetal bovino y 10 ng/ml de NGF 7S. Esta es la dosis mínima que encontramos asegura la sobrevivencia de las neuronas simpáticas.

Tanto para neuronas como para cromafines, el medio se sustituye por medio fresco cada 72 hs, y al término de los tratamientos o días de exposición, los cultivos se procesaron inicialmente para inmunocitoquímica con anticuerpos contra PNMT siguiendo el procedimiento del conjugado avidina-biotina-peroxidasa y en una segunda etapa para inmunofluorescencia con anticuerpos contra neurofilamentos de 68 kDa (NF68), siguiendo la metodología que a continuación se menciona.

c) Inmunocitoquímica con Conjugado Avidina-Biotina-Peroxidasa.

Las células se lavaron dos veces con una solución salina de buffer de fosfatos (PBS) (Sigma, fosfato de sodio monobásico S5011, fosfato de sodio dibásico S5136 y cloruro de sodio S5886) 0.1 M pH 7.4, se fijaron en paraformaldehído (Sigma, P6418) al 4% en PBS frío por 2 hs, se lavaron tres veces con PBS 0.1 M pH 7.4, se preincubaron por 2 hs a temperatura

ambiente con una solución trizma (TBS) 0.1 M pH 7.6 (Sigma, trizma hidrociorada T1535, trizma base T1410 y NaCl S5886), con 3% de suero normal de cabra (Vector, S1000) y 0.3% de Triton X-100 (Sigma, X-100) transcurrido este tiempo se incubaron por 12 hs a temperatura ambiente con el anticuerpo primario contra PNMT (Eugene Tech, TE104), el anticuerpo está hecho en conejos inmunizados con esta enzima extraída de glándula adrenal de bovino. El anticuerpo se diluyó 1:1000 con TBS y una vez transcurrido este tiempo de incubación se lavaron tres veces con PBS y se incubo en una Ig G anticonejo biotinilado hecho en cabra (Vector, BA-1000) a una dilución 5:1000 en TBS y simultáneamente se preparan avidina y biotina (Vector, PK-6102) con 2 µl de cada uno en 1 ml de TBS. El anticuerpo secundario y avidina-biotina, se dejaron a temperatura ambiente por 2 hs, transcurrido este tiempo se eliminó el anticuerpo secundario y se lavaron 3 veces con TBS, se adiciono la avidina-biotina con TBS y se incubaron nuevamente por 2 hs. Al término de este tiempo se preparó una solución de 100 ml de TBS y 0.010 g de diaminobenzidina (Sigma, D5637) en un vaso de precipitado cubierto con papel aluminio, se retiro la avidina y biotina, se lavaron 3 veces con TBS y se agrega 1 ml de la solución de diaminobenzidina que se deja actuar por 10 min, posteriormente se adicionó 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30% (Sigma, H1009) y se deja actuar 3 min. Se eliminó esta solución que se deposito en una solución de hipoclorito, así como el material utilizado, que en el caso de ser desechable se coloca en un recipiente donde se desecha material peligroso (carcinogénico). Finalmente se hicieron preparaciones permanentes y se procedió al análisis de las células inmunoreactivas bajo los siguientes criterios: Se evaluaron tres cultivos para cada condicion por duplicado y de cada preparación se evaluaron 100 células con inmunoreactividad para PNMT, entre ellas se distinguen las que forman procesos y las que nos los forman, para obtener de esta manera un porcentaje de neurogenización, en cada una de estas células transdiferenciadas se contaron el número de los procesos formados y se midió la longitud de cada uno de ellos y al final se obtuvo un promedio de esta medición. Para que se consideren como cromafines neurogenizadas los procesos deben de medir al menos el doble del diámetro del cuerpo celular.

d) Inmunofluorescencia.

Las células se lavaron dos veces con una solución PBS (0.1 M pH 7.4, se fijaron en paraformaldehido (Sigma, P6418) al 4% en PBS frío por 2 hs, se lavaron tres veces con PBS

0.1 M pH 7.4 y se permearon con una solución de PBS con BSA (Sigma, A9418) 3% y tritón X-100 (Sigma, X-100) 0.3% (v/v) por 30 min. A partir de este paso todo se realizó a temperatura ambiente, se eliminó esta solución y se adicionó el anticuerpo monoclonal primario contra NF68 o MAP2 a una concentración 1:400 por 2 hs.

El anti-NF68 (Sigma, N5139) posee las siguientes características: es una inmunoglobulina G1 (Ig G1) monoclonal derivado de un hibridoma producto de la fusión de melanocitos y esplenocitos de ratón inmunizado. Los neurofilamentos purificados provenientes de la médula espinal de cerdo. El anti-MAP2 (Sigma, M4403) es una inmunoglobulina G1 (Ig G1) monoclonal producida de microtúbulos de cerebro de rata utilizada como inmunógeno en ratones y que tiene alta afinidad por árboles dendríticos de neuronas cerebrales, al reaccionar con tejido humano, de rata, ratón, bovino y pollo.

Una vez transcurrido este tiempo, se eliminó el anticuerpo primario y se lavaron tres veces con PBS y los cuboreobjetos se incuban por 2 hs con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una concentración 1:125, (Sigma, F2266), este anticuerpo es una Ig G monoclonal contra ratón desarrollada en oveja.

Una vez transcurrido este tiempo de incubación, los portaobjetos se lavaron 3 veces con solución PBS y se montaron en PermaFluor (Inmunon, 434990) que es un medio especial para tejido tratado con FITC sobre portaobjetos del no. 1 y de 25 mm de diámetro (Thomas Scientific, 6662-F67).

e) Sistema de Adquisición y Análisis de Imágenes

Para detectar a las proteínas de citoesqueleto de neuronas y células PC12, han sido utilizadas varias técnicas entre ellas la inmunofluorescencia, en la que los anticuerpos han sido conjugados con fluoróforos como el isotiocianato de fluoresceína (FITC). La característica útil de la FITC es la de tener un espectro de excitación con una longitud de onda de entre 400-520 nm con un punto máximo de emisión en 535 nm.

Para el análisis al microscopio de las células cromafines transdiferenciadas inmunoreactivas a anticuerpos contra neurofilamentos de 68 kDa (NF68), en nuestro caso se utilizó el sistema que se esquematiza en la figura 7, que consta de un microscopio invertido (Nikon Diaphot) con una fuente de iluminación de mercurio (Nikon, HB-10101AF) y una combinación de filtros para epifluorescencia (Nikon B-2A DM10) con las siguientes

características: un filtro de excitación en el rango de 450-490 nm (este componente transmite la luz a la longitud de onda que excita al fluoróforo y elimina la longitud de onda no necesaria), un espejo dicróico que únicamente permite el paso de la fluorescencia emitida a 510 nm (es un filtro de interferencia de 45° que refleja la luz de excitación hacia el espécimen y transmite en la longitud de onda de emisión del fluoróforo) y un filtro barrera de 520 nm (éste elimina la longitud de onda no absorbida por el fluoróforo y transmite sólo la emitida por el fluoróforo). Además se utiliza un objetivo (Nikon, CD Fluo DL) para fluorescencia con apertura numérica de 1.3 y de aumento 40X, un ocular 10X y un espejo 80/20 que permite al experimentador observar el espécimen con sólo 20% de la luz emitida por el fluoróforo y dirige el 80% de la fluorescencia emitida por las células a una cámara CCD de 1000 x 1000 píxeles. Usamos un tiempo de exposición de 1.5 a 2 seg. La imagen se adquiere por una tarjeta Matrox y digitalizada con 16 bits de resolución (32 000 tonos de grises). Luego es almacenada en un disco de lectura óptica, para que finalmente se analizaran y evaluaran por el programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics) que convierte las imágenes de 8 bit y 256 tonos de gris.

El procedimiento, como se muestra en la figura 8, consiste en adquirir imágenes tanto de células aisladas como de acúmulos de ellas, esta adquisición se realiza exponiendo las células por 1.5 seg. Una vez adquirida y digitalizada, se definen arbitrariamente áreas sobre las células con círculos pequeños dentro de la célula que está siendo analizada, obteniéndose una serie de valores que definen como (Xi), en la misma imagen se tiene áreas libres de células marcadas en donde se evaluó la fluorescencia de fondo o background (Xo), en ellas también se definieron arbitrariamente áreas. El promedio de Xi restado del promedio de Xo, nos da el valor de la intensidad de la fluorescencia corregida (Xt), o sea $Xt = Xi - Xo$. Los datos numéricos obtenidos de esta manera permite convertir una característica cualitativa en una cuantitativa.

De cada experimentos se realizaron tres repeticiones, en cada uno se analizaron entre 20 y 30 células inmunoreactivas en diferentes campos de las preparaciones que se evaluaban por duplicado.

Una vez obtenidos los valores son procesados en un programa para graficación Sigam Plot con el que también se realizan las pruebas de significancia estadística

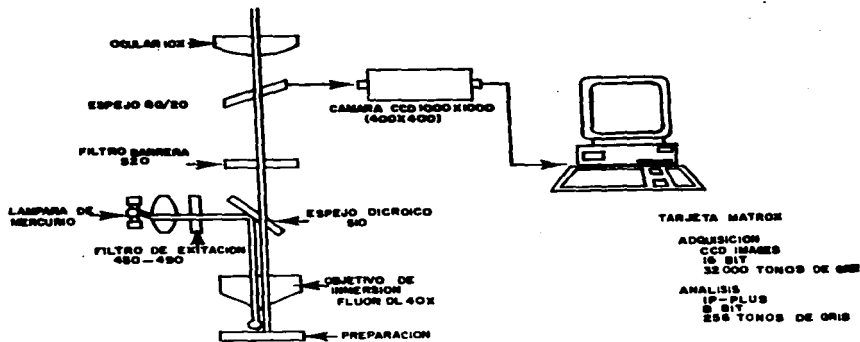
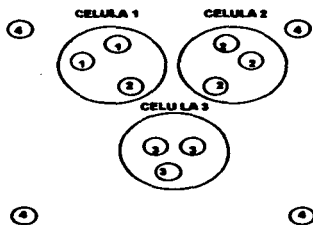


Figura 7 Sistema de Análisis de Imágenes



- 1: Fluorescencia Promedio de la Célula 1 $\bar{X}_1 = \sum X_{1i} / n$
 2: Fluorescencia Promedio de la Célula 2 $\bar{X}_2 = \sum X_{2i} / n$
 3: Fluorescencia Promedio de la Célula 3 $\bar{X}_3 = \sum X_{3i} / n$
 4: Fluorescencia Promedio del Fondo $\bar{X}_0 = \sum X_{0i} / n$
 $n =$ número de determinaciones por célula.

$$\bar{X}_{11} = \bar{X}_1 - \bar{X}_0$$

$$\bar{X}_{12} = \bar{X}_2 - \bar{X}_0$$

$$\bar{X}_{13} = \bar{X}_3 - \bar{X}_0$$

Figura 8 Procedimiento para la Obtención de la Fluorescencia Corregida o X_i

RESULTADOS

a) Análisis Morfométrico

Para conocer la participación del dbAMPc en la transformación de las células cromafines se procedió a establecer una curva dosis respuesta y se evaluó por inmunocitoquímica para PNMT el porcentaje de células neurogenizadas (ver métodos).

La figura 9 muestra que a las concentraciones de 0.1 y 1.0 mM de dbAMPc, los porcentajes de cromafines que forman procesos después de 8 días de exposición continua aumentan 1.5 y 2.5 veces, respectivamente, al compararse con el control. Las diferencias fueron significativas con una $p < 0.05$. Se decidió utilizar la dosis de 1 mM de dbAMPc para los experimentos subsiguientes.

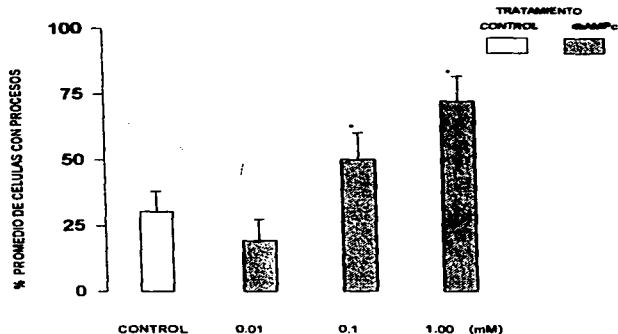


Figura 9.- Porcentaje de Neurogenización de Células Cromafines en Condiciones Control y Expuestas por 8 Días a Diferentes Concentraciones de dbAMPc (n = 100 células evaluadas por triplicado en dos experimentos independientes. * $p < 0.05$ al compararse con el control).

Para examinar la capacidad de respuesta de células cromafines obtenidas de animales de distinto grado de maduración, se cultivaron células cromafines provenientes de animales de 3, 10 y 30 días de edad por 3, 8 y 15 días. Las condiciones experimentales fueron: control, 1 mM de dbAMPC y 100 ng/ml de NGF7S. Al evaluarse el porcentaje de neurogenización y el promedio de la longitud (μm) de los procesos formados se observó, en los cultivos de animales de 3 y 10 días un incremento considerable en ambos parámetros a partir de 8 y 15 días de cultivo, sin que entre ellos hubiesen diferencias significativas. Al compararse con las condiciones control las diferencias son significativas con $p < 0.05$ (figuras 10, 11 y 12). Las cromafines provenientes de animales de 30 días de edad, muestran también diferencias significativas con ambos tratamientos aunque existen diferencias a los 8 y 15 días de cultivo. Al compararse con el control, tanto el porcentaje de neurogenización como el promedio de la longitud de los procesos formados es menor que en las células provenientes de animales de 3 y 10 días de edad.

De estos resultados se desprenden que las cromafines de animales de 3 días, son las que presentan una mayor neurogenización. Sin embargo en un trabajo paralelo (Islas-Suarez, 1994) al registrar la excitabilidad de estas células, se observó que durante los primeros cinco días de cultivo, la densidad de las corrientes de Na^+ se duplicaban en condiciones control, mientras en las tratadas con NGF7S se triplicaban; como si en parte esto se debiera a un aumento de la expresión de los canales de Na^+ funcionales que ocurre durante la primera semana de desarrollo postnatal y sólo parcialmente al efecto del NGF7S. Decidimos utilizar sólo cultivos de células cromafines obtenidas de animales de 10 días de edad en los que estos cambios ya hubieran ocurrido *in vivo*, lo que simplificaría el análisis e interpretación de los resultados. En los cultivos de animales de 30 días en los parámetros antes mencionados disminuyeron considerablemente (figura 13). Estos experimentos sugieren que el grado de neurogenización inducible con el NGF7S en las células cromafines postnatales disminuye paulatinamente al avanzar la edad de los animales.

