



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE
LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE LOS
RECEPTORES DE CALCIO INTRACELULAR DE
INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO Y DE RIANODINA EN
EL NERVIIO CIÁTICO DE LA RATA EN CONDICIONES
NORMALES Y DURANTE LA DEGENERACIÓN
WALLERIANA”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA:
ALEJANDRO MARTÍNEZ GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MYRNA DENT



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó en
el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de
la Facultad de Medicina
de la Universidad Autónoma del Estado de México

A lo largo del Doctorado conté con una beca CONACYT, 153149

El presente trabajo de investigación fue financiado por
CONACYT: 25418-N y 33540-N

DEDICATORIA

A XIMENA

**"Siempre hay algo de demencia en el amor,
pero también siempre hay algo de razón en la demencia"**

Friedrich Wilhelm Nietzsche

A MIS PADRES, VIOLETA Y AGUSTÍN

A MIS HERMANOS, MARCO, NIDIA Y MIRIAM

AGRADECIMIENTOS

No hay forma alguna de expresar toda la gratitud de trabajar con usted... Por todo lo que ha hecho e influido en mí, en todos los ámbitos. Gracias, Dra. Myrna Dent.

A la enorme guía y apoyo académico, inagotable fuente de inspiración para el pensamiento científico y filosófico. Gracias, Dr. Armando Aranda Anzaldo.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz y al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por su valiosa asesoría dentro de mi comité tutorial.

A los sinodales: Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza, Agustín Guerrero Hernández, Juan Riesgo Escovar, Alfredo Varela Echavarría y Arturo Hernández Cruz, por sus enriquecedores comentarios, y sugerencias al presente trabajo.

A Claudia Rivera Cerecedo por la gentileza y amabilidad de proporcionarnos la materia prima experimental, las ratas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Juan Carlos Rivera Mulia, Claudia Trevilla García, Janeth Alva Medina, Edith Segura Anaya, Ricardo Lara Rodríguez, por compartir este gran espacio, por permitir influir en sus gustos musicales y por dejar convertir ocasionalmente el laboratorio en una estación de radio espacial. Y por las sabatinas funciones de cine. Gracias por compartir buenos momentos.

Al personal del laboratorio, a Laura Urbina Ballina por todo el apoyo administrativo brindado en el laboratorio. A Ernesto Hernández Mejía, por su enorme labor como técnico laboratorista y a Luis Enrique Bastida Gonzáles, por mantener "limpio y en orden" el pequeño espacio habilitado como bioterio.

A mi padre, Agustín Martínez Mancera, por ser un enorme oráculo... Origen de inspiración y sabiduría.

A mi madre, principio de complejidad... Espíritu combativo y necesidad.

A mi hermano, Marco Martínez Gómez, por escuchar y compartir tantos momentos lindos.

A Ulises Suarez Gutiérrez por brindarme su amistad incondicionalmente. Sin un amigo así, la vida sería tan aburrida...

A Héctor Vázquez Rivera, por seguir en el mismo canal y frecuencia de comunicación biológico.

A la Facultad de Medicina de la UAEMéx.

A todos lo que hicieron posible que este proyecto de investigación pudiera ser concluido.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
SUMMARY	4
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN	6
CAPÍTULO 2	
ANTECEDENTES	12
2.1 EL SISTEMA NERVIOSO	12
2.2 LA NEURONA	12
2.3 LA NEUROGLÍA	14
2.4 FORMACIÓN DE LOS NERVIOS PERIFÉRICOS	15
2.5 LAS CÉLULAS DE SCHWANN	16
2.5.1 ANATOMÍA DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN QUE FORMAN MIELINA	18
2.5.2 ESTRUCTURA DE LOS NODOS DE RANVIER	19
2.6 LA DEGENERACIÓN WALLERIANA	22
2.6.1 LA REGENERACIÓN AXONAL	26
2.6.2 LA RECUPERACIÓN POSTERIOR A UNA LESIÓN EN LOS NERVIOS PERIFÉRICOS	26
2.7 EL CALCIO INTRACELULAR	28
2.8 LOS RECEPTORES DE CALCIO INTRACELULAR	29
2.9 LOS RECEPTORES DE INOSITOL 1, 4, 5-TRIFOSFATO	30
2.9.1 MECANISMOS DE LIBERACIÓN DE CALCIO A TRAVÉS DE LOS IP ₃ Rs	33
2.10 LOS RECEPTORES DE RIANODINA	34
2.10.1 MECANISMOS DE LIBERACIÓN DE CALCIO A TRAVÉS DE LOS RyRs	36
2.11 ASPECTOS GLOBALES DEL SEÑALAMIENTO DE CA ²⁺	37
2.12 EL PAPEL DEL CALCIO EN LAS CÉLULAS GLIALES	38
CAPÍTULO 3	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
3.1 HIPÓTESIS	42
3.2 OBJETIVO GENERAL	42
3.3 OBJETIVOS PARTICULARES	42
CAPÍTULO 4	
MATERIALES Y MÉTODO	43
4.1 ANIMALES DE LABORATORIO	43

4.2 NERVIOS CIÁTICOS EN CONDICIONES NORMALES Y LESIONES POR COMPRESIÓN Y TRANSECCIÓN DEL NERVIOS CIÁTICO	43
4.3 DISECCIÓN DEL NERVIOS CIÁTICO	44
4.4 AISLAMIENTO DE RNA TOTAL	44
4.5 TRANSCRIPCIÓN INVERSA ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA SEMICUANTITATIVA	45
4.6 SECUENCIAS DE LOS "PRIMERS", AMPLICONES Y SITIOS DE RESTRICCIÓN DE LOS IP ₃ Rs Y RyRs	46
4.7 TRANSCRIPCIÓN INVERSA	50
4.8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	50
4.9 EXPERIMENTOS DE RESTRICCIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN	51
4.10 CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE HIBRIDACIÓN	51
4.11 DENSITOMETRÍA	51
4.12 HISTOGRAMAS Y PRUEBA ESTADÍSTICA	52
4.13 ANTICUERPOS	53
4.14 INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL CEREBRO DE RATA PARA LOS IP ₃ Rs	53
4.15 NERVIOS DESMEMBRADOS	54
4.16 INMUNOHISTOQUÍMICA	55
4.17 DOBLE INMUNOHISTOQUÍMICA	55
4.18 CONTRA-TINCIÓN CON TIONINA PARA MARCAR NÚCLEOS CELULARES	56
4.19 ALIZARINA ROJA	56
4.20 HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	56
4.21 PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	57
CAPÍTULO 5	
RESULTADOS	59
5.1 NERVIOS CIÁTICOS NORMAL	59
5.1.1 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS IP ₃ Rs MEDIANTE RT-PCR	59
5.1.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DE LOS IP ₃ Rs	60
5.1.2.1 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP ₃ R1	60
5.1.2.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP ₃ R2	62
5.1.2.3 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP ₃ R3	63
5.1.3 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS RyRs MEDIANTE RT-PCR	66
5.1.4 HIBRIDACIONES <i>IN SITU</i> DE LOS RyRs EN EL NERVIOS CIÁTICO NORMAL DE LA RATA	66
5.2 DEGENERACIÓN WALLERIANA DEL NERVIOS CIÁTICO	69

5.2.1 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS IP ₃ Rs	
DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA	70
5.2.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DE LOS IP ₃ Rs	
EN EL NERVIO CIÁTICO LESIONADO POR COMPRESIÓN DE LA RATA	73
5.2.2.1.1 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP ₃ R1 EN LA REGIÓN DISTAL	73
5.2.2.1.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP ₃ R1 EN LA REGIÓN PROXIMAL	77
5.2.2.2.1 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP ₃ R2 EN LA REGIÓN DISTAL	77
5.2.2.2.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP ₃ R2 EN LA REGIÓN PROXIMAL	79
5.2.2.3.1 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP ₃ R3 EN LA REGIÓN DISTAL	79
5.2.2.3.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP ₃ R3 EN LA REGIÓN PROXIMAL	82
5.2.3 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS RyRs	
DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA	82
CAPÍTULO 6	
DISCUSIÓN	86
6.1 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS IP ₃ Rs Y RyRs EN EL NERVIO CIÁTICO NORMAL	86
6.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DE LOS IP ₃ Rs EN EL NERVIO CIÁTICO NORMAL	87
6.3 LOCALIZACIÓN DE LOS RNAm DE LOS RyRs	
EN EL NERVIO CIÁTICO NORMAL MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	90
6.4 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS IP ₃ Rs Y DE LOS RyRs	
DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA	91
6.5 INMUNOLOCALIZACIÓN DE LOS IP ₃ Rs	
DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA	95
6.6 ASPECTOS FUNCIONALES DE LA EXPRESIÓN DE LOS IP ₃ Rs Y LOS RyRs	
EN LAS CÉLULAS DE SCHWANN	99
CAPITULO 7	
CONCLUSIONES	102
ANEXO	105
BIBLIOGRAFÍA	106

RESUMEN

Con el fin de entender el papel del Ca^{2+} intracelular en el SNP, primero es necesario determinar tanto la expresión como la localización de las tres isoformas de los receptores intracelulares de Ca^{2+} de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3Rs) y de rianodina (RyRs), actores importantes en la regulación del Ca^{2+} intracelular. Para conocer si había la expresión de los RNA mensajeros (RNAm) de los IP_3Rs así como de los RyRs en el nervio ciático en condiciones normales, se llevó a cabo la técnica de transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) semicuantitativa. Las tres isoformas de ambas familias de receptores de calcio intracelular se expresan en el nervio ciático, siendo los RNAm del $\text{IP}_3\text{R3}$ (49%) y del RyR1 (45%) los de mayor expresión. Por otra parte, la cantidad de transcritos de los RyRs es mucho menor que la de los IP_3Rs , ya que se requiere el doble de templado inicial con los RyRs (1 μg) en comparación con los IP_3Rs (500 ng) para poder llevar a cabo la reacción de RT-PCR.

Para determinar la localización celular de los IP_3Rs y de los RyRs realizamos inmunohistoquímicas e hibridaciones *in situ*, respectivamente. Mediante inmunohistoquímica encontramos que las tres isoformas de los IP_3Rs tienen un patrón de distribución diferente. Los receptores de $\text{IP}_3\text{R1}$ e $\text{IP}_3\text{R2}$ se inmuno-localizan en los núcleos, el citoplasma perinuclear y redes citoplasmáticas de las células de Schwann que forman mielina (CSFM) y en bajos niveles en las células de Schwann que no forman mielina (CSNFM). El $\text{IP}_3\text{R3}$ está presente principalmente a lo largo de las CSNFM mostrando un intenso marcaje filamentoso; también se localiza en el citoplasma perinuclear de las CSFM. Un resultado muy interesante es que los IP_3Rs se inmuno-localizan de manera diferencial en los nodos de Ranvier. El $\text{IP}_3\text{R1}$ se localiza en los nodos de Ranvier de manera similar a la reportada para los canales de sodio $\text{Na}_v1.6$. El $\text{IP}_3\text{R2}$ se expresa en el citoplasma abaxonal muy próximo al nodo de Ranvier y en los procesos canaliculares. Este patrón de expresión es muy similar al encontrado para el canal de potasio Kv1.5 . El $\text{IP}_3\text{R3}$ se expresa en la región paranodal de las células de Schwann, entre el nodo de Ranvier y la región yuxtaparanodal (**Ver artículo anexo, Martínez-Gómez y Dent, 2007**).

Con los experimentos de hibridación *in situ* para las tres diferentes isoformas de los RyRs determinamos que esta familia de receptores de calcio intracelular se localizan tanto en las CSFM como en las CSNFM. En las CSFM los RyRs están presentes en el citoplasma perinuclear y abaxonal del internodo y en el citoplasma abaxonal próximo a los nodos de Ranvier. Estos resultados sugieren que a lo largo de la red citoplasmática de las CSFM hay presencia de retículo endoplasmático o de polisomas libres donde se sintetizan las proteínas de los RyRs . Por otra parte, también sugiere que los RNAm de los RyRs tienen secuencias de transporte y localización

subcelular (RTS) en la región 3' de la región no traducible del RNAm (UTR), ya que sus RNAm se localizan en las regiones nodales de las CSFM. En las CSNFM los RyRs se localizan en forma de granulos a lo largo del citoplasma.

Por otro lado, con el fin de determinar si se presentaban cambios en los niveles de expresión de los RNAm de los IP₃Rs y de los RyRs durante la degeneración Walleriana, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR semicuantitativa en nervios ciáticos lesionados tanto por compresión como por transección. Nuestros resultados indican que no se presentan cambios en el nivel de expresión con las tres diferentes isoformas de los IP₃Rs así como con RyR1 durante la degeneración Walleriana tanto en el muñón proximal como en el distal. Mientras que con el RyR2 y RyR3 se observa que presentan una discreta disminución en el nivel de expresión en el muñón distal y proximal respectivamente, cuyo significado fisiológico es desconocido. Aunque sugiere que el contacto axonal es requerido para mantener un nivel de expresión adecuado. Los RNAm de RyR2 y RyR3 en la región proximal y distal respectivamente, no muestran cambios en el nivel de expresión durante la degeneración Walleriana, al igual que con los nervios contralaterales para las dos familias de receptores de Ca²⁺ intracelular.

Con el objetivo de conocer si se presentaban cambios en la de distribución de los IP₃Rs durante la degeneración Walleriana a nivel de proteína, realizamos inmunohistoquímicas del nervio ciático lesionado por compresión. Nuestros resultados muestran que en la región distal de la lesión, los IP₃Rs presentan cambios de distribución, extendiéndose a lo largo de todo el citoplasma de las células de Schwann "denervadas". También se observa un intenso marcaje en forma de gránulos en los núcleos de las células de Schwann "denervadas" tanto con IP₃R1 como con IP₃R2 durante todo el proceso. Un resultado interesante es el obtenido con el IP₃R3, esta isoforma no se localiza en los núcleos en condiciones normales, sin embargo durante la degeneración Walleriana se observa un punteado discreto en el núcleo de las células de Schwann "denervadas" a los 15 y 20 días de ocasionada la lesión. Estos resultados sugieren que los IP₃Rs posiblemente tienen un papel importante en la activación de factores de transcripción a través de la movilización intranuclear de Ca²⁺. De esta manera, factores de transcripción relacionados con la proliferación y mielinización de las células de Schwann como CREB, cfos, Krox-24, Krox-20, Oct-6, Jun-D, Jun-B entre otros pueden ser regulados durante la degeneración Walleriana mediante la señalización intranuclear de Ca²⁺. Aunque la función fisiológica de la movilización de Ca²⁺ dentro del núcleo es desconocida. En contraste, en la región proximal no se observaron cambios de distribución de las tres isoformas con respecto al normal.

En conclusión, los resultados muestran que los RNAm de todas las isoformas de los IP₃R y los RyR se expresan en el nervio ciático de la rata. A nivel de proteína los IP₃Rs muestran un patrón de

distribución diferencial en las células de Schwann. Por otro lado, a nivel de RNAm los RyRs se observan tanto en CSFM como CSNFM. Durante la degeneración Walleriana, la expresión de los RNAm tanto de los IP₃Rs como del RyR1 no presentan cambios en los niveles de expresión, mientras que los RNAm del RyR2 y del RyR3 presentan una discreta disminución en los niveles de expresión en la porción distal y proximal respectivamente. A nivel de proteína la distribución de los IP₃Rs se extiende a lo largo del citoplasma de las células de Schwann “denervadas” sugiriendo que los IP₃Rs pueden ayudar a establecer la polaridad de las células de Schwann. Nuestros resultados sugieren que las tres isoformas de los IP₃Rs y de los RyRs deben jugar un papel importante en los nervios ciáticos tanto en condiciones normales como durante la degeneración y regeneración del nervio.

SUMMARY

In order to understand the role of intracellular Ca^{2+} in the Peripheral Nervous System (PNS), it is necessary to determine the expression and localisation of intracellular receptors known to be important for Ca^{2+} regulation. The aim of this study was to determine the expression and localisation of the three IP_3R and RyR isoforms in rat sciatic nerve. Using semi-quantitative RT-PCR, the three isoforms of both families of receptors were found to be expressed in the sciatic nerve, where among the isoforms the mRNAs of $\text{IP}_3\text{R3}$ (49%) and RyR1 (45%) show the highest levels of expression respectively. Also, the level of RyRs transcripts is much lower compared to that of IP_3Rs , since for doing the RT-PCR it is necessary to double the initial template of RyRs (1 μg) compared to that of IP_3Rs (500 ng).

The localisation of the IP_3Rs and RyRs in the sciatic nerve was determined by immunohistochemistry and *in situ* hybridisation respectively. Immunolocalisation studies showed that the distribution pattern of IP_3Rs is different for each isoform. In myelinating Schwann cells (MSC), $\text{IP}_3\text{R1}$ and $\text{IP}_3\text{R2}$ are localised in the cell nucleus, perinuclear cytoplasm and cytoplasmic networks. Also, the two isoforms are expressed at low levels in non-myelinating Schwann cells (NMSC). $\text{IP}_3\text{R3}$ is localised mainly in NMSC, showing a filamentous staining, also it is present in the perinuclear cytoplasm of the MSC. An interesting result is that the three IP_3Rs are differentially immunolocalised at the node of Ranvier. The $\text{IP}_3\text{R1}$ is localised at the nodes of Ranvier in a similar pattern to the sodium channels Nav1.6, suggesting that the $\text{IP}_3\text{R1}$ are forming clusters at the nodes. $\text{IP}_3\text{R2}$ is localised in the abaxonal cytoplasm next to the node of Ranvier and in the canalicular processes, resembling the distribution of the potassium channel Kv1.5. $\text{IP}_3\text{R3}$ is localised at the paranodal region of the Schwann cells between the node of Ranvier and the juxtaparanodal region (Martínez-Gómez y Dent, 2007).

In situ hybridisation studies revealed that the three RyR isoforms are localised in both MSC and NMSC. In MSC the RyRs are localised in the perinuclear, abaxonal and internodal regions of the cytoplasm, and in the abaxonal cytoplasm at the node of Ranvier. These results suggest the presence of endoplasmic reticulum or free polysomes throughout the NMSC cytoplasm, where the RyRs are synthesised. In addition, the localisation of mRNA RyRs suggest the presence of RNA transport signal (RTS) in the 3' untranslated region (UTR) of mRNA to ensure localised synthesis of the encoded protein at the nodal region.

The levels of mRNA of the IP_3R and RyR isoforms were studied during Wallerian degeneration in crushed and transected sciatic nerve by semi-quantitative RT-PCR. No change in the levels of expression of the IP_3R isoforms was observed. However, RyR2 and RyR3 show a modest decrease

of expression in the distal and proximal region of the sciatic nerve respectively, whose physiological significance is unknown, yet it suggests that axonal signals are required for achieving the right level of mRNA expression. No change in the mRNA expression of IP₃R isoforms and RyR1 is observed in the proximal and distal region of the injured sciatic nerve. Also, no changes are observed in the mRNA expression of the RyR2 and RyR3 in the distal and proximal region of damage nerves respectively. Finally, the contralesional nerves do not show changes in the mRNA expression of both families of intracellular Ca²⁺ channels.

Localisation of IP₃R isoforms during the Wallerian degeneration by crush injury was performed by immuno-histochemistry. In the distal region, the IP₃R isoforms are found throughout the cytoplasm of the denervated Schwann cells. In addition, an intense granular-like staining for IP₃R1 and IP₃R2 is present in the nucleus while IP₃R2 is localised throughout the nucleus at day 15 after lesion. Interestingly, IP₃R3 is not localised in the nucleus of normal Schwann cells, but at days 15 and 20 after lesion a speckle-like staining is observed in the nucleus of denervated Schwann cells. All together these results suggest that the IP₃R may have an important role in the activation of transcription factors throughout the mobilization of intranuclear Ca²⁺ signals. In this way transcription factors related with the proliferation and myelination of Schwann cells like CREB, c-fos, Krox-24, Krox-20, Oct-6, Jun D, Jun B could be regulated during Wallerian degeneration throughout intranuclear Ca²⁺ signals; although the physiological is not clear. In contrast, the proximal region of the damaged nerve did not show any change in the localisation of the IP₃R isoforms, compared to normal sciatic nerve.

In conclusion, the results show that all the IP₃R and RyR isoforms are expressed in the rat sciatic nerve. In situ hybridization shows that the RyR isoforms are present in both MCS and NMSC. The mRNAs levels of IP₃R do not change during Wallerian degeneration, however, the expression of RyR2 and RyR3 shows a small decrease in the distal and proximal regions of the sciatic nerve respectively. Each IP₃R isoform shows a different pattern of distribution in normal sciatic nerve. During Wallerian degeneration the IP₃R are expressed in the cytoplasm of the denervated Schwann cells, suggesting a role of these receptors determining the polarity of the Schwann cells. The results suggest that the IP₃R and RyR isoforms play an important role in normal sciatic nerve and also during Wallerian degeneration.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En el sistema nervioso periférico (SNP) de los vertebrados se lleva a cabo un vigoroso y exitoso proceso celular cuando son dañados o lesionados los axones; estos tienen la capacidad de regenerarse, aún sobre largas distancias. En contraste, en el sistema nervioso central (SNC) y de manera particular el de los mamíferos, la regeneración es mínima o está ausente, por lo que cuando se ocasiona un trauma o daño por lo regular resulta en un detrimento funcional permanente (Klusman y Schwab, 2005). Los trabajos de principio del siglo XX realizados por Santiago Ramón y Cajal y Francisco Tello (Ramón y Cajal, 1928), sugerían cierta capacidad regenerativa de las neuronas del SNC. Sin embargo, se tenía la aceptación general que tanto las fibras nerviosas del cerebro así como las de la médula espinal eran incapaces de regenerar para reestablecer una función nerviosa correcta (Klusman y Schwab, 2005). Posteriormente con los trabajos de Albert Aguayo (David y Aguayo, 1981; Aguayo et al., 1981; Bray et al., 1981) se transformó esta visión. Primero, se observó que al transplantar células gliales del SNC en los nervios periféricos los axones del SNP evitaban crecer sobre estas células gliales. Segundo, al transplantar segmentos de nervios periféricos en el SNC, para determinar si era posible que las neuronas crecieran en componentes del SNP, observando que las neuronas incapaces de crecer unos milímetros en el SNC después de una lesión, extendían sus axones por varios centímetros en los trasplantes con componentes del SNP. Estos experimentos demostraron que la incapacidad de los axones para regenerarse sobre largas distancias en el SNC no es debida a la inhabilidad intrínseca de las neuronas, sino a la naturaleza no permisiva del medio ambiente, en el cual los componentes neurogliales y el parénquima densamente empacado del SNC son hostiles a la regeneración (Klusman y Schwab, 2005).

En 1850, el neurofisiólogo inglés Augustus Waller observó la degradación de la parte distal de los nervios glossofaríngeo e hipogloso en rana, después de ocasionar una axotomía y estableció que el núcleo de la neurona es un elemento crítico para la sobrevivencia del axón (Waller, 1850). Este proceso fue denominado posteriormente degeneración Walleriana en donde se produce inicialmente la degradación de los axones y de las vainas de mielina en la región distal del axón (Waller, 1850). Subsecuentemente las células de Schwann que sobreviven se desdiferencian y comienzan a proliferar formando las bandas de Büngner, las cuales sirven como guía para que los axones regeneren dentro de la región distal del nervio (Stoll et al., 2002; Sulaiman et al., 2005). Además, en pocos días, el sitio de la lesión es invadido por los macrófagos que limpian los desechos de axones y los restos de mielina con el objetivo principal de generar un ambiente propicio para la regeneración axonal. Las células de Schwann también tienen la capacidad de fagocitar restos de

mielina, favorecido la limpieza y regeneración del sistema (Stoll et al., 2002; Scherer y Salzer, 1996; Avellino et al., 1995; Fernandez-Valle et al., 1995).

De acuerdo con marcadores moleculares de progresión del linaje, las células de Schwann se diferencian en células de Schwann que forman mielina (CSFM) y que no forman mielina (CSNFM). Después de una lesión en los nervios del SNP, las células de Schwann “maduras”, se desdiferencian y comienzan a expresar marcadores moleculares característicos de células de Schwann inmaduras (propios de etapas embrionarias finales) (Mirsky y Jessen, 1990; Jessen y Mirsky, 1991; Jessen et al., 1994). Todos estos cambios crean un medio ambiente que facilita la regeneración axonal, donde las células de Schwann forman parte de un sustrato particular para que se lleve a cabo esta regeneración, ya que los axones se regeneran guiándose por las células de Schwann y la lámina basal (bandas de Büngner), que eventualmente conducen a una remielinización y restauración de la función fisiológica del nervio (Fawcett y Keynes, 1990; Scherer y Salzer, 1996; Fu y Gordon, 1997; Sulaiman et al., 2005).

Por otra parte, el Ca^{2+} es una señal intracelular ubicua que controla numerosos procesos biológicos esenciales, tales como la proliferación celular, la exocitosis y la contracción muscular, entre otros. La concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) que en condiciones de reposo es de 100 nM puede ser incrementada a niveles aproximados de 1000 nM. Esta elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es ocasionada por la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de la membrana plasmática (VOCCs), generando una entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular y por la movilización de Ca^{2+} del retículo endoplasmático o sarcoplasmático (RE/RS) mediante los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3Rs) y de rianodina (RyRs) (Carafoli, 1987; Sambrook, 1990; Berridge, 1993; Berridge et al., 2000).

En los últimos años numerosos estudios han implicado a las células gliales en diferentes procesos requeridos para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso (SN) (Fields y Stevens, 2002). Las células gliales durante el desarrollo del SN se encuentran implicadas en la proliferación, migración y diferenciación de precursores neuronales, así como en la sinaptogénesis y la mielinización. En el SN adulto las células gliales pueden controlar la intensidad o fuerza de la actividad sináptica y pueden participar en el procesamiento de la información al coordinar la actividad entre grupos de neuronas (Pfrieger, 2002; Ullian et al., 2004; Stevens y Fields, 2000; Fields y Stevens, 2002; Auld y Robitaille, 2003a; Bullock et al., 2005). De esta manera, el señalamiento de Ca^{2+} mediado tanto por los IP_3Rs como por los RyRs, desempeña un papel relevante en el funcionamiento de las células gliales, así como en la comunicación con las neuronas

dentro del SN normal o cuando este comienza a tener un funcionamiento patológico (Fields y Stevens, 2002; Miller, 2005).

Mediante el desarrollo de nuevas técnicas de microscopía, sistemas de adquisición y análisis de imágenes en tiempo real, así como de marcadores fluorescentes que permiten estimar la concentración de iones en células vivas (Perea y Araque, 2003; Rudolf et al, 2003), se ha podido demostrar que tanto los astrocitos en el SNC, como las células de Schwann perisinápticas en el SNP, son células excitables y que su excitabilidad se basa en variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ (Hassinger et al., 1996; Cornell-Bell et al., 1990; Haydon, 2001; Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994; Araque et al., 1999; Newman et al., 1997; Robitaille, 1998; Guthrie et al., 1999; Kast, 2001). Estas respuestas en la $[Ca^{2+}]_i$ resultan de la actividad coordinada de cascadas de señalamiento responsables del movimiento de Ca^{2+} hacia el interior de la célula mediante canales de Ca^{2+} operados por voltaje o activados por ligandos, así como por los intercambiadores de Na^+/Ca^{2+} o mediante la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma mediada por los IP_3Rs y $RyRs$ localizados en los almacenes intracelulares de Ca^{2+} como lo son el RE/RS (Verkhratsky et al., 1998; Fields y Stevens, 2002; Cotrina y Nedergaard, 2005).

La excitabilidad astrocitaria en el SNC y de las células de Schwann perisinápticas (CSP) en el SNP, se desencadena por actividad sináptica neuronal, lo que demuestra la existencia de una comunicación entre las neuronas y este tipo de glía (Perea y Araque, 2003; Auld y Robitaille, 2003b; Cotrina y Nedergaard, 2005). Las variaciones del Ca^{2+} en los astrocitos también pueden presentarse como oscilaciones espontáneas independientes de la actividad neuronal (ondas de Ca^{2+}) que permiten la transmisión de señales entre estas células gliales a largas distancias, principalmente llevadas a cabo por el ATP (Perea y Araque, 2003).

Durante el desarrollo del SNC, las células precursoras de oligodendrocitos (CPOs) deben migrar y proliferar antes de diferenciarse en células productoras de mielina. Este proceso requiere señales tanto de astrocitos como de neuronas, las cuales involucran factores de crecimiento (Barres y Raff, 1999). Simpson y Russell (1996) han mostrado que la estimulación de los receptores colinérgicos muscarínicos en las CPOs, activa cascadas de segundos mensajeros, que en consecuencia incrementan la $[Ca^{2+}]_i$. Estos incrementos de Ca^{2+} intracelular son particularmente interesantes en los procesos celulares de las CPOs, donde desempeñan un papel muy importante durante la migración y diferenciación ya que son evidencia también de comunicación neuronal y astrocitaria (Haak et al., 2000). De manera similar se observa que en los conos de crecimiento axonales incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ regulan su motilidad (Spitzer et al., 2000; Davenport et al., 1995).

En el SCN y en el SNP se ha señalado que tanto los astocitos como las CSP, pueden monitorear y modular la actividad eléctrica axonal, mostrando la estrecha asociación y comunicación que existe entre este tipo de células gliales y las neuronas o las terminales axonales, la cual es llevada a cabo por movilizaciones y variaciones de Ca^{2+} . La dinámica de comunicación entre las células de Schwann y los axones ha sido poco explorada, sin embargo los estudios de Lev-Ram y Ellisman (1995), muestran que la actividad eléctrica axonal genera movimientos transitorios de Ca^{2+} en las células de Schwann, de manera particular en los nodos de Ranvier. Estos estudios sugieren que las células de Schwann presentan elementos de movilización de Ca^{2+} intracelular, aunque el desempeño fisiológico de las señales de Ca^{2+} mediado por los IP_3Rs o los RyRs y el papel funcional de la liberación de Ca^{2+} en los nervios periféricos es aún desconocido.

Nuestros estudios de transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) semicuantitativa, muestran que las tres isoformas de los IP_3Rs ($\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$ e $\text{IP}_3\text{R3}$) se expresan en el nervio ciático en condiciones normales. El $\text{IP}_3\text{R3}$ es el que presenta los mayores niveles de expresión, en comparación con las otras dos isoformas restantes las cuales presentan un nivel de expresión similar. Por otra parte, los resultados obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativa para los RyRs muestran que los genes para las tres isoformas para estos receptores (RyR1 , RyR2 y RyR3) se expresan en el nervio ciático de la rata en condiciones normales. Un dato interesante es que la concentración de templado inicial para poder llevar a cabo la reacción de RT-PCR con los RyRs tiene que ser del doble ($1 \mu\text{g}$) en comparación con los IP_3Rs (500ng), lo que sugiere que existe una cantidad mucho menor de transcritos de los RyRs . La expresión del RyR1 es mayor que la encontrada para los RyR2 y RyR3 , en donde ambas isoformas tienen un nivel de expresión similar.

Con anticuerpos específicos para cada una de las isoformas de los IP_3Rs se llevaron a cabo estudios de inmunohistoquímica para determinar la distribución de cada una de las isoformas de los IP_3Rs en el nervio ciático. Nuestros estudios muestran que las tres isoformas de los IP_3Rs tienen diferentes patrones de distribución en las células de Schwann y se inmuno-localizan tanto en las CSFM como en las CSNFM. Un resultado interesante es que las tres isoformas se localizan en los nodos de Ranvier. El $\text{IP}_3\text{R1}$ se agrupa en los nodos de Ranvier en forma similar al reportado para los canales Na^+ , $\text{Na}_v1.6$ (Caldwell et al., 2000). El $\text{IP}_3\text{R2}$ se encuentra en el citoplasma externo o membrana abaxonal de las células de Schwann muy próximas al nodo de Ranvier y en los procesos canaliculares; este patrón de expresión es similar al reportado para el canal de potasio, Kv1.5 (Mi et al., 1995). El $\text{IP}_3\text{R3}$ esta presente en la región paranodal, entre el nodo de Ranvier y la región yuxtaparanodal. Estos resultados muestran que las tres isoformas tienen una localización diferencial en las células de Schwann, sugiriendo que los IP_3Rs pueden ser importantes en el mantenimiento

de la fina arquitectura molecular de los nodos de Ranvier y posiblemente ser cruciales en la modulación de la conducción saltatoria de las CSFM (**Ver artículo anexo Martínez-Gómez y Dent, 2007**).

Con el objetivo de determinar en qué tipo de células de Schwann se expresan los RyRs, se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* utilizando sondas específicas para cada una de las tres isoformas. Los resultados muestran que los RyRs se localizan tanto en las CSFM como en las CSNFM. En las CSFM se encontró la expresión de RNAm de los RyRs en el citoplasma perinuclear, en las incisuras de Schmidt-Lanterman, en el citoplasma abaxonal internodal y en el citoplasma abaxonal próximo a los nodos de Ranvier. Con la técnica de hibridación *in situ*-inmunohistoquímica se pudo determinar que las tres isoformas se expresan a lo largo del citoplasma en las CSNFM cuando estas se marcaron con GFAP, (que es un marcador específico de CSNFM). De esta manera, los resultados muestran que los RNAm de los RyRs tienen un patrón de distribución similar, sugiriendo que los RyRs deben tener también un papel importante en el mantenimiento de la arquitectura molecular del nervio ciático.

Para conocer si se presentaban cambios en los niveles de expresión de los IP₃Rs y los RyRs durante la degeneración Walleriana llevamos a cabo estudios mediante RT-PCR semicuantitativa. Nuestros resultados no muestran cambios significativos en los niveles de expresión de los IP₃Rs, tanto en la región distal como en la región proximal del nervio lesionado por compresión, al igual que con el RyR1. Sin embargo, con el RyR2 en la porción distal y con el RyR3 en la región proximal, se presentan discretos cambios a la baja en el nivel de expresión. Estos resultados sugieren que la disminución en el nivel de expresión de los RNAm del RyR2 y del RyR3 probablemente estén modulando el Ca²⁺ intracelular evitando la liberación masiva de Ca²⁺ del RE que produciría efectos nocivos en las células de Schwann, ya que se ha mostrado que un incremento intracelular desmedido ocasiona una desmielinización vesicular (Smith et al., 1985; Smith y Hall, 1988).

Para conocer si las diferentes isoformas de los IP₃Rs presentan cambios de distribución durante la degeneración Walleriana, se llevaron a cabo estudios de inmunohistoquímica, lesionando el nervio ciático de rata por compresión. Una vez ocasionado un daño en un nervio periférico se produce el proceso conocido como degeneración Walleriana, en donde la región distal del nervio comienza a degradar la mielina y las células de Schwann se desdiferencian y proliferan. Después se lleva a cabo el proceso de regeneración en donde los axones de la región proximal extienden proyecciones axonales a su sitio blanco en la región distal y estos son remielinizados. Se ha descrito que la movilización de Ca²⁺ intracelular activa procesos sensibles a Ca²⁺ en las células de Schwann

durante el desarrollo, dentro de los que destacan la proliferación celular y la mielinización (Stevens y Fields, 2000).

Nuestros resultados mediante inmunohistoquímica muestran cambios en la distribución de los IP₃Rs durante la degeneración Walleriana. La inmuno-localización de los IP₃Rs se extiende a lo largo de todo el citoplasma de las células de Schwann "denervadas". A los 20 días de producida la lesión, las proyecciones axonales de la región proximal han invadido la región distal y muchos de los axones se encuentran en una etapa de remielización. Durante esta etapa los IP₃Rs se localizan a lo largo del citoplasma de las células de Schwann "denervadas", las cuales se encuentran estrechamente asociadas con los axones, recubriéndolos y extendiéndose a lo largo de los mismos. En algunos caso se ha re-establecido la localización de manera similar a la encontrada en condiciones normales.

Por otra parte, el IP₃R1 y el IP₃R2 se localizan en el núcleo de las células de Schwann "denervadas" y el IP₃R3 tiene una localización transitoria en el núcleo en el día 15 después de efectuada la lesión. Esto sugiere que la movilización mediada por estos receptores de Ca²⁺ intracelular posiblemente participe en la activación de genes. Por otro lado, la presencia de los IP₃Rs en el núcleo de las células de Schwann maduras y "denervadas" sugiere que el núcleo de estas células tienen retículo nucleoplasmático el cual tiene la capacidad de regular el señalamiento de Ca²⁺ en regiones subcelulares específicas (Echevarria et al., 2003).

En la porción proximal de los nervios ciáticos lesionados por compresión, nuestros resultados muestran que la localización de los IP₃Rs tienen un patrón de distribución semejante al encontrado en condiciones normales.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso (SN) recibe una abundante información del medio que le rodea y de sí mismo; de toda esa información, extrae lo esencial, almacena y emite un comando a los músculos o glándulas para dar una respuesta apropiada. En muchas ocasiones las respuestas suceden en milisegundos, como un reflejo o una respuesta automática. La principal tarea del SN es asegurar que un organismo se adapte de manera adecuada al medio ambiente (Brodal, 1992). Por esto el sistema nervioso es el conjunto de estructuras funcionalmente especializadas mediante las cuales el organismo procesa y responde adecuadamente a los estímulos que recibe, tanto del medio externo como del medio interno. De dicha adecuación depende la posibilidad de adaptación al ambiente y por lo tanto de supervivencia (Kandel et al., 2000).

Las neuronas y células gliales o neuroglía conforman el SN. Las neuronas son responsables de funciones únicas y se caracterizan por la capacidad de responder a estímulos mediante impulsos nerviosos. De esta manera, las neuronas se encargan de decodificar información compleja y conceptual en señales eléctricas. El significado que envuelve esas señales depende en gran medida de las interconexiones específicas de las neuronas. Las señales consisten en cambios del potencial de membrana producidos por corrientes eléctricas que fluyen a través de receptores iónicos en la membrana plasmática de la neurona (Kandel et al., 2000).

Anatómicamente el SN se divide en sistema nervioso central (SNC), el cual comprende el cerebro y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP), el cual conecta al SNC con los diferentes receptores y efectores que tiene el cuerpo. Tanto el SNC como el SNP pueden ser subdivididos en partes que se ocupan de manera primaria con la regulación de órganos y fluidos internos y partes que sirven para la adaptación al medio externo. El primero es denominado sistema nervioso autónomo o visceral y el segundo sistema nervioso somático (Lodish et al., 2004).

2.2 LA NEURONA

La neurona es la pieza fundamental del sistema nervioso, especializada para la rápida conducción de señales a largas distancias de una manera precisa. Una neurona típica tiene cuatro regiones morfológicamente definidas (Fig. 1): el cuerpo celular (el cual consiste del núcleo y el pericarion), las dendritas, el axón y la terminal sináptica; cada una de estas regiones tiene una función distinta en la generación de señales. El cuerpo celular es el centro metabólico de la neurona y de este se extienden dos procesos celulares denominados dendritas y axón. Típicamente una neurona tiene

varias dendritas, las cuales se ramifican de manera similar a las ramas de un árbol. Las dendritas tienen la función de recibir las señales de otras neuronas (Kandel et al., 2000; Kuffler et al., 2001).

El axón es un proceso tubular con un diámetro que varía entre 0.2 y 20 μm que se puede extender hasta más de un 1 m. El axón es la unidad de conducción de la neurona y es capaz de llevar información a grandes distancias propagando potenciales de acción. Los axones pueden ser envueltos por una vaina de mielina compuesta principalmente por lípidos y proteínas, la cual es esencial para una conducción rápida del potencial de acción. La vaina de mielina se forma por células gliales especializadas. Esta membrana multilaminar extremadamente compacta de mielina no es continua y presenta interrupciones en intervalos regulares, estas interrupciones son denominadas nodos de Ranvier, denominadas así en honor al neuroanatomista Louis Antoine Ranvier, quien fue el primero en describirlas al final del siglo XIX. Por último, el axón en su parte final extiende finas ramificaciones que conforman la terminal sináptica, la cual es una región de la neurona en la que se localizan los elementos para la transmisión del impulso nervioso (Kandel et al., 2000; Kuffler et al., 2001).

Una neurona transmite su información sobre las dendritas y cuerpo celular de otra neurona, el punto de contacto es conocido como sinapsis. La neurona que envía la información es denominada neurona presináptica y la célula que recibe dicha información es la neurona postsináptica. El espacio que separa a la neurona presináptica de la postsináptica es conocido como hendidura sináptica. Existen dos tipos de sinapsis: eléctricas y químicas, distinguiéndose por su morfología y mecanismo de funcionamiento. La sinapsis representa la principal forma de comunicación en el SN (Kandel et al., 2000).

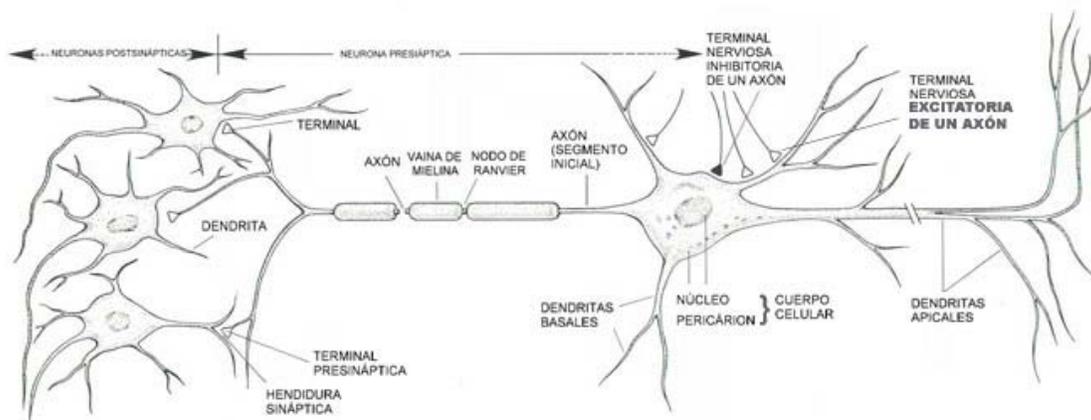


Figura 1. Esquema de una neurona típica de un vertebrado. Se ilustran las principales características, regiones y puntos de contacto con otras neuronas (esquema modificado de Kandel et al., 2000).

El mecanismo para la rápida conducción nerviosa a lo largo de los axones mielinizados involucra la presencia de agrupaciones de canales de Na^+ y K^+ acoplados a voltaje en los nodos de Ranvier. Los nodos se encuentran separados por la mielina, la cual es sintetizada por las CSFM en el SNP y por los oligodendrocitos en el SNC. La mielina aísla al axón, incrementa la resistencia y disminuye la capacitancia de las membranas axonales, dando como resultado la conducción saltatoria de nodo a nodo (Trapp y Kidd, 2000). Para producir la misma conductancia sin la mielina, los diámetros de los axones tendrían que incrementarse 15,000 veces (Salzer, 1997). Durante el potencial de acción, la membrana axonal en primer lugar se hace permeable a los iones Na^+ , lo cual permite una entrada rápida e importante de Na^+ despolarizando la membrana. Enseguida se produce una disminución a la permeabilidad al Na^+ , que continúa con un flujo de salida de K^+ , que repolariza la membrana y restablece el potencial de reposo (Kandel et al., 2000).

2.3 LA NEUROGLÍA

Las células no neuronales que forman parte del SN, son denominadas neuroglía o glía, termino acuñado por Rudolph Virchow en 1856 (Kettenmann y Ransom, 2005). Históricamente las células gliales fueron vistas como un tipo de tejido conectivo en el SNC cuya principal función era la de proporcionar soporte a las neuronas. Esta conceptualización sobre la glía se mantuvo sin cuestionamiento durante la mayor parte del siglo pasado, en parte debido a que carecen de las propiedades de la membrana plasmática de las neuronas, ya que no pueden disparar potenciales de acción. Las células gliales habían sido poco estudiadas en la comunicación y el procesamiento de información en el SN. Tradicionalmente se considerara que las células gliales únicamente tenían un papel como espectadores pasivos en el funcionamiento del SN, es decir, como asistentes de soporte estructural, trófico y metabólico de las neuronas (Rouach y Giaume, 2001; Fields y Stevens-Graham, 2002; Volterra y Meldolesi, 2005a). Sin embargo, las células gliales no son un tejido conectivo y tampoco un mero soporte para las neuronas. Ahora se conoce que son células que mantienen un estrecho funcionamiento con las neuronas y se encuentran involucradas en muchas de las acciones que lleva a cabo el cerebro, así como en su patología (Kast, 2001; Bullock et al., 2005; Miller, 2005).

En los últimos 15 años numerosos estudios han implicado a las células gliales en diferentes procesos requeridos para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso. En el SNC del total de las células que lo conforman las células gliales representan aproximadamente el 80-90% (Rao et al., 1998). En el SNP esta proporción es desconocida, sin embargo, algunas estimaciones sugieren que un axón de 1m de largo puede tener asociadas alrededor de 100, 000 células de Schwann que forman mielina (Mathey y Armati, 2007). Por otra parte, durante el desarrollo del SN, se ha

observado que las células gliales se encuentran implicadas en la proliferación, migración y diferenciación de precursores neuronales, así como en la sinaptogénesis y la mielinización. En el SN adulto las células gliales pueden controlar la intensidad o fuerza de la actividad sináptica y pueden participar en el procesamiento de la información al coordinar la actividad entre grupos de neuronas. De manera inversa las neuronas también pueden regular un amplio rango de actividades gliales como son la proliferación, diferenciación y mielinización (Ullian et al., 2004; Pfrieger y Barres, 1997; Fields y Stevens-Graham, 2002; Auld y Robitaille, 2003b, Bullock et al., 2005; Ullian et al., 2001; Hansson y Rönnbäck, 2003; Lin y Bergles, 2004; Jessen, 2004).

Existen dos principales clases de células gliales en el SN de los vertebrados: la macroglía que durante el desarrollo embrionario se origina a partir de células precursoras del ectodermo y que comprende en el SNC a los oligodendrocitos y a los astrocitos, y en el SNP a las células de Schwann que forman mielina (CSFM) y las células de Schwann que no forman mielina (CSNFM). La segunda clase es denominada microglía, y procede embrionariamente de células precursoras de monocitos de la médula espinal, las cuales también forman parte del SNC (Doetsch, 2003).

Los oligodendrocitos y las CSFM son las células que mielinizan al axón envolviéndolo mediante una vaina de mielina. La mielina está presente a través de todo el SN concentrada en áreas compuestas principalmente por los axones de las neuronas, como son la materia blanca en el cerebro, la médula espinal y los nervios periféricos (Norton y Cammer, 1984). La materia blanca de un cerebro de mamífero contiene cerca del 50 al 60% de mielina sobre la base de su peso seco (Norton y Autilio, 1966), mientras que los nervios periféricos mielinizados son todavía más ricos en mielina. Se calcula que la mielina de las raíces intradurales de buey puede llegar a ser de un 75% del peso seco (O'Brien, et al. 1967).

2.4 FORMACIÓN DE LOS NERVIOS PERIFÉRICOS

Los nervios periféricos se forman en fascículos de fibras neuronales envueltas en tejido conjuntivo compuesto principalmente de colágena. La cubierta del nervio tiene tres componentes. La parte más exterior es el epineuro, la cual está formada por tejido conectivo condensado que contiene grandes cantidades de fibras de colágena. El epineuro se encuentra fuera del tubo celular conocido como perineuro. La pared del perineuro consiste de varias capas de células aplanadas cubiertas por lámina basal que forman uniones sumamente estrechas e impermeables unas con otras. Dentro del perineuro las unidades celulares axón-célula de Schwann se encuentran embebidas en la matriz rica de colágena conocida como el endoneuro (Jessen y Mirsky, 1999; Jessen y Mirsky, 2005a).

