



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

ANALISIS EXPERIMENTAL DE LA  
REGENERACIÓN NEURAL *IN VITRO*

TESIS

Que para obtener el titulo de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Presenta:

Biol. Iván Ramiro Espínola Alvarado

Tutora

Dra. Beatriz Fuentes Pardo

México, D. F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**A mi esposa, Dorys y mi hija, Lucia Regina.**

**A mis padres, José Ramiro y Sonia.**

**Agradezco a mis padres, Sonia Alvarado Olvera y José Ramiro Espínola Almanza, su enorme apoyo, sin el cual, este logro sería impensable.**

Agradezco a mi esposa, **Dorys Mata López**, por brindarme la tranquilidad necesaria para terminar este trabajo.

Agradezco a mi tutora la **Dra. Beatriz Fuentes Pardo** por haberme brindado su confianza, así como, la oportunidad de colaborar con ella y hacer posible este proyecto.

Agradezco a todas las personas que intervinieron en la realización de esta tesis y particularmente a la **Dra. Marta Romano Pardo** y a su estudiante **Herlinda Rivera Rosas** cuya colaboración resultó decisiva en la finalización de este proyecto.

Agradezco al **Dr. José Luis Cortés Peñaloza** por entrenarme en la técnica de registro electrofisiológico de campo.

Agradezco a la técnica académica **Yolanda Quintana** su valiosa colaboración y amistad incondicional.

Agradezco a mis sinodales su paciencia y compromiso en la revisión de esta tesis:

**Dra. Beatriz Fuentes Pardo**  
**Dra. Marta Romano Pardo**  
**Dra. Margarita González del Pliego**  
**Dr. Federico Bermúdez Rattoni**  
**Dr. Rene Drucker Colín**

Agradezco a **Antonio García Guerra** y a **Raúl Cueva del Castillo Mendoza** su amistad desinteresada y su apoyo indirecto a este proyecto.

Agradezco a la **Facultad de Medicina de la UNAM** por poder emplear su infraestructura.

Agradezco al **CINVESTAV del IPN** por poder emplear su infraestructura.

# INDICE TEMATICO

RESUMEN

CAPITULO 1

INTRODUCCION

ANTECEDENTES

BREVE HISTORIA DEL ESTUDIO DE LA REGENERACION NERVIOSA

CONCEPTO DE REGENERACION Y DEGENERACION NERVIOSA

RAMIFICACIÓN Y REGENERACION NEURAL

PLASTICIDAD NEURONAL, SIMILITUDES CON LA REGENERACION NERVIOSA

FACTORES QUE AFECTAN LA REGENERACION NERVIOSA

ESPECIE

EDAD DEL INDIVIDUO

TIPO DE TEJIDO NEURONAL

NEUROTROFINAS Y SUS RECEPTORES

CAPITULO 2

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LOS CRUSTACEOS

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL ACOCIL

REGENERACIÓN Y DEGENERACION NERVIOSA EN EL ACOCIL.

INFORMACIÓN RELATIVA AL PROYECTO OBTENIDA EN NUESTRO

LABORATORIO

JUSTIFICACION

HIPOTESIS

OBJETIVOS

MATERIALES Y METODOS

LOS ACOCILES Y SU MANTENIMIENTO

MANTENIMIENTO DE ANIMALES CUYA CADENA GANGLIONAR FUE  
DESTINADA AL CULTIVO DE TEJIDOS

DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS CONTROLES Y EXPERIMENTALES

REGISTROS ELECTROFISIOLOGICOS

GRUPO 1: VIABILIDAD (ACTIVIDAD ESPONTÁNEA)

GRUPO 2: ACTIVIDAD INDUCIDA

EXPERIMENTOS HISTOLOGICOS

EL TEJIDO PROCESADO PARA CORTES HISTOLOGICOS

EXPERIMENTOS DE DETECCION MOLECULAR DE TRK A

CONTROL POSITIVO

CONTROL NEGATIVO Y FALSOS POSITIVOS

EXPERIMENTAL POSITIVO

EXPERIMENTAL NEGATIVO Y FALSOS POSITIVOS

TECNICAS EMPLEADAS PARA EL DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO  
EXPERIMENTAL:

OBTENCION DE UNA CADENA GANGLIONAR

EXPOSICION DE LA CADENA GANGLIONAR

CASO GENERAL

CASO DE LESION CON PINZAS

CASO DE LESION CON HILO

CASO DE CULTIVO DE TEJIDOS

CASO DE CULTIVO DE TEJIDOS EN NGF

EXTRACCION DE LA CADENA GANGLIONAR PARA REGISTRO

INMEDIATO

EXTRACCION DE LA CADENA GANGLIONAR PARA EL CULTIVO

DE TEJIDOS

TECNICA ELECTROFISIOLÓGICA:

DESCRIPCION DEL CIRCUITO DE REGISTRO

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA ESPONTANEA

DESCRIPCION DEL CIRCUITO DE ESTIMULACION

ESTANDARIZACION DEL ESTIMULO

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA PRODUCIDA POR  
ESTIMULACION ELECTRICA

TECNICAS HISTOLOGICAS

TÉCNICA DE FIJACION DEL TEJIDO

INCLUSION EN PARAFINA

CORTES HISTOLOGICOS

TINCION DE TRICRÓMICA DE MASSON

PROCEDIMIENTOS MOLECULARES PARA LA DETECCION DE TRK-A

HOMOGENEIZADO

ACOCIL

CEREBRO DE RATA

INMUNOPRECIPITACION

WESTERN BLOT

INMUNO ELECTRO TRANSFERENCIA (IET)

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

APENDICE I

APENDICE II

APENDICE III

APENDICE IV

APENDICE V

APENDICE VI

## RESUMEN

Este trabajo estuvo encaminado a generar un modelo *in vitro* que permita estudiar y comprender el fenómeno de la regeneración del sistema nervioso central a una lesión mecánica,

Se empleó al acocil (*Procambarus clarkii*) como sujeto experimental, debido a que:

- a) La supervivencia de las cadenas ganglionares *in vitro* se extiende por más de 7 días.
- b) Existe suficiente información de la anatomía y fisiología de las raíces tónico motoras de la cadena ganglionar ventral abdominal para poder estudiar la recuperación de la conductividad nerviosa tras la lesión del tejido conectivo ínterganglionar.
- c) Se puede diseccionar la totalidad del sistema nervioso con facilidad.

Se comparó la recuperación a una lesión en presencia y en ausencia del factor de crecimiento nervioso (NGF<sup>1</sup>) y se pudo comprobar que en los casos en los que la vaina no impidió el paso de los axones a través de lesión tuvo un efecto favorable en la recuperación de las lesiones.

Se establecieron métodos reproducibles de estimulación y registro eléctrico que permitieron la evaluación del efecto de la lesión en el tejido nervioso sobre la transmisión de potenciales de acción, se presentan y discuten los resultados que muestran su recuperación.

Se empleó la técnica histológica tricrómica de Masson para determinar los cambios estructurales producidos por la lesión y la posterior evolución del fenómeno regenerativo.

Determinamos la presencia de receptores de alta afinidad a neurotrofinas tipo A (TRK-A) en tejido nervioso del acocil.

---

<sup>1</sup> Del inglés "nerve growth factor"

# CAPITULO 1

## INTRODUCCION

El tema de la regeneración nerviosa ha atraído la atención de numerosos investigadores quienes lo han abordado desde diversos puntos de vista y con distintos objetivos, siendo común el uso de distintas herramientas metodológicas que van desde el análisis de la conducta hasta la aplicación de técnicas de biología molecular.