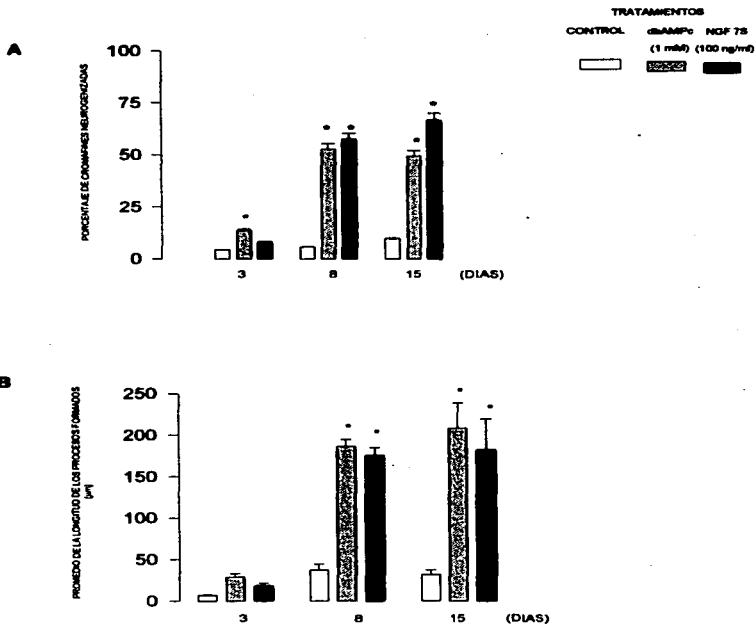


Figura 10.- A) Porcentaje de Células Cromafines Neurogenizadas y B) Promedio de la Longitud (µm) de los Procesos Formados por estas mismas Provenientes de Ratas Neonatale 3 Días Cultivadas por 3, 8 y 15 Días de Cultivo en Condiciones Control, dbAMPc (1mM) y NGF7S (100 ng/ml). (n = 100 células evaluadas por triplicados en tres experimentos independientes. * p < 0.05 al compararse con el control. ± ES)

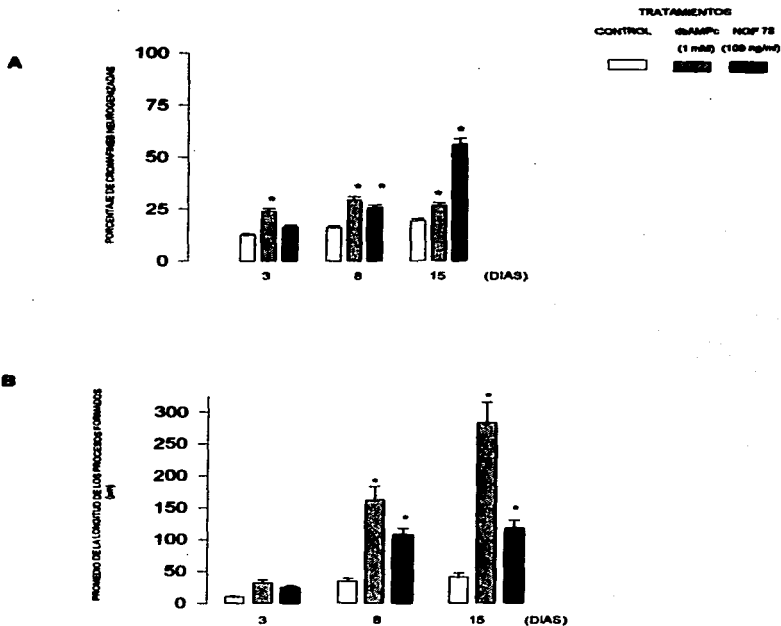


Figura 11.- A) Porcentaje de Células Cromafines Neurogenizadas y B) Promedio de la Longitud de Procesos (μm) Formados por estas mismas Provenientes de Ratas Neonatas de 10 Días Cosechadas Después de 3, 8 y 15 Días de Cultivo en Condiciones Control, dbAMPc (1 mM) y NGF7S (100 ng/ml) (n = 100 células evaluadas por triplicados en tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ al compararse con el control. \pm ES).

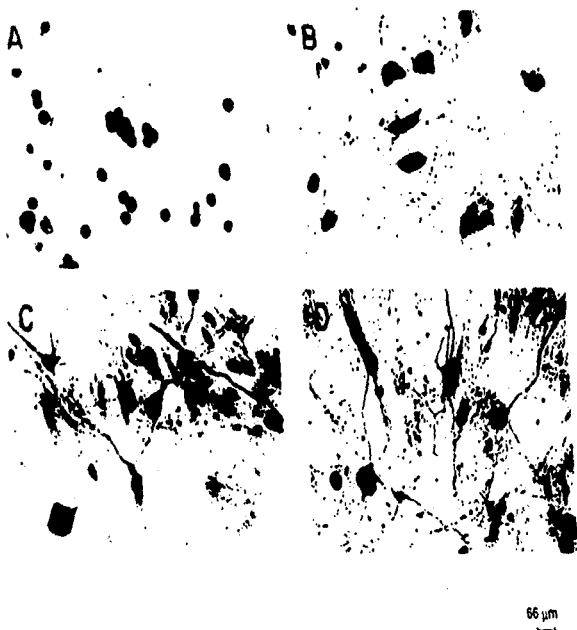


Fig. 12 Células Cromafines *in vitro* por 9 Días de Ratas de 10 Días de Nacidas Condiciones A) Recien Disociadas, B) Control, C) dbAMPc (1 mM) y D) NGF7S (100 ng/ml), Procesadas con inmunocitoquima para PNMT.

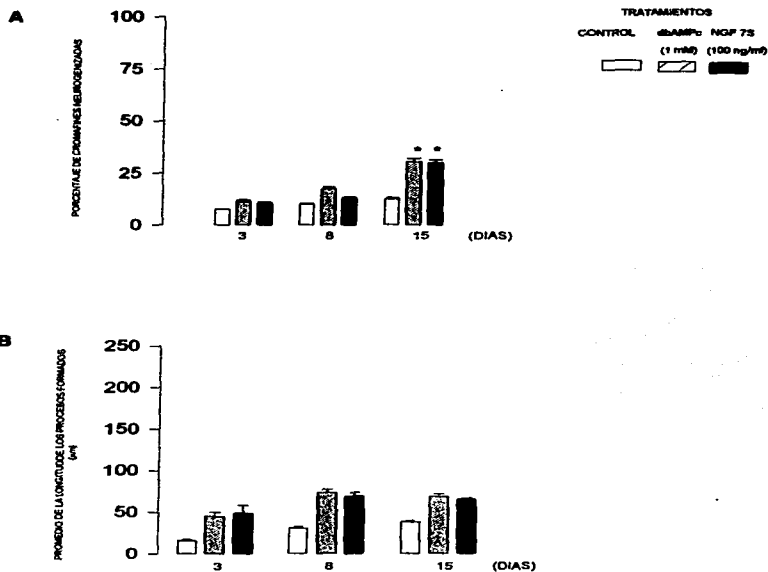


Figura 13.- A) Porcentaje de Células Cromafines Neurogenizadas y B) Promedio de la Longitud (μm) de los Procesos Formados por estas mismas Provenientes de Ratas Neonatas de 30 Días Cosechadas después de 3, 8 y 15 Días de Cultivo en Condiciones Control, dbAMPc (1 mM) y NGF7S (100 ng/ml). ($n = 100$ células evaluadas por triplicados en tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ al compararse con el control. \pm ES)

b) Inmunofluorescencia de Antígenos Específicos de Neuronas

b.1) Curso Temporal de la Expresión de NF68 Inducida por NGF7 y AMPc

Con el objeto de validar la sensibilidad y reproducibilidad del microscopio digital de fluorescencia y para tener un parámetro de comparación de la expresión de neurofilamentos en neuronas simpáticas auténticas, se hicieron cultivos de neuronas simpáticas del ganglio superior cervical y de células cromafines, ambas provenientes de los mismos animales con 10 días de edad. En estos cultivos se evaluó la expresión de dos proteínas del citoesqueleto, MAP2 y NF68, ésta última considerada como un marcador neuronal (ver apéndice 1). Después de 3, 6 y 9 días de cultivo y recién disociadas (tiempo 0), las células se procesaron para inmunofluorescencia en el mismo día bajo las mismas concentraciones de anticuerpo con FITC y condiciones del sistema óptico (apertura del diafragma, objetivo y tiempo de exposición).

La figura 14 muestra el promedio de la intensidad de la fluorescencia para cada condición. En las condiciones control para las células cromafines y las neuronas simpáticas podemos observar que los valores de MAP2 no muestran cambios significativos para los diferentes tiempos de cultivo. En cambio en las células cromafines tratadas con NGF7S podemos observar que la expresión de MAP2 se incrementa 2.00, 2.75 y 2.25 veces conforme avanza el tiempo de la exposición. En el caso del dbAMPc, se incrementa su expresión 2.00, 2.60 y 2.90 veces. Para ambos tratamientos, las diferencias son significativas ($p < 0.05$) al compararse con los controles y con las células recién disociadas. Llama la atención el que los niveles de expresión de MAP2 en las células cromafines a los 9 días de cultivo en presencia del NGF7S son incluso superiores a los de las neuronas simpáticas (figuras 14 y 15). La consistencia de los niveles de expresión de MAP2 en los grupos control (de células cromafines y neuronas simpáticas) es un buen indicador de la reproducibilidad de nuestras determinaciones.

Siguiendo el mismo procedimiento de la sección anterior, pero utilizando ahora anticuerpos contra NF68, la figura 16 muestra los promedios de la expresión de neurofilamentos de 68 kDa (NF68). En condiciones control para las cromafines y en las neuronas simpáticas podemos observar que nuevamente no aparecen diferencias significativas conforme transcurre el tiempo de cultivo. En cambio en las cromafines tratadas con NGF7S la fluorescencia se incrementa 2.15, 2.65 y 2.85 veces a los 3, 6 y 9 días de cultivo respectivamente. Luego de la exposición a dbAMPc los valores se

incrementan 2.25, 2.95 y 2.60 veces. Para ambos tratamientos las diferencias son significativas ($p < 0.05$), al compararse contra los controles y con las células recién

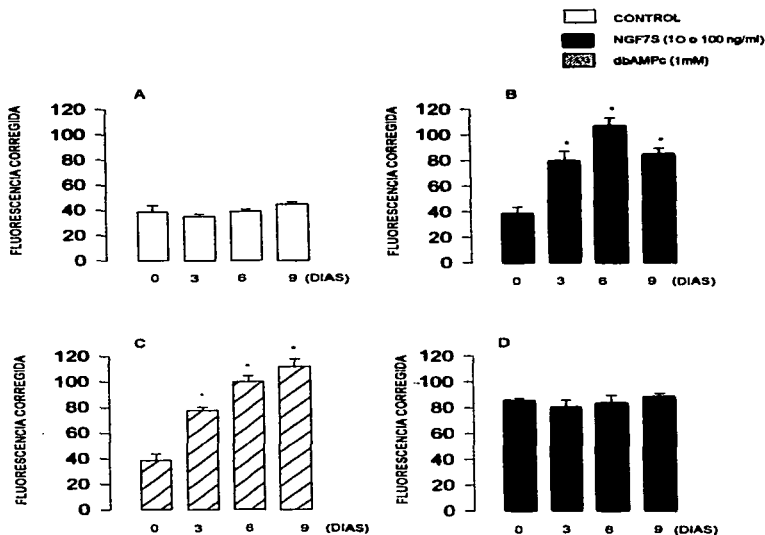


Figura 14.- Intensidad de la Inmunofluorescencia Emitida por MAP2 en Células Cromafines en Condiciones: A) Control, B) NGF7S (100 ng/ml), C) dbAMPc (1 mM) y D) Neuronas Simpáticas (10 ng/ml) Después de 0, 3, 6 y 9 Días de Cultivo. (n = 20 células evaluadas por duplicado en dos experimentos independientes * $p < 0.05$ al compararse con los controles. \pm ES). Nótese que los niveles de expresión de NF68 en neuronas simpáticas y los alcanzados por las células cromafines neurogenizadas por ambos tratamientos son comparables (figuras 16 y 17).

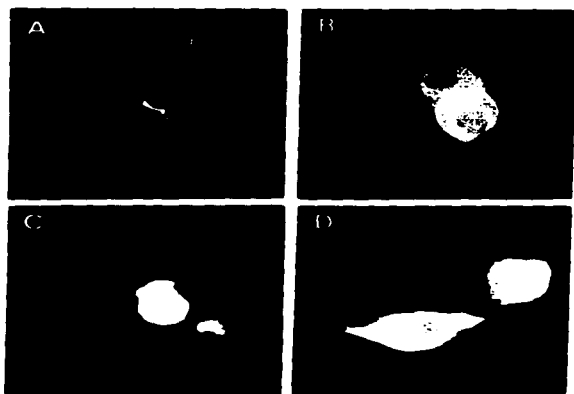


Figura 15.- Imágenes de Células Cromafines Cultivadas por 9 Días en Condiciones A) Recien Disociadas, B) NGF7S (100 ng/ml), C) dbAMPc (1 mM) y D) Neuronas Simpáticas con NGF7S (10 ng/ml), Inmunofluorescentes a MAP2.

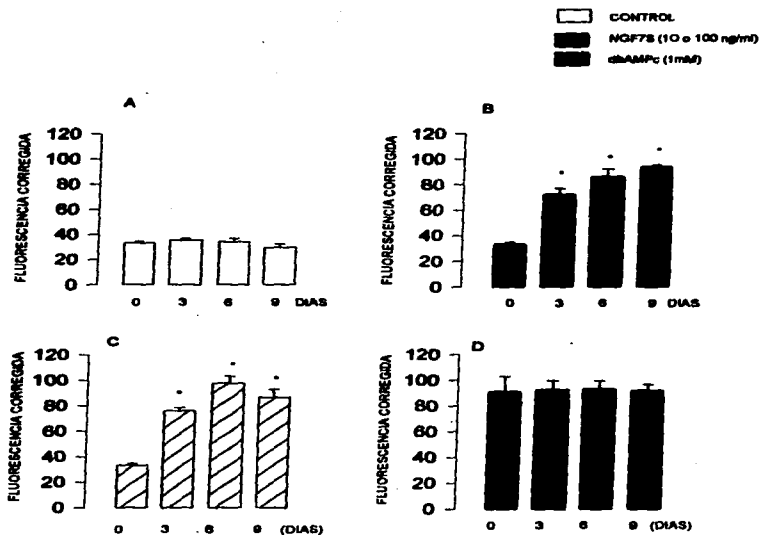
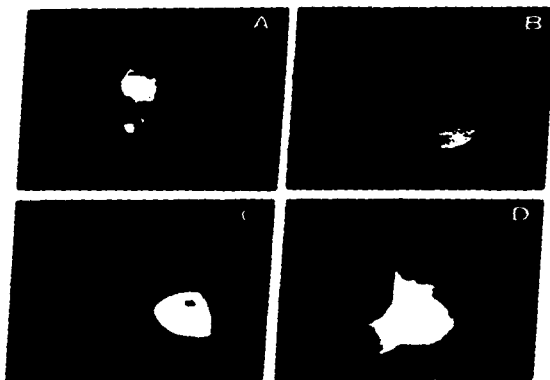


Figura 16.- Intensidad de la Inmunofluorescencia Corregida (Proporcional a la Expresión de Neurofilamentos de 68 kDa) en Células Cromaffines en las siguientes Condiciones: A) Control, B) NGF7S (100 ng/ml), C) dbAMPc (1 mM) y D) Neuronas Simpáticas con NGF7S (10 ng/ml), Después de 0, 3, 6 y 9 Días de Cultivo. (n = 20 células evaluadas por duplicado en dos experimentos independientes * p < 0.05 al compararse con los controles. ± ES).



20 μ m

Figura 17.- Imágenes de Células Cromafines Cultivadas por 9 Días en Condiciones A) Recien Disociadas, B) NGF7S (100 ng/ml), C) dbAMPc (1 mM) y D) Neuronas Simpáticas con NGF7S (10 ng/ml), Inmunofluorescentes a NF68.

b.2) Curso Temporal Detallado de los Efectos de Exposición al NGF7

Con el fin de probar la sensibilidad de nuestro sistema de cuantificación de la expresión de antígenos neuronales y también con el propósito de comparar los niveles de expresión de NF68 kDa como indicador de neurogenización. Se cultivaron células cromafines y se fijaron un par de cubreobjetos a la vez cada 12 hs hasta completar 132 hs de cultivo, siguiendo el protocolo que se muestra en la figura 18A. Puede observarse que la expresión de los NF68, se incrementó \approx 1.5, 2.0 y 2.5 veces a las 36, 84 y 132 hs, de tratamiento con NGF respectivamente, siendo las diferencias significativas ($p < 0.05$) después de 36 hs de exposición al compararse con las recién disociadas, es decir al tiempo 0 (figuras 18 y 19). Estos resultados fueron muy alentadores, pues se pudo comprobar que nuestro sistema es lo suficientemente sensible como para detectar incrementos en la fluorescencia con diferencias de 12 hs. Además el curso temporal observado para la expresión de NF68, coincide bastante bien con la expresión de canales de Na^+ en células cromafines expuestas a NGF (Islas-Suarez, 1994) y con los cambios morfológicos descritos anteriormente (ver gráficas 11A y 11B).

b.3) Permanencia de los Efectos del NGF. Efectos de la Deprivación del Factor.

Para averiguar si la exposición a NGF7S por un periodo corto de tiempo era suficiente para inducir la expresión de NF68 y cuales eran los cambios de expresión a diferentes tiempos, se probaron diferentes periodos de exposición de las cromafines de este factor hasta completar 180 hs de cultivo (\approx 8 días). Consideramos como antecedente los datos que se muestran en la figura 16 en la cual la expresión de esta proteína comienza a tener diferencias significativas a los 9 días de cultivo. El protocolo, que muestra la figura 20A, consistió en exponer a las células cromafines a NGF7S con diferencias de 12 hs y posteriormente privarlas de este factor hasta completar un total de 180 hs de cultivo. Además a dos de los cultivos hermanos después de transcurrido este tiempo de exposición continua al NGF7S, se les suprimió éste por 24 y 72 hs.