Durante el desarrollo del nervio ciático, los precursores de las células de Schwann (PrS) carecen de lámina basal en etapas muy tempranas y se entrelazan con los fascículos de axones extendiendo procesos celulares entre los paquetes de axones. Además, estas células se encuentran al margen de lo que eventualmente se convertirá en un nervio o el fascículo nervioso y se orientan hacia el mesénquima con la membrana abaxonal. Conforme el desarrollo prosigue, los PrS comienzan a formar lámina basal, a proliferar y colectivamente a envainar fascículos de axones formando lo que Webster (1971) denominó familias de células de Schwann. A partir del nacimiento del organismo comienza la mielinización (Jessen y Mirsky, 2005a). En la etapa embrionaria cuando los PrS se diferencian en células de Schwann inmaduras, es cuando estas células se caracterizan por la capacidad de poder sobrevivir de manera independiente de los axones (cuando son colocadas en cultivos) mediante señales autócrinas (Jessen y Mirsky, 1998).

2.5 LAS CÉLULAS DE SCHWANN

Fenotípicamente se han distinguido 2 tipos de células de Schwann, las células de Schwann que forman mielina (CSFM) y las células de Schwann que no forman mielina (CSNFM). En un corte transversal de un nervio periférico mixto como es el nervio sural de humano, el número de CSNFM es 3 ó 4 veces mayor que el de CSFM, es decir que el nervio contiene aproximadamente 8,000 fibras mielinizadas por mm^2 , mientras que el número de axones no mielinizados es aproximadamente de 30,000 por mm^2 (Mathey y Armati, 2007). Estos dos tipos de células de Schwann tienen diferencias morfológicas, moleculares y estructurales ya que cada una de ellas expresa proteínas que las caracteriza (Mirsky y Jessen, 1990). Los nervios embrionarios son columnas compactas construidas y formadas exclusivamente por axones y los PrS. Estas columnas no tienen durante esta etapa tejido conectivo de reforzamiento o de protección, ni presentan vasos sanguíneos. Esas características surgen posteriormente cuando los nervios llegan a sus tejidos blanco (Jessen y Mirsky, 2005a).

El desarrollo del linaje de las células de Schwann envuelve tres transiciones; el primero es como PrS a partir de células de la cresta neural. Posteriormente estos precursores originan las células de Schwann inmaduras, las cuales durante el periodo postnatal se diferencian en CSFM y CSNFM (células de Schwann maduras) (Fig. 2). El desarrollo de estas células depende críticamente de señales asociadas al axón. Se ha observado que existe una estrecha relación entre el diámetro axonal y la mielinización. La mielinización sólo ocurre en células de Schwann que tienen la oportunidad de envolver axones de diámetro "grande" (mayor a $2 \mu\text{m}$), las células de Schwann que envuelven axones de diámetro pequeño (menores a $2 \mu\text{m}$) progresan hacia el fenotipo de las CSNFM (Jessen y Mirsky, 1998).

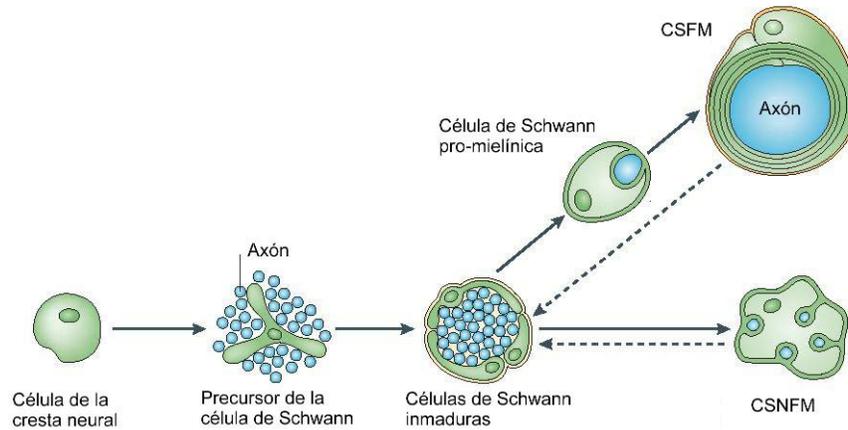


Figura 2. El linaje de las células de Schwann en rata y ratón. Las células de la cresta neural generan a los PrS, los cuales a su vez inducen la formación de células Schwann inmaduras antes del nacimiento; este paso parece ser irreversible. Después del nacimiento las células de Schwann inmaduras forman a las CSFM y CSNFM. Esta diferenciación depende de señales asociadas al axón y es reversible (indicado por las flechas con doble punta) (ilustración modificada de Jessen y Mirsky, 2005a).

La manera de poder distinguir el linaje de las células de Schwann se establece a partir de diferentes marcadores y factores moleculares. Hay tres principales sistemas implicados en el establecimiento del linaje de las células de Schwann a partir de la cresta neural: el señalamiento a través de Delta/Notch, mediante Neuroregulina-1 (Nrg-1) y a través del factor de transcripción Sox-10 (Jessen y Mirsky, 2005b). Los PrS no sobreviven en cultivo cuando son desprovistos del contacto axonal, mientras que las células de Schwann inmaduras tienen la capacidad de sobrevivir de manera independiente a los axones mediante mecanismos de señalización autócrina (Jessen y Mirsky, 2002; Martini, 2005). Esto representa una diferencia fundamental entre las células de Schwann inmaduras y sus precursores, las cuales son completamente dependientes de señalamiento mediado por Nrgs axonales para sobrevivir. Se han identificado componentes del señalamiento autócrino de las células de Schwann, entre estos se encuentran el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), neurotrofina 3 (NT3) y el factor inhibitorio de leucemia (LIF). Por otra parte, la laminina actúa junto con estos componentes como un promotor de la supervivencia (Jessen y Mirsky, 2005b).

En el proceso de diferenciación de las células de Schwann inmaduras las señales del axón brindan el estímulo necesario para que estos sean mielinizados. La naturaleza de estas señales es desconocida, pero se ha sugerido que depende del calibre del axón (Voyvodic, 1989), o que es el reflejo de las diferencias bioquímicas entre los diferentes tipos de axones (Salzer, 1995). Estudios recientes muestran que la neuroregulina-1 tipo III (Nrg-1 tipo III) es necesaria para la mielinización

en el SNP y diferencia a las células de Schwann inmaduras en células mielinizantes (Nave y Schwab, 2005).

2.5.1 ANATOMÍA DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN QUE FORMAN MIELINA

La estructura de los axones mielinizados se esquematiza en la figura 3. Las CSFM mielinizan al axón envolviéndolo mediante una vaina de mielina, formando de esta manera regiones internodales separadas por los nodos de Ranvier. Para mostrar la estructura trapezoidal de una CSFM, uno de los internodos se ha sido desenvuelto. La superficie que establece contacto con la lámina basal se denominada abaxonal (basal), mientras que la superficie que establece contacto con el axón es llamada adaxonal (apical). En el axón recubierto por las CSFM o por los oligodendrocitos, la vaina de mielina se hace más delgada conforme se aproxima a la región nodal; de esta manera los bordes adaxonales quedan ligeramente distantes del nodo de Ranvier, mientras que los bordes abaxonales forman asas más próximas a la región nodal (Fig. 3). Las asas formadas por las células se encuentran estrechamente unidas y forman contactos con la membrana axonal, esta región se conoce como paranodo. La región anterior a la paranodal se llama yuxtaparanodal (Scherer, 1999; Scherer y Arroyo, 2002; Trapp y Kidd, 2000; Arroyo et al., 2002; Salzer, 2003; Corfas et al., 2004).

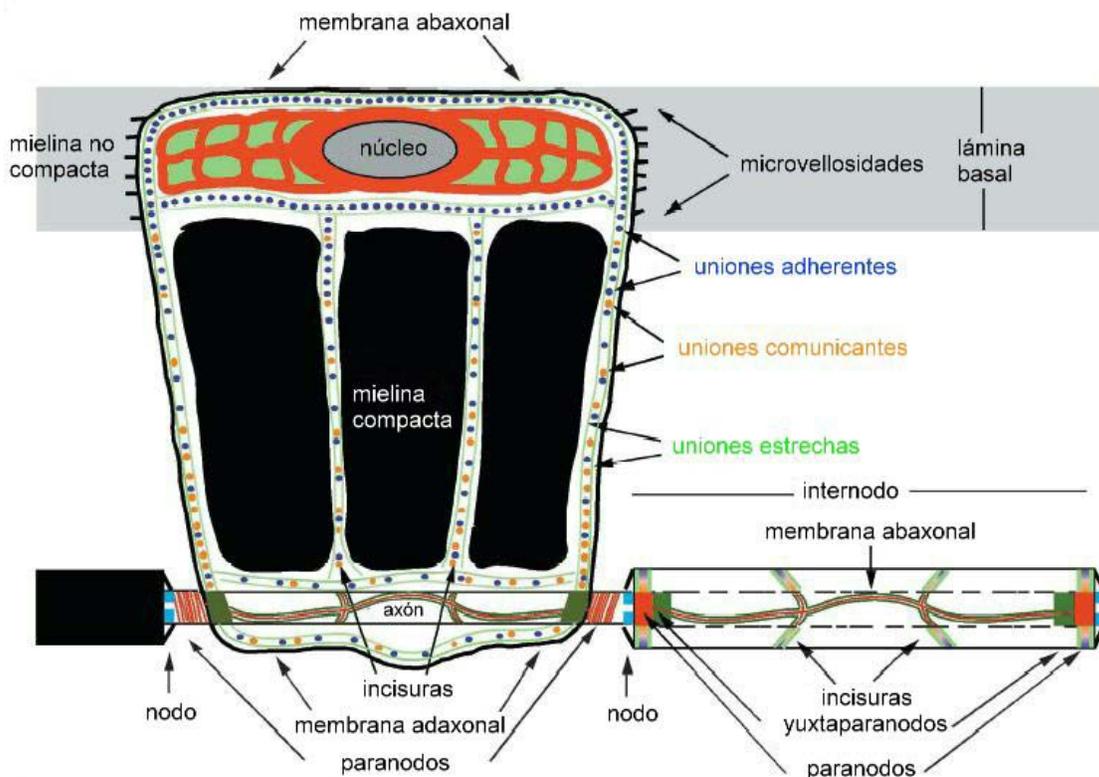


Figura 3. Esquema de un axón mielinizado, de los nodos de Ranvier, así como la asociación de la célula glial con el axón. Modelo de una célula de Schwann desenvuelta o extendida mostrando su estructura trapezoidal y todas las regiones

altamente especializadas que forman esta unión axo-glial, en la cual se pueden observar las zonas de mielina compacta y no compacta, las incisuras de Schmidt-Lanterman, las regiones yuxtaparanodales, paranodales y nodales, así como los diferentes tipos de uniones que se establecen entre las células mielinizantes con el axón. Las uniones adherentes se representan mediante círculos azules, las uniones comunicantes mediante pequeños círculos anaranjados y las uniones estrechas como líneas en color verde (esquema modificado de Scherer y Arroyo, 2002).

La vaina de mielina puede dividirse en dos dominios, el de mielina compacta y el de mielina no compacta, en esta última se localiza el núcleo (en el caso de las CSFM), los paranodos y las incisuras de Schmidt-Lanterman (que son las interrupciones con forma de copa presentes en la mielina compacta (Fig. 3). De esta manera, las membranas plasmáticas de la región nodal y paranodal son sitios de alta especialización, debido a su particular adhesión celular, pero también son centros de señalamiento celular. Las asas paranodales se adhieren estrechamente al axón a través de una continua espiral formando una unión axo-glial, que es muy similar a las uniones septadas de los invertebrados (Scherer y Arroyo, 2002; Trapp y Kidd, 2000; Salzer, 2003; Corfas et al., 2004).

2.5.2 ESTRUCTURA DE LOS NODOS DE RANVIER

Las vainas de mielina son una adaptación fundamental de los vertebrados, en donde los axones mielinizados tanto del SNC como del SNP están cubiertos casi en su totalidad por la vaina de mielina, exceptuando los nodos de Ranvier que son pequeños espacios (aproximadamente de 1 μm) relativamente expuestos al medio extracelular (Scherer, 1999). En el SNC, los oligodendrocitos mielinizan múltiples axones formando numerosos segmentos de mielina, mientras que las CSFM solo envuelven un axón generando un sólo segmento de mielina. Otra diferencia importante entre la mielina del SNC y el SNP, consiste en la presencia de lámina basal asociada con el exterior de la célula de Schwann mientras que los oligodendrocitos no son recubiertos por lámina basal. En el SNP la lámina basal tiene un desempeño crítico en la formación de la mielina (Bunge et al., 1986). De esta manera, en el SNP los nodos de Ranvier se mantienen en contacto con finos procesos de las CSFM conocidos como microvellosidades además de ser cubiertos por la lámina basal (Fig. 4 1A) (Jessen y Mirsky, 1999), mientras que en el SNC los nodos de Ranvier se encuentran expuestos al medio extracelular o están cubiertos por procesos astrocíticos, recientemente denominados "sinantocitos" (Fig. 4 1B) (Black et al., 1995; Poliak y Peles et al., 2003).

La organización de la unión del axón con las CSFM o los oligodendrocitos es muy peculiar formando un complejo nodal que muestra una alta especialización. La arquitectura molecular de los nodos de Ranvier en el SNC y el SNP es muy similar, siendo las diferencias anatómicas las principales (Fig. 4 2). En la región axonal yuxtaparanodal se localizan agrupaciones de canales rectificadores tardíos de K^+ ; Kv1.1, Kv1.2 y Kv β 2 (Arroyo et al., 1999; Scherer y Arrollo, 2002; Hildebrand et al., 1994;

Kocsis et al., 1983), los cuales estabilizan la conducción y ayudan a mantener el potencial de acción. Además estos canales co-localizan y crean un complejo con la proteína de adhesión Caspr-2 (proteína asociada a contactina) perteneciente a la superfamilia de las neurexinas. En la membrana adaxonal de las CSFM se localiza TAG-1 (glicoproteína axonal transitoria 1), que es una molécula de adhesión celular anclada a GPI (glicofosfatidil inositol) relacionada con contactina y conexina 29 (Cx29) (Corfas et al., 2004). En el axón Caspr-2 forma un complejo-cis con TAG-1 presente en la membrana adaxonal de la célula de Schwann. En ausencia de Caspr-2 y TAG-1, el andamio que mantiene a los canales de K⁺ dentro de la posición correcta en la región yuxtaparanodal se pierde y los canales de K⁺ se distribuyen a lo largo del internodo (Corfas et al., 2004). Por otra parte, Caspr-2 tiene dominios intracelulares PDZ, al igual que los canales Kv1.1 y Kv1.2, por lo que es probable que sean formados complejos mediados por una proteína que tiene múltiples sitios de unión a dominios PDZ (Scherer y Arrollo, 2002). Caspr-2 tiene un sitio de unión intracelular a la proteína Banda 4.1 (B4.1), y esta proteína se localiza en esta región (Ohara et al., 2000; Parra et al., 2000; Salzer, 2003).

La región paranodal (Fig. 4 2), se encuentra constituida por las uniones paranodales o también conocidas como uniones septadas (nombradas así por la similitud a las encontradas en los insectos). Estas uniones son formadas por el axón y la terminación de la CSFM, la cual establece asas citoplasmáticas que rodean al axolema, esta región se encuentra inmediata al nodo de Ranvier. Se ha propuesto que las uniones paranodales establecen un ensamblaje firme entre la vaina de mielina y el axón, para separar la actividad eléctrica que se lleva a cabo en el nodo de Ranvier de la región internodal la cual se encuentra envuelta por mielina compacta. De esta manera la región paranodal sirve como frontera que limita la difusión lateral de iones y pequeñas moléculas (Corfas et al., 2004). El axolema de los paranodos expresa el complejo formado por la unión de las moléculas de adhesión Caspr y contactina (Peles et al., 1997; Einheber et al., 1997), este complejo es anclado al citoesqueleto axonal mediante la proteína 4.1B. La membrana glial de la unión paranodal expresa neurofasina 155 (NF-155) de manera específica (Tait et al., 2000). NF-155 se une directamente a contactina, aunque se desconoce con qué región del complejo Caspr/contactina interactúa (Peles et al., 1997, Trapp y Kidd, 2000).

El nodo de Ranvier (Fig. 4 2) se caracteriza por tener una alta densidad de canales de Na⁺ dependientes de voltaje ($\sim 1200/\mu\text{m}^2$), los cuales son esenciales para la generación del potencial de acción. El canal Na_v1.6, parece ser el que tiene una mayor expresión en los nodos (Caldwell et al., 2000), aunque también se ha reportado la expresión de los canales Na_v1.2, Na_v1.8 y Na_v1.9 en los nodos de Ranvier (Boiko et al., 2001; Kaplan et al., 2001). Los canales de Na⁺ co-localizan con los canales de potasio, KCNQ2 (Kv7.2) (Devaux et al., 2004) y muchas otras proteínas

transmembranales y del citoesqueleto. Entre estas proteínas se encuentran los intercambiadores de Na^+ - K^+ dependientes de ATP, los cuales mantienen el equilibrio iónico de la membrana nodal (Scherer, 1999). También se han localizado las moléculas de la superfamilia Ig (Ig-CAMs) NrCAM y neurofascina 186 (NF-186) (Davis et al., 1996), las proteínas adaptadoras de membrana plasmática-citoesqueleto Ankirina_G (Ank_G) (Kordeli et al., 1995) y la proteína de unión a actina, espectrina β IV (Berghs et al., 2000). Las isoformas de 480 y 270 kDa de Ank_G unen proteínas integrales de la membrana plasmática a espectrina y esta última se une con el citoesqueleto de actina, formando un complejo con los canales de Na^+ (Lambert et al., 1997), los canales de K^+ KCNQ2, NF-186 y NrCAM. La interacción entre la Ank_G y espectrina puede proporcionar un fuerte anclaje de las agrupaciones de canales de Na^+ e Ig-CAMs al citoesqueleto. (Scherer y Arrollo, 2002; Salzer, 2003; Corfas et al., 2004). El contacto axo-glial en los nodos puede ser llevado a cabo por NrCAM y NF186 o por la subunidad β de los canales de Na^+ .

En el SNP, el axolema nodal está expuesto al contacto de microvellosidades que se desprenden de las CSFM. Las proteínas ERM (ezrina, radixina y moesina) (Melendez-Vazquez et al., 2001; Scherer et al., 2001), así como la proteína que une ezrina EBP50 (Gatto et al., 2003), la GTPasa Rho-A, (Melendez-Vazquez et al., 2004), sindecanos (Goutebroze et al., 2003), distroglicanos (Saito et al., 2003) y gliomedina (Eshed et al., 2005) se distribuyen en las microvellosidades. Se ha sugerido que las proteínas ERM se unen a los filamentos de actina mediante su dominio C-terminal y se pueden asociar a diferentes proteínas integrales de la membrana mediante su dominio N-terminal (Scherer y Arroyo, 2002). Es probable que las proteínas ERM se unan a las moléculas de adhesión celular de las microvellosidades y que estas a su vez interactúen con moléculas del axolema nodal estabilizando el complejo de ensamblaje del nodo de Ranvier (Martini, 2005).

Los nodos de Ranvier se sitúan a intervalos regulares dependiendo del diámetro del axón, a una longitud aproximadamente de 100 veces el diámetro del axón, teniendo intervalos de 150 μm a 2.0 mm y actúan como propagadores del impulso nervioso. La importancia fisiológica de este arreglo radica en la entrada de Na^+ en la región nodal que despolariza la membrana axonal, mientras que en la región yuxtaparanodal, se ha sugerido que los canales de K^+ permiten la salida de este ión, con lo que se restablece el potencial de membrana después de un potencial de acción (Trapp y Kidd, 2000; Fields y Stevens-Graham, 2002). Las características de las corrientes iónicas de K^+ en los nodos de Ranvier de mamífero son distintas a las presentadas en axones gigantes de calamar y axones mielinizados de anfibio (Horackova et al., 1968; Chiu et al., 1979).

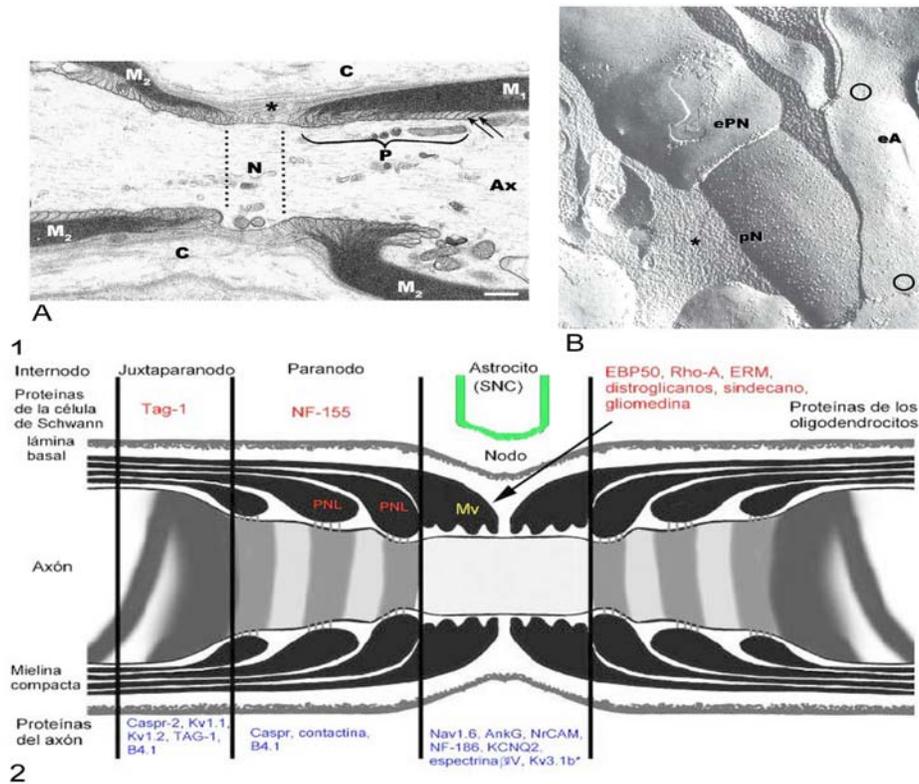


Figura 4. (1) Microfotografías electrónicas del nodo de Ranvier en el SNP (A) y en el SNC (B). (A) Microfotografía electrónica de un nodo de Ranvier del nervio ciático de rata, (M1 y M2) son dos CSFM, (N) es la región nodal. (*) microvellosidades. Las asas paranodales (flechas) se encuentran en estrecho contacto con la membrana axonal. (P) Región paranodal. (Ax) Axón. (C) Fibras de colágena que se encuentran en el espacio extracelular formando parte de la lámina basal. La barra de escala es de 0.4 μ M (imagen modificada de Jessen y Mirsky, 1999). (B) Microfotografía electrónica mediante la técnica de fractura por congelamiento, que muestra un axón mielinizado del nervio óptico de la rata (pN, rostro protoplasmático de la membrana axonal en el nodo de Ranvier; ePN, rostro del compartimiento extracelular de un oligodendrocito (x85,000). Un astrocito perinodal (eA), el cual despliega su rostro extracelular a través del neuropilo para contactar en el nodo de Ranvier, los arreglos ortogonales que son característicos de membranas astrocitarias, se observan dentro de los círculos. Los asteriscos, muestran el espacio extracelular, no hay presencia de lámina basal en el SNP (imagen modificada de Black et al., 1995). (2) Modelo de la estructura molecular del complejo nodal y las diferentes interacciones que se llevan a cabo en esta región, entre las CSFM y el axón (PNL, asas paranodales; Mv, microvellosidades) y los oligodendrocitos y el axón cubierto por un proceso astrocítico denominado "sinantocito" (dibujo modificado de Corfas et al., 2004).

2.6 LA DEGENERACIÓN WALLERIANA

En 1850 Augusto Waller describió la desintegración de los nervios glossofaríngeo e hipogloso de rana después de producir una axotomía, la descripción que Waller realizó de esta lesión es aplicable a todas las lesiones nerviosas que interrumpen la integridad del axón. De esta manera el proceso que ahora nosotros llamamos degeneración Walleriana puede ser ocasionado por lesiones inflamatorias o autoinmunes del axón, así como por cortes o lesiones por compresión del axón (Fig. 5) (Waller, 1850; Stoll et al., 2002).

Los nervios periféricos mantienen estables sus conexiones con sus células blanco a través de la vida de un animal bajo condiciones normales. Sin embargo, mucho del comportamiento celular relacionado con el crecimiento persiste en neuronas maduras, ya que pueden continuamente remodelar sus conexiones produciendo y transportando moléculas necesarias para el crecimiento del nervio. Cuando se produce daño en los nervios periféricos se inicia el proceso de degeneración Walleriana, y a los paquetes de axones que mantienen contacto con el cuerpo neuronal y que sobreviven a la lesión se denomina región proximal, mientras que el paquete de axones que pierde contacto con los cuerpos neuronales, se denomina región distal. En esta región, los axones y la vaina de mielina se fragmentan generando elipsoides u ovoides. Estos restos celulares son removidos por las células de Schwann y por los macrófagos invasores (Fawcett y Keynes, 1990).

La región proximal cercana al sitio de la lesión, muestra signos de degeneración, la cual está asociada con la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular (Mata et al., 1986; Bisby, 1995) y la activación de proteasas activadas por Ca^{2+} (Schlaepfer y Micko, 1979; Bisby, 1995). La interrupción axonal se extiende de manera variable en la región proximal, aproximadamente 2 mm a partir del sitio de la lesión (Ramón y Cajal, 1928), usualmente en el primer o segundo nodo de Ranvier. Es probable que de acuerdo con lo considerablemente estrecho del axón en los nodos de Ranvier se restrinja la difusión de iones de Ca^{2+} que dañan al axón; sin embargo, las regiones paranodales de las células de Schwann pueden ser sitio de salida de Ca^{2+} el cual puede invadir el sitio de la lesión y ocasionar daño a los axones (Mata et al., 1987; Bisby, 1995). Por otra parte, la entrada de iones Ca^{2+} al sitio de la lesión es importante para resellar la membrana dañada, un proceso que requiere de la activación de proteasas similares a calpaina producida por la elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del axón, la cual remodela y desensambla las conexiones entre la membrana plasmática y el citoesqueleto. Se sugiere que las proteínas como espectrina/foridina y Ank_G que forman la unión entre estas estructuras celulares, se rompen permitiendo la movilidad y reorganización del axolema (Xie y Barrett, 1991; Bisby, 1995).

Después de una lesión en un nervio periférico, las células de Schwann "maduras" se desdiferencian generando un fenotipo similar al encontrado durante el desarrollo (células de Schwann inmaduras), este fenotipo celular es denominado células de Schwann "denervadas", ya que son privadas del contacto axonal. Posteriormente durante los primeros días de la degeneración Walleriana, las células de Schwann "denervadas" y los macrófagos desempeñan el principal papel en la degradación y fagocitosis de restos celulares producidos por el trauma, principalmente mielina y restos axonales (Fernandez-Valle et al, 1995). Inmediatamente después de una lesión, los macrófagos son reclutados en el sitio de la lesión así como las células T, estas células se extienden

a todo el muñón distal. Los macrófagos realizan una rápida limpieza de los restos de mielina, la cual aparentemente contiene inhibidores del crecimiento de neuritas, como la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) y de esta manera facilitan la regeneración nerviosa (Stoll et al., 2002), también la entrada de los macrófagos al sitio de la lesión estimula a las células de Schwann para que proliferen al liberar en el lugar del trauma citocinas como: interlucina (IL)-1 β , IL-6, IL-10, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el interferón (IFN- γ) (Avellino et al., 1995; Fawcett y Keynes, 1990; Fernandez-Valle et al., 1995; Pellegrino y Spencer, 1985; Podhajsky y Myers, 1993; Stoll et al., 1989).

La respuesta inmediata de las células de Schwann maduras a un daño axonal en la región distal consiste en desdiferenciarse y por otro lado las CSFM regulan a la baja la síntesis de proteínas de mielina, incluyendo la proteína P₀, la proteína básica de la mielina (MBP), proteína de mielina periférica de 22 kDa (PMP22) y la MAG (LeBlanc y Poduslo, 1990; Scherer y Salzer, 1996; Jessen y Mirsky, 1991; Stewart et al., 1996; Olawale et al., 2005). También las CSFM comienzan a fragmentar su propia mielina en elipsoides y a fagocitar desechos de mielina. En los días siguientes, los elipsoides de mielina desaparecen a mediada que son fagocitados por los macrófagos que invaden el nervio en regeneración. Los cambios de expresión en proteínas y glicolípidos son probablemente adaptativos, ya que el fenotipo de las células de Schwann "denervadas" no necesita expresar genes relacionados con la mielina, mientras que las moléculas de adhesión molecular que este tipo de células expresa [la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM), la molécula de adhesión celular L1, el receptor del factor de crecimiento neuronal (NGFR), la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) (Fu y Gordon, 1997), promueven la regeneración axonal (Scherer y Salzer, 1996).

En la lesión por compresión, la lámina basal que rodea cada célula de Schwann permanece intacta, de esta manera las células de Schwann continúan siendo cubiertas por su lámina basal (Fig. 5 A). Las células de Schwann "denervadas" en la región distal se vuelven mitogénicas, con un pico de proliferación entre el tercer y quinto día post-axotomía. Esta actividad mitótica resulta en la formación de cordones de células de Schwann, que reciben el nombre de bandas de Büngner (Fig. 5 B). De esta forma, mientras los axones y las capas de mielina se degradan durante la degeneración Walleriana, las células de Schwann "denervadas" y su lámina basal persisten (Scherer y Salzer, 1996).

Los axones mielinizados de la región proximal se regeneran al establecer contacto con las células de Schwann "denervadas" presentes en las bandas de Büngner, posteriormente cuando comienza la re-mielinización las células de Schwann "denervadas" envuelven a los axones y comienzan a sintetizar mielina. Sin embargo, en los nervios regenerados, la distancia internodal nunca logra ser

como en los nervios normales, también hay persistencia de vainas de mielina más delgadas de lo habitual, sugiriendo que las velocidades del potencial de acción son más lentas en los nervios regenerados (Fawcett y Keynes, 1990; Scherer y Salzer, 1996). Las extensiones axonales no mielinizadas de la región proximal regeneran en contacto con las células de Schwann “denervadas” de las bandas de Büngner, frecuentemente en paquetes de axones asociados con células de Schwann, posteriormente cada axón de diámetro “pequeño” es envuelto por procesos de las células de Schwann “denervadas” las cuales se re-diferenciarán en células de Schwann que no forman mielina, mientras que los axones de diámetro “grande” serán cubiertos por CSFM. Las señales axonales determinan cuáles axones deben ser mielinizados, sin importar si las células de Schwann estuvieron originalmente relacionadas con axones mielinizados o no (Fawcett y Keynes, 1990).

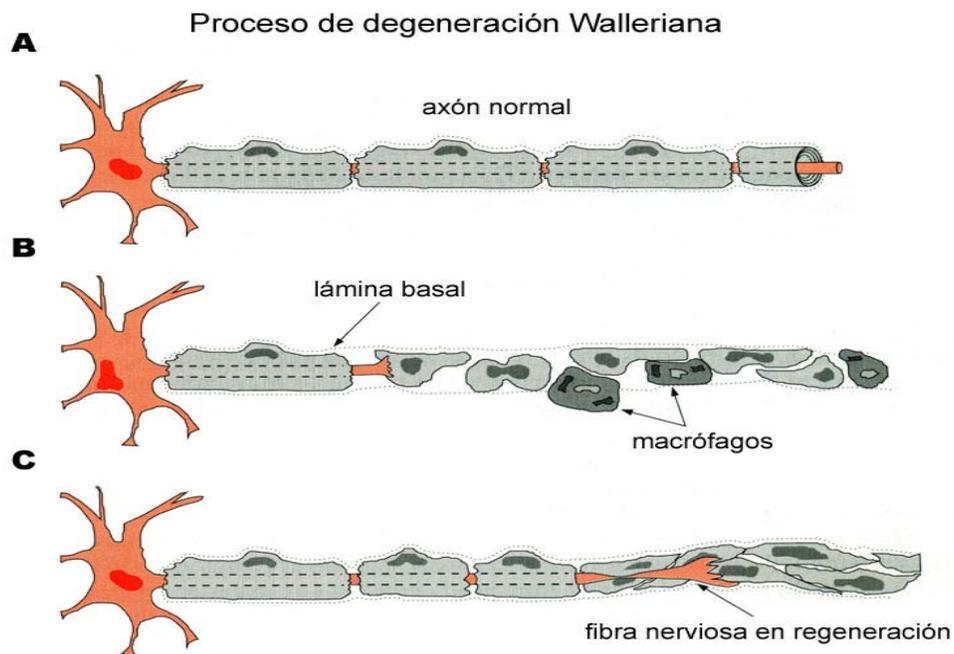


Figura 5. Cambios en el nervio periférico durante la degeneración Walleriana. Cada panel del esquema muestra una neurona, su axón y las células de Schwann asociadas. (A) un axón mielinizado no lesionado. Las células de Schwann que forman mielina están recubiertas por la lámina basal, la cual también protege al nodo de Ranvier. (B) Unos pocos días después de haber sido lesionado el nervio, el axón y su vaina de mielina degeneran en el extremo distal del sitio de la lesión. Los macrófagos invaden el extremo distal del nervio, penetran la lámina basal y fagocitan la mielina en degeneración. Las células de Schwann “denervadas” comienzan a proliferar. (C) En el extremo proximal a la lesión, los axones en regeneración forman conos de crecimiento los cuales penetran el muñón distal y comienzan a regenerar dentro del tubo de las células de Schwann. Unas pocas semanas después de la lesión, el axón se ha regenerado dentro de las bandas de Büngner y los axones son envueltos por las células de Schwann para posteriormente mielinizarlos (imagen modificada de Scherer y Salzer, 1996).

2.6.1 LA REGENERACIÓN AXONAL

El SNP tiene una gran capacidad para regenerar los axones después de una lesión. En contraste con el SNC, esta característica del SNP, es el resultado de la capacidad de las células de Schwann y su medio ambiente de soportar la regeneración axonal; contrario a los oligodendrocitos en el SNC, los cuales al ocasionarse un daño en el cerebro o médula espinal mantienen lesiones permanentes.

El proceso de regeneración axonal y reinervación con su blanco involucra diversos factores estrechamente relacionados con la lesión producida a la neurona, el crecimiento y desarrollo del medio ambiente del muñón distal y los sitios blanco. Las neuronas que sobreviven a la lesión son las que llevan a cabo una respuesta regenerativa, restablecen sus axones con el medio ambiente del muñón distal el cual es permisivo y favorece el crecimiento axonal y por último reinervan los blancos apropiados para reestablecer su función (Olawale et al., 2005).

Numerosas neuronas a las que se les ocasiona una interrupción axonal o axotomía mueren, dependiendo de la edad del animal y la proximidad de la lesión al cuerpo celular (Fu y Gordon, 1997). Neuronas sensoriales y motoras de animales adultos (ratones y ratas entre otros, ampliamente utilizados como modelos experimentales) normalmente sobreviven a la lesión; las neuronas axotomizadas sufren cambios morfológicos, también denominados cromatólisis que consiste en la dispersión de la sustancia de Nissl debido a la desintegración de condensaciones granulares del retículo endoplasmático rugoso (Fawcett y Keynes, 1990). Además presentan un marcado incremento en la síntesis de RNA mensajero (RNAm) y un cambio en la expresión de genes que permite a las neuronas que se encuentran normalmente en un estado de transmisión (conducción del impulso nervioso) ir a uno de crecimiento axonal (Olawale et al., 2005).

2.6.2 LA RECUPERACIÓN POSTERIOR A UNA LESIÓN EN LOS NERVIOS PERIFÉRICOS

Los extraordinarios eventos que suceden posteriormente a una lesión en el nervio, indican que se requieren señales axonales para mantener el fenotipo de las células de Schwann. Langley y Anderson (1903) fueron los primeros en demostrar esta interacción, realizando experimentos donde forzaron a los axones de un nervio predominantemente mielinizado a que se regeneraran en el muñón distal de un nervio desmielinizado. Encontrando que los axones regenerados frecuentemente estaban mielinizados, indicando que los axones destinados a ser mielinizados inducen a las células de Schwann a formar la vaina de mielina (Langley y Anderson, 1903).

Al ocurrir una lesión, las células de Schwann maduras sufren un proceso clave en la regeneración de nervios periféricos. Las células de Schwann son capaces de sobrevivir a la lesión y

eventualmente recuperar sus funciones normales. Para ello, estas células primero se desdiferencian y re-activan el ciclo celular, estableciendo condiciones de proliferación. En este proceso, las células de Schwann adoptan un fenotipo similar, aunque no idéntico, al de las células de Schwann inmaduras, que nosotros hemos denominado células de Schwann "denervadas". Después de esto, las células de Schwann se vuelven a rediferenciar cuando entran en contacto nuevamente con los axones (Fig. 5 C). Esta propiedad notable de las células de Schwann que involucra la desdiferenciación, proliferación y rediferenciación después de una lesión es uno de los principales factores involucrados en la regeneración de los nervios periféricos.

La habilidad de las células de Schwann para sobrevivir en la ausencia de los axones es crucial para la regeneración de los nervios periféricos después de una lesión, ya que las células de Schwann proveen factores tróficos y sustratos adhesivos que promueven el crecimiento axonal. El principal factor que permite esta sobrevivencia de las células de Schwann es la presencia de circuitos autócrinos de sobrevivencia (Jessen y Mirsky, 2004). Entre los principales componentes de estos circuitos de sobrevivencia autócrinos de las células de Schwann se encuentra el factor de crecimiento tipo 2 semejante a insulina (IGF-2), la neurotrofina-3 (NT-3) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas BB (PDGF-BB). También existen otros probables factores de sobrevivencia autócrinos de las células de Schwann como el factor inhibitorio de leucemia (LIF) y el ácido lisofosfatídico (LPA) (Jessen y Mirsky, 2004).

La capacidad de las células de Schwann maduras de desdiferenciarse y presentar un fenotipo celular que permite el crecimiento o la mielinización dependiendo de las señales provenientes del axón, muestra la gran plasticidad de las células de Schwann. Esto contrasta con su glía homóloga en el SNC, los oligodendrocitos y los astrocitos, los cuales no tienen la plasticidad de llevar a cabo estos cambios (Stewart et al., 1996).

Las interacciones subsecuentes durante la regeneración del nervio entre las células de Schwann y los axones son fundamentalmente similares a las que ocurren durante el desarrollo embrionario. Inicialmente, las células de Schwann rodean paquetes de axones en regeneración y posteriormente separan las fibras axonales largas en una relación 1:1, elaborando nueva lámina basal y formando vainas de mielina. Los nodos de Ranvier también se reestablecen, resultando en una conducción eléctrica saltatoria en las fibras nerviosas remielinizadas (Scherer y Salzer, 1996).

Para una óptima recuperación de la función posterior a una regeneración del nervio periférico, los axones necesitan reconectarse con sus blancos originales. Después de una lesión por compresión los tubos del endoneuro y la lámina basal de las células de Schwann están intactos, la regeneración

de los axones se lleva a cabo sobre las bandas de Büngrner y éstos son guiados directamente a sus blancos. Si la lámina basal se rompe mediante una lesión por transección, las proyecciones de regeneración pueden formarse inapropiadamente en el muñón distal y de esta manera guiar a blancos incorrectos. La precisión de la regeneración seguida de lesiones donde es cortado el nervio, varía de acuerdo con la región del cuerpo, la edad y la especie; y estos factores de variación tienen importantes implicaciones para conocer mejor los mecanismos de conducción y dirección hacia los blancos (Fawcett y Keynes, 1990).

2.7 EL CALCIO INTRACELULAR

Los mecanismos de señalización del ión Ca^{2+} para operar como segundo mensajero intracelular, dependen de su enorme versatilidad. En la mayoría de las actividades que realizamos se encuentra implicado el Ca^{2+} ; la contracción del músculo esquelético así como del cardíaco, el procesamiento de la información que realiza nuestro cerebro y el almacenaje en la memoria son algunos ejemplos (Berridge et al., 2000). El Ca^{2+} actúa como un mensajero intracelular dando información al interior de las células para que éstas regulen su actividad; por ejemplo: el Ca^{2+} dispara la fertilización y controla el desarrollo y la diferenciación de las células embrionarias en células especializadas. El Ca^{2+} interviene en la actividad subsecuente de esas células y finalmente de manera invariable se encuentra involucrado en la muerte celular. Para coordinar todas estas funciones las señales de Ca^{2+} deben ser flexibles pero reguladas de una manera precisa. Esta increíble versatilidad surge a través del uso de una variada forma de señalización de Ca^{2+} , donde este ión puede actuar en diferentes contextos de espacio, tiempo y amplitud. Diversos tipos de células seleccionan combinaciones de señales de Ca^{2+} con los parámetros precisos para adecuarlos a su fisiología (Berridge, 2006).

La concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma de cualquier célula es extremadamente baja, aproximadamente de 100 nM, mientras que la concentración en el fluido extracelular es mayor a 1 mM y dentro del retículo endoplásmico/sarcoplásmico (RE/RS) es de 3 mM, el RE/RS es uno de los principales almacenes de Ca^{2+} dentro de la célula. Otro organelo celular que tiene una gran capacidad de almacenar Ca^{2+} es la mitocondria (Sambrook, 1990; Pozzan et al., 1994). De este modo, un gradiente elevado en el exterior de la célula tiende a conducir Ca^{2+} extracelular hacia el citoplasma a través de la membrana plasmática y de la membrana del RE hacia el citoplasma. Cuando una señal abre los canales de Ca^{2+} en cualquiera de estas membranas, el Ca^{2+} es liberado hacia el citoplasma, incrementando dramáticamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a valores aproximados de 1000 nM, activando mecanismos de respuesta sensibles al Ca^{2+} en la célula (Pozzan et al., 1994; Berridge et al., 2000).

2.8 LOS RECEPTORES DE CALCIO INTRACELULAR

La $[Ca^{2+}]_i$ puede ser incrementada por: a) la apertura de los canales operados por voltaje de calcio de la membrana plasmática (VOCCs), para generar una entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular (Berridge, 1993; Berridge et al., 2000) o por b) la movilización de Ca^{2+} del retículo endoplasmático hacia el citoplasma a través de los receptores intracelulares de Ca^{2+} de inositol 1,4,5-tifosfato (IP_3Rs), así como por los receptores de rianodina ($RyRs$) (Berridge, 1993; Berridge et al., 2000; Berridge et al., 2003). Los IP_3Rs y los $RyRs$ son regulados por diferentes factores, el principal es el Ca^{2+} *per se*, el cual regula la liberación de Ca^{2+} mediada por estos receptores intracelulares, tanto en su región citoplásmica como en la luminal. Un incremento en la concentración de Ca^{2+} dentro del lumen del RE/RS aumenta la sensibilidad de ambos tipos de receptores (Berridge et al., 2000).

La acción del Ca^{2+} en el citoplasma es compleja y puede ser estimulante o inhibitoria y puede variar entre las diferentes isoformas de ambas familias de receptores. En general los IP_3Rs presentan un comportamiento de tipo "curva de campana" de dependencia al Ca^{2+} , cuando son tratados a bajas concentraciones de IP_3 así como a bajas concentraciones de Ca^{2+} (100-300 nM) las cuales resultan ser activadoras; por encima de esas concentraciones el Ca^{2+} es inhibitorio y cierra el canal o poro de los IP_3Rs . Por otro lado, en algunos casos los IP_3Rs no son inhibidos por una alta concentración de Ca^{2+} y en este sentido la relación entre la actividad de los IP_3Rs y el Ca^{2+} del citoplasma es sigmoideal. En el caso de altos niveles de IP_3 , los IP_3Rs se vuelven más sensibles al efecto activador del Ca^{2+} , pero no al efecto inhibitorio (Bootman y Lipp, 1999; Berridge et al., 2000). Experimentos recientes realizados por Bezprozvanny et al. (2005), muestran una caracterización funcional de las diferentes isoformas de los IP_3Rs recombinantes de rata, reconstituidos en bicapas de lípidos planas. Los resultados indican que, el IP_3R2 tiene aparentemente la más alta afinidad de la isoformas, por el IP_3 (0.10 μM), a diferencia del IP_3R1 (0.27 μM) y el IP_3R3 (0.40 μM). Además el IP_3R1 tiene un sitio de modulación de ATP de alta afinidad (0.13 mM), mientras que la apertura del IP_3R2 es independiente de ATP y el IP_3R3 tiene un sitio de modulación de ATP de baja afinidad (2 mM) (Tu et al., 2005). Por otro lado, el proceso de "liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} " (CICR) permite tener una comunicación entre los IP_3Rs , así como con los $RyRs$, estableciendo de esta manera una señal de Ca^{2+} coordinada en ondas de propagación (Berridge et al., 2000).

Los IP_3Rs y $RyRs$ son complejos tetraméricos de un gran peso molecular (Pozzan et al., 1994). Los $RyRs$ fueron originalmente caracterizados en músculo esquelético como un canal de CICR, el cual es activado por Ca^{2+} , cafeína y por el alcaloide rianodina, además de ser uno de los principales elementos del complejo denominado triada, el cual está formado por la asociación entre el tubo transversal y el RS. Por otro lado, los estudios de clonación muestran que los $RyRs$ pertenecen a una familia de genes que consiste en tres diferentes tipos ($RyR1$, $RyR2$ y $RyR3$) (Hamilton, 2005;

Rossi y Sorrentino, 2002; Wagenknecht y Radermacher, 1997; Sutko y Airey, 1996; Sorrentino y Volpe, 1993). De manera similar los IP₃Rs, muestran tres diferentes isoformas codificadas por diferentes genes (IP₃R1, IP₃R2 e IP₃R3 y dos variantes producidas por procesamiento alternativo del IP₃R1 la variante (SII+) la cual predomina en el cerebro y la (SII-) encontrada principalmente en tejidos periféricos no neuronales) (Bezprozvanny, 2005; Patterson et al., 2004; Patel et al., 1999; Dawson, 1997; Michikawa et al., 1996; Bezprozvanny y Ehrlich, 1995).

Los RyRs codifican para una proteína de casi el doble del tamaño en comparación con la de los IP₃Rs; los IP₃Rs están formados por 2700 aminoácidos (aa), mientras que los RyRs por 5000 aa. No obstante la diferencia en tamaño, los IP₃Rs y los RyRs son similares en su estructura. Ambos tipos de receptores tienen un dominio transmembranal próximo al dominio C-terminal y exhiben hacia el citoplasma un largo dominio N-terminal, así como un pequeño fragmento del dominio C-terminal. Las secuencias primarias de estos receptores tienen regiones de homología, particularmente en el dominio C-terminal donde se localiza la región del canal iónico.