El empleo de diversas especies, -como las sanguijuelas (Acklin S E & Nicholls J G, 1990) o el hombre (Guest D et al., 1997)-, como sujetos de estudio durante distintas etapas de su desarrollo ontogénico, pone de manifiesto el interés que se tiene en el tema. Pese a ello y a que los procesos de regeneración y degeneración se han estudiado desde hace cerca de 100 años (Ramón y Cajal, S. 1914), existen aún buen número de objetivos y preguntas, (algunos de ellos planteados desde entonces) por resolver, lo que pone en evidencia lo complejo de estos procesos. Quizá el ejemplo más claro y primigenio de lo anterior es el anhelo de lograr que las personas se reestablezcan de alguna discapacidad producida por la lesión o una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central, mediante el empleo de alguna cura, la cual supone casi forzosamente la regeneración nerviosa.

Un punto básico, planteado recientemente y que permanece aún sin respuesta es el mecanismo por el cual las neuronas reconectan o no con las mismas células o grupos de células que eran su blanco antes de la lesión.

También es de interés establecer por ejemplo, si la especificidad de la reconexión depende de la presencia de factores como las neurotrofinas y sus receptores o si, todos los animales que poseen sistema nervioso tienen factores como las neurotrofinas y sus receptores que hagan permisiva la regeneración nerviosa.

Quedan como dudas de gran significado pragmático las siguientes: ¿se puede manipular la reconexión a fin de permitir el restablecimiento de las funciones perdidas?,

¿cómo cambian los circuitos neuronales centrales como consecuencia de la degeneración de algunas fibras o la reconexión de otras a diferentes blancos a los originales?, ¿cómo se ve afectada la inhibición presináptica a consecuencia de ambos procesos?, ¿por qué las fibras motoras muestran grandes diferencias en los tiempos requeridos para degenerar y regenerar comparativamente con las sensoriales, tanto en los vertebrados como en los invertebrados?, ¿por qué las lesiones periféricas pueden producir dolor crónico?, ¿por qué en algunos animales regenera el sistema nervioso central y en otros no?, ¿qué función desempeñan los factores de crecimiento nervioso y sus receptores en los invertebrados?. Estas y muchas otras preguntas son relevantes y, a la fecha ninguna de ellas parece tener respuestas simples.

# ANTECEDENTES

## I. 1.- BREVE HISTORIA DEL ESTUDIO DE LA REGENERACIÓN NERVIOSA

Enseguida se esbozarán los puntos históricos más fundamentales sobre el estudio del fenómeno de la regeneración nerviosa:

Los primeros trabajos sobre el tema de la regeneración neural principian durante la segunda mitad del siglo XVIII y fueron hechos por Felice de Fontana, quién no pudo interpretar correctamente todas sus observaciones debido a la carencia de técnicas capaces de aclarar con más detalle el fenómeno (Gorio A. y col., 1993).

A principios del siglo XX el tema es retomado por Ramón y Cajal (Ramón y Cajal S. 1914, Gorio A. y col., 1993), así como por su alumno J. F. Tello (Gorio A. y col., 1993), quienes con las técnicas de su época empezaron a interpretar e inferir los mecanismos de la regeneración nerviosa.

En 1914 Santiago Ramón y Cajal menciona como una meta muy ambiciosa mencionar todo lo que se conocía en su época del fenómeno de regeneración y degeneración nerviosa. Además, reconoce en el trabajo de Tello uno de los más importantes.

Tello demostró que durante la regeneración, los axones forman ramas que se alargan, atraviesan el sitio de lesión y penetran el muñón distal hasta el órgano desnervado. Sugirió la existencia de sustancias liberadas por el tejido blanco desnervado que dirigirían los axones guiándolos a través del sitio de lesión, lo que ha resultado cierto.

Ramón y Cajal por su parte sugirió que la lesión de un nervio produce la pérdida del aporte trófico proveniente del soma neuronal hacia el muñón distal lo que produce su degeneración, lo que ha resultado cierto en los nervios de los vertebrados (Robbins S. L 1975), pero no de todos los invertebrados (Bittner 1973; Bittner y col., 1974, 1980, 1981, 1991).

Con el advenimiento del cultivo de tejidos, ideado por Harrison, y el descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (NGF)<sup>1</sup> hecho por Rita Levi Montalcini a mediados del siglo pasado (Gorio A. y col., 1993; Levi-Montalcini R., 1987) se fortaleció la interpretación realizada por Tello.

Durante la mitad del siglo XX hubo un fuerte avance tecnológico que impulsó el conocimiento humano de manera general. El microscopio electrónico y el perfeccionamiento de la electrónica que permitió realizar nuevos tipos de registros electrofisiológicos, son solo dos de los muchos ejemplos que se pueden mencionar y que han dado como resultado el apoyo sólido a algunas de las controversias científicas como la teoría neuronal apoyada por Ramón y Cajal. Favoreciendo, por otro lado, el surgimiento de nuevas propuestas que marcaron un cambio en la manera de concebir el sistema nervioso central. Un ejemplo importante de esto último, fue el descubrimiento de la inhibición presináptica propuesta por Frank y Fourtes (1957) ya que de ella y de los trabajos del grupo de Pablo Rudomín, (Rudomín, 1995), se puede inferir que a diferencia de lo que se pensaba desde la época de Ramón y Cajal en 1914, las rutas por las que fluye el impulso sensorial no son rígidas y que potencialmente una lesión nerviosa no sólo produce cambios en los muñones, sino que la neurona cambia sus interacciones en las regiones centrales. Estos cambios plásticos se han propuesto como adaptativos. En este punto, no es difícil imaginar que al restituirse la comunicación nerviosa los cambios producidos por la lesión sean reversibles.

Otro descubrimiento importante, se refiere a que tras una lesión, los factores neurotróficos no sólo actúan guiando el crecimiento de las neuritas provenientes de las yemas del muñón nervioso proximal, sino que son indispensables para el funcionamiento normal de las neuronas y que en su ausencia se altera la velocidad de conducción nerviosa (Mendell y col., 2001). Existen evidencias que indican que estos factores también podrían determinar la forma y la ubicación de las sinapsis nerviosas centrales, lo que las haría responsables de las modificaciones plásticas a nivel central.

---

<sup>1</sup> Del inglés "nerve growth factor"

Hay en la actualidad gran número de trabajos acerca de la regeneración nerviosa encaminados tanto al conocimiento mismo del proceso de regeneración como a su posible aplicación clínica. Algunos de los modelos de estudio preferidos son el injerto de tejidos (el auto injerto Ostrosky Solís F. y col., 1988; el aloinjerto Hirji R. et al., 2000), la lesión de un sitio específico del sistema nervioso central, o una combinación en la que al tejido dañado se le injerta tejido homo tópico o hetero tópico que comúnmente es fetal (Iwashita et al., 1994) y se acompaña de la aplicación de un factor neurotrófico (Levi-Montalcini R., 1987). Entre los trabajos con injertos que han destacado en la medicina están los realizados en pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson (Drucker Colin R. y col., 1988) y en la investigación básica, los realizados para recuperar la función de la médula espinal de ratas adultas (Iwashita y col., 1994) desgraciadamente este último no ha sido reproducido por otros laboratorios hasta ahora. También hay modelos de regeneración *in vitro*, en donde se lesiona el tejido nervioso y se observa la regeneración axonal bajo condiciones controladas (Chiquet M y Nicholls J. G., 1987), de diversos factores como iones de  $Ca^{2+}$  (Mattson M. P. y Kater S. B., 1987), factores de crecimiento (Barde Y. A., 1989), interacciones celulares (Berkelaar M et al., 1994), la matriz extracelular (Fernández de Miguel F 1997), campos eléctricos (Shen, N. J. y Wang, S. C., 1999), campos magnéticos (Macías M. Y. et al., 2000) y temperatura (Marzullo T. C. et al., 2002).

