



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE LA PROTEÍNA GAP-43 EN EL GANGLIO TRIGEMINAL DE RATAS ENUCLEADAS AL NACIMIENTO

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ABRIL ALDAMA SÁIZ

TUTOR: DR. GABRIEL GUTIERREZ OSPINA

COMITÉ TUTORAL:

**DR. GABRIEL GUIZAR SAHAGÚN
DRA. SARA CABALLERO CHACÓN**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS 2006



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

El desarrollo de la fase experimental se realizó en el laboratorio A-107 del Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

La M en C Patricia Padilla Cortés apoyó en la realización de la técnica de inmunoelectrotransferencia y densitometría.

El LIBB Miguel Tapia Rodríguez apoyó en el montaje de la técnica de inmunohistoquímica.

El Dr. Jaime Alonso Navarro apoyó en el análisis estadístico de los datos.

El personal de la Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, María Petra Muñoz García, Alfonso Martínez Amud y Erasto Brito Brito, proporcionaron la información bibliográfica.

El personal del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Gerardo Arrellín Rosas y Adolfo Hernández Juárez, hicieron llegar los animales que se requirieron en la investigación.

Este proyecto fue apoyado por fondos concurrentes del CONACyT (38615N) y UNAM (DGAPA / PAPIIT (IN203702). DGAPA-PAPIIT también otorgó beca de Término de Tesis durante el periodo de septiembre a diciembre de 2005 (IN201605).

Dedicada a todos

Los animales que prestaron la vida a esta Tesis, y aquéllos que cada día me regalan la necesidad de seguir creciendo.

Los amigos que, con toda su luz, hicieron posible la realización de este trabajo, Vero, Irene, Judith, Fabiola, Margarita, Memo, Astrid, Angie, LuzMa, LuzMa, Richar, Jose, Magda, Jessi, Ale, Ángel, Isela, Lupita, Leo, Hugo, Sixto, Efrén, Moni, Raúl, Raúl, Laura, Víctor, Rafa.

Mis compas del laboratorio, especialmente a Miguel, quienes supieron ser conductos en mi acercamiento a la ciencia, y amigos para apoyarme en los momentos que más necesité, Pancho, Juli, Paty, Luis, Eileen, Brenda, Lalo.

Mi tutor, Gabriel Gutiérrez, por haberme dado la oportunidad de emprender en el conocimiento personal y científico, con un grupo de trabajo tan valioso.

Mi raza querida, Yuri, Amy, Máshenka, Monchis, Toño, Marian, Edi, Licha, Clau, Chofi, Toño, y a la memoria de mis abuelas Conchita y Bolo. Porque el camino está construido con sus palabras.

Mis padres, que me dieron la vida y el deseo de explorarla, y que han estado siempre a mi lado con su desbordante amor.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA.....	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	8
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	39
PERSPECTIVAS A FUTURO.....	40
LITERATURA CITADA.....	41

RESUMEN

En los individuos ciegos, la corteza cerebral está organizada de manera distinta que en aquéllos que poseen un sentido de la vista íntegro. Por un lado, la corteza somatosensorial primaria se encuentra expandida, y por otro, la corteza “visual” privada procesa información para el tacto y la audición. Se considera que estos cambios en la organización cerebral son responsables de las habilidades táctiles que caracterizan a los individuos ciegos. Sin embargo, no hay que olvidar que la información táctil es procesada tanto por estructuras nerviosas centrales como periféricas. La participación de los mecanorreceptores y la inervación periférica en las diferencias táctiles de los individuos ciegos no ha sido explorada. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) han mostrado, sin embargo, que en animales adultos enucleados al nacimiento existe un mayor número de células de Merkel en los folículos pilosos asociados a las vibrisas. Dado que cada célula de Merkel está inervada por una sola terminal nerviosa, esta observación sugiere que el crecimiento de los nervios que proyectan a los bigotes pudiera estar modificado. Con la finalidad de inferir posibles cambios en el crecimiento de los axones que inervan los bigotes de estos animales, en el presente estudio se evaluó la intensidad de la inmunotinción de la proteína asociada al crecimiento de axones (GAP-43) en las neuronas mecanoceptivas del ganglio trigeminal en ratas testigo y enucleadas a diferentes edades, mediante técnicas de inmunohistoquímica y densitometría. Asimismo se estimó el contenido de GAP-43 en el ganglio trigeminal de ratas testigo y enucleadas a diferentes edades, mediante el uso de técnicas de inmunoelectrotransferencia y densitometría. Por otro lado, se analizó el área de sección de las neuronas y el área relativa al núcleo, con el objeto de inferir posibles cambios relativos

en las neuronas ganglionares del nervio trigeminal. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los estimadores medidos en estas neuronas, relacionadas con las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Es necesario realizar estudios complementarios a este trabajo, pues las tendencias encontradas en los estimadores medidos son interesantes. Sin embargo, nuestros resultados podrían indicar que los axones que inervan los belfos de la rata no modifican su desarrollo en respuesta a la enucleación. Probablemente, las diferencias conocidas en las habilidades del tacto de los individuos ciegos no están relacionadas con el desarrollo de la inervación de la piel.

Palabras clave: plasticidad, tacto, ceguera, sistema nervioso periférico, GAP-43

ABSTRACT

The brain of blind individuals displays an expanded primary somatosensory. These shifts are thought to be responsible for the differences in tactile abilities that blind individuals have when compared with individuals having normal sight. Nevertheless, tactile information is processed by both central and peripheral nervous structures. Possible anatomical and/or functional changes of mechanoreceptors and peripheral innervation in shifting tactile discrimination have not been evaluated. We have previously shown (Departamento de Biología Celular y Fisiología from Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) that adult animals enucleated at birth have more Merkel cells in vibrissae follicles. Because each Merkel cell is innervated by a single nerve terminal, one might guess that vibrissal innervation is increased in enucleated rats. Hence, to infer possible changes in axonal growth, the present study focused at evaluating through densitometry, the intensity of the immunohistochemical label for the growth associated protein (GAP)-43, a protein that enhances axonal growth, in mechanosensory neurons of the trigeminal ganglion in control and enucleated rats at different ages. Also, we estimated the content of GAP-43 in trigeminal ganglia of control and enucleated rats at different ages by using Western blot and densitometry. In addition, we estimated neuronal area. We found no statistical differences in these parameters between our groups of study. In spite of this lack of difference, there were trends that deserve further exploration. However, our results could indicate that the axons from maxilar branch of the trigeminal nerve do not modify its growth in response to enucleation. Probably, known differences about tactile abilities on blind individuals are not related to the development of the skin innervation.

Key words: plasticity, tact, blindness, PNS, GAP-43.

INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre la neurobiología del tacto en la ceguera.

En los individuos ciegos la organización del sistema de sensopercepción táctil difiere de aquella observada en individuos con un sentido de la vista íntegro. Esto se ilustra con el hecho de que la corteza cerebral de roedores, gatos y humanos ciegos muestra una expansión del área dedicada al procesamiento de la información del tacto (S1) (Bronchti G, *et al.*, 1992, Rauschecker J P, *et al.*, 1992, Toldi J, *et al.*, 1996, Negyessy L, *et al.*, 2000) y una re-activación de la corteza occipital (antes visual) por información táctil (Sadato N, *et al.*, 1998). Actualmente se reconoce que los cambios macrofuncionales descritos reflejan modificaciones anatómo-fisiológicas a nivel celular. En apoyo a esto, se han reportado incrementos en el número de dendritas en las neuronas del núcleo posterior talámico de ratas enceguecidas quirúrgicamente al nacimiento (Negyessy L, *et al.*, 2000). Asimismo, estudios electrofisiológicos de neuronas corticales ubicadas en S1 de las ratas enceguecidas documentaron un incremento en el tamaño de sus campos receptivos y modificaciones en su sensibilidad a cambios en la dirección del movimiento de las vibrisas (Toldi J, *et al.*, 1994).

Por otra parte, en estudios conductuales se ha mostrado que la habilidad táctil de los individuos ciegos es diferente, no necesariamente mejor, a la de los individuos normales. Como ejemplo, las personas ciegas congénitas identifican caracteres en relieve y diferencias en el tamaño de los objetos utilizando su tacto de forma más eficiente que las personas normales (Heller M A, 1989, Sunanto J, Nakata H, 1998). En contraste, personas ciegas congénitas entrenadas en la lectura Braille son incapaces de individualizar estímulos

aplicados a los distintos dígitos en la mano que utilizan para ejecutar la lectura Braille (Sterr A, *et al.*, 2003).

Por años se ha pensado que los cambios anatómo-fisiológicos documentados en la corteza cerebral de los individuos ciegos conducen a las modificaciones conductuales táctiles descritas en el párrafo precedente. El hecho de que la inactivación de la corteza occipital en individuos ciegos lograda por estimulación magnética transcraneal incrementa el número de errores en su desempeño táctil ha sido utilizado como argumento en favor de esta postura (Cohen L G, *et al.*, 1997). Sin embargo, sabemos que las capacidades sensoriales somáticas no dependen exclusivamente de los circuitos cerebrales, sino que también son dependientes de la entrada de la información sensorial a través del sistema nervioso periférico. Así, las propiedades biofísicas (e.g., la velocidad de adaptación) de los receptores periféricos y el tipo y la densidad de la inervación determinan muchas de las características de la información que alcanza al cerebro desde los receptores. En apoyo a esto, es bien conocido que la densidad de inervación se pierde con la edad, mientras que la capacidad de discriminación de dos puntos a una corta distancia disminuye (Stevens J C, 1992, Chang Y C, *et al.*, 2004), y que las zonas del cuerpo más densamente inervadas son aquellas que poseen una mejor respuesta discriminatoria táctil (Besne I, *et al.*, 2002). La posibilidad de que en los sujetos ciegos existan modificaciones en el aparato periférico de mecanosensación que conduzcan a cambios en la percepción somatosensorial, se sostiene con los resultados recientemente obtenidos en nuestro laboratorio. En ellos, Geovannini (Geovannini Acuña H, 2001) y Martínez-Martínez (Martínez Martínez E, 2004) describieron independientemente cambios en la densidad de los mecanorreceptores del tipo Merkel (ver abajo) en la piel del belfo de ratas enceguecidas. Específicamente, Martínez-Martínez observó una disminución del número de células de Merkel asociadas a los

folículos de la vibrisas faciales a los 10 días de vida (10P) y un mayor número de estos mecanorreceptores foliculares a los 60P en la ratas enceguecidas al nacimiento, al ser comparadas con las ratas testigo de edades equivalentes. Estos cambios se acompañaron de un engrosamiento aparente de la epidermis y de cambios en los niveles de neurotrofina-3 (Figura 1).