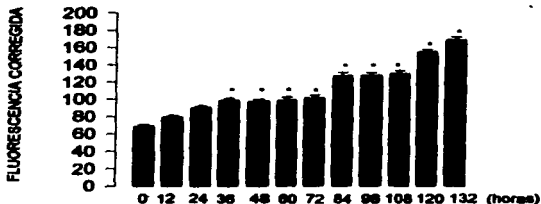
A**B**

Figura 18.- A) Esquema del Protocolo Utilizado para Evaluar el Curso Temporal de la Neurogénesis por NGF7S y B) Intensidad de la Fluorescencia Corregida (Proporcional a la Expresión de NF68) en Células Cromaffines Expuestas a NGF7S (100 ng/ml) por los Tiempos Indicados. (n = 20 células evaluadas por duplicado en dos experimentos independientes * $p < 0.05$ al compararse con los controles. \pm ES).



20 μ m

Figura 19 Ejemplos de las Imágenes Obtenidas con el Sistema de Análisis de Imágenes. Se Muestran Células Cromafines *in vitro* Después de Ser Expuestas a NGF7S (100 ng/ml) con Diferencias de 12 hs y Procesadas con Inmunofluorescencia para NF68.

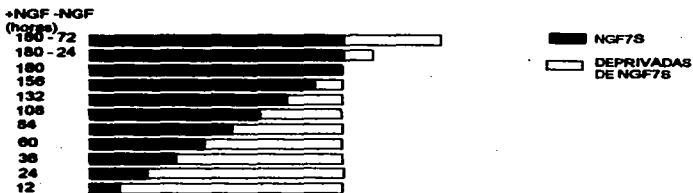
Los datos muestran que después de 84 hs (3.5 días) de exposición al NGF7S la expresión de los NF68 se incrementa 2.3 veces en tanto que con la exposición continua (180 hs = 7.5 días) se incrementa 3.85 veces. A partir de las 84 hs de exposición las diferencias son significativas ($p < 0.05$) al compararse con los cultivos mantenidos en ausencia del factor. Si se comparan los resultados del experimento ilustrado en la figura 20B con la figura 18B, se observa una diferencia importante, mientras que en la figura 18B se aprecia una diferencia significativa con el control a las 36 horas, en la figura 20B esto no ocurre sino hasta las 84 hs. Si suponemos que los cultivos respondieron de la misma forma al NGF7S, la única explicación para la diferencia entre las figuras 18B y 20B es el distinto protocolo empleado.

Las células del experimento ilustrado en la figura 18B fueron expuestas al NGF7S y fijadas inmediatamente después de finalizado el tiempo de exposición correspondiente. En cambio, las células del experimento ilustrado en la figura 20B fueron expuestas al NGF y luego privadas de él hasta completar 180 hs, a este tiempo todos los cultivos se fijaron simultáneamente (con excepción de los privados por 24 y 72 horas adicionales; figura 20C).

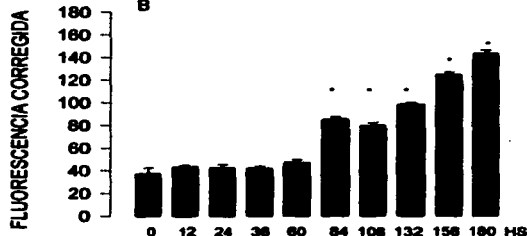
Esto quiere decir que las células expuestas a NGF por períodos relativamente cortos (36, 60 hs) y luego privadas de él, perdieron parcial o totalmente durante el período de privación la expresión de NF68 que habían alcanzado, lo cual podría haberse detectado si los cultivos se hubiesen fijado al término de su exposición a NGF. El efecto de la privación al NGF es menor cuando los cultivos se expusieron a éste por períodos mayores de 84 hs (ver más adelante). Posiblemente la neurogenización alcanzada luego de 84 hs está mejor consolidada que la que se produce luego de 36 y 60 hs. Aunque también debe considerarse que el tiempo de privación del factor fue menor.

La supresión por 24 y 72 del NGF7S después de la exposición continua a éste por 180 hs disminuye la expresión de los NF68 0.35 y 0.25 veces respectivamente, observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) al compararse con el de exposición continua por 180 hs (figuras 20C y 21). También se observó una tendencia progresiva al deterioro de estas células luego de su privación de NGF. Las células por microscopía de contraste de fases se ven granulosas y las neuritas se adelgazan y muestran varicosidades. Se sabe que las células cromafines una vez neurogenizadas se vuelven dependientes al NGF tal como sucede con las neuronas simpáticas.

A



B



C

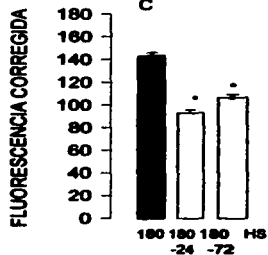
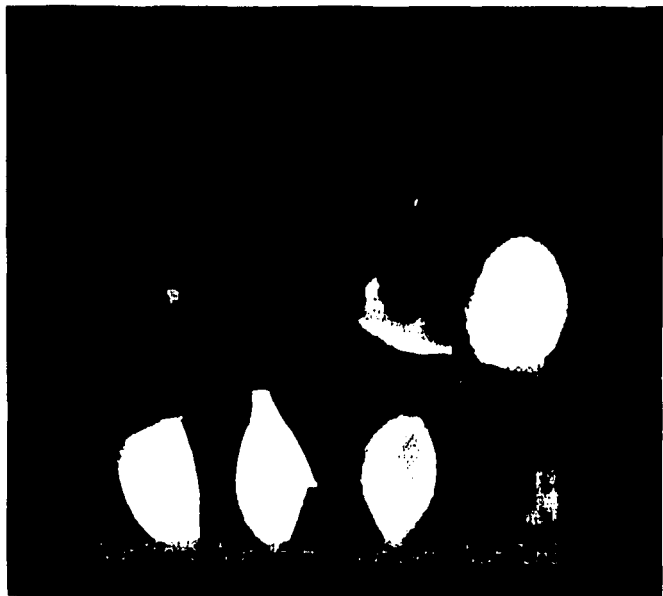


Figura 20.- A) Esquema del Protocolo Utilizado, B) Inmunofluorescencia de NF68 de Células Cromafines Expuestas por Diferentes Periodos de Tiempo a NGF7S (100 ng/ ml) Procesadas hasta Completar 180 hs de Cultivo y C) Deprivadas del Factor por 24 y 72 hs Después de su Exposición Continua por 180 hs a NGF7S. (n = 20 células evaluadas por duplicado en dos experimentos independientes * p < 0.05 al compararse con los controles. ± ES).



20 μ m

Fig. 21 Imágenes de Células Cromafines *in vitro* Obtenidas con el Sistema de Análisis Después de Ser Expuestas por Diferentes Periodos de Tiempo a NGF7S (100 ng/ml) o Deprivadas del Factor y Procesadas para Inmunofluorescencia contra NF68.

b.4) Permanencia de los Efectos del AMPc. Efectos de su Deprivación.

Para estudiar si en el aumento de la expresión de NF68 luego de la exposición al NGF7S podrían participar segundos mensajeros activadores de PkA que fosforila a esta proteína, favoreciendo con ello su polimerización y ensamblaje, utilizamos el procedimiento anterior, pero en vez del NGF7S empleamos dbAMPc. Este es un análogo de AMPc permeable a través de la membrana plasmática, el cual fue adicionado como se procedió para el NGF7S, con diferencia de 12 hs hasta completar 180 hs de cultivo. A dos cultivos hermanos, después de transcurrido este periodo con exposición continua, se les privó de dbAMPc por 24 y 72 hs.

Los datos mostraron que después de 108 hs de exposición a dbAMPc, la expresión de NF68 se incrementa 2.45 veces y 3.90 veces luego de la exposición continua por 180 hs. Después de 108 hs de exposición las diferencias comienzan a ser significativas ($p < 0.05$) al compararse con los cultivos no expuestos dbAMPc.

La supresión del dbAMPc después de la exposición continua disminuye la expresión de la proteína 0.08 y 0.20 veces, (esta disminución es menor que la observada después de la privación de NGF). Estos resultados muestran que el dbAMPc induce una expresión comparable a la del NGF pero no parece inducir dependencia al AMPc en las cromafines transdiferenciadas. Sus efectos a largo plazo se observan en menor tiempo (a las 36 hs) y son más pronunciados que con el NGF7S (figuras 22A y 23), lo cual sugiere que a diferencia del NGF, los efectos del AMPc son más estables, manteniéndose a pesar de que el agonista se retire del medio de cultivo. Cabe señalar que durante el periodo de privación al AMPc (figuras 22B) las células disminuyen la expresión de neurofilamentos, pero no muestran las alteraciones morfológicas que siguen a la privación del NGF. Es decir, las células una vez neurogenizadas no dependen para su sobrevivencia de la presencia del AMPc.

b.5) Reversión de los Efectos del NGF por Dx

Como se mencionó en los antecedentes, los glucocorticoides inhiben la transdiferenciación de las PC12 y favorecen el fenotipo cromafín. Para explorar el efecto de los glucocorticoides se diseñó un protocolo en el cual se utilizó dexametasona que es un glucocorticoide sintético a una concentración $5 \mu\text{M}$ para ver si podíamos inhibir en las células cromafines la transdiferenciación y expresión de los NF68. El diseño experimental como se muestra en la figura 24A, consistió en mantener tres cultivos en

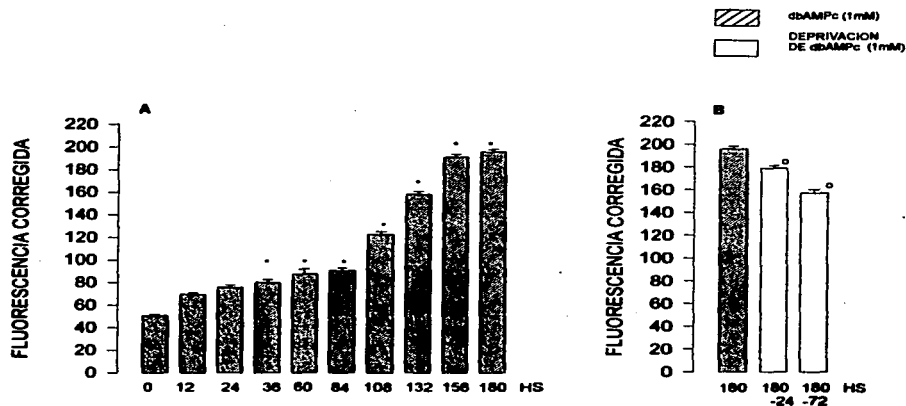
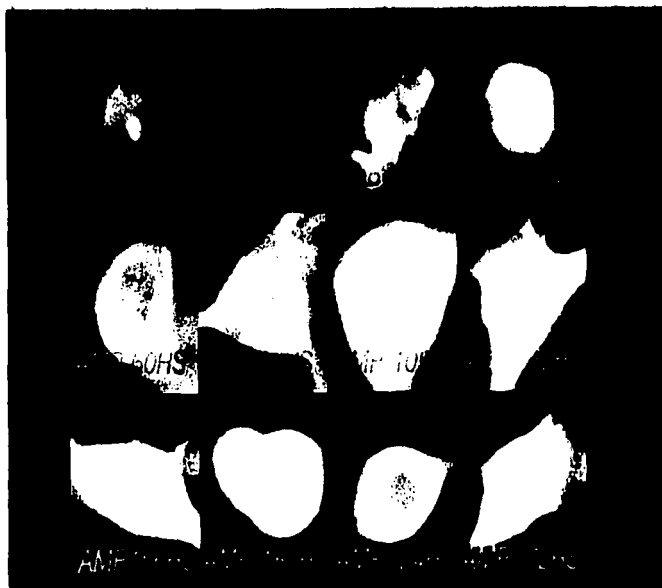


Figura 22.- A) Intensidad de la Fluorescencia Corregida (Proporcional a la Expresión de NF68) de Células Cromafines Expuestas por Diferentes Períodos de Tiempo a dbAMPc (1 mM) y Cosechadas hasta Completar 180 hs de Cultivo y B) Deprivadas por 24 y 72 hs Después de su Exposición Continua al dbAMPc n = 20 células evaluadas por duplicado en dos experimentos independientes * $p < 0.05$ al compararse con los controles. \pm ES).

condiciones control esto es sin ningún factor añadido, en exposición continua a 100 ng/ml de NGF7S y en exposición continua a 5 μ M de Dx por 180 hs. Otras condiciones experimentales fueron exponer primero a NGF con diferencias de 12 hs y posteriormente a dexametasona hasta completar 180 hs de cultivo. Esto nos permitió evaluar hasta que punto los aumentos en la expresión de NF68 inducido por el NGF7S podrian ser revertidos por la dexametasona. Al comparar las condiciones control con las células cromafines expuestas por 180 hs únicamente a dexametasona, puede observarse que la expresión de NF68 disminuyó en 0.25 veces, lo cual puede deberse a que en las condiciones control hay una expresión basal de NF68 que se debe a la ausencia de glucocorticoides sin que este llegue a niveles más altos pues no podemos descartar una



20 μm

Figura 23 Imágenes de Células Cromafines *in vitro* Obtenidas con el Sistema de Análisis Imágenes Después de Ser Expuestas por Diferentes Periodos de Tiempo a dbAMPc (1 mM) o Deprivadas y Procesada con Inmunofluorescencia para NF68.

concentración endógena de éstos en los cultivos de células cromafines, sin embargo al compararse las condiciones control y con dexametasona con la exposición continua de NGF7S el incremento en la expresión de los NF68 es de 2.5 veces, existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$), mientras que la exposición por 108 hs de NGF7S y 60 hs a dexametasona con 108 hs de NGF7S y 24 hs de NGF7S y 156 de dexametasona, la expresión de NF68 disminuyó en 50% y 70%, respectivamente.,

Esta última condición no muestra diferencias significativas al compararse con las condiciones de exposición continua a Dx (figuras 24B y 25).

b.6) Efectos inhibitorios de la Dx sobre los Efectos Inducidos por el NGF

Los datos anteriores nos llevaron a preguntarnos hasta que grado podría llevarse la plasticidad de las células cromafines. Por ejemplo si una vez expuesta a NGF7S y luego de inducir la expresión parcial de NF68 el adicional dexametasona para inhibir la expresión de esta proteína por tiempos variables para posteriormente adicionar nuevamente NGF7S y reiniciar su expresión. El protocolo para resolver esta pregunta fue como se muestra en la figura 26A. Las cromafines fueron expuestas por 108 hs a NGF7S y posteriormente recibieron pulsos de 12, 24, 48 y 72 hs de dexametasona continuando después su tratamiento con NGF7S hasta completar 180 hs de cultivo. Al comparar los cultivos por 180 hs en condiciones control y expuestas a NGF7S de 180 hs se observó un incremento de 4.0 veces en la expresión de NF68, siendo las diferencias significativas ($p < 0.05$). Al compararse la expresión de NF68 en las células cromafines parcialmente neurogenizadas y luego de su exposición a dexametasona, con el de exposición continua a NGF7S, los valores disminuyeron en un 1.30, 1.50, 2.00 y 2.15 veces, respectivamente, siendo las diferencias significativas ($p < 0.05$) (figuras 26B y 27).

Los resultados de este experimento muestran claramente que en las células cromafines cultivadas con NGF7S por 108 hs la exposición a dexametasona aún por períodos tan cortos como 12 hs tiene un significativo efecto inhibitorio sobre la expresión de los neurofilamentos. Esta inhibición no se corrige completamente después de exponer a las células nuevamente al NGF. Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos con la sola privación de NGF7S (figura 20A), resulta evidente que el efecto de la exposición transitoria a dexametasona tiene un efecto inhibitorio mayor que el de la simple privación de NGF por el mismo periodo de tiempo.