El último gran descubrimiento en el sistema nervioso central adulto de vertebrados superiores, es que posee la capacidad de producir nuevas neuronas, (Goldman, S A y Nottebohm, F, 1983; Arias Carrión O y col., 2007). Trabajos iniciales fueron realizados por Joseph Altman (según Arias Carrión O. y col., 2007), quien marcó células en división con timidina tritiada y demostró neurogénesis en el bulbo olfatorio y el giro dentado. Posteriormente, el grupo de Arturo Alvarez Buylla (1988), demostró la neurogénesis en el cerebro del canario, fenómeno que se vinculó con el aprendizaje del canto.

Se ha propuesto la existencia de las células nerviosas que se originan *de novo* en el lóbulo olfatorio de roedores (Seri B et al, 2001) sufren una compleja migración a través del cerebro.

Por último se ha propuesto la metaplasia de las células gliales a neuronas, un fenómeno que ha despertado el interés de algunos investigadores en emplear esta capacidad en el tratamiento de algunas afecciones del sistema nervioso.

## I. 2.- CONCEPTO DE REGENERACIÓN Y DEGENERACIÓN NERVIOSA

Cualquier tejido sano que sufra una lesión suele mostrar cierto grado de desorganización, a la que puede seguir, entre otras posibilidades, la muerte de la región dañada y su sustitución por tejido conectivo cicatricial, proceso llamado cicatrización. También es posible asociar la reparación del daño tisular con la reaparición de células de la misma estirpe a la que pertenecen las células dañadas. En este último caso se habla de regeneración proceso que asegura la restitución parcial o total de la función pérdida después de la lesión.

Factores como: especie, edad del individuo, estado nutricional o temperatura determinan que regenere un tejido, así como el grado y la velocidad de la recuperación funcional, a ellos habría que añadir, como determinante, el tipo de tejido dañado, ya que es un hecho bien establecido que existe una relación inversa entre el grado de diferenciación celular y la capacidad de recuperación que se tenga ante alguna lesión. El tejido nervioso por su alta especialización y sus complejas relaciones posee una muy baja capacidad de regeneración.

La baja capacidad de regeneración del tejido nervioso se manifiesta, por ejemplo, en la imposibilidad de que se formen nuevas neuronas que sustituyan la pérdida de algunas otras. Este hecho ha sido sustentado por gran número de observaciones en diversas especies de vertebrados e invertebrados, algunas de las cuales datan de hace muchos años y aunque -como ya mencionamos- recientemente se ha encontrado metaplasia en ciertas células gliales que son capaces de diferenciarse en neuronas (Seri B et al., 2001), su valor en el proceso regenerativo aún no está establecido. De este mismo tipo de observaciones se desprende otro hecho importante y es que normalmente cualquier porción de una neurona separada de su soma muere en el término de pocos días y en ocasiones es reemplazada por un nuevo proceso nervioso que puede originarse a partir de la parte nucleada de la neurona lesionada, según se describe en la teoría neuronal elaborada por Ramón y Cajal (Gorio, A. y col. 1993), o bien, por una neurita

proveniente de la ramificación de una neurona intacta. Así, de manera general se puede considerar que a la sección de un axón se acompaña un proceso de destrucción del cabo distal (la porción del axón separada del núcleo), con la consecuente pérdida de comunicación de la neurona con su célula blanco. A este hecho suele seguir la formación, en el cabo proximal (la porción del axón unida al soma neuronal) de nuevas terminaciones nerviosas que con frecuencia permiten el restablecimiento de la comunicación entre el tejido nervioso lesionado y el órgano blanco. Por ello, cuando en el siglo XX se hablaba de regeneración neuronal o nerviosa se aludía en realidad a la regeneración axonal, que concluye con la formación de sinapsis funcionales, pero no a la hiperplasia de neuronas o metaplasia de células troncales que remplazando a las células muertas o lesionadas fueren capaces de desarrollar conexiones adecuadas con el blanco desnervado. En resumen, se puede definir a la regeneración nerviosa como el proceso curativo de una lesión, por medio del cuál se restablece la comunicación nerviosa interrumpida entre una neurona y su blanco, lo que permite restaurar la función perdida.

La degeneración nerviosa se asocia a su vez con la pérdida de la función debido a la desorganización y retracción del tejido nervioso lo que no implica, necesariamente, una lesión traumática. Como una regla, si se lesiona el nervio, entonces, ocurrirá una serie de cambios estructurales degenerativos enmarcados dentro de un orden temporal lo que según la gravedad de la lesión, conducirá o no, a la necrosis del tejido.

Cuando un axón es seccionado, obviamente se presentan dos cabos: el proximal que se encuentra unido al resto de la neurona y el distal que se encuentra separado de la neurona. Se sabe que la degeneración es diferente en cada uno de ellos.

A partir de una lesión en el cabo proximal, el soma muestra modificaciones visibles en un plazo de 24 a 48 horas: hay una ligera tumefacción y en el área peri nuclear la sustancia de Nissl comienza a disgregarse. Con el tiempo, aumenta la tumefacción, la célula pierde todos los ángulos que haya tenido, la sustancia de Nissl experimenta disgregación periférica progresiva y el núcleo se desplaza a la periferia de la célula. Este fenómeno alcanza su máximo en 12 días y para esta etapa el citoplasma presenta aspecto de vidrio despolido, excepto en la periferia misma, donde quedan pocos gránulos de Nissl.

Sí el cilindro eje dañado regenera, el cuerpo de la célula recupera su aspecto normal, sin embargo, eventualmente la célula es incapaz de recuperarse, experimenta degeneración y desaparece por completo.

La degeneración Walleriana o secundaria es el fenómeno por virtud del cual el muñón distal de un nervio periférico seccionado experimenta disolución y resorción, lo que se refleja en el tronco nervioso y sus arborizaciones terminales. El cilindroeje se torna tumefacto, deformado y fragmentado antes de desaparecer. La vaina de mielina comienza a degenerar poco después de comenzar el proceso en el cilindroeje, y se disgrega en glóbulos que son ingeridos por los macrófagos que aparecen después de varios días. Los macrófagos permanecen con los restos grasos en su interior durante varias semanas (Robbins S L, 1975).

### **I. 2. 1. RAMIFICACIÓN Y REGENERACIÓN NEURAL**

La ramificación nerviosa es el fenómeno mediante el cual una neurona es capaz de producir una o varias prolongaciones neuríticas a partir de una yema que se produce en su soma o bien de alguna rama primaria (Fernández de Miguel, 1997). Parece ser un fenómeno muy generalizado que se presenta a lo largo de toda la vida de los animales y no sólo durante las primeras etapas de desarrollo (Carter D. A. et al., 1994) y precede a los fenómenos de plasticidad neuronal, formación sináptica y regeneración. Este fenómeno tiene importancia crucial en los diversos ámbitos de competencia del sistema nervioso, ya que provee a la neurona de un nuevo conducto físico, una neurita, para el posterior establecimiento de cualquier tipo de conexión nerviosa. Así participa en el establecimiento de rutas de conducción nerviosa que son sin lugar a dudas, la base anatómica del funcionamiento del sistema nervioso; en la facilitación para evocar rutas que son indispensables en los procesos asociados con la conducta y el aprendizaje.

La aparición de una neurita supone la reorganización del citoesqueleto y en consecuencia la organización y el movimiento de los elementos constitutivos de la nueva prolongación. Esto implica la participación de por lo menos los mecanismos de transporte

axonal, de señalización, de actividad catalítica mediada por enzimas y de síntesis proteínica, entre otros, es decir, una constelación de mecanismos que se han ido entendiendo poco a poco.