2.9 LOS RECEPTORES DE INOSITOL 1, 4, 5-TRIFOSFATO

Inicialmente el estudio de los IP₃Rs, fue originado por el hallazgo de que el IP₃ puede llevar a cabo señalamiento de Ca²⁺, tanto en células excitables como en células no excitables. Estudios de ensayo de enlace ("binding") detectaron unión específica de [³H]IP₃ en membranas de neutrófilos (Prentki et al., 1984), hepatocitos y células adrenales (Williamson et al., 1985; Baukal et al., 1985). Sin embargo, debido a los bajos niveles detectados en los ensayos de enlace, no fue posible la caracterización de la proteína de enlace a IP₃. Estudios de autoradiografía mostraron una alta densidad de unión de IP₃ en el cerebelo, con niveles 100 o 300 veces mayores que en los tejidos periféricos, permitiendo de esta manera la caracterización de la proteína de enlace. El IP₃R1 fue purificado de este tejido y caracterizado. La reconstitución de la proteína purificada que une IP₃ en vesículas de lípidos, indicó que se trataba de un canal de Ca²⁺, con la capacidad de liberar Ca²⁺ de manera cuántica. La clonación de este receptor facilitó el análisis de su estructura y función (Patterson et al., 2004).

Las tres isoformas de los IP₃Rs tienen diferentes patrones de expresión en diversos tejidos. Se ha sugerido que la principal diferencia entre las isoformas es la regulación llevada a cabo por el Ca²⁺. Sin embargo, diversos estudios no han detectado diferencias en la modulación de la liberación de Ca²⁺ entre las isoformas sugiriendo que la regulación para que estos receptores lleven a cabo la liberación de Ca²⁺ es similar en todas las isoformas (Boehning y Joseph, 2000; Mak et al., 2001). Las evidencias sugieren una redundancia funcional puesta al descubierto por experimentos de disrupción genética de las diferentes isoformas de los IP₃Rs en células B (DT40). Dichas células,

que sólo expresan de forma exclusiva alguna de las tres isoformas o una combinación de subtipos de IP₃Rs, muestran diferencias en los patrones de señalamiento de Ca²⁺ y en la respuesta a sus agonistas, como lo son el IP₃, el Ca²⁺ y el ATP; sin embargo, en células que expresan dos de las isoformas estas diferencias pueden ser mínimas bajo condiciones intracelulares fisiológicas (Miyakawa et al., 1999).

Por otra parte, en estudios para conocer el funcionamiento del IP₃R3, fueron expresados recombinantes de esta isoforma de rata en ovocitos de *Xenopus* (Mak et al., 2001). Las características de trabajo de esta isoforma son muy similares a las encontradas para los IP₃R1 (expresados de manera endógena en los ovocitos), aunque cabe señalar que la principal diferencia radica en la fuerte sensibilidad de activación llevada a cabo por el Ca²⁺ en el IP₃R3. Esta diferencia permite que los IP₃R3 tengan una alta ganancia para poder realizar una liberación de Ca²⁺ inducida por IP₃, mientras que mantienen una baja ganancia para llevar a cabo el proceso de CICR haciendo que esta propiedad sea complementaria a los IP₃R1. De esta manera, las distintas señales de Ca²⁺ pueden ser conferidas por propiedades de activación de Ca²⁺ complementarias, de acuerdo a las diferentes isoformas de los IP₃Rs (Mak et al., 2001). Además, ratones “knockout” para las isoformas tipo 2 y 3 no presentan fenotipos con problemas dramáticos. No obstante, el ratón “knockout” para el IP₃R1 muestra una baja tasa de nacimiento, indicando que la mayoría de los animales mueren *in utero* y los que sobreviven mueren poco tiempo después de nacidos, además de presentar serios síntomas neurológicos. Estos ratones exhiben ataxia y epilepsia así como deficiencias para poder llevar a cabo la depresión de largo plazo en el cerebelo (Matsumoto y Nagata, 1999), debido a que en el cerebelo se encuentra dramáticamente enriquecido el IP₃R1, en particular en las neuronas de Purkinje (Sharp et al., 1999). Es probable que este fenotipo sea el reflejo de la dependencia celular basada solamente en el funcionamiento de una sola isoforma de los IP₃Rs.

La localización subcelular de los IP₃Rs es de gran importancia para el señalamiento celular, esta puede ser dinámica y depende del status fisiológico de la célula. Diferentes proteínas han sido propuestas para regular la localización de los IP₃Rs; no obstante, los factores que determinan la localización subcelular de los IP₃Rs son desconocidos (Vermassen et al., 2004). De esta manera, el RE es un compartimiento heterogéneo que permite que se lleven a cabo diferentes funciones en las diferentes sub-regiones que lo conforman. La estructura del RE es altamente dinámica y depende del citoesqueleto (Berridge, 2002). A través de procesos como la elongación y la retracción de túbulos y ramificación de tubulos, el RE es capaz de re-estructurarse por si mismo. Además, se ha observado la formación de apilamientos regulares de RE, en neuronas de Purkinje o en fibroblastos transfectados, permitiendo interacciones entre los dominios N-terminal de los IP₃Rs (Takei et al.,

1994). Sin embargo, bajo ciertas condiciones el RE sufre reorganizaciones drásticas en algunos tipos de células. Un ejemplo son los ovocitos, en los que existen re-arreglos estructurales del RE, incluyendo la formación de agrupaciones, durante la maduración y en algunas especies en la fertilización (Dumollard et al., 2002). Finalmente, las altas concentraciones de Ca^{2+} en el citoplasma pueden afectar la estructura del RE. Por ejemplo, en la línea celular RBL-2H3 de mastocitos, una alta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sin vaciamiento de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares generan una fragmentación reversible del RE, bajo estas condiciones la estructura de la envoltura nuclear (EN) no se afecta (Subramanian y Meyer, 1997).

La distribución subcelular de los IP_3Rs cambia de acuerdo con las necesidades y requerimientos fisiológicos de la célula y no es estática. Las modificaciones más espectaculares de la distribución de los IP_3Rs ocurren durante el proceso de maduración celular. Por ejemplo, en la maduración de los ovocitos y en la diferenciación y polarización de las células epiteliales (Vermassen et al., 2004). La maduración de los ovocitos de muchas especies correlaciona con cambios en la estructura del RE que origina la formación de agrupaciones de RE. Estas modificaciones son acompañadas por cambios en la localización de los IP_3Rs (la principal isoforma de IP_3R en ovocitos de rana *Xenopus* es el $\text{IP}_3\text{R1}$) y un incremento en la sensibilidad de este receptor para liberar Ca^{2+} mediado por IP_3 (Kume et al., 1993). El análisis teórico predice que el agrupamiento del RE y el subsecuente anclaje del IP_3R puede facilitar la formación de sitios de liberación de Ca^{2+} altamente sensibles, de tal modo ayuda a la iniciación y propagación de las ondas de Ca^{2+} (Swillens et al., 1999).

Por otro lado, los factores celulares responsables de determinar la localización precisa de los IP_3Rs son desconocidos. Sin embargo, en años recientes se han identificado diversas proteínas tanto del citoesqueleto como del ensamblaje celular que interactúan con los IP_3Rs , que pueden ser responsables de mantener una localización específica de estos receptores. El $\text{IP}_3\text{R1}$ es la isoforma más estudiada y de acuerdo con la proteólisis con tripsina realizada al $\text{IP}_3\text{R1}$ en cerebelo, el receptor se divide en 5 dominios aa (I-V) separados por regiones de unión (Bezprozvanny, 2005). Dentro de estos dominios el $\text{IP}_3\text{R1}$ tiene motivos de unión a proteínas adaptadoras de citoesqueleto como la Ankirina (Ank) y la proteína banda 4.1 neuronal (4.1N) (Bezprozvanny, 2005).

Un importante elemento constitutivo del citoesqueleto son los filamentos de actina y es de esperarse que cambios en el citoesqueleto de actina afecten a los IP_3Rs o el señalamiento de Ca^{2+} mediado por estos receptores (Vermassen et al., 2004). En hepatocitos por ejemplo, se reportó que almacenes de Ca^{2+} sensibles a IP_3 se encontraban asociados con la membrana plasmática a través del citoesqueleto de actina (Rossier et al., 1991).

2.9.1 MECANISMOS DE LIBERACIÓN DE CALCIO A TRAVÉS DE LOS IP₃Rs

El mecanismo para la liberación de calcio por parte de los IP₃R, como se ha señalado en este texto consiste en: la estimulación por señales externas (hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento) que enlazan con sus receptores en la superficie celular para iniciar vías de señalización. La formación de IP₃ es el punto principal para dos vías. a) Una iniciada por receptores de siete dominios transmembranales (7TM) acoplados a proteínas G y otra vía b) por receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs). La activación de los receptores 7TM dirige a la estimulación de la proteína Gqα, esta reacción activa a la enzima fosfolipasa C-β (PLC-β), la cual a su vez rompe el fosfatidilinositol 4,5- bifosfato (PIP₂) formando diacilglicerol (DAG) e IP₃. De manera alternativa, la activación de RTKs recluta a la enzima PLC-γ la cual hidroliza el PIP₂ generando DAG e IP₃, productos que actúan como segundos mensajeros. El DAG permanece unido a la membrana plasmática y estimula a la PKC, la cual requiere de Ca²⁺ y fosfatidilserina para su actividad. El IP₃ difunde al citoplasma y moviliza Ca²⁺ del RE a través de los IP₃Rs, dando como resultado la activación de diferentes procesos dependientes de Ca²⁺ (Fig. 6) (Banerjee y Hasan, 2005).

La vida media del IP₃ (~1 ms), así como la tasa de difusión del IP₃ y del Ca²⁺ son algunos de los factores que determinan la distancia y propagación en el tiempo de la señalización de Ca²⁺. Las propiedades de la señal de propagación también se encuentran influenciadas por la cantidad de los IP₃Rs, los cuales pueden estar agrupados en altas densidades, conduciendo hacia una liberación de Ca²⁺ sincronizada de los almacenes intracelulares y a la respuesta bifásica de los IP₃Rs de acuerdo a los niveles de Ca²⁺ citoplasmático. Posterior a la liberación de Ca²⁺ y guardando un nivel homeostático intracelular adecuado, el Ca²⁺ es bombeado al interior del RE/RS mediante la bomba ATPasa de Ca²⁺ del retículo endo/sarcoplasmático (SERCA). Un exceso de Ca²⁺ citoplasmático produce que la mitocondria meta Ca²⁺ a su interior. La depleción de los almacenes intracelulares de Ca²⁺, a través de la liberación de Ca²⁺ mediante los IP₃Rs produce que estos receptores a través de mecanismos directos o indirectos puedan a activar a los canales aperados por almacén (SOCs), permitiendo de esta manera la entrada capacitativa de Ca²⁺ extracelular y llenando de esta forma los almacenes intracelulares (Banerjee y Hasan, 2005). Por otra parte, los IP₃Rs son también capaces de llevar a cabo el proceso de CICR, al ser activados por la entrada de Ca²⁺ mediada por los VOCCs de la membrana plasmática.

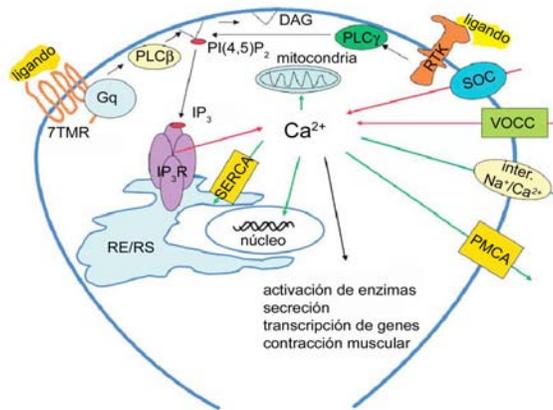


Figura 6. Esquema que muestra cómo se lleva a cabo la liberación de calcio mediante los IP_3 Rs (dibujo modificado de Banerjee y Hasan, 2005).

2.10 LOS RECEPTORES DE RIANODINA

Los receptores de Ca^{2+} intracelular de rianodina son una familia conformada por tres miembros: RyR1, RyR2 y RyR3. Los tres receptores de rianodina se expresan en una gran variedad de tejidos periféricos de los mamíferos (Lai et al., 1992; Nakanishi et al., 1992; Walton et al., 1991; Sorrentino y Volpe, 1993; Giannini et al., 1995; Rossi y Sorrentino, 2002). El trabajo realizado por Giannini et al. (1995) en roedores, mostró que el RyR1 se expresa en esófago, bazo, intestino, estómago, timo, cerebro, cerebelo, glándula adrenal, ovarios, músculos del muslo y diafragma; el RyR2 se expresa en corazón, pulmón, riñón, intestino, esófago, estómago, cerebro, cerebelo, glándula adrenal y ovarios y por último el RyR3 se expresa en el corazón, pulmón, esófago, bazo, intestino, riñón, estómago, cerebro, cerebelo, testículos, ovarios, diafragma y músculos del muslo. Estos resultados indican que la expresión de los RyRs, no se limita a neuronas y células musculares, sino que también está presente en otros tejidos.

Por otro lado, la presencia de los RyRs se ha descrito en diferentes especies de vertebrados además de los mamíferos como los peces, anfibios, reptiles, aves y en invertebrados como insectos, crustáceos y anélidos. Las tres isoformas de los RyRs han sido reportadas en vertebrados. RyR1 se expresa principalmente en músculo esquelético y es el responsable del acoplamiento excitación-contracción. RyR2 se localiza principalmente en músculo cardíaco donde sostiene el proceso inducido de CICR, que hace posible la operación rítmica del corazón. El RyR3 se expresa de manera ubicua en diferentes tejidos. En el caso de los invertebrados sólo se ha reportado una isoforma. El grado de homología entre diferentes tipos de RyRs y entre los vertebrados e invertebrados es aproximadamente de un 40% (Vázquez-Martínez et al., 2003; Butanda-Ochoa et al., 2006).

Acorde con el análisis de la secuencia de los RyRs, estos receptores contienen al menos dos dominios funcionales, un dominio citoplasmático N-terminal muy largo (~4,000 aa), el cual tiene muchos de los sitios de unión a ligando así como regiones de regulación y un dominio C-terminal (~1,000 aa), el cual contiene varios dominios hidrofóbicos, cuatro de estos forman los dominios transmembranales (M1-M4) (Takeshima et al., 1989). Entre M3 y M4 se localiza la región putativa que forma el poro del canal.

Una de las relaciones más estudiadas es la que se lleva a cabo entre el RyR1 y los receptores de dihidropiridinas (DHPRs, los cuales son canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje de tipo L) en el músculo esquelético que realiza el acoplamiento de la excitación-contracción. En los músculos estriados los RyR1 son los responsables de regular la liberación de Ca^{2+} del RS para disparar la contracción, formando parte esencial del complejo de triada, el cual está compuesto por la asociación del tubo transversal donde se localizan los DHPRs y el RS donde se encuentran altamente organizados los RyR1 (Fig. 7 A) (Franzini-Armstrong y Protasi, 1997).

La actividad de los RyRs puede ser modulada por muchas sustancias (Fig. 7 C), tanto endógenas como exógenas. Dentro de los reguladores endógenos, tenemos a los iones, el Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ , Fe^{2+} y fosfato inorgánico; los nucleótidos de adenina; la ADP ribosa cíclica (cADPR); la cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaM), mediante la fosforilación a través de las fosfocinasas A y C (PKA y PKC); así como por agentes oxidantes y reductores. Los reguladores exógenos son agentes farmacológicos como la rianodina, la cafeína, el rojo de rutenio, entre otros. La cADPR ha sido propuesta como el activador fisiológico de los RyRs (Rossi y Sorrentino, 2002).

Los nucleótidos de adenina a concentraciones milimolares incrementan la probabilidad de apertura del RyR1, esta activación es dependiente de Ca^{2+} y de forma completa ocurre a una concentración de ~100 μM de Ca^{2+} . El ATP también elimina la inhibición del RyR1 ocasionada por Mg^{2+} (1 mM), el cual es un catión que compite por los sitios de activación de Ca^{2+} . El RyR2 también es activado por nucleótidos de adenina, aunque en comparación con el RyR1, el receptor requiere de Ca^{2+} para movilizar Ca^{2+} del RS y es activado al doble por la adenosina (Butanda-Ochoa et al., 2006). Por otro lado, el Ca^{2+} tiene un efecto bifásico sobre el funcionamiento de los RyRs, en concentraciones citoplasmáticas nanomolares a micromolares tiene un efecto activador de los receptores, mientras que en concentraciones micromolares a milimolares tiene un efecto inhibitorio.

El alcaloide rianodina es frecuentemente utilizado como un fármaco que indica el estado abierto del canal, además de tener un efecto dual dependiendo de la concentración utilizada en el medio. A concentraciones nanomolares la rianodina activa la liberación de Ca^{2+} a través de los RyRs,

mientras que en concentraciones micromolares-milimolares inhibe el funcionamiento de los RyRs (Masumiya et al., 2001). El efecto de la rianodina sobre los RyRs también depende de la concentración de Ca^{2+} citoplasmática, a bajas concentraciones de Ca^{2+} , sin ATP en el medio, no se presenta enlace de la rianodina en las isoformas tipo 1 y 2 de RyRs recombinantes.

En el lumen del RS, los RyRs forman un complejo multiproteico con calcicuestrina (la cual es una proteína que tiene una alta capacidad de unir Ca^{2+}) triadina y juntina; estas dos proteínas anclan a la calcicuestrina a la membrana interna del RS (Zhang et al., 1997). La calcicuestrina puede regular la cantidad de Ca^{2+} que pueden liberar los RyRs y este efecto puede ser mediado por juntina y triadina (Rossi y Sorrentino, 2002); ambas proteínas son parte estructural de la membrana del RS y comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos.

2.10.1 MECANISMOS DE LIBERACIÓN DE CALCIO A TRAVÉS DE LOS RyRs

El control de la liberación de calcio por los RyRs en respuesta a la despolarización de la membrana puede ser de las siguientes formas: a) En el músculo esquelético los RyRs localizados en el retículo sarcoplasmático, contribuyen a la estructura de los túbulos-T y son responsables del acoplamiento de excitación-contracción de las fibras musculares; de esta manera, los DHPRs en la superficie de la membrana celular percibe un cambio de voltaje (ΔV) y sufre un cambio conformacional, que modifica la región N-terminal del RyR para abrir el canal de calcio en el RS (Fig. 7 B). b) En el músculo cardíaco se lleva a cabo el CICR, se piensa que este proceso también es realizado por las neuronas y diferentes tipos celulares que expresan los RyRs. Los VOCCs responden a un ΔV permitiendo la entrada de una pequeña cantidad de Ca^{2+} , el cual activa a los RyRs para liberar calcio del retículo endoplásmico (Berridge, 1993; Sorrentino y Volpe, 1993; Berridge et al., 2000) (Fig. 7 C).

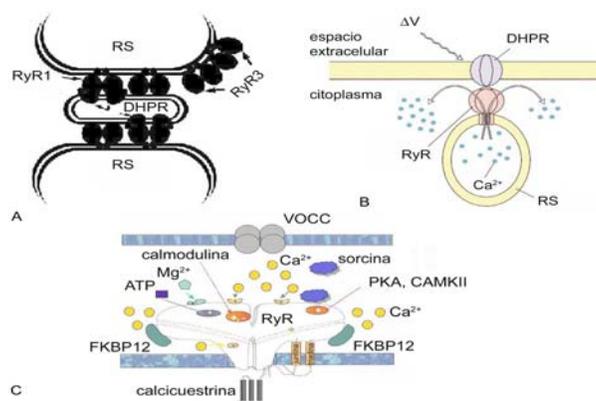


Figura 7. Esquema que muestra cómo se lleva a cabo la liberación de calcio mediante los RyRs. (A) esquematización del complejo de triada en músculo esquelético. (B) Mecanismo de liberación efectuado en músculo esquelético, en el cual es

necesario un acoplamiento mecánico entre los RyR1-2 y los DHPR (ilustraciones modificadas de Lodish et al., 2000). (C) Mecanismo de liberación mediante el proceso de CICR presente principalmente en músculo cardíaco y neuronas, además se ejemplifican reguladores endógenos de los RyRs (A y C modificadas de Farrell et al., 2004).

2.11 ASPECTOS GLOBALES DEL SEÑALAMIENTO DE Ca^{2+}

Los diferentes tipos de señales de Ca^{2+} son el resultado de los diversos procesos de activación tanto de los IP_3Rs como de los RyRs, los cuales dependen de los niveles apropiados de segundos mensajeros que permiten la movilización de Ca^{2+} mediada a través de estos receptores. A bajos niveles de estimulación, la excitabilidad es mínima, de esta forma la apertura de los IP_3Rs o RyRs es individual y esta liberación de Ca^{2+} es registrada como “blip” en el caso de los IP_3Rs o un “quarks” para los RyRs. Estos eventos son considerados como elementales para generar señales de Ca^{2+} mucho más estructuradas y complejas, como es el resultado de la apertura de agrupaciones de IP_3Rs formando “puffs” o de RyRs produciendo “sparks” (Fig. 8).

Los “sparks y puffs” contribuyen al señalamiento intracelular de Ca^{2+} , generando ondas de Ca^{2+} que se mueven a través de las células. Para que sean formadas ondas de Ca^{2+} , tanto los IP_3Rs como los RyRs deben ser lo suficientemente sensibles al Ca^{2+} para responder de manera mutua al proceso de CICR. De esta forma, un grupo de receptores libera Ca^{2+} , el cual difunde a los receptores vecinos ocasionando la activación de los mismos, generando de esta manera un proceso regenerativo de liberación de Ca^{2+} (Berridge, 2006). Estas ondas intracelulares de Ca^{2+} pueden extenderse a través de uniones comunicantes a las células vecinas, para producir ondas de Ca^{2+} intercelulares, capaces de coordinar la actividad de muchas células (Fig. 8) (Lansley y Sanderson, 1999). Por ejemplo, en el epitelio pulmonar las ondas de Ca^{2+} intracelulares estimulan la frecuencia con que los cilios expelen contaminantes inhalados por las vías respiratorias (Lansley y Sanderson, 1999).

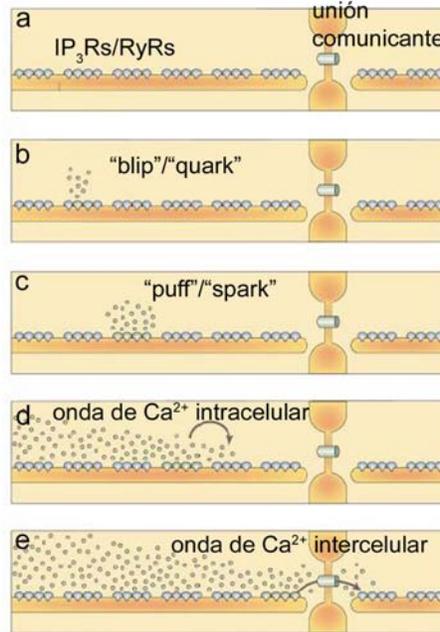


Figura 8. Organización espacial de la liberación de Ca^{2+} a través de los receptores intracelulares (imagen modificada de Berridge et al., 2000).

2.12 EL PAPEL DEL CALCIO EN LAS CÉLULAS GLIALES

En el SNC, incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de los astrocitos ocasionan la liberación de glutamato de estas células, activando receptores NMDA (Araque et al., 1998b) y AMPA/kainato (Hassinger et al., 1995; Araque et al., 1998a) en la neurona presináptica produciendo de esta manera incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, los cuales aumentan la liberación del neurotransmisor (Volterra y Meldolesi, 2005a; Volterra y Meldolesi, 2005b). Por otro lado, Hassinger et al. (1996) han mostrado en estudios *in vitro*, que astrocitos estimulados eléctricamente y que no están en contacto físico con otros astrocitos, pueden provocar ondas de Ca^{2+} . Esta señal es llevada a cabo por el ATP el cual puede activar receptores purinérgicos ionotrópicos P2X de los astrocitos adyacentes. El ATP también puede activar receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y los cuales estimulan a la PLC generando de esta manera IP_3 , el cual libera Ca^{2+} de los almacenes intracelulares a través de los IP_3Rs , propagándose de esta manera la onda de Ca^{2+} (Castonguay et al., 2001).

Durante el desarrollo del SNC, la expresión del $\text{IP}_3\text{R1}$ es principalmente neuronal y coincide con el proceso de axogénesis así como con el período en que las neuronas establecen las sinapsis. Por otra parte, el $\text{IP}_3\text{R1}$ se expresa transitoriamente en los oligodendrocitos durante el período de mielinización. También en etapas tempranas del desarrollo el $\text{IP}_3\text{R1}$ se expresa en los ganglios de las raíces dorsales (Dent et al., 1996). Estos estudios sugieren que la expresión del $\text{IP}_3\text{R1}$ debe

jugar un papel muy importante en la regulación del calcio intracelular durante el proceso de axogénesis y mielinización en el desarrollo del sistema nervioso.

En el SNP, las células de Schwann pueden responder y posiblemente influir en la actividad axonal. En este sistema, el ATP funciona como un co-trasmisor en la unión neuromuscular y en la rana, se ha mostrado que la actividad presináptica y la aplicación local de ATP produce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de las células de Schwann perisinápticas (CSP). Las CSP poseen receptores purinérgicos P2X y P2Y sensibles a ATP (Robitaille, 1995), receptores colinérgicos muscarínicos que son activados por la acetilcolina (Robitaille et al., 1997) y receptores neuropeptídicos tipo NK-1 sensibles a sustancia p (SP) (Bourque y Robitaille, 1998). La activación de los receptores P2X permiten la entrada de Ca^{2+} extracelular mientras que los receptores P2Y, NK-1 y colinérgicos muscarínicos activan a la PLC, produciendo IP_3 que activa a los IP_3Rs liberándose Ca^{2+} del RE. De esta manera la liberación del neurotransmisor de la terminal presináptica da como resultado un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en las CSP (Castonguay et al., 2001). Es así que las CSP no sólo monitorean la actividad sináptica, sino que también controlan el potencial postsináptico, regulando la liberación del neurotransmisor de la terminal nerviosa (Robitaille, 1998). Los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ en las CSP pueden activar una oxido nítrico sintetasa (NOs), la cual produce NO el cual deprime la liberación de neurotransmisor en la terminal presináptica. También los aumentos de Ca^{2+} intracelular en las CSP se encuentran mediando la liberación glutamato contenido en estas células, a la terminal sináptica ocasionando una disminución en la liberación de neurotransmisor (Castonguay et al., 2001).

En co-cultivos de células de Schwann (Postnatal día 2) y neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de etapas embrionarias de ratón, Stevens y Fields (2000), mostraron cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en las células de Schwann como respuesta a la estimulación eléctrica de las neuronas del DRG. Los niveles de Ca^{2+} aumentan inmediatamente en las neuronas en respuesta al potencial de acción, posteriormente el calcio intracelular se incrementa en diferentes células de Schwann asociadas con los axones. Esta respuesta es llevada a cabo por el ATP, el cual es liberado por las neuronas activas eléctricamente, el cual a su vez estimula a las células de Schwann a través de receptores purinérgicos P2Y. Esta actividad de calcio intracelular puede inhibir la proliferación y la desdiferenciación en las células de Schwann (Stevens y Fields, 2000).

En estudios *in vitro* Thomson et al. (1993) señalan que el Ca^{2+} puede desempeñar una función importante en la expresión de los genes NGFR y GFAP durante la degeneración Walleriana ya que si el Ca^{2+} es eliminado del medio de cultivo, la expresión del NGFR y el GFAP es inhibida. Estos experimentos sugieren que el calcio puede regular la expresión de genes. Por otra parte, la

respuesta en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, que se observa en las células de Schwann inducida por el potencial de acción induce el incremento de factores de transcripción como lo son CREB (elemento de unión a proteínas que responde al AMPc), c-fos y Krox24 (Stevens y Fields, 2000).

Por otro lado, Lev-Ram y Ellisman (1995) proponen que el complejo nodal opera de manera integrada durante la conducción del impulso nervioso, en el que también participan las células mielinizantes. Sus estudios *in situ* muestran incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ de las CSFM en las regiones paranodales, como respuesta a un estímulo eléctrico. La propuesta de estos autores sugiere que la salida de K^+ durante el potencial de acción despolariza a la membrana paranodal de las CSFM, activando un proceso de amortiguamiento en el citoplasma próximo a los nodos de Ranvier de las CSFM que evita la acumulación de K^+ en la región nodal. El significado fisiológico de esta activación se desconoce pero sugiere que está relacionado con la capacidad de conducción del potencial de acción a través del axón.

En experimentos clásicos realizados tanto *in situ* como *in vivo*, Smith et al. (1985 y 1988), mostraron que la incubación de explantes de ganglios de la raíz dorsal y ventral así como de nervios ciáticos de ratón con ionóforos selectivos para Ca^{2+} (A23187 y la ionomicina), induce una inmediata vesiculación de la mielina en los paranodos y las incisuras de Schmidt-Lanterman, invadiendo rápidamente regiones de mielina compacta. Esta vesiculación se sugiere que es producida por un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en las células de Schwann afectadas, indicando que el calcio intracelular activa enzimas que degradan la mielina (Smith y Hall, 1988; Smith et al., 1985).

Para examinar los efectos de la dinámica de calcio intracelular durante una lesión, Thorell et al. (2002) llevaron a cabo estudios electrofisiológicos en un modelo *in vitro* de lesión en columna vertebral de la rata. La integridad de la médula espinal fue monitoreada mediante la medición del potencial de acción compuesto (CAP). Durante la lesión el CAP decrece cerca del 50%, cuando se coloca BAPTA (un quelador de alta afinidad por el calcio) en el medio el CAP se recupera significativamente (83%); si se coloca cafeína (un agonista de los RyRs) en el medio el CAP declina al 45%; mientras que cuando se coloca dantroleno (una antagonista de los RyRs) mejora significativamente el CAP después de realizada la lesión. Algo similar se observa cuando se coloca 2APB (un bloqueador de los IP_3 Rs) en el medio, sugiriendo que incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ durante una lesión en el SNC, puede tener efectos dañinos en las células de la médula espinal, los cuales pueden ser mediados por los RyRs e IP_3 Rs (Thorell et al., 2002).

En cultivo de tejidos se encontró que la expresión de IP_3R1 aumenta cuando las células de Schwann se cultivan en presencia de agentes mitogénicos como forskolina y el factor de

crecimiento de fibroblasto (FGF), lo mismo se observa con células de Schwann autócrinas (Flores et al., 1997). En estudios preliminares de pegado específico de [³H] IP₃ utilizando una preparación de membranas internas de nervio ciático de rata. Las isotermas de saturación para este ligando dio una K_d de 11 nM, que es similar a lo reportado para otros IP₃; y una B_{max} de 93 fmol/mg de proteína, que es más baja que la B_{max} reportada en cerebro, pero similar al hígado. Estos resultados preliminares sugieren que el calcio intracelular debe tener un papel muy importante cuando las células de Schwann se encuentran en proliferación.

De esta manera, el presente proyecto tiene la intención de conocer la expresión y distribución de los IP₃Rs tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína así como la expresión y localización de los RyRs a nivel de RNA mensajero, en el sistema nervioso periférico en condiciones normales y durante la degeneración Walleriana. Es posible que cambios en la expresión de cuando menos uno de las isoformas de IP₃R o de RyR esté involucrada con cambios en la concentración de calcio intracelular, que influyan sobre el proceso de degeneración y regeneración del nervio ciático. Se ha reportado que cuando los nervios ciáticos de ratón son incubados con ionóforos selectivos para Ca²⁺, se genera una desmielinización vesicular en las células de Schwann (Smith y Hall, 1988), así como cambios en la expresión de genes que normalmente se expresan en las células de Schwann durante la degeneración Walleriana (Thomson et al., 1993). Es posible que estos efectos de la concentración de calcio intracelular puedan estar asociados con la activación de los IP₃Rs o de los RyRs. De esta forma con la finalidad de comprender el papel del Ca²⁺ intracelular en el SNP, nuestra investigación se enfoca en estudiar la expresión de las diferentes isoformas del IP₃R y del RyR en el nervio ciático de la rata en condiciones normales y durante el proceso de degeneración Walleriana.

CAPÍTULO 3

3.1 HIPÓTESIS

Dada la importancia del Ca^{2+} intracelular vinculado a los procesos de proliferación y mielinización es posible que la expresión y distribución los receptores intracelulares de calcio de IP_3R o de RyR se modifique durante la degeneración Walleriana del SNP.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Conocer la expresión y distribución de los IP_3Rs y de los RyRs a nivel de proteína y de RNA mensajero, en el sistema nervioso periférico en condiciones normales y durante la degeneración Walleriana, tomando como modelo el nervio ciático de la rata.

3.3 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar la expresión de los RNA mensajeros, tanto de las tres isoformas de los IP_3Rs como de los RyRs en el nervio ciático de la rata en condiciones normales, mediante la técnica de RT-PCR semi-cuantitativa.
2. Determinar en qué tipo de células se localizan las diferentes isoformas de los IP_3Rs en el nervio ciático. Para ello, se llevarán a cabo inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos específicos para cada una de las isoformas.
3. Determinar la localización de las diferentes isoformas de los RyRs en el nervio ciático de la rata mediante hibridación *in situ*, utilizando sondas específicas para cada una de las isoformas. Esto se llevará a cabo para determinar en qué tipo de células de Schwann se expresan los RyRs y por otra parte, para determinar si existe una expresión diferencial de los RyRs en el nervio ciático.
4. Determinar la expresión de los diferentes isoformas de los IP_3Rs y de los RyRs durante la degeneración Walleriana mediante la técnica de RT-PCR semi-cuantitativa.
5. Determinar si se presentan variaciones en la distribución de las tres diferentes isoformas de los IP_3Rs durante la degeneración Walleriana del nervio ciático de la rata comparado con el nervio normal utilizando la técnica de inmunohistoquímica.

CAPITULO 4

MATERIALES Y MÉTODO

4.1 ANIMALES DE LABORATORIO

Fueron utilizadas ratas adultas Wistar machos con un peso entre 250 y 350 gr del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales fueron manejados de acuerdo a la ley general de salud en materia de investigación de México y la National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos de América.

4.2 NERVIIO CIÁTICO EN CONDICIONES NORMALES Y LESIONES POR COMPRESIÓN Y TRANSECCIÓN.

En la primera parte de nuestro proyecto se utilizaron nervios ciáticos de ratas normales para conocer si había expresión de las diferentes isoformas de los IP₃Rs así como de los RyRs y posteriormente determinar los niveles de expresión de estos receptores de Ca²⁺ intracelular en condiciones normales. Finalmente los nervios ciáticos normales también fueron utilizados para establecer la localización y distribución de ambas familias de receptores de Ca²⁺ intracelular en los componentes celulares del nervio ciático.

Por otra parte, se llevaron a cabo lesiones tanto por compresión como por transección de los nervios ciáticos. En condiciones asépticas, la rata es anestesiada vía respiratoria con éter o con CO₂. Posteriormente se procede a limpiar el sitio donde se realiza la incisión, la cual se lleva a cabo en la extremidad inferior izquierda. Una vez limpio el lugar, se corta la piel, seguida de un corte en el tejido conectivo que une los músculos y se localiza el nervio ciático, el cual se lesiona por compresión durante 30 seg utilizando pinzas de disección (inox 55 a.dumont & fils), generando una región proximal, una porción peritraumática y una región distal. Para realizar la lesión por transección, se localiza el nervio ciático y se sujeta con un punto de sutura al músculo superior y se corta transversalmente, con el punto de sutura queda fijo el extremo del muñón proximal al músculo. El muñón distal queda sin conexión neuronal alguna y se aleja lo más posible del sitio de la lesión así como del muñón proximal, con la finalidad de evitar la unión de las 2 porciones de nervios formadas y de esta manera favorecer la regeneración del nervio. Un aspecto importante de la operación consiste en no generar hemorragias ya que las células sanguíneas pueden afectar el sistema de regeneración (sección 2.6). La extremidad derecha (contralateral) es utilizada como control.

4.3 DISECCIÓN DEL NERVIÓ CIÁTICO

Los animales se sacrificaron por decapitación después de una sobredosis de éter o CO₂. Los nervios lesionados por compresión y los muñones generados por la lesión de transección, así como los nervios contralaterales se extrajeron a 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 18, 20 y 30 días después de haber causado la lesión. La disección de los nervios se realizó lo más rápido posible (5 min), tratando de extraer la mayor cantidad de tejido posible de cada extremo del nervio lesionado sin provocar hemorragias en el área. Para los experimentos de RT-PCR, además de extraer nervio ciático, se utilizaron los siguientes tejidos como control: cerebelo, corteza cerebral, hígado, páncreas, músculo cardíaco y músculo estriado.

4.4 AISLAMIENTO DE RNA TOTAL

Los tejidos extraídos se procesaron para obtener RNA total [Chomczynski y Sacchi, 1987 o mediante el protocolo del reactivo TRIzol (Invitrogen)], que posteriormente fue utilizado para realizar la técnica de RT-PCR. Para aislar RNA total, 50-100 mg de los tejidos extraídos se colocaron en homogenizadores de vidrio con émbolos de teflón que contenían 1 ml de Trizol (Invitrogen). El tejido se homogenizó perfectamente a temperatura ambiente. Posteriormente el homogenizado se colocó en tubos de 1.5 ml y se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min a 4°C, para quitar el exceso de grasa y material extracelular. El homogenizado se decanta y se deja incubar a temperatura ambiente por 5 min, se adiciona 0.2 ml de cloroformo-alcohol isoamil (24:1) se agita vigorosamente por 15 seg y se deja incubar 5 min. Después las muestras se centrifugan a 12,000 x g por 15 min a 4°C. Para precipitar el RNA total, la fase acuosa se coloca en tubos nuevos y se agrega 0.5 ml de alcohol isopropil, se incuba por 15 min a temperatura ambiente y se centrifuga a 12,000 x g durante 10 min a 4°C. El RNA precipitado forma una pastilla. Posteriormente se lava el RNA, removiendo el sobrenadante y agregando 1ml de alcohol al 75% mezclando y agitando vigorosamente; nuevamente se centrifuga a 7,500 x g durante 5 min a 4°C, se decanta el alcohol y finalmente el RNA se resuspende en H₂O ultrapura.

El RNA total aislado fue cuantificado en un espectrofotómetro Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech. Posteriormente, los productos de RT-PCR o "amplicones" fueron analizados en geles de agarosa al 2.5% y sirvieron para llevar a cabo un estudio semicuantitativo de la expresión mediante el análisis densitométrico con el software de análisis de imágenes Kodak Digital Science 1D 3.5. Este análisis se realizó tanto para las diferentes isoformas de los IP₃Rs como para las isoformas de los RyRs. Para determinar la posición y peso del RNA total, de los plásmidos y transcritos generados *in vitro*, y de los productos de amplificación, se utilizaron los siguientes marcadores. Escalera de ADN del fago lambda digerido con la enzima Pst1 (Sigma), escalera de 500pb (Invitrogen), escalera de 100pb (Invitrogen), escalera de 50pb (Invitrogen), marcador de bajos pesos moleculares, que es

una escalera que despliega fragmentos de peso conocido cuando se analiza en un gel de agarosa (Low DNA Mass, Invitrogen).

4.5 TRANSCRIPCIÓN INVERSA ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA SEMICUANTITATIVA

Para realizar la RT-PCR se empleó el protocolo sugerido para la enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). La RT-PCR consiste en dos etapas, la primera, llamada transcripción inversa (RT), que consiste en utilizar las secuencias de un fragmento del RNAm y generar ADN complementario (cADN) de un determinado gen. El cADN es una secuencia menos lábil y es adecuada para llevar a cabo la segunda etapa, llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual amplifica de manera exponencial el fragmento de la secuencia específica del RNAm del gen que se desea estudiar.

Inicialmente se llevaron a cabo reacciones para amplificar las tres diferentes isoformas de los IP₃Rs bajo las condiciones de incubación reportadas por Blondel et al. (1993). Posteriormente se realizaron amplificaciones para las diferentes isoformas de los RyRs (Neylon et al., 1995). Sin embargo, las condiciones reportadas en los artículos por estos autores no proporcionaron las amplificaciones esperadas, por lo que fue necesario establecer las condiciones de incubación para la RT-PCR en nuestro sistema.

Para establecer las condiciones adecuadas de RT-PCR en nuestro sistema se realizaron las amplificaciones de los IP₃Rs, RyRs y β -actina inmuno [(β -actina es un gen constitutivo de alta expresión en células eucarióticas, que sirve como control positivo interno (Alberts et al., 2002)] en los tejidos control, optimizando las condiciones de RT-PCR (concentración de templado inicial, MgCl₂, dNTP, "primers" (o cebadores), así como, los tiempos de alineación de los "primers", extensión de polimerización y números de ciclos de la PCR hasta obtener bandas específicas para cada marcador utilizado por nosotros. Una vez obtenidas las condiciones para cada uno de nuestros mensajeros en estudio, se procedió a realizar la RT-PCR en el nervio ciático de la rata en condiciones normales (las condiciones de amplificación se muestran en la tabla de programas de amplificación, sección 4.8). El siguiente paso consistió en hacer lesiones por compresión y transección en el nervio ciático a los diferentes intervalos de tiempo determinados y se llevó a cabo la RT-PCR para posteriormente realizar el análisis densitométrico de los productos de RT-PCR analizando la intensidad de las bandas de los geles de agarosa al 3%, mediante el software 1D 3.5 de Kodak Digital Science, con la finalidad de observar si existían variaciones en los niveles de expresión de los IP₃Rs así como de los RyRs.

4.6 SECUENCIAS DE LOS "PRIMERS", AMPLICONES Y SITIOS DE RESTRICCIÓN DE LOS IP₃Rs Y RyRs

Los "primers" del IP₃R1 son: sentido (5'-TCCCTGGTCAGCAGTGA-3') y antisentido (5'-CTCATTTGCTTAGGCTGGCT-3'). Estos "primers" generan un producto de amplificación de 219 pb de la región C- terminal del cADN del IP₃R1 (Blondel et al., 1993). La secuencia del producto de amplificación del IP₃R1 (acceso al GenBank J05510) es:

```
8341 ttgattggtt cccaggatg agagccatgT CCCTGGTCAG CAGTGA-3' gaaggggaac agaacgagct
gaggaacctg 8421 caggagaagc tggagtccac catgaagctg gtcaccaatc tttctggcca gctgtcagaa
ctaaag↓gacc agatgacaga 8601 acaaaggaag cagaaacaaa gaattggcct tctaggacat cctctcaca
tgaatgcaa cccacagcAG CCAGCCTAAG 8681 CAAATGAGac ggagggactg tactcaaccc ttttaaatt
attgtcagcg tgggtctggc
```

Sitio de corte con la enzima de restricción *Ava*I g↓gacc, la cual corta el producto de amplificación del IP₃R1 que es de 219pb, en dos fragmentos uno de 118pb y otro de 101pb.

Para amplificar el IP₃R2 se generaron 2 "primers" diferentes: los primers IP₃R2 (Yang) e IP₃R2 (vector) diseñados por nosotros con el software vector NTI, para asegurarnos que las amplificaciones realizadas con el IP₃R2 (yang), (debido a su gran tamaño de 816pb), no disminúan en el rendimiento al amplificarse durante la degeneración Walleriana bajo el procedimiento de RT-PCR, y de esta manera corroborar los resultados obtenidos con los "primers" IP₃R2 (Yang).

Los "primers" del IP₃R2 (Yang) son: (5'-CAGAACTCCAGTCACAGG-3') y antisentido (5'-CAGTGCGGTGGCATGTGATG-3'). Estos "primers" generan un producto de amplificación de 816pb de la región C- terminal del cADN del IP₃R2 (Yang et al., 1995). La secuencia del producto de amplificación del IP₃R2 (acceso al GenBank AF329470) es:

```
7501 gattgaaaa CAGAACTCCA GTCACAGGta acgacggggt tccactatg accttaactt ccatgctggg
aacctgcctt aaggaaaact gtcacccac 7601 gatccctct tcgaatgagc cgggtgaggg aggtgaggac ggcacgaga
ggacctgtga cacctgctc atgtgcattg tcaccgtgct gaaccagggc 7701 ctcaggaatg gtggcggagt tggtagcgtg
ctgagacgac cctcaaagga tgagcctttg tttgctgcc ggggtg↓cta cgacctcctt ttctcttca 7801 tcgtcatcat
catcgtcctt aacctgattt ttggtgtgat cattgacact ttcgctgacc tcaggagtga gaagcagaag aaagaagaaa
ttctcaagac 7901 aacctgctt atctgtggct tggagagggg caagtttgat acaagacgg tgcctttga ggagcacatc
aagtcagagc acaacatgtg gcattacttg 8001 tacttcatcg tcctggtgaa ggtgaaggac ccaacagaat acacagggcc
tgagagctac gtggctcaga tgatcacaga gaagaattta gactggttc 8101 ctcgatgagc agccatgtca cttgtcagca
atgaaggtga cagtgagcaa aatgagatcc ggaacctgca ggagaagctg gactccacta tgagtctggt 8201 gaaacagttg
```

tcggggcagc tggcagagct gaaggagcag atgacagaac aaaggaaaa caagcaaagg ctgggcttcc ttgatcaaa
cacaccccat 8301 gtgaacCATC ACATGCCACC GCACTGacac catgggggca

Sitio de corte con la enzima de restricción AccI gt↓cta c, la cual corta el producto de amplificación del IP₃R2 (Yang) que es de 816pb, en dos fragmentos uno de 268pb y otro de 548pb.

Los "primers" del IP₃R2 (Vector) son: (5'-ACATTTTCCTGCGGACGACC-3') y antisentido (5'-GCAGAGTTGTGGCGTCAAGTTC-3'). Estos "primers" generan un producto de amplificación de 342pb de la región N- terminal del cADN del IP₃R2. La secuencia del producto de amplificación del IP₃R2 (acceso al GenBank AF329470) es:

1001 gcACATTTTC CTGCGGACGA CCTtgcgta atcagcaacg tcggcacta gctctaaagc actctgggag
atagaggtgg ttccatga tccatgccg 1101 ggaggtgcag gacagtggaa cagcctgtc aggttaagc atcttgaac
tgggaactac ttagctgcag agcttaacc tgactatcga gatgctcaaa 1201 atgaaggaaa aactgtgaga gacggggagc
ttcaacctc aaagaaaaa cgcc↓aggcag gggagaagat catgtacacg ctggtctcgg tcccgcacgg 1301
aatgacatc gcgtcccttt ttGAACTTGA CGCCACA ACT CTGCagagag ctgactgctt ggttctagg aactctacg
tgcggttgag gcacctgtgt

Sitio de corte con la enzima de restricción MvaI cc↓agg, la cual corta el producto de amplificación del IP₃R2 (vector) que es de 342pb, en dos fragmentos uno de 253pb y otro de 89pb.

Los "primers" del IP₃R3 son: sentido (5'-GGTGAGCGGCGAGGGCGAGG-3') y antisentido (5'-GCAGTTCTGCACGTCCACGA-3'). Estos "primers" generan un producto de amplificación de 175pb de la región C- terminal del cADN del IP₃R3 (Blondel et al., 1993). La secuencia del producto de amplificación del IP₃R3 (acceso al GenBank NM_013138) es:

7901 ggctcagatg atcaagaaca agaacctgga ctggttcca cggatgcgcg ccatgtcctt GGTGAGCGGC
GAGGGCGAGG gcgagcagaa cgagatccgc 8001 atcctgcagg aga↓agcttgg ctccaccatg aagctggtct
cgcacctcac cgcccagctc aatgagctca aggaacagat gacggagcag cggaagcgga 8101 ggcaacgtct
gggctTCGTG GACGTGCAGA ACTGCatgag ccgctgagca gagcggagcc

Sitio de corte con la enzima de restricción HindIII a↓agctt, la cual corta el producto de amplificación del IP₃R3 que es de 175pb, en dos fragmentos uno de 54pb y otro de 121pb.