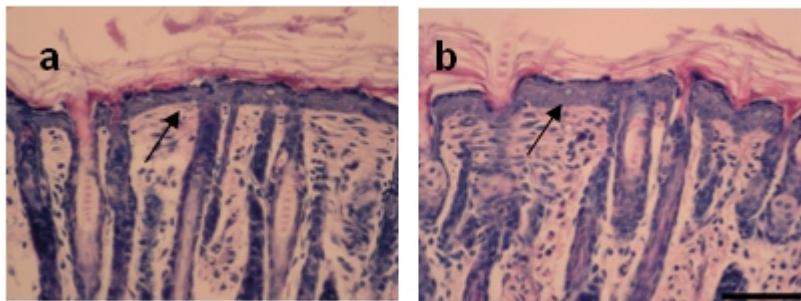


Figura 1. Efecto de la remoción de los ojos al nacimiento sobre la epidermis del cachete de la rata de 10P. Fotomicrografía que muestra cortes sagitales de la piel del bello de la rata ciega (a) y testigo (b), a los 10P, teñida con HE. La epidermis (flechas en a y b) de ratas ciegas es más gruesa (a) que en la rata testigo (b). Las células del estrato basal epidérmico en el cachete de ratas ciegas se observan hipertróficas, por lo que la estratificación de la epidermis está distorsionada. Barra de escala: 60mm. Estudio y fotografía: Eduardo Martínez M.

Hasta el momento, desconocemos los mecanismos responsables de generar estos cambios. Debido a que normalmente la magnitud de la inervación periférica incrementa desde el nacimiento hasta la edad adulta joven para luego remodelarse a través de fenómenos de eliminación de axones, es posible suponer que 1) el incremento en la inervación periférica observada en las ratas enucleadas se debe a la retención de axones transitorios y/o 2) a un crecimiento axonal mayor a lo normal. Con estas ideas en mente, en el presente trabajo se evaluó la intensidad del marcaje inmunohistológico y el contenido de la proteína asociada al crecimiento axonal con un peso molecular de 43kDa (GAP-43) en el ganglio del trigémino de ratas testigo y enucleadas, con la finalidad de proveer evidencia que nos permita inferir si estos cambios en la inervación periférica son el producto del incremento en el crecimiento de axones a lo largo de la edad.

Anatomofisiología del sistema sensorial trigeminal

El sistema somatosensorial de los mamíferos está constituido por una división cefálica que recoge la información relativa al tacto correspondiente a la cabeza y cuello, y una división corporal que hace lo propio con relación al tronco y a las extremidades. La inervación sensorial de la cara está provista, predominantemente, por el nervio trigémino. Este nervio craneal posee tres ramas conocidas como la oftálmica, la maxilar y la submandibular que nacen en el ganglio del nervio trigémino, y que constituyen el brazo externo de las aferentes primarias. En la rata, las aferentes trigeminales externas inervan sensorialmente tanto al belfo como a las vibrisas faciales. La vía del nervio trigémino se continúa desde el ganglio homónimo hacia el complejo nuclear trigeminal localizado a lo largo del tallo cerebral. El ganglio y el núcleo se relacionan a través del brazo interno de las aferentes primarias trigeminales. Del complejo nuclear trigeminal, la vía somatosensorial cefálica primaria asciende hacia el complejo nuclear ventrobasal en el tálamo desde el cual se proyecta hacia S1 (Lazarov N E, 2002, Purves D, 2004). Debido a que en el presente trabajo se explorarán cambios en la expresión y contenido de GAP-43 en el ganglio del nervio trigémino, en los párrafos siguientes describiremos en mayor detalle los elementos anatómicos y fisiológicos de la división periférica del sistema trigeminal.

Mecanorreceptores

El procesamiento de la información somatosensorial inicia con la activación de los diferentes receptores cutáneos especializados en transducir a las distintas submodalidades del tacto, las cuales se clasifican en mecanosensación, propiocepción, nocicepción y termocepción (Craig J C, Rollman G B, 1999, Purves D, 2004). Debido a que los cambios reportados en los folículos de las vibrisas corresponden a modificaciones en el número de mecanorreceptores, en esta sección solamente nos enfocaremos a los distintos tipos de

receptores mecánicos asociados a la vibrisas de los roedores. Este acotamiento es importante puesto que el análisis de los datos descritos más adelante hace énfasis en las neuronas ganglionares que conducen información relacionada con la mecanosensación. Al respecto, en la rata, los mecanorreceptores de Merkel, que se encuentran envolviendo al folículo piloso, transducen información de tacto y presión estática. Aquéllos referidos como de Meissner, que se encuentran entre las papilas dérmicas, bajo la epidermis, transducen la información referente a la presión dinámica. Los mecanorreceptores de Pacini, localizados en el tejido subcutáneo, transducen la información relacionada con la presión profunda y la vibración. Por otro lado, existen terminaciones mecanorreceptoras cuya función no es muy clara, entre las que se encuentran las terminaciones lanceoladas que corren longitudinalmente en los folículos de la vibrisa, las terminaciones reticulares y las espinadas, las cuales se encuentran en la membrana cristalina del folículo. Finalmente, los mecanorreceptores de Ruffini, encontrados en la epidermis profunda, transducen la información asociada al estiramiento (Kumamoto K, *et al.*, 1993, Johnson K O, *et al.*, 2000, Takahashi-Iwanaga H, 2000, Hollins M, *et al.*, 2002, Maklad A, *et al.*, 2004) (Figura 2).

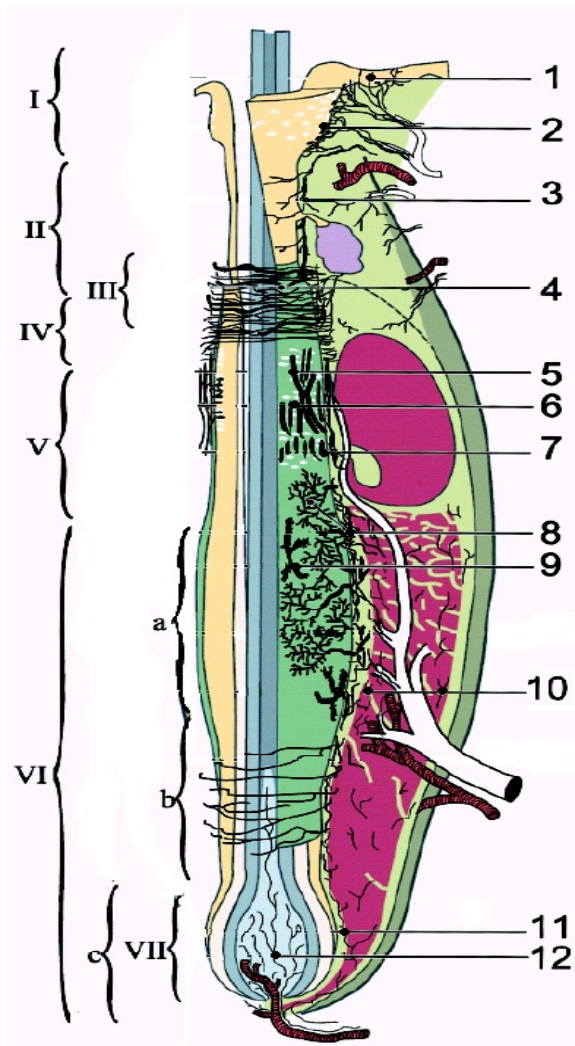


Fig.2 Estructura e inervación de la vibrisa del la rata. Los números romanos indican las zonas de inervación. I, Collar de la red de la orilla (RRC): el epitelio forma un delgado collar en la terminal superficial del folículo, donde éste se continúa con la epidermis. II, Cuerpo cónico externo: el cuello del folículo está rodeado por la terminal final cónica de la cápsula referida como OCB. III, glándula sebácea: la mitad inferior del OCB contiene una glándula sebácea multilobulada, la cual se distribuye por completo alrededor de la mitad de la circunferencia. Los conductos drenan la glándula sebácea dentro del intervalo entre el folículo y la vibrisa. IV, anillo del seno: el tercio superior y hasta la mitad del seno vascular tiene una luz abierta referida como anillo del seno: a, parte superior; b, parte inferior. VI, seno cavernoso: la mitad inferior de los dos tercios del seno vascular está enlazada de numerosas trabéculas de tejido conectivo y se llama seno cavernoso. VII, bulbo del folículo. Los números arábigos denominan las diferentes terminaciones. 1, inervación epidérmica intervibrisal. 2, terminaciones de las células de Merkel (óvalos blancos). 3, inervación de fino calibre del OCB y del ducto de la glándula sebácea. 4, inervación circunferencial de fino y pequeño calibre y terminaciones lanceoladas. 5, células de Merkel. 6, terminaciones lanceoladas longitudinales. 7, terminaciones "Club-like". 8, terminaciones reticulares 9, terminaciones espinadas 10, inervación de fino y pequeño calibre. 11, inervación de fino calibre alrededor del bulbo del folículo. 12, inervación de fino y pequeño calibre de la papila dérmica. Figura modificada de *J. Comp Neurol* 449:103-119 (2002).

Propiedades biofísicas de los mecanorreceptores

Como se escribió anteriormente, las propiedades biofísicas dinámicas de los mecanorreceptores determinan la calidad, cantidad y tipo de información transducida. De estas propiedades cabe destacar el umbral de activación, que se define como la intensidad mínima de estímulo que se requiere aplicar para producir un potencial de acción en el receptor. Al respecto se sabe que el umbral de activación de los mecanorreceptores de Merkel, Ruffini, Pacini y Meissner, así como de las terminaciones lanceoladas, espinadas y reticulares es bajo (Fundin B T, *et al.*, 1997, Rice F L, *et al.*, 1997, Frey D, *et al.*, 2000).

