



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EXPRESIÓN DE NEUROFILAMENTOS EN CÉLULAS  
ADENOHIPOFISIARIAS DE RATA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**VLADIMIR EDUARDO OVANDO HERNÁNDEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. TATIANA FIOREDELISIO COLL  
(2010)**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

En esta vida tan adversa  
Lo unico que puedes hacer  
Es seguir luchando por tus sueños

Mamá para ti es esta tesis,  
Sin ti no lo hubiera logrado te amo.

Papá lo que he conseguido

Es gracias a ti, te amo.

## Agradecimientos

Muchísimas gracias a Tatiana por toda la ayuda y el apoyo que me brindó, por su paciencia, consejos, llamadas de atención, pero sobre todo por su amistad, has sido una gran tutora y amiga.

Gracias al Dr. Arturo Hernández por permitirme realizar este trabajó en su laboratorio, por brindarme los recursos y facilidades para llevarlo a cabo.

Agradezco a Román por todos los conocimientos y técnicas que me enseñó, sin ellas no hubiera sido capaz de sacar este trabajo adelante.

Agradezco al Laboratorio del Dr. René Drucker Colin por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo algunos experimentos en su laboratorio.

A el maestro Adán, Ale, Claudia, Diana, Nico, Laura, Luis, Luisa, Omar, Pedro y Tziti por todos los ratos de alegría y relaxo que hacen que la vida dentro de un laboratorio sea muy agradable.

Gracias a Lalo que me instruyó tanto en la realización de las técnicas como en la adquisición de conocimientos.

A Sigmar, Aline y Ulianov por tenerme la paciencia de aguantarme, son con quienes más he convivido y se lo difícil y voluble que es mi personalidad, muchas gracias, todos su consejos y regaños sirvieron, los quiero.

Papá, mamá gracias por todo su apoyo y sus palabras, me criaron y educaron bien, sin ustedes nunca hubiera podido llegar hasta donde estoy los quiero mucho.

Tíos y tías, son muchos para mencionarlos uno por uno, pero, gracias por su ayuda y palabras de aliento.

A mis dos abuelitas que sus conversaciones me ayudan a reflexionar sobre las decisiones que debo tomar, las quiero mucho.

A mis amigos de la prepa y de la facultad, igual son varios y no puedo escribir todos sus nombres, pero gracias por todas las aventuras que vivimos, me enseñaron mucho sobre la vida.

Mis amigas, les agradezco el tiempo que me dedicaron para escuchar mis locuras y problemas, por cuidarme, darme aliento de seguir adelante y regañarme, saben que siempre estaré con ustedes.

De ustedes vino todo esto que logré, y ahora de mi para ustedes este logró que no es solo mío sino de todos nosotros .... Vladimir

1.-Datos del alumno

Ovando

Hernández

Vladimir Eduardo

55 73 57 50

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

301011693

2.-Datos del tutor

Dra.

Tatiana

Fiordelisio

Coll

3.-Datos del sinodal 1

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

4.-Datos del sinodal 2

Dr.

Román Vidal

Tamayo

Ramírez

5.-Datos del sinodal 3

Dr.

Alejandro

Zentella

Dehesa

6.-Datos del sinodal 4

Dr.

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

7.- Datos del trabajo escrito

Expresión de neurofilamentos en células adenohipofisarias de rata.

50 p

2010

## Indice

1. Introducción	
1.1 Hipofisis	1
1.1.1 Estructura	1
1.1.2 Función	3
1.2 Citoesqueleto	5
1.2.1 Microtubulos	6
1.2.2 Microfilamentos	9
1.2.3 Filamentos intermedios	10
1.3 Neurofilamentos	12
1.3.1 Estructura	12
1.3.2 Fosforilación	14
1.3.3 Expresión	15
1.3.4 Función	16
2. Hipótesis	19
3. Objetivo	19
3.1 Objetivos Particulares	19
4. Materiales y Método	20
4.1 Determinación del ciclo estral	20
4.2 Western Blot	20
4.3 Extracción RNA	21
4.4 Elaboración cDNA	22
4.5 Elaboración Primers	23
4.6 PCR en tiempo real	24
4.7 PCR	24

4.8Células competentes	25
4.9Transformación	25
4.10Secuenciación	26
5. Resultados	27
6. Discusión	35
6.1Western Blot	35
6.2RT-PCR	37
6.3Secuenciación	38
7. Conclusión	41
8. Referencias	42



# 1. Introducción

## 1.1 Hipófisis

### 1.1.1 Estructura

La hipófisis se ubica en la zona ventral de la cavidad craneal. En la mayoría de los vertebrados consta de tres lóbulos: posterior, intermedio y anterior (Fig. 1). La neurohipófisis o lóbulo posterior se desarrolla a partir de una evaginación del ectodermo del piso del tercer ventrículo en el cerebro, se divide en pars nervosa o proceso infundibular y tallo infundibular. El tallo infundibular es la zona de paso de las fibras neurosecretoras peptidérgicas que terminan en los capilares del proceso infundibular. La pars nervosa se conforma del 42% de los axones provenientes de las neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo, estos sintetizan dos hormonas peptídicas, la oxitocina y la hormona antidiurética (ADH) o vasopresina. Estas hormonas son producidas en el hipotálamo y transportadas hasta el lóbulo posterior de la hipófisis, donde se almacenan y liberan (Fig. 1). La porción superior de esta formación se expande para cubrir la parte inferior del hipotálamo, formando la eminencia media<sup>9, 11,23</sup>.

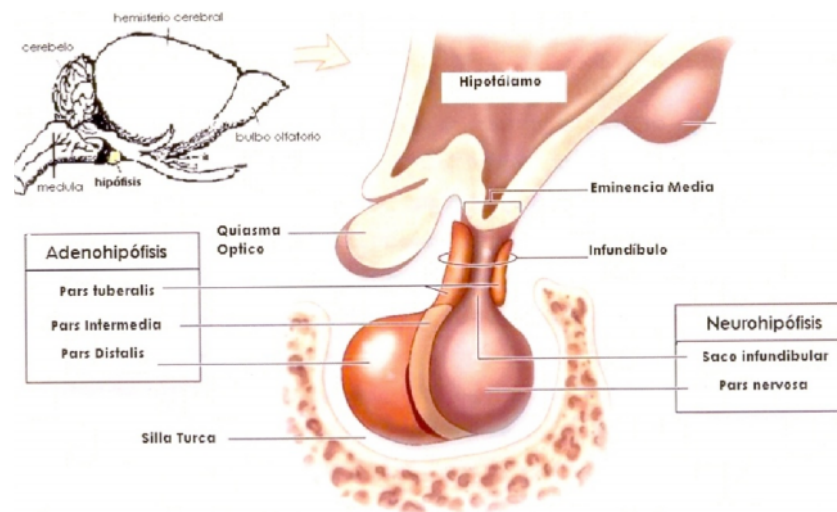


Figura 1. Esquema de la hipófisis<sup>9</sup>.

La pars intermedia o lóbulo intermedio, es una delgada lámina que se encuentra entre el lóbulo posterior y el anterior, según la clasificación puede ser tomada como parte de la adenohipófisis o lóbulo neuro-intermedio cuando se encuentra fusionado al lóbulo posterior. La mayoría de las células que se encuentran en este lóbulo son melanotropos, producen el precursor de proopiomelanocorticotropina (POMC), que posteriormente se divide en  $\beta$ -endorfina y  $\alpha$ -hormona estimulante de melanocitos. Este lóbulo se encuentra directamente innervado por las neuronas hipotalámicas, a través del lóbulo neural<sup>11, 23</sup>.

El lóbulo anterior o adenohipófisis, se divide en pars tuberalis comprende una pequeña porción del lóbulo que se extiende hacia arriba para adosarse en forma de collar al piso del diencéfalo y pars distalis, aquí se encuentra la mayor parte del tejido secretor hipofisiario. Las células de pars distalis pueden dividirse en dos categorías: células que secretan hormonas proteicas y células cuya secreción hormonal es glicoproteica. El primer grupo corresponde a células acidófilas: somatotropos (hormona de crecimiento GH), lactotropos (prolactina), lactosomatotropos (GH y prolactina) y corticotropos (adenocorticotropina ACTH). El segundo grupo se conforma por células basófilas: tirotropos (tirotropina TSH) y gonadotropos (hormona luteinizante y/o folículo estimulante LH y/o FSH). La proporción de cada uno de estos tipos celulares en la adenohipófisis varía en el adulto y más en las hembras puede variar en hasta un 10% dependiendo de la edad y etapa del ciclo reproductivo, por lo que en promedio la proporción de somatotropos es de 38.8%, lactotropos 26.8%, corticotropos 9.9%, gonadotropos 7%, tirotropos 3.6% y células folículo-estrelladas 4.3%(Figura 2)<sup>7, 9, 11</sup>.

El sistema porta-hipofisiario es una complicada red de vasos porta largos y cortos que forman una complicada red que irriga a la glándula. La neurohipófisis posee una irrigación común (vasos-arteria-capilares-vasos), mientras que la adenohipófisis por el contrario posee una irrigación excepcional ya que toda la sangre que irriga a las células de este lóbulo pasa primero por el sistema nervioso a nivel de la eminencia media<sup>11, 23</sup>.

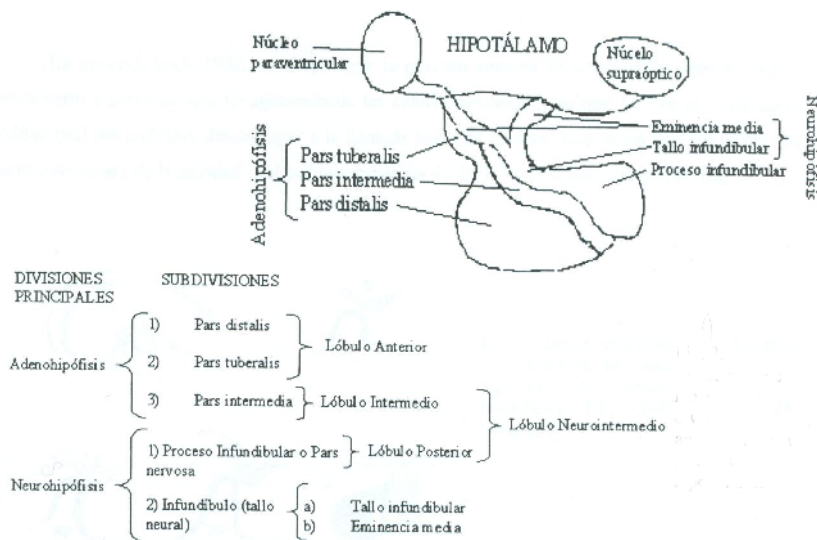


Figura 2. Esquema de la división anatómica de la hipófisis<sup>11</sup>.

### 1.1.2 Función

Como se menciona anteriormente la hipófisis es una glándula y su papel es liberar hormonas (Tabla 1), a continuación se describirá cuales son las hormonas que libera y el papel que desempeñan.

Hormona Hipofisiaria	Tejido blanco	Efecto
TSH	Tiroides	Promueve la liberación de tiroxina y triiodotironina, que se encargan de regular el metabolismo.
LH y FSH	Ovaros y testículos	Promueve la liberación de hormonas esteroideas como los estrógenos y los andrógenos
ACTH	Corteza adrenal	Promueve la liberación de glucocorticoides, mineralocorticoides y gonadocorticoides
GH	Hígado, tejido adiposo	Afecta el crecimiento modificando el metabolismo de proteínas, grasa y carbohidratos
Prolactina	Glándulas mamarias	Promueve el desarrollo de los senos e inicia la producción de leche durante la lactancia
ADH	Riñones	Promueve la reabsorción de agua
Oxitocina	Gónadas, glándulas mamarias y útero	Estimula las contracciones del útero y facilita la liberación de leche

Tabla 1. Hormonas producidas en la hipófisis y su efecto<sup>2</sup>.

En la adenohipófisis los tirotropos liberan la hormona estimulante de la tiroides (TSH) o tirotropina, es una glicoproteína con un peso molecular de 28 kDa que afecta el metabolismo y el crecimiento celular, cuando llega a su blanco, la tiroides, produce la liberación de tiroxina y triiodotironina. La TSH es liberada cuando el hipotálamo secreta la hormona liberadora de tirotropos (TRH) y es a su vez regulada por un asa de retroalimentación negativa que involucra a las hormonas liberadas por la tiroides<sup>2, 31</sup>.

Los gonadotropos secretan dos tipos de gonadotropinas: la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), estas hormonas promueven el desarrollo de los espermatozoides y los óvulos, son controladas por los ovarios y los testículos. Los niveles de estas hormonas son bajos hasta que comienza el proceso de la pubertad y en las hembras varían de acuerdo a la fase del ciclo estral en el que se encuentran. Inicialmente su liberación es provocada por el hipotálamo al secretar la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)<sup>2</sup>.

Los adenocorticotropos son las células encargadas de liberar la hormona adenocorticotropina (ACTH) o corticotropina, es un polipéptido de 39 aminoácidos que estimula el desarrollo celular y la síntesis de hormonas en la corteza adrenal (glucocorticoides, mineralocorticoides y gonadocorticoides). Esta hormona es liberada cuando el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticoides (CRH) y es inhibida por medio de un sistema de retroalimentación negativa que involucra a los glucocorticoides<sup>31</sup>.