Es común observar al microscopio, que algunos tipos de células nerviosas lesionadas desarrollan prolongaciones e inician su crecimiento desde algún muñón remanente a la axotomía (Fernández de Miguel et al. 1992). Esto sugiere que parte de la maquinaria y las señales necesarias para iniciar este crecimiento, se encuentran en esos lugares ya que es ahí donde se inicia el proceso. Sin embargo, este comportamiento no es obligatorio, y el crecimiento se puede iniciar desde algún punto del soma neuronal. Sin importar si proviene del soma o del muñón, a esta prolongación se le conoce como rama primaria, y suele aparecer en forma de cono, el que recibe el nombre de cono de crecimiento. La prolongación se puede extender, e incluso emitir una nueva ramificación llamada ramificación secundaria. De acuerdo con el tipo neuronal se puede emitir una o muchas ramificaciones cuyo crecimiento, por lo menos en cultivo, suele cesar al alcanzar la talla estereotípica o bien al tocar una célula diana (en cocultivos).

Es probable que sea en las puntas de las nuevas neuritas donde se concentre la actividad reguladora del crecimiento, ya que éste puede ser inhibido al hacer aquéllas contacto con ciertos tipos celulares específicos, o bien, cesar el crecimiento al establecerse una conexión adecuada con el blanco. Si durante el desarrollo no se establece una conexión adecuada en un periodo definido, sobreviene la degeneración de la prolongación y la muerte neuronal por apoptosis. El mecanismo de apoptosis puede ser activado en cualquier momento durante toda la vida de algunas células nerviosas y es comúnmente disparado por la pérdida de la célula blanco, lo que imposibilita la recuperación funcional en ciertos tipos de lesión.

Los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios son elementos citoesqueleto relacionados con el crecimiento de una neurita. No siempre están todos presentes en todas las células capaces de producir ramificaciones, sin embargo, siempre hay alguno de ellos en todas ellas. Se ha propuesto que estos elementos cito esqueléticos, se ensamblan y desensamblan según las necesidades específicas de cada célula nerviosa

en expansión y se han considerado que son el soporte estructural en el que crece la neurita (Seshan K. R. y Bittner G. D., 1987).

Si una neurona es lesionada y pierde sus procesos, queda un pequeño muñón, lo que produce un cambio evidente de la forma original. Como cada neurona tiene una forma típica, el proceso de ramificación y no sólo el proceso de crecimiento suele ser el responsable de que la neurona regrese a un estado similar al que se encontraba antes de la lesión (Fernández de Migue F., 1997)l.

## **I. 2. 2. PLASTICIDAD NEURONAL: SIMILITUDES CON LA REGENERACIÓN NERVIOSA**

La plasticidad neuronal es la capacidad que tiene el sistema nervioso central de adaptarse a las exigencias propias de su función con la generación de nuevas conexiones nerviosas que faciliten o inhiban vías específicas (Mendell L. M y col., 2001). Estas vías, pueden por ejemplo, ser las responsables de permitir el establecimiento de un recuerdo. Una diferencia con la regeneración nerviosa es que los estímulos que la desencadenan son diferentes y se presenta de manera relativamente espontánea. Comparten el hecho de que ambas establecen conexiones adecuadas y funcionales, lo que nos hace pensar en la importancia de un estudio comparativo entre ambos fenómenos. Sin embargo, una revisión de esta índole escapa a los objetivos inmediatos de esta tesis.

### **I. 3.- FACTORES QUE AFECTAN LA REGENERACIÓN NERVIOSA**

La regeneración nerviosa puede ser facilitada o inhibida por dos conjuntos generales de factores que por su origen son: intrínsecos o extrínsecos a la célula nerviosa. Se entenderá por factor intrínseco todo aquel que sea propio a la neurona misma y por factor extrínseco todo aquel que afectando el proceso regenerativo dependa de otras fuentes ajenas a la neurona. Ambos conjuntos pueden interaccionar y su composición es compleja, es decir, dependiente de múltiples factores y en ocasiones resulta difícil su separación estricta. En seguida se mencionaran algunos de los más importantes.

#### **I. 3. 1.- ESPECIE**

Desde la década de 1950, gracias a los trabajos de Sperry se sabe que las neuronas de sistema nervioso central de peces y anfibios pueden regenerar sus axones después de una axotomía, a diferencia de las neuronas del SNC de mamíferos que comúnmente mueren por apoptosis (Matsukawa T., et al 2004). También se ha establecido, en general, que los invertebrados conservan en sus neuronas centrales cierta capacidad regenerativa y aunque poseen una relativa similitud estructural entre los diferentes phyla, existen diferencias en dicha capacidad, por ejemplo: crustáceos y anélidos (Bittner G D y col 1974 vs. Chiquet M., y Nicholls J. G., 1987, respectivamente). Por lo tanto, existe una clara diferencia en el poder de regeneración que exhiben los diversos sistemas nerviosos centrales dependiendo de la especie animal de la que se trate. Los motivos por la cuales esto ocurre no se han esclarecido, pero creemos que es importante determinar cuáles son intrínsecos y extrínsecos a la neurona, porque todos los extrínsecos podría permitir, por ejemplo, el planteamiento de propuestas terapéuticas aplicables para humanos. Nosotros pensamos que uno de los múltiples motivos que afectan la capacidad regenerativa, es la diferencia en la complejidad estructural y las relaciones intercelulares que guardan las neuronas en los diferentes grupos animales. Por

ejemplo, si se aplasta la médula espinal de un mamífero y comparamos lo que ocurre con una lesión equivalente en el tejido conectivo de la cadena ganglionar del acocil (crustáceo) observaremos -a priori- que: debido a la organización anatómica de cada uno de los sistemas, en el mamífero, millones de somas de ínter neuronas serán lesionados aún en unos cuantos milímetros, así como todo tipo de neuritas, y debido a las interdependencias trópicas neuronales, no importando la ubicación de la lesión muchas neuronas morirán aún a grandes distancias de dicho lugar y será imposible su reemplazo, mientras que en el caso del acocil, si la lesión ocurre en el conectivo nervioso solo serán lesionados un elevado número de axones pero ningún soma neuronal será aplastado o cortado y seguramente sobrevivirán permitiendo la regeneración de los axones lesionados.

Es importante recalcar que las diferencias en la capacidad de regeneración entre las diferentes especies, si bien, es intrínseca a la especie, no necesariamente lo es para la condición de la neurona lesionada, por ejemplo, se sabe que la sección del nervio óptico en mamíferos no sana, en buena medida porque existen factores inhibidores en el sistema nervioso que evitan que la neurona presente gemaciones y elongación de un nuevo axón, lo que queda demostrado al poner en contacto a las neuronas lesionadas con un medio permisivo para el crecimiento, como sucede cuando se injerta un pedazo de nervio periférico, en cuyo caso se desarrolla un nuevo axón. Las células ganglionares de la retina emplean el injerto como un puente entre ellas y su blanco (Matsukawa T et al 2004), sin embargo, este grado de regeneración no se compara en calidad con la que ocurre en el *Carassius auratus* (pez japonés o pez dorado) y el *Pseudotropheus zebra* (pez cebra), que sin mayores maniobras recuperan la vista por completo después de un periodo de “convalecencia” de varios meses (Matsukawa y col., 2004). Otro aspecto importante y diferencial que parece han omitido los principales investigadores de este fenómeno, es el hecho de que el cerebro de los mamíferos, incluso el de la rata es mucho mayor al de la carpa y cientos o miles de veces más grande que el del pez cebra, esto hace que en los mamíferos el tectum cerebral, que potencialmente libera factores de guía y promoción del crecimiento, esté demasiado alejado para lograr tener un efecto trófico o quimiotáctico capaz de guiar los nuevos axones.

### I. 3. 2.- EDAD DEL INDIVIDUO

¿Existe el envejecimiento neuronal, es decir, una neurona en particular, envejece?