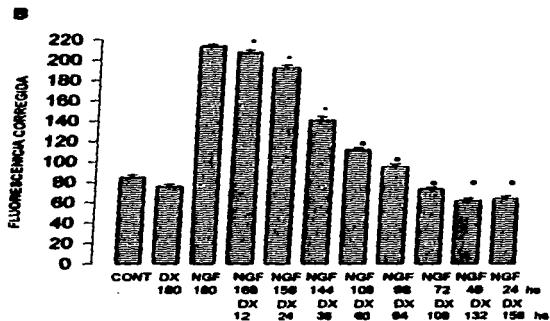
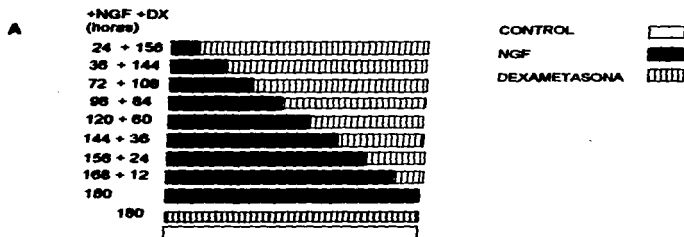
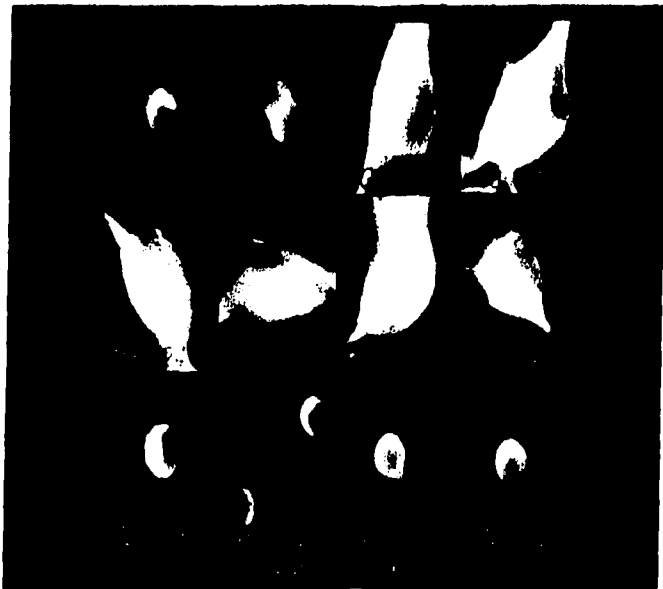


Figura 24.- A) Esquema del Protocolo Empleado para Examinar los Efectos de Reversión de la Dexametasona y B) intensidad de la Inmunofluorescencia Emitida por NF68 en Células Cromafines en Condiciones Control y Expuestas Continuasmente a NGF7S (100 ng/ml) y Dx (5 μ M) por 180 hs y por Diferentes Periodos a Ambos Factores a las Mismas Concentraciones. (n = 20 células evaluadas por duplicado en dos experimentos independientes * p < 0.05 al compararse con los controles. \pm ES).



20 μ m

Figura 25 Imágenes Obtenidas de Células Cromafines *in vitro* con el Sistema de Análisis Después de Ser Expuestas por Diferentes Periodos de Tiempo a NGF7S (100 ng/ml) y Dx (5 μ M) con Inmunofluorescencia para NF68.

Por ejemplo en la figura 26B puede verse que la exposición por 24 hs a dexametasona produjo un reducción del 34% en la expresión de los NF88 con respecto a la exposición continua por 180 hs. En cambio, la falta del NGF por el mismo periodo de tiempo (columna marcada con 156 hs en la figura 20B) solo produjo una reducción de 12% con respecto a la exposición continua a NGF7S (180 hs).

Es importante notar también que la exposición a dexametasona no tiene los mismos efectos durante todo el proceso de neurogenización. Cuando se compara el efecto de exponer las células a dexametasona por 24 hs (figura 24B columna de 156 hs de NGF7S y 24 con dexametasona) con la sola deprivación del NGF7S por 24 hs (figura 20B columna de 156 hs de NGF7S) no se encuentran diferencias significativas entre si. (10% reducción con dexametasona 24 hs vs 12% reducción con la ausencia del NGF7S por 24 hs). Esto podría indicar que la exposición a dexametasona es menos eficaz para inhibir o revertir la neurogenización cuando ésta se encuentra mejor consolidada (156 hs en NGF7S). En cambio la dexametasona afecta más severamente el curso temporal de la neurogenización cuando se aplica durante periodos mas tempranos del proceso (por ejemplo 108 hs de exposición al NGF7S).

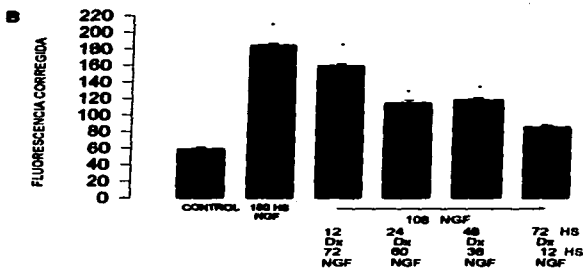
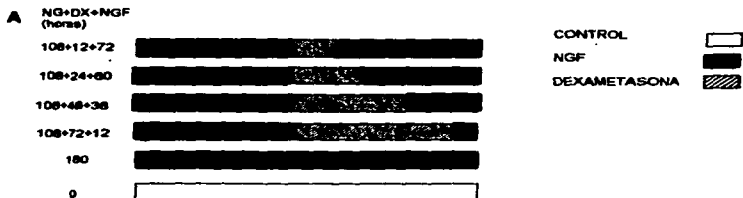
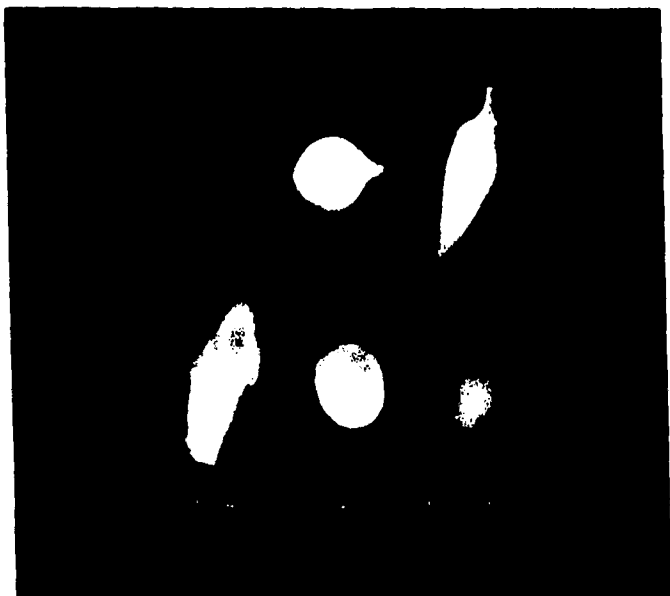


Figura 26.- A) Esquema del Protocolo Utilizado para Evaluar los Efectos Inhibitorios de la Dexametasona **B)** intensidad de la Inmunofluorescencia Corregida (Proporcional a la Expresión de NF68) en las Células Cromafines Expuestas a NGF7S (100 ng/ml) 108 h Posteriormente a Pulsos de 12, 24, 48 y 72 hs de Dx (5 μ M) para Continuar Luego su Exposición con NGF7S hasta Completar 180 hs de Cultivo. (n = 20 células evaluadas por duplicado en dos experimentos independientes * p < 0.05 al compararse con los controles. \pm ES).



20 μ m

Figura 27 Imágenes de Células Cromafines *in vitro* con el Sistema de Análisis Expuestas por Diferentes Períodos a NGF7S (100 ng/ml) y a Pulsos de 12, 24 y 48 hs de Dx (5 μ M) para Continuar su Exposición a NGF7S hasta Completar 180 hs de Cultivo

DISCUSION

Las células cromafines tienen la capacidad de responder *in vitro* al NGF, iniciando un proceso de transdiferenciación que comparte algunas características con el proceso fisiológico de diferenciación neuronal que tiene lugar durante el desarrollo embrionario de las neuronas simpáticas, con las que comparten un progenitor embrionario común. Este proceso de diferenciación neuronal puede mimetizarse *in vitro* por la exposición a derivados permeables del AMPc, como el dbAMPc. Los efectos del dbAMPc probablemente se deban a que en la cascada de señales que se inicia por la unión del NGF a su receptor (TrKA) se activan cinasas comunes como son la MAPK y CREB, ambas involucradas en la inducción de la expresión de genes de respuesta temprana y la activación de factores de transcripción de genes de respuesta tardía. Contrariamente a lo que ocurre con el NGF y dbAMPc, la exposición crónica a la dexametasona, un glucocorticoide sintético, favorece el fenotipo endócrino, incluyendo la expresión de la enzima PNMT, característica de las células cromafines.

El análisis morfológico de las células cromafines durante la diferenciación neural mostró que el dbAMPc induce un alto porcentaje de células cromafines neurogenizadas, positivas a la PNMT, y que la dosis de 1 mM era la más efectiva para inducir estos cambios. Para comparar la neurogenización inducida por el dbAMPc y el NGF7S, diseñamos una serie de experimentos que nos permitieron además evaluar el grado de plasticidad que conservan células provenientes de animales de distintas edades. Los cultivos de células cromafines provenientes de animales de 3 días de edad mostraron el mayor porcentaje de células neurogenizadas y la longitud de los procesos formados después de haber sido expuestas a NGF7S y dbAMPc fué mayor. No obstante, en lo sucesivo decidimos establecer los cultivos con células de animales de 10 días de edad, para poder diferenciar claramente los efectos debidos a los factores adicionados de los que resultan de la diferenciación postnatal, la cual, según resultados previos del laboratorio (Islas et al, 1993), termina hacia al día 10 después del nacimiento. Las células cromafines provenientes de animales de 30 días no fueron empleadas en este trabajo puesto que la neurogenización inducible en ellas disminuye paulatinamente al avanzar la edad postnatal, aunque nunca desaparece completamente (Aloe, 1979; Yang, 1996). Cabe mencionar que la cuantificación del porcentaje de neurogenización y la medición de la longitud de los procesos se llevó a cabo únicamente en células PNMT+,

lo que implica que a pesar de haber cambiado su morfología, las células conservan sus características adrenérgicas.

A continuación, nos propusimos averiguar si la neurogenización inducida por efecto del NGF7S ó el dbAMPc también implicaba la expresión de proteínas involucradas en el citoesqueleto, tales como la proteína asociada a microtúbulos (MAP2) y los neurofilamentos de peso intermedio (NF68), las cuales están estrechamente relacionadas con el transporte de neurotransmisores y factores tróficos en las neuronas. Es decir nos planteamos averiguar si durante su transdiferenciación, las células cromafines no sólo mostraban cambios morfológico que las hacían parecerse cada vez más a neuronas simpáticas, sino si estos cambios iban acompañados de otros cambios funcionales acordes con el fenotipo neuronal, manifestando así el encendido de genes que codifican la expresión de proteínas específicamente neuronales que se encontraban reprimidos.

Detacamos la expresión de MAP2 y NF68 con una técnica de fluorescencia digital cuantitativa diseñada en el laboratorio, que se basa en el marcaje de éstas proteínas con anticuerpos fluoresceinados. Esta técnica demostró ser cuantitativa y poseer suficiente sensibilidad para detectar cambios en los niveles de expresión con una diferencia temporal de hasta 24 horas. Además de la ventaja de permitimos trabajar con valores numéricos, esta técnica resultó ser más eficiente y menos laboriosa para la evaluación de la neurogenización que la que se basa en determinar la presencia o ausencia de procesos neuríticos y la medición de de sus longitudes.

Se compararon células cromafines y neuronas del ganglio cervical superiores, tanto recientemente disociadas como cultivadas con y sin los factores por diferentes periodos de tiempo. Las mediciones en las células recién disociadas de MAP2 y NF68 nos sirvieron como referencia de los niveles de expresión de estos marcadores neuronales en células cromafines (bajo nivel de expresión) y en neuronas verdaderas (alto nivel de expresión). La MAP2 pudo detectarse en baja cantidad en las células cromafines y en mucho mayor cantidad en neuronas simpáticas recién disociadas. Ambos tipos celulares mantienen una expresión basal constante de la proteína después de cultivarse hasta por 9 días en medio de cultivo control (las neuronas requieren un mínimo de 10 ng/ml de NGF7S para mantener su sobrevivencia). Cuando las células cromafines fueron expuestas a NGF7S incrementaron casi al doble su expresión de la proteína, en tanto que las tratadas con dbAMPc alcanzan un valor cercano al triple del

nivel basal. Resultó interesante constatar que al compararse el nivel máximo de expresión de estas células transdiferenciadas con las neuronas simpáticas verdaderas, los valores alcanzados por las células cromafines fueron mayores por casi un 30%. Es decir que bajo nuestras condiciones experimentales, aparentemente se produce una sobreexpresión de la proteína, alcanzándose niveles superiores a los encontrados en neuronas simpáticas que se han diferenciado naturalmente. Este resultado sorprendente probablemente implica que las células precursoras simpatoadrenales que terminan diferenciándose en neuronas simpáticas fueron expuestas durante su migración y establecimiento en el primordio ganglionar a concentraciones del factor trófico menores a las utilizadas en este trabajo.

En condiciones idénticas a las anteriores evaluamos la expresión de los neurofilamentos NF68. Encontramos que las células cromafines y las neuronas simpáticas recién disociadas también presentan expresión diferencial basal, la cual mantienen bajo las condiciones control. En las cromafines expuestas a NGF7S ó dbAMP aumenta al triple la expresión de NF68 alcanzándose niveles de expresión similares o superiores a los encontrados en las neuronas. La expresión basal de NF68 en las células cromafines recién disociadas concuerda con los hallazgos de Erlich, quien en 1994 detectó la presencia de niveles bajos de neurofilamento en células cromafines de la médula adrenal de rata. Más recientemente, Yang, en 1996 muestra que la expresión de NF68 en la médula adrenal de ratas adultas se pierde. Desafortunadamente desconocemos la edad de los animales que fueron utilizados por Yang para la detección de la proteína.

Una vez llevado a cabo el estudio comparativo anterior, que también sirvió para validar nuestra técnica de inmunofluorescencia cuantitativa, decidimos emplear, para los siguientes experimentos únicamente los anticuerpos contra NF68. Esto se debe a que encontramos que MAP2 también se expresa a niveles altos en células no neuronales, en tanto que los neurofilamentos NF68 son proteínas de citoesqueleto exclusivas de las neuronas.

Como se observa en la figura 20B, la exposición de las células cromafines al NGF7S por periodos breves de tiempo induce una expresión significativamente mayor de los NF68, después de 84 h de cultivo. Este dato aparentemente no concuerda con lo observado en los experimentos ilustrados en la figura 18B. En este caso, los NF68 alcanzan un nivel de expresión significativamente superior al control después de las 36 h

de cultivo. Esta diferencia se debe a que los cultivos empleados en la figura 18B fueron fijados inmediatamente después de haber finalizado su tiempo de exposición a NGF7S, en tanto que en los experimentos contenidos en la figura 20B los cultivos se expusieron al factor por el tiempo indicado y después se privaron del mismo hasta completar el curso temporal total, al cabo del cual todos los cultivos se fijaron y procesaron simultáneamente. Esta diferencia implica que las células cromafines expuestas al factor por periodos cortos (36-60hs), cuando son posteriormente privadas del mismo pierden parcial o totalmente el nivel de expresión que habían alcanzado. El efecto de la privación es menor cuando las células cromafines se han expuesto al NGF7S por un tiempo mayor (84 hs). Posiblemente el nivel de neurogenización alcanzado al cabo de este periodo de exposición está mejor consolidado. Por el contrario, la diferenciación alcanzada entre las 36 y 60 hs es más inestable. Un aspecto adicional que debe considerarse, sin embargo, es que la privación del factor tiene menor efecto en el caso de las células expuestas al NGF7S por 84 horas.

Por estas razones, en otra serie de experimentos estudiamos en células cromafines el efecto que tenía suprimir el aporte de NGF7S por 24 y 72 hs después de su exposición continua por 180 hs. En estos experimentos pudo observarse que durante la privación del NGF disminuye paulatinamente la expresión de los NF68. Aunado a esta disminución, también observamos en las cromafines privadas una tendencia progresiva al deterioro, el cual se manifiesta por la formación de vacuolas y el hinchamiento, ruptura y retracción de las neuritas. De hecho, una alta proporción de las células cromafines neurogenizadas había desaparecido a las 72 horas de haber eliminado el NGF del medio. Este efecto de la privación parece deberse a que, una vez alcanzado un nivel mínimo de neurogenización, las cromafines se vuelven dependientes del NGF, tal y como sucede con las neuronas simpáticas. Es interesante comentar que ni las células cromafines control (no expuestas al NGF) ni las que sóla mente alcanzaron un grado incipiente de neurogenización, se hicieron dependientes del aporte continuo de NGF para su sobrevivencia.

El dbAMPc también resultó ser un buen inductor de la expresión de los NF68 en las células cromafines. La expresión de los NF68 se incrementa significativamente a las 36 h de exposición a este factor, un tiempo menor del que se requiere de exposición al NGF7S para alcanzar un grado comparable de neurogenización (84 h). Esta diferencia podría indicar que los efectos del dbAMPc una vez alcanzados, son más estables,

manteniéndose aún a pesar de que el estímulo se haya retirado del medio. Tal como se ilustra en la figura 22, la supresión del dbAMPc por 24 y 72 h después de la exposición continua por 108 h, también disminuye (aunque de manera menos drástica que la supresión de NGF), la expresión de la proteína. Resulta interesante constatar que la supresión del dbAMPc del medio no se acompaña del deterioro morfológico y de la muerte celular que siguen a la privación de NGF. Estos resultados demuestran que el dbAMPc induce en las células cromafines la expresión de los NF68 en una forma comparable al NGF, pero que con la privación sus efectos son más estables no induciéndose una dependencia, tal y como la que se presenta en las células cromafines neurogenizadas por acción del NGF.