Los somatotropos secretan la hormona del crecimiento (GH) o somatotropina, es un polipéptido que está compuesto de 191 aminoácidos y posee un peso de 22 kDa, juega un papel importante en el crecimiento y metabolismo. Esta hormona es liberada cuando el hipotálamo secreta la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH)<sup>31</sup>.

Finalmente los lactotropos secretan prolactina, este es un polipéptido cuyas funciones principales son el desarrollo de las glándulas mamarias durante el embarazo, así como iniciar y mantener la producción de leche, tanto en el embarazo como en la lactancia. Su secreción está regulada por la hormona liberadora de prolactina, que es producida en el hipotálamo, su inhibidor primario es la dopamina. Cabe mencionar que los lactotropos no son las únicas células que producen esta hormona también el cerebro, células del sistema inmune y células del útero durante el embarazo<sup>2, 31</sup>.

La regulación de estas hormonas es indispensable para mantener la homeostasis del cuerpo, por lo que existen tres mecanismos de regulación en esta glándula. El primero de ellos se asocia a pulsos que siguen un ciclo regular, la

fuerza y frecuencia de los pulsos puede estar dada por un ritmo circadiano, o más frecuentemente (ultradiano) o menos frecuente una vez al día (infradiano)<sup>2</sup>.

Estas asas pueden ser asas largas, es decir, se libera la hormona de la adenohipófisis y llega al blanco celular, este produce otra hormona o factor y este inhibe o estimula la hipófisis o el hipotálamo. Las asa cortas hipotálamo son hormonas que se inhiben ellas mismas antes de salir al torrente sanguíneo (ejemplo LH y FSH). Las asas ultracortas (autocrina= implican a las hormonas liberadoras producidas en el hipotálamo, que se inhiben a ellas mismas (ejemplo LHRH o GHRH)<sup>2</sup>.

Finalmente la regulación neural puede estar afectada por factores externos como el estrés, la dieta o enfermedad<sup>2</sup>.

## **1.2Citoesqueleto**

El citoesqueleto de las células eucariotas es un conjunto de estructuras formado por tres clases de proteínas: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Estos elementos interactúan entre sí y al mismo tiempo funcionan independientemente en las células, son estructuras dinámicas más que elementos estructurales pasivos<sup>16</sup> (Figura 3). En la figura de abajo se puede observar cómo es que los elementos del citoesqueleto se encuentran en toda la célula comunicándola con los organelos celulares, entre ellos mismos, con otras células formando uniones celulares o interactuando con moléculas de anclaje.

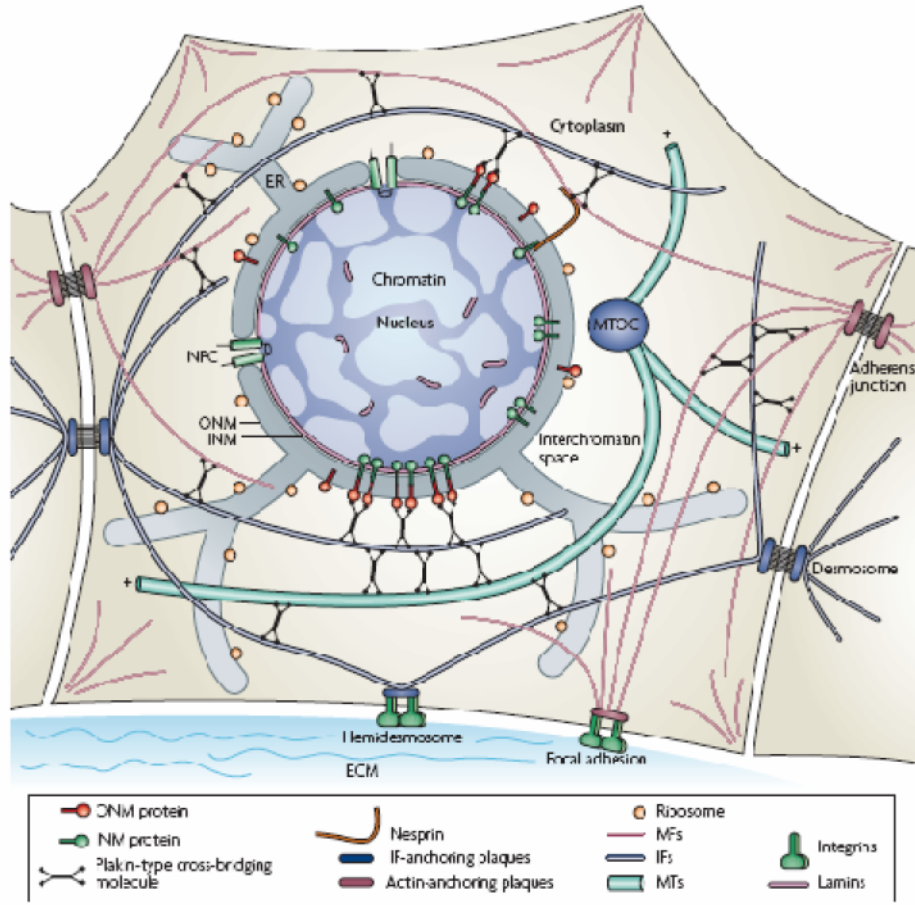


Figura 3. Distribución y organización de los componentes del citoesqueleto<sup>16</sup>.

### 1.2.1 Microtúbulos

Son proteínas que forman un tubo hueco de 25nm de diámetro y cientos de micrómetros de largo. Típicamente está formada por 13 protofilamentos en un arreglo lineal de subunidades globulares de tubulina (Figura 4). Las subunidades son heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina con proteínas asociadas (MAPs) a las paredes de la superficie de los microtúbulos. El principal papel de los microtúbulos es llevar a cabo el transporte intracelular, determinar la morfología celular, formar la estructura que correlaciona al huso mitótico y constituir el centro de los cilios<sup>3, 4, 6</sup>.

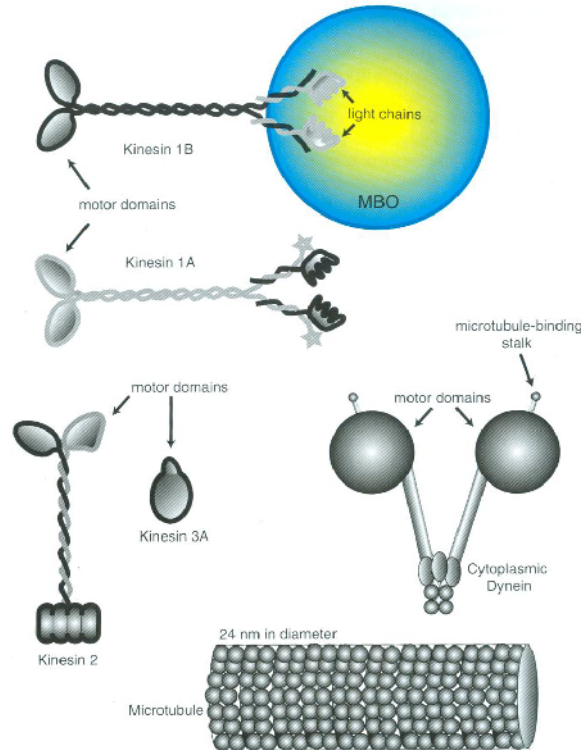


Figura 4. Esquema de la estructura del microtúbulo<sup>4</sup>.

Los microtúbulos en el cerebro se distinguen por su diversidad genética y bioquímica. Existen diversos genes que codifican para las tubulinas y estos son expresados diferencialmente de acuerdo al tipo celular y el estado de desarrollo. Estos isotipos de tubulina varían en su cinética de ensamblaje y en la capacidad de unirse a ligandos <sup>4, 6</sup>(Tabla 2).

<b>Proteínas</b>	<b>Localización y función</b>
<b>Tubulinas</b>	
Tubulina y - tubulina	Se encuentran en casi todas las células excepto en los eritrocitos. Estructura primaria de los polipéptidos de los microfilamentos.
-tubulina	Se encuentran cerca del centro organizador de los microtúbulos en todas las células que contengan microtúbulos. Necesaria para la nucleación de los microtúbulos.
<b>Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)</b>	
MAP1a/1b	Ampliamente expresada en neuronas y glía, incluye axones y dendritas; fosfoproteínas que regulan el desarrollo.
MAP2a/2b y MAP2c	MAPs específicas de dendritas. MAP2c es funcional durante el desarrollo y se restringe a las espinas en los adultos, mientras que MAP2a MAP2b están distribuidas en todo el cerebro de los adultos
LMW tau y HMW tau	Las proteínas tau son abundantes en los axones. Un simple gen de tau sufre un splicing alternativo, dando diferentes isoformas.
<b>Proteínas de corte de microtúbulos</b>	
Katanina	Son abundantes en el centro organizador de los microtúbulos y se piensa que son importantes para la liberación de los microtúbulos, para llevar a cabo el transporte en las dendritas y axones.
<b>Proteínas motoras</b>	
Cinesinas (Cinesina-1s, cinesina-2s, cinesina-3s y otras	Cinesina-1s está asociada a los límites de la membrana de los organelos transportándolos por el axón. Las otras cinesinas se expresan en el desarrollo y están implicadas en el motor mitótico, se restringen a células en división.
Axonemal dineina	Microtúbulos asociados con cilios y flagelos como los de las células ependimales.
Dineina citoplasmática	Formas citoplasmáticas que están involucradas en el transporte axonal de organelos y otros elementos del citoesqueleto.

Tabla 2. Proteínas de microtúbulos presentes en el cerebro<sup>4</sup>.

Las modificaciones postraduccionales más comunes de las tubulinas son la tirosinación, destirosinación, acetilación, desacetilación fosforilación y defosforilación. Las dos primeras están asociadas al ensamblaje de los microtúbulos, pero se conoce poco acerca del papel fisiológico que desempeñan las demás modificaciones<sup>4,6</sup>.



### 1.2.2 Microfilamentos

El citoesqueleto de actina se encuentra en todos los organismos eucariontes, sin embargo es más común asociarlos a delgados filamentos en el músculo esquelético. Los microfilamentos son proteínas de 4-6nm de diámetro y de 400-800nm de largo, su principal papel dentro de la célula es conferirle contractilidad y movimiento (Figura 5). La actina por sí sola no produce el fenómeno de contracción, necesita de otra proteína que en la mayoría de los casos es la miosina<sup>3, 4, 6</sup>.

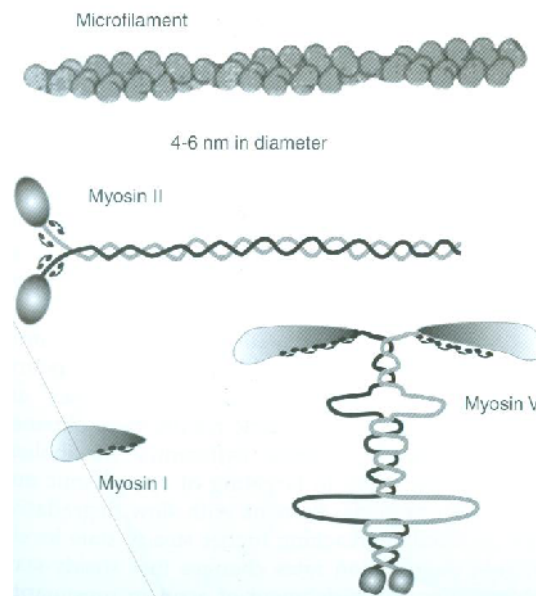


Figura 5. Esquema de la estructura del microfilamento de actina<sup>4</sup>.

Existen varios genes que codifican a la actina (Tabla 3), en humanos han sido clonados 4 genes distintos de  $\alpha$ -actina que se expresan específicamente en diferentes tipos celulares del músculo (músculo esquelético, cardíaco, liso). También existen dos genes de actina en humanos que se expresan en células no musculares ( $\beta$ -actina y  $\gamma$ -actina), estos genes se encuentran ampliamente expresados en células del sistema nervioso. Las secuencias de aminoácidos que se conocen de la actina están ampliamente conservadas, coincidiendo los aminoácidos en dos a tres posiciones, aún la posición de los intrones está conservada entre las diferentes especies y genes<sup>4, 6, 18, 19</sup>.

<b>Actinas</b>
-actina (músculo liso)
-actina (células neurales y no neurales)
<b>Proteínas de anclaje al monómero de actina</b>
Profilina
Tiomisina 4 y 10
<b>Proteínas de terminación</b>
Ezrina/radixina/moesina
Schwannomina/merlina
<b>Gelsolina y otras proteínas de corte de microfilamentos</b>
Gelsolina
Vilina
<b>Proteínas de ensamblaje y andamiaje</b>
Espectrina
Distrofina, utrofina, y proteínas relacionadas a $\alpha$ -actina
<b>Tropomiosina</b>
Miosinas I, II, V, VI, VII

Tabla 3. Proteínas componentes o asociadas a microfilamentos<sup>4</sup>.