Otra propiedad biofísica de los mecanorreceptores se relaciona con la velocidad de adaptación, la cual se define como la rapidez con que el receptor deja de responder ante un estímulo que es aplicado de manera constante. Se conoce que las células de Merkel y los corpúsculos de Ruffini poseen una velocidad de adaptación lenta, mientras que los cuerpos de Meissner y Pacini, así como las terminaciones lanceoladas, son de adaptación rápida. (Takahashi-Iwanaga H, 2000, Johnson K O, 2001, Maklad A, *et al.*, 2004).

Ganglio y aferentes primarias trigeminales

El ganglio del nervio trigémino está dividido en tres secciones que le dan origen a las tres ramas descritas anteriormente. El ganglio está constituido por dos poblaciones generales de neuronas denominadas pequeñas y grandes, cada una de ellas con subtipos neuroquímicos distintos (Lagares A, Avendano C, 2000) (Aigner M, *et al.*, 2000). Las de gran diámetro, llamadas células A, se caracterizan por tener el citoplasma claro, mientras que las pequeñas, llamadas células B, son de citoplasma oscuro. Se sabe que las células tipo A se asocian a receptores de mecanosensación, y sus fibras axónicas son A- α/β , altamente mielinizadas y de calibre grueso, mientras que las células tipo B pertenecen a fibras poco o no mielinizadas (A- δ y C, respectivamente), de calibre fino y son responsables de transducir información nociceptiva, de temperatura y propioceptiva (Koerber H R, Mendell L M, 1988, Craig J C, Rollman G B, 1999). Las neuronas del ganglio trigeminal aumentan ligeramente de tamaño con la edad (Biedenbach M A, *et al.*, 1992). Todas las neuronas del ganglio son bipolares; poseen un axón simple que se divide en una rama proximal que se dirige al tallo cerebral y otra periférica que inerva al órgano blanco periférico (Lazarov N E, 2002). Los somas neuronales de la rama mandibular ocupan la

porción caudolateral del ganglio, los de la oftálmica están localizados rostromedialmente, y los de la maxilar se sitúan entre ambas (Figura 3).

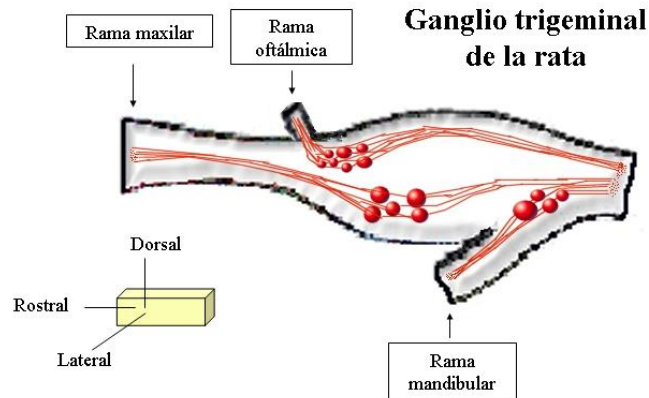


Fig. 3. Esquema que ilustra el ganglio trigeminal con sus tres ramas: oftálmica (dorsomedial), maxilar (rostral), mandibular (ventrolateral). Así como la regionalización de las neuronas de las distintas ramas.

Las aferentes primarias trigeminales son heterogéneas químicamente, y utilizan distintos mediadores químicos para su transmisión sináptica. Estos incluyen transmisores clásicos entre los que destacan los aminoácidos excitatorios como glutamato y aspartato, aminoácidos inhibitorios como el ácido gamma-amino butírico (GABA), aminas biogénicas como la noradrenalina y la histamina y una variedad de péptidos tales como la sustancia P, la sustancia K, el péptido relacionado al gen de la calcitonina, el péptido intestinal vasoactivo y somatostatina (Lazarov N E, 2002, Ambalavanar R, *et al.*, 2003) (Cuadro 1).

Neurotransmisores	Neuronas Grandes	Neuronas Pequeñas
Glutamato	+	+
Aspartato	+	+
GABA	+	+
Noradrenalina	+	+
Histamina	+	+
Substancia P	-	+
Substancia K	-	+
Péptido relacionado al gen de la calcitonina	-	+
Péptido intestinal vasoactivo	-	+
Somatostatina	-	+
Óxido nítrico	-	+
Calbidina	+	-
Calretinina	+	-

Cuadro 1. Mediadores químicos contenidos (+) en las neuronas grandes del ganglio trigeminal (Lazarov N E, 2002)

Diversos aspectos relacionados con la estructura y función de las aferentes primarias trigeminales determinan el procesamiento de la información mecánica en el sistema nervioso central. De entre ellas cabe destacar el tamaño del campo receptivo, que se relaciona con el área cutánea de distribución de las ramas axonales de cada neurona. Las células de Merkel y los corpúsculos de Meissner son inervados por fibras de campos receptivos pequeños, mientras que los cuerpos de Pacini y Ruffini por aquéllas de campos receptivos grandes (Craig J C, Rollman G B, 1999, Johnson K O, 2001).

La velocidad de conducción de las aferentes depende de su grado de mielinización y de su grosor. Así, las fibras de gran diámetro mielinizadas originadas en neuronas ganglionares grandes están relacionadas frecuentemente con los mecanorreceptores de bajo umbral. Algunas de estas responden exclusivamente a la estimulación de los receptores de adaptación lenta, mientras que otras lo hacen a los mecanorreceptores de adaptación rápida (Koerber H R, Mendell L M, 1988, Lazarov N E, 2002).

La capacidad de discriminación del sistema mecanosensorial también depende de la densidad de inervación y del número de los mecanorreceptores. En general, a mayor densidad de ambos mayor será la discriminación. También la capacidad de discriminación depende del grado de convergencia de la vía nerviosa. Se sabe que a mayor convergencia menor será la habilidad para discriminar entre estímulos (Craig J C, Rollman G B, 1999, Daselaar S M, *et al.*, 2003, Purves D, 2004).

La proteína asociada al crecimiento axonal (GAP) – 43 KDa (43)

La GAP-43 es una proteína de entre 39-60KDa que se localiza en la membrana neuronal asociada preferentemente con los conos de crecimiento axonales (Benowitz L I, *et al.*, 1987). Esta proteína es sintetizada en el soma neuronal, transferida en vesículas hacia el aparato de Golgi, para luego ser enviada a través de transporte vesicular constitutivo a lo largo del axón hacia los conos de crecimiento (Oestreicher A B, *et al.*, 1997). La GAP-43 corresponde a una cadena de 194-238 residuos aminoácidos de los cuales alrededor del 25% son acídicos, el 17% corresponde a residuos de alanina, y un porcentaje reducido corresponde a residuos hidrofóbicos. La GAP-43 puede identificarse en dos formas. La primera de ellas, la forma inactiva, carece de residuos fosforilados. La segunda, en cambio, presenta una fosforilación en el residuo de serina 41. La fosforilación de la GAP-43 se lleva a cabo a través de la participación de la proteína Cinasasa C (Benowitz L I, *et al.*, 1987, Oestreicher A B, *et al.*, 1997).

Durante el desarrollo del sistema nervioso, la GAP-43 regula el crecimiento de los axones a través de al menos tres mecanismos. Por un lado, se ha propuesto que su presencia incrementa la velocidad de transporte axonal de calmodulina (proteína que estimula la polimerización de actina y tubulina), funcionando como un acarreador de ésta (Spencer S, Willard M B, 1992, Oestreicher A B, *et al.*, 1997, Dent E W, Meiri K F, 1998, Frey D, *et al.*, 2000). Por el otro, la GAP-43 parece amplificar las respuestas del cono de crecimiento a las señales externas que afectan los procesos de formación y navegación (Aigner L, Caroni P, 1993, Frey D, *et al.*, 2000), (Gordon-Weeks P R, 1989). Finalmente, esta proteína modula los efectos de diversos sistemas de mensajería secundaria (e.g., AMPc) que participan en el proceso de formación y retracción de los conos de crecimiento axonal. Evidencia adicional que apoya la participación de GAP-43 en los procesos de crecimiento

axonal proviene de estudios en los que se evalúan las habilidades de axones centrales y periféricos para regenerar después de haber sido lesionados. En general, esta evidencia muestra que tanto las neuronas centrales como periféricas incrementan la transcripción y traducción del mensajero para GAP-43 después de una lesión (Buffo A, *et al.*, 1997). (Erzurumlu R S, *et al.*, 1989); (Sommerville T, *et al.*, 1991, Wiese U H, *et al.*, 1992, Verkade P, *et al.*, 1997) (Hoffman P N, 1989) (Basi G S, *et al.*, 1987), (Van der Zee C E, *et al.*, 1989, Verge V M, *et al.*, 1990, Woolf C J, *et al.*, 1990). El bloqueo de este efecto impide la respuesta regenerativa.

GAP-43 no solamente ha sido involucrada en fenómenos de crecimiento axonal durante el desarrollo y durante respuestas regenerativas. Los niveles de expresión de esta proteína incrementan con relación a procesos de reorganización sináptica asociados al aprendizaje, la memoria y/o la privación o estimulación sensorial, sugiriendo un papel fundamental de esta proteína en respuestas plásticas no asociadas a lesiones. Parece, de hecho, jugar un papel regulador en la liberación de neurotransmisores (Benowitz L I, Schmidt J T, 1987, Stroemer R P, *et al.*, 1993, Ondarza A B, *et al.*, 2003).

Con base en estos antecedentes, y dado el probable incremento de la inervación somatosensorial del belfo en las ratas enucleadas antes referido, decidimos evaluar posibles cambios en la disponibilidad de GAP-43 en neuronas mecanoceptivas del ganglio del nervio trigémino de ratas testigo y enceguecidas al nacimiento en tres edades distintas durante el desarrollo postnatal. Además se evaluaron posibles diferencias en el tamaño de estas neuronas con relación a la edad y a la enucleación.

HIPÓTESIS

1. El contenido de la proteína GAP-43 es mayor en las neuronas mecanoceptivas (grandes) de la región del ganglio que corresponde a la emergencia de la rama maxilar del nervio trigémino en los animales enucleados, con relación a los testigos.
2. El contenido de la proteína GAP-43 es mayor en los ganglios del nervio trigémino de animales enucleados con relación a los testigos.
3. El área de las neuronas mecanoceptivas (grandes) de la región del ganglio que corresponde a la emergencia de la rama maxilar del nervio trigémino es mayor en los animales enucleados con relación a los testigos.