Aparentemente el dbAMPc puede inducir con una latencia más corta que el NGF, la expresión de proteínas producto de genes inducibles durante la diferenciación neuronal. Esto tiene sentido puesto que sus efectos no requieren de la unión del NGF a su receptor específico ni del acoplamiento y activación de un complejo sistema de moléculas asociadas al receptor o de la cascada de cinasas citoplasmáticas. Los efectos miméticos del dbAMPc con los del NGF pueden deberse a que por efecto de este segundo mensajero se activan cinasas como la MAPK y CREB, ambas involucradas en la inducción de la expresión de genes de respuestas tempranas y la activación de factores de transcripción de genes de respuesta tardía. Sin embargo, es evidente que no todos los efectos del NGF son mimetizados por el dbAMPc. Uno que hemos mencionado aquí es la incapacidad del AMPc para inducir la dependencia al NGF que es característica de la diferenciación neural inducida por este factor trófico.

Finalmente, con el objeto de determinar hasta qué punto la transdiferenciación alcanzada en las células cromafines por efecto del NGF es plástica, examinamos si era posible prevenir ó revertir los efectos del NGF empleando hormonas que se sabe influyen poderosamente en la expresión del fenotipo cromafin, los glucocorticoides. Nuestra estrategia fué ver si una vez logrado un grado importante de diferenciación, por exposición al NGF, las células cromafines podían revertir su diferenciación hacia el fenotipo cromafin por exposición al análogo glucocorticoide dexametasona. En estos experimentos expusimos a las células cromafines al NGF por 108 h y luego adicionamos dexametasona por diferentes periodos de tiempo, para nuevamente restablecer el NGF7S. Estos experimentos claramente demostraron que en las células cromafines expuestas por 108 hs a NGF7S la dexametasona tiene efectos inhibitorios sobre la

neurogenización aún adicionada por periodos tan cortos como 12 hs. La exposición a dexametasona por 24 hs disminuye la expresión de NF68 en 34% mientras la falta de NGF7S por este mismo periodo de tiempo disminuye los neurofilamentos solamente en un 12%, lo que sugiere un efecto inhibitorio de la dexametasona adicional al de la sola privación del NGF. Los mismos experimentos demostraron que los efectos de la dexametasona son realmente inhibitorios, puesto que la exposición nuevamente a NGF7S no recupera los niveles de la expresión de los NF68 que se alcanzan durante la exposición continua al NGF.

En resumen, este trabajo muestra que las células cromafines postnatales de rata constituyen un modelo útil para explorar *in vitro* las influencias positivas y negativas que regulan la diferenciación neural de los precursores simpatoadrenales. En algunos aspectos, este modelo resulta más atractivo que el comúnmente utilizado de las células PC12, línea celular derivada de un tumor de células de la médula adrenal (feocromocitoma), por representar en forma más parecida a la fisiológica, los cambios funcionales y anatómicos que acompañan a la diferenciación en el ambiente natural. Las células cromafines poseer una considerable potencial plástica (aún en la etapa adulta) (Tischler, 1993), siendo capaces de responder a los estímulos medioambientales que participan durante la embriogénesis en su selección fenotípica. En estudios futuros, será interesante constatar hasta qué punto las células cromafines diferenciadas modifican aspectos esenciales su organización celular (excitabilidad, síntesis de neurotransmisores, formación y establecimiento de conexiones sinápticas, homeostasis del calcio intracelular) dentro de lo que al parecer, constituye una compleja readaptación funcional aparejada a la adopción del fenotipo neuronal.

CONCLUSIONES

- 1) Las células cromafines tienen la capacidad de responder *in vitro* al NGFes por ello que han sido utilizadas como modelo de la diferenciación neuronal como el que observan *in vivo* las neuronas simpáticas con las que comparten un progenitor embrionario común, sin que por ello pierdan totalmente su características de células neuroendocrinas. El AMPc puede mimetizar este efecto del NGF.
- 2) El análisis morfométrico permitió el obtener los datos preliminares con los que pudimos determinar que la dosis 1 mM de dbAMPc es óptima para lograr la diferenciación de las células cromafines.
- 3) La edad 10 días de nacimiento en ratas, es en la que transdiferenciación o su inhibición ocurre por la adición del NGF7S, dbAMPc o Dexametasona.
- 4) La técnica de fluorescencia digital cuantitativa resulta ser una herramienta de gran valor, ya que su alta sensibilidad nos permite detectar cambios en los niveles de expresión de MAP2 y NF68 con diferencia temporal de 24 hs, además de ser una técnica eficiente y menos laboriosa que la evaluación que se basa en determinar la presencia o ausencia de procesos neuríticos y la medición de sus longitudes.
- 5) Las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior, tanto recién disociadas o cultivadas con 10 ng/ml de NGF7S (dosis mínima para mantener su sobrevivencia), y las células cromafines recién disociadas nos permitieron tener los valores basales de la expresión de MAP2 y NF68.
- 6) La expresión de los NF68 en las células cromafines tratadas con NGF7S es comparable a la expresión que se observa a las tratadas con dbAMPc, lo que reafirma los efectos miméticos del dbAMPc con el NGF7S.

7) El NGF7S induce la diferenciación de las células cromafines a células parecidas a las neuronas simpáticas, sin que estas hayan perdido totalmente su sensibilidad a la dexametasona, pues puede revertir e inhibir la expresión de los NF68.

8) El dbAMPc induce en las células cromafines la neurogenización y expresión de NF68 a niveles comparables a los del NGF7S, sin inducir dependencia, pues no se observan alteraciones morfológicas ni muerte celular en los cultivos privados de este, como ocurre con el NGF7S.

APENDICE 1

PROTEINAS DE CITOESQUELETO MARCADORES

ESPECIFICOS DE NEURONA

La morfología de las neuronas está estrechamente relacionada con el citoesqueleto que está constituido por proteínas que no solo proporcionan el soporte, sino que también es responsables del movimiento celular y del movimiento de material dentro de ellas. El citoesqueleto determina la forma y la plasticidad de los conos de crecimiento durante el desarrollo embrionario para formar axones y dendritas con la conectividad apropiada y propiedades específicas, a las cuales mantiene o modifica en respuesta a diversos factores como: la edad, experiencia, actividad eléctrica, lesiones y alteraciones en su microambiente.

La polaridad del citoesqueleto neuronal permite distinguir entre axón y dendritas, cuya función la determina el flujo de información como es el transporte de moléculas que forman parte de la membrana plasmática. En la pre y postsinapsis cada una contiene porciones de membrana con conjuntos de receptores, canales y transportadores que en conjunto definen el repertorio de funciones con una localización específica en la neurona.

La distribución diferencial de las moléculas y organelos en el citoplasma de dendritas y axones resulta de la configuración del citoesqueleto y del transporte a través de los filamentos que lo componen.

El citoesqueleto tiene la capacidad de formar tanto estructuras estables como plásticas por un mecanismo de equilibrio entre ensamblaje-desensamblaje (estabilización-desestabilización) que dependen de la polimerización y despolimerización de los filamentos que lo forman (actina, microtubulos, microfilamentos y neurofilamentos), que son el resultado de la respuesta de la neurona a cambios fisiológicos en las concentraciones de factores de crecimiento o interacciones con la matriz extracelular.

Las neuronas tratadas con detergentes, (los cuales solubilizan los lípidos y proteínas de la membrana) conservan el citoesqueleto con forma casi completa. Con la ayuda del microscopio electrónico, se ha demostrado que axones y dendritas contienen filamentos que se cruzan entre sí, a través de los cuales organelos y moléculas son transportados del soma al axón.

El citoesqueleto de las neuronas se compone por varios elementos como: los microtúbulos, proteínas asociadas a microtúbulos con diferentes pesos moleculares, microfilamentos y filamentos intermedios como: neurofilamentos, vimentina, etc.

Los microtúbulos (MTs), por su polaridad intrínseca y su asociación con otras proteínas dan estabilidad mecánica, determinan la polaridad de la neurona, forma, movimiento y crecimiento y plasticidad de los conos de crecimiento y funcionan como motores del transporte de organelos que se unen a la membrana plasmática del axón.

Su principal componente son monómeros idénticos de α y β tubulina que al asociarse forman un complejo de 100 kDa, forman cilindros constituidos por 13 protofilamentos en un arreglo lineal, asimétrico y polar en cuyos extremos poseen distintas propiedades, tienen un largo indefinido con diámetro externo de 24 nm. El número de microtúbulos es directamente proporcional al calibre del axón.

En el cerebro de mamíferos la proteína que conforman a los microtubulos comprenden el 20% de la proteína soluble total, su estabilidad depende de la polimerización que requiere de la hidrólisis de GTP y su asociación con otras proteínas, el equilibrio entre la poza de tubulina y microfilamentos, se afecta por factores como la concentración de Ca^{2+} en presencia de calmodulina que interactúa con proteínas asociadas a microtúbulos y *tau*.

Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) son responsables del ensamblaje y crecimiento de microtúbulos por alteraciones entre la forma estable y dinámica, que son necesarios para el desarrollo, estabilidad y plasticidad de los procesos formados por el citoplasma y de la formación de puentes entre microtúbulos con funciones de transporte. Algunas MAPs se encuentran solamente en neuronas embrionarias durante periodos de crecimiento activo y otras sólo en el estado adulto.

Existen al menos 10 tipos de MAPs, que pueden clasificarse en de alto peso molecular ~ 320-350 kDa que son principalmente MAP1A y las menos abundantes MAP1B, MAP1C y MAP5, un grupo de MAPs de peso molecular intermedio: ~ 70-280 kDa de las cuales MAP2 es abundante en neuronas, MAP3 y MAP4 en astrocitos y la MAP de menor peso molecular: ~ 55-62 kDa *tau* que abunda en axones.

Anticuerpos preparados contra diferentes tipos de MAPs han mostrado que tienen una compartimentalización intraneuronal y regularización específica durante el desarrollo, esta compartimentalización probablemente depende de su asociación con

neurofilamentos y filamentos de actina a los cuales se unen por fosforilación, además de los microtúbulos en los que la fosforilación disminuye su ensamblaje.

Los microfilamentos (MFs) son elementos del citoesqueleto que también determinan la forma y movimiento celular y que se encuentran estrechamente relacionados con la liberación del neurotransmisor, están constituidos principalmente de actina, proteína globular de 43 kDa que se ensambla linealmente cuyos extremos tienen distintas propiedades y al polimerizar forman una doble hélice, con la que forman el soporte del axón, se localizan principalmente en la periferia de los axones y conos de crecimiento, mientras los microtúbulos se encuentran en el citoplasma y son menos abundantes que en las zonas ricas en actina. La actina es el componente de citoesqueleto más abundante y tiene un diámetro de 6-8 nm, la presencia de Ca^{2+} libre corta los filamentos de actina, su despolimerización es indispensable para la liberación del neurotransmisor. La fibronectina es otro microfilamento encargado de promover el crecimiento de axones *in vitro* e *in vivo*.

Los neurofilamentos (NFs), son componentes que se encuentran exclusivamente en la matriz interna de la neurona, donde se distribuyen en soma, dendritas y axones en arreglos longitudinales característicos, tienen una alta afinidad por la plata y se encuentran en todos los vertebrados, por lo que se han tipificado como marcadores neuronales. En los mamíferos superiores el número de neurofilamentos está relacionado a una familia de filamentos intermedios entre los que se encuentran la queratina (células epiteliales), vimentina (neuronas) proteína ácida fibrilar glial (astrocitos), desmina (músculo) y lamininas nucleares.

Los neurofilamentos se componen de tres subunidades de distinto peso molecular de alto (NF-H), mediano (NF-M) y bajo (NF-L), de 112, 102 y 68 kDa, respectivamente, cada uno codificado por un diferente gen (Julien, 1987). Los neurofilamentos funcionales son moléculas díméricas que al ensamblarse forman los neurofilamentos con diámetro aproximado de 8 nm.

Cochard en 1984, mostró que la expresión de NFs en el sistema nervioso central de embriones de ratón, tienen una expresión temporal característica. Las subunidades NF-L y NF-M aparecen casi simultáneamente y la NF-H se expresa en células postmitóticas, la aparición de los NFs es temprana, durante la diferenciación del sistema nervioso central y el periférico, además de tener una estrecha relación con la iniciación del crecimiento de los axones, posteriormente se expresa la vimentina, sin embargo es

posible que coexistan los NFs y proteínas relacionadas con la neurotransmisión durante la diferenciación.

Los NFs aparecen en el cerebro y la médula espinal en embriones de rata de 10 y 11 días , se extienden rostral y caudalmente en el cerebro y cordón espinal, a los 12 días en somitas y a los 15 y 18 días en el romboencéfalo. Estudios inmunohistoquímicos de Cochard muestran que a los 9 días de gestación los somas se tiñen únicamente con NF-L y NF-M y en estados posteriores con NF-H, lo que sugiere que cada proteína tiene diferentes patrones de expresión durante el desarrollo embrionario en diferentes regiones del sistema nervioso central, estos hallazgos son apoyados por Shaw quien en 1982 encontró que los NF-H en el sistema nervioso central se expresa postnatalmente.

En algunas neuronas las tres subunidades se expresan simultáneamente, pero cabe la posibilidad de una expresión secuencial en cierto tipo de neuronas, la correspondencia entre la formación de procesos y la expresión de NFs puede establecerse a nivel celular. Gracias a las técnicas de impregnación argéntica fue posible su detección en las células del tubo neural inicialmente, los NFs también abundan en neuronas postmitóticas cuyos procesos se han retraídos o perdido.

Las células de las crestas neurales no expresan características adrenérgicas durante su migración, la síntesis de catecolaminas y sus enzima TH y PNMT aparecen cuando las células están cerca de la aorta para formar la cadena simpática primaria, en el embrión de ratón la diferenciación catecolaminérgica se inicia a los 10 días en las neuronas simpáticas, estado preciso en el que aparecen por primera vez células con NFs, lo que supone una correspondencia espacial y temporal muy estrecha que correlaciona la expresión del fenotipo neuronal y la producción y liberación del neurotransmisor.

Los filamentos de actina y tubulina son estructuras polares cuya polimerización ocurre por la hidrólisis de ATP y GTP, respectivamente, un extremo de ellos crece más rápidamente durante la polimerización que otro extremo, la polimerización de NFs también requiere de la hidrólisis de nucleótidos, se ensamblan en el soma para posteriormente ser transportados al axón.

De los factores que organizan el citoesqueleto e integran los filamentos que lo forman se sabe muy poco, por ello las neuronas y la línea celular PC12 han sido un interesante modelo para el estudio de las funciones de los factores que regulan la morfología de estas células en las que el crecimiento de axones y neuritas, pueden

alterarse por condiciones ambientales como: factores de adhesión, gradientes de concentración de NGF y Ca^{2+} y otros factores neurotróficos, así como la inducción de la cascada bioquímica de segundos y hasta terceros mensajeros.

Estudios morfológicos han sugerido la existencia de puentes entre MTs y NFs, y a través del marcaje radiactivo de sus subunidades para estudios de flujo axónico se observó que estos se mueven a la misma tasa de transporte axónico lento, lo que sugiere una asociación directa entre ellos o a través de un elemento común, la tubulina. Los NFs también se asocian con el transporte lento del axón.

Las interacciones bioquímicas entre MTs y NTs, se han analizado *in vitro* extrayendo de cerebro de diferentes mamíferos por varios ciclos de polimerización-despolimerización se ha observado que el ATP media su estabilidad y que una PK-MAPs dependiente de AMPc, fosforila preferencialmente las subunidades de neurofilamentos (Leterrier, 1981).

Un posible mecanismo que regula las interacciones entre estos dos elementos de citoesqueleto es la fosforilación de una o más proteínas por la actividad de Pk-AMPc y la fosforilación de tubulina, MAP2 y *tau*, en 1980 Valle propuso que la cinasa dependiente de AMPc se localiza sobre los brazos de los microtúbulos.

El NGF induce la expresión de las proteínas consideradas marcadores neuronales como la vimentina (VM) y NFs en las PC12, lo que evidencia que estas células están comprometidas en una diferenciación neuronal.

Los mecanismos genéticos que controlan la síntesis, ensamblaje y cambios de los NFs permanecen sin definirse, sin embargo experimentos dirigidos a estudiar la modulación de la expresión de las subunidades de NFs por NGF en células PC12 previamente tratadas con NGF y resemebradas, coinciden con la hipótesis de que el NGF (Greene & Shooter, 1982), incrementa gradualmente su expresión, lo que refleja un efecto del NGF sobre la transcripción como parte del proceso de transdiferenciación.