Los "primers" del RyR1 son: sentido (5' -GAAGTTCTGGACAAACACGGG- 3') y antisentido (5' -TCGCTCTTGTGTAGAATTTGCGG- 3'). Estos "primers" generan un producto de amplificación de

435pb de la región C- terminal del cADN del RyR1 (Neylon et al., 1995). La secuencia del producto de amplificación del RyR1 (acceso al GenBank XM_001078539) es:

14101 gtgctcaaca caccgtcttt ccccagcaac tactgggaca agtttgtaa gcgGAAGGTT 14161 CTGGACAAAC
ACGGGgacat cttcgggagg gagcggattg cagagctgct gggcatggat 14221 ctggcctctc tggagatcac
agcccacaat gagcgcaaac ctgaccctcc accaggcctg 14281 ctgacatgga tcatgtccat t↓cgatgtcaaa taccagatct
ggaagtttg agtcatcttc 14341 acagacaact ctttctgta tctgggctgg tacatggatg tgccctctc gggccactac
14401 aataacttct tcttcgctgc ccacctctg gatatcgcca tgggagtcaa gacgctgctc 14461 accatcttt
catccgtcac tcacaacgga aagcagctgg tgatgacagt agggctctc 14521 gctgtagtgg tctacttga tacgggtgg
gccttcaact tcttCCGCAA GTTCTACAAC 14581 AAGAGCGAag atgaggacga gcctgacatg aagtgtgacg
acatgatgac gtgctacctg 14641 ttccacatgt atgtgggctg ccgggcccgt ggtggcatcg gggacgagat cgaggaccg

Sitio de corte con la enzima de restricción TaqI t↓cga, la cual corta el producto de amplificación del RyR1 que es de 435pb, en dos fragmentos uno de 148pb y otro de 287pb.

Los "primers" del RyR2 son: sentido (5' -GAATCAGTGAGTTACTGGGCATGG- 3') y antisentido (5' -CTGGTCTCTGAGTTCTCCAAAAGC- 3'). Estos "primers" generan un producto de amplificación de 635 pb de la región C- terminal del cADN del RyR2 (Neylon et al., 1995). La secuencia del producto de amplificación del RyR1 (acceso al GenBank XR_008338) es:

13981 atggataaat atggagagtt ttatgggaga gacaGAATCA GCGAGTTACT GGGCATGGat 14041
aaggctgcac tggatttcag cgatgcaaga gagaagaaga agcccaagaa ggacagtcc 14101 ttgtctgctg tgtgagtgc
acttctgcc tactcgggat gggacctggg ttagttccc 14161 agcactcaca gttcctctc ctacctagcc tggatatga
ccatgtctgt tcttgacac 14221 tacaacaact tttttttgc tgcccactc cttgacatcg cgatgggctt caagacctg 14281
agaactatcc tgcctcagt taccataat ggcaaacagc tctggtt↓aac tgttgcttg 14341 ttggctgtg ttgtatacct
gtactgtt gtggcgttca atttctccg aaaattctac 14401 aataaaagcg aggatggatg cacgccggac atgaagtgtg
acgacatgct gacgtgttac 14461 atgttcaca tgtatgtgg cgtccgtgct ggagggggca tcggtgatga aattgaagc
14521 ccagcaggag atgagtacga gatctaccga atcatcttg atatcacatt cttctcttt 14581 gtgattgtca tcctttggc
tatcatataa ggtttgatca ttgatGCTTT TGGAGAACTC 14641 AGAGATCAAc aagagcaagt caaggaagac
atggagacca agtgcttcat ctgtgggata 14701 ggcaacgact actttgatac agtgccgcat ggctttgaaa cccatactc
acaggagcac 14761 aacctggcca actacctgtt ttttctgat tacctcataa acaaggatga aacagaacac

Sitio de corte con la enzima de restricción HincII gtt↓aac, la cual corta el producto de amplificación del RyR2 que es de 635pb, en dos fragmentos uno de 314pb y otro de 321pb.

Los "primers" del RyR3 son: sentido (5' -CCTTCGCTATCAACTTCATCCTGC- 3') y antisentido (5' -TCTTCTACTGGGCTAAAGTCAAGG- 3'). Estos "primers" generan un producto de amplificación de 505

pb de la región C- terminal del cADN del RyR3 (Neylon et al., 1995). La secuencia del producto de amplificación del RyR (acceso al GenBank XM_342491) es:

```
13201 aagaagacgc gacggcgtgg tcagaaggcc gagaagccag tagccttcat ggccaacttc 13261 ttaaagggc
tggagattta tcagaccaag ttactgcact acctggccag gaatttctac 13321 aacctgaggt tctcgtctct attttagCC
TTCGCTATCA ACTTCATCCT GCttttctat 13381 aaggtcacgg aagagccttt agaggaagaa acagaggatg
ttgcaaacct gtggaactca 13441 ttcaatgagg atgatgagga agaagcgatg gtgttctttg ttcttcagga gactactggg
13501 tatatggcac caacactgcg tgcctggcc attgtccaca ctgtcatctc tctggtctgt 13561 gtggtgggct
attactgcct gaaggtagc↓ct ttggtggtat tcaaaagga gaaggaaatt 13621 gccaggaagc tggagttga tggctctgat
atcactgagc agccatctga ggatgacatc 13681 aaagggcagt gggatcgctt ggtgatcaac acgcatctt ttctaataa
ctactgggac 13741 aagtttga agagaaaggt gatcaacaag tatggagatc tctatggagc agagcgatc 13801
gctgaactcc tgggtttga caaaaatgcC CTGGACTTTA GCCCAGTAGA AGAggcaaaa 13861 gcagaggcgg
cgtctctggt gtcattggcta agttccatcg acatgaagta ccatatttgg 13921 aagctagggg tggtttcac tgacaactcc
tttcttacc ttgcctgga cacaacctg
```

Sitio de corte con la enzima de restricción KpnI **ggtagc**↓**c**, la cual corta el producto de amplificación del RyR3 que es de 505pb, en dos fragmentos uno de 214pb y otro de 291pb.

Los "primers" de β -actina son: sentido (5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAA-3') y antisentido (5'-AGCCATGCCAAATGTGTCAT-3'). Estos "primers" generan un producto de 349 pb (Blondel et al., 1993). La secuencia del producto de amplificación de β -actina (acceso al GenBank V01217) es:

```
2701 catcatgaa actacattca attccatcat gaagtgtgac gttgacatcC GTAAAGACCT 2761 CTATGCCAAc
acagtctgt ctggtggcac caccatgtac ccaggcatcg ctgacaggat 2821 gcagaaggag attactgccc tggctcctag
caccatgaag atcaaggtaa gcagccttag 2881 cctggacca tagtgggggtg tggcagccc ttagttgta gccaactctc
ttggcttaag 2941 gaacaaccca gcatccagaa tgctcacaat cactgtcttg ctttctcag atcattgctc 3001 ctctgagcg
caagtactct gtgtggattg gtggctctat cctggcctca ctgtccacct 3061 tccagcagat gtggatcagc aagcaggagt
acgatgagtc cggcccctcc atcgtgcacc 3121 gcaaatgctt ctaggcggac tgttactgag ctgcgtttta cacccttct
ttgacaaaac 3181 ctaactgcg cagaaaaaaaa aaATGAGACA TTTGGCATGG Ctttattggt tttttgttt
```

El producto de amplificación de β -actina tiene un intrón entre los nucleótidos 2865 y el 2998 (**aggtaa gcagccttag cctggacca tagtgggggtg tggcagccc ttagttgta gccaactctc ttggcttaag gaacaaccca gcatccagaa tgctcacaat cactgtcttg ctttctcag atcattgc**), en el gen completo y por consiguiente es un fragmento no codificado en el RNAm.

*El producto de amplificación de β -actina no fue restringido, ya que tenemos una manera indirecta de determinar si el amplicón es específico o no, puesto que contiene un intrón. Si nuestras

amplificaciones estuvieran contaminadas con ADN genómico el producto de amplificación sería mucho mayor del esperado para la amplificación del mensajero (la amplificación sería de 482pb, mientras que para el mensajero es de 349pb).

4.7 TRANSCRIPCIÓN INVERSA

Para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR con los IP₃Rs la concentración utilizada de templado inicial fue de 0.5 µg, mientras que para los RyRs la cantidad de RNA total utilizado como templado inicial fue de 1.0 µg. Todos los reactivos utilizados para realizar la RT y la PCR fueron de Invitrogen y se utilizó el siguiente programa para llevar a cabo la RT.

Programa	Segmento	Temperatura(°C)	Tiempo (minutos)
1	1	27	10
	2	42	60
	3	70	15
Adicionar:			
Ribonucleasa H (2U)		37	20

4.8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Una vez concluido el tiempo de incubación para que se llevara a cabo la RT y la degradación de los restos de nucleótidos de una sola cadena, se adicionaron los reactivos de la PCR y se procedió a amplificar. Los siguientes cuadros muestran las condiciones optimizadas para poder amplificar los diferentes mensajeros estudiados, mediante RT-PCR.

Programas de Amplificación

Programa para amplificar β-actina, IP₃R1, IP₃R3 e IP₃R2 (vector)

Programa	Segmento	Temperatura	Tiempo	No de ciclos
1	1 Desnaturalización	94°C	4 min	1
2	1 Desnaturalización	94°C	30 seg	30
	2 Acoplamiento	56°C	1 min	
	3 Extensión	72°C	1 min	
3	1 Extensión final	72°C	7 min	1

Programa para amplificar IP₃R2 (Yang), RyR1 y RyR3

Programa	Segmento	Temperatura	Tiempo	No de ciclos
1	1 Desnaturalización	94°C	4 min	1
2	1 Desnaturalización	94°C	1 min	30
	2 Acoplamiento	60°C	1 min	
	3 Extensión	72°C	3 min	
3	1 Extensión final	72°C	7 min	1

Programa para amplificar RyR2

Programa	Segmento	Temperatura	Tiempo	No de ciclos
1	1 Desnaturalización	94°C	4 min	1
2	1 Desnaturalización	94°C	1 min	30
	2 Acoplamiento	64°C	1 min	
	3 Extensión	72°C	2 min	
3	1 Extensión final	72°C	8 min	1

Los productos de amplificación obtenidos mediante los programas de amplificación aquí mostrados, se observan y analizan en geles de agarosa al 3% teñidos con EtBr.*Todos los experimentos fueron por triplicado y además llevados a cabo con diferentes camadas de ratas. **Para corroborar la información obtenida de los niveles de expresión con el IP₃R2 (Yang), ya que el producto de amplificación es muy grande (816pb) y esto puede disminuir el rendimiento de la RT-PCR, se realizaron experimentos de amplificación del IP₃R2 con los "primers" (IP₃R2 vector, 341pb) diseñados con el software vector NTI.

4.9 EXPERIMENTOS DE RESTRICCIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN

Para comprobar que los productos de amplificación de los IP₃Rs y de los RyRs son específicos se llevaron a cabo ensayos de restricción con diferentes enzimas de restricción las cuales cortan los productos de amplificación de manera específica. El amplicón del IP₃R1 de 219pb se corta con Ava II; el amplicón del IP₃R2 (Yang) de 816pb se corta con AccI; el amplicón del IP₃R2 (vector) de 342pb se corta con MvaI; el amplicón del IP₃R3 de 175pb se corta con Hind III; el amplicón del RyR1 de 435pb se corta con TaqI; el amplicón del RyR2 de 635pb se corta con HincII; el amplicón del RyR3 de 505pb se corta con KpnI. Para tener mayor detalle de los productos que se generan por el corte enzimático consultar la sección 4.6. Antes de realizar la digestión de los productos de amplificación con la enzima de restricción fue necesario purificar los productos de amplificación y en este caso se utilizó el Kit CONCERT sistema de purificación rápida de Invitrogen.

4.10 CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE HIBRIDACIÓN

Muestras de los amplicones de los IP₃Rs y RyRs así como de β -actina, después de ser purificadas, fueron enviados a clonar al University College of London con el objetivo de generar sondas específicas para cada isoforma y poder realizar hibridaciones *in situ*. Se utilizó esta técnica porque se podían adquirir anticuerpos específicos comerciales para cada isoforma en ese momento, para poder llevar a cabo inmunohistoquímicas. Sin embargo, después se compararon anticuerpos específicos para cada una de las isoformas de los IP₃Rs.

4.11 DENSITOMETRÍA

El análisis semicuantitativo de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (EtBr), se realizó empleando el software de análisis de imágenes 1D 3.5 de Kodak Digital Science; con este sistema

de análisis digital se produce un valor aproximado de cada banda detectada en el gel, para lo cual se usó como referencia el marcador de pesos moleculares bajos (Low DNA Mass, Invitrogen).

4.12 HISTOGRAMAS Y PRUEBA ESTADÍSTICA

Los resultados obtenidos del análisis de la imagen son exportados del software Kodak Digital Science 1D 3.5, a una tabla de Microsoft Excel 2000, la cual nos permitió obtener el valor de la relación de la intensidad de las bandas del producto de amplificación de los IP₃Rs, los RyRs y β -actina, para cada una de las muestras. De estos valores de relación se obtuvo el promedio y la desviación estándar, y se realizaron los histogramas de relación entre los IP₃Rs/ β -actina y los RyRs/ β -actina. Los valores de la relación de los IP₃Rs/ β -actina y los RyRs/ β -actina, fueron exportados al software STATGRAPHICS Plus 2.0, en el cual se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis en todas las muestras (prueba estadística no paramétrica, debido a que en nuestros experimentos sólo se realizaron 3 repeticiones).

Control 1: Expresión del RNAm de β -actina

En todos nuestros experimentos el gen constitutivo β -actina de alta expresión fue utilizado como control de la reacción en las amplificaciones de RT-PCR. En la figura 9, se muestra el histograma y gel representativo de la amplificación de β -actina en lesiones por transección. Como se esperaba, no se presentan cambios significativos en el nivel de expresión entre el nervio ciático normal y los nervios ciáticos lesionados a los diferentes tiempos que se establecieron de estudio, ya que el valor de $p=0.962817$.

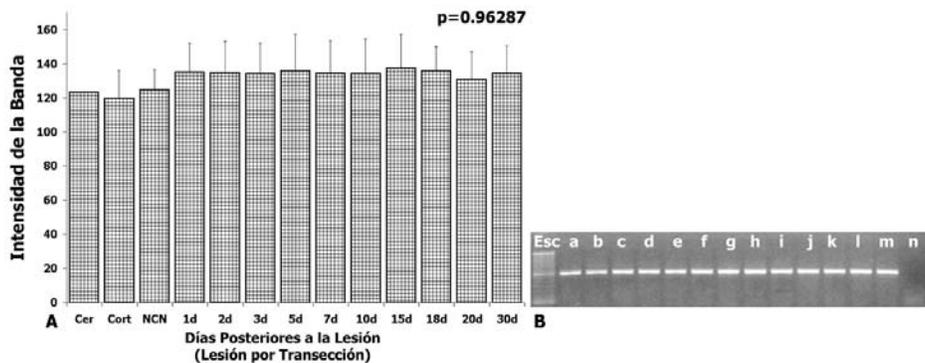


Figura 9. Expresión de β -actina tanto en los tejidos control como en el nervio ciático normal y lesionado por transección a los diferentes días de estudio establecidos. (A) Histograma representativo de la amplificación de β -actina mediante RT-PCR. (Cer) cerebelo, (Cort) corteza cerebral, (NCN) nervio ciático normal. (B) Gel de agarosa al 3% representativo de la amplificación de β -actina. (a) cerebelo, (b) corteza cerebral, (c) nervio ciático normal, (d, e, f, g, h, i, j, k, l, m) corresponden a 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 18, 20 y 30 días después de la lesión respectivamente. (n) control, reacción de amplificación sin templado inicial. (Esc) Escalera de 50pb. En todos los casos $n=10$.

4.13 ANTICUERPOS

Con la finalidad de estudiar la distribución de los IP₃Rs en el nervio ciático en condiciones normales, así como durante la degeneración Wallerina en nervios lesionados por compresión, se llevaron a cabo inmunohistoquímicas contra los antígenos para cada una de las isoformas de los IP₃Rs. La siguiente tabla muestra la lista de los anticuerpos utilizados.

ANTICUERPO	COMPañÍA
Anticuerpo de conejo policlonal anti-IP ₃ R1	(Synaptic Systems)
Anticuerpo de conejo policlonal anti-IP ₃ R2	(Affinity BioReagents, Inc.)
Anticuerpo de conejo policlonal anti-IP ₃ R3	(Chemicon International, Inc.)
Anticuerpo de ratón monoclonal anti-Ankyrin _G	(Zymed)
Anticuerpo de ratón monoclonal anti-Kv1.2 α -subunit	(Upstate)
Anticuerpo de ratón monoclonal anti-GFAP conjugado con Cy3	(Sigma)
Anticuerpo de pollo anti-conejo IgG Alexa Fluor® 488	(Invitrogen-Molecular Probes)
Anticuerpo de cabra anti-ratón IgG Alexa Fluor® 568	(Invitrogen-Molecular Probes)

4.14 INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL CEREBRO DE RATA PARA LOS IP₃Rs

Para demostrar la especificidad de los anticuerpos de los IP₃Rs que utilizamos, se llevaron a cabo inmunohistoquímicas relevando con DAB en cortes por congelación de cerebro de rata, reportes previos muestran el patrón de distribución de los IP₃Rs en este tejido (Sharp et al., 1999; Dent et al., 1996). Para realizar el inmuno-marcaje de los IP₃Rs en el cerebro el procedimiento fue el siguiente. Se sacrifica por decapitación el animal, rápidamente se extrae el cerebro al cual se le hace un corte sagital, los 2 cortes de cerebro se colocan inmediatamente en hielo seco finamente machacado o nitrógeno líquido y se almacenan a -70°C. Posteriormente, el tejido se embebe con tissue-tek (Miles Inc.) y se realizan los cortes histológicos (10 mm) que se colocan en los portaobjetos. Las preparaciones se dejan secar al aire, para posteriormente llevar a cabo la inmunohistoquímica (sección 4.16)

Control 2: Inmunohistoquímica en el cerebelo de rata para los IP₃Rs

Para comprobar la especificidad de los anticuerpos comerciales que se utilizaron en los experimentos, se realizaron inmunohistoquímicas en cortes de cerebelo de rata. En la figura 10, se muestra la distribución del IP₃R1 la cual se detecta sólo en las neuronas y está enriquecido en los cuerpos neuronales, dendritas y axones de las neuronas de Purkinge del cerebelo (Sharp et al., 1999, Dent et al., 1996). El IP₃R2 se detecta principalmente en la glía, mientras que el IP₃R3 se encuentra enriquecido en las terminales neuronales y en la glía como se ha descrito previamente (Sharp et al., 1999). El IP₃R2 también se localiza bajos niveles en neuronas.

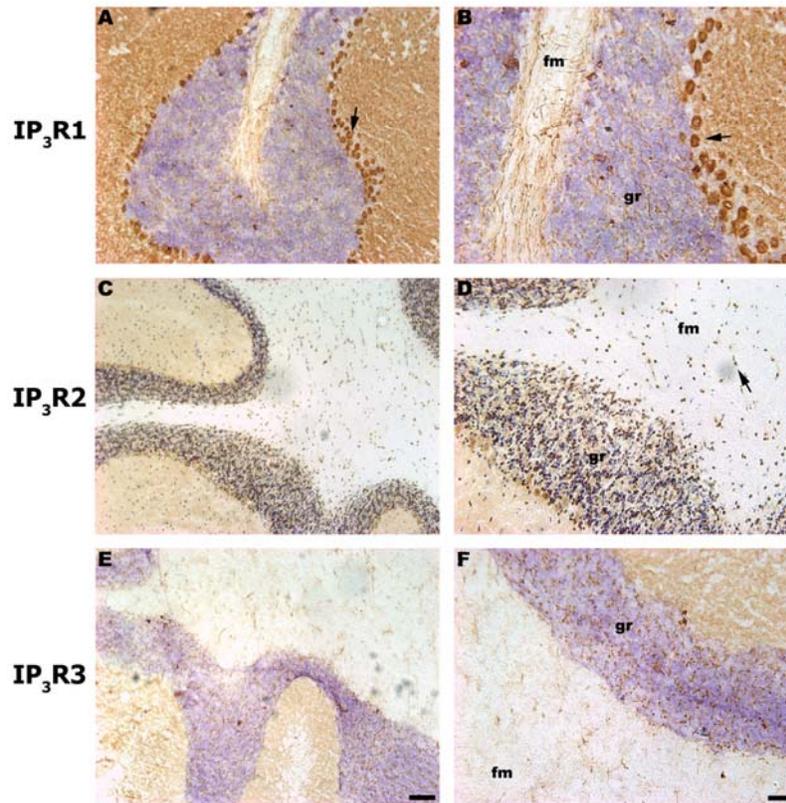


Figura 10. Inmunohistoquímica de los IP₃Rs en cerebelo de rata, revelado con DAB y contrateñido con tionina. (A y B) Inmunohistoquímica con el IP₃R1 en el cerebelo de rata adulta donde se puede observar un intenso marcaje en las neuronas de Purkinje, las dendritas y axones (flecha). (C y D) La inmuno-localización del IP₃R2 esta presente principalmente en las células gliales (flecha) aunque también se presentan bajos niveles de inmuno-marcaje en los cuerpos neuronales. (E y F) El marcaje del IP₃R3 es detectado en las neuronas de la capa granular del cerebro. (fm) tractos de fibras mielinizadas. (gr) capa granular. Barra=100 μm (A, C y E) y 50 μm (B, D y F)

4.15 NERVIOS DESMEMBRADOS

Para realizar los estudios de inmunohistoquímica, los nervios fueron puestos en una caja Petri que contenía PBS (10X, 1.4 M de NaCl, 27 mM de KCl, 100 mM de Na₂HPO₄, 18 mM de KH₂PO₄, pH 7.4). En un microscopio estereoscópico, los nervios se colocan en un portaobjetos y rápidamente se les quita el epineuro, separándose en pequeños paquetes de fibras nerviosas, estas fibras se regresan a la caja Petri. Posteriormente cada paquete de nervios es colocado en un portaobjetos y se desmembra, separando las fibras nerviosas lo mejor posible para visualizar las fibras mielínicas y amielínicas claramente. Los nervios ciáticos normales y los nervios lesionados por compresión fueron utilizados para hacer las inmunohistoquímicas con los IP₃Rs (los nervios fueron extraídos a 3, 5, 10, 15 y 20 días después de haber causado la lesión).

4.16 INMUNOHISTOQUÍMICA

El tejido colocado en el portaobjetos se deja secar 1 h a temperatura ambiente. En todos los experimentos las muestras se fijaron con 4% de paraformaldehído (PF), hecho en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.4, durante 10 o 20 min. Posteriormente se lavan las muestras 3 veces por 5 min en PBS, se bloquea con leche descremada al 10% en PBS por 2h a 4°C, a continuación se coloca el primer anticuerpo (IP₃R1 [1:250], IP₃R2 [1:100], IP₃R3 [1:1000]) en PBS-leche al 1%, con 0.5% Triton X-100 y 0.2% de Tween, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lava 3 veces por 5 min en PBS y se coloca el anticuerpo secundario conejo anti-biotina IgG [1:500] en PBS-leche al 1%, con 0.5% triton X-100 y 0.2% de Tween, durante 2 h, a 4°C. Después de lavar 3 veces por 5 min en PBS, si se desea revelar con diaminobenzidina (DAB Sigma), las muestras se incuban con los reactivos A y B (del kit ABC Vector, avidin and biotinylated horse-radish preoxidase macromolecular complex) por 30 min y después se coloca el DAB de 7 a 10 min, se lavan las muestras 3 veces por 5 min en PBS y se contra-tiñen con tiónina. Para llevar a cabo la inmunohistoquímica con fluorescencia, después de incubar con el anticuerpo primario, se coloca a las muestras anti-conejo IgG fluoresceína-avidina [1:1000] o Alexa Fluor® 488 [1:1500] en PBS, por 1 h, se lava 3x5 min con PBS y las muestras se montan con Vectashield (Vector Laboratories Inc.). Los controles de las inmunohistoquímicas fueron realizados omitiendo la colocación del anticuerpo primario.

4.17 DOBLE INMUNOHISTOQUÍMICA

Para llevar a cabo la doble inmunohistoquímica, los nervios desmembrados se fijaron con 2% PF durante 10 min. Después las muestras fueron lavadas con PBS y bloqueadas con leche descremada 10% en PBS-TT durante 30 min, a 4°C. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios (anti-Ankyrin_G [1:100] o anti-Kv1.2 subunidad- α [1:100]), a 4°C durante toda la noche. Después se lavó 3 x 5 min con PBS y se colocó anti-ratón IgG rodamina [1:1000] o Alexa Fluor® 568 [1:1500] en PBS, por 1 h, a 4°C. Se continuó con el procedimiento descrito previamente para marcar con los IP₃Rs con fluoresceína o Alexa (sección 4.16).

Para realizar la doble inmunohistoquímica contra el anticuerpo de ratón monoclonal anti-GFAP, las muestras de las fibras nerviosas fueron fijadas con 4% PF durante 15 min, se lavó con PBS 3 veces durante 5 min. Enseguida se boquearon con leche descremada al 10% en PBS por 2 h y se incubaron con anti-GFAP conjugado con Cy3 [1:1000] (Sigma) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizó el marcaje descrito para los IP₃Rs (sección 4.16).

4.18 CONTRA-TINCIÓN CON TIONINA PARA MARCAR NÚCLEOS CELULARES

Para realizar la contra-tinción con tionina para marcar los núcleos de las células de Schwann, las láminas se enjuagaron por 10 min en H₂O destilada, se colocaron en tionina 0.2% por 5 min, se lavaron con H₂O destilada 3 veces durante 10 min y se deshidrataron en tren de alcoholes de manera ascendente 50, 70, 80, 96 y 100%, 1 min en cada alcohol. Se continuó colocando las muestras en Xilol-Alcohol (1:1) 5 min y por último en Xilol absoluto por 5 min, para montarlas con permount (FisherChemical).

4.19 ALIZARINA ROJA

Se llevaron a cabo tinciones con Alizarina roja (sigma) que permite marcar depósitos de Ca²⁺ en el tejido (Johnson, 1994). Para ello se fijaron las preparaciones de nervio previamente desmembradas durante 15 min con 4% PF, se lavaron e hidrataron las muestras 3 veces por 5 min con H₂O destilada y se colocaron en Alizarina roja durante 5 min, agitando constantemente. Posteriormente se lavaron en acetona por 3 min y se deshidrataron y aclararon en acetona-xilol (1:1) y después en xilol absoluto durante 3 min y finalmente se montaron con permount para ser observadas en el microscopio.

4.20 HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Para determinar la distribución de las diferentes isoformas de los RyRs en el nervio ciático, se montó la técnica de hibridación *in situ*, dado que cuando se inició este trabajo no había anticuerpos comerciales específicos para cada isoforma de estos receptores intracelulares de Ca²⁺.

Los productos de amplificación de los RyRs, de los IP₃Rs así como de β-actina (sección 4.6), fueron clonados en el vector pCR®II-TOPO® (Invitrogen). El vector tiene diferentes sitios de corte para enzimas de restricción y el producto de amplificación clonado se encuentra franqueado por sitios de corte para EcoRI. Mediante la digestión con esta enzima se obtuvieron los productos de amplificación clonados, los cuales se analizaron en geles de agarosa al 3% para determinar si el tamaño en pares de bases corresponde con el de nuestros amplicones. Posteriormente los productos obtenidos del vector de clonación se purificaron con las columnas del sistema de purificación rápida Kit CONCERT de Invitrogen y se les realizó el ensayo de restricción a cada uno de los amplicones con el objeto de comprobar que los productos de amplificación correspondían para cada isoforma. Todos los productos clonados fueron específicos por lo que se procedió a realizar los ensayos de transcripción *in vitro*, para generar las sondas que fueron utilizadas para llevar a cabo la hibridación *in situ*.

Los plásmidos se linearizaron con el objeto de producir las sondas antisentido y sentido. Para el antisentido la sonda se corta con HindIII y se transcribe con la RNA polimerasa T7. Para generar la sonda sentido la sonda se corta con XhoI y se transcribe con la RNA polimerasa SP6. Con la sonda antisentido se obtiene el marcaje específico del mensajero cuando se lleva a cabo la hibridación *in situ*, mientras que la sonda sentido sirve como control, ya que en principio no se pega al mensajero. Las sondas se marcan con digoxigenina (DIG-11-UTP). Se lleva a cabo la transcripción *in vitro*, con la adición del nucleótido DIG-11-UTP (Roche). De esta manera las sondas se marcan y detectan con NBT (nitroazul tetrasolium) (Roche) y Fosfatasa-X (Roche). Para realizar la transcripción *in vitro* se utilizó el protocolo de Roche. Finalmente los transcritos se observaron en un gel de agarosa al 2% y se realizaron dot-blot para conocer si las sondas no estaban degradadas y que presentaran marcaje, respectivamente.

4.21 PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

El protocolo que llevamos a cabo es una modificación de tres protocolos descritos anteriormente (Dent et al., 1996; Speel et al., 1999; Court et al., 2004). Sin embargo, establecer la técnica de hibridación *in situ* fue una labor complicada debido a las dificultades técnicas que produce trabajar con un tejido de las características del nervio ciático, el cual tiene un exceso de matriz extracelular que impide un manejo y separación de las fibras nerviosas. Logramos obtener magníficos resultados con la sonda control de β -actina, así como con las sondas de las diferentes isoformas de los RyRs. Primero se realizaron hibridaciones *in situ* con β -actina, dado que es un gen constitutivo muy abundante. Una vez que se estableció la técnica con β -actina se procedió a realizar los experimentos con los RyRs, con los cuales se tuvo varias dificultades técnicas debido a los niveles tan bajos de expresión de estos genes en el nervio ciático.

Para llevar a cabo la hibridación *in situ*, los nervios ciáticos denervados son colocados en portaobjetos cubiertos con poly-L lisina (sigma) y se fijan con 4% PF. Se lavan 3 veces durante 5 min en PBS y se permeabiliza el tejido con proteinasa K (20 μ g/ml) durante 10 min a 37°C. Las muestras se lavan 5 min en PBS y se fijan nuevamente con 4% PF por 5 min a 4°C, se acetilan en buffer TEA (0.1M trietanolamina en H₂O, pH 8) con 0.25% v/v anhídrido acético (sigma) durante 5 min 2 veces, en agitación constante. A continuación se pre-hibridizan las muestras colocando el buffer de pre-hibridación [40% formamida desionizada, 10% dextran sulfato, 1x de solución Denhardt's, 4x SSC, 10 mM DTT, 1 mg/ml RNA-t de levadura (sigma) y 1 mg/ml de ADN de esperma de arenque desnaturalizado (invitrogen)] sobre el tejido, se cubre con nescofilm y las muestras se colocan en una cámara húmeda, y se incuban en una estufa a 50°C durante 6 h. Posteriormente, las muestras se ponen a hibridar con la sonda, para lo cual se aspira con una micro-pipeta el buffer de pre-hibridación de las muestras y se coloca buffer de hibridación con la

sonda deseada, cubriendo el tejido con nescofilm y colocándolo en una cámara húmeda que se incuba a 42°C durante toda la noche (de 12-16 h). Antes de colocar la sonda en el tejido, debe calentarse durante 3 min a 80°C con el objetivo de eliminar estructuras secundarias. La concentración de la sonda en nuestros experimentos fue de 12.5 ng/μl para β-actina y de 50 ng/μl para los RyRs.

Finalmente se continua con los pasos de post-hibridación, que consisten en quitar el nescofilm de las muestras y lavar cuidadosamente las láminas con 2 X SSC (10X, 1.5 M NaCl, 150 mM citrato de sodio, pH a 7.2) 2 veces por 10-15 min a temperatura ambiente. Posteriormente las láminas se colocan en buffer NTE (500 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH a 8.0) por 5 min y las muestras se ponen a digerir con RNAsa A en buffer NTE (a una concentración de 20μg/ml) durante 10 min a 37°C. Después las láminas se lavan durante 30 min en buffer 2X SSC (2 veces) a 45°C y por 30 min en buffer 0.1X SSC (2 veces) a 55°C. Para poder revelar, las láminas se colocan en buffer1 (10X, 1 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH a 7.5) 2 veces por 10 min, en agitación suave y constante a temperatura ambiente y se bloquean con leche descremada al 10% en buffer1 durante 1 h. Posteriormente las muestras se incuban, con 4 μl del anticuerpo anti-digoxigenina-AP Fab fragments (Roche) en 15 ml de leche descremada al 10% en buffer1 durante 2 h (mantener en agitación suave y constante). Lavar 2 veces por 10 min en buffer1 en agitación constante, después se lavan en buffer2-MgCl₂ (10X, 1 M Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 9.5 y agregar 25 ml de MgCl₂ 1 M (stock de MgCl₂) a 500 ml de buffer2 (1x), (* el MgCl₂ es muy importante para que se lleve a cabo la reacción de revelado) durante 10 min en agitación continua. Las laminillas se incuban entonces con la solución de revelado (67.5 μl de NBT (Roche), 52.5 μl de fosfatasa-X (Roche) en 15 ml de buffer2-MgCl₂) durante toda la noche (12-16h), en agitación constante. Se cubren los portalaminillas con papel aluminio para evitar que la luz afecte el revelado. Cuando el color desarrollado en el tejido es el óptimo, se detiene la reacción de revelado de color incubando las muestras en buffer3 (10 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1 mM EDTA) durante 10 min. Se lavan las muestras 2 veces por 10 min con buffer TE (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH8) y se enjuagan con H₂O ultrapura. Finalmente las muestras se montan con Aquamount (BDH) y se observan al microscopio.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 NERVIOS CIÁTICOS NORMALES

Para realizar la primera parte de nuestro proyecto, utilizamos nervios ciáticos de rata en condiciones normales (Fig. 11), los cuales por una parte fueron extraídos y procesados para aislar RNA total y analizar la expresión de los RNAm de los IP₃Rs así como de los RyRs mediante RT-PCR. Por otro lado, los nervios ciáticos fueron usados para llevar a cabo tanto las inmunohistoquímicas como las hibridaciones *in situ* en fibras nerviosas desmembradas.



Figura 11. Fotografía que muestra los nervios ciáticos de la rata. Nervio ciático de la extremidad inferior izquierda (flecha). Nervio ciático derecho (punta de flecha).

5.1.1 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS IP₃RS MEDIANTE RT-PCR

Se determinó la expresión de las 3 diferentes isoformas de los IP₃Rs en el nervio ciático normal por RT-PCR (Fig. 12). Los resultados de la densitometría con las amplificaciones llevadas a cabo para los IP₃Rs en el nervio ciático en condiciones normales muestran que el IP₃R3 es la isoforma más abundante en el nervio ciático (49%), mientras que el IP₃R2 (26%) y el IP₃R1 (25%) mantienen un nivel similar de expresión como se puede observar en el histograma.

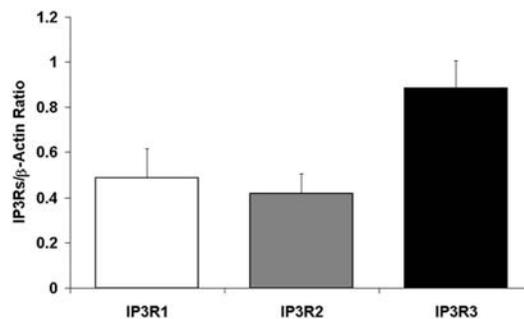


Figura 12. Histograma promedio del nivel de expresión de los RNAm de los IP₃Rs, en el nervio ciático de la rata en condiciones normales, la isoforma con mayor expresión es el IP₃R3 (asterisco), mientras que el IP₃R1 y el IP₃R2 mantienen similares niveles de expresión en nervio ciático. P=0.014. n=10.

5.1.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DE LOS IP₃RS

5.1.2.1 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP₃R1

Con el fin de conocer la distribución de los IP₃Rs en el nervio ciático normal se llevaron a cabo a cabo inmunohistoquímicas con cada una de las diferentes isoformas. Con el IP₃R1, se observa marcaje tanto en las CSFM como en las CSNFM. En las CSFM se observa un intenso marcaje tanto en el núcleo como en el citoplasma perinuclear (Fig. 13 A y B) lo que sugiere una agrupación de estos receptores en núcleo. También se aprecia marcaje en el citoplasma internodal (en las microfotografías se observa como una fina línea en la membrana abaxonal de las CSFM), así como en las incisuras de Schmidt-Lanterman (Fig. 13 C y D). En las CSNFM el IP₃R1 se detecta a bajos niveles tanto en el citoplasma como en el núcleo (Fig. 13 D), ya que haciendo una doble inmunohistoquímica contra los canales de K⁺, Kv1.2 (Fig. 13 E), los cuales marcan este tipo de células (Arroyo et al., 1999), el IP₃R1 co-localiza con los canales de potasio (Fig. 13 F).

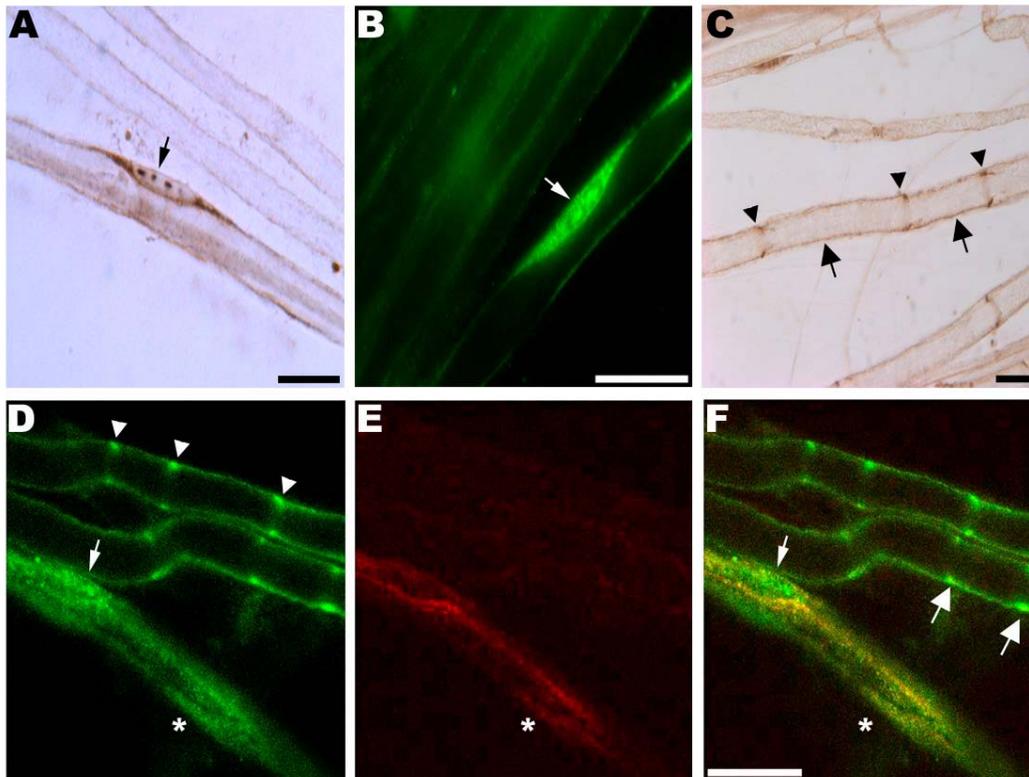


Figura 13. Inmunohistoquímica del IP₃R1 en el nervio ciático de la rata en condiciones normales. Inmuno-marcaje con DAB (A) o fluorescencia (B) del IP₃R1 en la región perinuclear y nuclear (flechas) de las CSFM. Inmuno-localización del IP₃R1 en las incisuras de Schmidt-Lanterman. (C y D puntas de flecha), y en el citoplasma internodal de las CSFM (C y F flechas). Doble inmuno-marcaje del IP₃R1 (D) y el canal de potasio, Kv1.2 (E), imagen empalmada de D y E que muestra la localización del IP₃R1 en las CSNFM (F). El IP₃R1 se detecta en las CSNFM (asteriscos en D y F), el IP₃R1 también esta presente en los núcleos de estas células (flechas pequeñas en D y F). Barra=10 μm A, B, C y en D-F.

El IP₃R1 también se localiza aproximadamente en 85% de los nodos de Ranvier (Fig. 14 A-C). Para determinar con mayor precisión la localización de esta isoforma en el complejo nodal, se realizaron dobles inmunohistoquímicas contra Ankirina_G (Ank_G) y contra los canales de K⁺, Kv1.2; que son marcadores específicos de la región nodal (Kordeli et al., 1995) y yuxtaparanodal (Arroyo et al., 1999) respectivamente. El doble-marcaje del IP₃R1 (Fig. 14 D) y de Ank_G (Fig. 14 E) mediante microscopía confocal, sugiere que el IP₃R1 co-distribuye con Ank_G (Fig. 14 F). Por otra parte, el doble-marcaje del IP₃R1 (Fig. 14 G) y el Kv1.2 (Fig. 14 H), no co-distribuye en la región yuxtaparanodal (Fig. 14 I). En conclusión, los resultados muestran que el IP₃R1 se localiza en la región nodal similar a la encontrada para los canales de sodio Nav1.6 (Caldwell et al., 2000), pero no se encuentra en la región yuxtaparanodal. El IP₃R1 también se localiza en la membrana abaxonal de las CSFM que se encuentra en proximidad con el nodo de Ranvier (Fig. 14 D y G), similar al reportado para Cx32 (Chandross et al., 1996).

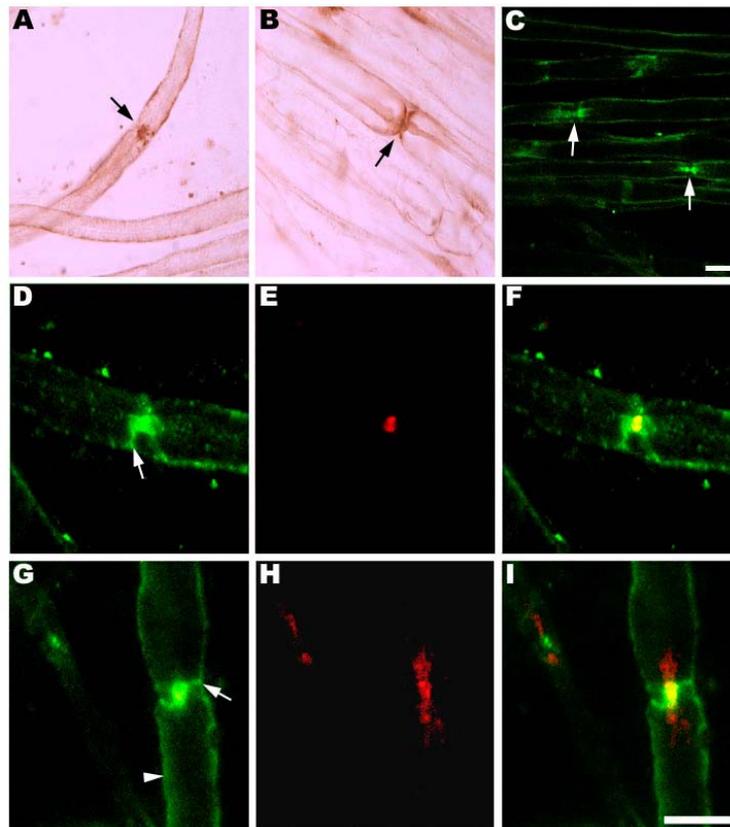


Figura 14. Inmunohistoquímica del IP₃R1 en los nodos de Ranvier del nervio ciático de la rata en condiciones normales. Marcaje nodal del IP₃R1 (flechas) con DAB (A y B) y con fluorescencia (C). Doble inmunohistoquímica del IP₃R1 (D) y Ank_G (E), el immuno-marcaje del IP₃R1 co-distribuye con Ank_G en el nodo de Ranvier (F). Doble immuno-marcaje contra el IP₃R1 (G) y Kv1.2 (H), en donde la localización de ambos marcadores no co-distribuye (I), sugiriendo que el IP₃R1 no se localiza en el yuxtaparanodo. La immuno-localización del IP₃R1 también se observa en la membrana abaxonal de las CSFM en la región

próxima a los nodos de Ranvier (flechas en D y G) y en el citoplasma abaxonal de las CSFM (punta de flecha en G). Barra=10 μm A-C y en D-I.

5.1.2.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP₃R2

Con el IP₃R2 se observa también distribución tanto en las CSFM como en las CSNFM. La localización del IP₃R2 en fibras nerviosas desmembradas se puede apreciar en la Fig. 15. El IP₃R2 se encuentra principalmente en el núcleo como gránulos discretos (Fig. 15 A y B), pero también se aprecia en el citoplasma perinuclear de las CSFM (Fig. 15 A y B). Por otro lado, las fibras nerviosas también se tiñeron con rojo de alizarina, que marca específicamente depósitos de Ca²⁺ en la célula, en donde se observan depósitos de Ca²⁺ tanto en el citoplasma perinuclear como gránulos en los núcleos de las CSFM (Fig. 15 C), sugiriendo que la localización tanto del IP₃R2 como del IP₃R1 puede estar relacionada con la presencia de depósitos de Ca²⁺. Para determinar si hay inmuno-localización del IP₃R2 en las CSNFM se llevó a cabo el doble inmuno-marcaje del IP₃R2 (Fig. 15 D) con GFAP (Fig. 15 E) que es un marcador específico de las CSNFM (Mirsky y Jessen, 1990). Se observa que la distribución de ambos marcadores co-localiza excepto en el núcleo que únicamente se marca con IP₃R2 (Fig. 15 F), sugiriendo que el IP₃R2 está presente a bajos niveles en las CSNFM tanto en el citoplasma como en el núcleo. La localización del IP₃R2 en la región nodal se extiende a la membrana abaxonal de las CSFM y a los procesos canaliculares (flechas en la Fig. 15 H e I), similar a la reportada para los canales de potasio Kv1.5 en el nervio ciático de la rata (Mi et al., 1995). También se observa un marcaje próximo al nodo de Ranvier (puntas de flecha en la Fig. 15 G-J); estas regiones del nodo de Ranvier fueron denominadas por Lev-Ram y colaboradores (1995) como "bolsas citoplasmáticas paranodales" en donde se observan movimientos transitorios de Ca²⁺ en las CSFM (incubadas con Flou3-AM) producidos por la estimulación eléctrica del axón.