OBJETIVOS

1. Evaluar posibles variaciones en la intensidad de la tinción inmunohistoquímica para la proteína GAP-43 en las neuronas localizadas en la región ganglionar de la que emerge la rama maxilar del nervio trigémino en ratas testigo y enucleadas a diferentes días de edad, mediante las técnicas de inmunohistoquímica y densitometría digital.
2. Evaluar posibles cambios en el contenido de la proteína GAP-43 en el ganglio del nervio trigémino en ratas testigo y enucleadas a diferentes días de edad, mediante las técnicas de inmunoelectrotransferencia y densitometría digital.
3. Estimar el área de tinción de las neuronas en la región del ganglio que corresponde a la emergencia de la rama maxilar del nervio trigémino en los animales enucleados y testigos de los diferentes días de edad, utilizando técnicas morfométricas de análisis digital de imágenes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 10, 30 y 60 días de edad. Para cada grupo de edad se destinaron 2 camadas. El número de crías por camada se ajustó a ocho (cuatro machos y cuatro hembras). De estas crías, dos machos fueron testigo y dos se enuclearon. Las hembras, que sólo se utilizaron para que el amamantamiento fuese equitativo, quedaron fuera del estudio. Los animales tuvieron libre acceso a alimentación y agua, y se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación controladas, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 x 12 horas. Las ratas que fueron sacrificadas después de 30 días de edad fueron destetadas hacia el día 21 postnatal. Los procedimientos de manejo de animales y quirúrgicos fueron aprobados por el comité local de protección de los derechos de animales.

Enucleación

La enucleación se realizó durante las diez primeras horas de vida. Los animales fueron colocados en una cama de hielo para anestésarlos. Dado que las ratas de 10 horas de vida no han abierto los ojos, es necesario realizar una pequeña incisión sobre la fisura palpebral. Con un bisturí de punta muy fina, se incidió en una longitud menor a 3mm y una profundidad mínima, suficiente para separar el párpado inferior del superior. Finalmente, utilizando una pinza fina, se removió totalmente el tejido ocular incluyendo a la glándula lacrimal. El tamaño de las estructuras anatómicas permite que la operación sea gentil y sencilla. El sangrado producido es prácticamente nulo y la duración de la extracción de cada ojo es menor a 30 seg. Después de realizada la enucleación bilateral, las ratas fueron

colocadas en una cobija térmica a 37° C hasta que recuperaron su color y movimientos, después de lo cual fueron devueltas con su madre.

Disección de los tejidos y su conservación

Las ratas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (9 mg / 100 g de peso corporal) administrado por la vía intraperitoneal y de inmediato se disecaron los ganglios del nervio trigémino. Para ello, se decapitó al animal con una guillotina, se retiró el cerebro y se desprendieron las meninges del ganglio trigeminal. Una vez obtenido éste, se colocó sobre una laminilla de vidrio cubierta con papel aluminio para conservar su orientación dorso-ventral, y se sumergió de inmediato en metilbutano previamente enfriado con hielo seco. Los especímenes se conservaron a -70° C hasta su utilización. De cada animal se seleccionó un ganglio para las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y para la medición del área de las neuronas, y el otro para la de inmunoelectrotransferencia; esta selección se realizó alternando entre los lados derecho e izquierdo. El total de ganglios obtenidos fue de 4 para cada técnica, edad y condición experimental.

Inmunohistoquímica

Se realizaron cortes longitudinales (14 µm de grosor) en un crióstato a -17° C. Los cortes se colocaron sobre portaobjetos cubiertos con gelatina. El primer corte de la serie se tomó una vez rebajadas las primeras 100µm del bloque. La serie se terminó de coleccionar después de haber recorrido 300µm adicionales a través del bloque. Las laminillas obtenidas se colocaron en una cámara de vacío durante 30 minutos, después de lo cual se sumergieron en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente para, posteriormente, lavarse profusamente con amortiguador de fosfatos (0.1M PB, pH 7.4).

Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, las laminillas se incubaron con una solución de H₂O₂ al 3% en PB a temperatura ambiente por 15 minutos, y se lavaron nuevamente con PB para incubarse con el suero de bloqueo (suero de caballo al 3%, tritón al 0.3% en PB; PBt) durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario conejo anti-GAP-43 (1:200 en PBT) (AB5220, Chemicon, Temecula, CA EUA) durante toda la noche. Dicho anticuerpo no discrimina entre las formas activa e inactiva de la proteína. Después de tres lavados, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo (1:200 en PBt) (AP 187B Chemicon) durante 3 horas a temperatura ambiente. Nuevamente, después de tres lavados, las laminillas fueron incubadas con el complejo avidina-peroxidasa durante 1.5 horas a temperatura ambiente de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Vector Laboratories, Burlingame CA, EUA). Finalmente, las laminillas se incubaron con una solución de 3,3'-diaminobencidina al 0.4% por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las laminillas se lavaron con PB, se dejaron secar toda la noche y se montaron con cytooseal.

Para su análisis, los cortes fueron observados en un microscopio compuesto (Axioscop40, Carl Zeiss Inc, Göttingen, Alemania Zeiss) y sus imágenes fueron capturadas a través de una cámara AxioCam (Carl Zeiss, Inc) y digitalizadas mediante el uso de programa AxioVision (Carl Zeiss, Inc). Los cortes se eligieron de manera alternada y seriada. De los cortes realizados sólo se seleccionaron 20 para cada edad y condición, de manera seriada, dejando un espacio de 10 cortes entre cada selección, lo que impidió que las neuronas se repitieran durante el muestreo. De cada corte se muestrearon solamente las primeras 5 neuronas que cumplieran con los criterios de inclusión. En primer lugar, se utilizó el objetivo de 4X para encuadrar la parte del ganglio correspondiente a la rama maxilar. Los valores de ganancia y brillo se mantuvieron constantes durante cada sesión de

captura. Una vez hecho esto, las fotografías se tomaron a una magnificación de 100X. Los criterios de inclusión fueron: células con contorno claramente definido, con núcleos grandes (lo que implica que el corte pasa por el centro de la célula), sin artefactos. Para ello se contaron 10 neuronas recorriendo la platina del microscopio hacia la parte dorsal del ganglio, después se recorrió caudalmente una distancia equivalente a una neurona, y posteriormente hacia la parte ventral una distancia de 10 neuronas. Esta serie de movimientos en zig-zag se repitió aproximadamente 5 veces en cada corte, para lograr el muestreo de 5 neuronas que cumplieran con los criterios de inclusión. El número de neuronas seleccionadas hasta este paso fue de aproximadamente 100 por cada edad y condición experimental. Una vez capturadas y digitalizadas las imágenes, se estimó la intensidad de la marca inmunológica seleccionando manualmente a las neuronas que serían evaluadas. Se procedió a trazar los límites tanto del citoplasma como del núcleo de las neuronas, y la intensidad de la marca intra-citoplásmica fue medida en esta última zona. También se tomaron medidas de intensidad de la marca en el núcleo neuronal. Se estimó la diferencia porcentual de la intensidad entre el soma (positivo) y el núcleo (negativo), cuyo valor obtenido se consideró como el valor densitométrico. Esto nos permitió tener un control interno que contiene contra los problemas de variaciones de la tinción entre diferentes laminillas y experimentos. Al mismo tiempo, se obtuvieron las áreas del núcleo y de la zona citoplásmica teñida. Esto nos permitió establecer el tamaño neuronal, así como también el porcentaje de área neuronal ocupada por núcleo; estimar este porcentaje nos permitió ver si las posibles modificaciones encontradas en el tamaño de las neuronas se referían a cambios proporcionales de soma y núcleo, o si sólo se referían a cambios en el soma. En este sentido, un cambio proporcional del soma y núcleo neuronales puede inferir cambios en el crecimiento de la célula, mientras que una modificación desproporcionada de

los tamaños de estas estructuras no. Posteriormente, se obtuvo la mediana del área neuronal de cada edad y condición experimental, valor a partir del cual se realizó la división entre neuronas grandes (mecanoceptivas) y neuronas pequeñas (nociceptivas). Las neuronas pequeñas se dejaron fuera del estudio, lo que quiere decir que el tamaño de muestra fue de aproximadamente 50 neuronas para cada edad y condición experimental.

Inmunoelectrotransferencia

Los ganglios obtenidos se homogenizaron por sonicación (4 pulsos de 40W, con duración de 35 segundos cada 2 minutos) en amortiguador de lisis (100mM NaCl, 10mM Tris HCl, 1mM PMSF, 0.5% tritón X 100), adicionado con una tableta de inhibidores de proteasas libres de EDTA (Roche) a 4°C. Una vez homogenizada la muestra, se procedió a centrifugar por 30 minutos a 14,000 RPM a 4°C, se recuperó entonces el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford M M, 1976). Finalmente, se prepararon alícuotas de 40µg de proteínas que se mantuvieron a -40°C hasta su uso. Las muestras de proteína (8µg por carril) se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS corridos a un voltaje de 80 V, por 30 minutos y a 125 V por 1 hora a temperatura ambiente. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando una cámara de transferencia semiseca a 0.3A por 45 minutos. Posteriormente, las membranas se lavaron con amortiguador de fosfatos por 15 minutos, para después incubarse en suero de bloqueo por 2 horas (leche descremada al 5% en Tris- NaCl, Tritón (TTBS)). Una vez finalizada la transferencia, las membranas se lavaron en dos ocasiones con Tris-NaCl (TBS) y se incubaron con el anticuerpo primario conejo anti-GAP-43 (diluido 1:5000 en TTBS con suero de albúmina bovina (BSA) al 1%) durante toda la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron con TTBS en tres ocasiones y se

incubaron con los anticuerpos secundarios cabra anti-conejo (diluido 1:10000 en TTBS con BSA al 1%) durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron nuevamente y se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa por 45 minutos a temperatura ambiente de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las membranas se lavaron y revelaron mediante quimioluminiscencia siguiendo el protocolo descrito por el proveedor (Amersham). Finalmente, placas fotográficas (Kodak) fueron expuestas a las membranas por 2 minutos a temperatura ambiente. Las placas se revelaron en Dektol (1 minuto) y fijaron (1 minuto) en fijador rápido, ambos de Kodak. Para su análisis, las placas se digitalizaron (Fluor-S Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) y se analizaron los cambios mediante densitometría usando el programa Quantity One (Bio-Rad). La densidad óptica de las bandas se ajustó automáticamente a través de restar el valor del fondo de la placa.