Observaciones del arreglo de los NF-L en pequeñas esferas cercanas al núcleo, se determinaron usando un doble marcaje con inmunofluorescencia en las PC12 creciendo en NGF con y sin colchicina, la VM muestra la misma localización que NF-L, lo que sugiere que ambas están asociadas (Sharp, 1982). Estas esferas han sido observadas en neuronas del sistema nervioso central y periférico, con la misma localización en condiciones normales (Anderton, 1982). Se propone que la agregación de esferas de VM y NF-L, y la exclusión de NF-H del dominio cerca del núcleo en las

PC12 sea una manifestación de la asociación del ensamblaje anormal de estos filamentos. La desaparición de estas esferas en las PC12, que crecen en suspensión o en cultivos de alta densidad, es el resultado de perturbaciones en el citoesqueleto, lo que fortalece la hipótesis de que ocurren interacciones funcionales entre los filamentos intermedios, organelos, la superficie celular y factores de adhesión (Menko, 1983).

En las PC12h-R, que son células que forman neuritas 12 hs después de su exposición a NGF, se incrementa la expresión del RNAm y las subunidades NF-L y NF-M en las dos primeras horas de exposición al NGF, pero no para NF-H, esto se debe a que se incrementa la transcripción y la síntesis de proteínas necesarias para el inicio del crecimiento de neuritas que se duplica en 12 hs, mientras el contenido de DNA para NF-H permanece en el mismo nivel.

La expresión de los NF-L parece estar mediada por los niveles de RNAm y no por el incremento en la tasa de transcripción, porque en las PC12h-R tratadas con Actinomicina D (Act-D) se incrementan los niveles del RNAm para la NF-L a niveles superiores a las tratadas únicamente con NGF.

Los análogos de AMPc como el dibutilil AMPc inducen la transdiferenciación de las PC12, probablemente porque activan a PK-MAP, esta respuesta puede inhibirse por colchicina y citocalicina B, agentes que desestabilizan a los microtúbulos y neurofilamentos, por lo que se ha propuesto que se requieren de la organización de ambos elementos para que se manifiesten los efectos del AMPc.

El crecimiento de neuritas inducido por la combinación de dbAMPc y NGF en PC12, es rápidamente reversible al eliminar el dbAMPc del medio, por que éste es capaz de favorecer la fosforilación de microtúbulos y microfilamentos sin requerir de la síntesis de proteínas y RNAm. El dbAMPc también induce cambios en la morfología y organización del citoesqueleto de otro tipo de células sin depender de la síntesis de RNA y proteínas, es probable que el dbAMPc ejerza sus efectos por alteraciones en el citoesqueleto de las PC12 que resultan en el crecimiento de neuritas (Gunning, 1981), el mecanismo detallado por el cual se altera la fosforilación y con ello la organización del citoesqueleto se desconoce, pero se ha reportado que las MAPs regulan el ensamblaje de microtúbulos por un mecanismo de fosforilación dependiente de AMPc.

Parece que la transcripción dependiente de NGF para inducir el crecimiento de neuritas involucrara la producción de un gene que regula de manera estable que el dbAMPc organice la fosforilación de microtúbulos y neurofilamentos (Gunning, 1981).

El tratamiento con NGF de las PC12h-R, induce la expresión temporal de genes tempranos como el de la β actina, *c-fos* y *c-myc* (Greenberg, 1985, Greenberg, 1986, Curran, 1985, Kruijer, 1985), el curso temporal para que el RNAm de estos genes llegue a su nivel máximo es de 0.5-2 hs y regresa a su nivel basal rápidamente, el tiempo necesario para inducir el RNAm y transcripción para NF-L es de aproximadamente 3 hs.

La adición de ciclohexamida a PC12h-R tratadas previamente con NGF, también induce la expresión de genes para β -actina y de genes tempranos, sin embargo no se observa la inducción del gene para NF-L, por lo que se considera que el mecanismo por el cual se induce la expresión de cada uno de estos genes es independiente (Ikenka, 1990).

Las células cromafines se distinguen de las neuronas simpáticas por la expresión de la enzima PNMT, la ausencia de NFs y de neuritas. Las neuronas expresan la enzima TH, forman procesos y expresan NFs pero no PNMT, sin embargo las cromafines de embriones de rata coexpresan PNMT y NFs *in vivo* y al cultivarse cromafines de bovino adulto en medio con NGF no expresan proteínas de neurofilamentos, porque no forman procesos. La adición de dexametasona inhibe ese efecto sin que la coexpresión de PNMT se afecte (Ehrlich, 1994). Contrariamente a lo propuesto por Ehrlich, se había observado que las cromafines de bovino adulto en cultivo son capaces de reexpresar características de neuronas adicionándoles NGF (Naujoks, 1982) y que el fenotipo cromafin se favorece con glucocorticoides y se inhibe la expresión de NFs (Doupe, 1985, Unsicker, 1989, Voguel, 1990), estudios *in vitro* de células cromafines de rata recién nacida y adulta, indican que estas células requieren de NGF para formar neuritas y posteriormente para sobrevivir (Doupe, 1985; Unsicker, 1989; Tischler, 1993), sin embargo la capacidad para formar procesos disminuye considerablemente con la edad (Seidl, 1989).

Se propone que durante el proceso de diferenciación y maduración, los glucocorticoides liberados por las células de la corteza de la glándula adrenal inhiben la expresión de los NFs en las células cromafines, sin embargo existen algunas controversias. Anderson propone que la expresión de PNMT depende de los glucocorticoides aunque sus receptores aparezcan después, lo que sugiere que no se requiere de éstos para la expresión de PNMT, ya que en experimentos con cromafines en cultivo en ausencia absoluta de glucocorticoides por dos semanas las células son inmunoreactivas a PNMT y contienen RNAm, por lo que consideran que la baja

producción endógena de glucocorticoides es suficiente para inducir la expresión de PNMT.

APENDICE 2

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia donde la luz se emite por moléculas por un corto período de tiempo después de haber absorbido luz, el tiempo entre la absorción y emisión es del orden de 10^8 seg o menos, la luz emitida se conoce como fluorescencia, si el tiempo es de 10^9 seg, se origina la fosforescencia, sin embargo la fluorescencia y fosforescencia pueden interactuar con la materia pudiendo disminuir por difracción o absorción.

La absorción ocurre en cuanta, la energía de un cuanta es de 9.9×10^{-12} erg/fotón, a una longitud de onda (λ) de 2×10^5 cm, manteniéndose las constantes de Planck ($h = 6.6 \times 10^{-27}$ erg seg), la velocidad de la luz en el vacío ($c = 3.0 \times 10^{10}$ cm/seg) y la frecuencia de vibración de la luz ($\nu = 1.5 \times 10^9$ /seg). La cantidad de energía que un fotón absorbe puede calcularse con la ecuación: $E = h\nu = hc/\lambda$.

En microscopia la intensidad de la luz se define como: $I = W/\text{cm}^2$, donde W es la intensidad de la luz de 1 watt y se define como la cantidad de energía que es producida por unidad de tiempo ($1 \text{ W} = 10^7$ erg/seg) y se afecta por el grosor del espécimen. Cuando un cuanta de luz se absorbe por una molécula, el electrón de valencia se mueve a una órbita superior adoptando un estado excitado y al regresar a su órbita emite un cuanta de luz. El espectro de absorción de una molécula depende del número de niveles de energía para el estado excitado de la molécula. La absorción ocurre en longitudes de onda en las que la energía del cuanta equivale a la diferencia de energía entre el estado electrónico basal y el excitado.

La fluorescencia es un proceso de relajación que se inicia con la absorción de la luz y termina con su emisión, también es una de las múltiples vías del proceso de desexcitación por el cual un electrón en estado excitado regresa a su estado basal liberando energía. La longitud de onda de la fluorescencia emitida siempre es mayor que la longitud de onda absorbida (corrimiento de Stokes). La vida media de la fluorescencia se determina por la permanencia de este electrón en el estado excitado, el tiempo requerido para el proceso de absorción (cerca de 10^{15} seg) es instantáneo en comparación con la vida media de la fluorescencia (cerca de 10^8 seg). Si la vida media de la fluorescencia es de cerca de 10^8 seg, el estado excitado impide que el electrón se mueva a un tercer estado antes de que regrese a un estado excitado menor y emite luz.

Existen otras vías de desexcitación por las que la energía del electrón excitado puede disiparse, por ejemplo las interacciones con la solución u otras moléculas en la muestra, de tal manera que la energía absorbida por una molécula puede pasar a otra forma de energía que se utiliza para otras reacciones químicas. Algunas moléculas fluorescentes pueden destruirse por proceso de excitación en presencia de O_2 . Esto se conoce como "blanqueo", el cual puede ser útil para evaluar la movilización de moléculas fluorescentes.

La autofluorescencia o fluorescencia natural de las moléculas en las células de mamífero, se encuentran en la región de UV o azul del espectro y se deben generalmente al NADH, riboflavina y flavina.

Los cambios en la autofluorescencia se han utilizado para evaluar reacciones moleculares como el transporte de electrones en mitocondrias, sin embargo tiene un valor limitado en la biología celular, en comparación a la aplicación de colorantes fluorescentes como fluoróforos y los fluorocromos, que se añaden a las células y se sintetizan para una aplicación específica basándose en los siguientes criterios: el espectro de absorción, el espectro de emisión, el coeficiente de extinción, la eficiencia cuántica, la reactividad química y los efectos del medio ambiente.

Los principales parámetros útiles de los colorantes fluorescentes son el coeficiente de extinción (ϵ), la eficiencia cuántica (F) y la vida media de la fluorescencia (t), donde ϵ es la medida de la probabilidad de absorción, si es alto se encuentra en el rango de $\sim 40,000$ a $250,000$ M/cm, si la probabilidad de absorción de las moléculas fluorescentes es alta entonces tiene una alta probabilidad de emisión, lo que reduce su vida media en el estado excitado, por lo tanto la vida media es inversamente proporcional a la probabilidad de absorción.

La eficiencia cuántica F es la medida de la eficiencia de la fluorescencia relativa a todas las posibilidades de desexcitación, se puede expresar como el número de cuanta emitidos divididos por el número de cuanta absorbidos. Las moléculas utilizadas en la biomedicina tienen un campo cuántico menor a 1, mientras las moléculas fluorescentes tienen un valor de 0.1, la intensidad de la fluorescencia es función del campo cuántico, el producto de $F \times \epsilon$ determina la intensidad de los colorantes o marcadores fluorescentes, c es la concentración absorbida y l la distancia la cual la intensidad I de la luz después de cruzar la muestra, por lo que $I_{\text{fluorescencia}} = I_0 F \epsilon c l$. La vida media de los colorantes fluorescentes t , se encuentra entre $1-100 \times 10^{-9}$ seg, y se define como el tiempo

promedio en que una molécula permanece en estado excitado, la vida media intrínseca es el valor máximo posible de t y esto ocurre cuando F es máxima, en este caso se requiere que todas las vías de desexcitación que no sean fluorescencia se eliminen.

En el caso del isotiocianato de fluoresceína (FITC), este tiene un pico en el espectro de absorción de 495 nm y de emisión de 535 nm como puede verse en la figura 28.

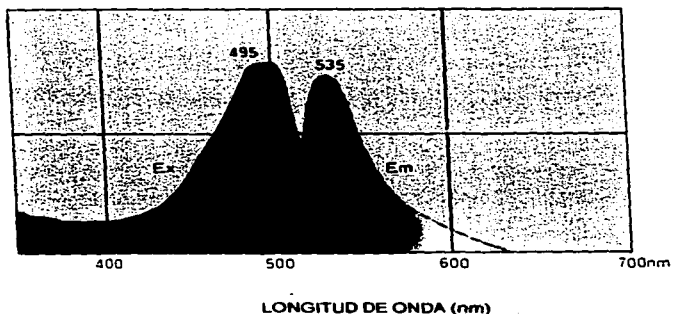


Figura 28 Espectro de Absorción y Emisión del FITC

Los atributos de los colorantes fluorescentes útiles en la microscopía son:

- 1) **Especificidad.** Las moléculas fluorescentes absorben y emiten luz a una longitud de onda determinada, por lo que pueden excitar selectivamente y detectarse de entre una mezcla de especies moleculares.
- 2) **Sensibilidad.** Permite detectar un pequeño número de moléculas fluorescentes, aproximadamente 50 moléculas pueden detectarse en un volumen celular de $1 \mu\text{m}^3$ con un microscopio de fluorescencia. Este número tiende a disminuir con el avance de métodos químicos, experimentales y al aumento de la sensibilidad de los fotodetectores.

3) **Espectroscopía.** Las moléculas fluorescentes pueden definir con extrema sensibilidad propiedades fisicoquímicas, varios parámetros espectroscópicos, pueden emplearse para medir propiedades como: pH, $[Ca^{2+}]$ libre, el potencial de membrana, hidrofobicidad, distribución de cargas, microviscosidad, distancia molecular, coeficiente de difusión y orientación molecular.

4) **Resolución Temporal.** Las mediciones fluorescentes se ven limitadas por su resolución temporal, como aquellos eventos que ocurren con una frecuencia igual o tan grande como la inversa del tiempo entre la absorción y emisión de la luz. Aquellos procesos biológicos que ocurren en el orden de $\sim 10^8$ seg o menos pueden ser detectados y medidos. Durante este intervalo del tiempo pueden ocurrir múltiples cambios químicos y moleculares en la célula viva, aunque muchos procesos son más lentos y pueden medirse con indicadores fluorescentes.

5) **Resolución Especial.** Las señales fluorescentes pueden medirse entre espacios celulares tan pequeños como una simple molécula, si contiene suficientes cantidades del fluoróforo. La resolución de estructuras se limita al poder de resolución del microscopio, el cual es función de la apertura numérica de objetivo y la longitud de onda de emisión.

La inmunofluorescencia ha sido una herramienta invaluable en la microscopía de fluorescencia útil en biología celular, combina la especificidad, sensibilidad y la resolución del microscopio de fluorescencia con la unión selectiva del anticuerpo a una región restringida de moléculas de antígeno o epítipo. Múltiples epítopes pueden localizarse en la misma célula, en la misma o diferente molécula, cambiando fluoróforos con diferentes colores de fluorescencia. El mismo concepto se ha usado recientemente para la hibridación *in situ*.

La microscopía de fluorescencia es una herramienta importante para el estudio *in vivo* e *in vitro* de células y tejidos. Las moléculas fluorescentes pueden introducirse en células vivas para medir cambios fisiológicos locales como el pH citosólico, la $[Ca^{2+}]$, potencial de membrana, estructuras celulares, así como la dinámica de análogos fluorescentes de macromoléculas biológicas específicas, movilización lateral de lípidos y de proteínas de membrana y la difusión rotacional. Los cambios dimensionales en la asociación de moléculas del orden de 5 nm se pueden detectar midiendo la transferencia de energía.

Los avances en los métodos de registro en video y por procesamiento digital, permiten obtener análisis multiespectrales, bidimensionales o tridimensionales y medir el tiempo de resolución de la distribución de las pruebas fluorescentes en las células.

CARACTERISTICAS DEL MICROSCOPIO DE EPIILUMINACION

El principio fundamental para el diseño de un microscopio de fluorescencia es maximizar la colección de la fluorescencia emitida y minimizar la excitación. Esto se logra optimizando la óptica y minimizando los componentes fluorescentes del microscopio.

Uno de los principales impedimentos para diseñar un microscopio de fluorescencia, es que la intensidad de la fluorescencia de la muestra sea varios órdenes de magnitud menor a la intensidad de la iluminación, por lo tanto las imágenes deben registrarse con un cámara de bajo nivel de luz, con un CCD o un digitalizar de imágenes que minimiza la destrucción permanente de la fluorescencia por la conversión que induce la luz sobre el fluoróforo a compuestos químicos no fluorescentes o "blanqueo" de la imagen. El contraste de la imagen depende de la capacidad del microscopio para permitir el paso de la fluorescencia al detector, mientras se bloquea la luz excitadora. La sensibilidad y contraste del microscopio dependen de la iluminación, la vía de formación de las imágenes y del funcionamiento de los componentes ópticos del microscopio.

Un microscopio de fluorescencia, es un microscopio compuesto por una porción óptica para la formación de imágenes similar al microscopio de campo claro, para convertirlo en un microscopio de fluorescencia o epi-iluminación se requiere de una serie de aditamentos que dependen del tipo de fluoróforo a utilizar.