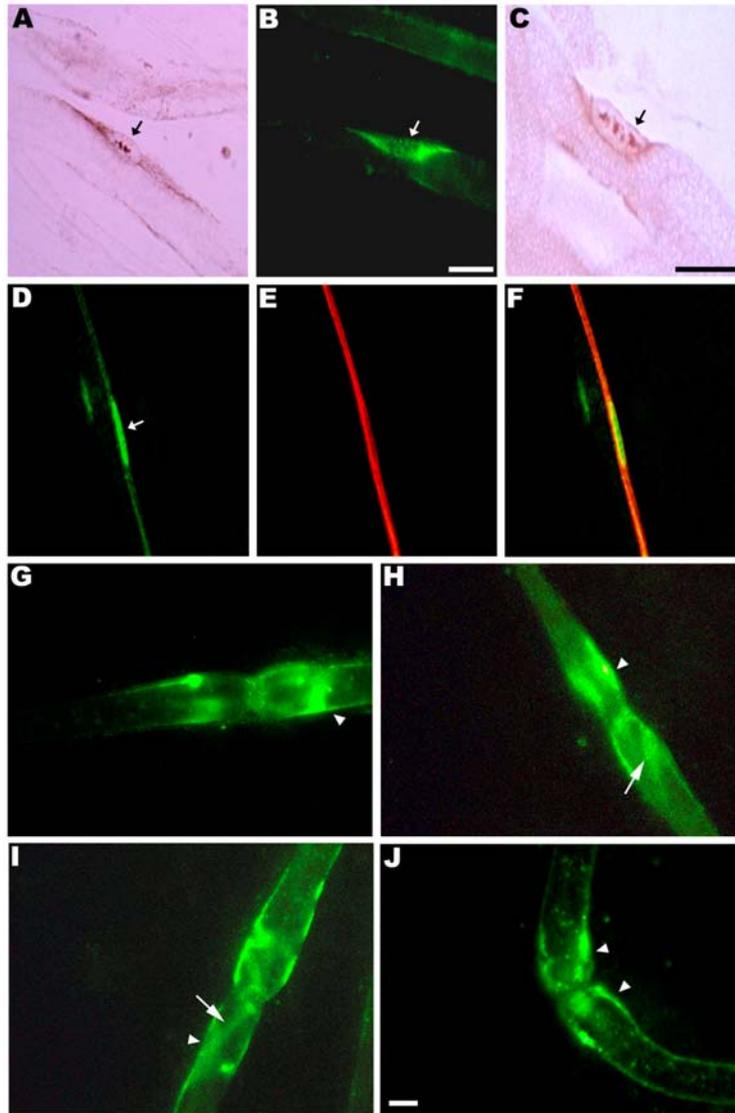


Figura 15. Inmunohistoquímica del IP_3R2 en el nervio ciático de la rata en condiciones normales. Localización del IP_3R2 tanto en el citoplasma perinuclear como en el núcleo (flechas) de las CSFM, con DAB (A) o fluorescencia (B), similar a la encontrada para el IP_3R1 . (C) Tinción con rojo de alizarina, que marca depósitos de Ca^{2+} intracelular. La alizarina tiñe tanto el citoplasma perinuclear como gránulos dentro del núcleo. (D-F) Doble inmunohistoquímica del IP_3R2 (D) y GFAP (E), los cuales co-localizan (F), el IP_3R2 también marca los núcleos de las CSNFM (flecha en D). (G-J) Marcaje de IP_3R2 en los nodos de Ranvier, el cual se distribuye en los procesos canaliculares (flechas) y en la membrana abaxonal próxima al nodo de las CSFM (puntas de flecha). Barra=10 μm A y B, C y en D-J.

5.1.2.3 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP_3R3

En nervios desmembrados, se observa un fuerte inmuno-marcaje de IP_3R3 en las CSNFM (Fig. 16 A, D y G), que se corrobora mediante el doble marcaje del IP_3R3 (Fig. 16 A) y GFAP que es un marcador específico de las CSNFM (Fig. 16 B), que el IP_3R3 co-distribuye con GFAP (Fig. 16 C). El marcaje del IP_3R3 en las CSNFM tiene un aspecto fibrilar (Fig. 16 D), semejante al que se observa

con GFAP. Para confirmar la distribución del IP₃R3 en la CSNFM se realizaron inmunohistoquímicas en nervios simpáticos, los cuales contienen 90% de fibras amielínicas (Aguayo et al., 1981), y en donde las fibras se marcan intensamente con el IP₃R3 (Fig. 16 E). También se observa la localización del IP₃R3 en fibras nerviosas desmembradas en el citoplasma perinuclear de las CSFM (flechas en la Fig. 16 F y G), pero no hay marcaje en el núcleo como sucede con las otras dos isoformas (el núcleo está contrateñido con tiónina).

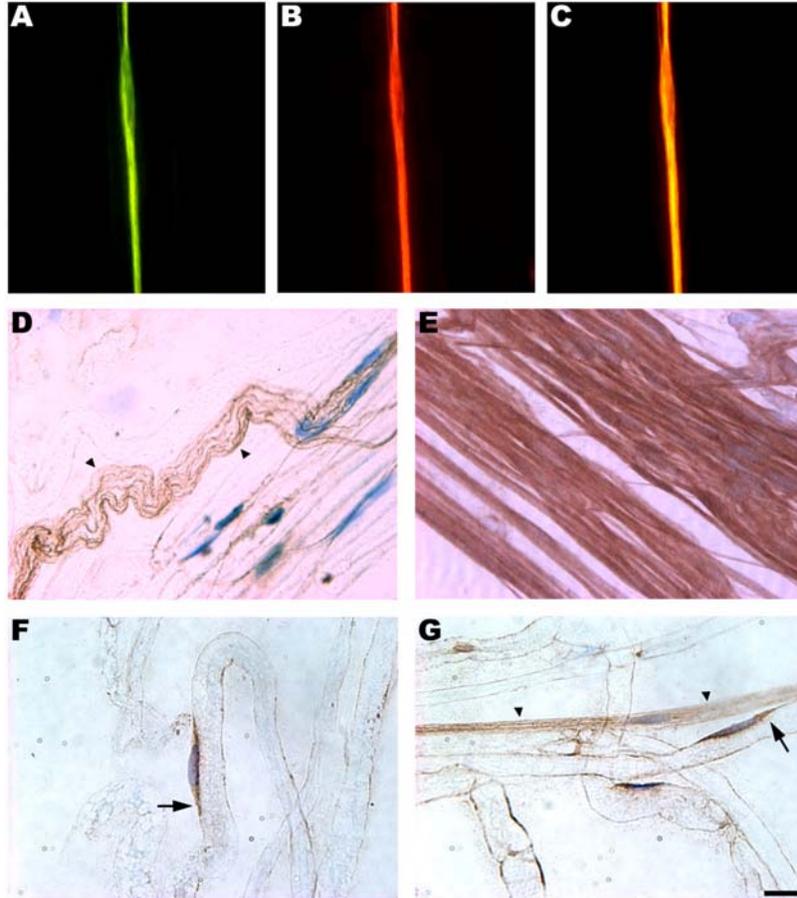


Figura 16. Inmunohistoquímica del IP₃R3 en las fibras nerviosas desmembradas del nervio ciático de la rata. Doble inmuno-marcaje del IP₃R3 (A) y GFAP (B), en donde el IP₃R3 co-distribuye con GFAP (C). Localización del IP₃R3 en las CSNFM (puntas de flecha en D y G). Distribución del IP₃R3 en el nervio simpático en preparaciones reveladas con DAB (E). Marcaje del IP₃R3 en el citoplasma perinuclear de una CSFM (flecha en F y G), el núcleo está contrateñido con tiónina. El marcaje del IP₃R3 en las CSNFM presenta un aspecto fibrilar (D). Barra=10 μm A-G.

También se encontró inmuno-localización del IP₃R3 en los nodos de Ranvier (Fig. 17 A y B), haciendo una cuantificación mediante el software image pro-plus, aproximadamente un 80% de los nodos de Ranvier muestran inmuno-marcaje para el IP₃R3. Por otro lado, la tinción de rojo de alizarina, que muestra la presencia de depósitos de Ca²⁺ en la región nodal (flechas en la Fig. 17

C), sugiriendo la presencia de compartimentos del RE/RS, donde probablemente se encuentren agrupaciones de los IP₃Rs. Para definir con mayor precisión la localización del IP₃R3 en los nodos de Ranvier, se realizaron dobles inmunohistoquímicas contra Ankirina_G (Ank_G) y contra los canales de potasio, Kv1.2 que son marcadores específicos de la región nodal y yuxtaparanodal respectivamente (Kordeli et al., 1995; Arroyo et al., 1999). El doble inmuno-marcaje del IP₃R3 (Fig. 17 D) y Ank_G (Fig. 17 E), muestra que la localización del IP₃R3 no se empalma con la observada con Ank_G (Fig. 17 F) de esta manera el IP₃R3 no esta presente en el nodo de Ranvier (en el axón). Mediante el doble marcaje del IP₃R3 (Fig. 17 G) y los Kv1.2 (Fig. 17 H), se observa que la región yuxtaparanodal en la que se agrupan los canales de K⁺, no co-localizan con el IP₃R3 (Fig. 17 I). Estos resultados sugieren un marcaje específico del IP₃R3 confinado a la región paranodal de las CSFM.

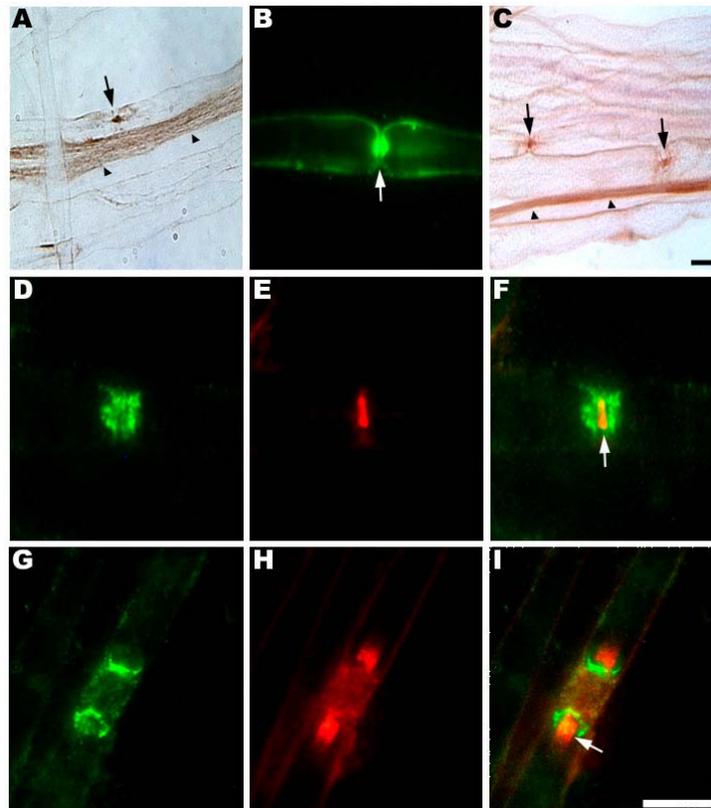


Figura 17. Inmunohistoquímica del IP₃R3 en los nodos de Ranvier de las fibras nerviosas desmembradas del nervio ciático de la rata en condiciones normales. Localización del IP₃R3 en los nodos de Ranvier (flechas) en preparaciones reveladas con DAB (A) o fluorescencia (B). (C) Tinción con rojo de alizariana en los nodos de Ranvier (flechas en C). Se puede observar marcaje del IP₃R3 en las CSNFM (puntas de flecha en A), así como depósitos de Ca²⁺ en este tipo de células (puntas de flecha en C). Doble inmunohistoquímica del IP₃R3 (D) y Ank_G (E), en donde la localización del IP₃R3 no co-distribuye con Ank_G (flecha en F). Doble inmuno-marcaje del IP₃R3 (G) y Kv1.2 (H), mostrando que el inmuno-marcaje del IP₃R3 no co-localiza con el marcaje yuxtaparanodal del canal de potasio Kv1.2 en imágenes de microscopía confocal (flecha en I), sugiriendo que la localización del IP₃R3 sólo esta presente en la región paranodal de las CSFM. Barra=10µm A-C y en D-I.

5.1.3 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS RyRs MEDIANTE RT-PCR

También se llevaron a cabo estudios de RT-PCR semicuantitativa con las diferentes isoformas de los RyRs en condiciones normales del nervio ciático (Fig. 18). Los resultados muestran que el RyR1 es la isoforma con mayor expresión en el nervio ciático de la rata en condiciones normales (45%), mientras que el RyR2 (27%) y el RyR3 (28%) mantienen un nivel de expresión muy similar. Sin embargo, es importante mencionar que la cantidad de estos receptores es menor que los de IP₃Rs.

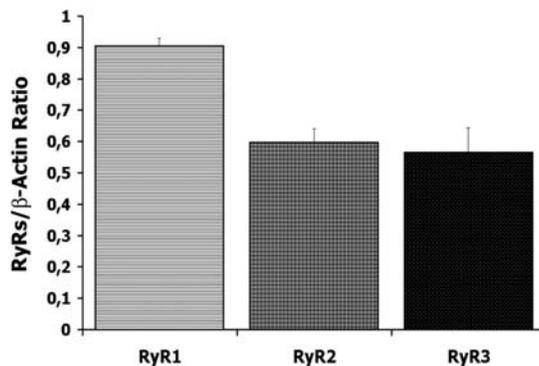


Figura 18. Histograma promedio del nivel de expresión de los RNAm de los RyRs, en el nervio ciático de la rata en condiciones normales. La isoforma con mayor expresión es el RyR1 (asterisco), mientras que el RyR2 y el RyR3 mantienen similares niveles de expresión. $p=0.0002$. $n=10$.

5.1.4 HIBRIDACIONES *IN SITU* DE LOS RyRs EN EL NERVIO CIÁTICO NORMAL DE LA RATA

Nuestros resultados muestran que las tres isoformas, RyR1 (Fig. 19), RyR2 (Fig. 20) y RyR3 (Fig. 21) se encuentran tanto en las CSFM como en las CSNFM. La expresión de los RyRs tiene un marcaje punteado a lo largo de las redes citoplasmáticas de las células de Schwann. En las CSFM estos punteados se localizan principalmente en el citoplasma perinuclear y a lo largo del citoplasma abaxonal internodal (Fig. 19-21). También se aprecia marcaje en la región nodal, en donde se observan puntos muy intensos a lo largo de la membrana abaxonal próxima al nodo de Ranvier (Fig. 19-21).

Para determinar si ambas células de Schwann expresan las diferentes isoformas de los RyRs se llevó a cabo la combinación de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica contra GFAP, que es un marcador específico de CSNFM. Los resultados muestran que los tres mensajeros de los RyRs se expresan en las CSNFM. La expresión de los RNAm de los RyRs muestran un marcaje punteado a lo largo de las células (Fig. 19-21 C) donde se localiza el inmuno-marcaje para GFAP (Figs. 19-21 D), el cual co-distribuye (Fig. 19-21 E). La expresión de los RyRs de tipo punteado sugiere la presencia

de agrupaciones de estos receptores a lo largo del citoplasma de ambos tipos de células de Schwann. La proteína básica de mielina (MBP) es transportado por polisomas libres espacialmente distribuidos al interior de la célula (Ainger et al., 1997). El hecho de encontrar expresión de los RyRs en las células que no presentan inmuno-marcaje para GFAP, implica que las diferentes isoformas de los RyRs también se expresan en las CSFM. En conclusión, los RyRs se expresan en ambos tipos de células de Schwann.

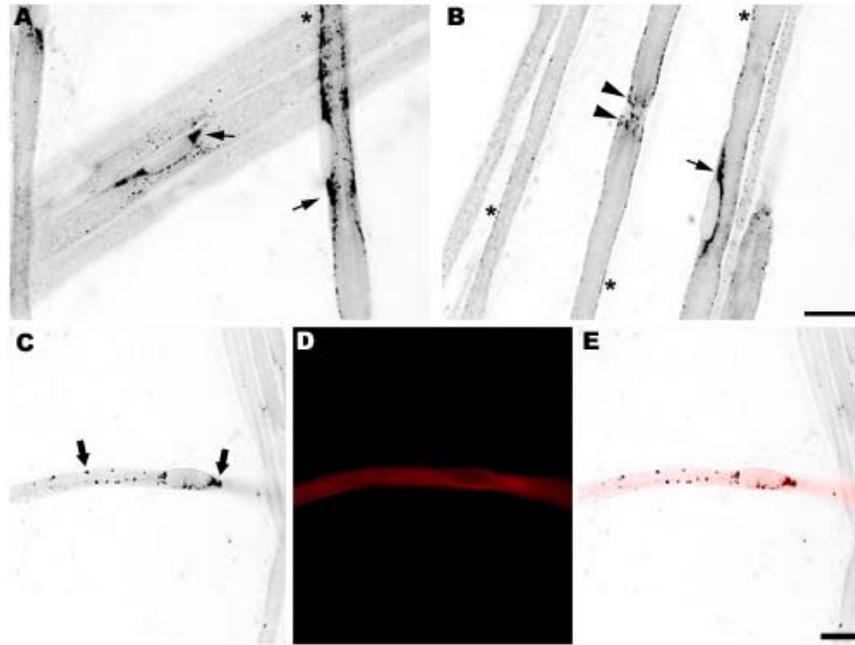


Figura 19. Hibridaciones *in situ* de RyR1 en fibras nerviosas desmembradas del nervio ciático de rata adulta. La expresión del RyR1 se aprecia en forma de puntos tanto en las CSFM como en las CSNFM. En las CSFM se distribuye en el citoplasma perinuclear (flechas en A y B), en la membrana abaxonal próxima al nodo de Ranvier (puntas de flecha en B) y en el citoplasma internodal (asteriscos en A y B). Mediante hibridación *in situ*-inmunohistoquímica, la expresión del RyR1 se distribuye a lo largo de la célula en forma de puntos (flechas grandes en C), donde el inmuno-marcaje de GFAP (D), se observa que co-distribuye (E), mostrando que RyR1 se expresa en las CSNFM. Barra=10 μ m en A y B, y en C-E.

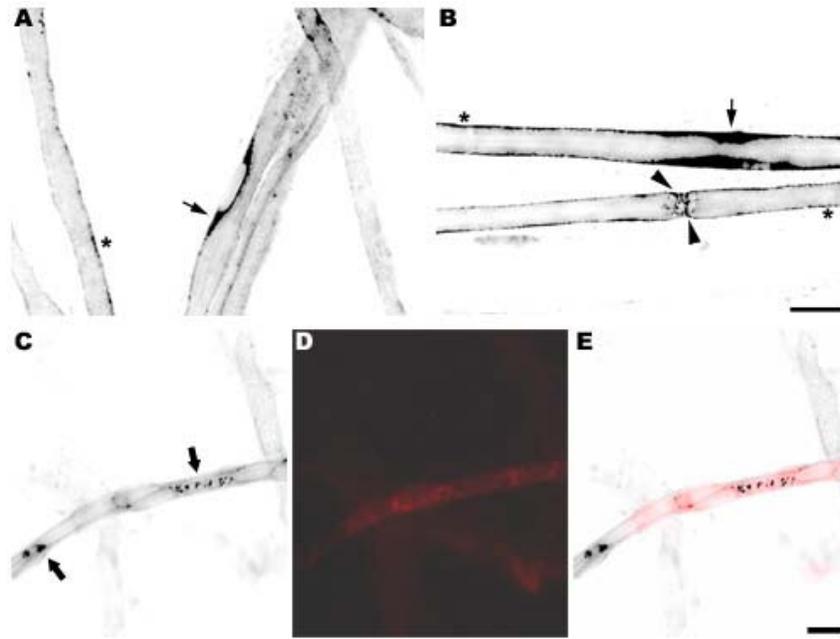


Figura 20. Hibridaciones *in situ* de RyR2 en fibras nerviosas desmembradas del nervio ciático de rata adulta. La expresión del RyR2 se aprecia en forma de puntos tanto en las CSFM como en las CSNFM. En las CSFM se distribuye en el citoplasma perinuclear (flechas en A y B), en la membrana abaxonal próxima al nodo de Ranvier (puntas de flecha en B) y en el citoplasma internodal (asteriscos en A y B). Mediante hibridación *in situ*-inmunohistoquímica, la expresión del RyR2 se distribuye a lo largo de la célula en forma de puntos (flechas grandes en C), donde el inmuno-marcaje de GFAP (D), se observa que co-distribuye (E), mostrando que RyR2 se expresa en las CSNFM. Barra=10 μ m en A y B, y en C-E.

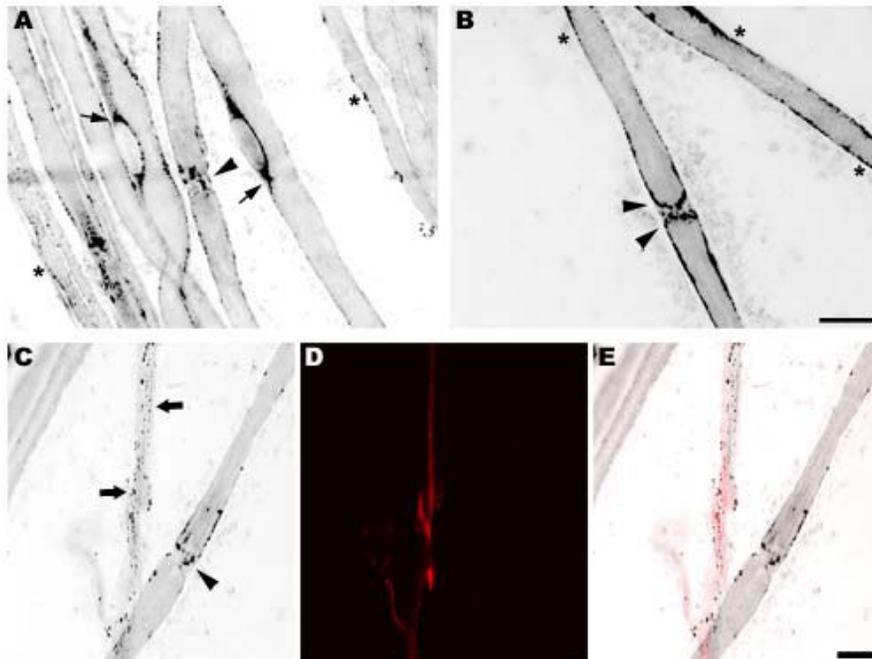


Figura 21. Hibridaciones *in situ* de RyR3 en fibras nerviosas desmembradas del nervio ciático de rata adulta. La expresión del RyR3 se aprecia en forma de puntos tanto en las CSFM como en las CSNFM. En las CSFM se distribuye en el citoplasma

perinuclear (flechas en A), en la membrana abaxonal próxima al nodo de Ranvier (puntas de flecha en A, B y C) y en el citoplasma internodal (asteriscos en A y B). Mediante hibridación *in situ*-inmunohistoquímica, la expresión del RyR3 se distribuye a lo largo de la célula en forma de puntos (flechas grandes en C), donde el inmuno-marcaje de GFAP (D), se observa que co-distribuye (E), mostrando que RyR3 se expresa en las CSNFM. Barra=10 μ m en A y B; y en C-E.

5.2 DEGENERACIÓN WALLERIANA DEL NERVO CIÁTICO

Para realizar la segunda parte de nuestro proyecto, se llevaron a cabo lesiones en el nervio ciático de la rata (Fig. 22) tanto por compresión como por transección. El daño se ocasiona en el nervio de la extremidad inferior izquierda de las ratas, mientras que el nervio ciático de la extremidad inferior derecha no se lesiona (nervio contalateral) y es utilizado como control en nuestros experimentos. Para realizar la lesión por compresión (Fig. 22 A) el nervio es descubierto y despojado del tejido conectivo que lo sujeta al músculo posteriormente a nivel medio se comprime con pinzas de disección durante 30 seg, la lesión forma una región proximal (flecha en la Fig. 22 A), una región peritraumática (punta de flecha en la Fig. 22 A) y una región distal (asterisco en la Fig. 22 A). Este modelo de lesión permite la regeneración nerviosa, ya que los componentes de la matriz extracelular del nervio no son cortados.

En la lesión por transección del nervio ciático (Fig. 22 B), el nervio se corta generando dos muñones, uno proximal (flecha en la Fig. 22 B) el cual mantiene contacto con los cuerpos neuronales agrupados en los ganglios de la raíz dorsal próximos a la médula espinal. El otro muñón que se forma es el distal (asterisco en la Fig. 22 B) el cual pierde el contacto neuronal y se degenera. Para evitar la regeneración nerviosa debido a que los dos muñones quedan libres en el espacio tisular, se coloca un punto de sutura que une el extremo libre del muñón proximal con el músculo (punta de flecha en la Fig. 22 C).

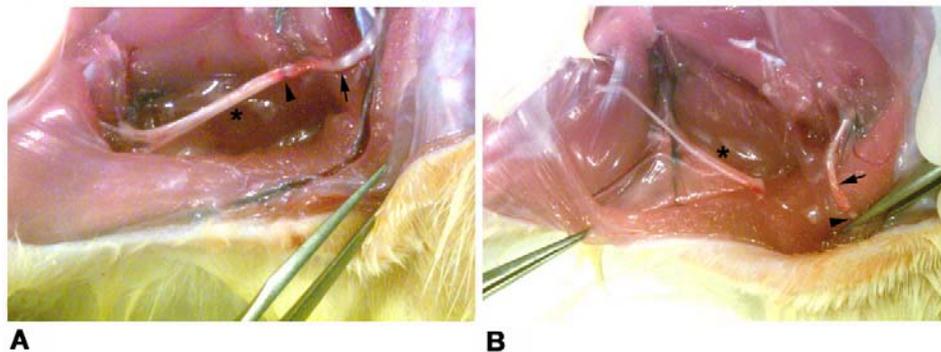


Figura 22. Fotografías que muestran las lesiones en el nervio ciático de la rata. (A) Fotografía de un nervio lesionado por compresión después de 1 día de ocasionado el daño. Este tipo de lesión produce una región proximal (flecha), una región peritraumática (punta de flecha) y una región distal (asterisco). (B) Fotografía de un nervio lesionado por transección 1 día después de realizada la operación. En la imagen se muestran los muñones proximal (flecha) y distal (asterisco). Para evitar que el nervio se regenere se coloca un punto de sutura que une extremo del muñón proximal con el músculo (punta de flecha).

5.2.1 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS IP₃Rs DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA

Se llevaron a cabo lesiones por transección (Fig. 23) y compresión (Fig. 24) del nervio ciático, para determinar si se presentaban cambios en la expresión de los RNAm de las diferentes isoformas de los IP₃Rs por RT-PCRs. De esta manera y con el auxilio del análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis determinamos si se presentaban diferencias significativas en los niveles de expresión del los IP₃Rs. Los histogramas del promedio del índice de relación IP₃R1/ β -actina obtenido de cada una de las tres repeticiones de la lesión por transección y el análisis estadístico confirmó que no hay cambios en el nivel de expresión del IP₃R1 en los diferentes tiempos establecidos, ya que para el muñón proximal la probabilidad (p) fue de 0.327136 (Fig. 23 IA) y para el muñón distal $p=0.773339$ (Fig. 23 IC). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los nervios contralaterales ya que $p=0.514741$ (dato no mostrado). En los nervios ciáticos lesionados por compresión (Fig. 24 IA), para el IP₃R1 el valor de p es de $p=0.9320$ y en los nervios contralaterales de $p=0.3674$ (Fig. 24 IC). Determinándose que no hay diferencias significativas en ambos experimentos, ya que sólo cuando $p<0.05$ hay diferencias significativas, en donde $n=3$.

Para el IP₃R2, se muestran los histogramas del promedio del índice de relación del IP₃R2 (yang y vector)/ β -actina obtenido con cada una de las tres repeticiones de la lesión por transección. El análisis estadístico mostró que no hay cambios en el nivel de expresión del IP₃R2 en los diferentes tiempos establecidos, ya que para el muñón proximal $p=0.97$ (Fig. 23 IIA) y para el muñón distal $p=0.31$ (Fig. 23 IIC). En el caso de los nervios contralaterales sólo se realizó un experimento el cual muestra que no hay cambios en el nivel de expresión (dato no mostrado). Las amplificaciones del IP₃R2 en los nervios lesionados por compresión fueron omitidas debido a que no se encontraron cambios significativos en el nivel de expresión durante la lesión por transección.

Para el IP₃R3 el análisis estadístico determinó que no hay diferencias significativas en el nivel de expresión tanto en los nervios lesionados por transección como por compresión en la relación IP₃R3/ β -actina. Los valores obtenidos fueron los siguientes: para los nervios lesionados por transección en el muñón proximal $p=0.600$ (Fig. 23 IIIA), en el muñón distal $p=0.1686$ (Fig. 23 IIIC) y en los nervios contralaterales $p=0.2420$ (dato no mostrado). Para el nervio lesionado por compresión $p=0.1895$ (Fig. 24 IIA). En los nervios contralaterales sólo se realizó un experimento que muestra no haber un cambio en el nivel de expresión del IP₃R3 (Fig. 24 IIC).

Lesión por Transección

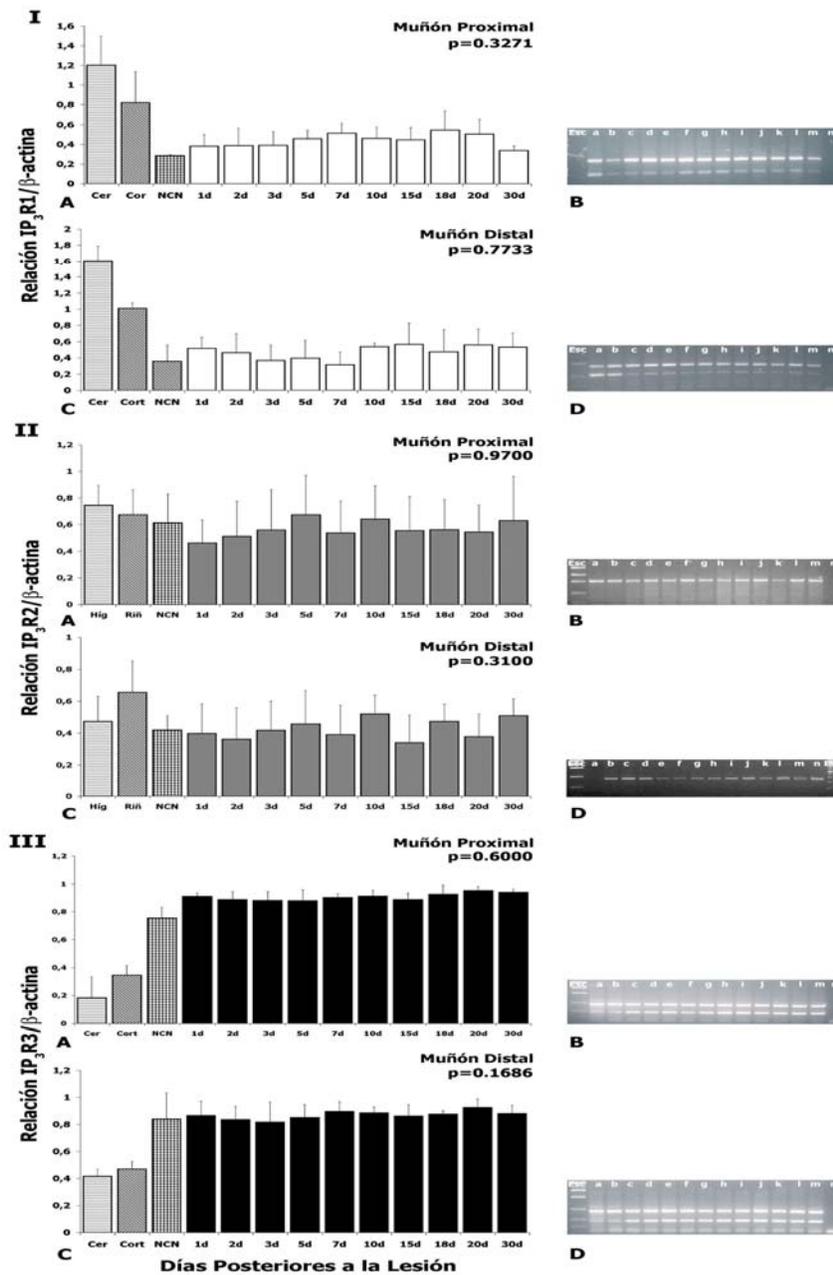


Figura 23. Expresión de los IP_3R s en lesiones por transección. Histograma de la relación $IP_3R1/\beta\text{-actina}$ (I), $IP_3R2/\beta\text{-actina}$ (II) o $IP_3R3/\beta\text{-actina}$ (III), en nervios lesionados por transección tanto en el muñón proximal (A) como en el distal (C) a los diferentes días de estudio establecidos, (Cer) cerebelo, (Cort) corteza cerebral, (NCN) nervio ciático normal, $n=3$. Gel de agarosa al 3% representativo de las co-amplificaciones del $IP_3R1/\beta\text{-actina}$ (I), $IP_3R2/\beta\text{-actina}$ (II) o $IP_3R3/\beta\text{-actina}$ (III), en el muñón proximal (B) o distal (D). (a) cerebelo, (b) corteza cerebral, (c) nervio ciático normal, (d, e, f, g, h, i, j, k, l, m) corresponden a 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 18, 20 y 30 días después de la lesión respectivamente. (n) control, reacción de amplificación sin templado inicial. (Esc) marcador de bajos pesos moleculares. $n=3$.

Lesión por Compresión

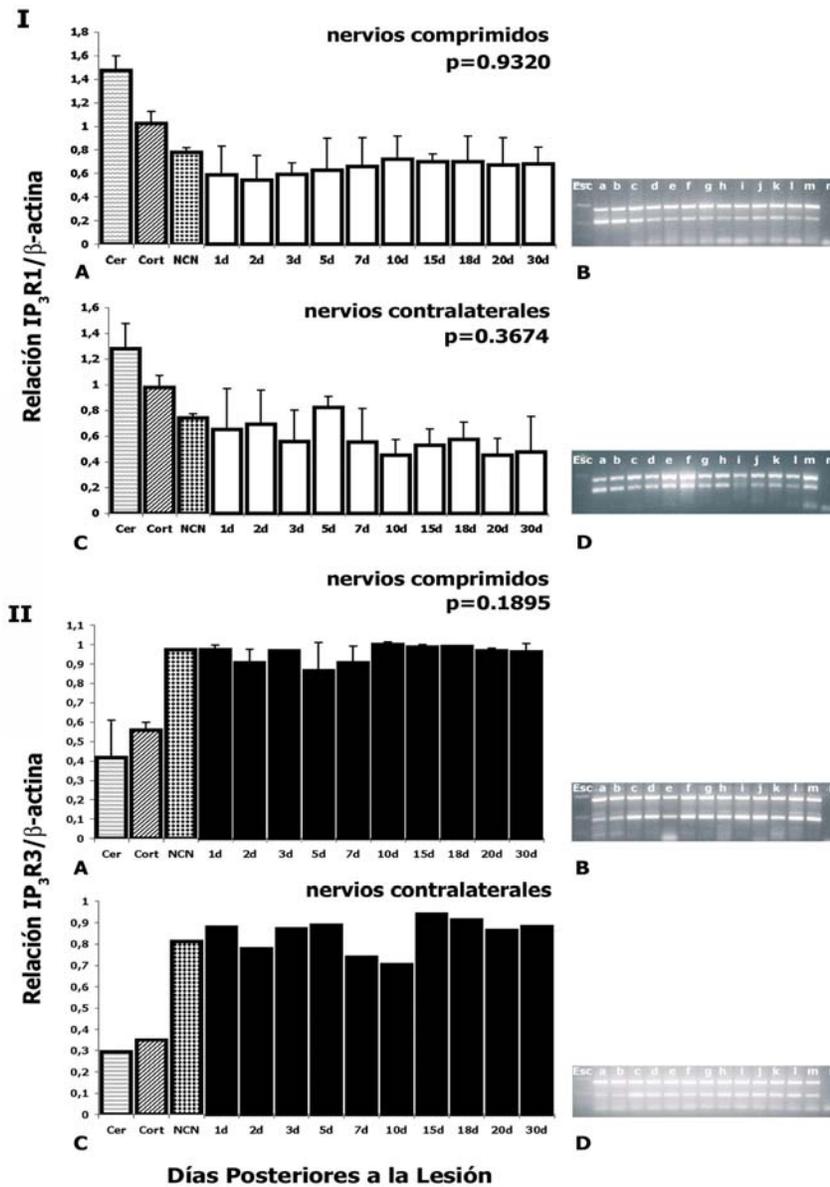


Figura 24. Expresión de IP_3R1 e IP_3R3 en lesiones por compresión. Histograma de la relación IP_3R1/β -actina (I) o IP_3R3/β -actina (II) En nervios lesionados por compresión (A) y en nervios contralaterales (C), a los diferentes días de estudio establecidos. (Cer) cerebelo, (Cort) corteza cerebral, (NCN) nervio ciático normal $n=3$. Gel de agarosa al 3% representativo de las co-amplificaciones del IP_3R1/β -actina (I) o del IP_3R3/β -actina (II) tanto en nervios lesionados por compresión (B) como en nervios contralaterales (D), (a) cerebelo, (b) corteza cerebral, (c) nervio ciático normal, (d, e, f, g, h, i, j, k, l, m) corresponden a 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 18, 20 y 30 días después de la lesión respectivamente. (n) control, reacción de amplificación sin templado inicial. (Esc) marcador de bajos pesos moleculares. $n=3$.

5.2.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DE LOS IP₃RS EN EL NERVIPO CIÁTICO LESIONADO POR COMPRESIÓN DE LA RATA

Una vez obtenidos los resultados de la distribución de los IP₃Rs en el nervio ciático normal, investigamos la distribución de estos receptores de calcio intracelular durante la degeneración Walleriana y la regeneración axonal ocasionada por compresión del nervio ciático. Para ello se realizaron lesiones en el nervio ciático por compresión y se extrajeron los nervios a diferentes tiempos después de haberse efectuado la lesión, tratando de separar lo mejor posible las fibras nerviosas. Se realizaron inmunohistoquímicas que fueron reveladas con DAB utilizando los mismos anticuerpos policlonales específicos para cada una de las isoformas del IP₃R, con el objetivo de comparar los posibles cambios que pudieran ocurrir en el patrón de distribución de los IP₃Rs con respecto a los encontrados en condiciones normales.

5.2.2.1.1 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP₃R1 EN LA REGIÓN DISTAL

Como se mencionó en la sección 2.6, durante la degeneración Walleriana ambos tipos de células de Schwann se desdiferencian y presentan un fenotipo similar al encontrado en las células de Schwann inmaduras durante el desarrollo. En este trabajo, las células de Schwann desdiferenciadas las hemos denominado células de Schwann “denervadas” ya que se encuentran privadas del contacto axonal.

En la figura 25 se muestra la localización del IP₃R1 en la porción distal del nervio ciático lesionado por compresión. Las fibras nerviosas que se degeneran forman elipsoides (también conocidos como ovoides) los cuales están compuestos principalmente de mielina fragmentada, embebida en el citoplasma de las CSFM que comienzan a desdiferenciarse (Fig. 25 A, asterisco). Se ha sugerido que los elipsoides se forman por ensanchamientos de las incisuras de Schmitd-Lanterman y de los nodos de Ranvier, (Ramón y Cajal, 1928) (Fig. 25 A, estrellas). Estos elipsoides son estructuras irregulares de acuerdo al tamaño y forma, aunque ordenadas en su arreglo, y se encuentran a lo largo de las fibras en degeneración.

A los 3 días de haberse lesionado el nervio, comienzan a ocurrir cambios importantes en el patrón de localización del IP₃R1 en la región distal. El IP₃R1 se observa en los espacios citoplasmáticos producto de la desmielinización de las CSFM y a lo largo del citoplasma de las células de Schwann “denervadas” (Fig. 25 A, puntas de flecha). También el IP₃R1 presenta un intenso marcaje en numerosos núcleos ya que las células de Schwann “denervadas” entran en proliferación (Fig. 25 A, flecha). La proliferación comienza a presentarse entre los días 2-4 posterior a la lesión y se incrementa notablemente de alrededor de día 6 al 10 (Jiménez et al., 2005). Los nodos de Ranvier desaparecen de las fibras nerviosas a partir de las 24 horas de ocasionada la lesión y en nuestras

preparaciones no pueden ser apreciados. Los espacios de la región nodal son ocupados por citoplasma y la mielina próxima a esos espacios se contrae (Ramón y Cajal, 1928). Un aspecto muy importante es que la degeneración de las fibras nerviosas no se lleva a cabo de manera sincronizada. Las fibras nerviosas con calibres “pequeños” avanzan más rápido en la fragmentación de la mielina en comparación con las fibras de calibres “grandes” (Ramón y Cajal, 1928), esto se aprecia en la figura 25 A, en donde las fibras presentan diferentes estados de degradación de la mielina. Las fibras centrales contienen varios elipsoides mientras que otras fibras apenas comienzan a fragmentar la mielina (Fig. 25 A, estrellas). Además, se aprecia un incremento en el inmunomarcaje del IP₃R1 en los núcleos de las células de Schwann “denervadas” las cuales están en proliferación, ya que se observa una gran cantidad de células con los núcleos teñidos con tionina.

Acorde con la progresión de la degeneración a los 5 días, se observan numerosos elipsoides conformados principalmente por fragmentos axonales y restos de mielina, que son degradados dentro de estos espacios (Fig. 25 B y C, asteriscos). El marcaje del IP₃R1 aumenta en el citoplasma presente entre los elipsoides de las células de Schwann “denervadas” (Fig. 25 B y C, puntas de flechas). Se puede observar también una mayor proliferación de las células de Schwann “denervadas” (núcleos teñidos con tionina), las cuales muestran un intenso inmuno-marcaje para el IP₃R1 (Fig. 25 B y C, flechas).

A los 10 días de efectuada la lesión por compresión (Fig. 25 D), se observa un gran número de células de Schwann “denervadas” que se encuentran en proliferación. Este fenotipo celular continúa presentando marcaje del IP₃R1 en el núcleo (Fig. 25 D, flecha). En esta etapa casi todos los restos de mielina han sido removidos, aunque todavía se encuentran algunos restos de acumulaciones de grasa (Fig. 25 D, asterisco), sugiriendo que las fibras nerviosas mielinizadas de calibres grandes aún no han sido totalmente degradadas. El IP₃R1 se distribuye a todo lo largo del citoplasma de las células de Schwann “denervadas” (Fig. 25 D, punta de flecha).

A los 15 días posteriores a la lesión, el IP₃R1 se localiza con mayor intensidad en el núcleo de las células de Schwann “denervadas”. Este marcaje se observa como gruesos gránulos (Fig. 25 E y F, flechas), y a lo largo del citoplasma de este fenotipo celular (Fig. 25 E y F, puntas de flecha). Aún se pueden apreciar en las células espacios de acumulación de grasa, aunque son menores (en tamaño y número) en comparación con los encontrados a los 10 días (Fig. 25 E, asterisco). En esta etapa de regeneración nerviosa, los axones comienzan a extender proyecciones a la región distal (Ramón y Cajal, 1928).

A los 20 días, el inmuno-marcaje de este receptor continúa marcando los núcleos de las células de Schwann (Fig. 25 G y H, flechas) aunque con menor intensidad que a los 15 días. La figura 25 H muestra una ampliación de dos núcleos marcados con el IP₃R1, que se observan como gránulos discretos semejantes a los descritos en condiciones normales (Sección 5.1.2.1). Esta localización sugiere que el IP₃R1 está formando agrupaciones dentro del retículo nucleoplásmico (RN) de las células de Schwann "denervadas". En esta etapa de regeneración nerviosa, los axones de la región proximal han penetrado las bandas de Büngner y han extendido sus proyecciones axonales a lo largo de la región distal con el objetivo de re-establecer contacto con su tejido blanco y de esta manera regenerar el nervio lesionado. Algunas de las proyecciones axonales ya han sido remielinizadas (Ramón y Cajal, 1928). El IP₃R1 se inmuno-localiza en el citoplasma de todas las células de Schwann "denervadas" que se encuentran estrechamente asociadas con los axones (Fig. 25 G y H, puntas de flechas), aunque los niveles de marcaje del IP₃R1 son menores, posiblemente porque los axones en esta etapa se están remielinizando.

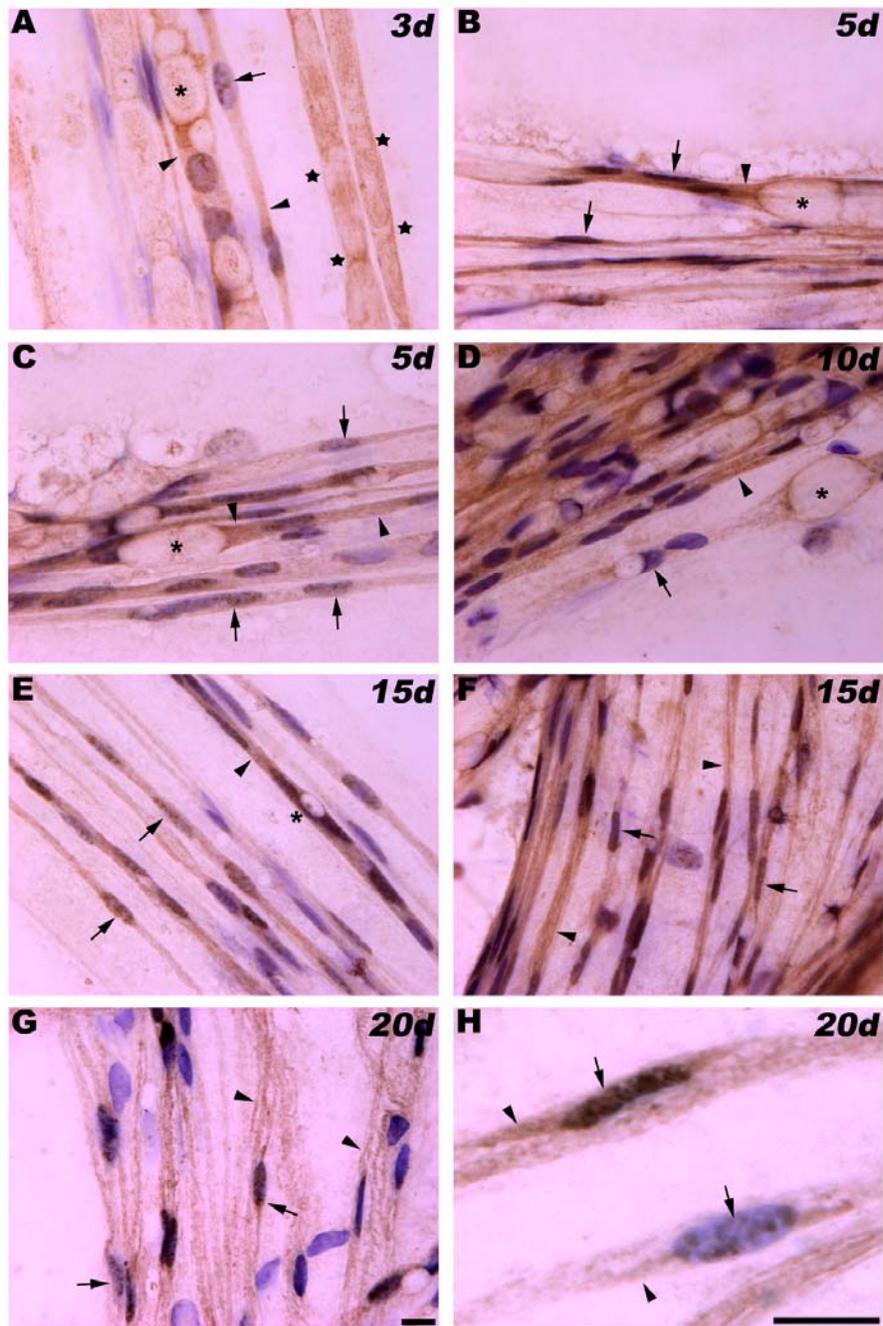


Figura 25. Inmuno-localización del IP_3R1 en la región distal de los nervios ciáticos lesionados. A los 3 días (A), el IP_3R1 se localiza dentro de los núcleos de las células de Schwann “denervadas” (flechas), los núcleos de las células de Schwann se observan en color morado/azul debido a la tinción con tiónina. El IP_3R1 también empieza a observarse en los espacios citoplasmáticos de las células de Schwann (puntas de flecha) entre los elipsoides (asterisco). Los sitios donde comienzan a formarse los elipsoides, que se ha sugerido son los ensanchamientos de las incisuras de Schmidt-Lanterman, se indican con estrellas. A los 5 días (B y C), se mantiene el marcaje del IP_3R1 dentro del núcleo de las células de Schwann “denervadas” (flechas) y a lo largo del citoplasma de las células de Schwann “denervadas” (puntas de flecha) entre los elipsoides (asteriscos). A los 10 días (D), el IP_3R1 sigue localizándose dentro del núcleo (flecha) y se aprecia una mayor cantidad de células de Schwann en proliferación. El IP_3R1 se distribuye a lo largo todo el citoplasma de las células de Schwann (punta de

flecha). En esta etapa se siguen observando los elipsoides (asteriscos). A los 15 días (E y F), aumentan los niveles de marcaje del IP₃R1 en los núcleos de las células de Schwann en forma de gruesos gránulos (flechas), continúan proliferando las células de Schwann (núcleos marcados con tionina). Aunque en menor cantidad, casi todas las células se encuentran desmielinizadas y muestran inmuno-marcaje del IP₃R1 a lo largo del citoplasma (puntas de flecha). Aún se pueden observar pequeñas acumulaciones de grasa en algunas fibras, sugiriendo que todavía no ha terminado de ser degradada la mielina en todas las fibras (asterisco en E). A los 20 días (G y H), los núcleos muestran marcaje del IP₃R1 pero en menor proporción que a los 15 días (flechas). El IP₃R1 se distribuye en el citoplasma de las células de Schwann “denervadas” (puntas de flecha). En H se muestra una ampliación de dos núcleos de las células de Schwann “denervadas” marcados con el IP₃R1 (flechas). Barra=10µm A-H.