### 1.2.3 Filamentos Intermedios

Los filamentos intermedios (IF) poseen un diámetro de 8-12 nm. Comparten un dominio  $\alpha$ -helicoidal característico de unos 310 aminoácidos que contiene una región hidrofóbica repetida (región  $\alpha$ -helicoidal compuesta de una secuencia repetida de 7 aminoácidos), esencial para el ensamblaje, situado en la parte central o cuerpo del filamento. Flanqueando este cuerpo central se encuentra la cabeza globular (extremo amino-terminal) y la cola (extremo carboxilo-terminal), los cuales son marcadamente divergentes en tamaño y secuencia entre las distintas subunidades. El ensamble de estos filamentos es sencillo, los monómeros se unen en paralelo y enrollan, ya que está formado el dímero estos dímeros se ensamblan en forma antiparalela para formar tetrámeros apolares y así sucesivamente (Figura 6). Los IFs se han clasificado basándose en la posición de los intrones-exones y en las similitudes entre sus secuencias. En los humanos los filamentos intermedios son codificados por al menos 65 genes, lo que da como resultado una gran familia de proteínas con una limitada identidad en su secuencia. Esto constituye una gran diferencia entre los microtúbulos y los microfilamentos<sup>16, 18, 19</sup>.

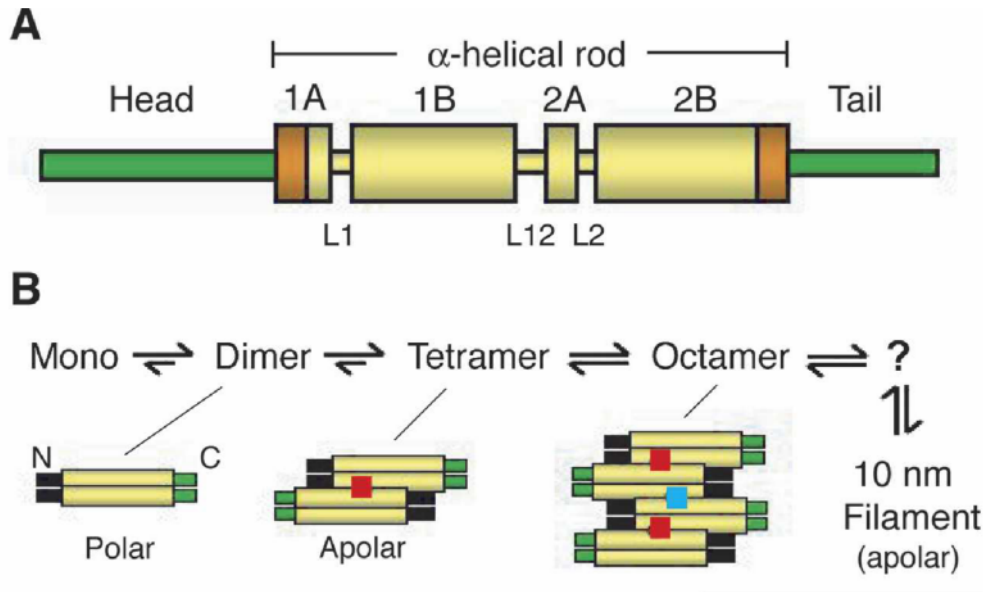


Figura 6.A) Esquema de la estructura de un IF. B) Esquema de ensamblaje de los IFs<sup>18</sup>.

Las proteínas IF han sido agrupadas en cinco tipos diferentes, o clases de secuencia de homología, en base a la identidad de la secuencia de sus aminoácidos. Las queratinas ácidas están agrupadas en el tipo uno, mientras que las queratinas básicas son del tipo dos. La vimentina, desmina y la proteína ácida fibrilar glial son del tipo 3. Los neurofilamentos son del tipo 4 y finalmente las láminas nucleares son del tipo 5 (Tabla 2). Empleando un criterio basando en la función de los IFs, pueden ser subdivididos en tres subgrupos independientes, de acuerdo a la manera en que se ensamblan: queratinas, vimentinas y láminas<sup>18, 19</sup>.

<b>Clase y nombre</b>	<b>Tipo celular</b>
<b>Tipo I y II</b>	
Queratinas ácidas y básicas	Células epiteliales y endoteliales
<b>Tipo III</b>	
Proteína ácida fibrilar glial	Astrocitos y células de Schwann no mielinizadas
Vimentina	Neuroblastos, glioblastos, fibroblastos
Desmina	Músculo liso
Periferina	Neuronas periféricas y centrales
<b>Tipo IV</b>	
Neurofilamentos	En la mayoría de las neuronas
-internexina	Neuronas en desarrollo, fibras paralelas del cerebelo
Nestina	Células del neuroectodermo temprano
<b>Tipo V</b>	
Lámina nuclear	Membranas nucleares

Tabla 4. Tipos de filamentos intermedios y su localización en el Sistema nervioso<sup>4</sup>.

## 1.3 Neurofilamentos

### 1.3.1 Estructura

Los neurofilamentos (NFs) son los filamentos intermedios predominantes en la mayoría de las neuronas, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Los neurofilamentos consisten en un triplete de polipéptidos: los NFs de bajo peso molecular (NF-L 60-70 KDa), de medio peso molecular (NF-M 140-160 KDa) y alto peso molecular (NF-H 180-200 KDa) (Figura 7). Existe tres genes que codifican la expresión de las subunidades de los neurofilamentos, a pesar de que todavía no se dilucida el mecanismo de activación de estos genes, se ha visto que el factor de crecimiento neural (NGF) a través de sus receptores de alta afinidad modula la expresión de los NFs y la presencia de estradiol aumenta la expresión de estos, posiblemente a través de estimular un aumento en la expresión del receptor de NGF trkA<sup>11, 14,25</sup>.

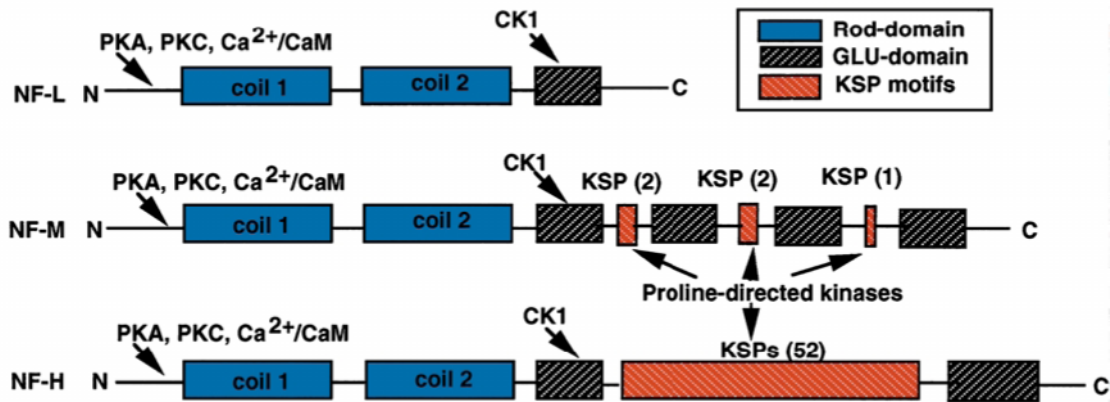


Figura 7. Estructura de los neurofilamentos<sup>14</sup>.

Los NFs pueden formar brazos laterales que se extienden desde el eje central de los filamentos, y parecen formar puentes entre ellos. Estos brazos laterales pueden ser desarrollados por la fosforilación de los extremos carboxilos de las subunidades NF-M y NF-H. A pesar de que los dominios de las cabezas no comparten homologías obvias en su secuencia de aminoácidos, éstas son ricas en serinas y treoninas. La fosforilación y la o-glicosilación de estos residuos se cree que son importantes para la regulación del ensamblaje de los NFs *in vivo*<sup>11, 14, 17</sup>.

Las cantidades molares relativas son de aproximadamente 5:2:1 para las subunidades NF-L, NF-M y NF-H respectivamente, aunque el valor para NF-L varía según el tipo neuronal. Los NFs de medio y alto peso molecular no son capaces de formar filamentos homopoliméricos, solamente en conjunto con NF-L se pueden ensamblar y formar un filamento heteropolimérico. En el proceso de ensamblaje lo primero que se lleva a cabo es la formación de dos cadenas enrolladas, estas se unen con otras y forman un tetrámero, a esto se le llama protofilamento, finalmente 4 protofilamentos se unen de manera enrollada para formar un neurofilamento<sup>6, 11</sup> (Figura 8).

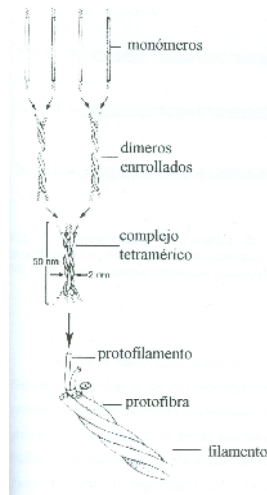


Figura 8. Esquema del proceso de ensamblaje de los neurofilamentos<sup>11</sup>.

### 1.3.2 Fosforilación

Las proteínas de los NFs, NF-M y NF-H (Figura 7) está altamente fosforiladas en los axones ampliar explicación. Es muy probable que la fosforilación del dominio del cuerpo central del NF-H juegue un papel fundamental en la modulación del transporte, la dinámica y la organización en el axón de los NFs. Este hecho ha desencadenado una búsqueda generalizada de las cinasas responsables. Entre las cinasas asociadas a NFs se encuentran: la cinasa A, la cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), la casein cinasa I y II, NFAK 115, PK 40 y la protein cinasa C. Las cinasas del tipo casein cinasas I y NFAK 115 se ha visto que fosforilan la cola de NF-H y pueden representar distintas clases de cinasas específicas de los dominios de lisina-serina-prolina (KSP) (Figura 9). Algunos de los lugares de fosforilación de la quinasa A se hallan en las cabezas de los NF-L y NF-M, y la unión de fosfato en esta región puede causar desensamblaje de los NFs reensamblados<sup>1, 25, 28,32</sup>.

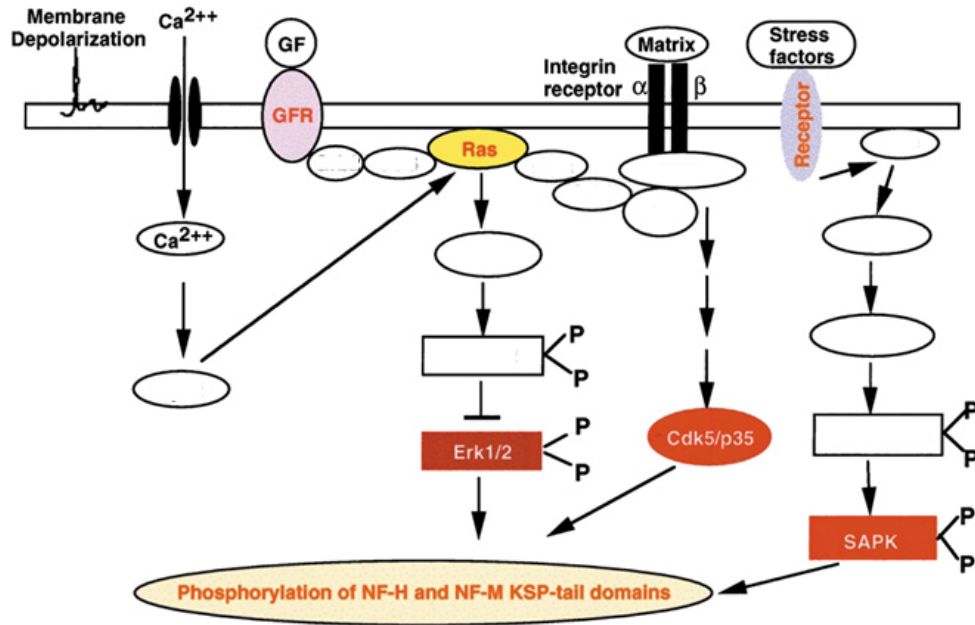


Figura 9. Cascada hipotética de fosforilación d los NFs<sup>14</sup>.

### 1.3.3 Expresión

El proceso de expresión de los neurofilamentos todavía no está claramente dilucidado, sin embargo al tratar células PC12 con NGF se estimula la expresión de periferina, siguiendo con un incremento en los niveles de expresión de los tres tripletes de NF. Los niveles de mRNA de NF-H no disminuyen, sin embargo, la cantidad de proteína se incrementa, por lo que se dice que se incrementa la traducción de NF-H. Los niveles de mRNA de NF-M se estabilizan, pero se incrementa la traducción de NF-M y NF-L. Esto sugiere que el establecimiento de conexiones sinápticas por los nervios periféricos, provoca la adquisición de factores que estabilizan el mRNA o que libera factores que desestabilizan al mRNA de los NFs<sup>30, 32</sup>.

Durante el desarrollo se ha visto que entre los días posnatales 5 y 10 la traducción de los NFs se ve disminuida, mientras que los niveles de mRNA se incrementan, sin embargo la traducción de NF-M se incrementa, lo que indica que los mecanismos de regulación de NF-M son distintos a los de NF-H y NF-L<sup>17,30</sup>.

NF-L y NF-H, también presentan diferencias en cuanto al control de su traducción y transcripción, esto se observó cuando al medir las cantidades molares de mRNA de ambos la diferencia era de 100-200 veces, siendo mayor en NF-L que en NF-H. Cuantificado la cantidad de proteína la diferencia era dos

veces mayor en NF-L que en NF-H, demostrando que el control transcripcional de NF-L es más rígido que el de NF-H<sup>30</sup>.