El problema de la iluminación y el contraste para la epi-iluminación se resolvió en los 60's modificando los iluminadores verticales adicionando un filtro de interferencia. La epi-fluorescencia o epi-iluminación, se logra a través de un objetivo que sirve como condensador y objetivo del sistema, el componente novedoso fue el introducir un espejo dicróico con un cubierta de interferencia que refleja a 45° para la longitud de onda del filtro de excitación la cual envía en dirección contraria, a la longitud de onda para el filtro de emisión, permitiendo el paso de esta última.

El filtro de interferencia de excitación y emisión, forma un excelente contraste en especímenes con fluorescencia débil, al combinarse con la apertura numérica del objetivo que bien alineado funciona como un condensador.

La epiluminación se basa en la iluminación Koehler, la ventaja es que puede combinarse con métodos convencionales de transiluminación como: contraste de fase, polarización o interferencia diferencial y su sensibilidad y compatibilidad la hacen una buena herramienta en la microscopía de fluorescencia.

En la epiluminación los filtros pueden ser de cuatro tipos, que difieren en su manufactura, a fin de que cumpla con características específicas de acuerdo al tipo de fluoróforo a utilizar. Los filtros de densidad neutra, atenúan los colores y hace uniforme el espectro, se fabrican depositando una delgada película de metal sobre la superficie del vidrio que se cubre por una segunda placa de vidrio, los filtros de vidrio coloreado o filtros barrera transmiten la luz en regiones limitadas del espectro, absorben la luz por la composición de metales del vidrio, los filtros de gelatina tienen entre dos placas de vidrio una película de gelatina con colorantes orgánicos y los filtros de interferencia que se forman por varias capas de una película con diferentes índices de refracción que se depositan sobre una capa de vidrio que se sella por otra. La transmisión característica de estos filtros se produce por interferencia de la luz refractada en la superficie de las diferentes capas de película, la luz que no se transmite por el filtro se refleja, estos filtros se diseñan para regiones específicas del espectro.

El filtro útil en el análisis del isotiocianato de fluoresceína (FITC), permite separar el espectro de absorción y de emisión del fluoróforo.

El filtro de excitación, espejo dichroico y el filtro de emisión se encuentran generalmente montados en cubos antes del objetivo en algunos casos un opturador con un switch permite el paso de la luz a través de estos componentes.

La fluorescencia de la imagen puede variar con el objetivo empleado, la intensidad luminosa se colecta por el objetivo y varía con el cuadrado de su apertura numérica.

Un microscopio de fluorescencia tiene un alto índice de detección, con el ha sido posible evaluar la fluorescencia emitida por una muestra como en un fluorómetro debido a la alta apertura numérica de los objetivos empleados. Varios estudios han demostrado que el microscopio tiene gran sensibilidad, Barak y Webb detectaron partículas de baja densidad de lipoproteínas con ~50 moléculas de fluoróforo (Barak,

1980), pero también ha sido posible detectar un solo fluoróforo en condiciones óptimas (Mathies, 1986) y Hirschfeld detectó una molécula biológica marcandón con polietilamina varios fosforos y acoplándolos a una molécula de Ig G (Hirschfel, 1987)

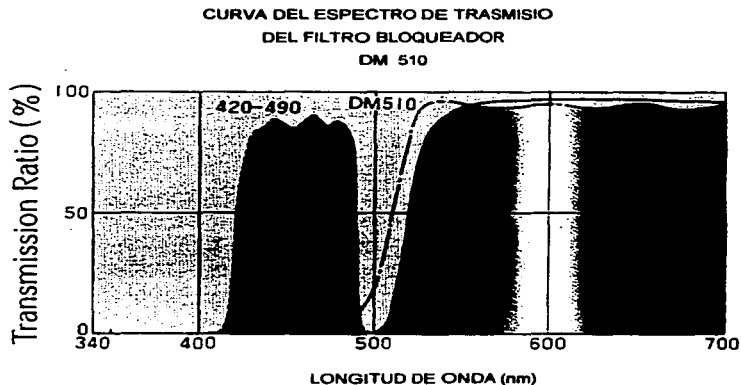


Figura 29 Curva del Espectro de Transmisión del Filtro para FITC

BIBLIOGRAFIA

- Aletta, JM, Shelanski ML & Greene LA (1989). Phosphorylation of the peripherin 58 kDa neural intermediate filament protein. Regulation by nerve growth factor and other agents. *J. Biol. Chem.* 165:4619-27.
- Aloe, L. & Levi-Montalcini, R. (1979). Nerve growth factor-induced transformation of *in* mature chromaffin cells *in vivo* into sympathetic neuron: Effects of antiserum to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1246-1250.
- Altin JG & Bradshaw RA (1990) Production of 1-2,-diacylglycerol in PC12 cells by nerve growth factor and basic fibroblast growth factor. *J. Neurochem.*54,1066-76.
- Armstrong R, Wen W, Malkonath J, Taylor S. & Montomini M. (1995) A refractory phase in cyclic AMP-responsive transcription requires down regulation of protein kinase A. *Mol. Cell Biol* 15(3)1826-32.
- Anderson, D. J. & Axel, R. (1986). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell* 47, 1079-1090.
- Anderton, B. H. (1982) The neuronal cytoskeleton. Proteins and pathology. In *Recent Advances in Neuropathology* W. T. Smith and J. B. Cavanagh, eds., pp. 29-51, Churchill Living-Stone, New York.
- Anton, E, Weskamp G, Reichardt L, Matthew W. (1994) Nerve growth factor and its loss affinity receptor promote Schwann cell migratio. *PNAS USA*91:2795-99.
- Barbacid, M. (1993). Nerve growth factor: a tale of two receptor. *Oncogene*. 8:2033-42.
- Barde, YA. (1989) Trophic Factors and Neuronal Survival. *Neuron*. 2:1525-34.
- Barak, LS, Yocum RR, Nothnagel EA & Webb WW. (1980). Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-phalloidin. *PNAS USA* 77(2):980-4.
- Barak, LS, Yocum RR. & Webb WW. (1981). *In vivo* staining of cytoskeletal actin by autointernalization of nontoxic concentration of nitrobenzoxadiazole-phalloidin. *J. Cell Biol* 89(2):369-72.
- Bar-Sagi, D. & Feramisco J. R. (1985). Microinjection of the *ras* oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 42:841-846.
- Berg, M. N., Sternberg, D. W., Parada, L. F., & Caho, M. V. (1992). K252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity. *J. Biol. Chem.* 267, 13-16.
- Berridge, M. J. (1990). Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 265, 9583-9586.
- Berridge, M: (1993). Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature*. 361:315-25.
- Blenis, J. & Erikson R. (1986). Regulation of protein kinase activities in PC12 pheochromocytoma cells. *EMBO J.*5:3441-3447.
- Bonni, A, Ginty D, Dudek H. & Black Y. (1995). Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via cooperative mechanisms that may confer specificity to neurotrophin signals. *Mol. Cell Neurosci.* 6:168-83.
- Burstein, D. E., Blumberg, P. M. and Greene, L. A. (1982). Nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 pheochromocytoma cells: Lack of inhibition by a tumor promoter. *Brain Res.* 247, 115-119.

- Catt, K. J., Hunyady, L. and Balla, T. (1991). Second messengers derived from inositol lipids. *J. Bioenergetics Biomembranes* 23, 7-27.
- Chen RH, Tung RR, Abate C, & Blenis J. (1993) Cytoplasmic to nuclear signal transduction by mitogen-activated protein kinase and 90 kDa ribosomal S6 kinase. *Biochem Soc Trans* 21:895-900.
- Cho, K., Skames, kW. C., Minsk, kB., Palmieri, S., Jackson-Grosby, L. & Wagner, J. A. (1989). Nerve growth factor regulates gene expression by several distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol* 9:135-143.
- Claude, P., Parada, I. M., Gordon, K. A., D'Amore, P. A. & Wagner, J. LA. (1985). Acid fibroblast growth factor stimulates adrenal chromaffin cell to proliferate and to extend neurite, but is not a long-term survival factor. *Neuron* 1:783-790.
- Cochard, P. & Paulin, D. (1984) Initial Expression of Neurofilaments and Vimentin in the Central and Peripheral Nervous System of the mouse embryo *in vivo*. *J. Neurosci.* 4(8):2060-2064.
- Cohen, S. (1960) Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 46, 302-311.
- Contreras, M. L., Guroff, G. (1987). Calcium-dependent nerve growth factor-stimulated hydrolysis of phosphoinositides in PC12 cells. *J. Neurochem.* 48, 1466-1472.
- Connolly, J. L., Seeley, P. J., & Greene, L. A. (1987). Rapid regulation of neuronal growth cone shape and surface morphology by nerve growth factor. *Neurochem. Res.* 12(10):861-8.
- Cowley S, Paterson H, Kemp P. & Marshal C. (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77:841-52.
- Cremis, J., Wagner, J. A. & Halegoua, S. (1986). Nerve growth factor action is mediated by cyclic AMP and Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinases. *J. Cell. Biol.* 103m 887-893.
- Curran, T. & Morgan, J. I. (1985). *Science* 229:1265-1268.
- Damon, D. H., D'Amore, P. A. & Wagner, J. A. (1990). Nerve growth factor action and fibroblast growth factor regulate neurite outgrowth and gene expression in PC12 cells via both protein kinase C and cAMP-independent mechanisms. *J. Cell Biol.* 110:1333-1339.
- Darcangelo G, Paradiso K, Shepherd D, Brehm P, Halogoua S & Mandel G. (1993). Neuronal growth factor regulation of 2 different sodium channel types through distinct signal transduction pathway, *J. Cell Biol.* 122:915-21.
- Doupe, A.J., Landis, S. C. & Patterson, P.H. (1985a) Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors and chromaffin cell plasticity. *J. Neurosci.* 5:2119-2142.
- Doupe, A. J., Patterson, P. H., & Landis, S. C. (1985b). Small intensely fluorescent (SIF) cells in culture: role of glucocorticoids and growth factors in their development and phenotypic interconversions with other neural crest derivatives. *J. Neurosci.* 5:2143-2160.
- Dobrowsky R, Werner M, Castellino A, Cahn M. & Hannun Y. (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low affinity neurotrophin receptor. *Science.* 265:1586-99.

- Ehrlich, M. E., Evinger, M., Regunathan, S. & Teitelman, G. (1994) Mammalian Adrenal Chromaffin Cells Coexpress the Epinephrine-Synthesizing Enzyme and Neuronal Properties *in vivo* and *in vitro*. *Dev. Biol.* 163:489-490
- Eveleth, D. (1986). Internalization and cycling of Nerve Growth Factor in PC12 Cells: Interconversion of Type II (Fast) and Type I (Slow) Nerve Growth Factor Receptors. *Neuron* 2, 292-936-
- Frazier, W. A., Angeletti, R. H., Sherman, R. & Bradshaw, R. A. (1973) The topography of mouse 2.55 nerve growth factor: The reactivity of tyrosine and tryptophan. *Biochemistry*. 12, 3282-3293.
- Frodin M & Gammeltoft S. L (1994) Insulin-like growth factors act synergistically with basic fibroblast growth factor and nerve growth factor to promote chromaffin cell proliferation. 91(5):1771-5.
- Frodin M, Peraldi P & Van Obberghen E. (1994). Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem.*269(6)6207-14.
- Golubeva, E. E., Posyanova, G. A., Kondratyev, A. D., Melnik, E. I. & Severin, E. S. (1969). The influence of nerve growth factor on the activities of adenylate cyclase and high affinity GTPase in pheochromocytoma PC12 cells. *FEBS Lett* 247, 232-234.
- Gonzalez G A, Mamamoto K, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs W, Vale WW & Montminy MR. (1989). A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicts by its sequence. *Nature* 337(6209):749-59.
- Greenber, M. E., Green, L. A. and Ziff, E. B. (1985) *J. Biol. Chem.* 160:14101-14110.
- Greenberg, M. E. Hermanowski, A. L. & Ziff, E. B. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:1040-1057.
- Greene, L. A. & Tischler, A. S. (1982). PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. *Adv. Cell. Neurobiol.* 3, 373-414.
- Greene, L.A. & E. M. Shooter. (1982) Nerve Growth Factor: Biochemistry, synthesis and mechanism of action. *Annu. Rev. Neurosci.* 3:353-402.
- Greene, L. A., Volonte, C., Chalazonitis, A. (1990). Purine analogs inhibit nerve growth factor-promote neurite outgrowth by sympathetic and sensory neurons. *J. Neurosci.* 10, 1479-1485.
- Greene, L. A., Drexler, S. A., Connolly, J. L., Rukenstein, A. & Green, S. (1986). Selective inhibition of responses to nerve growth factor and of microtubule-associated protein phosphorylation by activators of adenylate cyclase. *J. Cellkl Biol.* 103:1967-1978.
- Gunning, P. W., Landreth, G., Bothell, M. & Shooter, E. (1981) Differential and Synergistic Action of Nerve Growth Factor and Cyclic AMP in PC12 Cells. *J. Cell Biol.* 89:240-245.
- Hagag N, Halogous S. & Viola M. (1988) Inhibition of growth factor induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibodies to ras p21. *Nature.* 319:880-82.
- Hall, F. L., Fernyhough, P., Ishii, D. N. and Vulliet, P. R. (1988). Suppression of nerve growth factor-directed neurite outgrowth in PC12 cells by sphingosine, an inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 263, 4460-4466.
- Heasley, L. E. and Johnson, G. L. (1989). Regulation of protein kinase C by nerve growth factor, epidermal growth factor and phorbol esters in PC12 pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 264, 8646-8652.

- Heidelmann, R. S., Joshi, H. C., Schechler, A., Fletcher, J. R. & Bothwell M. (1985). Synergistic effects of cyclic AMPc and NGF on neurite outgrowth and MT stability of PC12 cells. *J. Cell Biol.* 100:916-927.
- Hermann, M. A., Schulz, C. A. & Claude, P. (1991). Chronic exposure to an activator of protein kinase C mimics early effects of NGF in chromaffin cells. *Dev. Biol.* 146:558-568.
- Hermann, M. A., Schulz, C. A. & Claude, P. (1992). Early and late effects of NGF may be mediated by different pathways in transdifferentiating chromaffin cells. *Dev. Brain Res.* 575:257-264.
- Huang CM, Tasya KE (1996). Role of Ca²⁺ in differentiation mediated by nerve growth factor and dibutyryl cyclic AMP in PC12 cells. *J. Neurochem* 67(2):530-9.
- Ibáñez CF, Ebdendal T, Barbany G, Murray RJ, Blundell TL & Persson H. (1992). Disruption of the low affinity receptor-binding site in NGF allows neuronal survival and differentiation by binding to the trk gene product. *Cell.* 69:329-41.
- Ikenaka K., Nakahira K., Takayama C., Wada K., Hatanaka H. & Mikoshiba, K. (1990). Nerve Growth Factor Rapidly Induces Expression of the 68 kDa Neurofilament Gene by Posttranscriptional Modification in PC12h-R Cells. *J. Biol. Chem.* 265(32):19782-19785.
- Islas-Suarez, L., Gomez-Chavarin, M., Drucker-Colin, R. & Hernández-Cruz, A. (1994) Properties of the Sodium Current in Rat Chromaffin Cells Exposed to Nerve Growth Factor *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 72(4):1938-1948.
- Itoh K, Brackenbury R. & Akeson R. (1995). Induction of L1 mRNA in PC12 cells by NGF is modulated by cell-cell contact and does not require the high affinity NGF receptor. *J. Neurosci* 15:2504-12.
- Jacobson, M. (1991). Developmental Neurobiology. The Neural Crest Derivatives. Third Edition. Plenum Press. New York and London. 4:143-158.
- Joseph C, Byun H, Bittman R. & Kolesnick R. (1994) Substrate recognition by ceramide-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 268:2002-6.
- Julien J P, Grosek F, Yazdanbakhsh K, Flavell D, Meijer D & Mushynski W. (1987). The structure of a human neurofilament gene (NF-L): a unique exon-intron organization in the intermediate filament gene family. *Biochem Biophys Acta* 909(1):10-20.
- Kater, S. B. & Mills, L. R. (1991). Regulation of growth cones behaviour by calcium. *J. Neurosci.* 11, 891-899.
- Knusel B, Rabin S, Hefti F. & Kaplan D. (1994). Regulation of growth cones behavior by calcium. *J. Neurosci* 11:891-899.
- Koizumi S, Contreras ML, Mtsuda Y, Hama T, Lazarovici P. & Guroff G. (1988) K-252a: A specific inhibitor of the action of nerve growth factor on PC12 cells. *J. Neurosci* 8(7):15-21.
- Kujubu, D. A., Lim, R. W., Varnum, B. C. & Herschman, H. R. (1987) Induction of transiently expressed genes in PC12 pheochromocytoma cell.s *Oncogene.* 1, 257-262.
- Kure, R. & Brown IR (1995) Expression of low-molecular-weight neurofilament (NF-L) mRNA during postnatal development of the mouse brain. *Neurochem Res* 20(7):833-46.
- Lakshmanan, J. (1978). Nerve growth factor induced turnover of phosphatidylinositol in rat superior cervical ganglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 767-272.