5.2.2.1.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP₃R1 EN LA REGIÓN PROXIMAL

Se llevaron a cabo inmunohistoquímicas de las regiones proximales del nervio ciático para determinar si también ocurren cambios en el patrón de distribución del IP₃R1 durante la degeneración Walleriana y la regeneración axonal (Fig. 26). En la región proximal del nervio ciático de todas las lesiones, como se muestra a los 5 días (Fig. 26 A) y a los 20 días (Fig. 26 B) el IP₃R1 se localiza en los núcleos, en el citoplasma perinuclear y a lo largo del citoplasma abaxonal de las CSFM y también se observa en las incisuras de Schmidt-Lanterman. De esta manera, el patrón de distribución del IP₃R1 es similar al encontrado en condiciones normales (Fig. 13). En los nodos de Ranvier, la localización del IP₃R1 es muy similar a la encontrada en condiciones normales el patrón de distribución del IP₃R1 es similar al encontrado en condiciones normales (Fig. 14). Estos resultados indican que en la región proximal, el patrón de distribución del IP₃R1 no presenta cambios durante los procesos de degeneración Walleriana.

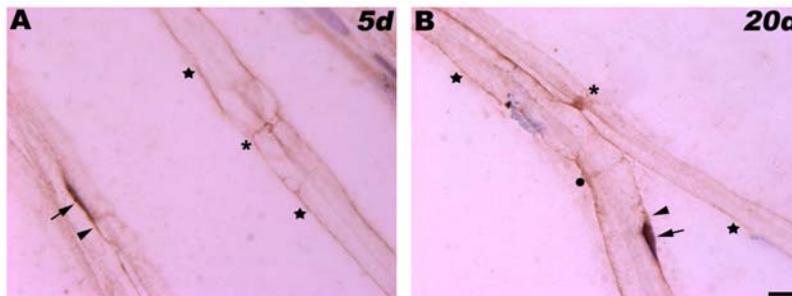


Figura 26. Inmuno-localización del IP₃R1 en la región proximal del nervio ciático de la rata. Inmunohistoquímica a los 5 (A) y 20 días (B) después de la lesión. El IP₃R1 se localiza en los núcleos (flechas), en el citoplasma perinuclear (puntas de flecha), en el citoplasma abaxonal las CSFM (estrellas) y en incisuras de Schmidt-Lanterman (punto en B). También se aprecia inmuno-marcaje del IP₃R1 en los nodos de Ranvier (asteriscos) similar a la obtenida en condiciones normales. Barra=10 µm.

5.2.2.2.1 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP₃R2 EN LA REGIÓN DISTAL

La localización del IP₃R2 en la porción distal del nervio ciático lesionado por compresión se muestra en la figura 27. La localización del IP₃R2 en la región distal a los 3, 5, 15 y 20 días de generada la

lesión se observa principalmente en los núcleos (Fig. 27 A, B y C, flechas) y en el citoplasma de las células de Schwann “denervadas”. Sin embargo, se aprecia un cambio en la distribución del IP₃R2 en los núcleos con respecto al normal. A los 3 días (Fig. 27 A) y 5 días (Fig. 27 B) después de la lesión se observan gránulos discretos semejantes a los descritos en condiciones normales, sin embargo, a los 15 días (Fig. 27 C) toda el área nuclear es marcada fuertemente. También se aprecia innumo-marcaje del IP₃R2 a lo largo de todo el citoplasma de las células de Schwann “denervadas” entre los elipsoides que se forman cuando se degrada la mielina (Fig. 27 A, B y C, puntas de flecha). A los 20 días (Fig. 27 D), se lleva a cabo la re-mielinización de los axones y se comienzan a formar los nodos de Ranvier. El IP₃R2 se localiza en los nodos de Ranvier (Fig. 27 D, asterisco) de manera similar al encontrado en condiciones normales, encontrándose en los procesos canaliculares (Fig. 27 D, punta de flecha) y en la membrana abaxonal próxima al nodo de Ranvier (Fig. 27 D, flecha). También se puede observar que las células de Schwann “denervadas” se encuentran todavía en proliferación por la abundancia de los núcleos teñidos con tionina (Fig. 27 A, B y C).

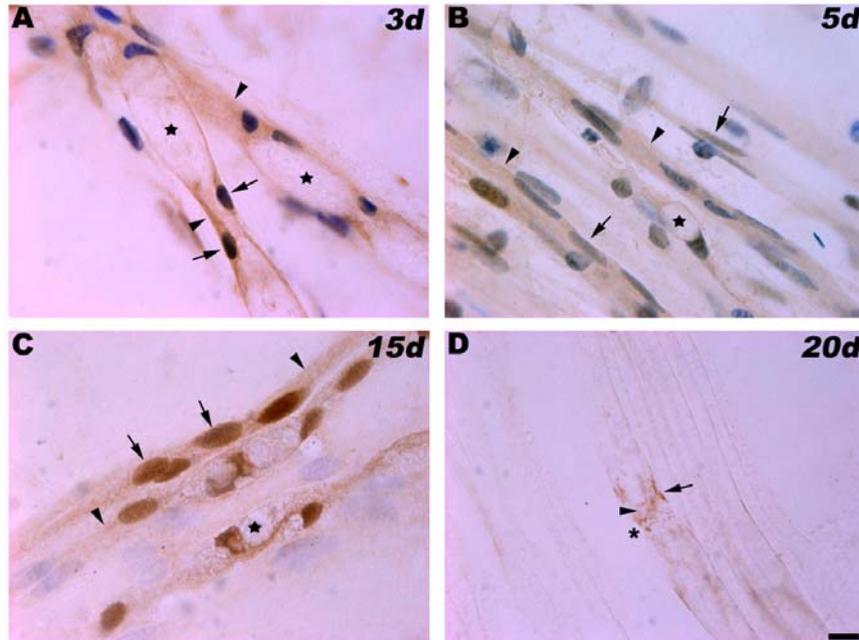


Figura 27. Inmuno-localización del IP₃R2 en la región distal del nervio ciático. Localización del IP₃R2 a 3 (A), 5 (B), 15 (C) y 20 (D) días de ocasionada la lesión. El IP₃R2 se encuentra principalmente en los núcleos (flechas) y en los espacios citoplasmáticos (puntas de flecha) entre los elipsoides (estrellas). En D se muestra el marcaje del IP₃R2 en un nodo de Ranvier (asterisco), el cual se localiza en los procesos canaliculares (punta de flecha) y en el citoplasma abaxonal próximo al nodo de Ranvier (flecha), sugiriendo que la región distal del nervio ha establecido las condiciones necesarias para la regeneración axonal. Barra=10 μ m.

5.2.2.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP₃R2 EN LA REGIÓN PROXIMAL

En la región proximal del nervio ciático (Fig. 28), el IP₃R2 se localiza en los núcleos y en el citoplasma perinuclear de las CSFM, como se muestra a los 3 días (Fig. 28 A) y a los 15 días (Fig. 28 B). De esta manera, el patrón de distribución del IP₃R2 es similar al patrón encontrado en condiciones normales (Fig. 15). En los nodos de Ranvier el IP₃R2 se localiza principalmente en los procesos canaliculares (Fig. 28 B, puntas de flecha) y en la membrana abaxonal próxima al nodo de Ranvier (Fig. 28 B, flechas), muy similar a la encontrado en condiciones normales (Fig. 15). Estos resultados indican que en la región proximal con respecto a la lesión el patrón de distribución del IP₃R2 no presenta cambios durante los procesos de degeneración Walleriana del nervio ciático con respecto al nervio en condiciones normales.

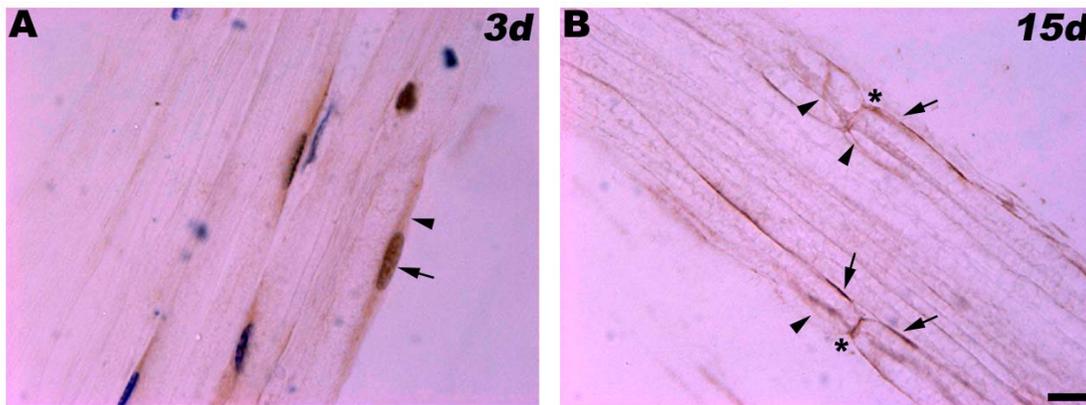


Figura 28. Inmuno-localización del IP₃R2 en la región proximal del nervio ciático. Localización del IP₃R2 a 3 días (A) y 15 días (B) después de la lesión. El IP₃R2 se distribuye principalmente en los núcleos (flecha) y en el citoplasma perinuclear (puntas de flecha) de las CSFM. Los nodos de Ranvier, muestran un patrón de localización similar a los normales, en la membrana abaxonal próxima al nodo (asteriscos) y en los procesos canaliculares (puntas de flecha) de las CSFM. Barra=10 μ m.

5.2.2.3.1 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP₃R3 EN LA REGIÓN DISTAL

La inmuno-localización del IP₃R3 en la porción distal del nervio ciático lesionado por compresión se muestra en la figura 29. A los 3 días de efectuada la lesión se observa que el IP₃R3 se localiza principalmente a lo largo del citoplasma de las células de Schwann "denervadas" (Fig. 29 A y B, puntas de flecha) y en el citoplasma próximo del núcleo de las células de Schwann "denervadas" (Fig 29 A y B, flechas) que se forma en las fibras nerviosas que se encuentran degradando la mielina creando elipsoides (Fig. 29 A y B, asteriscos). Además, se aprecia que las células de Schwann "denervadas" están en proliferación, ya que se observan una gran cantidad de núcleos teñidos con tiónina.

A los 10 días de efectuada la lesión (Fig. 29 C), el inmuno-marcaje del IP₃R3 es más intenso (en comparación con las otras dos isoformas de los IP₃Rs) y se distribuye a lo largo del citoplasma de las células de Schwann “denervadas” (Fig. 29 C, flechas) y entre los elipsoides (Fig. 29 C asteriscos). Las células de Schwann “denervadas” se encuentran en proliferación, como lo muestra la gran cantidad de núcleos que se pueden observar debido a la contra-tinción con tiónina (Fig. 29 C, puntas de flecha).

A los 15 días (Fig. 29 D-F) a lo largo de las células de Schwann “denervadas”, el marcaje del IP₃R3 tiene un aspecto fibroso (flechas en la Fig. 31 D-F) semejante al observado en condiciones normales y que es notablemente diferente al observado tanto para el IP₃R1 como para el IP₃R2, que muestran un marcaje punteado. Esto sugiere que el IP₃R3 se encuentra a lo largo de compartimentos celulares del RE que se extienden a lo largo del citoplasma asociándose probablemente con elementos del citoesqueleto. Durante esta etapa de degeneración y regeneración nerviosa, hay presencia de elipsoides (Fig. 29 D-E, asteriscos) y por el marcaje de los núcleos con tiónina, continúa habiendo proliferación de las células de Schwann “denervadas”. Un resultado interesante es que al igual que las otras isoformas el IP₃R3 se localiza en los núcleos de las células de Schwann “denervadas” durante esta etapa de degeneración y regeneración nerviosa (Fig. 29 D y E). En un campo ampliado, se muestran células de Schwann “denervadas” que presentan inmuno-localización del IP₃R3 en los núcleos. El marcaje se observa como puntos discretos en el núcleo (Fig. 29 F, puntas de flecha), pero a diferencia de las otras isoformas, los puntos son escasos y se encuentran diseminados a lo largo del núcleo. Este resultado sugiere que la movilización de Ca²⁺ mediada por este receptor podría estar involucrado en procesos de activación de genes implicados en la re-mielinización ya que este proceso comienza entre la primer y segunda semana de realizada la lesión (Jiménez et al., 2005).

A los 20 días (Fig. 29 G y H), la localización del IP₃R3 se distribuye a lo largo del citoplasma de todas las células de Schwann “denervadas” (Fig. 29 G y H, flechas), las cuales se encuentran estrechamente asociadas con los axones. Las células de Schwann “denervadas” extienden sus procesos celulares a lo largo de los axones, sugiriendo que estas células gliales guían y envuelven a los axones para que puedan establecer contacto con su tejido blanco; por otra parte, la asociación célula de Schwann “denervada”-axón, permite a la célula glial recibir las señales adecuadas provenientes del axón para iniciar la re-mielinización (Fawcett y Keynes, 1990; Scherer y Salzer, 1996). Los núcleos de las células de Schwann “denervadas” continúan presentando inmuno-marcaje para el IP₃R3, aunque es más discreto que a los 15 días (Fig. 29 G y H, asteriscos; inserto en G).

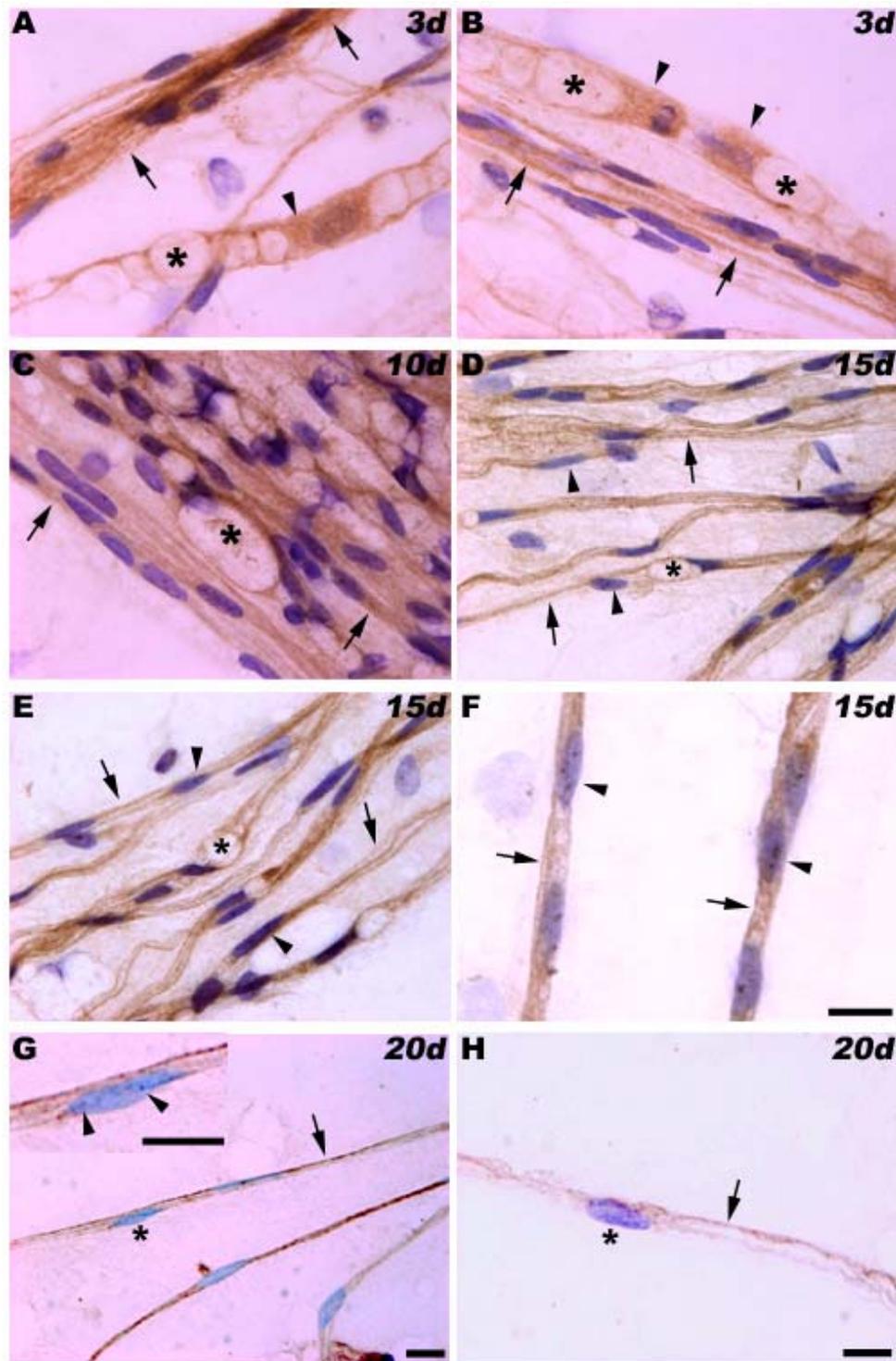


Figura 29. Inmuno-localización del IP_3R3 en la región distal de los nervios ciáticos lesionados por compresión. Inmunohistoquímica del nervio ciático a los 3 (A y B), 10 (C), 15 (D-F) y 20 (G y H) días después de la lesión. A los 3 días, el IP_3R3 se localiza en el citoplasma de las células de Schwann “denervadas” (flechas). También se observa marcaje en el citoplasma de fibras nerviosas de calibres “grandes” (puntas de flecha) que se encuentran degradando la mielina formado elipsoides (asteriscos). A los 10 días (C) el IP_3R3 se distribuye a lo largo de las células de Schwann “denervadas” (flechas). Se aprecian elipsoides sin marcaje (asteriscos) y un incremento en la señal; los núcleos se contratiñeron con tionina. (D-F) A

los 15 días (E-F) el receptor se localiza a lo largo del citoplasma de las células de Schwann “denervadas” (flechas) de aspecto fibroso y hay pocos elipsoides (asteriscos). También hay marcaje del IP₃R3 en los núcleos de las células de Schwann “denervadas” (puntas de flecha). (F) Ampliación de núcleos de células de Schwann “denervadas”, mostrando marcaje del IP₃R3 como pequeños puntos diseminados en a lo largo de los núcleos. A los 20 días (G y H) el IP₃R3 se distribuye a lo largo todo el citoplasma de las células de Schwann “denervadas” (flechas). El inmuno-marcaje del IP₃R3 se mantiene en los núcleos de las células de Schwann “denervadas” (Inserto en G, puntas de flecha). Barra=10 μm en A-H.

5.2.2.3.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DEL IP₃R3 EN LA REGIÓN PROXIMAL

En la región proximal del nervio (Fig. 30) como se muestra a los 3 días y a los 20 días (Fig. 30 A y B), el IP₃R3 se localiza principalmente a lo largo de las CSNFM (Fig. 30 A y B, puntas de flecha) y en el citoplasma perinuclear de las CSFM (Fig. 30 A y B, flechas). De esta manera, el patrón de distribución del IP₃R3 es similar al encontrado en condiciones normales (Fig. 16). En los nodos de Ranvier, el marcaje del IP₃R3 se localiza en las regiones paranodales (Fig. 30 B, asteriscos), similar a la encontrada en condiciones normales (Fig. 17). Estos resultados indican que en la región proximal el patrón de distribución del IP₃R3 no presenta cambios durante el proceso de degeneración Walleriana del nervio ciático con respecto a las condiciones normales.

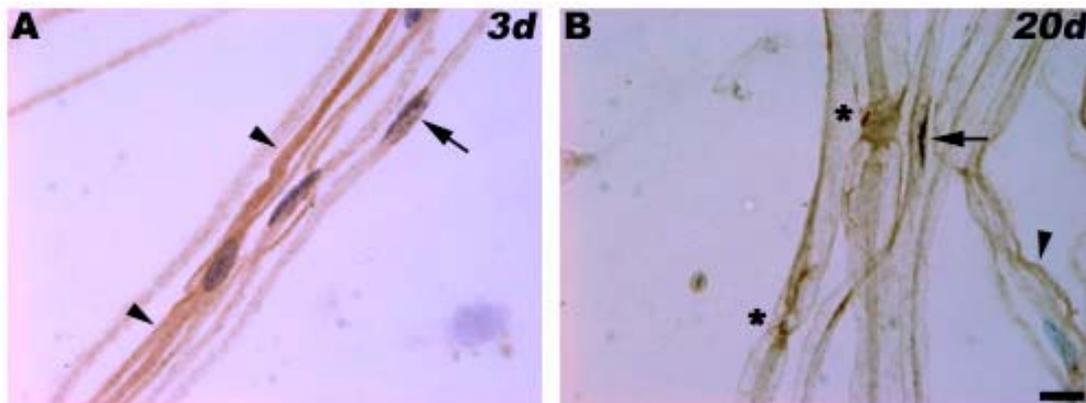


Figura 30. Inmuno-localización del IP₃R3 en la región proximal del nervio ciático. Localización del IP₃R3 a 3 días (A) y 20 días (B) después de la lesión, el IP₃R3 se distribuye principalmente a lo largo del citoplasma de las CSNFM (puntas de flecha) y en el citoplasma perinuclear de las CSFM (flechas). En los nodos de Ranvier el IP₃R3 se localiza en las regiones paranodales (asteriscos) similar al encontrado en condiciones normales. Barra=10 μm.

5.2.3 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS RyRs DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA

Se llevaron a cabo también lesiones por transección del nervio ciático con el objetivo de estudiar la expresión de las diferentes isoformas de los RyRs durante la degeneración Walleriana. Los datos obtenidos de los RyRs se muestran en la figura 31. Para el RyR1, se llevó a cabo el promedio del índice de relación RyR1/β-actina obtenido de cada una de las tres repeticiones de la lesión por transección. El análisis estadístico muestra que no hay cambios significativos en el nivel de

expresión del RyR1 a los diferentes tiempos establecidos con respecto al nervio ciático normal, ya que en el muñón proximal $p=0.600$ (Fig. 31 IA), en el muñón distal $p=0.1686$ (Fig. 31 IC) y en los nervios contralaterales $p=0.2420$ (dato no mostrado).

Para el RyR2, se realizaron los histogramas del promedio del índice de relación RyR2/ β -actina obtenido de cada una de las tres repeticiones de la lesión por transección. El análisis estadístico muestra que no hay cambios significativos en el nivel de expresión del RyR2 en los diferentes tiempos establecidos con respecto al nervio normal tanto en el muñón proximal donde $p=0.97$ (Fig. 31 IIA), como en los nervios contralaterales donde $p=0.8231$ (dato no mostrado). Sin embargo, en el muñón distal se muestra un cambio significativo en el nivel de expresión del RyR2 disminuyendo con respecto al nervio en condiciones normales donde $p=0.0013$ (Fig. 31 IIC).

Para el RyR3, fueron efectuados los histogramas del promedio del índice de relación RyR3/ β -actina obtenido de cada una de las tres repeticiones de la lesión por transección. El análisis estadístico muestra que el nivel de expresión del RyR3 en el muñón proximal presenta cambios significativos con respecto al nervio normal donde $p=0.0006$ (Fig. 31 IIIA). El nivel de expresión, disminuye a partir del primer día de lesión y paulatinamente se incrementa hasta alcanzar los niveles encontrados en condiciones normales a los 30 días después de la lesión. Sin embargo, el nivel de expresión del RyR3 tanto en el muñón distal (Fig. 31 IIIC) como en el nervio contralateral (dato no mostrado) no presenta cambios significativos con respecto al nervio normal ya que en el muñón distal $p=0.9973$ y en el nervio contralateral $p=0.9838$.

Lesión por Transección

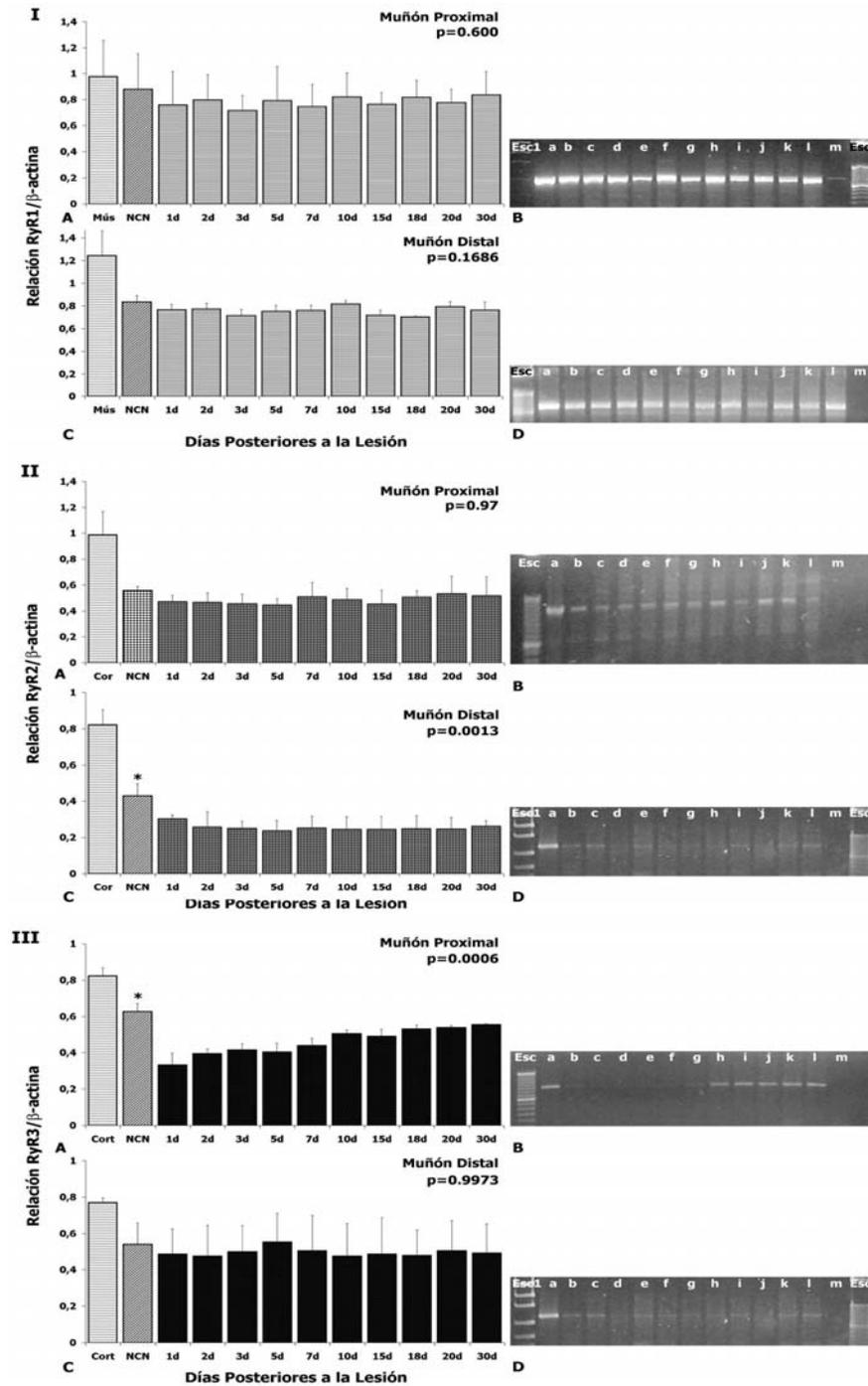


Figura 31. Expresión de los RyRs durante la degeneración Walleriana ocasionada por transección. Histograma de la relación RyR1/ β -actina (I), RyR2/ β -actina (II) o RyR3/ β -actina (III), en nervios lesionados por transección en el muñón proximal (A) y distal (C) a los diferentes días de estudio establecidos, (Mús) músculo esquelético, (Cor) músculo cardíaco, (Cort) Corteza cerebral, (NCN) nervio ciático normal. Gel de agarosa al 3% representativo de las amplificaciones del RyR1 (I), RyR2 (II) o RyR3 (III) en el muñón proximal (B) y distal (D). (a) tejido control (Mús, Cor, Cort en I, II y III respectivamente), (b) nervio ciático normal, (c, d, e, f, g, h, i, j, k, l) corresponden a 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 18, 20 y 30 días

después de la lesión respectivamente. (m) control, reacción de amplificación sin templado inicial. (Esc) escalera de 50 pb. (Esc1) escalera de bajos pesos moleculares. En todos los casos n=3.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

6.1 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS IP₃Rs Y DE LOS RyRs EN EL NERVIIO CIÁTICO NORMAL

Nuestros resultados muestran que mediante la técnica de RT-PCR semi-cuantitativa, es posible amplificar tanto las tres isoformas de los IP₃Rs como de los RyRs en el nervio ciático de la rata en condiciones normales. Este interesante resultado abre la perspectiva para investigar el desempeño de estos receptores de Ca²⁺ intracelulares en este sistema y de manera indirecta poder sugerir algunas de las probables funciones que pueden llevar a cabo en el SNP.

Se llevaron a cabo las densitometrías de las amplificaciones obtenidas por RT-PCR semi-cuantitativa para las diferentes isoformas tanto de los IP₃Rs como de los RyRs en el nervio ciático en condiciones normales. Los resultados muestran que a nivel de RNAm el IP₃R3 es la isoforma más abundante en el nervio ciático (49%), mientras que el IP₃R2 (26%) y el IP₃R1 (25%) mantienen un nivel similar de expresión (Fig. 12). Para los RyRs, los resultados muestran que a nivel de RNAm el RyR1 es la isoforma con mayor expresión en el nervio ciático de la rata en condiciones normales (45%), mientras que el RyR2 (27%) y el RyR3 (28%) mantienen un nivel de expresión muy similar (Fig. 18).

Por otra parte, el nivel de expresión del IP₃R3 en el nervio ciático es notablemente mayor que en corteza cerebral y cerebelo, e incluso que el páncreas, el cual es un tejido que ha sido reportado con una abundante expresión de esta isoforma del IP₃R (Berridge et al., 2000). La alta expresión del IP₃R3 en el nervio ciático es un resultado intrigante y el papel funcional que el receptor pueda llevar a cabo es desconocido y más aún por la distribución que presenta este receptor en el nervio ciático.

Un dato importante es que para poder llevar a cabo las reacciones de RT-PCR con los RyRs, la cantidad de RNA total utilizado como templado inicial fue de 1 µg (a menores concentraciones la amplificación es fallida o inespecífica), mientras que con los IP₃Rs la concentración utilizada fue de 500 ng. Este resultado sugiere hay una menor cantidad de mensajeros de las diferentes isoformas de los RyRs en el nervio ciático. En concordancia con estos resultados están los estudios hechos en el núcleo supraquiasmático en el cual los IP₃Rs son 8 veces más abundantes que los RyRs (Díaz-Muñoz et al., 1999) y en neuronas del ganglio simpático la relación IP₃R/RyR es aproximadamente de 6:1 (Hernández-Cruz et al., 1995).

6.2 INMUNO-LOCALIZACIÓN DE LOS IP₃RS EN EL NERVIPO CIÁTICO NORMAL

Los resultados muestran una expresión diferencial de las tres diferentes isoformas de los IP₃Rs en las células de Schwann, así como en estructuras anatómicas concretas como son los nodos de Ranvier. Esto indica que las tres isoformas de los IP₃Rs deben tener papeles diferentes en la movilización de Ca²⁺ intracelular con diferentes significados para la célula y el sistema.

Los resultados también muestran la localización de las tres isoformas de los IP₃Rs en el citoplasma abaxonal de las CSFM que se encuentra a todo lo largo del internodo, así como en el citoplasma abaxonal de la célula de Schwann que rodea al nodo de Ranvier. Sin embargo, el IP₃R1 es la única isoforma que se expresa en las incisuras de Schmidt-Lanterman.

La expresión del IP₃R1 a lo largo de las redes citoplasmáticas internodales de las CSFM indica que en estas redes citoplasmáticas se puede movilizar Ca²⁺, sugiriendo la posibilidad de generación de ondas de Ca²⁺, las cuales pueden tener diversos significados fisiológicos para las células, aún desconocidos para nosotros. Estos resultados se correlacionan con las tinciones que hicimos con alizarina, que marca específicamente depósitos de Ca²⁺ en la célula (Johnson, 1994), en donde se observa marcaje tanto en el citoplasma perinuclear como a lo largo del citoplasma abaxonal del internodo y en las incisuras de Schmidt-Lanterman semejante al encontrado con los IP₃Rs, sugiriendo que los depósitos de calcio se correlacionan con la presencia de RE a lo largo de las redes citoplasmáticas de las CSFM. También se correlaciona con los estudios *in situ* de fibras nerviosas de nervio ciático de rana realizados por Lev-Ram y Ellisman, (1995) en los cuales las células fueron incubadas con Fluo-3AM y después de una estimulación eléctrica de los axones, se observaron incrementos transitorios de la [Ca²⁺]_i en el citoplasma perinuclear a lo largo de la redes citoplasmáticas internodales, marcándose intensamente el citoplasma abaxonal internodal y las incisuras de Schmidt-Lanterman, además de ser generada una alta actividad transitoria de [Ca²⁺]_i en el citoplasma abaxonal próximo a la región nodal de las CSFM (Lev-Ram y Ellisman, 1995).

En las incisuras de Schmidt-Lanterman también se han reportado la inmuno-localización de los canales de K⁺, Kv1.2, Kv1.2 y Kvβ2 (Arroyo et al., 1999). Se ha propuesto que la expresión de los canales de K⁺ en las células de Schwann desempeña un papel en el mantenimiento del potencial de reposo, así como también en respuesta a la proliferación una vez que se ocasiona un daño al nervio (Baker, 2002). La distribución de los canales de K⁺ así como la que observamos para los IP₃Rs es segregada e independiente. De esta manera es posible que las células de Schwann y los axones tengan una alta regulación espacial del Ca²⁺ en microdominios, generando eventos de señalamiento de Ca²⁺ en regiones específicas de la célula (Mi et al., 1995; Berridge, 2006).

Diferentes estudios indican la presencia de caveolas (pequeñas bolsas vesiculares de la membrana plasmática) en diferentes tipos de células, por ejemplo en células endoteliales, de músculo liso y queranocitos (Fujimoto et al., 1992). Las caveolas también han sido descritas mediante microscopía electrónica en las CSFM (Muganini et al., 1977). Además ha sido localizada una proteína similar al IP₃R1 en los caveolos mediante técnicas inmunohistoquímicas (Fujimoto et al., 1992). La expresión y función de esta proteína en las caveolas es desconocida; sin embargo se ha propuesto que estas estructuras celulares en la membrana plasmática pueden estar involucradas con la entrada capacitativa de Ca²⁺ a la célula (Putney, 1999; Isshiki et al., 2002, Isshiki y Anderson, 2003).

La expresión del IP₃R2 en el citoplasma abaxonal próximo al nodo de Ranvier y en los procesos canaliculares, sugiere una alta especialización de las regiones citoplasmáticas de las células de Schwann. La membrana citoplasmática abaxonal de las células de Schwann próxima a los nodos de Ranvier también expresa canales de K⁺, Kv1.5 (Mi et al., 1995), receptores ionotrópicos P2X₇ (Grafe et al., 1999), y receptores metabotrópicos P2Y₁ (Toews et al., 2007). Esto sugiere que el Ca²⁺ intracelular puede desempeñar un papel importante, tanto en el ensamblaje como en la estabilización del complejo nodal.

Por otra parte, el IP₃R3 tiene un fuerte marcaje y una alta distribución en las CSNFM además de presentar un marcaje de tipo fibroso a diferencia de las otras isoformas que presentan un marcaje punteado a lo largo de las células. El marcaje de tipo fibroso es muy similar al que presenta la proteína GFAP. El GFAP es un componente del citoesqueleto ya que es un filamento intermedio que se expresa en las CSNFM. Los factores celulares responsables de determinar la localización precisa intracelular de los IP₃Rs aún son desconocidos. Sin embargo, en estudios recientes numerosas proteínas del citoesqueleto así como de ensamblaje de complejos proteicos, han sido identificadas como proteínas que interactúan con los IP₃Rs. Por ejemplo, los filamentos de actina son elementos esenciales del citoesqueleto y cualquier modificación que pueda afectar esta estructura puede afectar la distribución de los IP₃Rs o el señalamiento de Ca²⁺ a través de estos receptores (Vermassen et al., 2004). La localización del IP₃R3 en las CSNFM sugiere que componentes tanto del citoesqueleto como proteínas de ensamblaje de complejos proteicos de estas células, tienen elementos o motivos necesarios para establecer relaciones estructurales estrechas con esta isoforma.

La inmuno-localización diferencial y segregada de los IP₃Rs en los nodos de Ranvier, sugiere que estos receptores de Ca²⁺ están llevando a cabo funciones específicas en esta región anatómica altamente especializada. Nuestros estudios muestran que el IP₃R1 tiene una localización en los

nodos de Ranvier similar a la encontrada para Ank_G, que es una proteína adaptadora que une proteínas integrales de la membrana plasmática como espectrina, con el citoesqueleto de actina, formando un complejo con los canales de Na⁺ (Lambert et al., 1997). El canal Na_v1.6 se expresa en los nodos de Ranvier y la expresión del IP₃R1 es similar con la reportada para este canal de sodio (Caldwell et al., 2000), sugiriendo que puede estar formando agrupaciones que permitirían la generación de microdominios de señalamiento de Ca²⁺. Por otro lado, el IP₃R1 no co-localiza en la región yuxtaparanodal que muestra la presencia de los canales de potasio Kv1.2 (Arroyo et al., 1999).

El IP₃R3 tiene una localización en la región paranodal, ya que no co-localiza ni con Ank_G en la región nodal donde también se encuentran los canales de sodio Na_v1.6, ni con el canal de potasio Kv1.2 en la región yuxtaparanodal. La expresión del IP₃R3 en el nodo de Ranvier sugiere que estos receptores forman una frontera o límite en los paranodos definiendo las regiones nodal y yuxtaparanodal. La presencia de conexina 32 (Cx32) también ha sido reportada en la región paranodal (Chandross et al., 1996). Esta inmuno-localización diferencial de los IP₃Rs en los nodos de Ranvier sugiere que los mecanismos de activación de los IP₃Rs están presentes en estos microdominios citoplasmáticos y que seguramente existen diferentes movilizaciones y señalamientos de Ca²⁺ disparados para cada una de estas isoformas, las cuales pueden tener propiedades, características, modulaciones y trabajos concretos, relacionados principalmente con la actividad eléctrica axonal y la conducción del impulso nervioso.

Localización del IP₃R1 e IP₃R2 en el núcleo de las células de Schwann

Un resultado muy interesante es que tanto el IP₃R1 como el IP₃R2 se localizan en los núcleos de las CSFM. Este resultado se correlaciona con los depósitos de Ca²⁺ observados con la tinción de rojo de alizarina en el núcleo de las células de Schwann, sugiriendo que la presencia de depósitos de Ca²⁺ en el núcleo. En muchas células de mamífero se ha descrito la presencia de membrana tubular nuclear (Fricker et al., 1997) también denominado retículo nucleoplásmico (RN) (Gerasimenko et al., 1995). La movilización de Ca²⁺ efectuada por estos receptores en el núcleo tiene diferentes funciones en la célula; por ejemplo, transcripción de genes, la síntesis de ADN, la reparación del ADN y el rompimiento de la envoltura nuclear (Humbert et al., 1996).

Por otra parte, Echevarría et al., (2003) mostraron que la liberación de Ca²⁺ en el RN de la línea celular de hígado HepG2 ocasiona que la PKC del núcleo se transloque a la región de la envoltura nuclear, mientras que la activación de señales de calcio en el citoplasma induce a que la PKC citoplasmática sea translocada a la membrana plasmática. Estos hallazgos sugieren que los mecanismos intracelulares de señalamiento de Ca²⁺ son independientes. En este sentido, es

probable que en las CSFM, la localización de los IP₃Rs en el núcleo y el señalamiento de Ca²⁺ efectuado a través de estos receptores cumpla funciones que aún son desconocidas. La distribución subcelular de los IP₃R se ha descrito como dinámica, y que cambia de acuerdo con el estado fisiológico de la célula (Vermassen et al., 2004). También se ha mostrado que el Ca²⁺ intracelular que actúa en el citoplasma y en el núcleo estimula la expresión génica a través de diferentes vías (Hardingham et al., 1997; Leite et al., 2003). Las propiedades espaciales de las señales de Ca²⁺ son determinantes importantes del tipo de respuesta transcripcional que se lleva a cabo. Las vías de señalización activadas por Ca²⁺ citoplásmico actúan a través del elemento de respuesta a suero (SER), mientras que el Ca²⁺ nuclear controla la expresión génica a través del elemento de respuesta a AMPc (CRE) (Hardingham et al., 1997; Leite et al., 2003). Por lo tanto, la presencia de IP₃R1 e IP₃R2 en el núcleo y en el citoplasma sugiere que estos receptores deben desempeñar papeles diferentes en cada compartimento celular.

La presencia de la maquinaria de señalización de Ca²⁺ en el núcleo tiene diferentes implicaciones. La primera es que diversos procesos intranucleares requieren de la presencia de Ca²⁺; por ejemplo, la transcripción de genes mediada por el elemento de respuesta a AMPc (CRE) (Hardingham et al., 1997). La proteína de enlace a CRE (CREB) o la proteína de enlace a CREB (CBP) dependen específicamente de incrementos en la [Ca²⁺]_i nuclear. La activación de Elk-1 por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) también depende de Ca²⁺ nuclear. Además el Ca²⁺ se puede unir y regular directamente ciertos factores de transcripción (Carrion et al., 1999) y puede también afectar la estructura del ADN (Dobi y Agoston, 1998). Los mecanismos de señalización de Ca²⁺ que modulan estos procesos celulares pueden ser regulados sin la co-activación de señales de Ca²⁺ del citoplasma (Echevarría et al., 2003).

6.3 LOCALIZACIÓN DE LOS RNAm DE LOS RyRs EN EL NERVIÓ CIÁTICO NORMAL MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Los estudios que realizamos mediante hibridación *in situ* muestran que las 3 isoformas de los RyRs, se localizan en el citoplasma perinuclear de las CSFM, y a lo largo de la red citoplasmática de la membrana abaxonal, así como en el citoplasma próximo a los nodos de Ranvier y en la región nodal. Cuando se llevaron a cabo *in situ*-inmunohistoquímicas contra GFAP se encontró que las 3 isoformas de los RyRs se localizan en las CSNFM. La expresión de los RNAm de los RyRs en la red citoplasmática y en la región nodal sugiere la translocación de RNAm a través de la red microtubular permitiendo la síntesis de proteína nueva en los compartimentos subcelulares adecuados a través de polisomas libres espacialmente localizados dentro de la célula (Court et al., 2004; Ainger et al., 1997)

Estudios preliminares hechos en el laboratorio con anticuerpos específicos para cada una de las isoformas de los RyRs muestran que las tres isoformas de los RyRs se localizan en ambos tipos de células de Schwann y en principio, las tres isoformas de los RyRs tienen el mismo patrón de localización al encontrado mediante las hibridaciones *in situ*.

Los resultados obtenidos con los RyRs sugieren que tanto los mecanismos como las señales necesarias para activar a estos receptores se encuentran presentes en las células de Schwann. En la membrana plasmática abaxonal próxima a los nodos de Ranvier se encuentran canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L y tipo T, aunque la expresión de estos canales es regulada aparentemente por señales del axón (Baker, 2002). También hay receptores purinérgicos P2X₇, los cuales al ser activados producen incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de esta región (Grafe et al., 1999) y esta movilización de calcio puede ser mediada por los RyRs (Lev-Ram y Ellisman, 1995). El papel funcional de estos RyRs en las células de Schwann y los axones, así como en la posible comunicación que pueda existir entre estas células es desconocido. Sin embargo, diferentes estudios tanto en el SNC como en el SNP sugieren que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediados tanto por los IP₃Rs como por los RyRs en las células gliales regula la actividad nerviosa (Anselin et al., 1997; Robitaille, 1995, Robitaille et al., 1997; Stevens y Fields, 2000; Parpura y Haydon, 2000). Es posible también que el señalamiento de Ca^{2+} mediado por RyRs cumpla funciones diferentes a la de los IP₃Rs debido a que las formas de activación de ambas familias de receptores de Ca^{2+} son distintas. También se ha sugerido que la movilización de Ca^{2+} producida por los IP₃Rs puede ser amplificada por los RyRs generándose de esta manera ondas intracelulares o intercelulares de Ca^{2+} (Berridge et al., 2000), las cuales pueden tener diferentes significados y funcionalidades en la interacción célula de Schwann-axón.

6.4 EXPRESIÓN DE LOS RNAm DE LOS IP₃Rs Y DE LOS RyRs DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA

Expresión de los RNAm de los IP₃Rs

Los resultados de nuestro estudio de RT-PCR semi-cuantitativa para los IP₃Rs durante la degeneración Walleriana muestran que no hay diferencias significativas en el nivel de expresión a los diferentes tiempos investigados tanto en lesiones por transección como por compresión (Fig. 23 y 24). Además como se esperaba, los resultados con los nervios contralaterales tampoco muestran cambios significativos en el nivel de expresión de los IP₃Rs.

Por otra parte, estos estudios son a nivel de RNAm, sugiriendo la probabilidad de que a nivel de proteína el comportamiento de los IP₃Rs sea diferente ya que estos receptores cuentan con un amplio repertorio de proteínas accesorias que los pueden modular y regular de acuerdo a los

requerimientos fisiológicos celulares. Por otro lado, la amortiguación del Ca^{2+} puede alterar la amplitud y duración de la señal de Ca^{2+} . Las proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} como la parvalbúmina, la calbindina- $\text{D}_{28\text{k}}$ y la calretinina también limitan la expansión espacial y de manera local las señales de Ca^{2+} . Esto es particularmente interesante en las neuronas, ya que confinan de manera importante la señal de Ca^{2+} a las sinapsis (Berridge et al., 2000; Pozzan et al., 1994).