Al estudiar las enfermedades neurodegenerativas, se ha visto que las mutaciones en NF-L causan cúmulos de NFs, lo que indica que el NF-L podría jugar un papel crucial en la regulación del ensamblaje de neurofilamentos. Al experimentar con ratones transgénicos con un cambio en la región 3'URT de NF-L se observó que se formaban estos cúmulos de NFs. Estos experimentos se llevaron a cabo también para NF-M, ya que es una región muy conservada, esta región consta de motivos CAGGA, está en todos los tripletes de NFs, causando efectos similares indicando que esta región juega un papel importante en la regulación de estos genes. Con base en esto se diseñó un diagrama del posible control de expresión de los neurofilamentos<sup>22, 30</sup> (Figura 10).

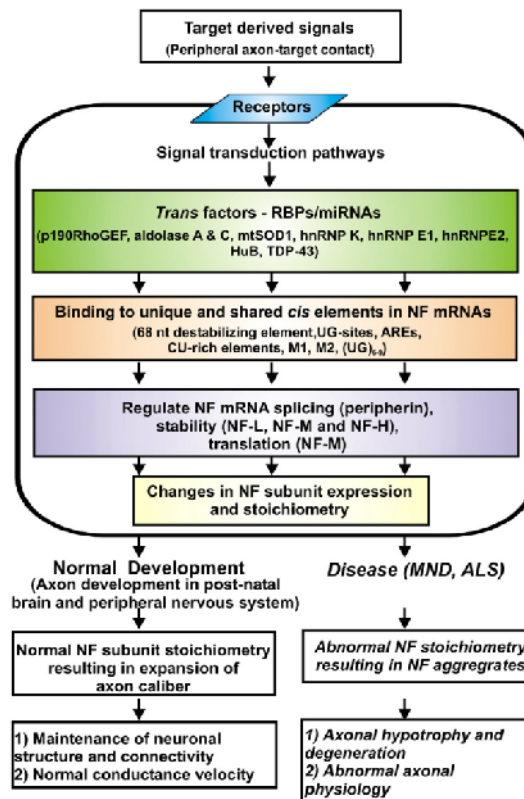


Figura 10. Esquema de la posible ruta de control de la expresión de los NFs<sup>30</sup>

### 1.3.4 Función

El principal papel de los neurofilamentos que se ha descrito hasta ahora es el de determinar el calibre axonal, dado sus características de poseer brazos, estos son capaces de interactuar con otros neurofilamentos y con otros componentes del



citoesqueleto (Figura 11). La deficiencia de los neurofilamentos provoca varias neuropatologías, es un marcador de varias enfermedades neurodegenerativas<sup>25</sup>.

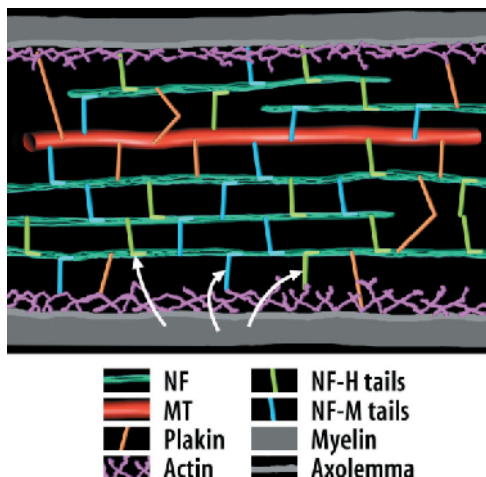


Figura 11. Esquema del arreglo de los neurofilamentos con otros componentes del citoesqueleto<sup>19</sup>.

Se ha visto que los neurofilamentos se encuentran sobre todo en el sistema nervioso, en específico en las neuronas, sin embargo, Fiordeliso et al (2002) demostraron la presencia de neurofilamentos en la hipófisis. Hicieron cultivos de ratas los cuales marcaron contra anti-rat 68kDa, con lo cual observaron la inmunoreactividad de las células de la adenohipófisis, encontraron que los neurofilamentos están presentes en este tejido (Figura 12). También vieron como era la proporción en diferentes etapas del desarrollo y se percataron de que entre más edad tenga el individuo la cantidad de células que presentan los neurofilamentos es mayor, por lo que infirieron que la presencia de estrógeno influye en la expresión de los neurofilamentos. Así mismo compararon hembras con machos, observando que existe una diferencia en cuanto a la cantidad de células que presentan los neurofilamentos, por lo que esta expresión es dimórfica, siendo mayor en hembras. Finalmente observaron la proporción de células que poseen neurofilamentos, identificando las diferentes subpoblaciones celulares de la adenohipófisis<sup>12</sup>.

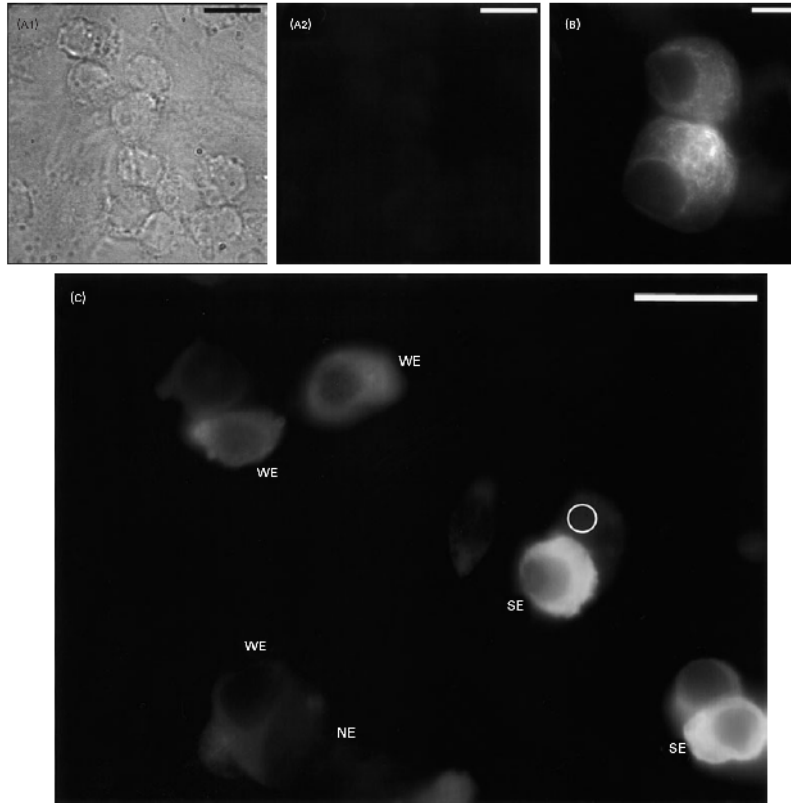


Figura 12. Imagen de microscopia de fluorescencia del neurofilamento de 68 kDa (NF68). (A) Inmunofluorescencia de NF68 de las células de ovario de hámster chino (CHO), empleadas como control negativo. (A1) Micrografía de fase de contraste. (A2) Imagen de epifluorescencia del mismo campo mostrando la inmunoreactividad de las células CHO. (B) Imagen de epifluorescencia del cultivo de neuronas simpáticas de rata, usadas como control positivo. (C) Cultivo primario de células de la hipófisis, se obtuvieron de una rata hembra de 60 días. Se muestran ejemplos de células sin expresión (NE), baja expresión (WE) y alta expresión (WE)<sup>12</sup>.

En resumen los NF-L se expresan dimórficamente, siendo mayor en hembras, esta expresión es afectada por los niveles circundantes de estrógenos y las subpoblaciones celulares de la adenohipófisis presentan diferencias de expresión. Hasta ahora no se ha identificado el papel que desempeñan los neurofilamentos en la hipófisis, ni se ha vislumbrado a que se deben esas diferencias<sup>12</sup>.

## **2. Hipótesis**

Las diferencias de expresión de los neurofilamentos en la glándula de la hipófisis se deben a cambios que ocurren a nivel de traducción.

Los neurofilamentos presentan diferencias. Pensar una mejor hipótesis.

## **3. Objetivo**

Determinar las posibles diferencias de transcripción o traducción de neurofilamentos en la glándula de la hipófisis.

### *3.1 Objetivos particulares*

Observar las diferencias moleculares de las proteínas de NF-L tanto fosforiladas como no fosforiladas.

Cuantificar la cantidad de mRNA, para determinar si los cambios observados son a nivel de mRNA.

Analizar la secuencia del mRNA, para establecer posibles diferencias en el RNA.

## 4. Materiales y Métodos

Todos los estudios con animales se realizaron bajo un protocolo institucionalmente aceptado similar a la guía de USPHS para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Las ratas Wistar se mantuvieron en el bioterio del Instituto bajo un régimen de 12 horas luz-oscuridad y se alimentaron ad libitum. El día del experimento los animales fueron decapitados bajo anestesia con pentobarbital y las glándulas hipofisarias de ratas hembras y macho se disectaron bajo condiciones asépticas.

### 4.1 Determinación del ciclo estral

El ciclo estral de la rata comprende 4 fases: proestro, estro, metaestro (diestro1) y diestro. Los cambios asociados al ciclo permiten reconocer cada una de las etapas (Tabla 5), en este caso a través de un frotis vaginal.

<b>Fase del ciclo estral</b>	<b>Cambios en los ovarios</b>	<b>Tipos de células en los frotis vaginales</b>
Proestro	Rápido crecimiento folicular	Células epiteliales nucleadas
Estro	Ovulación y copulación	Células Cornificadas
Metaestro (diestro 1)	Formación de cuerpos lúteos	Células Cornificadas y leucocitos
Diestro	Cuerpos lúteos formados	Leucocitos y células epiteliales nucleadas

Tabla 5. Distintas etapas del ciclo estral presentando las modificaciones celulares que ocurren en cada una

Justo antes de la decapitación bajo anestesia con pentobarbital, en la mañana del experimento, la fase del ciclo estral fue determinada en ratas ciclantes mediante la examinación microscópica de un frotis vaginal.

### 4.2 Western Blot

Los experimentos de western blot se llevaron a cabo para ver las diferencias de expresión de neurofilamentos entre cada una de las etapas del ciclo estral de rata, se empleo esta técnica ya que permite medir la proteína total de neurofilamentos en hipófisis. La hipófisis y el cerebro de ratas hembras Wistar de 2 meses de edad en diferentes etapas del ciclo estral (estro, diestro y proestro) y ratas macho Wistar de dos meses de edad, fueron disectadas, en el caso de la hipófisis se empleo la adenohipófisis removiendo la neurohipófisis, el cerebro solo se extrajo, se lavaron en DMEM lavados frío. Los tejidos fueron homogeneizados en una solución de Tris HCl 50mM, 1% Nonidet P40 y 0.5% deoxycholate pH 7.5, con inhibidores de enzimas (inhibidores de enzima 10 mg/ml, aprotinina 1.5 µg/ml

y fenil-metil-sulfonil-floride, PMSF 1mM). La cantidad de proteína se cuantificó utilizando el método Bradford.

Un vez obtenida la cantidad de proteína por muestra, se determinó emplear geles de 1 mm de grosor, con una concentración de acrilamida al 4% en el concentrador y al 8% en el resolvidor para obtener una mejor resolución de las proteínas de bajo peso molecular (68 kDa). Se realizaron varias pruebas de expresión y detección para los western blots y se determinó utilizar la cantidad de 100 µg de proteína total para todas las muestras.

Para realizar la electroforesis, la cantidad de homogenado de proteína total y el marcador de peso molecular se mezclaron con una solución de -mercaptoetanol y azul de bromofenol, posteriormente las muestras se calentaron durante 10 min y se colocaron en cada uno de los pozos del gel. Los geles se corrieron durante 2 horas a 30V y 2 horas a 60V, terminado esto, los geles fueron electro transferidos a una membrana de PVDF (Polivinildenefluoride) durante toda la noche a 30V con corriente constante, en un cuarto frío y agitación constante, esta membrana posteriormente fue teñida con rojo de Ponceau.

Para la inmunotinción las membranas de PVDF, se lavaron en TBS(Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 7.5) durante 10 min, posteriormente se bloqueo durante 1 h con una solución de bloqueo (leche al 5% en Buffer TBS-Tween 1% tween), posteriormente se enjuagaron y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario anti-NF68 fosforilado o no fosforilado (Zymed) o anti-NF200 (Dako) (1:100) diluido en TBS-tween-albúmina 1%, después de la incubación se realizaron 3 lavados con TBS-tween y se incubó durante 2 h con el anticuerpo secundario anti-ratón con fosfatasa alcalina (1:10000) diluido en TBS.tween-albúmina 1%. Se realizaron 3 lavados con TBS-tween y una vez enjuagada la membrana con TBS, se incubó durante 5 minutos con una solución de revelado quimioluminiscente (Healthcare) y finalmente la membrana se expuso por diferentes tiempos a una placa fotográfica (KodaxX-omat) que se reveló.