Investigamos en la literatura la presencia de factores intrínsecos a la neurona y que hubieran sido considerados como marcadores del envejecimiento, así como estudios comparativos sobre algún tipo determinado de neurona en los que en condiciones de cultivo se comparara la capacidad regenerativa de las células obtenidas de un individuo joven y de un adulto, y no encontramos una respuesta a la pregunta planteada (ver Jiang ZG, et al., 1995, Koistinaho J et al 1991) por lo que este punto queda abierto a la investigación experimental más extensa. A manera de hipótesis, planteamos, entonces que al igual que las diferencias entre especies, las diferencias en el proceso desarrollo-envejecimiento están connotadas en el microambiente de la célula diferenciada, es decir, a las características del medio que rodea a una neurona, más que a la pérdida de sus capacidades fisiológicas, -incluyendo la regenerativa-, por causas del envejecimiento. En apoyo a esta idea encontramos el trabajo de Fukuda J. (1985) quién mantuvo en cultivo células ganglionares disociadas obtenidas de las raíces dorsales de ratones ancianos (98 - 99 semanas) y adultos (4-8 semanas) y encontró menor capacidad de supervivencia, acelerada cinética de la reducción somática y menor tamaño de las células provenientes de animales ancianos, aun cuando, las propiedades fisiológicas (potenciales de reposo y de acción), así como el régimen de crecimiento de las neuritas fueron iguales en ambos grupos.

Las neuronas que se localizan en el epitelio olfativo (NO) son las responsables de la detección de las moléculas olorosas. Una característica distintiva de este tipo celular es que continuamente son reemplazadas durante el transcurso de la vida. Esto es posible gracias a la proliferación y la diferenciación local de precursores neuronales llamados células basales. La destrucción experimental de todas las NO induce la división de las células basales estimulando la regeneración. Sin embargo, la proliferación de las células basales y en consecuencia de las NO disminuye en función de la edad. Debido a ello si

durante algunos días mediante baño intranasal se administra  $ZnSO_4$  a ratones jóvenes (1 mes) y adultos (6 meses), se produce una destrucción total de las NO lo que les produce una hipoosmia (deficiencia en la olfacción). En ambos grupos de ratones la recuperación del tejido y su función ocurre después de algunas semanas y se ve precedida de un pico transitorio de división celular. Aún cuando la neurogénesis en el epitelio olfativo adulto es menos eficiente que en el juvenil, los precursores neuronales de los organismos viejos mantienen su habilidad para proveer de nuevas NO funcionales capaces de restaurar el olfato (Ducray A et al 2002).

### **I. 3. 3.- TIPO DE TEJIDO NEURONAL**

Originalmente el trabajo de Felice de Fontana en el siglo XVIII (Gorio y col. 1993), mostró, entre otras cosas, que la pérdida de la continuidad por sección del nervio hipogloso del conejo, se reestablecía al cabo de algunas semanas y que el nervio sanaba por completo, lo que era evidente al ser inspeccionado mediante microcirugía. Así quedó establecido que el sistema nervioso periférico es capaz de recuperar su aspecto y funcionalidad. Erróneamente el autor atribuyó a la reproducción del tejido nervioso lesionado la responsabilidad de dicha recuperación. Es probable que debido a ello, a este fenómeno se le haya nombrado “regeneración nerviosa”. Por otra parte a finales del siglo XIX y principios del XX ya había sido establecido que las lesiones en la médula espinal y otras regiones superiores no sanaban nunca (Ramón y Cajal, S. 1914). Así, desde hace más de un siglo se sabe que, en general, los nervios del sistema nervioso periférico (SNP) regeneran mientras que los tractos del sistema nervioso central (SNC) no lo hacen en la misma proporción.

Las razones por las cuales existen diferencias en la capacidad regenerativa del SNP y del SNC, son múltiples y son estudiadas extensamente. Uno de los puntos en los que más énfasis se ha puesto se refiere a las diferencias entre los conjuntos celulares responsables del soporte neuronal.

El SNC posee tres tipos de células de soporte: astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Los astrocitos y los oligodendrocitos también reciben la denominación de macroglía y se derivan, al igual que las neuronas, del tubo neural. La microglía fue considerada desde 1928 por Río Hortega de origen mesodérmico (Vellis, de J. 1993). A estas células se les considera macrófagos y constituyen del 5 al 10% de todas las células del SNC.

El SNP posee dos tipos de células de soporte: las células satélites y las células de Schwann, derivadas de las crestas neurales y del neuroectodermo. Las células satélites rodean el pericarión neuronal y las células de Schwann envuelven sus axones. El SNP posee una pequeña cantidad de macrófagos que se incrementa fuertemente después de algunos tipos de lesión.

Los oligodendrocitos expresan proteína básica de mielina (MBP, del inglés myelin basic protein), glicoproteína asociada a mielina (MAG, del inglés myelin associated glycoprotein), fosfohidrolasa de nucleótidos cíclicos (CNP del inglés cyclic nucleotide phosphohydrolase) y proteína protcolípida (PLP del inglés proteolipid protein). Producen también transferrina, una glicoproteína transportadora de hierro. Durante una lesión estas sustancias impiden la regeneración nerviosa. La liberación al medio extracelular de hierro libre proveniente de la transferrina de los oligodendrocitos resulta sumamente tóxica para las neuronas ya que se producen radicales libres (Vellis, de J. 1993).

Los astrocitos poseen bucles muy largos de filamentos intermedios construidos de una proteína específica, la GFAP. La expresión de GFAP se incrementa cuando existe una lesión sobre el sistema nervioso central produciendo la hipertrofia celular fenómeno conocido como gliosis reactiva; la gliosis guarda relación con la cicatrización; a su las sustancias presentes en la cicatrización impiden el avance de los axones regenerados a través de ellas. Los astrocitos permanecen con su ciclo celular detenido, hasta que un trauma o un desorden neurológico dispara su proliferación en el tejido adulto.

La microglía se activa por una lesión y se vuelve prolífera y fagocítica. Actúa como presentadora de antígenos a monocitos que invaden el tejido cerebral cuando la barrera hematoencefálica se rompe en algún punto (Vellis, de J. 1993).

En la lesión del SNP, los axones crecen a través del tubo endoneural que permanece como un remanente secundario después de una lesión en la región distal. Esto es una diferencia importante con respecto al SNC, ya que éste no tiene esta característica. Se sugiere que la preservación del tubo endoneural guarda una estrecha relación con la organización histológica entre el axón y las células de Schwann.

Las células de Schwann producen factores neurotróficos como el NGF, moléculas de adhesión, e interactúan con los macrófagos después de una lesión. La infiltración de macrófagos en el tejido nervioso lesionado permite la remoción de restos de mielina, la que de otra manera impediría la regeneración nerviosa, mientras que la secreción de factores tróficos mantiene y promueve el crecimiento del muñón nervioso proximal.

Con lo anterior se podría pensar que solamente el micro ambiente es el responsable de la forma y calidad en que regeneran los axones, sin embargo, nada es más alejado de la realidad. Por ejemplo, es posible aislar y cultivar tipos diferentes de células provenientes de los ganglios ventrales de la sanguijuela, se han cocultivado células de Retzius y células tipo pagoda, se ha observado que ambos tipos de células tienden a conservar la forma y el funcionamiento que poseían cuando se encontraban *in situ*. Las diferencias son evidentes en la forma y en las arborescencias, lo que permite identificarlas fácilmente aun después de pequeños periodos de cocultivo (Fernández de Miguel F et al., 1997). En nuestro laboratorio hemos realizado observaciones equivalentes, en disgregados celulares provenientes de los ganglios ventrales abdominales del acocil *Procambarus clarkii* y hemos observado que las neuronas aisladas cultivadas en medios definidos exhiben diversos patrones de arborización neurítica que parecen estar vinculados con el tamaño y la forma del soma neuronal (datos no publicados).