Análisis estadístico

Los estimadores de densidad obtenidos por la inmunohistoquímica y la inmunoelectrotransferencia, así como los de área celular y porcentaje de área celular ocupado por el núcleo, fueron analizados mediante la prueba de Análisis de Varianza de Rangos tipo Kruskal-Wallis, utilizando el paquete estadístico Sigma Stat versión 3.1. Para el análisis de la inmunoelectrotransferencia se utilizó la prueba *post hoc* de Dunn.

RESULTADOS

En las neuronas individuales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los estimadores medidos (densidad de marca inmunohistoquímica para GAP-43, tamaño de las neuronas y porcentaje de área celular ocupado por el núcleo). Sin embargo, se mencionan las tendencias observadas:

La intensidad de la marca de las neuronas mecanoceptivas de la región de la rama maxilar del ganglio trigeminal tiende a incrementar entre los 10 y 60 días en ambos grupos de animales. Sin embargo, el patrón del incremento en la intensidad de la marca difiere entre ambos grupos de ratas. Mientras que en las ratas testigo la pendiente del incremento es mayor entre los 10P y los 30P (medianas = 18.7 y 22.9 unidades densitométricas, de 10P a 30P, respectivamente), en las ratas enucleadas ésta es mayor entre los 30P y los 60P (medianas = 21.8 y 26.3 unidades densitométricas, de 30P a 60P, respectivamente) ANOVA de Rangos Kruskal-Wallis $H = 8.912$, con 5 grados de libertad. ($P = 0.113$). (Figura 4).

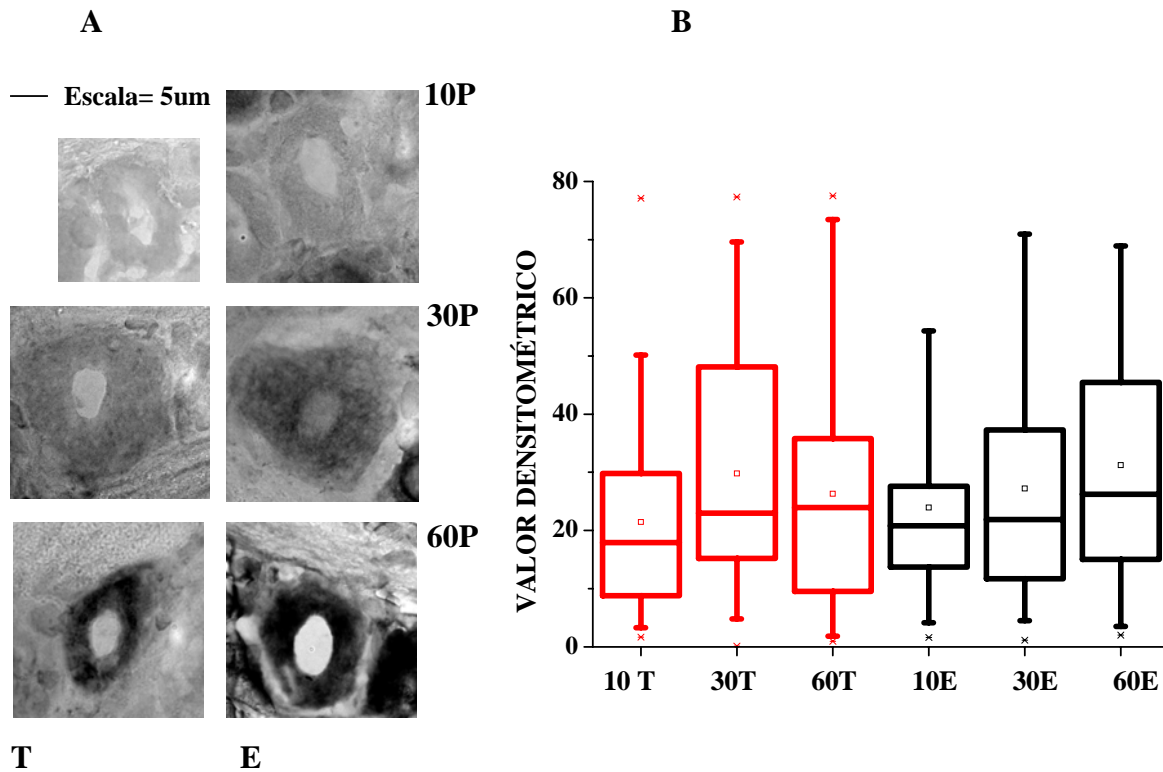


Figura 4. (A) Fotomicrografías que muestran neuronas ganglionares grandes presumiblemente dan origen a la rama maxilar del nervio trigémino en ratas testigo y enucleadas a las edades de 10, 30 y 60 días de vida (T= testigo; E= enucleado). Escala (esquina superior izquierda) 5µm (B) Gráfica de cajas que muestra las medianas y los percentiles de los valores de intensidad relativa para la tinción citoplásmica de GAP-43 en las neuronas grandes del ganglio del trigémino. (10T= 10P, testigo; 10E= 10P, enucleado; 30T= 30P, testigo; 30E= 30P, enucleado; 60T= 60P, testigo; 60E= 60P, enucleado). Nótese, en ambas figuras, que existe una tendencia muy ligera al incremento en la intensidad de la inmunotinción para GAP-43 con la edad, así como también el patrón de esta tendencia es diferente entre ambos grupos de ratas. ANOVA de Rangos Kruskal-Wallis H = 8.912, con 5 grados de libertad. (P = 0.113).

En general, la frecuencia de neuronas cuya área es menor las $320 \mu\text{m}^2$ es mayor a los 10P en ambos grupos de ratas. En contraste, ente los 30P y los 60P, incrementa la frecuencia de las neuronas cuya área es mayor a $320\mu\text{m}^2$ tanto en las ratas testigo como en las enucleadas. Es decir, se observa un discreto corrimiento a la derecha de los histogramas de frecuencia con el avance de la edad.

No obstante la similitud en el comportamiento del crecimiento del área de las neuronas ganglionares en ambos grupos de ratas, los valores en aquéllas enucleadas tienden a ser ligeramente mayores (ver los valores promedio en los histogramas).

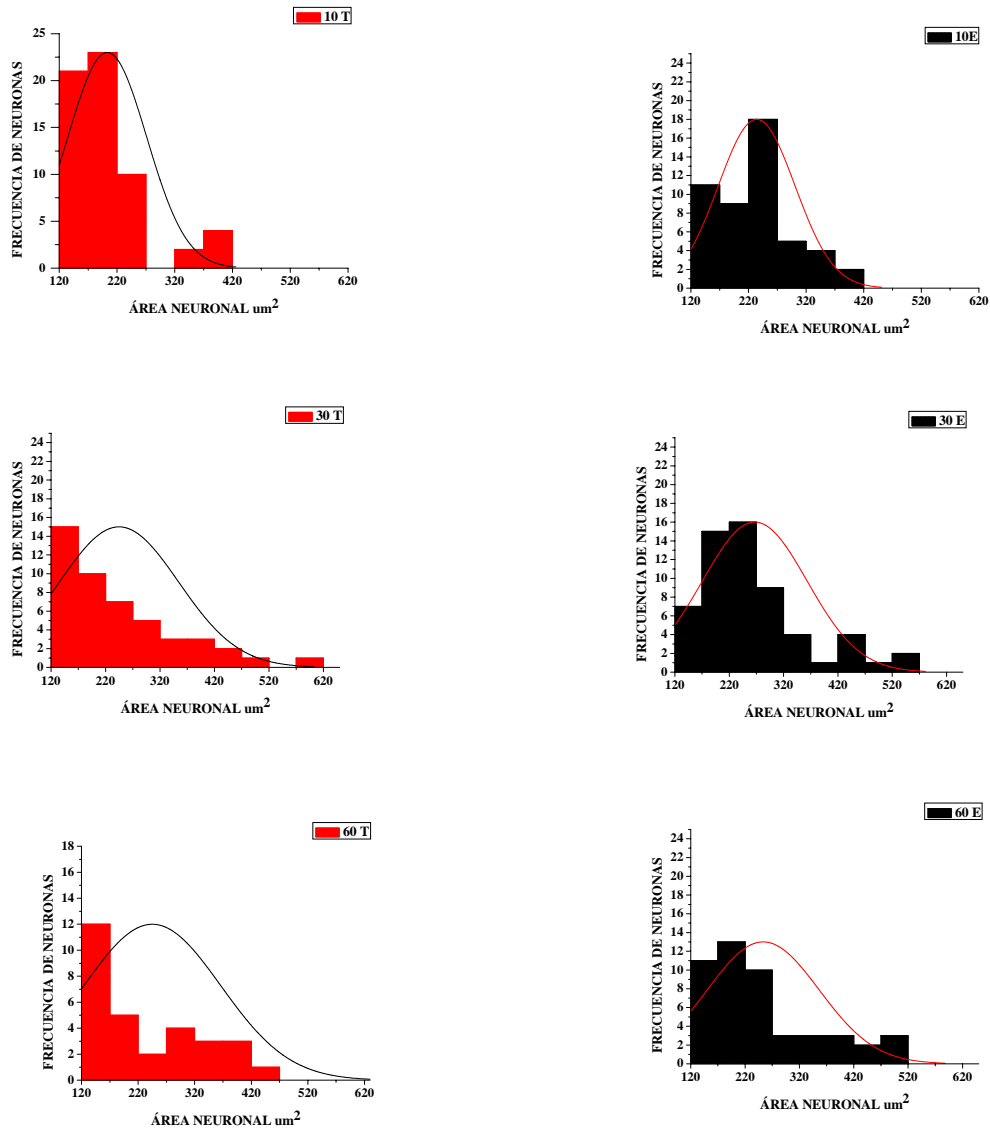


Figura 5. Histogramas de frecuencias que muestran la distribución de los tamaños de las neuronas grandes localizadas en la zona de la rama maxilar del ganglio trigeminal en ratas testigo y enucleadas a distintas edades. (10T= 10P, testigo; 10E= 10P, enucleado; 30T= 30P, testigo; 30E= 30P, enucleado; 60T= 60P, testigo; 60E= 60P, enucleado). Como puede observarse en ambos grupos de ratas la frecuencia de neuronas mayores a $320\mu\text{m}^2$ tiende a aumentar con la edad.