A pesar de que los IP_3Rs se encuentran en mayor cantidad que los RyRs en las células de Schwann, es posible que las diferentes isoformas de los RyRs tengan una participación más significativa durante la degeneración Walleriana del nervio ciático de la rata. Por ejemplo, se ha reportado que aunque en el núcleo supraquiasmático los IP_3Rs son 8 veces más abundantes que los RyRs , sólo la expresión del RyR2 mostró una variación temporal significativa (Díaz-Muñoz et al., 1999). También, estudios realizados en neuronas del ganglio simpático muestran que a pesar de que la relación $\text{IP}_3\text{R/RyR}$ es cercana a 6, la activación de los RyR es capaz de contribuir con cerca del 40% del total del señalamiento de Ca^{2+} citoplasmático (Hernández-Cruz et al., 1995). Por lo tanto, se decidió estudiar de la misma forma que con los IP_3Rs , la expresión de los isoformas de RyR durante la degeneración Walleriana mediante RT-PCR cuantitativa.

Expresión de los RNAm de los RyRs

Los estudios de amplificación realizados con las diferentes isoformas de los RyRs durante la degeneración Walleriana ocasionada por transección del nervio ciático de la rata muestran resultados muy interesantes. En primer lugar la isoforma más abundante en el nervio ciático, el RyR1 no muestra cambios significativos en el nivel de expresión tanto en el muñón proximal como en el muñón distal (Fig. 31 I A y C). Con el RyR2 , las amplificaciones en el muñón proximal no muestran cambios significativos en el nivel de expresión a los diferentes días de lesión monitoreados (Fig. 31 II), mientras que en el muñón distal se puede apreciar un cambio moderado en el nivel de expresión. Este cambio de expresión es a la baja y comienza a partir del primer día y se sostiene hasta el día 30 posterior a la lesión (Fig. 31 II C). Por último, las amplificaciones realizadas con el RyR3 también muestran cambios moderados en el nivel de expresión y en este caso es en el muñón proximal donde los niveles de expresión inicialmente van a la baja y conforme avanza el estado de degeneración del nervio ciático estos niveles de expresión gradualmente llegan a un estado similar al que se observa en condiciones normales (Fig. 31 III A). Por otra parte, el muñón distal no presenta cambios significativos en el nivel de expresión del RyR3 a los diferentes tiempos de estudio establecidos (Fig. 31 III C).

Los resultados con el RyR1 presentan un comportamiento similar al encontrado con los IP_3Rs ; es decir, no cambian los niveles de expresión en el nervio ciático durante la degeneración Walleriana.

Sin embargo, la activación de este receptor, el cual es el principal actor para que se lleve a cabo la contracción del músculo esquelético, es a través de una relación mecánica con los receptores de dihidropiridinas (DHPRs). Estos datos sugieren que las células de Schwann o los axones expresan DHPRs en la membrana plasmática, para que pueda ser realizada la liberación de Ca^{2+} . En cultivos de células de Schwann ha sido reportada la presencia de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje de tipo L y de tipo T (Baker, 2002). Sin embargo, el mecanismo de activación del RyR1 en las células de Schwann es desconocido, probablemente el RyR1 es activado por el proceso de "liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} " (CICR) de manera similar a la llevada a cabo por el músculo cardíaco, neuronas u otro tipo de células no eléctricamente excitables.

Los resultados obtenidos con el RyR2 y el RyR3 sugieren una participación directa de estos receptores durante la degeneración Walleriana del nervio ciático de la rata e indican cambios discretos en la expresión de estas 2 isoformas de los RyRs, las cuales son activadas por el proceso de CICR, apuntando a que este proceso de liberación de Ca^{2+} está activo en las células de Schwann y los axones.

Los estudios realizados por Smith et al. (1985 y 1988) sugieren que un exceso en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células de Schwann puede ser perjudicial ya que induce la vesiculación de la mielina en los paranodos y las incisuras de Schmidt-Lanterman, invadiendo rápidamente regiones de mielina compacta. Dado que durante la degeneración Walleriana se lleva a cabo la degradación de la mielina, se pensó que los RyRs estaban involucrados en la desmielinización del sistema y por lo tanto los niveles de expresión deberían de incrementarse. Curiosamente, contrario a lo que se esperaba, tanto el RyR2 como el RyR3 tienen una expresión a la baja durante la lesión por transección. Una posibilidad es que el proceso de CICR y las señales de Ca^{2+} producidas por los IP_3Rs y los RyRs puedan tener efectos nocivos para la homeostasis del sistema, al generar amplificaciones del señalamiento de Ca^{2+} , a través de los VOCCs en la membrana plasmática de las células de Schwann y el axoplasma. Thorell et al. (2002) en un modelo *in vitro* de lesión en columna vertebral de la rata, sugieren que incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la lesión, puede tener efectos dañinos en las células de la médula espinal y que dichos efectos pueden ser mediados por los RyRs e IP_3Rs . De esta manera, una regulación a la baja de los RyRs mantiene una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ adecuada para que no sean producidos efectos nocivos a las células y al sistema en general, ya que la lesión producida afecta de manera global a todo un entorno el cual tiene que dar una respuesta inmediata a la desregulación ocasionada al sistema y establecer el funcionamiento correcto y fisiológico de las células.

Por otra parte, los cambios en la expresión del RyR2 e RyR3 se observan en diferentes muñones. El RyR2 presenta una disminución constante y permanente en el nivel de expresión en el muñón distal, sugiriendo que esta isoforma tiene una función de modulación de Ca^{2+} en las células de Schwann “denervadas” ya que es en este muñón donde se lleva a cabo la degeneración de la mielina y de los axones, la desdiferenciación y proliferación de las células de Schwann. Este resultado sugiere la expresión de los RyR2 en las células de Schwann tenga una estrecha relación con el axón para tener un comportamiento y una función adecuada. En cultivos organotípicos de ganglios de la raíz dorsal de ratón, las células de Schwann sólo expresan los canales de Ca^{2+} tipo L y tipo T si las neuronas del ganglio están presentes, sugiriendo que las neuronas inducen la expresión de VOCCs en las células de Schwann (Sontheimer, 1994). De esta forma, el sistema axón-célula de Schwann puede estar estableciendo complejas relaciones funcionales y de comunicación celular.

En el caso del RyR3, se aprecia una disminución en el nivel de expresión de este receptor en el muñón proximal, el cual paulatinamente se incrementa hasta llegar a un nivel de expresión similar al presentado en condiciones normales. Inicialmente, el muñón proximal muestra signos de degeneración axonal, asociado con la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular ocasionada principalmente por cromatólisis (Mata et al., 1986; Bisby, 1995) y por la degradación de mielina a través de la activación de proteasas activadas por Ca^{2+} (Schlaepfer y Micko, 1979; Bisby, 1995). Sin embargo, esta degeneración no es abundante y no llega a extenderse del sitio de la lesión (Ramón y Cajal, 1928). Posteriormente comienzan a desarrollarse conos de crecimiento y ramificaciones axonales con el objetivo de establecer contacto con la región distal, donde una vez dadas las condiciones y señales adecuadas, las células de Schwann comienzan a mielinizar los axones y finalmente a establecer contacto con el tejido blanco.

Los resultados obtenidos para el RyR3, sugieren que la movilización Ca^{2+} mediada por ellos, depende de la asociación entre los axones y las células de Schwann, así como el contacto con el tejido blanco. Al ser cortado el nervio, los axones pierden el contacto con el tejido que inervan, las neuronas que sobreviven a la lesión generan conos de crecimiento y proyecciones axonales. De esta forma los axones entran a un “estado de crecimiento”, el cual es totalmente diferente del que tienen en condiciones normales el cual es un “estado de conducción”. La expresión a la baja del RyR3 puede ser el reflejo de la pérdida de ese estado de conducción donde el muñón proximal pierde contacto con el tejido blanco. Acorde con la progresión de la lesión el muñón proximal extiende proyecciones axonales con el objetivo de alcanzar el muñón distal y reestablecer el funcionamiento del nervio, aunque esto no se logre en el modelo de transección nerviosa. Sin embargo, en el sitio de unión del muñón proximal al músculo (que evita la regeneración del nervio)

se genera una fuerte inervación de los axones al músculo, aunque éste no sea su tejido blanco. Esto explicaría que la expresión del RyR3 nuevamente se incremente a un nivel similar al encontrado en condiciones normales.

6.5 INMUNO-LOCALIZACIÓN DE LOS IP₃Rs DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA

Nuestros resultados sugieren que en la porción proximal del nervio lesionado por compresión la expresión de los IP₃Rs mantiene una inmuno-localización similar a la encontrada en el nervio ciático normal. La presencia de nodos de Ranvier en la porción proximal sugiere que las fibras de esta región mantienen un orden estructural, ya que sólo las partes estrechamente cercanas a la lesión muestran signos de degeneración, la cual está asociada con la entrada de Ca²⁺ del espacio extracelular y la activación de proteasas activadas por Ca²⁺ (Schlaepfer y Micko, 1979; Bisby, 1995). Los estudios del análisis proteómico del patrón de regulación de proteínas en nervios ciáticos de rata lesionados por compresión muestran que los segmentos proximales después de 5 días de realizada la lesión, no presentan diferencias significativas de expresión en comparación con el nervio contralateral, mientras que los cambios en el nivel de regulación de proteínas sólo se presentan en la región distal (Jiménez et al., 2005). Esto sugiere que la presencia del axón o señales asociadas al axón establecen la presencia adecuada de una gran cantidad de proteínas en las células de Schwann.

En estudios recientes realizados por Jiménez et al. (2005), se muestra que hay una dinámica de regulación de proteínas durante la regeneración del nervio ciático. Esta investigación a través de proteómica muestra perfiles de proteínas en el nervio ciático de la rata después de una lesión por compresión a 5, 10 y 30 días. Mediante el análisis de agrupación encontraron 2 perfiles regulados a la baja y 4 sobre regulados. Las proteínas metabólicas se encuentran relativamente en altos niveles en los perfiles regulados a la baja, mientras que las proteínas de fase aguda, proteínas de reorganización del citoesqueleto y proteínas involucradas con maduración y degradación del metabolismo de lípidos se encuentran en altos niveles en los perfiles de sobre-expresión. Este estudio muestra los complejos procesos que se llevan a cabo en el nervio ciático tanto en el aspecto temporal como en el de expresión de proteínas, indicando la estrecha relación de eventos que se llevan a cabo durante la regeneración nerviosa así como los tiempos en los que son requeridos diferentes determinantes moleculares de los axones, de las células de Schwann y de la respuesta inflamatoria (Jiménez et al., 2005).

Inmuno-localización de los IP₃Rs en el citoplasma de las células de Schwann “denervadas”

En la porción distal se observa que las 3 isoformas de los IP₃Rs presentan cambios de distribución, los cuales son ocasionados por la disrupción de la mielina y la formación de los elipsoides así como por la extensión del citoplasma de las células de Schwann “denervadas”, lo que sugiere cambios abruptos del citoesqueleto celular. Los cambios de distribución de estos receptores sugieren que señales provenientes del axón son requeridas para que los IP₃Rs se localicen en los microdominios anatómicos particulares descritos en condiciones normales. En etapas iniciales de la degeneración Walleriana las células de Schwann que sobreviven a la lesión se desdiferencian y comienzan a proliferar, aunque no hay una evidencia clara sobre qué tipo de célula de Schwann se desdiferencia primero, las CSNFM o las CSFM. De esta manera, se ha sugerido que las células de diámetros pequeños degradan la mielina y restos celulares más rápido que las de diámetros grandes (Ramón y Cajal, 1928). No obstante, sin importar el calibre de la fibra nerviosa los IP₃Rs se localizan en el citoplasma de las células de Schwann “denervadas”, puesto que en las fibras de calibres “grandes” que contienen numerosos elipsoides la expresión se encuentra entre el citoplasma que empieza a generarse entre ellos y principalmente alrededor del núcleo.

La localización de los IP₃Rs en las células de Schwann “denervadas” sugiere que hay un re-arreglo del citoplasma de estas células, modificándose la estructura y forma que conlleva cambios en el citoesqueleto, sugiriendo que los IP₃Rs se encuentran asociados a proteínas adaptadoras que se enlazan al citoesqueleto.

La secuencia de aminoácidos 2548-2558 dentro de la región M5-M6, del segundo subdominio del fragmento V del IP₃R1, se ha reportado que puede enlazarse a Ank. Esta secuencia se sobrepone parcialmente a la región del filtro de selectividad del IP₃R1 y se desconoce si la Ank es físicamente capaz de asociarse con ese motivo. Sin embargo, en cardiomiocitos de ratones “knockout” de Ank_B se presentan desarreglos en la localización y estabilidad del IP₃R1, sugiriendo que la relación IP₃R1-Ank es fisiológicamente importante (Mohler et al., 2004).

Por otro lado, se ha descrito que el IP₃R1 se relaciona con la proteína de enlace al citoesqueleto de actina neuronal 4.1N y que esta unión es importante para la traslocación y localización del IP₃R1 del RE en dominios de la membrana plasmática específicos, sugiriendo que es importante para el señalamiento de Ca²⁺ tanto en neuronas como en células epiteliales MDCK (Zhang et al., 2003; Maximov et al., 2003).

Los factores celulares responsables de determinar la localización precisa intracelular de los IP₃Rs en células normales aún son desconocidos. Sin embargo, dados los cambios de distribución de los IP₃Rs durante la degeneración y regeneración nerviosa, es probable que los IP₃Rs se encuentren asociados con diferentes proteínas adaptadoras del citoesqueleto involucradas con el re-arreglo del citoplasma en las células de Schwann.

Inmuno-localización de los IP₃Rs en los núcleos de las células de Schwann “denervadas”

La lesión por compresión en los nervios periféricos induce el proceso de degeneración Walleriana y la regeneración nerviosa. Este proceso se lleva a cabo en aproximadamente 4 semanas en la rata. Para que se lleve a cabo, se requiere que diferentes eventos celulares ocurran de manera simultánea. En las 2 primeras semanas los axones y la mielina tienen que ser degradados; desde el segundo día de lesión, las células de Schwann “denervadas” entran en proliferación alcanzando un pico entre los 4-7 días. Al tercer-cuarto día, el sitio de la lesión comienza a ser infiltrado por macrófagos, alcanzando un pico al día 7. La regeneración axonal comienza entre el segundo y quinto día después de la lesión, en este periodo se observan las primeras proyecciones axonales cruzar el límite distal del sitio de la lesión y la re-mielinización ocurre en la primera y segunda semana después de realizada la lesión (Jiménez et al., 2005).

La inmuno-localización de los IP₃Rs en los núcleos de las células de Schwann sugiere que estos receptores de Ca²⁺ intracelular pueden estar formando agrupaciones en el RN y que la movilización y señalamiento de Ca²⁺ al interior del núcleo puede estar desempeñando un papel importante en la transcripción de genes. En el caso particular de las células de Schwann “denervadas” estos deben estar relacionados con el crecimiento y la maduración así como el metabolismo de lípidos, con la activación de señales de fase aguda o de respuesta inflamatoria (Jiménez et al., 2005) y con la re-mielinización.

Los resultados muestran un intenso inmuno-marcaje del IP₃R1 e IP₃R2 en el núcleo de las células de Schwann “denervadas”, desde los primeros días de realizada la lesión hasta los 20 días. Esto hace complicada una posible determinación sobre su desempeño en alguno de los eventos celulares previamente señalados. No obstante se puede apreciar un cambio con el IP₃R2 en donde el marcaje se observa como gruesos gránulos, pero a los 15 días de realizada la lesión se extiende a todo el nucleoplasma. Con el IP₃R3, el núcleo no se marca ni en condiciones normales ni en los primeros días de la lesión. Sin embargo, se aprecia la expresión de esta isoforma en los núcleos de las células de Schwann “denervadas” a los 15 y 20 días de lesión (aunque el marcaje es discreto en comparación con el de las otras 2 isoformas). La expresión del IP₃R2 y del IP₃R3 coincide con

etapas de re-mielinización, puesto que las proyecciones axonales ya han invadido la región distal de la lesión, con el objetivo de re-establecer la funcionalidad nerviosa.

El significado fisiológico de la expresión de los IP₃Rs en el núcleo de las células de Schwann “denervadas” es desconocido. Sin embargo, sugiere que los IP₃Rs y la movilización de Ca²⁺ a través de estos receptores se encuentran estrechamente asociada a la activación de factores de transcripción estrechamente relacionados con la proliferación y la mielinización. Por otro lado, la expresión de los IP₃Rs en el núcleo también sugiere el establecimiento de microdominios de movilización y señalización de Ca²⁺, en donde las propiedades funcionales de cada una de las isoformas de los IP₃Rs genera movilización de Ca²⁺ con características particulares. No obstante, se desconoce si señalamientos de Ca²⁺ intranuclear pueden tener efectos sobre la transcripción de genes relacionados con la re-mielinización, para lo cual es necesario dirigir otro tipo de estudios.

Por otra parte, durante la re-mielinización (20 días) se aprecia marcaje del los IP₃Rs a lo largo de todo el citoplasma de las células de Schwann “denervadas”, las cuales se extienden sobre el axón y lo comienzan a envolver (McDonal et al., 2006). Las señales que dirigen este proceso son desconocidas pero involucran directamente al diámetro del axón (Berthold y Rydmark, 1995). La expresión de los IP₃Rs en el citoplasma de las células de Schwann “denervadas” que envuelven a las extensiones axonales sugiere que los IP₃Rs y la movilización de Ca²⁺ a través de estos receptores se encuentra involucrada con el re-establecimiento adecuado de la relación axón-célula de Schwann. Sin embargo, se requiere de un mayor número de experimentos para establecer el funcionamiento de los IP₃Rs durante el contacto axonal. Por otro lado, no realizamos un seguimiento del patrón de distribución del IP₃Rs en días posteriores a los 20 días de lesión, donde el nervio se reestablece, aunque sugerimos por los datos obtenidos a los 20 días donde es posible observar el re-establecimiento del complejo nodal que la expresión de los IP₃R regresa a su patrón normal de expresión.

El manejo del nervio lesionado es muy complicado ya que fácilmente se pierden las marcas del sitio de la lesión y con esto se obtienen mezclas de fibras nerviosas de las diferentes regiones producto de la lesión. También se produce un exceso de matriz extracelular que impide un manejo y separación de las fibras nerviosas. Estos problemas técnicos son una limitante en la mayoría de los trabajos que se realizan para estudiar la degeneración Walleriana. Sin embargo, es posible mejorar las técnicas de separación de regiones de lesión así como de fibras nerviosas para poder determinar con precisión la localización de las proteínas en estudio.

Los resultados de la expresión de los IP₃Rs obtenidos mediante RT-PCR muestran que no hay cambios en el nivel de expresión durante la degeneración Walleriana tanto en la porción proximal como en la distal. Pero, mediante estudios realizados con inmunohistoquímica se puede observar que hay un cambio en el patrón de distribución de los IP₃Rs. Estos resultados sugieren que el patrón de distribución de los IP₃Rs encontrado durante la degeneración Wallerian es reflejo de la reorganización del citoesqueleto producto de la pérdida axonal y la desdiferenciación de las células de Schwann, donde los procesos de degradación de la mielina y proliferación celular establecen una pérdida de la polaridad celular.

6.6 ASPECTOS FUNCIONALES DE LA EXPRESIÓN DE LOS IP₃Rs Y LOS RyRs EN LAS CÉLULAS DE SCHWANN

Las células de Schwann que forman mielina son unos de los principales componentes gliales en el SNP y su funcionamiento típicamente se ha caracterizado como aislante de los axones permitiendo que la conducción del potencial de acción sea saltatoria, brindando una transmisión del impulso nervioso rápido y eficaz. De esta manera la expresión, distribución y funcionamiento de los IP₃Rs y RyRs a lo largo de las redes citoplasmáticas y en los nodos de Ranvier resulta intrigante. En las fibras amielínicas, la función de estos receptores es desconocida, aunque nuestros estudios sugieren que hay una localización diferencial de los IP₃Rs en estas células, ya que el IP₃R1 y el IP₃R2 tienen bajos niveles de inmuno-marcaje siendo principalmente como punteado a lo largo de las células, en tanto el IP₃R3 tiene altos niveles de expresión y presenta un marcaje fibrilar. Por otro lado, con los RyRs las tres isoformas se expresan en las CSNFM. Nuestro trabajo sugiere que la movilización de Ca²⁺ mediada tanto por los IP₃Rs como por los RyRs esta desempeñando un papel similar al efectuado por los astrocitos del SCN y las CSP, en donde se ha demostrado que el señalamiento de Ca²⁺ desempeña un papel relevante en la comunicación, modulación y regulación de las células gliales y las neuronas (Fields y Stevens, 2002; Miller, 2005).

La presencia de los IP₃Rs y los RyRs en el complejo nodal sugiere un funcionamiento muy particular de estos receptores de Ca²⁺, indicando que la movilización de Ca²⁺ llevada a cabo por estos receptores puede estar jugando un papel importante durante la conducción del impulso nervioso.

Los complejos nodales, como se ha mencionado con anterioridad, poseen muchos de los elementos para efectuar señalamiento a través de Ca²⁺. Dentro del amplio repertorio de proteínas relacionadas con el señalamiento de Ca²⁺, tienen la presencia de: canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo L (Ca_v1.2 y Ca_v1.3 (Ouardouz et al., 2003) y tipo T (Baker, 2002), receptores purinérgicos ionotrópicos (P2X₇) (Grafe et al., 1999), receptores purinérgicos metabotrópicos (P2Y1) (Toews et al., 2007), Cx32 (Chandross et al., 1996; Toews et al., 2007) conexina 29 (Cx29)

(Altevogt et al., 2002; Corfas et al., 2004), la bomba ATPasa de Ca^{2+} (PMCA) (Mata y Fink, 1989) y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Steffenssen et al., 1997)

Una de las propuestas para explicar esto, sugiere que a lo largo de los axones pueden ser liberadas moléculas neurotransmisoras o co-transmisoras como el ATP (Jahromi et al., 1992). La posibilidad de liberación de neurotransmisores por parte de las células de Schwann o los axones debe ser considerada, aunque a lo largo del nervio ciático un probable origen neuronal para la liberación de neurotransmisores es poco probable. En CSP en cultivo la aplicación local de acetilcolina y ATP, en ausencia de Ca^{2+} extracelular en el medio, produce actividad transitoria de Ca^{2+} (Jahromi et al., 1992). En nervio óptico de rata se demostró que los axones pueden activar señales transitorias de Ca^{2+} en las células gliales. La activación de señales transitorias de Ca^{2+} en la glía fue ocasionada por la activación dependiente de glutamato, por ATP y por la actividad axonal (Kriegler y Chiu, 1993).

Otra de las propuestas está estrechamente relacionada con el amortiguamiento de K^+ , producido durante la actividad axonal prolongada (Horio, 2001; Baker, 2002; Barres et al., 1990; Chiu, 1991; Lev-Ram y Ellisman, 1995; Mi et al., 1995; Mi et al., 1996; Mi et al., 1999). La elevación de K^+ en el axolema yuxtaparanodal puede despolarizar el axolema de la región nodal adyacente e inactivar los canales de Na^+ , produciendo una reducción en la corriente de entrada del Na^+ en el axolema nodal. El impacto general del proceso generaría un incremento en el umbral del potencial de acción y una reducción en la velocidad de conducción del impulso nervioso (Lev-Ram y Ellisman, 1995). La hipótesis de amortiguamiento de K^+ , sugiere que el exceso de K^+ producido por el axón durante el potencial de acción (que llegaría a alcanzar concentraciones de 9 mM en la región yuxtaparanodal), despolariza a las membranas adaxonal y abaxonal próximas a los nodos de Ranvier de la CSFM, permitiendo la entrada de Ca^{2+} extracelular a través los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOCCs) de la membrana plasmática. El Ca^{2+} puede activar diferentes procesos intracelulares y un incremento local de Ca^{2+} en la célula puede disparar el ensamblaje del citoesqueleto de actina (Verbny et al., 2002) sugiriendo que el Ca^{2+} intracelular puede modificar el citoesqueleto, generando bolsas citoplasmáticas paranodales. Por otro lado, la acumulación de K^+ en el espacio yuxtaparanodal es amortiguada debido a la entrada de este ión a los espacios citoplasmáticos nodales de las CSFM, con la finalidad de mantener una osmolaridad adecuada. A estos espacios citoplasmáticos también entran Cl^- y H_2O , generándose de esta manera una amortiguación de K^+ en el complejo nodal.

En las células de Schwann, se desconoce si los factores de transcripción que se encuentran relacionados con la mielinización dependan o sean activados mediante señalización de Ca^{2+} . Por

otro lado, también se desconoce si durante los diferentes procesos celulares que conlleva la degeneración Walleriana, como son la regulación a la baja de genes relacionados con la mielina, la desdiferenciación y proliferación celular, la muerte celular, la extensión axonal, re-mielinización, el establecimiento de las nuevas regiones nodales, entre otros, sean regulados, modulados o controlados por señalización de Ca^{2+} . Sin embargo, nuestros resultados mediante RT-PCR semicuantitativa del nivel de expresión de los IP_3Rs y RyRs sugieren que en las células de Schwann tanto en condiciones normales como durante la degeneración Walleriana, la expresión de estos receptores de Ca^{2+} intracelulares y la movilización de Ca^{2+} a través de ellos se encuentra altamente regulada ya que no se presentan cambios abruptos en los niveles de expresión que indiquen una movilización masiva o atenuada de Ca^{2+} en alguno de los procesos celulares antes citados.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Expresión de los IP₃Rs en el nervio ciático en condiciones normales a nivel de RNAm:

- 1 En el nervio ciático de la rata se expresan todas las tres isoformas de los IP₃Rs.
- 2 El RNAm del IP₃R3 es la isoforma con mayor nivel de expresión en el nervio ciático en comparación con las otras isoformas de los IP₃Rs y con otros tejidos estudiados.

Localización de los IP₃Rs en el nervio ciático en condiciones normales a nivel de Proteína:

- 3 Las tres isoformas de los IP₃Rs se distribuyen en el nervio ciático de la rata y muestran un patrón diferencial de localización.
- 4 Las tres isoformas del IP₃Rs se expresan en las CSFM. Los IP₃Rs están presentes en el citoplasma perinuclear y redes citoplasmáticas de las células de Schwann. El IP₃R1 se localiza también en las incisuras de Schmidt-Lanterman. El IP₃R1 y el IP₃R2 se localizan en los núcleos de las células de Schwann en forma de gránulos, mientras que el IP₃R3 no se localiza en los núcleos.
- 5 Las tres isoformas del IP₃R se localizan en los nodos de Ranvier del nervio ciático. IP₃R1 se agrupa en los nodos de manera semejante a los canales de sodio Nav_v1.6. El IP₃R2 se aprecia en la membrana abaxonal próxima a los nodos de Ranvier y en los procesos canaliculares, semejante a lo reportado con los canales de potasio Kv1.5 y el IP₃R3 se encuentra en las regiones paranodales de los nodos.
- 6 Las tres isoformas de los IP₃Rs se localizan en las CSNFM en el nervio ciático. El IP₃R3 tiene un fuerte marcaje filamentosos, mientras que el IP₃R1 y el IP₃R2 muestran un marcaje en forma de puntos usando microscopia de fluorescencia.

Localización de los RyRs en el nervio ciático en condiciones normales a nivel de RNAm:

- 7 En el nervio ciático de la rata se expresan todas las isoformas de los RyRs.
- 8 El RNAm del RyR1 es la isoforma con mayor nivel de expresión en el nervio ciático en comparación con las otras isoformas de los RyR.

9 Las tres isoformas de los RyRs se expresan a nivel de RNAm tanto en CSFM como en CSNFM en el nervio ciático de la rata. En las CSFM el RNAm se observa en el citoplasma perinuclear, a lo largo de la red citoplasmática abaxonal, en el citoplasma próximo a los nodos de Ranvier y en la región nodal.

Expresión de los IP₃Rs y de los RyRs en el nervio ciático durante la degeneración Walleriana a nivel de RNA:

10 El análisis de la RT-PCR semicuantitativa mediante densitometría indica que los IP₃Rs no muestran diferencias significativas a nivel de RNAm durante la degeneración Walleriana, tanto en lesiones por transección como por compresión. Los nervios contralaterales tampoco presentan cambios significativos en su nivel de expresión. 11 El RyR1 no muestran cambios a nivel de RNAm en lesiones por transección del nervio ciático de la rata a los diferentes tiempos estudiados. La expresión de los RNAm del RyR2 en el muñón distal disminuye a partir del primer día de lesión y se sostiene hasta el día 30 posterior a la lesión. La expresión del RNAm del RyR3 muestra una moderada disminución en la expresión en el muñón proximal, donde inicialmente se regula a la baja y conforme avanza el tiempo de degeneración Walleriana los niveles de expresión aumentan gradualmente hasta alcanzar los niveles normales.

Localización de los IP₃Rs en el nervio ciático durante la degeneración Walleriana a nivel de proteína:

12 En lesiones por compresión las tres isoformas de los IP₃Rs no presentan cambios en el patrón de distribución en la región proximal. 13 En lesiones por compresión las tres isoformas de los IP₃Rs muestran cambios en el patrón de distribución en la región distal. Los IP₃Rs se localizan a lo largo del citoplasma de las células de Schwann "denervadas".

14 En lesiones por compresión las tres isoformas de los IP₃Rs se localizan en los núcleos de las células de Schwann "denervadas". El IP₃R1 y el IP₃R2 se inmuno-localizan como gránulos desde el inicio de la degeneración Walleriana hasta las etapas de regeneración nerviosa. A los 15 días de ocasionada la lesión, el marcaje del IP₃R2 se observa a lo largo de todo el nucleoplasma. El IP₃R3 se localiza como un punteado discreto en los núcleos a los 15 y 20 días de generada la lesión.

ANEXO

El siguiente, es el artículo publicado en la revista NeuroReport Vol. 18 No 5 del 26 de Marzo del 2007, en el cual se exponen los resultados de la localización y distribución inmunohistoquímica de los IP₃Rs en el nervio ciático en condiciones normales. En este trabajo de tesis doctoral se muestran resultados de la expresión y distribución de los IP₃Rs durante la degeneración Walleriana así como resultados de la localización y expresión de los RyRs, tanto en condiciones normales como durante la degeneración Walleriana del nervio ciático de la rata. Con estos resultados se pretende generar al menos dos publicaciones más.

Expression of IP₃ receptor isoforms at the nodes of Ranvier in rat sciatic nerve

Alejandro Martínez-Gómez and Myrna A.R. Dent

Laboratory of Neuroscience, School of Medicine, Autonomous University of the State of Mexico (UAEMex), Toluca Edo. de Mexico, Mexico

Correspondence to Dr Myrna A.R. Dent, Fac. Medicina, UAEMex, Apartado Postal 428, Toluca, Edo. de México, México CP 50000
Tel: + 5255 722 173552 (ext 222); fax: + 5255 722 2174142; e-mail: md@uaemex.mx

Received 31 October 2006; accepted 17 December 2006

Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP₃R) are modulated by the second messenger IP₃, which induces intracellular calcium release. Using immunohistochemical techniques, we show that the three isoforms are expressed in sciatic nerve. IP₃R1 and IP₃R2 are mainly present in the nucleus of Schwann cells. IP₃R1 is also expressed in Schmidt-Lanterman incisures. IP₃R3 is primarily localized at very high levels in nonmyelinating Schwann cells. Interestingly, the three

isoforms are expressed at the nodes of Ranvier. IP₃R1 is clustered at the node of Ranvier, in a distribution that is similar to the Na_v1.6 sodium channels in the sciatic nerve. IP₃R3 is present in the paranodal regions of the nodes. IP₃R2 is concentrated in the vicinity of the node, and the outer Schwann cell cytoplasm similar to the Kvl.5 potassium channel. *NeuroReport* 18:447–450 © 2007 Lippincott Williams & Wilkins.

Keywords: calcium channel receptors, sciatic nerve, Schwann cells, nucleus

Introduction

Calcium (Ca²⁺) is a ubiquitously used second messenger that regulates many cellular processes such as fertilization, proliferation, differentiation, gene expression and apoptosis [1]. Increasing evidence suggests that the spatiotemporal patterns of Ca²⁺ signals may determine the specificity and functional outcome of these signals.

The hydrolysis of phosphoinositol 4,5-bisphosphate generates the two second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol. The IP₃ binds to the IP₃ receptor (IP₃R), promoting Ca²⁺ release from internal Ca²⁺ stores, which are mostly located in the endoplasmic reticulum. Three structurally and functionally different isoforms of the IP₃R have been identified, each of which differs in its amino acid sequence, affinity for IP₃ and modulation by [Ca²⁺]_i [1]. The distinct isoforms are differently distributed between tissues and are expressed in a developmentally regulated manner. The IP₃R subtypes can be coexpressed in several tissues and within a single-cell type. Differences in the subcellular distribution of these intracellular Ca²⁺ channels might modulate the amplitude, duration and wave patterns of [Ca²⁺]_i transients in the cytosol and the nucleus [2]. Moreover, the subcellular distribution of the IP₃R is not static and can change according to the physiological status of the cell [3].

IP₃R is widely distributed throughout the CNS in neuronal cell bodies, fibers and dendrites [4]. In the brain, IP₃R1 is expressed in neurons; IP₃R2 is detected only in glia; and IP₃R3 is enriched in neuronal terminals, with little staining in the glia [5]. During development, the levels of expression of IP₃R1 in neurons increased during the time of synaptogenesis and dendritic contact [6].

To further understand the involvement of intracellular Ca²⁺ in the peripheral nervous system, it is first necessary

to determine the localization, at the cellular and subcellular level, of the different IP₃R isoforms. We have determined the localization of the different IP₃R subtypes in the rat sciatic nerve. The three isoforms are expressed in the sciatic nerve and show different pattern of distribution. IP₃R1 and IP₃R2 are expressed as discrete intranuclear clusters and IP₃R3 is predominantly expressed in nonmyelin Schwann cells. Interestingly, the three isoforms are also expressed at the nodes of Ranvier.

Materials and methods

Male Wistar rats (250–350 g) were used in all experiments. Rats were killed with ether or CO₂ overexposure. The sciatic nerve and sympathetic trunk from normal adult rats were excised and desheathed. The nerves were teased gently onto poly-L-lysine-coated microscope slides in a drop of phosphate-buffered saline (PBS) using 23-gauge needles as described previously [7], and allowed to air dry for at least 1 h before immunostaining.

Immunohistochemistry

IP₃R isoforms were detected with polyclonal rabbit antibodies against anti-IP₃R1 (Synaptic Systems), anti-IP₃R2 (Affinity Bioreagents, INC) and anti-IP₃R3 (Chemicon Int.). As a control we determined the expression of the three antibodies in brain sagittal frozen sections. Anti-IP₃R1 is only detected in neurons and is enriched in Purkinje neurons. IP₃R2 is predominantly detected in glia. IP₃R3 is enriched in neuronal terminals and glia as described previously [5,6]. IP₃R2 is also expressed at low levels in neurons (data not shown).

Teased nerves were fixed for the three rabbit anti-IP₃R with 4% w/v paraformaldehyde for 20 min. Nonspecific

binding sites were blocked with 10% nonfat skimmed milk powder (NFM) in PBS for 2 h, before incubation in IP₃R1 [1:250], IP₃R2 [1:100] and IP₃R3 [1:1000] antibodies in PBS, 0.1% triton X-100 at 4°C overnight. Incubated with biotinylated anti-rabbit IgG antibody (1:500) (Vector Lab) for 2 h and incubated in ABC kit (Vector Elite reagent) for 30 min. Peroxidase labeling was detected using diaminobenzidine (Sigma) for 7–10 min. The nucleus was counterstained with thionin 0.2% w/v (Sigma) for 5 min, dehydrated and mounted in Permount. For fluorescence, teased nerves were incubated with fluorescein-avidin D (1:1000) (Vector Lab) for 1 h.

For double immunohistochemistry, teased nerves were fixed with 2% w/v paraformaldehyde for 10 min, washed in PBS, 0.5% triton X-100, 0.2% tween-20 (PBS-TT), and blocked with 10% NFM, before incubation with mouse anti-ankyrin G (1:100) (Zymed Lab Inc.) or mouse anti-Kv1.2 α -subunit (1:300) (Upstate) at 4°C overnight. For myelin basic protein (MBP), teased nerves were fixed with methanol for 10 min and incubated with mouse anti-MBP (1:500) (Calbiochem). The samples were then incubated with antimouse IgG Alexa Fluor 568 (Molecular Probes) (1:1500) for 1 h, and labeled with anti-IP₃R subtypes as before. For glial fibrillary acidic protein (GFAP), teased nerves were labeled with anti-IP₃R isoform as before, and incubated with mouse anti-GFAP conjugate with Cy3 (1:1000) (Sigma) at 4°C overnight. The samples were mounted with Vectashield (Vector Lab). Controls were performed by omission of the primary antibody. Specimens were examined by epifluorescence on an Olympus BX60 followed by image manipulation with Image-Pro Plus 4.5.1 or by confocal microscope on a Zeiss LSM Image Browser Version 3.1.0.99.

Alizarin red S (for calcium deposits) staining was performed as reported previously [8].

Results

The expression and distribution of the three IP₃R subtypes were studied in adult rat sciatic nerve. Specific polyclonal antibodies for each isoform were used to establish their distribution by immunohistochemistry.

Expression of IP₃R1

Teased nerves show discrete intranuclear clusters of IP₃R1 staining in both myelinating (Fig. 1a) and nonmyelinating Schwann cells. Perinuclear staining in myelinating Schwann cells and within the cytoplasmic domains of myelin internodes is also present. IP₃R1 is also expressed in the Schmidt-Lanterman incisures (Fig. 1b), and at low levels in nonmyelinating Schwann cells as discrete dots, which were identified by double-labeling with GFAP (Fig. 1b).

Labeling is also present in a majority (at least 85%) of the nodes of Ranvier, where IP₃R1 is clustered at high densities (Fig. 1c) and myelin is labeled with MBP. To examine this further, we double labeled with ankyrin G that is located at the node of Ranvier in peripheral myelinated axons [9] and with the juxtaparanodal expression of the Kv1.2 potassium channels [10]. Confocal microscopy shows that IP₃R1 is expressed at the nodal region, where it colocalized with ankyrin G (Fig. 1d–f), suggesting that the distribution of IP₃R1 at the nodal region of the axon is similar to that of the Na_v1.6 sodium channel reported in sciatic nerve [11]. It did not colocalize, however, with the axonal-juxtaparanodal expression of Kv1.2 potassium channels (Fig. 1g–i). IP₃R1

expression is also seen on the outer surface of the Schwann cells close to the node in the paranodal region (Fig. 1d and g). This suggests that IP₃R1 is both clustered at the axonal side of the node and within the Schwann cells. Calcium deposits are also observed at the nodes of Ranvier, with alizarin red staining at the nodal region and the outer surface of Schwann cells (Fig. 1j) having similar distribution as IP₃R1.

Expression of IP₃R2

Teased nerves show that IP₃R2 is primarily expressed in the nucleus, as strong discrete intranuclear clusters in both myelinating and nonmyelinating Schwann cells (Fig. 1k). Perinuclear staining is also seen in myelinating Schwann cells and within the cytoplasmic domains of myelin internodes. Calcium deposits are detected deeper into the nucleus with alizarin red staining (Fig. 1l). IP₃R2 is also expressed at very low levels in nonmyelinating Schwann cells. Under fluorescence, IP₃R2 is observed as discrete dots; it is codistributed with GFAP (data not shown).

IP₃R2 is also expressed at the nodes of Ranvier, having a different distribution from the other isoforms. Figure 1m and 1n are nodes of Ranvier showing that IP₃R2 is concentrated near the node and in the canalicular processes that extend along the outer surface of the myelin in Schwann cells. In some focal planes the paranodal Schwann cell membranes express IP₃R2 (Fig. 1n). This pattern is similar to the Kv1.5 potassium channel expression reported in the sciatic nerve [12].

Expression of IP₃R3

In teased nerves, IP₃R3 was primarily present in nonmyelinating Schwann cells (Fig. 1p), which were double labeled with GFAP (Fig. 1q), which is expressed selectively in nonmyelinating Schwann cells [7]. IP₃R3 codistributed with GFAP immunoreactivity (Fig. 1r). IP₃R3 shows a filamentous staining similar to GFAP. In some myelinating Schwann cells perinuclear staining of IP₃R3 is present (Fig. 1o), but not in the nucleus.

Immunoreactivity is also present in a majority (at least 80%) of the nodes of Ranvier (Fig. 1s and v). We double labeled with ankyrin G and Kv1.2 potassium channel. Confocal microscopy shows that IP₃R3 does not colocalize with the ankyrin G expression at the nodes (Fig. 1s–u), or with the juxtaparanodal expression of the Kv1.2 potassium channel (Fig. 1v–x). This suggests that IP₃R3 is strongly expressed in the paranodal region of the axon. IP₃R3 is also extended along the outer surface of the Schwann cells, similar to the other isoforms.

Discussion

It has been shown that the subcellular distribution of IP₃R subtypes varies widely, depending on the cell type and the isoform expressed [2]. However, the mechanisms that determine the localization and redistribution of IP₃Rs in any given cell are not yet clear. Here, we show that the three IP₃R isoforms are expressed in the rat sciatic nerve with different patterns of distribution.

IP₃R1 and IP₃R2 are present in both the nucleus and the cytoplasm

IP₃R1 and IP₃R2 are expressed mainly in the nucleus and perinuclear region of myelinating Schwann cells in teased

nerve preparations. This finding is consistent with previous work showing that IP₃R2 is associated with the cell nucleus [13,14]; however, IP₃R1 expression has not been reported in the nucleus. In most preparations, both IP₃R1 and IP₃R2 are distributed deeper within the nuclear structure, which correlates with the Ca²⁺ deposits observed with alizarin red in Schwann cell nuclei, suggesting that the presence of Ca²⁺ in the nucleus correlates with the presence of IP₃R1 and IP₃R2. In many mammalian cell types, the presence of nuclear tubular membrane structures has been described

[15]. It has been suggested that these membranes derive from the nuclear envelope and form long, dynamic tubular channels that extend deep into the nucleoplasm. A reticular network of nuclear calcium stores that is continuous with the endoplasmic reticulum has been identified [14]. The presence of IP₃R1 and IP₃R2 in both the nucleus and the perinuclear region suggests that the localization of these receptors can be redistributed in Schwann cells. The subcellular distribution of IP₃R has been described as dynamic, changing according to the physiological status of the cell [2]. It has also been shown that intracellular Ca²⁺ acts in the cytoplasm and the nucleus, which stimulate gene expression through distinct pathways [16,17]. The spatial properties of calcium signals are important determinants for the type of transcriptional response. This suggests that the IP₃R1 and IP₃R2 in the nucleus and the cytoplasm might play different roles in each cellular compartment, regulating important nuclear functions that are independent of the processes regulated in the cytosol.

IP₃R1 is also present in Schmidt-Lanterman incisures. The expression of K_v1.1, K_v1.2 and K_vβ2 potassium channels have also been reported in the Schmidt-Lanterman incisures [10] and calcium deposits have been observed in the incisures in nerves loaded with the Ca²⁺-sensitive dye fluo3-AM [18].

IP₃R subtypes are also present in myelinating Schwann cell cytoplasm. Considerable evidence also exists in the literature for the presence of the three subtypes in the plasma membranes of various cell types [19]. The expression of potassium channels has also been reported in myelinating Schwann cell cytoplasm [12].

IP₃R subtypes are present in nonmyelinating Schwann cells

The three isoforms are expressed in nonmyelinating Schwann cells, but IP₃R3 is localized at very high levels in nonmyelinating Schwann cells, showing filamentous staining very similar to that observed with GFAP, in contrast to IP₃R2 and IP₃R1, which are present at very low levels as stained punctuate dots. This suggests that IP₃R3 has an

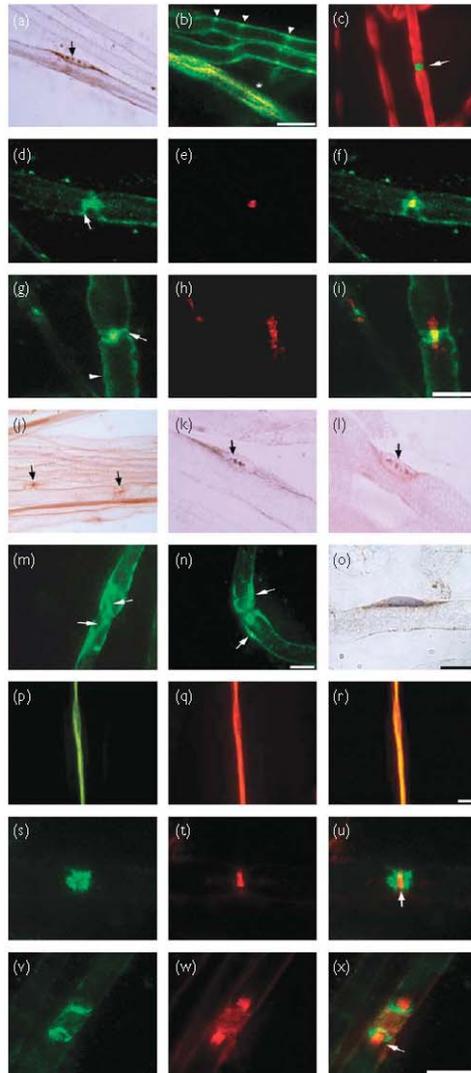


Fig. 1 IP₃R isoforms are present in myelin and nonmyelin Schwann cells. IP₃R1 (a) is expressed in the nucleus as intranuclear clusters (arrow) and in the perinuclear regions of myelin Schwann cell; also in the Schmidt-Lanterman incisures (arrowheads in b) and in nonmyelin Schwann cells (asterisk in b) which colocalize with GFAP (yellow). IP₃R1 is clustered at the nodes of Ranvier (arrow in c) in which myelin is stained with MBP (red). It is also in the membrane separated by the nodal region (arrows in d and g) and on the outer surface of Schwann cells (arrowhead in g). Double immunolabeling of IP₃R1 (d and g) and ankyrin G (e) or the Kvl.2 potassium channel (h) shows that IP₃R1 colocalized with ankyrin G in the nodal region (f), but not with the juxtaparanodal expression of Kvl.2 (i) in confocal images. Staining with alizarin red shows Ca²⁺ deposits at the nodes of Ranvier (arrows in j). IP₃R2 is present in the nucleus and perinuclear regions as IP₃R1 (arrow in k). Ca²⁺ deposits are observed in nuclei stained with alizarin red (arrow in l). IP₃R2 is also expressed in the canalicular processes (arrows in m) and the cytoplasmic membrane (arrows in n). IP₃R3 is expressed in the perinuclear region (o) and at high levels in nonmyelinating Schwann cell (p), when double labeled with mAbs against GFAP (q) they colocalize (r). IP₃R3 is expressed in the paranodal region of the axon. Double-labeling with IP₃R3 (s and v) and ankyrin G (t) or the Kvl.2 potassium channel (w), shows that IP₃R3 did not colocalized with both the nodal expression of ankyrin g (arrow in u) or the juxtaparanodal expression of the Kvl.2 potassium channel (arrow in x) in confocal images. Scale bars=10 μm (a and b; c, j and p-r; d-i; m and n; k, l, and o; s-x).

important role in these cells. It has been proposed that several cytoskeletal and scaffolding proteins, like actin or ankyrin, interact directly with IP₃R isoforms [2]; therefore, there is a possibility that in nonmyelinating Schwann cells intermediate filaments, like GFAP, that are coexpressed with IP₃R3, are involved in determining the localization of IP₃R3.