Otro ejemplo de cómo los diferentes tipos de tejido nervioso están implicados en la degeneración y regeneración nerviosas se expone en seguida. En ratas adultas, la sección de un nervio óptico y su reemplazo por un injerto de nervio periférico autólogo (nervio del peroné) produjo la regeneración de las células ganglionares axotomizadas procedentes de la retina. Inclusive se encontró que la distancia recorrida por los axones regenerados fue mayor que la que los provenientes de las células intactas. Algunos de los axones

abandonan el injerto y penetran el sistema nervioso central en donde algunas de sus ramificaciones son capaces de formar nuevas sinapsis (Vidal-Sanz M y col., 1987). En cricetos en los que se hizo una maniobra equivalente a la anterior se observó algo similar a lo que ocurre en rata. En este estudio que tuvo por objeto explorar tiempos mayores de recuperación, se encontró que los axones de las células ganglionares de la retina mantienen su capacidad de crecimiento hasta por meses y que la restitución de las conexiones conserva en buena medida la organización ultraestructural normal. Lo que indica que las reconexiones no son al azar y sugiere la existencia de interacciones locales implicadas en el reconocimiento de los blancos adecuados (Carter D. A. y col., 1994)

### I. 3. 4. NEUROTROFINAS Y SUS RECEPTORES

Las neurotrofinas son factores de crecimiento que están profusamente presentes en el desarrollo; desempeñan un papel crucial en la maduración y el mantenimiento del sistema nervioso central. Se sabe que favorecen la subsistencia de las neuronas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Segal, R. A. y col. 1992). Son proteínas pequeñas y básicas, con acciones en grupos diversos de neuronas centrales o periféricas (Barde, Y. A. 1989). Hasta el momento se sabe que una familia de genes codifica para las siguientes neurotrofinas: factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4) y neurotrofina 5 (N-5)(Ebendal, T. 1992). Sin embargo, no todas las neurotrofinas pertenecen a la misma familia de genes (Kuffler, D. P. 1994).

Las neurotrofinas son producidas de manera limitada por los tejidos diana. Participan en la inervación de estos tejidos y tienen importancia en los sistemas nerviosos de los organismos adultos ya que se relacionan con la subsistencia de diversos tipos neuronales (Ebendal, T. 1992). Es evidente, sin embargo, que el desarrollo de conexiones neuronales adecuadas requiere de muchos otros factores además de las neurotrofinas (Kuffler, D. P. 1994).

El establecimiento de un sistema nervioso funcional requiere de la subsistencia, maduración y diferenciación de un gran número de poblaciones neuronales así como del crecimiento de gran número de procesos nerviosos. Durante el desarrollo del sistema nervioso abunda la formación de estos últimos y cuando el SNC alcanza su máximo grado de maduración se desencadenan mecanismos inhibitorios de la formación de tales procesos en los que también participan las neurotrofinas (Kuffler, D. P. 1994). El funcionamiento de las neurotrofinas a lo largo del desarrollo se puede separar en forma artificial en diversos tipos: a) temporal, es decir, que hay épocas en las que la acción de una neurotrofina es mayor para un determinado tipo neuronal que en otras; b) coordinada, lo que significa que dos o más neurotrofinas pueden actuar en forma sinérgica y c) secuencial, ya que hay ocasiones en las que a la acción de una neurotrofina sigue específicamente la acción de otra. Como ejemplo podemos decir que durante la diferenciación, las primeras células granulares de la lámina germinal externa responden al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Una vez que estas células alcanzan cierto grado de madurez responden a la neurotrofina-3 (NT-3) (Segal, R. A. y col., 1992). d) Una sola neurotrofina puede actuar sobre diferentes poblaciones (divergencia). e) Muchas neurotrofinas actúan sobre la misma población neuronal (convergencia) (Kuffler, D. P. 1994).

La degeneración neural que presentan algunos vertebrados después de la lesión de sus axones puede ser reducida y pospuesta por un tiempo mediante la aportación de factores neurotróficos. Este hecho apoya la teoría -sostenida de manera implícita por investigadores como Aguayo-, que supone que la interrupción en el aporte trófico es la causa de la degeneración neural (Berkelaar, M. y col., 1994, Carter, D. A. y col., 1994, Cohen, A. y col., 1994, Mansour-Robaey, S. y col., 1994). En los mamíferos, se tiene el antecedente de que las neurotrofinas, no sólo actúan como sustancias de soporte trófico sino también son factores coadyuvantes de la regeneración neural (Bermúdez-Rattoni, F. y Escobar, M. L. 1994).

Por otro lado, por la importancia del descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (NGF, por su siglas en inglés) vale la pena detallar un poco más su historia: Rita

Levi, fue invitada por Víctor Hamburger a la Universidad de Washington -San Louis-, para analizar los resultados obtenidos por su estudiante de doctorado E. Bueker, que sugerían la presencia de un factor soluble capaz de promover el crecimiento neuronal (Levi-Montalcini R. 2000).

Levi regresa al Laboratorio de Giuseppe Levi en Turín –Italia- y continúa con el estudio de ese factor, para después trasladarse a Río de Janeiro –Brasil- al Instituto de Biofísica, (entonces dirigido por Carlos Chagas), con su amiga Hertha Meyer del laboratorio de cultivo de tejidos. Ahí determina la naturaleza soluble y la presencia de ese factor. Por el descubrimiento del NGF, Rita Levi Montalcini comparte el Premio Nobel de Fisiología y Medicina con Stanley Cohen en 1986.

El factor de crecimiento neuronal (NGF) es el prototipo de la neurotrofina ya que proviene del tejido blanco y funciona como un factor de subsistencia tanto para neuronas periféricas como centrales (Segal, R. A. y col., 1992). De hecho, la sobrevivencia de los ganglios simpáticos y sensoriales en cultivo de tejidos dependen de la presencia de NGF y la respuesta a este factor conforma un patrón tan característico que se emplea como bioensayo para detectar la presencia de la neurotrofina (Server, C. A. y Shooter, E. M. 1977)

El NGF es la neurotrofina mejor conocida; es una proteína con 118 aminoácidos cuya estructura ha sido aclarada mediante datos cristalográficos (Ebendal, T. 1992).

Su peso molecular es de, aproximadamente, 140 KDa (Varón, S. y col., 1968). Sin embargo, existe más de una forma, y se han purificado una con 30 KDa (Bocchini, V. y Angeletti, P. U. 1969) y otras dos de 20 y 44 KDa (Varón, S. y col., 1967). Actúa sobre neuronas, promueve el crecimiento neurítico (Levi-Montalcini, R. 1987) y su aplicación (intramuscular) prolongada induce hipertrofia e hiperfunción selectiva de las neuronas ganglionares simpáticas (Abramchick, G. V. y col., 1988). Se sabe que está presente en el cerebro, en donde desempeña funciones neurotróficas en el desarrollo y mantenimiento de las neuronas colinérgicas de la base del cerebro (Ebendal, T. 1992).

El NGF maduro posee un péptido llamado P3, que es una región sumamente conservada en la evolución, idéntica en el pollo, la rata, el ratón y el hombre. Debido a que

los niveles celulares de  $\beta$ NGF son bajos o extremadamente bajos y a que no existen mecanismos de almacenaje, es muy difícil localizar NGF endógeno. Sin embargo mediante el uso de anticuerpos monoclonales o algunos tipos de anticuerpos poli clónales contra el péptido P3 y mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas ha sido posible detectar su unión en el citoplasma de muchas neuronas de la formación hipo campal y la neocorteza (Sara, V. R. y col. 1990).