El citoplasma de las neuronas mecanoceptivas pertenecientes a la rama maxilar del ganglio trigeminal de los animales enucleados tiende a expandirse con la edad. Mientras

que el porcentaje de área neuronal ocupada por núcleo se mantiene a lo largo de la edad en las ratas testigo (medianas = 15.8% al 10P, 16.3% al 30P, 16.6% al 60P), en aquellas enucleadas tiende a disminuir (medianas = 18.2% al 10P, 14.2% al 30P, 9.2% al 60P) (Figura 6A). Esta disminución no refleja una reducción del tamaño nuclear (Figura 6B), y dada la tendencia a aumentar el área total de la célula con la edad, se concluye que el cambio de tamaño se debe a una expansión del citoplasma. A pesar del valor de la significancia del ANOVA Kruskal-Wallis ($P = 0.015$), la prueba de comparaciones múltiples de Dunn no refleja diferencias estadísticamente significativas entre las edades y condiciones que son biológicamente comparables.

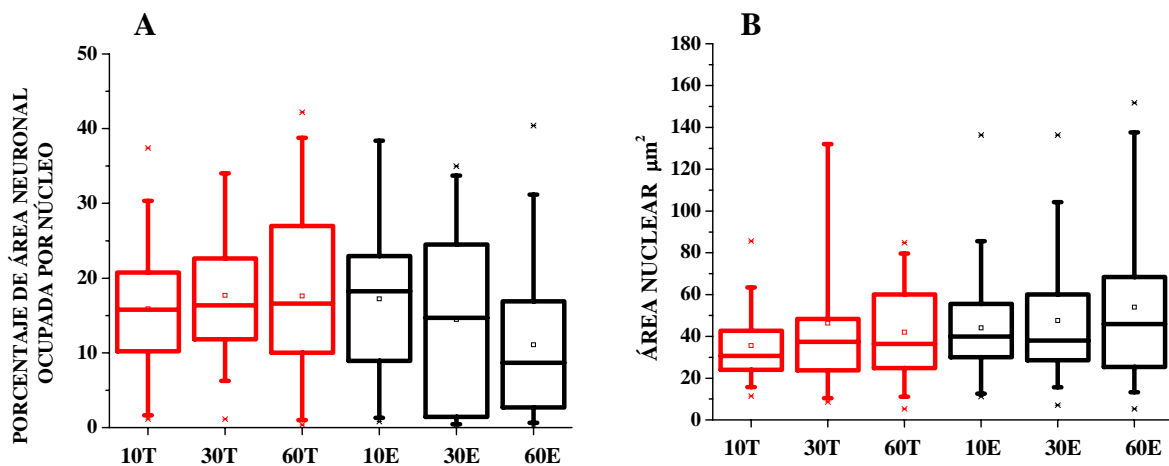


Figura 6. (A) Gráfica de cajas que muestra las medianas y los percentiles de los valores del área relativa del núcleo celular en las neuronas grandes del ganglio del trigémino de ratas testigo y enucleadas a diferentes edades. Nótese la tendencia a disminuir este estimador con la edad en las ratas enucleadas. ANOVA de Rangos Kruskal-Wallis $H = 14.041$ con 5 grados de libertad. ($P = 0.015$) para la comparación general. Prueba de comparaciones múltiples de Dunn: $P < 0.05$ sólo al comparar 30T vs 60E (lo que no tiene ninguna relevancia biológica). (B) Gráfica de cajas que muestra las medianas y los percentiles de los valores del área del núcleo celular en las neuronas grandes del ganglio del trigémino de ratas testigo y enucleadas a diferentes edades. ANOVA de Rangos Kruskal-Wallis $H = 9.354$ con 5 grados de libertad. ($P = 0.096$). (10T= 10P, testigo; 10E= 10P, enucleado; 30T= 30P, testigo; 30E= 30P, enucleado; 60T= 60P, testigo; 60E= 60P, enucleado).

Se encontró evidencia estadística de que el contenido de GAP-43 en el ganglio del trigémino de ratas enucleadas disminuye con la edad. A los 30P las bandas

inmunorreactivas de la inmunoelectrotransferencia realizada en los ganglios trigeminales de las ratas enucleadas muestran 0.18 puntos densitométricos para GAP-43. A los 60P de este mismo grupo, se presenta un valor densitométrico de 0.13 puntos. ANOVA de Kruskal-Wallis $H = 15.608$ con 5 grados de libertad. ($P = 0.008$) para la comparación general. Prueba de comparaciones múltiples de Dunn: $P < 0.05$ sólo al comparar 30E vs 60E.

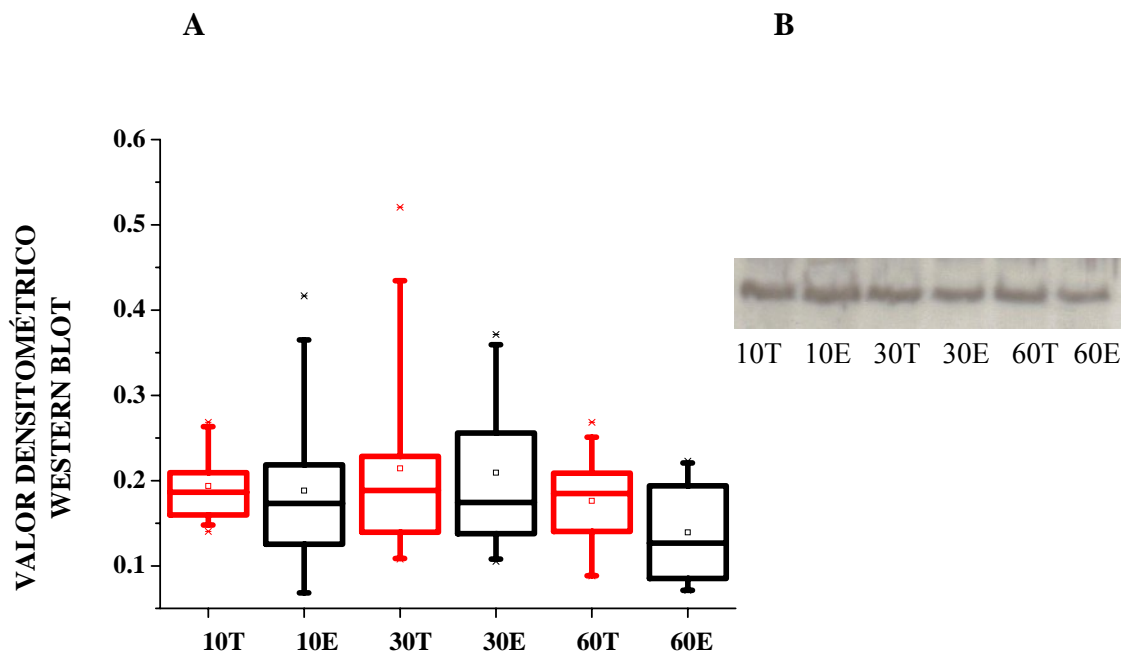


Figura 7. (A) Gráfica de cajas que muestra las medianas y los percentiles de los valores densitométricos de las bandas inmunorreactivas a GAP-43 de la inmunoelectrotransferencia de los ganglios trigeminales de ratas testigo y enucleadas a distintas edades. Nótese la disminución significativa de este valor entre 30E y 60E. ANOVA de Kruskal-Wallis $H = 15.608$ con 5 grados de libertad. ($P = 0.008$) para la comparación general. Prueba de comparaciones múltiples de Dunn: $P < 0.05$ sólo al comparar 30E vs 60E. (B) Fotografía que ilustra las bandas inmunorreactivas a GAP-43. (10T= 10P, testigo; 10E= 10P, enucleado; 30T= 30P, testigo; 30E= 30P, enucleado; 60T= 60P, testigo; 60E= 60P, enucleado).

DISCUSIÓN

La discriminación táctil en individuos ciegos difiere de aquella correspondiente a la de individuos con un sentido de la vista íntegro (Heller M A, 1989, Sunanto J, Nakata H, 1998, Sterr A, *et al.*, 2003). Dichas diferencias pueden resultar de modificaciones anatómico-funcionales del sistema nervioso tanto a nivel central como periférico. Mucho trabajo se ha hecho para tratar de entender la participación de las vías y centros nerviosos centrales en estas diferencias (Bronchti G, *et al.*, 1992, Rauschecker J P, *et al.*, 1992, Toldi J, *et al.*, 1996, Negyessy L, *et al.*, 2000), mientras que el papel del sistema nervioso periférico ha sido poco explorado. Evidencia reciente obtenida en el laboratorio muestra incrementos en la densidad de células de Merkel en los folículos de las vibrisas y en la inervación relativa y la disponibilidad de neurotrofina-3 en la piel del belfo de ratas ciegas. Estos resultados son compatibles con la idea de que la inervación periférica esté elevada en ratas enucleadas. Con esto en mente, y dado que la proteína GAP-43 se asocia al crecimiento de axones, en el presente trabajo investigamos si el contenido de esta proteína aumentaba, o si su patrón de disponibilidad se modificaba, en las neuronas ganglionares mecanoceptivas correspondientes a la rama infraorbitaria del nervio trigémino en respuesta a la enucleación.

Nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratas testigo y enucleadas en la densidad de inmunotinción para GAP-43 en las neuronas presentes en la región de la rama maxilar del ganglio trigeminal, ni en el área neuronal, así como tampoco en el porcentaje de área neuronal ocupada por núcleo, a las diferentes edades estudiadas, con relación a la enucleación. Estos resultados pueden ser producto de diversas circunstancias. La primera de ellas, es que efectivamente no ocurren cambios en la inervación de los belfos de la rata ciega, con relación a la rata testigo. Sin embargo, nuestros antecedentes sugieren que sí hay cambios periféricos como resultado de

la enucleación, específicamente con relación a la sobrevivencia de las células de Merkel (Martínez Martínez E, 2004). No obstante, estos mecanorreceptores dependen también de factores tróficos como neurotrofina-3 (NT-3) para su sobrevivencia, no sólo de la inervación. Así, es probable que el aumento en la sobrevivencia de las células de Merkel observada en la rata enucleada se deba a un aumento en la producción local de NT-3, sin que intervenga el crecimiento axonal.