#### *4.3 Extracción RNA*

La extracción de RNA se realizó en el laboratorio del Dr. René Drucker Colin en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Al igual que en la extracción de proteína, la hipófisis de ratas hembras Wistar de 2 meses de edad en diferentes etapas del ciclo estral (estro, diestro y proestro) y ratas Wistar macho de dos meses de edad, se disectó, se empleó la adenohipófisis removiendo la neurohipófisis, se extrajo el cerebro y se lavaron en DMEM lavados frío. El procedimiento siguiente se llevo a cabo en condiciones libres de DNAsas y RNAsas. Los tejidos fueron homogeneizados en trizol (Invitrogen), posteriormente

se agregó cloroformo (JTBaker) y centrifugó a 4°C, se extrajo el sobrenadante, se adicionó isopropanol (JTBaker) y se centrifugó a 4°C, finalmente se lavó con alcohol al 70% agua con DEPC (Dietileno Pirocarbonato), se volvió a centrifugar y se resuspendió en 25 µl de agua con DEPC, se corrió 1 µl de muestra en un gel de agarosa al 0.8% para ver la pureza del RNA, el resto se guardo a -70°C.

#### 4.4 Elaboración de cDNA

Para obtener el cDNA se midió la cantidad de RNA en un Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific) en el laboratorio del Dr. Diego González Halphen en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, posteriormente se utilizó el kit SuperScript® III Reverse Transcriptase de Invitrogen, añadiendo 1 µg de RNA (Tabla 6).

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
RNA	Depende de la concentración que se tenga
Oligo T	1µl
dNTPs	1µl
Agua con DEPC	Lo que haga falta para completar la reacción

Tabla 6. Reactivos que se usaron para la primera etapa de la elaboración de cDNA y las cantidades que se emplearon por reacción.

A continuación se llevó la segunda reacción (Tabla 7).

Reactivo	Cantidad
10X RT buffer	2µl
MgCl <sub>2</sub>	4µl
DTT	2µl
RNAse out	1µl
SSIII	1µl

Tabla 7. Reactivos que se usaron para la segunda etapa de la elaboración de cDNA y las cantidades que se emplearon por reacción

#### 4.5 Elaboración de Primers

Las secuencias de genes de neurofilamentos de rata se obtuvieron de la base de datos de Ensembl Genome Browse, posteriormente las secuencias se metieron al programa Oligo Carbon 5.0 y se diseñaron los primers, para los primers de PCR se diseñaron 4 primers para NF-H, NF-M, NF-L carboxilo terminal y NF-L completo (tabla). Para los primers para el RT-PCR se diseñaron primers mas pequeños y solo para NF-L y GPDAH (Tabla 8). Se mandaron a hacer a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Primer	Secuencia
NF-H Forward	5' GAG GCA GCC AAA GTG AAC ACA GAT GCT ATG 3'
NF-H Reverse	5' CCG GAT CTC TTC TGT CTG TCC TTC TAC AAT 3'
NF-M Forward	5' CGA CTA CAA ACT GTC CCG CTC TAA CGA GAA 3'
NF-M Reverse	5' CGC CGT GGA GAT GTC TGT CTT CAG GTA ATC 3'
NF-L C-term Forward	5' CTA ACC GAG AGC GCC GCC AAG AAC ACC GAC 3'
NF-L C-term Reverse	5' TCA ATC TTT CTT CTT AGC CAC CTG CTC CTC 3'
NF-L Completo Forward	5' ATG AGT TCG TTC GGC TAC GAT CCG TAC TTT 3'
NF-L Completo Reverse	5' TCA ATC TTT CTT CTT AGC CAC CTG CTC CTC 3'
NF-L qPCR Forward	5' TAC CAG CCA CGT CCA GGA AGA GCA GTC AGA 3'
NF-L qPCR Reverse	5' CCT CAC CAC CTT CTT CTT CTT TGG CAT CT 3'
GAPDH Forward	5' AAT GGT GAA GGT CGG TGT GAA C 3'
GAPDH Reverse	5' AGG TCA ATG AAG GGG TCG TTG 3'

Tabla 8. Secuencias de los primers elaborados.

#### 4.6 PCR en tiempo real

El PCR en tiempo real (RT-PCR) se realizó con el fin de determinar posibles diferencias a nivel de expresión génica, se empleo el cDNA, los primers y el kit EVA QPCR (Tabla 9), las muestras se metieron en el termociclador de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, para llevar a cabo la reacción de PCR.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>
Eva QPCR SuperMix (2x)	20 µl
PCR forward primer	1 µl
PCR reverse primer	1 µl
Reference Dye ROX	2 µl
Template	4 µl
Nuclease-free PCR grade water	12 µl

Tabla 9. Reactivos utilizados en el RT-PCR y las cantidades que se utilizaron por reacción.

#### 4.7 PCR

El experimento de PCR se realizó para separar el cDNA de neurofilamentos, para esto se utilizó Taq Polimerase Titanium y buffer Titanium (Clontech), dNTP's (invitrogen), agua desionizada estéril, los primers diseñados (NF-H, NF-M, NF-L carboxilo terminal y NF-L completo) y el cDNA de las muestras (Tabla 10), se pusieron a reaccionar en un termociclador (Biosistemas) con el protocolo para cada primer.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
H <sub>2</sub> O (estéril)	23..5µl
Buffer Titanium	3µl
dNTPs	1µl
Primer	1µl
Enzima Titanium	0.5µl
DNA	1µl

Tabla 10. Reactivos utilizados para llevar a cabo el PCR y las cantidades empleadas por reacción.



Posteriormente se extrajeron 5 µl de muestra, se le agregó 1µl de buffer de cargado y se pusieron a migrar en un gel de agarosa al 1% con una escalera (Invitrogen) a 120V durante 20 minutos, el resto de la muestra se guardó a 4 °C.

#### 4.8 Células Competentes

Se sembraron las células DH5 en un medio de agar bacteriológico (15gr) con Luria Broth (LB) (25gr) y se dejó cultivando toda la noche, posteriormente se tomó una colonia de las células sembradas y se puso en 100ml de LB (2.5gr en 100ml). Se dejaron incubando a 37°C por alrededor de 3 horas o más hasta que se tuvo una concentración que no excediera las 10<sup>8</sup> células.

Todos los pasos siguientes se hicieron en condiciones de esterilidad. Se agregaron 50ml de las bacterias en el LB a un tubo Falcon de 50ml, se centrifugaron a 4000rpm por 10min a 4°C en un rotor Sorval GS3, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en 10ml 0.1M de CaCl<sub>2</sub> frío, se centrifugaron a 4000rpm por 10 min a 4°C se eliminó el sobrenadante se resuspendieron en 2ml 0.1M de CaCl<sub>2</sub> frío y finalmente se guardaron a -72 °C en alícuotas de 200µl.

#### 4.9 Transformación

Para observar si existe un splicing alternativo se tienen que secuenciar los cDNAs obtenidos, para esto se transformaron células DH5 con el cDNA amplificado que se obtuvo del PCR. Se purificaron los productos de PCR utilizando el kit Qiaprep Miniprep (Quiagen), una vez obtenidos los productos purificados se realizó la reacción de ligación, se utilizó el vector PGem-T-easy Vector (Promega) (Tabla 11) dejando la reacción toda la noche a 4°C.

<b>Componentes de la reacción</b>	<b>Volumen</b>
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1 µl
PCR product	3 µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1 µl
nuclease-free water	0 µl

Tabla 7. Reactivos utilizados para la reacción de ligación y las cantidades que se usaron por reacción.

Una vez obtenida la reacción de ligación, se insertó en las células DH5 , todo esto se realizó en condiciones estériles, se utilizaron 100 µl de las células DH5 por cada 10 µl de reacción de ligación, se sometieron a un choque térmico y posteriormente se vertieron en un medio líquido de LB durante 2 h, luego fueron sembradas en un medio sólido de LB-Agar con estreptomycin, IPTG (Isopropyl - D-1-thiogalactopyranoside) y X-Gal (bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside), se

dejaron durante toda la noche a 37°C. Una vez obtenidas las colonias de células, se tomaron las colonias blancas y se resembraron en un medio líquido de LB a 37°C y a 200rpm, durante 16 h. Posteriormente se purificaron los plásmidos utilizando el kit Quiaprep Miniprep (Quiagen) y se guardaron a -32°C.

#### 4.10 Secuenciación

Ya obtenidos los plásmidos purificados, se realizó el proceso de digestión utilizando el kit EcoRI (Promega) (Tabla 8), para la confirmación de las clonas, posteriormente se cuantificaron los plásmidos en el nanodrop, se mandaron secuenciar con una concentración de 300ng a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
sterile, deionized water	32.6µl
RE 10X Buffer	4µl
Acetylated BSA, 10µg/µl	0.4µl
DNA, 1µg/µl	2µl
Restriction Enzyme, 10u/µl	1µl

Tabla 8. Reactivos empleados en la digestión y las cantidades que se usaron por reacción

## 5. Resultados

Los resultados del western blot nos permiten observar las diferencias en la cantidad de proteína de un tejido completo y sus características de peso molecular. Al analizar el western blot, de las proteínas de neurofilamento no fosforiladas (Figura 13), se observa que hay una diferencia en el peso molecular 2) se observan dos isoformas, 3) se observan diferencias en la cantidad en cuanto a la cantidad de proteína de acuerdo a la etapa del ciclo estral de la rata y si es macho o hembra. También se puede distinguir dos isoformas distintas a las del control lo que nos indica que existen diferencias en cuanto a la proteína que se expresa en el cerebro y la que expresa la hipófisis, así mismo se ven diferencias de expresión respecto al ciclo estral, se observa que el proestro contiene mayor cantidad de proteína que las demás condiciones, el estro es la que presenta menor cantidad de proteína y finalmente el diestro y macho presentan cantidades similares.

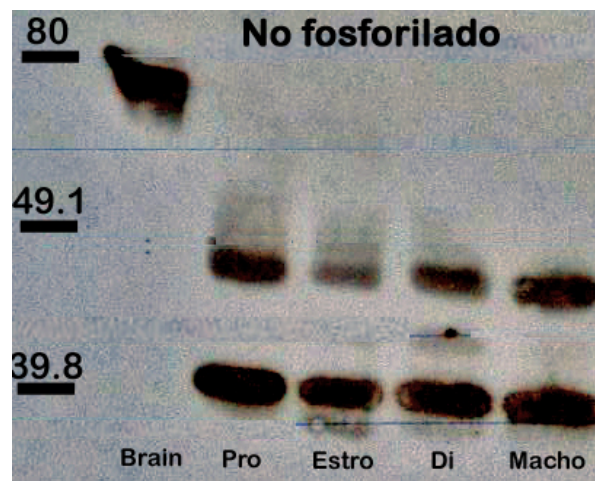


Figura 13. Imagen del western blot de los neurofilamentos no fosforilados con las condiciones cerebro, proestro (Pro), estro, diestro (Di) y macho.

En la proteína de neurofilamento fosforilado, también se observan diferencias entre hembra y macho, así como entre las diferentes etapas del ciclo estral, de igual manera se observan dos diferentes isoformas a la del control (Figura 14), lo cual nos indica que a parte de la fosforilación existe otro proceso por el que NF-L está siendo modificado. De igual manera se ven diferencias de expresión respecto al ciclo estral, se observa que el macho y el proestro presenta cantidades similares, mientras que el diestro presenta mayor cantidad que estos, pero menor que el estro.

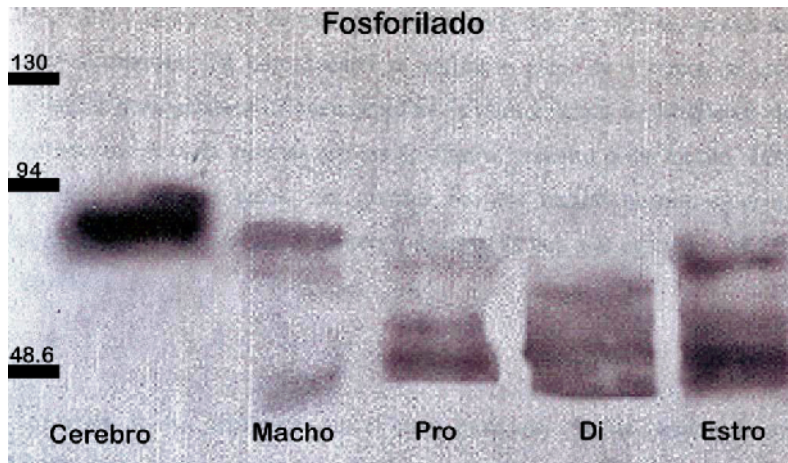


Figura 14. Imagen del western blot de los neurofilamentos fosforilados con las condiciones cerebro, proestro (Pro), estro, diestro (Di) y macho.

Para resolver completamente a que se deben los cambios en cuanto a la cantidad de NF-L presente en las células adenohipofisarias, se llevo a cabo un RT-PCR, en el cual se puede observar que no existen cambios en la cantidad de mRNA que se produce en la adenohipófisis (Figura 15), tanto entre hembra y macho, como entre cada etapa del ciclo estral y el control. Con estos resultados se puede decir que los cambios en la cantidad de NF-L, en la adenohipófisis, se deben a cambios a nivel de traducción o a nivel de proteína.