El NGF puede promover directamente en las neuronas la formación de procesos regenerativos y el crecimiento neurítico (Vázquez, E. y col. 1994, Twiss, J. L. y Shooter, E. M. 1995). Estos procesos suponen el restablecimiento de la síntesis, empaquetamiento y salida de material específico por parte del cabo proximal del axón; el reconocimiento de este material por parte de las células blanco (Scott, T. B. 1993) y la participación de otras células como las de Schwann, hacen posible que el crecimiento neurítico se dirija en forma específica a través de un sitio de lesión (Madison, R. D. y Archibald, S. J. 1994).

Es frecuente que las neuronas presenten receptores para NGF, uno de alta afinidad (TrkA) y otro de baja afinidad (p75; Vázquez, E. y col. 1994). No sólo las neuronas tienen receptores a NGF, las células de Schwann, por ejemplo, poseen receptores del tipo p75 (Madison, R. D. y Archibald, S. J. 1994), lo que sugiere que la neurotrofina podría ser un elemento que participaría en la acción de la glía sobre los procesos de regeneración y crecimiento neuríticos.

Los receptores de alta afinidad del NGF tienen una constante de disociación (Kd) de  $10^{-11}$ M; la Kd de los receptores de baja afinidad es de  $10^{-9}$ M (Ebendal, T. 1992). En el sistema nervioso periférico, la capacidad de respuesta a las neurotrofinas se correlaciona con la expresión de receptores de alta afinidad y se supone que existe el mismo tipo de receptores que en el SNC (Cohen-Cory S. y col. 1989).

Se ha identificado un gene que se expresa específicamente durante el desarrollo del SNC de *Drosophila melanogaster*, y que codifica para un receptor con actividad tirosina cinasa (RTK). Los miembros de la familia de receptores de las neurotrofinas tienen actividad tirosina cinasa y la proteína codificada por este gene (llamado Dror) presenta una

gran similitud con la codificada por los RTK humanos como el gene Ror1. Ror1 fue originalmente identificado por la similitud entre las bases de su dominio a tirosin cinasa (TK) con los dominios TK de la familia de los receptores Trk para neurotrofinas. La proteína Ror1 posee un dominio tirosin cinasa esto significaba que el gene Dror codifica para un receptor de neurotrofina relacionado con el que poseen los vertebrados (Wilson, C. y col. 1993), lo que llevó a suponer la posibilidad de que otros invertebrados, diferentes a la *Drosophila*, pudieran poseer receptores al NGF semejantes a los que se encuentran en vertebrados.

En 1998, van Kesteren y colaboradores, publicaron haber descubierto una secuencia de cDNA que correspondía a un posible receptor tipo TRK, en el molusco *Lymnaea stagnalis*, por ello, lo denominaron LTRK. De dicha secuencia también dedujeron cual podría ser la secuencia de aminoácidos y encontraron que era muy similar al TRK C de mamíferos que no une NGF, sino el factor de crecimiento nervioso NT3. Mediante la expresión del Ltrk (proteína) por transfección en células COS, determinaron que efectivamente unía NT3. Esto los condujo a suponer que las secuencias TRK son altamente conservadas y que provienen de un ancestro común.

En 1999 se publicó la presencia de proteínas tipo TRK en *Eisenia foetida* (un anélido oligoqueto, o sea, una lombriz), por el grupo de Carla Lucini. Encontraron inmunorreactividad de TRKA, TRKB y TRKC en poblaciones específicas de neuronas y además descubrieron que este tipo de receptores no sólo se encontraban en el sistema nervioso. Los TRKB y TRKC también se encontraron en epidermis y epitelio bucal respectivamente. No discuten el sentido de este último descubrimiento.

En 2004 el grupo de Ormond publicó el descubrimiento de un receptor tipo Trk en el caracol de mar *Aplysia* al que denominaron ApTrkl., Mostraron que se expresaba en las neuronas sensoriales en un lugar vinculado con la facilitación sináptica, y su participación en dicho proceso.

El último trabajo que hemos rastreado es el del grupo de Elia Benito (2006), el que publicó la presencia de un receptor tipo Trk en el anfibio al que denominaron Amphitrk.

Encontraron que este receptor está ligado a los TRK de los ancestros de los vertebrados y que su estructura genómica sugiere que surgió de un Proto-TRK (gen) antes de que se produjera la separación entre los cefalocordados y los vertebrados. Este receptor puede ser activado por NGF, BDNF, NT3 y NT4, sin embargo es incapaz de activar una vía denominada PLC y de vertebrados. Este receptor se expresa durante la embriogénesis en los precursores de las neuronas sensoriales.

## CAPITULO 2

### II. 1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LOS CRUSTÁCEOS

El plano general del sistema nervioso de los crustáceos más primitivos es muy parecido a una escalera y se encuentra presente en los anostracos y los cladóceros. En ellos, los ganglios se forman en pares durante la etapa embrionaria, se comunican a través de la línea media por comisuras transversales y por el conectivo de manera longitudinal. En la región anterior se fusionaron posiblemente tres ganglios y formaron el cerebro o ganglio cerebral. El cerebro se divide en dos regiones anteriores denominadas protocerebro y deutocerebro, se piensa que provienen de estructuras preorales no segmentadas. La tercera división del cerebro recibe el nombre de tritocerebro y deriva del primer ganglio post-oral. El cerebro está situado dorsalmente y está eslabonado al cordón nervioso ventral (CNV) por dos conectivos que pasan alrededor del esófago. En algunos crustáceos (vgr. *Triops=Apus* o camarón renacuajo), el primer ganglio post-oral no está fusionado al cerebro pero permanece como un ganglio comisural. En los decápodos (acociles y cangrejos) se encuentran aun pequeños ganglios comisurales y forman la mayor parte del tritocerebro.

El grado de fusión de los ganglios en el cordón ventral es muy variable. En los decápodos de cuerpo largo como la langosta y el acocil los ganglios se encuentran fusionados en la línea media pero están separados longitudinalmente por un par de conectivos, por lo que comúnmente cada segmento puede ser distinguido. En los decápodos de cuerpo corto, por ejemplo los cangrejos, los ganglios torácicos se encuentran fusionados en una masa ganglionar simple, cuyos lóbulos corresponden a los apéndices segmentados. Los ganglios abdominales se encuentran muy reducidos. En los cangrejos ermitaños (*Anomura*) se presenta un estado intermedio entre los acociles y los cangrejos. (Sandeman D.C., 1982a). Existe cierta relación entre el largo del cuerpo y el

arreglo del cordón nervioso ventral, pero es importante tener presente que existen excepciones.

## II. 1. 1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL ACOCIL

El sistema nervioso central (SNC) del acocil consiste de un prominente ganglio cerebral, un ganglio subesofágico, cinco ganglios torácicos y seis ganglios abdominales.

El cerebro o ganglio cerebroide posee numerosos nervios: los medianos anteriores, el óptico, los oculomotores, los antenulares, los antenares, los tegumentarios, el inferior ventricular y los conectivos. Inmediatamente después del ganglio cerebral se encuentra la comisura esofágica la cual posee ínter neuronas que comunican a dos ganglios comisurales. A partir del ganglio comisural se establece una unión con el nervio ventricular inferior proveniente del cerebro para formar el ganglio esofágico que se encuentra situado medialmente. En esta área se encuentra también el nervio estomatogástrico que une al ganglio esofágico con el estomatogástrico.

El ganglio subesofágico contiene algunos nervios: el paragnatal, el mandibular, el maxilar, el maxilipedar, el dorsal y algunas raíces menores.

Los ganglios torácicos poseen dos tipos de raíces nerviosas llamadas raíces menores y raíces mayores. Las raíces mayores forman un listón largo de nervios que parte de cada ganglio con axones motores y sensoriales hacia las patas, se encuentran divididas en dos raíces pedales; primera y segunda respectivamente. Las raíces menores son tres pequeñas raíces denominadas A, B, y C que llevan axones motores y sensoriales al coxopodito y al sistema muscular segmentado del cuerpo, al integumento y al corazón (Sandeman D.C., 1982a).