- Landreth, G. E. & Rieser, G. D. (1985). *J. Cell Biol.* 100, 677-683.
- Landreth, G. E. & Williams, L. K. (1987). Nerve growth factor stimulates the phosphorylation of a 250-kDa cytoskeletal protein in cell-free extracts of PC12 cells. *Neurochem. Res.* 12, 943-950.
- Landreth, G., Cohen, P. & Shooter IE, M. (1980) Ca²⁺ transmembrane fluxes and nerve growth factor action on a clonal cell line of rat pheochromocytoma. *Nature* 283:202-204.
- Lankford, E. G. & Letourneau, P. C. (1989). Evidence that calcium may control neurite outgrowth by regulating the stability of actin filaments. *J. Cell Biol.* 109, 1229-1243.
- Lasling, D. (1989) *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture. Part A. Methods in Cell Biology*, Vol. 29 Ed. Yu-Il Wwang & D. Lasling Taylor. Academic Press, Inc.
- Lazarovici, P., Lewli, B-Z., Letkes, P.I., Koizumi, S., Fujita, K., Matsuda, Y., Ozato, K. & Guroff, G. (1989). K-252a inhibits the increase in kc-fos transcriptional and the increase in intracellular calcium produced by nerve growth factor in PC12 cells. *J. Neurosci.* 23, 1-8.
- LeDouarin, N: M: (1982) *The Neural Crest*. Cambridge. Cambridge Univ. Press.
- Lecointe L, Semolin O, Zvara A, Boisseau S, Poujeol C, Julien JP & Simonneau M. (1994) Both upstream and intragenic sequences of the human neurofilament light gene direct expression of lacZ in neurons of transgenic mouse embryos. *J Mol Neurosci* 5(4):273-95.
- Leterrier, J.F, Liem, R. & Shelanski, M. (1981) Preferential Phosphorylation of the 150,000 Molecular Weight Component of Neurofilaments by a Cyclic AMP-dependent, Microtubule-associated Protein Kinase. *J. Cell. Biol.* 90:755-760.
- Levi-Montalcini R & Booker B (1960). Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve growth factor protein. *PNAS USA* 45,394-391.
- Lillien, L. & Claude. P. (1985) Nerve growth factor is a mitogen for cultured chromaffin cells. *Nature*. 317:632-634.
- Lim, R. W., Varnum, B. C. & Herschman, H. R. (1987). Cloning fo tetradecanoyl phorbol ester-induced "primary response" sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant. *Oncogene* 1, 263-270.
- Loeb D, Margos J, Martin-Zanca D, Chao M, Parada L & Green L. (1991). The trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF responsive PC12 cells lines. *Cell* 66:961-66.
- Maher, P. A. (1989) Role of protein tyrosine phosphorylation in the NGF response. *J. Neurosci. Res.* 24:29-37
- Marshall C. J. (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Develop.* 4:82-89
- Marshall C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-85.
- Mathies, R. & Stryer, L. (1986) In *Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences*. (D. L. Taylor, A. Waggoner, R. Murphy, F. Lanni and R. Birge, eds) 120-140, Liss, New York
- Mathies, H. J. G., Palfrey, H. C., Himing, L. D. and Miller, R. J. (1987). Down regulation of protein kinase C in neuronal cells: Effects on neurotransmitter release. *J. Neurosci.* 7, 1198-1122.

- McCormick F (1994). Activators and effectors of ras p21 protein. *Curr Opin Genet Devel* 4:71-76.
- Meakin, S. O. & Shooter, EM. (1991) Tyrosine kinase activity couple to the high affinity nerve growth factor receptor complex. *PNAS*. 88(13):5862-67.
- Meakin, S. O. & Shooter, EM. (1991) Molecular investigations on the high affinity nerve growth factor receptor. *Neuron* 6:153-63.
- Meakin, SO. & Shooter, EM. (1992) The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci* 15(9):323-31.
- Menko AS, Toyama Y, Boettiger D & Holtzer H (1983). Altered cell spreading in cytochalasin B: a possible role for intermediate filaments. *Mol Cell Biol* 3(1):1113-25.
- Michelsohn, A., & Anderson, D. J. (1992). Changes in competence determine the timing of two sequential glucocorticoid effects on sympathoadrenal progenitors. *Neuron* 8:589-604.
- Montminy MR, Gonzalez Ga & Yamamoto KK (1990) Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* 13(5):184-8.
- Moskal, J. R. & Morrison, R. (1987) Signal transduction mechanisms that promote neurite outgrowth in cultures of CNS neurones. *Soc. Neurosci. Abstr.* 13(1), 1605.
- Mutoh, T., Rudkin, B. B. & Guroff, G. (1992) Differential responses of the phosphorylation of ribosomal protein S6 to nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. *J. Neurochem.* 58, 58, 175-185.
- Nakanishi, N. & Guroff, G. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 7791-7799.
- Naujorks, K. W., Korsching, S., Rohrer, H. & Thoenen, H. (1982) Nerve Growth Factor-mediated induction of tyrosine hydroxylase and neurite outgrowth in cultures of bovine adrenal chromaffin cells. Dependence on developmental stages. *Dev. Biol.* 92:365-379.
- Nikodijevic, B. & Guroff, G. (1991) Nerve growth factor-induced increase in calcium uptake by PC12 cells. *J. Neurosci. Res* 29, 192-197.
- Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233, 305-312.
- Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature (London)*. 334, 661-665.
- Obermeier A, Lammers R, Wiesmuller KH, Jung G, Stesinger J & Ullrich A (1993). Identification of trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J. Biol. Chem.* 268:22963-66.
- Ohmichi M, Decker S & Saltiel A (1992). Activation phosphatidylinositol 3'-kinase by nerve growth factor involves indirect coupling of the trk proto-oncogene with src homology 2 domains of phospholipase Cgamma1. *Biochem Biophys. Res. Comm* 179:217-223.
- Pacheco, M. T., Garcia-Hernández, F., Hiriart, M., Komisura, V. & Drucker-Colin, E. (1990). Dibutyryl cAMP stimulates analgesia in rats bearing ventricular adrenal medulla transplant. *Brain Res.* 531:290-293.

Peng X, Green L, Kaplan D, & Stepehns R. (1995). Deletion of a conserved juxtamembrana sequence in Trk abolishes NGF-promoted neurogenesis. *Neuron*.15:395-406.

Putney, J. W., Jr. (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*. 11, 611-624.

Qiu, M & Green S (1992). PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21 ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron* 9:705-17.

Rabin S, Cleghorn V & Kaplan D. (1993). SNT, a differentiation-specific target of neurotrophic factor-induced tyrosine kinase activity in neurons and PC12 cell. *Mol. Cell. Biol.* 12:2203-13.

Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, & Bitler CM (1993). Induction of apoptosis by the low affinity NGF receptor. *Science*. 251:345-46.

Reinhold, D. S. & Neel, K. E. (1989). The lack of a role for protein kinase C in neurite extension and in the induction of ornithine decarboxylase by nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 264, 3538-3544.

Ritcher-Landsberg, C. & Josteorff, B. (1986). The role of cAMP in nerve growth factor-promoted neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Cell Biol* 102:821-829.

Ricketts WA, Rose DW, Shoelson S & Olefsky JM (1996) Functional roles of the Shc phosphotyrosine binding and Src homology 2 domains in insulin and epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem.* 271(42):26165-9.

Rodriguez-Tebar, A. Dechant, G. & Barde, Y. A. (1992). *Neuron* 4, 487-492.

Rogers, M. & Henry, I. (1990). Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in nerve growth factor-dependent neurite outgrowth by sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 26, 447-454.

Romano, C., Nichos, R. A. & Greengard, P. (1987) Synapsin 1 in PC12 cells 11. Evidence for regulation by NGF of phosphorylation at a novel site. *J. Neurosci.* 7, 1300-1306.

Ross, M. E. Evinger, M. J. Hyman, S. E., Carroll, J. M., Mucke, L., et al (1990) Identification of glucocorticoid response element in the phenylethanolamine N-methyltransferase promoter using fusion genes introduced into chromaffin cells in primary culture. *J. Neurosci.* 10:520-530.

Ross, A. H. (1991). Identification of tyrosine kinase Trk as a nerve growth factor receptor. *Cell Regulation* 2:685-690.

Rydell, R. E. & Greene, L. A. (1988). cAMP analogs promote survival and neurite outgrowth in cultures of rat sympathetic and sensory neurons independently of nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 85:1257-1261.

Rydell, R. E. & Greene, L. A. (1988). 8-Substituted cAMP analogs can replace the NGF requirements of cultured rat sympathetic and sensory neurons: Evidence for parallel neurotrophic pathways in Neuronal Plasticity and Trophic Factors. (G. Biggio, P.F. Spano, G. Toffano, S. H. Appel, and G. L. Gessa, eds.) 73-85. Liviana Press, Padova.

Rydell, E. W. & Greene, L. A. (1988). cAMP analogs promote survival and neurite outgrowth in cultures of rat sympathetic and sensory neurons independently of nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1257-1261.

- Sano, M., Nishiyama, K. & Kitajima, S. (1990). A nerve growth factor-dependent protein kinase that phosphorylates microtubule-associated protein *in vitro*: Possible involvement of its activity in the outgrowth of neurites from PC12 cells. *J. Neurochem.* 55, 427-435.
- Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., et al (1988). Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 1/interleukin 6. *Mol. Cell. Biol.* 8:3546-3549.
- Seidl K & Unsicker K. (1989) The determination of the adrenal medullary cell fate during embryogenesis. *Dev Biol* 136(2):481-90.
- Schonen-King, C., Nel, A., Williams, L. K. & Landreth, G. (1991) Nerve growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of MAP2 Kinase in PC12 cells. *Neuron.* 6, 915-922.
- Schelessinger, J. & A. Ullrich. (1992). Growth factor Signaling by Receptor Tyrosine Kinase. *Neuron.* 9, 383-391.
- Schubert, D., LaCarriere, M., Whitlock, C. & Stallcup, W. (1978) Alterations in the surface properties of cells responsive to the nerve growth factor. *Nature (London).* 273:718-723.
- Sharp, G., Osborn, M., & K. Webster. (1982). Occurrence of two different intermediate filament protein in the same filament *in situ* within a human glioma cell line: An immunoelectron microscopical study. *Exp. Cell Res.* 141:385-395.
- Shaw, G. & Weber, K. (1982) Differential expression of neurofilament triplet protein in brain development. *Nature.* 298:277-279.
- Sheng, M. & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485.
- Smith C, Farnh T & Goodwin R. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell.* 76:959-62.
- Starr R, Attema B, DeVries GH & Monteiro MJ (1996) Neurofilament phosphorylation is modulated by myelination. *J. Neurosci Res* 44(4):328-37.
- Stephens RD, Loeb D, Copeland T, Pawson T, Green L & Kaplan D (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathway involving SHC and PLC gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron.* 12:691-705.
- Stein, R., Orit, S. & Anderson, D. J. (1988). The induction of a neural-specific gene SCG10, by nerve growth factor in PC12 cells is transcriptional, protein synthesis dependent, and glucocorticoid inhibitable. *Dev. Biol.* 127:316-325.
- Stemple, D. F., Mahanthappa, N. K. & Anderson, D. J. (1988) Basic FGF induces neuronal differentiation, cell division and NGF dependence in chromaffin cells: a sequence of events in sympathetic development. *Neuron* 1:517-525.
- Sutter A, Riopelle RK, Harris-Warrick Rm & Shooter EM (1979) NGF receptor characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J. Biol Chem* 254,5972-5982
- Terada S, Nakata T, Peterson AC & Hirokawa N. (1996) Visualization of slow axonal transport *in vivo*. *Science* 273(5276):784-8.

- Tischler, A. IS., Moblaker, H., Kwan, P. W. L., Jason, W. J., DeLellis, R. A. & Wolfe, H. JH. (1987) Hypertrophy pheochromocytoma cells treated with nerve growth factor and activators of adenylate cyclase. *Cell Tissue Res.* 249:161-169.
- Tischler, A. S., Ruzicka, L. A. & Perlman, R. L. (1990) Mimicry and inhibition of nerve growth factor effects: Interactions of staurosporine, forskolin and K-252a in PC12 cells and normal rat chromaffin cells in vitro. *J. Neurochem.* 55, 1159-1185.
- Tischler, A. S., Ruzicka, L. A. & Dobner, P. R. (1991). A protein kinase inhibitor, staurosporine, mimics nerve growth factor induction of neurotensin/neuromedin N gene expression. *J. Biol. Chem.* 266, 1141-1146.
- Tischler, A. S., Riseberg, J. C., Hardenbrook, M. A. and Cherington, V. (1993). Nerve growth factor is a potent inducer of proliferation and neuronal differentiation for adult rat chromaffin cells in vitro. *J. Neurosci.* 13:1533-1542.
- Toledo-Aral J, Brehm P, Halegoua S & Mandel IG. (1995). A single pulse of nerve growth factor triggers long-term neuronal excitability trough sodium channel gene induction. *Neuron* 14:907-11
- Traynor, A. E., Schubert, D. & Allen, W. LR. (1982). Alterations of lipid metabolism in response to nerve growth factor. *J. Neurochem.* 39, 1677-1683.
- Tsao, H., Aletta, J. M., & Greene, L. A. (1990). Nerve growth factor and fibroblast growth factor selectively activate a protein kinase that phosphorylates high molecular weight microtubule-associated protein. Detection, partial purification and characterization in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 265, 15471-15480
- Usicker, K., Drisch, B., Otten, J., & Thoenen, H. (1978). Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3498-3502.
- Usicker, K. & Mueller, T. H. (1981) Purification of bovine adrenal medullary cells by differential plating. *J. Neurosci Methods* 4:227-241.
- Usicker, K. Seidl, K. & Hofmann, H. D. (1989). The neuro-endocrine ambiguity of sympathoadrenal cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 7:413-417.
- Valle, R. (1980) Structure and phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3208-3210.
- Verdi J, Birren S, Ibanez CI, Persson H, Kaplan D, et al (1994). p75LNGFR regulates trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron*.12:733-45.
- Vetter, M. L., Martin-Zanca, D., Parada, L. F., Bishop, J. M. & Kaplan, D. R. (1991) Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1 by a kinase activity associated with the product of the trk proto-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 5650-5654.
- Vogel, K. S. & Weston, J. A. (1990) The sympathoadrenal lineage in avian embryos. I Adrenal chromaffin cells lose neuronal traits during embryogenesis. *Dev. Biol.* 139:1-12.
- Volante, C. & Greene, L. A. (1990b) Induction of ornithine decarboxylase by nerve growth factor in PC12 cells: Dissection by purine analogues. *J. Biol. Chem.* 265, 11050-11055.-
- Wakade, A. R., Wakade, T. D., Malhotra, R. K. & Bhawe, S. V. (1988). Excess K⁺ and phorbol ester activate protein kinase C and support the survival of chick sympathetic neurons in culture. *J. Neurochem.* 51:975-983.

Yankner BA & Shooter EM (1979) Nerve growth factor in the nucleus: interaction with receptors on the nuclear membrane. PNAS USA 76:1269-73.

Yang, H, Kriho V, Lieska N. & Pappas G. (1996). Immunomicroscopy of Neurofilaments in Chromaffin Cells of the Adult Bovine Adrenal Gland. J Comp Neurol 371:461-468.

Yao R & Cooper G (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. Science. 267:2003-6.

Young SW, Dickens M & Tavaré JM (1994) Differentiation of PC12 cell in response to a cAMP analogue is accompanied by sustained activation of mitogen-activate protein kinase. Comparison with the effects of insulin, growth factors and phorbol esters. 338(2):212-6.

Xu Z, Marszalek JR, Lee MK, Wong PC, Folmer J, Crawford TO, Hsieh ST, Griffin JW & Cleveland Dw (1996) Subunit composition of neurofilaments specifies axonal diameter. J Cell Biol 133(5):1061-9.

Ziegler, W. & Unsicker, K. (1981). Differential effects of cyclic AMPc and choera toxin on nerve growth factor-induced neurite outgrowth from adrenal medullary chromaffin and pheochromocytoma cells. Dev. Brain Res. 1:622-627.