Es probable, también, que un posible incremento en la ramificación axonal que inerva a los belfos de la rata ciega, se deba no al aumento en el desarrollo, sino a una retención de axones transitorios. Se sabe que las ramas axónicas periféricas y centrales sufren un proceso de eliminación en las primeras etapas del desarrollo posnatal, al menos en los mamíferos (Luo L, O'Leary D D, 2005). Si la pérdida de estos axones disminuyera en la rata enucleada, esto explicaría por qué las células de Merkel sobreviven más. Para ahondar en esta posibilidad, es necesario realizar en un estudio posterior la evaluación del contenido de sinapsis. Otra estrategia experimental útil en este sentido sería evaluar la densidad de inervación de la piel de las ratas testigo y enucleadas a lo largo de la edad. En estudios como los que se mencionan, sin embargo, la información acerca del tipo de neuronas (mecanorreceptivas o nociceptivas) podría ser difícil de distinguir. Para contender contra esto, sería indispensable valerse del análisis morfológico por microscopía electrónica, o bien, mediante la realización de marcajes múltiples simultáneos con anticuerpos que distinguen a los diferentes tipos de fibras.

También existe la posibilidad de que si bien la densidad de inervación del belfo de la rata ciega no sea mayor que la de la rata testigo, las propiedades biofísicas de los axones de ambos grupos sean distintas. Se sabe que los campos receptivos de los belfos de la rata enucleada al nacimiento son mayores para algunos de los bigotes (Toldi J, *et al.*, 1994).

Asimismo, el grado de mielinización ha mostrado cambios en respuesta al estímulo derivado del aprendizaje (Fields R D, 2005). Estos eventos pudieran ser el sustento de las habilidades diferenciales que existen entre individuos testigo y enucleado. Es importante revisar estas propiedades en la inervación del belfo de la rata ciega.

Por otro lado, puede pensarse que la proteína GAP-43 se está produciendo más en los animales enucleados debido a un posible aumento en el desarrollo de axones pero que, debido a que esta proteína actúa en los conos de crecimiento, es posible que el transporte axonal de GAP-43 se encuentre incrementado en los animales ciegos, dando como resultado que no se observe diferencia entre la inmunotinción de los somas neuronales de ambos grupos. En este sentido, es necesario estudiar la inmunotinción de esta proteína en los axones distales.

Otra posibilidad es que la ventana temporal en que se evaluó GAP-43 no fue la más adecuada. Suponiendo que el desarrollo de la inervación sea mayor en el animal enucleado que en el testigo, es probable que este incremento esté ocurriendo en edades que no fueron medidas, por lo que se deberán realizar estudios a edades distintas de las que se evaluaron en el presente trabajo.

Las posibilidades que abordamos en la sección anterior, intentan explicar la ausencia de diferencias en los resultados obtenidos entre ambos grupos experimentales. No obstante, consideramos que vale la pena abordar las tendencias obtenidas en el análisis descriptivo de los datos:

Las neuronas mecanoceptivas en las ratas enucleadas tendieron a mostrar una mayor intensidad de marca a los 10P y 60P que las ratas testigo. Esta observación pudiera explicar por qué las células de Merkel mueren menos en las ratas enucleadas entre los 10P y 30P al ser comparadas con las ratas testigo. Se sabe que la sobrevivencia de las células de Merkel

depende de la inervación que reciben durante las primeras semanas de vida (Krimm R F, *et al.*, 2004). Siguiendo esta misma línea, nuestra observación también explicaría por qué la densidad de las células de Merkel en las ratas enucleadas se mantiene entre los 30P y 60P. Debido a que la sobrevivencia de las células de Merkel ya no depende de la inervación en la fase adulta, el efecto que se observa a los 60 días podría ser indirecto a través del control neural de la producción de factores tróficos, como las neurotrofinas, por parte de la piel.

Por otro lado, el patrón temporal de disponibilidad de la proteína GAP-43 durante el desarrollo aparenta ser diferente entre testigos y enucleados, lo que pudiera ser importante. Se sabe que los cambios en los patrones de disponibilidad de hormonas y factores de crecimiento modifican las tasas de desarrollo de diversos organismos. Es decir, el patrón temporal, y no solamente la cantidad en que un factor está disponible constituye un código de información que participa en los procesos del desarrollo. Al respecto, es importante destacar que la aparente diferencia en el patrón de disponibilidad de GAP-43 entre ratas testigos y enucleadas, coincide con cambios en los procesos de desarrollo de la población de células de Merkel.

Las neuronas mecanoceptivas de las ratas testigo mostraron una tendencia a incrementar su área desde los 10P hasta los 60P. Esta observación es consistente con estudios previos que muestran que las neuronas ganglionares trigeminales aumentan su tamaño conforme las ratas maduran (Biedenbach M A, *et al.*, 1992). El área promedio ($240\mu\text{m}^2$) reportada en el presente estudio, sin embargo, es menor que aquella referida en estudios previos ($300\mu\text{m}^2$ - $600\mu\text{m}^2$ (Sugimoto T, *et al.*, 1986), $300\mu\text{m}^2$ - $400\mu\text{m}^2$ (Sugimoto T, Takemura M, 1993), y $550\mu\text{m}^2$ (Lagares A, Avendano C, 2000)). Es probable que esta diferencia se deba a diferencias en los criterios de clasificación. Otra posibilidad es que la

tinción inmunocitoquímica para GAP-43 no se distribuya en la totalidad del citoplasma lo que resultaría en una subestimación del tamaño. En general, en otros estudios, se realizan inmunohistoquímicas acompañadas de una contratinción con violeta de cresilo. Esta última técnica delimita con gran precisión los contornos neuronales. En nuestro caso no contrateñimos debido a que realizamos estudios de densitometría cuyos resultados podrían haber sido modificados.

Por otro lado, es interesante destacar el hecho de que las ratas enucleadas tienden a mostrar una frecuencia mayor de neuronas con áreas mayores a las $320\mu\text{m}^2$ con la edad, mientras que el porcentaje de área neuronal ocupado por núcleo tiende a ser menor. Esta disminución podría no reflejar un decremento en el área nuclear sino más bien una hipertrofia del citoplasma neuronal. En general, se considera que la hipertrofia del citoplasma celular refleja una mayor actividad metabólica. Diversos estudios han mostrado que incrementos en el tamaño de una célula se asocian con aumentos en la cantidad de mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y/o liso, un mayor número de nucleolos y de eucromatina nuclear y un aumento en la complejidad del aparato de Golgi (Miyata S, Hatton G I, 2002).

Debido a que las neuronas mecanoceptivas tienden a mostrar un aumento en la intensidad de la marca para GAP-43 en los animales enucleados, el hecho de que estas neuronas estuviesen hipertróficas podría sugerir un aumento en la síntesis de proteínas relacionadas al crecimiento axonal.

Por otro lado, el análisis densitométrico de las inmunoelectrotransferencias muestra un decremento en la intensidad de las bandas inmunorreactivas a GAP-43 del 30P al 60P, en las ratas enucleadas. Estos resultados difieren de aquellos obtenidos en la densitometría

de la inmunocitoquímica, sin embargo, existen varias razones que pueden explicar esta diferencia. Una de ellas es que la proporción relativa de la proteína GAP-43 en el ganglio caiga con la edad. Esto conllevaría a una dilución de la proteína en ausencia de cambios reales. Por otro lado, el análisis por inmunoelectrotransferencia analiza el contenido relativo de GAP-43 considerando el contenido total de proteína de los ganglios. Estas proteínas se asocian a una diversidad de estructuras que el estudio de inmunohistoquímica permite excluir; el estudio por inmunohistoquímica está delimitado a las neuronas grandes de la rama infraorbitaria del ganglio. Es probable que mientras las neuronas mecanosensoriales incrementan su contenido en GAP-43, en otros componentes celulares del ganglio esta proteína disminuya. Por ejemplo, se sabe que algunas células del ganglio trigeminal (entre ellas las células de Schwann) disminuyen su producción de GAP-43 con la edad. Es claro que se requieren de más estudios para dilucidar esta contradicción.

A pesar de que se sabe que el sistema nervioso periférico es importante en el procesamiento de la información en la sensopercepción táctil, y que los individuos ciegos muestran una respuesta diferente en este sentido, no se conocen estudios sobre la inervación de la piel de los individuos ciegos ni sobre las características biofísicas, anatómicas y fisiológicas de estos axones. Este trabajo es un comienzo en la exploración del desarrollo de la inervación de la piel en modelos de ceguera, misma que puede ayudar a dilucidar las diferencias en las características sensoriales de dichos individuos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio no muestran diferencias en el contenido somático de GAP-43 ni en el tamaño celular en las neuronas pertenecientes a la región de la rama maxilar del ganglio trigeminal de ratas enucleadas, con relación a aquéllas testigo, a lo largo de la edad. Nuestros resultados sugieren que las habilidades distintas del tacto de las ratas enucleadas no se deben a una diferencia en el desarrollo axonal de las neuronas de la rama maxilar del ganglio trigeminal.

PERSPECTIVAS A FUTURO

Es importante realizar estudios más específicos sobre la inervación de la piel de modelos de ceguera. Por ejemplo, explorar la activación de los mecanorreceptores, así como de su inervación, en ratas testigo y enucleadas al nacimiento a diversas edades.

Por otro lado, sería interesante evaluar la expresión de la proteína GAP-43 en conos de crecimiento de ratas testigo y enucleadas, a edades anteriores y posteriores a los 10P, 30P y 60P, en sus dos formas. Esto puede realizarse mediante inmunohistoquímica e inmunoelectrotransferencia y densitometría, considerando los posibles factores de variación, e.g., el ciclo de crecimiento del pelo. Este estudio ayudaría a esclarecer si nuestras tendencias que indican la posibilidad de que el desarrollo de la inervación del tacto de los individuos ciegos sí se modifica, es correcta.

LITERATURA CITADA

Aigner L, Caroni P. Depletion of 43-kD growth-associated protein in primary sensory neurons leads to diminished formation and spreading of growth cones. *J Cell Biol* 1993; 123: 417-29.

Aigner M, Robert Lukas J, Denk M, Ziya-Ghazvini F, Kaider A, Mayr R. Somatotopic organization of primary afferent perikarya of the guinea-pig extraocular muscles in the trigeminal ganglion: a post-mortem DiI-tracing study. *Exp Eye Res* 2000; 70: 411-8.