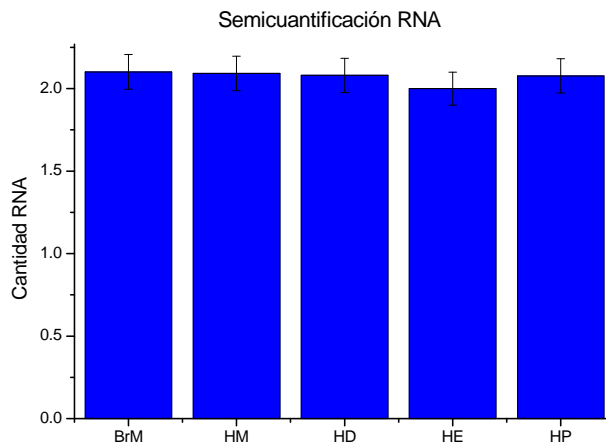


Figura 15. Gráfica de la expresión de RNA medido por RT-PCR de neurofilamentos de 68 kDa. Se emplearon muestras de cerebro de macho (BrM), adenohipófisis de rata macho (HM), ratas hembras en diestro (HD), estro (HE) y proestro (HP).

Para ver si las isoformas que se obtuvieron se deben a un splicing alternativo, se llevó a cabo una secuenciación, lo primero que se hizo es un PCR para amplificar y separar los cDNAs de interés. El primero de estos es el NF-L completo (Figura 16), en el cual se puede observar que esta presente en todas las muestras, y no presenta posibles isoformas ya que solo se observa una sola banda.

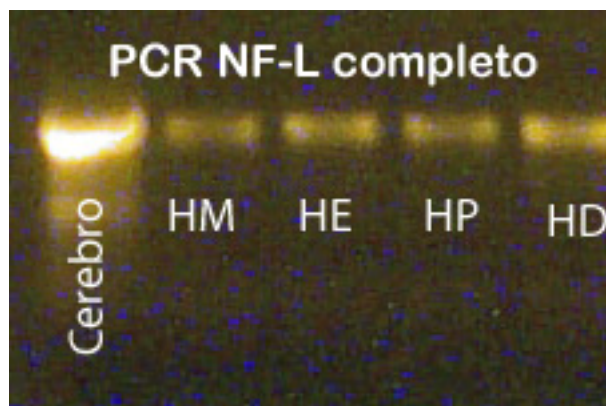


Figura 16. Imagen de PCR de NF-L completo con las condiciones cerebro, hipófisis macho (HM), hipófisis estro (HE), hipófisis proestro (HP) e hipófisis diestro (HD).

Para el caso del NF-L C-term (Figura 17), se observa que esta presente en todas las muestras, sin embargo se observa que existen dos bandas en todas las

muestras con excepción del control (cerebro), lo que nos indica que pueden existir dos isoformas y esto explicaría las isoformas que se observan en los geles.

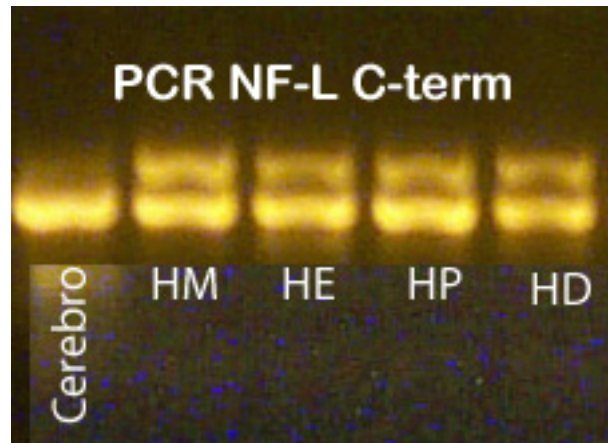


Figura 17. Imagen de PCR de NF-L C-term con las condiciones cerebro, hipófisis macho (HM), hipófisis estro (HE), hipófisis proestro (HP) e hipófisis diestro (HD).

Se repitió el PCR de NF-L C-term (Figura 18), pero solo para las muestras de Hipófisis macho e Hipófisis en estro, para corroborar la presencia de las dos bandas y determinar las kilobases que posee el producto. Agregar Kilobases y cuantas kilobases de diferencia hay



Figura 18. Imagen de PCR de NF-L C-term con las condiciones hipófisis macho (HM) e hipófisis estro (HE).

Antes de mandar a secuenciar los plásmidos se llevó a cabo una digestión con EcoRI (Figura 19), esto para comprobar si los plásmidos que se obtuvieron poseen tanto el vector como el DNA insertado, como se puede apreciar todas las

muestras presentan tanto el vector como el DNA, y con base en la cantidad de kilobases que debe de tener el DNA, corroboramos que en efecto todas las muestras poseen el DNA requerido.

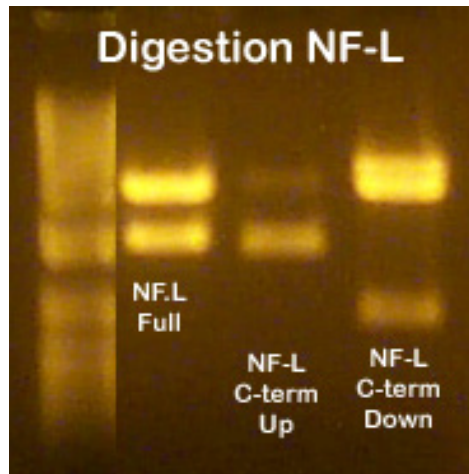


Figura 19. Imagen de la digestión con EcoRI con de plásmido de neurofilamentos de alto peso molecular (NF-H), neurofilamentos de peso molecular medio (NF-M), neurofilamentos de bajo peso molecular completo (NF-L Full), neurofilamentos de bajo peso molecular región carboxilo terminal de mayor número de kilobases (NF-L C-term Up) y neurofilamentos de bajo peso molecular carboxilo terminal de menor número de kilobases (NF-L C-term Down).

Finalmente se mandaron secuenciar para ver si existía un splicing alternativo, ya que se ha observado que los filamentos intermedios tienen una gran propensión a presentar splicing alternativo, sobre todo en la región del carboxilo terminal (Kim S. et al. 2009), sin embargo los resultados del alineamiento de las secuencias obtenidas contra el gen de la base de datos en la región del carboxilo terminal no presentan diferencias entre ellas (Figura 20), primero se presenta la secuencia de los ácidos nucleicos en el cual todos los ácidos concuerdan y adelante se presenta la gráfica de alineación, que de haber diferencias en la secuencia mostraría una línea seccionada, lo que nos indica que no existe una diferencia en la secuencia y por lo tanto un splicing alternativo.

NefLight + AG CAGAATGCAG ACATCAGCGC CATGCAGGAC>  
Nefl rat c AG CAGAATGCAG ACATCAGCGC CATGCAGGAC

NefLight + ACAATCAACA AACTGNAGAA TGAGCTGCGA AGCACGAAGA GCGAGATGGC>  
Nefl rat c ACAATCAACA AACTGGAGAA TGAGCTGCGA AGCACGAAGA GCGAGATGGC

NefLight + CAGGTACCTG AAGGAGTACC AGGACCTCCT CAATGTCAAG ATGGCATTGG>  
Nefl rat c CAGGTACCTG AAGGAGTACC AGGACCTCCT CAATGTCAAG ATGGCATTGG

NefLight + ACATTGAGAT TGCAGCTTAC AGGAAACTCT TGGAAAGGCGA AGAAACCAGG>  
Nefl rat c ACATTGAGAT TGCAGCTTAC AGGAAACTCT TGGAAAGGCGA AGAAACCAGG

NefLight + CTCAGTTTCA CCAGCGTGGG TAGCATAACC AGCGGCTACT CTCAGAGCTC>  
 Nefl rat c CTCAGTTTCA CCAGCGTGGG TAGCATAACC AGCGGCTACT CTCAGAGCTC

NefLight + GCAGGTCTTT GGCCGTTCTG CTTACAGTGG CTTGCAGAGC AGCTCCTACT>  
 Nefl rat c GCAGGTCTTT GGCCGTTCTG CTTACAGTGG CTTGCAGAGC AGCTCCTACT

NefLight + TGATGTCTGC TCGAGCATT C CAGCCTACT ATACCAGCCA CGTCCAGGAA>  
 Nefl rat c TGATGTCTGC TCGAGCATT C CAGCCTACT ATACCAGCCA CGTCCAGGAA

NefLight + GAGCAGTCAG AGGTGGAGGA GACCATTGAG GCTACGAAAG CTGAGGAGGC>  
 Nefl rat c GAGCAGTCAG AGGTGGAGGA GACCATTGAG GCTACGAAAG CTGAGGAGGC

NefLight + CAAGGATGAG CCCCCCTCTG AAGGAGAAGC AGAAGAGGAG GAGAAGGAGA>  
 Nefl rat c CAAGGATGAG CCCCCCTCTG AAGGAGAAGC AGAAGAGGAG GAGAAGGAGA

NefLight + AAGAGGAGGG GGAGGAAGAG GAAGGTGCTG AGGAGGAAGA AGCTGCCAAG>  
 Nefl rat c AAGAGGAGGG GGAGGAAGAG GAAGGTGCTG AGGAGGAAGA AGCTGCCAAG

NefLight + GATGAGTCTG AAGATGCCAA AGAAGAAGAA GGTGGTGAGG GTGAAGAGGA>  
 Nefl rat c GATGAGTCTG AAGATGCCAA AGAAGAAGAA GGTGGTGAGG GTGAAGAGGA

NefLight + AGACACCAA GAGTCAGAAG AGGAAGAGAA GAAAGAGGAA AGTGCTGGGG>  
 Nefl rat c AGACACCAA GAGTCAGAAG AGGAAGAGAA GAAAGAGGAA AGTGCTGGGG

NefLight + AGGAGCAG>  
 Nefl rat c AGGAGCAA

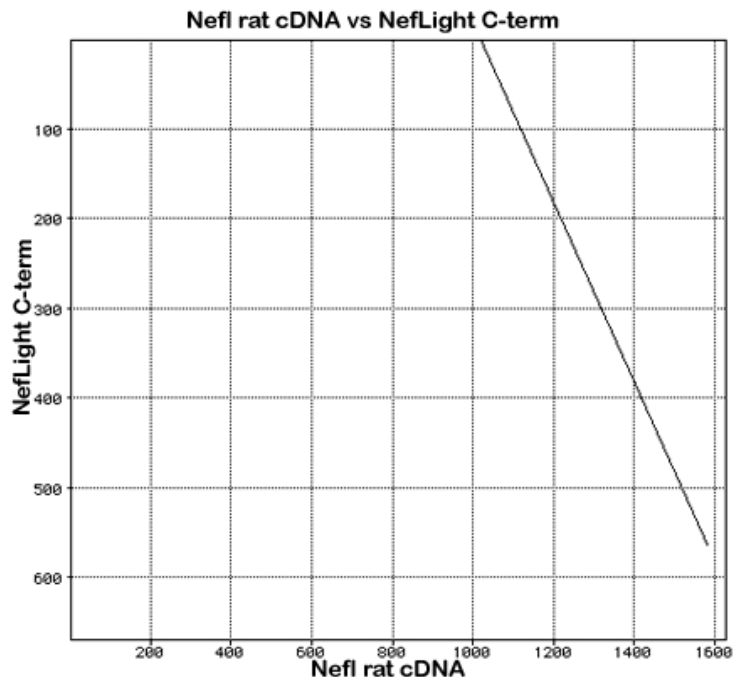


Figura 20. Imagen del alineamiento de la región del carboxilo terminal de neurofilamento de bajo peso molecular (Neflight C-term) contra el cDNA de la region carboxilo terminal que se mando secuenciar (Nefl rat cDNA).



El alineamiento también lo llevamos a cabo en la región del amino terminal (Figura 21), para corroborar que en ninguna región del gen existía alguna modificación, y lo que se obtuvo fue que tampoco existen diferencias en la región amino terminal, por lo que las isoformas que se observan en los western blots se deben a algún cambio postraduccional.