IP₃R isoforms are expressed at the nodes of Ranvier

The three IP₃R isoforms are expressed at the nodes of Ranvier in distinct subcellular domains. IP₃R1 is clustered at high densities at the nodes of Ranvier, similar to the Na_v1.6 sodium channel reported in the sciatic nerve [11]. IP₃R3 is present in the paranodal region. IP₃R1 and IP₃R3, however, are not in the juxtaparanodal parts of the node, as it is shown when nerves were double labeled with the K_v1.2 potassium channel. The three isoforms are also present in the paranodal Schwann cell membranes and along the outer surface of the Schwann cell cytoplasmic. IP₃R2 is in the canaliculi and became particularly concentrated near the node. A similar distribution has been reported for the K_v1.5 potassium channel [12].

The nerves labeled with alizarin red show calcium deposits in the outer Schwann cell cytoplasm and clusters at the nodes of Ranvier along the axonal axis. In addition, nerves loaded with the calcium indicator fluo3 revealed fluorescence in the paranodal loops and cytoplasmic pockets of the longitudinal incisors of Schwann cells. The calcium observed with alizarin red and the calcium indicator fluo3 demonstrate the presence of Ca²⁺ at the nodes of Ranvier, which coincides with the distribution observed with the IP₃R subtypes.

[Ca²⁺]_i transients were observed in nerves loaded with fluo3 during nerve stimulation and recovery at the nodes of Ranvier [18]. In nerves loaded with fluo3 during nerve stimulation, a small [Ca²⁺]_i transient was detected with IP₃R-activated calcium release [18]. It is possible that at least one of the IP₃R subtypes is involved in the small [Ca²⁺]_i transient they observed during nerve stimulation. The correlation between the Na⁺ and K⁺ channels and the IP₃R may be significant, involving the maintenance and modulation of the Na⁺ and K⁺ channel related to conduction velocity.

Conclusion

The panorama that emerges from this study is that IP₃R isoforms might be involved in more than one event within Schwann cells and axons. They have different patterns of distribution, which might influence the Schwann cells and be important in maintaining the fine molecular architecture of the node of Ranvier. This could be crucial for the modulation of saltatory conduction.

Acknowledgements

The authors thank Professor R. Mirsky and Dr B. Amess for critically reading and correcting the manuscript, M.Sc.I. Sánchez-González for assistance with confocal microscopy and MVZ C. Rivera-Cerecedo for providing us with the rats.

This research was completed as part of the first author's PhD dissertation, within the graduate program in Biomedical Science at IFC, UNAM, México. This work was supported by Conacyt-México, Grants 25418-N and 33540-N to M.A.R. Dent.

References

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1:11–21.
- Vermassen E, Pary JB, Mauer J-P. Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol Cell* 2004; 96:3–17.
- Colosetti F, Tunwell RE, Cruttwell C, Arsanto JE, Mauer J-E, Cassio D. The type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is concentrated at the tight junction level in polarized MDCK cells. *J Cell Sci* 2003; 116:2791–2803.
- Sharp AH, Dawson TM, Ross CA, Fotuhi M, Mourey RJ, Snyder SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: immunohistochemical localization to discrete areas of rat central nervous system. *Neuroscience* 1993; 53:927–942.
- Sharp AH, Nucifora FC Jr, Blondel O, Sheppard CA, Zhang Ch, Snyder SH, et al. Differential cellular expression of isoforms of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in neurons and glia in brain. *J Comp Neurol* 1999; 406:207–220.
- Dent MAR, Raisman G, Lai FA. Expression of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor during axogenesis and synaptic contact in the central and peripheral nervous system of developing rat. *Development* 1996; 122:1029–1039.
- Jessen KR, Mirsky R. Nonmyelin-forming Schwann cells coexpress surface proteins and intermediate filaments not found in myelin-forming cells: a study of Ran-2, A5E3 antigen and glial fibrillary acidic protein. *J Neurocytol* 1984; 13:923–934.
- Johnson FB. Pigments and minerals. In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editors. *Laboratory methods in histotechnology*. Washington, DC: American Registry of Pathology; 1994. p. 198.
- Kordeli E, Davis J, Trapp B, Bennett V. An isoform of ankyrin is localized at nodes of Ranvier in myelinated axons of central and peripheral nerves. *J Cell Biol* 1990; 110:1341–1352.
- Arroyo EJ, Xu Y, Zhou L, Messing A, Peles E, Chiu SY et al. Myelinating Schwann cells determine the internodal localization of Kv1.1, Kv1.2, Kv2 and Caspr. *J Neurocytol* 1999; 28:333–347.
- Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. Sodium channel Na_v1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites and synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:5616–5620.
- Mi H, Deerinck TJ, Ellisman MH, Schwarz TL. Differential distribution of closely related potassium channels in rat Schwann cells. *J Neurosci* 1995; 15:3761–3774.
- Laflamme K, Domingue O, Guillemette BL, Guillemette G. Immunohistochemical localization of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to the nucleus of different mammalian cells. *J Cell Biochem* 2002; 85: 219–228.
- Echevarría W, Leite MF, Guerra MI, Zipfel WR, Nathanson MH. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 2003; 5:440–446.
- Fricker M, Hollinshead M, White N, Vaux D. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1997; 136:531–544.
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. Distinct function of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 1997; 385:260–265.
- Leite MF, Thrower EC, Echevarría W, Koulen P, Hirata K, Bennett AM, et al. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:2975–2980.
- Lev-Ram V, Ellisman MH. Axonal activation-induced calcium transients in myelinating Schwann cells, sources, and mechanisms. *J Neurosci* 1995; 15:2628–2637.
- Tanimura A, Tojyo Y, Turner J. Evidence that type I, II, and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors can occur as integral plasma membrane proteins. *J Biol Chem* 2000; 275:27488–27493.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo, A. J., S. David y G.M. Bray. (1981). "Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents". *J. Exp. Biol.* 95:231-40.
- Ainger, K., D. Avossa, A.S. Diana, C. Barry, E. Barbarese y J.H. Carson. (1997). "Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA". *J Cell Biol.* 138:1077-87.
- Alberts, B.; A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. (2002). "Molecular Biology of the Cell". 4a edición. Garland Science. New York. USA.
- Altevogt, B.M., K.A. Kleopa, F.R. Postma, S.S. Scherer y D.L. Paul. (2002). "Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems". *J. Neurosci.* 22:6458-70.
- Ansselin, A.D., D.F. Davey y D.G. Allen. (1997). "Extracellular ATP increases intracellular calcium in cultured adult Schwann cells". *Neuroscience.* 76:947-955.
- Araque, A., R.P. Sanzgiri, V. Parpura y P.G. Haydon. (1998b). "Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons". *J. Neurosci.* 18:6822-9.
- Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri y P.G. Haydon. (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner". *TINS.* 22: 208-215.
- Araque, A., V. Parpura, R.P. Sanzgiri y P.G. Haydon. (1998a). "Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons". *Eur. J. Neurosci.* 10:2129-42.
- Arroyo, E.J., T. Xu, J. Grinspan, S. Lambert, S.R. Levinson, P.J. Brophy, E. Peles y S.S. Scherer. (2002). "Genetic dysmyelination alters the molecular architecture of the nodal region". *J. Neurosci.* 22:1726-37.
- Arroyo, E.J., Y.T. Xu, L. Zhou, A. Messing, E. Peles, S.Y. Chiu y S.S. Scherer. (1999). "Myelinating Schwann cells determine the internodal localization of Kv11, Kv1.2, Kvbeta2, and Caspr". *J. Neurocytol.* 28:333-347.
- Auld, D.S., y R. Robitaille. (2003a). "Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function". *Neuron.* 40:389-400.
- Auld, D.S., y R. Robitaille. (2003b). "Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation". *Neuroscientist.* 9:144-157.
- Avellino, M.A., D. Hart, A.T. Dailey, M. Mackinno y D. Ellegala y M Kliot. (1995). "Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during Wallerian degeneration of axons". *Exp. Neurol.* 136:183-198.
- Baker, M.D. (2002). "Electrophysiology of mammalian Schwann cells". *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 78:83-103.
- Banerjee, S., y G. Hasan. (2005). "The InsP_3 receptor: its role in neuronal physiology and neurodegeneration". *BioEssays.* 27:1035-1047.
- Barres, B.A., y M.C. Raff. (1999). "Axonal control of oligodendrocyte development". *J. Cell Biol.* 147:1123-8.
- Baukal, A. J., G. Guillemette, R. Rubin, A. Spat y K.J. Catt. (1985). "Binding sites for inositol triphosphate in the bovine adrenal cortex". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133:532-538.
- Berghs, S., D. Aggujaro, R. Dirx Jr, E. Maksimova, P. Stabach, J.M. Hermel, J.P. Zhang, W. Philbrick, V. Slepnev, T. Ort y M. Solimena. (2000). "IV spectrin localized at axon initial segments and nodes of Ranvier in the central and peripheral nervous system". *J. Cell Biol.* 151:985-1001.
- Berridge, M.J. (1993). "Inositol triphosphate and calcium signaling". *Nature.* 361: 315-325.
- Berridge, M.J. (2006). "Calcium microdomains: organization and function". *Cell Calcium.* 40:405-12.
- Berridge, M.J., M.D. Bootman y H.L. Roderick. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling". *Nature Rev. Mol Cell Biol.* 4:517-29.
- Berridge, M.J., P. Lipp y M.D. Bootman. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:11-21.

- Berthold, C.H., y M. Rydmark. (1995). "Morphology of normal peripheral axons". En *The axon: structure, function and pathophysiology*. Editado por Waxman S.G, Kocsis J.D, Stys P.K. Oxford University Press. New York. USA. pp 13-48.
- Bezprozvanny, I. (2005). "The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors". *Cell Calcium*. 38:261-272.
- Bezprozvanny, I., y B.E. Ehrlich. (1995). "The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor". *J. Membrane Biol.* 145:205-216.
- Bisby, M.A. (1995). "Regeneration of peripheral nervous system axons". En *The axon: structure, function and pathophysiology*. Editado por Waxman S.G, Kocsis J.D, Stys P.K. Oxford University Press. New York. USA. pp 553-578.
- Black, J.A., H. Sontheimer, Y. Oh y S.G. Waxman.(1995). "The oligodendrocyte, the perinodal astrocyte, and the central node of Ranvier". En *The axon: structure, function and pathophysiology*. Editado por Waxman S.G, Kocsis J.D, Stys P.K. Oxford University Press. New York. USA. pp 116-143.
- Blondel, O., J. Takeda, H. Janssen, S. Seino y G.I. Bell. (1993). "Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues". *J. Biol. Chem.* 268:11356-63.
- Boehning, D., y S.K. Joseph. (2000). "Functional properties of recombinant type I and type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms expressed in COS-7 cells". *J. Biol. Chem.* 275:21492-21499.
- Boiko, T., M.N. Rasband, S.R. Levinson, J.H. Caldwell, G. Mandel, J.S. Trimmer y G. Matthews. (2001). "Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon". *Neuron*. 30:91-104.
- Bootman, M.D., y P. Lipp. (1999). "Calcium signalling: rining changes to the bell-shaped curve". *Curr. Biol.* 9:R876-R878.
- Brodal, P. (1992). "The central nervous system structure and function". Oxford University Press. New York. USA.
- Bullock, T.H., M.V. Bennett, D. Johnston, R. Josephson, E. Marder y R.D. Fields. (2005). "Neuroscience. The neuron doctrine, redux". *Science*. 310:791-3.
- Bunge, R.P., M.B. Bunge y C.F. Eldridge. (1986). "Linkage between axonal ensheathment and basal lamina production by Schwann cells". *Annu. Rev. Neurosci.* 9:305-28.
- Butanda-Ochoa, A., G. Höjer, V. Morales-Tlalpan y M. Díaz-Muñoz. (2006). "Recognition and activation of ryanodine receptors by purines". *Curr. Med. Chem.* 13: 647-57.
- Caldwell, J.H., K. L. Schaller, R.S. Lasher, E. Peles y S.R. Levinson. (2000). "Sodium Channel Nav1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:5616-5620.
- Carafoli, E. (1987). "Intracellular calcium homeostasis". *Annu. Rev. Biochem.* 56:395-433.
- Carrión, A. M., W. A. Link, F. Ledo, B. Mellström y J. R. Naranjo. (1999). "DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor". *Nature*. 398:80-84.
- Castonguay, A., S. Levesque y R Robitaille. (2001). "Glial cells as active partners in synaptic functions". *Prog. Brain Res.* 132:227-240.
- Corfas, G., M.O. Velardez, C.P. Ko, N. Ratner y E. Peles. (2004). "Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions". *J. Neurosci.* 24:9250-9260.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. (1990). "Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling". *Science*. 247:470-3.
- Cotrina, M.L., y M. Nedergaard. (2005). "Intracellular calcium control mechanisms in glia". En *Neuroglia*. 2a edición. Editado por Helmut Kettenmann y Bruce R Ranson. Oxford University Press. New York. USA. pp 229-239.
- Court, F.A., D.L. Sherman, T. Pratt, E.M. Garry, R.R. Ribchester, D.F. Cottrell, S.M. Fleetwood-Walker y Brophy PJ. (2004). "Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves". *Nature*. 431:191-5.
- Chandross, K.J., J.A. Kessler, R.I. Cohen, E. Simburger, D.C. Spray, P. Bieri y R. Dermietzel. (1996). "Altered connexin expression after peripheral nerve injury". *Mol. Cell. Neurosci.* 7:501-18.

- Chiu, S.Y., J.M. Ritchie, R.B. Rogart y D. Stagg. (1979). "A quantitative description of membrane currents in rabbit myelinated nerve". *J. Physiol.* 292:149-66.
- Chomczynski, P., y Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal. Biochem.* 162:156-9.
- Davenport, R.W., S.R. Bolsover y S.B. Kater. (1995). "Development of axons: calcium, steering, and the growth cone". En *The Axon: structure, function and pathophysiology*. Editado por Stephen G. Waxman, Jeffery D. Kocsis y Peter K. Stys. Oxford University Press. New York. USA. pp 200-217.
- David, S., y Aguayo A.J. (1981). "Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats". *Science.* 214:931-3.
- Davis, J.Q., S. Lambert y V. Bennet. (1996). "Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (musin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments". *J. Cell Biol.* 135:1355-1367.
- Dawson, A.P. (1997). "Calcium signalling: how do IP₃ receptors work?". *Curr. Biol.* 7:R544-R547.
- Dent, M.A., G. Raisman y A. Lai. (1996). "Expression of type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptor during axogenesis and synaptic contact in the central and peripheral nervous system of developing rat". *Develop.* 122:1029-1039.
- Devaux, J.J., K.A. Kleopa, E.C. Cooper y S.S. Scherer. (2004). "KCNQ2 is a nodal K⁺ channel". *J. Neurosci.* 24:1236-1244.
- Díaz-Muñoz, M., M.A. Dent, D. Granados-Fuentes, A.C. Hall, A. Hernández-Cruz, M.E. Harrington y R. Aguilar-Roblero. (1999). "Circadian modulation of the ryanodine receptor type 2 in the SCN of rodents". *Neuroreport.* 10:481-6.
- Dobi, A., y D.V. Agoston. (1998). "Submillimolar levels of calcium regulates DNA structure at the dinucleotide repeat (TG/AC)_n". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:5981-5986.
- Doetsch, F. (2003). The glial identity of neural stem cells. *Nature Neurosci.* 6:1127-1134.
- Dumollard, R., J. Carroll, G. Dupont, y C. Sardet. (2002). "Calcium wave pacemakers in eggs". *J. Cell Sci.* 115:3557-3564.
- Echevarria, W., M. F. Leite, M.T. Guerra, W.R. Zipfel y M.H. Nathanson. (2003). "Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum". *Nature Cell Biol.* 5:440-446.
- Einheber, S., G. Zanazzi, W. Ching, S. Scherer, T.A. Milner, E. Peles y J.L. Salzer. (1997). "The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination". *J. Cell Biol.* 139:1495-506.
- Eshed, Y., K. Feinberg, S. Poliak, H. Sabanay, O. Sarig-Nadir, I. Spiegel, J.R. Bermingham Jr y E. Peles. (2005). "Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier". *Neuron.* 47:215-229.
- Farrell, E.F., A. Antaramian, N. Benkusky, X. Zhu, A. Rueda, A.M. Gómez y H.H. Valdivia. (2004). "Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by sorcin, a novel modulator of ryanodine receptors". *Biol. Res.* 37:609-612.
- Fawcett, J.W., y R.J. Keynes. (1990). "Peripheral nerve regeneration". *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 42-60.
- Fernandez-Valle, C., R.P. Bunge y M.B. Bunge. (1995). "Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration". *J. Neurocytol.* 24:667-679.
- Fields, R.D., y B. Stevens. (2002). "New insights into neuron-glia communication". *Science.* 298:556-62.
- Flores-García, L., Martínez-Gómez, A., Díaz-Muñoz, M., Dent, M.A.R. (1997) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is expressed in the sciatic nerve. 27th Annual Meeting, Society for Neuroscience, New Orleans.
- Franzini-Armstrong, C., y F. Protasi. (1997). "Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions". *Physiol. Rev.* 77:699-729.
- Fricker, M., M. Hollinshead, N. White, y D. Vaux. (1997). "Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope". *J. Cell Biol.* 136:531-544.
- Fu, S.Y., y T. Gordon. (1997). "The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration". *Mol. Neurobiol.* 14:67-116.

- Fujimoto, T., S. Nakade, A. Miyawaki, K. Mikoshiba y K. Ogawa. (1992). "Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae". *J. Cell Biol.* 119:1507-1513.
- Gatto, C.L., B.J. Walker y S. Lambert. (2003). "Local ERM activation and dynamic growth cones at Schwann cell tips implicated in efficient formation of nodes of Ranvier". *J. Cell Biol.* 162:489-498.
- Gerasimenko, O.V., J.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin y O.H. Petersen. (1995). "ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope". *Cell.* 80:439-44.
- Giannini, G., A. Conti, S. Mammarella, M. Scrobogna y V. Sorrentino. (1995). "The Ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and diferentially expressed in murine brain and peripheral tissues". *J. Cell Biol.* 128:893-904.
- Goutebroze, L., M. Carnaud, N. Denisenko, M.C. Bouterin y J.A. Girault. (2003). "Syndecan-3 and syndecan-4 are enriched in Schwann cell perinodal processes". *BMC Neurosci.* 4:29.
- Grafe, P., C. Mayer, T. Takigawa, M. Kamleiter y R. Sanchez-Brandelik. (1999). "Confocal calcium imaging reveals an ionotropic P2 nucleotide receptor in the paranodal membrane of rat Schwann cells". *J. Physiol.* 515:377-83.
- Guthrie, P.B., J. Knappenberger, M. Segal, M.V. Bennett, A.C. Charles y S.B. Kater. (1999). "ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves". *J. Neurosci.* 19:520-8.
- Haak, L.L., M. Grimaldi y J.T. Russell. (2000). "Mitochondria in myelinating cells: calcium signaling in oligodendrocyte precursor cells". *Cell Calcium.* 28:297-306.
- Hamilton, S.L. (2005). "Ryanodine receptors". *Cell Calcium.* 38:253-260.
- Hansson, E., y L. Rönnbäck. (2003). "Glial neuronal signaling in the central nervous system". *FASEB J.* 17:341-348.
- Hardingham, G.E., S. Chawla, C.M. Johnson y H. Bading. (1997). "Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression". *Nature.* 385:260-5.
- Hassinger, T.D., P.B. Atkinson, G.J. Strecker, L.R. Whalen, F.E. Dudek, A.H. Kossel y S.B. Kater. (1995). "Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves". *J. Neurobiol.* 28:159-70.
- Hassinger, T.D., P.B. Guthrie, P.B. Atkinson, M.V. Bennett y S.B. Kater. (1996). "An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:13268-73.
- Haydon, P.G. (2001). "Glial: listening and talking to the synapse". *Nature Rev. Neurosci.* 2:185-193.
- Hernández-Cruz, A., M. Díaz-Muñoz, M. Gómez-Chavarrín, R. Cañedo-Merino, D.A. Protti, A.L. Escobar, J. Sierralta y B.A. Suarez-Isla. (1995). "Properties of the ryanodine-sensitive release channels that underlie caffeine-induced Ca²⁺ mobilization from intracellular stores in mammalian sympathetic neurons". *Eur. J. Neurosci.* 7:1684-99.
- Hildebrand, C., C.M. Bowe y I.N. Remahl. (1994). "Myelination and myelin sheath remodelling in normal and pathological PNS nerve fibres". *Prog. Neurobiol.* 43:85-141.
- Horackova, M., W. Nonner, R. Stämpfli. (1968). "Action potentials and voltage clamp currents of single rat Ranvier nodes". *Proc. Int. Union Physiol.* 7:198.
- Horio, Y. (2001). "Potassium channels of glial cells: distribution and function". *Jpn. J. Pharmacol.* 87:1-6.
- Humbert, J.P., N. Matter, J.C. Artault, P. Koppler y A.N. Malviya. (1996). "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate". Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes". *J. Biol. Chem.* 271:478-85.
- Isshiki, M., y R.W. Anderson. (2003). "Function of caveolae in Ca²⁺ entry and Ca²⁺-dependent signal transduction". *Traffic.* 4:717-723.
- Isshiki, M., Y.S. Ying, T. Fujita y R.W. Anderson. (2002). "A molecular sensor detects signal transduction from caveolae in living cells". *J. Biol. Chem.* 277:43389-43398.
- Jahromi, B.S., R. Robitaille, M.P. Charlton. (1992). "Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ". *Neuron.* 8:1069-77.
- Jessen, K., y R. Mirsky. (2004). "Schwann cell development". En *Myelin Biology and Disorders*. Editado por R. Lazzarini. Elsevier. New York. USA. pp 329-369.

- Jessen, K.R. (2004). "Glial cells". *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* 36:1861-1867.
- Jessen, K.R., A. Brennan, L. Morgan, R. Mirsky, A. Kent, Y. Hashimoto y J. Gavrilovic. (1994). "The Schwann cell precursor and his fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves". *Neuron.* 12:509-527.
- Jessen, K.R., y R. Mirsky. (1991). "Schwann cell precursors and their development". *Glia.* 4:185-194.
- Jessen, K.R., y R. Mirsky. (1998). "Origin and early development of Schwann cell". *Microscopy Research and Tecnique.* 41:393-402.
- Jessen, K.R., y R. Mirsky. (1999). "Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development". *Trends Neurosci.* 22:402-10.
- Jessen, K.R., y R. Mirsky. (2002). "Signals that determine Schwann cell identity". *J. Anat.* 200:367-76.
- Jessen, K.R., y R. Mirsky. (2005a). "The origin and development of glial cells in peripheral nerves". *Nature Rev. Neurosci.* 6:671682.
- Jessen, K.R., y R. Mirsky. (2005b). "The Schwann cell lineage". En *Neuroglia*. 2a edición. Editado por Helmut Kettenmann y Bruce R. Ranson. Oxford University Press. New York. USA. pp 85-100.
- Jiménez, C.R., F.J. Stam, K.W. Li, Y. Gouwenberg, M.P. Hornshaw, F. De Winter, J. Verhaagen y A.B. Smit. (2005). "Proteomics of the injured rat sciatic nerve reveals protein expression dynamics during regeneration". *Mol. Cell. Proteomics.* 4:120-32.
- Johnson, F.B. Pigments and minerals. (1994). In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editors. *Laboratory methods in histotechnology*. Washington, DC: American Registry of Pathology. p. 198.
- Kandel, E.R., J.H. Schwartz y T.M. Jessell. (2000). "Principles of neural science". 4a Edición. McGraw-Hill. New York. USA.
- Kaplan, M.R., M.H. Cho, E.M. Ullian, L.L. Isom, S.R. Levinson y B.A. Barres. (2001). "Differential control of Clustering of the sodium channels Na_v1.2 and Na_v1.6 at developing CNS nodes of Ranvier". *Neuron.* 30:105-119.
- Kast, B. (2001). "The best supporting actors". *Nature.* 412:674-676.
- Kettenmann, H., y B.R. Ranson. (2005). "The concept of neuroglia: a historical perspective". En *Neuroglia*. 2a edición. Editado por Helmut Kettenmann y Bruce R. Ranson. Oxford University Press. New York. USA. pp 229-239.
- Klusman, I. y M.E. Schwab. (2005). "Axonal regeneration in the peripheral nervous system of mammals". En *Neuroglia*. 2a edición. Editado por Helmut Kettenmann y Bruce R. Ranson. 190-201. Oxford University Press. New York. USA. pp 467.
- Kordeli, E., S. Lambert y V. Bennett. (1995). "Anyrin_C: a new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier". *J. Biol. Chem.* 270:2352-2359.
- Kriegler, S., y S.Y. Chiu. (1993). "Calcium signaling of glial cells along mammalian axons". *J. Neurosci.* 13:4229-45.
- Kuffler, S.W., J.G. Nicholls y A.R. Martin. (2001). "From Neuron to Brain: Cellular Approach to the Function of the Nervous System". 4a edición. Sinauer Associates Inc. USA.
- Kume, S., A. Muto, J. Aruga, T. Nakagawa, T. Michikawa, T. Furuichi, S. Nakade, H. Okano, y K. Mikoshiba. (1993). "The *Xenopus* IP3 Receptor. Structure, function, and localization in oocytes and eggs". *Cell.* 73:555-570.
- Lai, A. F., M.A. Dent, C. Wickenden, L. Xu, G. Kumari, M. Misra, H. B. Lee, M. Sar y G. Meissner. (1992). "Expression of a cardiac Ca²⁺-release channel isoform in mammalian brain". *J. Biochem.* 288:553-564.
- Lambert, S., J.Q. Davis y V. Bennett. (1997). "Morphogenesis of the node of Ranvier: co-clusters of ankyrin and ankyrin-binding integral proteins define early developmental intermediates". *J. Neurosci.* 17:7025-36.
- Langley, J.N. (1903). "On the union of the fifth cervical nerve with the superior cervical ganglion". *J. Physiol.* 30:439-442.
- Lansley, A.B., y M.J. Sanderson. (1999). "Regulation of airway ciliary activity by Ca²⁺: simultaneous measurement of beat frequency and intracellular Ca²⁺". *Biophys. J.* 77:629-638.
- LeBlanc, A.C., y J.F. Poduslo. (1990). "Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve". *J. Neurosci. Res.* 26:317-326.

- Leite, M.F., E.C. Thrower, W. Echevarria, P. Koulen, K. Hirata, A.M. Bennett, B.E. Ehrlich y M.H. Nathanson. (2003). "Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:2975-2980.
- Lev-Ram, V., y M.H. Ellisman. (1995). "Axonal activation-induced calcium transients in myelinating Schwann cells, sources, and mechanisms". *J. Neurosci.* 15:2628-37.
- Lin, S.C., y D.E. Bergles. (2004). "Synaptic signaling between neurons and glia". *Glia.* 47:290-298.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaria y J. Darnell. (2004). "Molecular Cell Biology". 5a Edición. W. H. Freeman & Co. New York. USA.
- Mak, D.O D., S. McBride y J. K. Foskett. (2001). "Regulation by Ca^{2+} and inositol 1,4,5-trisphosphate ($InsP_3$) of single recombinant type 3 $InsP_3$ receptor channels: Ca^{2+} activation uniquely distinguishes types 1 and 3 $InsP_3$ receptors". *J. Gen. Physiol.* 117:435-446.
- Martínez-Gómez A., y M.A.R. Dent. (2007). "Expression of IP_3 receptor isoforms at the nodes of Ranvier in rat sciatic nerve". *Neuroreport.* 18:447-450.**
- Martini, R. (2005). "Schwann cells and myelin". ". En *Neuroglia.* 2a edición. Editado por Helmut Kettenmann y Bruce R. Ranson. Oxford University Press. New York. USA. pp 48-59.
- Masumiya, H., P. Li, L. Zhang y S.R.W. Chen. (2001). "Ryanodine sensitizes the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) to Ca^{2+} activation". *J. Biol. Chem.* 276:39727-39735.
- Mata, M., B. Staple y D.J. Fink. (1986). "Changes in intra-axonal calcium distribution following nerve crush". *J. Neurobiol.* 17:449-467.
- Mata, M., J. Staple y D.J. Fink. (1987). "Ultrastructural distribution of calcium within neurons: an oxalate pyroantimonate study". *Histochemistry.* 87:339-349".
- Mata, M., J. Staple, D.J. Fink. (1989). "Cytochemical localization of Ca^{2+} -ATPase activity in peripheral nerve". *Brain Res.* 445:47-54.
- Matsumoto, M., y E. Nagata. (1999). "Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor knock-out mice: their phenotypes and their meaning in neuroscience and clinical practice". *J. Mol. Med.* 77:406-411.
- Maximov, A., T.S. Tang y I. Bezprozvanny. (2003). "Association of the type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor with 4.1N protein in neurons". *Mol Cell Neurosci.* 22:271-83.
- McDonald, D., C. Cheng, Y. Chen y D. Zochodne. (2006). "Early events of peripheral nerve regeneration". *Neuron Glia Biology.* 2:139-147.
- Melendez-Vasquez, C.V., J. C. Rios, G. Zanazzi, S. Lambert, A. Bretscher y J.L. Salzer. (2001). "Nodes of Ranvier form in association with ezrin-radixin-moesin (ERM)-positive Schwann cell processes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:1235-1240.
- Melendez-Vasquez, C.V., S. Einheber y J.L. Salzer. (2004). "Rho kinase regulates Schwann cell myelination and formation of associated axonal domains". *J. Neurosci.* 24:3953-3963.
- Mi, H., R.M. Harris-Warrick, T.J. Deerinck, I. Inman, M.H. Ellisman y T.L. Schwarz. (1999). "Identification and localization of Ca^{2+} -activated K^+ channels in rat sciatic nerve. *Glia.* 26:166-75.
- Mi, H., T.J. Deerinck, M. Jones, M.H. Ellisman y T.L. Schwarz. (1996). "Inwardly rectifying K^+ channels that may participate in K^+ buffering are localized in microvilli of Schwann cells". *J. Neurosci.* 16:2421-9.
- Mi, H., T.J. Deerinck, M.H. Ellisman y T.L. Schwarz. (1995). "Differential distribution of closely related potassium channels in rat Schwann cells". *J. Neurosci.* 15:3761-3774.
- Michikawa, T., A. Miyawaki, T. Furuichi y K. Mikoshiba. (1996). "inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and calcium signaling". *Crit. Rev. Neurobiol.* 10:39-55.
- Miller, G. (2005). "The dark side of Glia". *Science.* 308:778-781.
- Mirsky, R., y K.R. Jessen. (1990). "Schwann cell development and the regulation of myelination". *Semin. Neurosci.* 2:423-35.

- Miyakawa, T., A. Maeda, T. Yamazawa, K. Hirose, T. Kurosaki y M. Lino. (1999). "Encoding of Ca^{2+} signals by differential expression of IP_3 receptor subtypes". *EMBO J.* 18:1303-1308.
- Mohler, P.J., I. Splawski, C. Napolitano, G. Bottelli, L. Sharpe, K. Timothy, S.G. Priori, M.T. Keating y V. Bennett. (2004). "A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:9137-42.
- Mugnaini, E., K.K. Osen, B. Schnapp y VL Jr Friedrich. (1977). "Distribution of Schwann cell cytoplasm and plasmalemmal vesicles (caveolae) in peripheral myelin sheaths. An electron microscopic study with thin sections and freeze-fracturing". *J. Neurocytol.* 6:647-68.
- Nakanishi, S., G. Kuwajima y K. Mikoshiba. (1992). "Immunohistochemical localization of ryanodine receptors in mouse central nervous system". *Neurosci. Res.* 15:130-142.
- Nave, K.A., y M. Schwab. (2005). "Glial cells under remote control". *Nature Neurosci.* 8:1420-1422.
- Nedergaard, M. (1994). "Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells". *Science.* 263:1768-71.
- Newman, E., y K.R. Zahs. (1997). "Calcium waves in retinal glial cells". *Science.* 275:844-847.
- Neylon, C.B., S.M. Richards, M.A. Larsen, A. Agrotis y A. Bobik. (1995). "Multiple types of ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels are expressed in vascular smooth muscle". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:814-21.
- Norton, W.T., y L.A. Autilio. (1966). "The lipid composition of purified bovine brain myelin". *J. Neurochem.* 13:213-222.
- Norton, W.T., y W. Cammer. (1984). "Isolation and characterization of myelin". En *Myelin*. 2a Edición. Editado por Pierre Morell. 147-195. Plenum Press, NY. USA.
- O'Brien, J.S., E.I. Sampson y M.B. Stern. (1967). "Lipid composition of myelin from the peripheral nervous system: Intradural spinal roots". *J. Neurochem.* 14:357-365.
- Ohara, R., H. Yamakawa, M. Nakayama y O. Ohara. (2000). "Type II brain 4.1 (4.1B/KIAA0987), a member of the protein 4.1 family, is localized to neuronal paranodes". *Mol. Brain Res.* 58:41-52.
- Olawale, A.R., J. Sulaiman, J.G. Boyd y T. Gordon. (2005). "Axonal regeneration in the peripheral nervous system of mammals". En *Neuroglia*. 2a edición. Editado por Helmut Kettenmann y Bruce R. Ranson. Oxford University Press. New York. USA. pp 454-466.
- Ouardouz, M., M.A. Nikolaeva, E. Coderre, G.W. Zamponi, J.E. McRory, B.D. Trapp, X. Yin, W. Wang, J. Woulfe y P.K. Stys. (2003). "Depolarization-induced Ca^{2+} release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca^{2+} channel activation of ryanodine receptors". *Neuron.* 40:53-63.
- Parpura, V., T.A. Basarsky, F. Liu, K. Jeftinija, S. Jeftinija y P.G. Haydon. (1994). "Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling". *Nature.* 369:744-747.
- Parpura, V., y P.G. Haydon. (2000). "Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:8629-8634.
- Parra, M., P. Gascard, L.D. Walensky, J.A. Gimm, S. Blackshaw, N. Chan, Y. Takakuwa, T. Berger, G. Lee, J.A. Chasis, S.H. Snyder, N. Mohandas y J.G. Conboy. (2000). "Molecular and functional characterization of protein 4.1B, a novel member of the protein 4.1 family with high level, focal expression in brain". *J. Biol. Chem.* 275:3247-3255.
- Patel, S., S.K. Joseph y A.P. Thomas. (1999). "Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors". *Cell Calcium.* 25:247-264.
- Patterson, R.L., D. Boehning y S.H. Snyder. (2004). "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators". *Ann. Rev. Biochem.* 73:437-465.
- Peles, E., M. Nativ, M. Lusting, M. Grumet, J. Schilling, R. Martinez, G.D. Plowman y J. Schlessinger. (1997). "Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions". *EMBO.* 16:978-988.
- Pellegrino, R.G., y P.S. Spencer. (1985). "Schwann cell mitosis in response to regenerating peripheral axons in vivo". *Brian Research.* 341:16-25.

- Perea, G., y A. Araque. (2003). "Nuevas vías de información en el sistema nervioso: comunicación entre astrocitos y neuronas". *Rev. Neurol.* 36:137-44.
- Pfrieger, F.W., y B.A. Barres. (1997). "Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro". *Science.* 277:1684-7.
- Pfrieger, F.W. (2002). "Role of glia in synapse development". *Curr. Opin. Neurobiol.* 12:486-490.
- Podhajsky, R.J. y R.R. Myers. (1993). "The vascular response to nerve crush: relationship to Wallerian degeneration and regeneration". *Brain Res.* 623: 117-123.
- Poliak, S., y E. Peles. (2003). "The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier". *Nature Rev. Neurosci.* 4:968-80.
- Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe y J. Meldolesi. (1994). "Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores". *Physiol. Rev.* 74:595-636.
- Prentki, M., C.B. Wollheim y P.D. Lew. (1984). "Ca²⁺ homeostasis in permeabilized human neutrophils. Characterization of Ca²⁺-sequestering pools and the action of inositol 1,4,5-triphosphate". *J. Biol. Chem.* 259:13777-13782.
- Putney Jr, J.M. (1999). "TRP, inositol 1,4,5-triphosphate receptor, and capacitance calcium entry". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:14669-14671.
- Ramón y Cajal, S. (1928). "Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system". Raoul M. May. Editado por Javier DeFelipe y Edward G. Jones. Oxford University Press. New York. USA.
- Robitaille, R. (1995). "Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction". *J. Neurosci.* 15:7121-31.
- Robitaille, R. (1998). "Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction". *Neuron.* 21:847-855.
- Robitaille, R., B.S. Jahromi y M.P. Charlton. (1997). "Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction". *J. Physiol.* 504:337-47.
- Rossi, D., y V. Sorrentino. (2002). "Molecular genetics of ryanodine receptors Ca²⁺-release channels". *Cell Calcium.* 32:307-319.
- Rossier, M.F., G.S. Bird y J.W. Putney. (1991). "Subcellular distribution of the calcium-storing inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive organelle in rat liver. Possible linkage to the plasma membrane through the actin microfilaments". *Biochem. J.* 274:643-650.
- Rouach, N., y C. Giaume. (2001). "Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets for neuroglial interaction". *Prog. Brain Res.* 132:203-14.
- Rudolf, R., M. Mongillo, R. Rizzuto y T. Pozzan. (2003). "Looking forward to seeing calcium". *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4:579-86.
- Saito F, Moore SA, Barresi R, Henry MD, Messing A, Ross-Barta SE, Cohn RD, Williamson RA, Sluka KA, Sherman DL, Brophy PJ, Schmelzer JD, Low PA, Wrabetz L, Feltri ML, Campbell KP. (2003). "Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization". *Neuron.* 38:747-58.
- Salzer, J.L. (1997). "Clustering sodium channels at the node of Ranvier: close encounters of the axon-glia kind". *Neuron.* 18:843-846.
- Salzer, J.L. (2003). "Polarized domains of myelinated axons". *Neuron.* 40:297-318.
- Salzer, J.L. (1995). "Mechanisms of adhesion between axons and glial cells". En *The axon: structure, function and pathophysiology.* Editado por Waxman S.G, Kocsis J.D, Stys P.K. Oxford University Press. New York. USA. pp 164-184.
- Sambrook, J. F. (1990). "The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum". *Cell.* 61:197-199.
- Scherer, S.S. (1999). "Nodes, paranodes, and incisures: from form to function". *Ann. NY Acad. Sci.* 883:131-42.
- Scherer, S.S., T. Xu, P. Crino, E.J. Arroyo y D.H. Gutmann. (2001). "Ezrin, radixin, and moesin are components of Schwann cell microvilli". *J. Neurosci. Res.* 65:150-164.

- Scherer, S.S., y E.J. Arroyo. (2002). "Recent progress on the molecular organization of myelinated axons". *J. Peripher. Nerv. Syst.* 7:1-12.
- Scherer, S.S., y J. L. Salzer. (1996). "Axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve degeneration and regeneration". En *Glial cell development basic principles and clinical relevance*. Bios. Sci. Pub. Ltd. pp. 165-185.
- Schlaepfer, W.W., y S. Micko. (1979). "Calcium-dependent alterations of neurofilament proteins of rat peripheral nerve". *J. Neurochem.* 32:211-9.
- Sharp, H.A., F.C. Nucifora Jr, O. Blondel, C. A. Sheppard, C. Zhang, S.H. Snyder, J.T. Russell, D.K. Ryugo y C.A. Ross. (1999). "Differential cellular expression of isoforms of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in neurons and glia in brain". *J. Comp. Neurol.* 406:207-220.
- Simpson, P.B., y J.T. Russell. (1996). "Mitochondria support inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} waves in cultured oligodendrocytes". *J. Biol. Chem.* 271:33493-501.
- Smith, K.J., S. M. Hall y C. L. Schaaf. 1985. Vesicular demyelination induced by raised intracellular calcium. *J. Neurological Sciences.* 71:19-37.
- Smith, K.J., y S. M. Hall. 1988. Peripheral demyelination and remyelination initiated by the calcium-selective ionophore ionomycin: in vivo observations. *J. Neurological Sciences.* 83:37-53.
- Sontheimer, H. (1994). "Voltage-dependent ion channels in glial cells". *Glia.* 11:156-72.
- Sorrentino, V., V. Barone y D. Rossi. (2000). "Intracellular Ca^{2+} release channels evolution". *Curr. Opin. Gen. Develop.* 10:662-667.
- Sorrentino, V., y P. Volpe. (1993). "Ryanodine receptors: how many, where and why?". *Trends Pharmacol. Sci.* 14:98-103.
- Speel, E.J., A.H. Hopman y P. Komminoth P. (1999). "Amplification methods to increase the sensitivity of *in situ* hybridization: play card(s)". *J. Histochem. Cytochem.* 47:281-8.
- Spitzer, N.C., N.J. Lautermilch, R.D. Smith y T.M. Gomez. (2000). "Coding of neuronal differentiation by calcium transients". *Bioessays.* 22:811-17.
- Steffensen, I., S.G. Waxman, L. Mills y P.K. Stys. (1997). "Immunolocalization of the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in mammalian myelinated axons". *Brain Res.* 776:1-9.
- Stevens, B., y R.D. Fields. (2000). "Response of Schwann cells to action potentials in development". *Science.* 287:2267-71.
- Stewart, S. J. H., K. Jessen y R. Mirsky.(1996). "The Schwann cell lineage: embryonic and early postnatal development. En *Glial cell development basic principles and clinical relevance*". Bios. Sci. Pub. Ltd. pp 1-30.
- Stoll, G., J.W. Griffin, C.Y. Li y B.C. Trapp. (1989). "Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation". *J. Neurocytol.* 18:671-683.
- Stoll, G., S. Jander y R.R. Myers. (2002). "Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation". *J. Peripher. Nerv. Syst.* 7:13-27.
- Subramanian, K., y T. Meyer. (1997). "Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores". *Cell.* 89:963-971.
- Sulaiman, O.A.R., J.G. Boyd, T. Gordon. (2005). "Axonal regeneration in the peripheral nervous system of mammals". En *Neuroglia*. 2a edición. Editado por Helmut Kettenmann y Bruce R. Ranson. Oxford University Press. New York. USA. pp 454-466.
- Sutko, J.L., y J.A. Airey, (1996). "Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: does diversity in form equal diversity in function?". *Physiol. Rev.* 76:1027-1071.
- Swillens, S., G. Dupont, L. Combettes y P. Champeil. (1999). "From calcium blips to calcium puffs: theoretical analysis of the requirements for interchannel communication". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:13750-13755.
- Tait, S., F. Gunn-Moore, J.M. Collinson, J. Huang, C. Lubetzki, L. Pedraza, D.L. Sherman, D.R. Colman y P.J. Brophy. (2000). "An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glial junction". *J. Cell Biol.* 150:657-66.

- Takei, K., G. A. Mignery, E. Mugnaini, T.C. Südhof y D. De Camilli. (1994). "Inositol 1,4,5-triphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblast and in cerebellar Purkinje cells". *Neuron*. 12:327-342.
- Takeshima, H.S., S. Nishimura, T. Matsumoto, H. Ishida, K. Kangawa, N. Minamino, H. Matsuo, M. Ueda, M. Hanoaka, T. Hirose y S. Numa. (1989). "Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor". *Nature*. 339:439-445.
- Thomson, C.E., I.R. Griffiths, M.C. McCulloch, E. Kyriakides, J.A. Barrie y P. Montague. (1993). "In vitro studies of axonally-regulated Schwann cell genes during Wallerian degeneration". *J. Neurocytol.* 22:590-602.
- Thorell, W.E., L.G. Leibrock y S.K. Agrawal. (2002). "Role of RyRs and IP3 receptors after traumatic injury to spinal cord white matter". *J. Neurotrauma*. 19:335-342.
- Toews, J.C., V. Schram, S.H. Weerth, G.A. Mignery, y J.T. Russell. (2007). "Signaling proteins in the axoglial apparatus of sciatic nerve nodes of Ranvier". *Glia*. 55:202-13.
- Trapp, B.D., y G.J. Kidd. (2000). "Axo-glial septate junctions: the maestro of nodal formation and myelination?". *J. Cell Biol.* 150:F97-F100.
- Tu, H., Z. Wang, E. Nosyreva, H. De Smedt y I. Bezprozvanny. (2005). "Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms". *Biophys. J.* 88:1046-1055.
- Ullian, E.M., B.T. Harris, A. Wu, J.R. Chan y B.A. Barres. (2004). "Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture". *Mol. Cell. Neurosci.* 25:241-251.
- Ullian, E.M., S.K. Saperstein, K. S. Christopherson y B.A. Barres. (2001). "Control of Synapse number by glia". *Science*. 291:657-660.
- Vázquez-Martínez, O., R. Cañedo-Merino, M. Díaz-Muñoz y J.R. Riesgo-Escovar. (2003). "Biochemical characterization, distribution and phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster* ryanodine and IP3 receptors, and thapsigargin-sensitive Ca²⁺ ATPase". *J. Cell Sci.* 116:2483-94.
- Verkhatsky, A., R.K. Orkand y H. Kettenmann. (1998). "Glial calcium: homeostasis and signaling function". *Physiol. Rev.* 78:99-141.
- Vermassen, E., J.B. Parys y J.P. Mauger. (2004). "Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants". *Biol. Cell.* 96:3-17.
- Volterra, A., y J. Meldolesi. (2005a). "Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues". *Nature Rev. Neurosci.* 6:626-40.
- Volterra, A., y J. Meldolesi. (2005b). "Quantal release of transmitter not only from neurons but from astrocytes as well?". En *Neuroglia*. 2a edición. Editado por Helmut Kettenmann y Bruce R Ranson. Oxford University Press. New York. USA. Pp 190-201.
- Voyvodic, J.T. (1989). "Target size regulates caliber and myelination of sympathetic axons". *Nature*. 346:430-433.
- Wagenknecht, T., y M. Radermacher. (1997). "Ryanodine receptors: structure and macromolecular interactions". *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7:258-265.
- Walton, D.P., J.A. Airey, J.L. Sutko, C.F. Beck, G.A. Mignery, T.C. Südhof, T.J. Deerinck y M.H. Ellisman. (1991). "Ryanodine and inositol trisphosphate receptors coexist in avian cerebellar Purkinje neurons". *J. Cell Biol.* 5:1145-1157.
- Waller, A. (1850). "Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres". *Philos. Trans. RS Lond.* 140:423-429.
- Webster, H. deF. (1971). "The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves". *J. Cell Biol.* 48:348-367.
- Williamson, J.R., R.H. Cooper, S. K. Joseph y A. P. Thomas. (1985). "Inositol trisphosphate and diacylglycerol as intracellular second messengers in liver". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 248:C203-C216.
- Xie, X.Y., y J.N. Barrett. (1991). "Membrane resealing in cultured rat septal neurons after neurite transection-evidence for enhancement by Ca²⁺-triggered protease activity and cytoskeletal disassembly". *J. Neurosci.* 11:3257-3267.

- Yang, T., Y. Terada, H. Nonoguchi, K. Tomita y F. Marumo. (1995). "Expression of mRNAs for different types of IP3 receptors in rat kidneys". *Am. J. Physiol.* 268:F1046-52.
- Zhang, L., J. Kelley, G. Schmeisser, Y.M. Kobayashi y L.R. Jones. (1997). "Complex formation between junctin, triadin, calcicuestrin and the ryanodine receptor". *J. Biol. Chem.* 272:23389-23397.