Ambalavanar R, Moritani M, Haines A, Hilton T, Dessem D. Chemical phenotypes of muscle and cutaneous afferent neurons in the rat trigeminal ganglion. *J Comp Neurol* 2003; 460: 167-79.

Basi G S, Jacobson R D, Virag I, Schilling J, Skene J H. Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. *Cell* 1987; 49: 785-91.

Benowitz L I, Perrone-Bizzozero N I, Finklestein S P. Molecular properties of the growth-associated protein GAP-43 (B-50). *J Neurochem* 1987; 48: 1640-7.

Benowitz L I, Schmidt J T. Activity-dependent sharpening of the regenerating retinotectal projection in goldfish: relationship to the expression of growth-associated proteins. *Brain Res* 1987; 417: 118-26.

Besne I, Descombes C, Breton L. Effect of age and anatomical site on density of sensory innervation in human epidermis. *Arch Dermatol* 2002; 138: 1445-50.

Biedenbach M A, Kalu D N, Herbert D C. Effects of aging and food restriction on the trigeminal ganglion: a morphometric study. *Mech Ageing Dev* 1992; 65: 111-25.

Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

Bronchti G, Schonenberger N, Welker E, Van der Loos H. Barrelfield expansion after neonatal eye removal in mice. *Neuroreport* 1992; 3: 489-92.

Buffo A, Holtmaat A J, Savio T, Verbeek J S, Oberdick J, Oestreicher A B, Gispen W H, Verhaagen J, Rossi F, Strata P. Targeted overexpression of the neurite growth-associated protein B-50/GAP-43 in cerebellar Purkinje cells induces sprouting after axotomy but not axon regeneration into growth-permissive transplants. *J Neurosci* 1997; 17: 8778-91.

Cohen L G, Celnik P, Pascual-Leone A, Corwell B, Falz L, Dambrosia J, Honda M, Sadato N, Gerloff C, Catala M D, Hallett M. Functional relevance of cross-modal plasticity in blind humans. *Nature* 1997; 389: 180-3.

- Craig J C, Rollman G B. Somesthesia. *Annu Rev Psychol* 1999; 50: 305-31.
- Chang Y C, Lin W M, Hsieh S T. Effects of aging on human skin innervation. *Neuroreport* 2004; 15: 149-53.
- Daselaar S M, Veltman D J, Rombouts S A, Raaijmakers J G, Jonker C. Neuroanatomical correlates of episodic encoding and retrieval in young and elderly subjects. *Brain* 2003; 126: 43-56.
- Dent E W, Meiri K F. Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior. *J Neurobiol* 1998; 35: 287-99.
- Erzurumlu R S, Jhaveri S, Moya K L, Benowitz L I. Peripheral nerve regeneration induces elevated expression of GAP-43 in the brainstem trigeminal complex of adult hamsters. *Brain Res* 1989; 498: 135-9.
- Fields R D. Myelination: an overlooked mechanism of synaptic plasticity? *Neuroscientist* 2005; 11: 528-31.
- Frey D, Laux T, Xu L, Schneider C, Caroni P. Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J Cell Biol* 2000; 149: 1443-54.
- Fundin B T, Arvidsson J, Aldskogius H, Johansson O, Rice S N, Rice F L. Comprehensive immunofluorescence and lectin binding analysis of intervibrissal fur innervation in the mystacial pad of the rat. *J Comp Neurol* 1997; 385: 185-206.
- Geovannini Acuña H. Re-evaluación del papel de la actividad neuronal asociada con el uso y de la densidad de inervación periférica en la plasticidad sensoriomodal de la neocorteza de la rata (tesis de maestría). Querétaro (Querétaro) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
- Gordon-Weeks P R. GAP-43--what does it do in the growth cone? *Trends Neurosci* 1989; 12: 363-5.
- Heller M A. Picture and pattern perception in the sighted and the blind: the advantage of the late blind. *Perception* 1989; 18: 379-89.
- Hoffman P N. Expression of GAP-43, a rapidly transported growth-associated protein, and class II beta tubulin, a slowly transported cytoskeletal protein, are coordinated in regenerating neurons. *J Neurosci* 1989; 9: 893-7.
- Hollins M, Bensmaia S J, Roy E A. Vibrotaction and texture perception. *Behav Brain Res* 2002; 135: 51-6.
- Johnson K O. The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 455-61.

Johnson K O, Yoshioka T, Vega-Bermudez F. Tactile functions of mechanoreceptive afferents innervating the hand. *J Clin Neurophysiol* 2000; 17: 539-58.

Koerber H R, Mendell L M. Functional specialization of central projections from identified primary afferent fibers. *J Neurophysiol* 1988; 60: 1597-614.

Krimm R F, Davis B M, Woodbury C J, Albers K M. NT3 expressed in skin causes enhancement of SA1 sensory neurons that leads to postnatal enhancement of Merkel cells. *J Comp Neurol* 2004; 471: 352-60.

Kumamoto K, Senuma H, Ebara S, Matsuura T. Distribution of pacinian corpuscles in the hand of the monkey, *Macaca fuscata*. *J Anat* 1993; 183 (Pt 1): 149-54.

Lagares A, Avendano C. Lateral asymmetries in the trigeminal ganglion of the male rat. *Brain Res* 2000; 865: 202-10.

Lazarov N E. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol* 2002; 66: 19-59.

Luo L, O'Leary D D. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 127-56.

Maklad A, Fritsch B, Hansen L A. Innervation of the maxillary vibrissae in mice as revealed by anterograde and retrograde tract tracing. *Cell Tissue Res* 2004; 315: 167-80.

Martínez Martínez E. Evaluación de la plasticidad periférica en ratas ciegas (tesis de licenciatura). Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.

Miyata S, Hatton G I. Activity-related, dynamic neuron-glia interactions in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Microsc Res Tech* 2002; 56: 143-57.

Negyessy L, Gal V, Farkas T, Toldi J. Cross-modal plasticity of the corticothalamic circuits in rats enucleated on the first postnatal day. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 1654-68.

Oestreicher A B, De Graan P N, Gispen W H, Verhaagen J, Schrama L H. B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1997; 53: 627-86.

Ondarza A B, Ye Z, Hulsebosch C E. Direct evidence of primary afferent sprouting in distant segments following spinal cord injury in the rat: colocalization of GAP-43 and CGRP. *Exp Neurol* 2003; 184: 373-80.

Purves D. *Neuroscience*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, (2004).

Rauschecker J P, Tian B, Korte M, Egert U. Crossmodal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 5063-7.

Rice F L, Fundin B T, Arvidsson J, Aldskogius H, Johansson O. Comprehensive immunofluorescence and lectin binding analysis of vibrissal follicle sinus complex innervation in the mystacial pad of the rat. *J Comp Neurol* 1997; 385: 149-84.

Sadato N, Pascual-Leone A, Grafman J, Deiber M P, Ibanez V, Hallett M. Neural networks for Braille reading by the blind. *Brain* 1998; 121 (Pt 7): 1213-29.

Sommerville T, Reynolds M L, Woolf C J. Time-dependent differences in the increase in GAP-43 expression in dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neuroscience* 1991; 45: 213-20.

Spencer S, Willard M B. Does GAP-43 support axon growth by increasing the axonal transport velocity of calmodulin? *Exp Neurol* 1992; 115: 167-72.

Sterr A, Green L, Elbert T. Blind Braille readers mislocate tactile stimuli. *Biol Psychol* 2003; 63: 117-27.

Stevens J C. Aging and spatial acuity of touch. *J Gerontol* 1992; 47: P35-40.

Stroemer R P, Kent T A, Hulsebosch C E. Acute increase in expression of growth associated protein GAP-43 following cortical ischemia in rat. *Neurosci Lett* 1993; 162: 51-4.

Sugimoto T, Takemura M. Tooth pulp primary neurons: cell size analysis, central connection, and carbonic anhydrase activity. *Brain Res Bull* 1993; 30: 221-6.

Sugimoto T, Takemura M, Sakai A, Ishimaru M. Cell size analysis of trigeminal primary afferent neurons comprising individual peripheral branches of the rat mandibular nerve. *Exp Neurol* 1986; 93: 565-73.

Sunanto J, Nakata H. Indirect tactual discrimination of heights by blind and blindfolded sighted subjects. *Percept Mot Skills* 1998; 86: 383-6.

Takahashi-Iwanaga H. Three-dimensional microanatomy of longitudinal lanceolate endings in rat vibrissae. *J Comp Neurol* 2000; 426: 259-69.

Toldi J, Farkas T, Volgyi B. Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioural and electrophysiological study. *Neurosci Lett* 1994; 167: 1-4.

Toldi J, Feher O, Wolff J R. Neuronal plasticity induced by neonatal monocular (and binocular) enucleation. *Prog Neurobiol* 1996; 48: 191-218.

Van der Zee C E, Nielander H B, Vos J P, Lopes da Silva S, Verhaagen J, Oestreicher A B, Schrama L H, Schotman P, Gispen W H. Expression of growth-associated protein B-50 (GAP43) in dorsal root ganglia and sciatic nerve during regenerative sprouting. *J Neurosci* 1989; 9: 3505-12.

Verge V M, Tetzlaff W, Richardson P M, Bisby M A. Correlation between GAP43 and nerve growth factor receptors in rat sensory neurons. *J Neurosci* 1990; 10: 926-34.

Verkade P, Schrama L H, Verkleij A J, Gispen W H, Oestreicher A B. Ultrastructural colocalization of calmodulin and B-50/growth-associated protein-43 at the plasma membrane of proximal unmyelinated axon shafts studied in the model of the regenerating rat sciatic nerve. *Neuroscience* 1997; 79: 1207-18.

Wiese U H, Ruth J L, Emson P C. Differential expression of growth-associated protein (GAP-43) mRNA in rat primary sensory neurons after peripheral nerve lesion: a non-radioactive in situ hybridisation study. *Brain Res* 1992; 592: 141-56.

Wolf C J, Reynolds M L, Molander C, O'Brien C, Lindsay R M, Benowitz L I. The growth-associated protein GAP-43 appears in dorsal root ganglion cells and in the dorsal horn of the rat spinal cord following peripheral nerve injury. *Neuroscience* 1990; 34: 465-78.