NefLight + GCTACGA TCCGTA CTTT TCGACCTCCT ACAAGCGGCG>  
Nefl rat c GCTACGA GCCGTA CTTT TCGACCTCCT ACAAGCGGCG

NefLight + CTACGTGGAG ACGCCCCGGG TGCACATCTC CAGCGTGCGC AGCGGCTACA>  
Nefl rat c CTACGTGGAG ACGCCCCGGG TGCACATCTC CAGCGTGCGC AGCGGCTACA

NefLight + GCACGGCGCG CTCTGCGTAC TCCAGCTACT CCGCGCCCGT CTCCTCCTCT>  
Nefl rat c GCACGGCGCG CTCTGCGTAC TCCAGCTACT CCGCGCCCGT CTCCTCCTCT

NefLight + CTGTGGTGC GCCGCAGCTA CTCATCCAGC TCCGGCTCTT TGATGCCAG>  
Nefl rat c CTGTGGTGC GCCGCAGCTA CTCATCCAGC TCCGGCTCTT TGATGCCAG

NefLight + CCTGGAGAAC CTCGATCTGA GCCAGGTAGC CGCCATCAGC AACGACCTCA>  
Nefl rat c CCTGGAGAAC CTCGATCTGA GCCAGGTAGC CGCCATCAGC AACGACCTCA

NefLight + AGTCTATCCG CACACAGGAG AAGGCACAGC TGCAGGACCT CAACGATCGC>  
Nefl rat c AGTCTATCCG CACACAGGAG AAGGCACAGC TGCAGGACCT CAACGATCGC

NefLight + TTCGCCAGCT TCATCGAGCG CGTGCACGAG CTGGAGCAGC AGAACAAGGT>  
Nefl rat c TTCGCCAGCT TCATCGAGCG CGTGCACGAG CTGGAGCAGC AGAACAAGGT

NefLight + CCTGGAAGCC GAGCTGTTGG TGCTGCGCCA GAAGCACTCA GAGCCTTCCC>  
Nefl rat c CCTGGAAGCC GAGCTGTTGG TGCTGCGCCA GAAGCACTCA GAGCCTTCCC

NefLight + GCTTCCGCGC CCTGTATGAG CAGGAGATCC GTGATCTGCG ACTGGCGGCC>  
Nefl rat c GCTTCCGCGC CCTGTATGAG CAGGAGATCC GTGATCTGCG ACTGGCGGCC

NefLight + GAAGACGCCA CTAACGAGAA GCAGGCGCTG CAGGGCGAGC GCGAGGGGCT>  
Nefl rat c GAAGACGCCA CTAACGAGAA GCAGGCGCTG CAGGGCGAGC GCGAGGGGCT

NefLight + GGAGGAGACT CTGCGCAACC TGCAGGCTCG CTACGAGGAG GAGGTGCTGA>  
Nefl rat c GGAGGAGACT CTGCGCAACC TGCAGGCTCG CTACGAGGAG GAGGTGCTGA

NefLight + GCCGCGAGGA CGCCGAGGGC CGGCTGATGG AAGCCCGCAA AGGCGCGGAT>  
Nefl rat c GCCGCGAGGA CGCCGAGGGC CGGCTGATGG AAGCCCGCAA AGGCGCGGAT

NefLight + GA>  
Nefl rat c GA

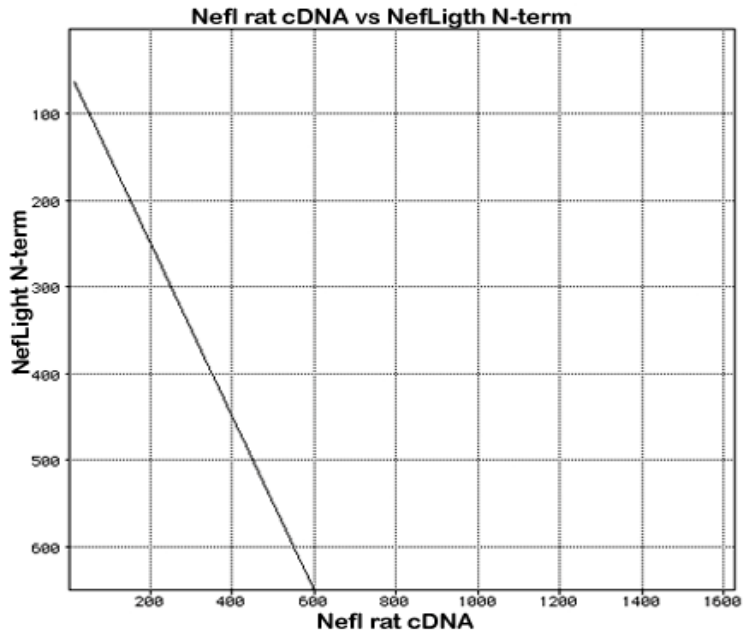


Figura 21. Imagen del alinamiento de la región del amino terminal de neurofilamento de bajo peso molecular (Neflight N-term) contra el cDNA de la región carboxilo terminal que se mando secuenciar (Nefl rat cDNA).

## 6. Discusión

### 6.1 Western Blot

En el western blot se pudo observar que la expresión de NF-L es dimórfica, siendo mayor en las hembras y dependiendo de la fase del ciclo estral en la que se encuentre la hembra, estos datos concuerdan con los reportados por Fiordelasio et al. (2002), donde se encontró que había una diferencia de expresión de NF-L, se concluyó que existía una diferencia de expresión de acuerdo a los niveles circundantes de estrógeno, esto debido a que el estradiol posiblemente estimula el aumento de la expresión del receptor de NGF trkA, al aumentar este se incrementa la acción de NGF, que como se reporta no afecta los niveles de mRNA, sino que modifica la cantidad de proteína que se traduce, por lo que las diferencias en la cantidad de proteína están ligadas a los niveles de estrógenos. Si se comparan estos dos geles con un gel de neurofilamentos de alto peso molecular de 200 kDa (NF-H) (Figura 22), se observa que los estrógenos solo afectan al NF-L<sup>11, 30</sup>.

Además de las diferencias de expresión se encontraron isoformas de la proteína NF-L, lo cual es posible, ya que como se ha visto los componentes del citoesqueleto poseen diversos mecanismos para producir variantes de las proteínas que los constituyen, entre los cambios más comunes encontramos los postraduccionales como la fosforilación y glicosilación y los transcripcionales como el splicing alternativo. De acuerdo a los western blots se encontraron cuatro isoformas distintas a las del control, dos para la condición no fosforilada y dos para la condición fosforilada, esto es relevante ya que en cerebro no observamos isoformas sino que solo se presenta una, y hasta el momento no se han reportado isoformas para NF-L, en el cerebro, en individuos que no presentan enfermedades neurodegenerativas. De igual manera si se compara con un gel de NF-H se observa que estos neurofilamentos no presentan isoformas<sup>7, 17</sup>.

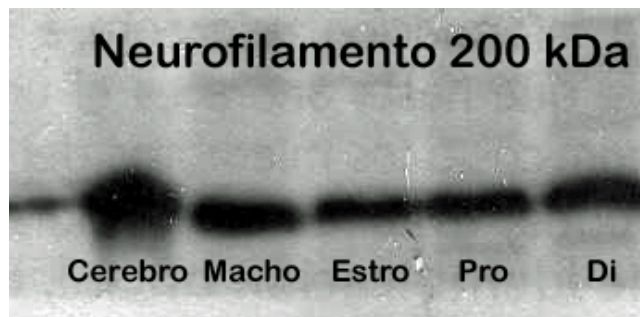


Figura 22. Imagen del western blot de los neurofilamentos de alto peso molecular con las condiciones cerebro, macho, estro, proestro (Pro) y diestro (Di).

La fosforilación es uno de los cambios postraduccionales más comúnmente encontrado en los neurofilamentos. El NF-L, al igual que los demás neurofilamentos, posee sitios de tirosinas y serinas que son sitios que fácilmente se fosforilan, estos sitios se encuentran en la región del carboxilo terminal, el NF-L se caracteriza por tener pocos sitios de este tipo, el papel de estos es controlar el ensamblaje o desensamblaje de los neurofilamentos de 68 kDa. Este cambio postraduccionales es uno de los más importantes de los neurofilamentos, sin embargo, no es capaz de explicar la presencia de todas las isoformas, ya que al observar el gel de los NF-L para la condición fosforilada se aprecian dos isoformas, se infiere que además de la fosforilación existe otro mecanismo que está modificando a la proteína y por lo tanto dando origen a las isoformas observadas.

Otro cambio postraduccionales es la glicosilación, este fenómeno se da en sitios ricos en treoninas y serinas, se debe a que ambos aminoácidos poseen oxígeno lo cual facilita la inserción del carbohidrato. Esta glicosilación es importante ya que gracias a esta facilita la interacción entre los distintos neurofilamentos. La región que se glicosila es la región amino terminal, esta se caracterizó al analizar pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ALS), se caracteriza por ser una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las neuronas motoras en específico las neuronas que se encargan del movimiento voluntario.

Se observó que al bloquear la glicosilación se formaban conglomerados de neurofilamentos, es decir, no se ensamblaban, al mismo tiempo al analizar las células de los pacientes que presentaban la ALS se observó una hiperglicosilación, esta produce aductos en las proteínas que les impide ensamblarse y se forman conglomerados de neurofilamentos. La glicosilación es un cambio postraduccionales importante en los neurofilamentos, ya que sin esta no hay ensamblaje de los mismos, es uno de los posibles cambios postraduccionales que estén generando las isoformas, tanto para la condición fosforilada como para la condición no fosforilada, ya que con los gels se puede descartar la fosforilada, sin embargo, las dos isoformas de esta no se pueden descartar solo con la fosforilación.

Otro cambio postraduccionales que se puede llevar a cabo es la nitración, este fenómeno se cree que no es indispensable para llevar a cabo el funcionamiento y ensamblaje de los neurofilamentos, sino que es un proceso al cual están expuestos y que bloquean el correcto ensamblaje. Se caracteriza por la inserción de nitratos en sitios ricos en tirosinas, y al igual que en la hiperglicosilación forma aductos que impiden el correcto ensamblaje. Esta condición se obtiene al metabolizar superóxido anión ( $O_2^-$ ) y el óxido nítrico, que forma el peroxinitrito, esto puede ocurrir cuando el  $O_2^-$  se encuentra cerca del

óxido nítrico y reaccionan formando el peroxinitrito que al reaccionar con el sitio activo de Cu/Zn de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) se forman especies reactivas de nitratos, que reaccionan con anillos aromáticos en específico con los residuos de tirosinas, que para el caso del NF-L posee en gran cantidad. En este trabajo se encontraron varias isoformas de NF-L tanto para sus casos control como para los casos de ALS, concluyendo que es un evento que normalmente ocurre, también se ha asociado al envejecimiento junto con la hiperglicosilación.

Este fenómeno podría explicar las isoformas que se observan en los geles, ya que si bien no es un cambio postraducciona l indispensable para los neurofilamentos, si es un fenómeno que ocurre normalmente y como la célula está altamente regulada y presenta mecanismos de compensación, esta genera más proteína de la que realmente necesita, por lo tanto como proponen Strong M. J. et al. (1998) los NF-L pueden funcionar como un quelador, para evitar que estos metabolitos afecten otros componentes, y por consecuencia, las isoformas que observamos tanto para la condición fosforilada y no fosforilada se deban a este fenómeno.

## 6.2 RT-PCR

Al analizar las cantidades de mRNA se observó que no existen diferencias entre ninguna de las condiciones, esto quiere decir que los cambios en la cantidad de proteína se debe a cambios ocurridos a nivel de traducción o postraduccionales. Si ocurren a nivel de traducción quiere decir que se produce más mRNA del que se traduce, esto es predecible ya que en la mayoría de las proteínas se produce más mRNA del que realmente se traduce, esto se puede deber a que la célula posee mecanismos de compensación por lo que genera mas mRNA, también existen factores que desestabilizan o degradan el RNA, esto se ve en los neurofilamentos en las primeras etapas del desarrollo, se ha reportado que la cantidad de mRNA se incrementa en los primeros días del desarrollo y disminuye conforme las células van diferenciándose. Una vez que las células, en este caso las neuronas, comienzan a madurar los neurofilamentos disminuyen las cantidades de mRNA en específico las de NF-L y NF-M y la cantidad de mRNA que se incrementa es la de NF-H, cuando esto sucede se dice que la neurona está madurando y es cuando se comienza a armar los neurofilamentos con los tres componentes.

Una de las proteínas que causa la desestabilización del mRNA y luego su degradación es la SOD1 y la p190RhoGEF, estas proteínas se unen a la región 3'UTR y desestabilizan el mRNA, bajando los niveles de este. Otro factor que interviene en la cantidad de mRNA son los propios neurofilamentos se cree que

ellos mismos son capaces de crear asas de retroalimentación que promueven o bloquean su expresión.

También existen otros filamentos intermedios como la perferina que en estadíos temprano del desarrollo se ha visto que afecta los niveles de mRNA disminuye la cantidad de NF-L que se produce, e incrementando la de NF-M. Esto también se ha visto cuando se desarrollan los nervios periféricos, como se ha mencionado, se ve que con la formación de estos se afectan los niveles de mRNA.

Incluso la cantidad de NGF en las primeras etapas del desarrollo, afecta estos de niveles de manera negativa, en específico NF-L, por lo que se puede suponer que los estrógenos no están interfiriendo con la cantidad de mRNA, sino que la producción de mRNA está regulada por otro mecanismo, sin embargo, los estrógenos si afecta la cantidad de proteína de la célula.

### 6.3 Secuenciación

Finalmente para ver si las isoformas que se tiene son debidas a un splicing alternativo se realizó una secuenciación, se analizó la región amino-terminal y carboxilo-terminal. Se mandaron secuenciar los tres fragmentos que se obtuvieron del PCR, sin embargo, el fragmento de menor número de kilobases del carboxilo-terminal no se logró secuenciar, esto pudo suceder por varias razones, uno de los problemas por los cuales no se lleva a cabo la secuenciación son los niveles de sales de la solución en la cual se encuentra el cDNA interfiriendo con el funcionamiento de la polimerasa. Otra razón es que la muestra este contaminada, sin embargo, los valores 260/280 que se obtuvieron al observar las muestras oscilan entre el 2.0 y 1.7, lo que nos dice que la muestra no presenta una contaminación. También lo que pudo haber ocurrido es que el fragmento que se extrajo contiene regiones con alta cantidad de GC, a continuación se mostrará la posible secuencia que se obtiene al realizar el PCR.

```
CTAACCGAGAGCGCCGCCAAGAACAACCGACGCAGTGCGCGCTGCCAAGGAC
GAGGTGTCGGAAA GCCGCCGCC TACTTAAGGCTAAG ACCCTGGAGATCGAA
GCTGCCGGGGTATGAACGAAGCTCTAGAGAA GCAGCTGCAGGAGCTGGAG
GACAAGCAGAATGCAGACATCAGCGCCATGCAGGACACAATCAACAAACTGG
AGAATGAGCTGCGAAGC ACGAAGAGCGAGATGGCCAGGTACCTGAAGGAGT
ACCAGGACCTCCTCAATGTCAAGATGGCATTGGACATTGAGATTGCAGCTTAC
AGGAAACTCTTGG AAGGCGAAGAAA CCAGGCTCAGTTT CACCAGCGTGGGTA
GCATAACCAGCGGCTACTCTCAGAGCTCGCAGGTC TTTGGCCGTTCTGCTTA
CAGTGGCTTGCAGAGCAGCTCCTACTTGATGTCTGCTCGAGCATTCCCAGCC
TACTATACCAGCCACGTCCAGGAA GAGCAGTCAGAGGTGGAGGAGACCATTG
AGGCTACGAAA GCTGAGGAGGCCAAGGATGAGCCCCCTCTGAAGGAGAAAG
```

CAG AAG AGG A GGAG AAGG A GAAAG AGG A GGGGG A GGAA GAGG AAGGT GCT  
GAGG AGG AAG AAGCT GCC AAGGAT GAGTCT GAAGAT GCC AAG AAG AAGAA  
GGTGGT GAGGGT GAAGAGGAA GAC CCAAAGAGT CAG AAGAGG AAGAGAAG  
AAAGAGG AAAAGTGCTGGGGAGGAGCAA

Como se observa esta secuencia contiene regiones con varias GC, por lo que puede provocar que se forme un “asa” o loop, esto ocasiona que la polimerasa sea incapaz de leer el fragmento y por ende no es posible secuenciarlo.

En los fragmentos restantes, que se pudieron secuenciar, no se encontraron diferencias entre la secuencia de la base de datos y el cDNA que se obtuvo, esto planteó dos tópicos, el primero de ellos es que en las regiones de estos fragmento no se está llevando a cabo un splicing alternativo, el segundo es que el fragmento que no se secuenció es posible que contenga la modificación que explicaría la presencia de las isoformas.

Con los datos que se tienen puede que no se esté llevando a cabo un splicing alternativo, es una posibilidad ya que no sean reportado isoformas para NF-L en individuos sanos, las isoformas que se tienen reportadas producen neurofilamentos que son incapaces de ensamblarse o se ensamblan parcialmente provocando la disminución del calibre axonal, estas isoformas se han visto en diversas enfermedades neurodegenerativas como la ALS, Alzheimer y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT).

Dependiendo de donde se lleven a cabo estas modificaciones se producen diferentes cambios en el NF-L (Figura 23), por ejemplo, en la región amino-terminal se han reportado mutaciones en la base 64 citosina por Timina provocando una sustitución de la prolina 22 por una serina que afecta la región globular del amino-terminal que es la que se encarga del ensamble de la proteína, también existe la E7K, P8R, P8Q, P8L, P22T, todas estas mutaciones afectan la parte globular del amino-terminal afectando la capacidad de ensamblarse de NF-L en mayor o menor grado.

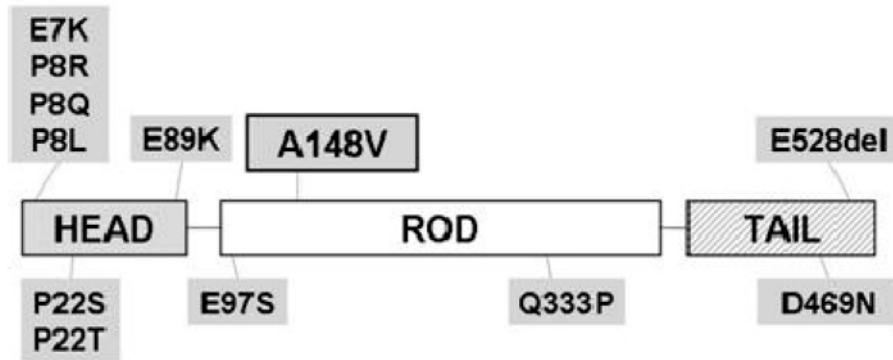


Figura 23. Esquema de las mutaciones que puede sufrir NF-L en las tres regiones amino-terminal (head), la región media (rod) y el carboxilo-terminal (tail)<sup>20</sup>.

Para la región central, también existen diversas mutaciones, por ejemplo la mutación en la alanina 148 por una valina, esta mutación induce un cambio en la estructura de NF-L, como consecuencia su ensamblaje es deficiente y forma conglomerados de NF-L que se van a la periferia de la célula, ya que es incapaz de asociarse con los otros tipos de NF. Otro tipo de mutaciones con efectos similares son E97S y Q333P, estas mutaciones son propias de la enfermedad de CMT<sup>20</sup>.

Finalmente están las mutaciones que se producen en el carboxilo-terminal como E528del y D469N, con estas mutaciones se han tenido problemas, ya que los efectos que se producen no se han podido ver *in vitro*, sin embargo, *in vivo* se ha visto que, al igual que las demás mutaciones, existe una dificultad al ensamblarse y provoca conglomerados de NF<sup>20</sup>.

Las mutaciones de NF-L dan como consecuencia un mal arreglo de la proteína que provoca que se ensamble incorrectamente con otros NFs, sugiriendo que un cambio en la secuencia de la proteína, puede causar modificaciones no favorables, y por lo tanto sugiere que no es posible la existencia de un splicing alternativo. Esto se respalda por el hecho de que hasta el momento no se han reportado isoformas de la proteína NF-L en los vertebrados, sin embargo, en el calamar gigante existe un solo gen que sirve para expresar las tres proteínas, ya que, el mRNA de este sufre de splicing alternativo, sugiriendo que es factible que en otros organismos se dé un splicing alternativo en los neurofilamentos.



## **7. Conclusiones**

Con base en los resultados se puede concluir que en la adenohipófisis los neurofilamentos se expresan dimórficamente y varía de acuerdo a la fase del ciclo estral.

Los neurofilamentos presentan 4 isoformas distintas, dos para la condición fosforilada y dos para la no fosforilada esto se debe a cambios postraduccionales o transcripcionales.

Los niveles de mRNA no varían en ninguna de las condiciones, por lo que la diferencia de proteína es a nivel de traducción y postraduccional, la expresión del mRNA no está influenciada por la cantidad de estrógenos.

Las secuencias obtenidas coinciden perfectamente con la que está en la base de datos, sin embargo, no se puede descartar la existencia de un splicing alternativo.

## 8. Referencias

1. Barry D. M., S. Millecamps, J. P. Julien y M. L. Garcia. (2007). "New movements in neurofilament transport, turnover and disease". Experimental cell research. **313**: 2110-2120.
2. Bolander F. (1994) Molecular Endocrinology. Estados Unidos de América, Academic Press. 25-31p.
3. Bruce A., A. Jhonson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. (2008). Molecular Biology of the Cell. New York. Garland Science. 965-1051p.
4. Byrne J. H. y J. L. Roberts. (2009). From molecules to networks. An introduccion to cellular and molecular neuroscience. San Diego, Academic Press. 32-47p.
5. Cañete-Soler R. y W. W. Schlaepfer. (2000). "Similar poly(C)-sensitive RNA-binding complexes regulate the stability of the heavy and light neurofilament mRNAs". Brain Research. **867**: 265–279.
6. Carpenter D. A. y W. Ip. (1996). "Neurofilament triplet protein interactions: evidence for the preferred formation of NF-L-containing dimers and a putative function for the end domains". Journal of Cell Science. **109**: 2493-2498.
7. Chou S.M., C.Y. Han, H.S. Wang, H. Vlassara y R. Bucala. (1999) "A receptor for advanced glycosylation endproducts (AGEs) is colocalized with neurofilament-bound AGEs and SOD1 in motoneurons of ALS: immunohistochemical study". Journal of the Neurological Sciences. **169**: 87–92.
8. Cooper G. y R. Hausman. (2007). The Cell a Molecular Approach. Washington D.C. Asm Press. 473-497p.
9. Durán L. 2008. "Estudio de los patrones de Ca<sup>2+</sup> intracelular generados por el estímulo de GnRH en rebanadas de hipófisis de ratón macho castrado e inyectado con estradiol". Tesis Licenciatura. UNAM. México. 43pp.
10. Fabrizi G. M., T. Cavallaro, C. Angiari, I. Cabrini, F. Taioli, G. Malerba, L. Bertolasi y N. Rizzuto. (2007). "Charcot–Marie–Tooth disease type 2E, a disorder of the cytoskeleton". Brain. **130**: 394–403.

11. Fiordeliso T. (2002). Regulación hormonal de la expresión de neurofilamentos en la adenohipófisis de rata. Tesis Doctoral. UNAM. México. 156pp.
12. Fiordeliso T. y A. Hernández-Cruz. (2002). "Oestrogen Regulates Neurofilament Expression in a Subset of Anterior Pituitary Cells of the Adult Female Rat". Journal of Endocrinology. **14**: 411-424.
13. Goldstein M. E., S. R. Weiss, R. A. Lazzarini , P. S. Shneidman, J. F. Lees y W. W. Schlaepfer. (1988). "mRNA levels of all three neurofilament proteins decline following nerve transection" Molecular Brain Research, **3**: 287-292.
14. Grnat P. y H. C. Pant. (2000). "Neurofilament protein synthesis and phosphorylation". Journal of Neurocytology. **29**: 843-872.
15. Gu L., J. C. Troncoso, J. B. Wade, y M, J. Monteiro. (2004). "In vitro assembly properties of mutant and chimeric intermediate filament proteins: insight into the function of sequences in the rod and end domains of IF" Experimental Cell Research **298**: 249– 261.
16. Herrmann H., H. Bär, L. Kreplak, S. V. Strelkov y U. Abei. ( 2007). "Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics". Molecular cell biology. **8**: 562-573.
17. Julien J.-P. (1999). "Neurofilament functions in health and disease". Current Opinion Neurobiology. **9** (5): 554-560.
18. Kim S. y P. A. Coulombe. (2007). "Intermediate Filaments scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm." Genes & Development **21**: 18.
19. Larivière R. C. y J. Julien. (2004). "Functions of Intermediate Filaments in Neuronal Development and Disease". Journal of Neurobiology. **58**(1): 131-148.
20. Lee I-B., S-K. Kim, S-H. Chung, H. Kim, T. K. Kwon, D. S. Min y J-S. Chang. (2008). "The effect of rod domain A148V mutation of neurofilament light chain on filament formation". BMB reports **41**(12): 868-874.
21. Nie Z., J. Wu, J. Zhai, H. Lin, W. Ge, W. W. Schlaepfer y R. Canñete-Soler. (2002). "Untranslated Element in Neurofilament mRNA Has Neuropathic

Effect on Motor Neurons of Transgenic Mice". The Journal of Neuroscience. **22**(17):7662–7670.

22. Nie Z., J. Wu, J. Zhai, H. Lin, W. Ge, W. W. Schlaepfer y R. Cañete-Soler. (2002). "Untranslated Element in Neurofilament mRNA Has Neuropathic Effect on Motor Neurons of Transgenic Mice". The Journal of Neuroscience. **22**(17): 7662-7670.

23. Norris D. (1997). Vertebrate Endocrinology. Estados Unidos de América, Academic Press. 106-119p.

24. Rao M. V., J. Campbell, A. Yuan, A. Kumar, T. Gotow, Y. Uchiyama y R. A. Nixon. (2003). "The neurofilament middle molecular mass subunit carboxyl-terminal tail domains is essential for the radial growth and cytoskeletal architecture of axons but not for regulating neurofilament transport rate" The Journal of Cell Biology. **163** (5): 1021-1031.

25. Ruiz-Ederra J. y E. Vecino. (2001). "Neurofilaments in Neurodegenerative diseases". Arch Sociedad Española de Oftalmología. **76**(12): 699-710.

26. Samuel M. Chou S. M., H. S. Wang, A. Taniguchi y R. Bucala. (1998). "Advanced Glycation Endproducts in Neurofilament Conglomeration of Motoneurons in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis". Molecular Medicine **4**: 324-332.

27. Sasaki T., T. Gotow, M. Shiozaki<sup>2</sup>, F. Sakaue, T. Saito, J.-P Julien, Y. Uchiyama y S. Hisanaga. (2006). "Aggregate formation and phosphorylation of neurofilament-L Pro22 Charcot–Marie–Tooth disease mutants". Human Molecular Genetics. **15**(6): 943–952.

28. Shea T. B. y W. K. L.-H. Chan. (2008). "Regulation of neurofilament dynamics by phosphorylation". European Journal of Neuroscience. **27**: 1893-1901.

29. Strong M. J., M. M. Sopper, J. P. Crow, W. L. Strong y J. S. Beckman. (1998). "Nitration of the Low Molecular Weight Neurofilament Is Equivalent in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis and Control Cervical Spinal Cord". Biochemical and Biophysical Research Communications. **248**: 157–164.

30. Thyagarajan A., M. J. Strong y B. G. Szaro. (2007). "Post-transcriptional control of neurofilaments in development and disease". Experimental cell research. **313**: 2088-2097.

31. Watson S. y K. Miller. (2004). The Endocrine System. Londres. Greenwood Press. 39-48p.

32. Yates D. M., C. Manser, K. J. DeVos, C. E. Shaw, D. M. McLoughlin y C. C. J. Miller. (2009). "Neurofilament subunit (NFL) head domain phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments". European Journal of Cell Biology. **88**: 193-202