Los ganglios abdominales son seis, de los cuales el sexto o ganglio caudal difiere sustancialmente de los cinco primeros. Posteriores a cada uno de los primeros cinco pares de ganglios abdominales aparecen, desde la cadena nerviosa ventral (CNV), dos largos pares de raíces nerviosas y un tercer par más pequeño (Seshan, K. R. y Bittner, G. D. 1987). En el primer par de raíces se encuentran axones sensoriales propioceptivos y

mecanorreceptivos primarios provenientes y dirigidos a las patas natatorias. El segundo par de raíces está constituido tanto de axones provenientes de mecanorreceptores del área pleural, como de axones de receptores al estiramiento ubicados en la musculatura dorsal y los axones de moto neuronas que se dirigen a los correspondientes músculos. El tercer par de raíces está constituido de motoneuronas dirigidas a los grupos musculares flexores más importantes de cada segmento (Sandeman D C 1982a). Por otra parte, está subdividido anatómica y funcionalmente en dos nervios, el nervio fásico que consta de 4 fascículos de 10 axones motores -aunque existen autores que sólo consideran un fascículo- (Kennedy D y Takeda K. 1965a) y el tónico que consta de 6 axones motores (Kennedy D y Takeda 1968b). La ubicación de los somas y los axones de las neuronas fásicas y tónicas ha sido bien establecida. Cinco de los seis axones tónicos se proyectan rostralmente y 1 caudalmente. Igualmente 5 son excitadores y 1 es inhibidor.

El sexto ganglio abdominal está constituido por siete raíces, la primera y la segunda raíces son una mezcla de nervios sensoriales y motores, los nervios de la primera están vinculados a la musculatura corporal. En particular los axones de la segunda raíz están dirigidos a los urópodos. La tercera raíz comunica a los receptores ubicados en la superficie ventral del telson. La cuarta se relaciona somatotópicamente con nervios sensoriales de la superficie dorsal del telson. La quinta raíz o nervio motor anal controla la musculatura de esa zona y la sexta o nervio anal lleva mensajes sensoriales de los receptores que rodean el ano. Finalmente, la séptima raíz, la única no pareada, inerva el intestino posterior (Sandeman D.C., 1982a).

La cadena ganglionar ventral posee simetría bilateral de la glía y del conectivo como lo muestran cortes a través de los ganglios abdominales. También es posible observar que los cuerpos de las células nerviosas se localizan en dos o más filas entre la región ventral y la ventrolateral del animal en cada ganglio. El centro de cada ganglio consiste de tramos de axones y cúmulos neuronales donde se producen múltiples interacciones sinápticas. También en los ganglios se distinguen conexiones de secciones axonales y glía adyacente (Seshan, K. R. y Bittner, G. D. 1987).

El sistema nervioso central de los acociles postembrionarios y juveniles, se considera, en general, una réplica en miniatura del que tendrían en la edad adulta (Seshan, K. R. y Bittner, G. D. 1987, Sandeman, D.C. 1982). En secciones transversales del conectivo abdominal de animales de 4-16 semanas se observan procesos axonales de diversos diámetros. En la parte dorsal de la cadena nerviosa ventral (CNV) existen dos pares de axones de gran diámetro identificados como axones mediales gigantes (MGAs) así como segmentos de axones gigantes laterales (SLAGAs). El diámetro de estos axones, varía según el tamaño del acocil, vgr., en animales de 10mm es de 12 a 18  $\mu\text{m}$ , mientras que en los de 50mm alcanzan de 40 a 60  $\mu\text{m}$ . La mayor parte del resto de la CNV está ocupada por axones de tamaño medio (2-5  $\mu\text{m}$ ). Existen, además, ramilletes de axones pequeños (0.1-0.5  $\mu\text{m}$ ) que se encuentran en las partes lateral y ventral del CNV (Seshan, K. R y Bittner, G. D. 1987).

En un corte transversal de la cadena ganglionar ventral de la región abdominal es fácil reconocer dos tipos de axones gigantes llamados axones gigantes mediales y axones gigantes laterales. Los axones gigantes mediales (MGAs) provienen de cuerpos celulares presentes en el ganglio supraesofágico, decusan entre éste y el primer ganglio abdominal (Bittner, G. D. 1973, Bittner, G. D. y col. 1974, Bittner, G. D. 1981) prosiguen de manera continua a través de los seis ganglios abdominales y en su trayecto establecen sinapsis *en passant* (Viancour, T. A. y col., 1987) con algunas motoneuronas. Los axones laterales gigantes (SLGAs) son multicelulares, de manera que un soma neuronal ubicado en cada ganglio aporta un segmento del axón que se dirige en sentido rostral (Bittner, G. D. 1973, Bittner, G. D. y col., 1974, Meyer, M. R. y Bittner, G. D. 1978b, Anderson T. E. y Bittner, G. D. 1980, Bittner, G. D. 1981). Este segmento empieza y termina con uniones septadas con sus homólogos axonales adyacentes. Ambos tipos, las fibras gigantes mediales y las laterales, son axones de ínter neuronas que comparten algunas características semejantes: van por pares, no se ramifican, corren en paralelo a lo largo de la superficie dorsal del cordón nervioso ventral y tienen diámetros que en animales adultos oscilan entre 100 a 200 $\mu\text{m}$ . Ambos tipos de axones son presinápticos y se relacionan con la conducta de

escape, por lo que comparten algunas ínter neuronas sensoriales y neuronas motoras con las que establecen sinapsis (Viancour, T. A. y col., 1987).

En cortes transversales del tejido conectivo de la cadena ganglionar ventral, a nivel de los ganglios abdominales, hay entre 3500 a 4500 axones. Por otro lado, el número de neuronas por ganglio es ligeramente mayor a 500. El número de células gliales rebasa el de las nerviosas y se encuentran en íntimo contacto con los somas neuronales y con sus prolongaciones. Aunque hay una organización de los organelos celulares básicamente igual en los acociles recién nacidos y en los adultos, con la edad cambia el número y la disposición espacial de los microtúbulos, ya que en las formas adultas existen en mayor proporción y tienden a concentrarse en el axolema (Seshan, K. R. y Bittner, G. D. 1987).

La mayor parte de las proyecciones neurales, se dirige desde los somas de la región caudal hasta la región rostral (Bittner, G. D. 1973). Sin embargo, el transporte de proteínas marcadas inyectadas dentro de los ganglios abdominales se presenta en dirección caudal exclusivamente (Fernandez, H. L. y col., 1970 y 1971).

Los acociles poseen fibras motoras con diversas propiedades estructurales y funcionales (Govind, C. K. y Atwood, H. L. 1982). Poseen terminales fásicas y tónicas, las que liberan diferentes transmisores (Lnenicka, G. A. 1991) y muestran diferentes niveles de actividad eléctrica. Estas terminales provienen de axones excitadores “rápidos” y “lentos”, respectivamente. Los rápidos o fásicos, permanecen eléctricamente silentes la mayor parte del tiempo y sólo son reclutados para actividades rápidas y ocasionales, como la respuesta de escape. En contraste, los axones lentos o tónicos presentan descargas de baja frecuencia que se prolongan por largos periodos de actividad y se relacionan con el control postural y las rutinas de locomoción (Govind, C. K. y Atwood, H. L. 1982). La frecuencia de la actividad eléctrica espontánea, en las raíces motoras tónicas registrada *in situ*, es mayor de 30Hz. Esta actividad persiste *in vitro*, y puede ser registrada después de 5 días de cultivo (Egid, K. y Lnenicka, G. A. 1993).

Por otro lado, aunque los mecanismos de diferenciación del sistema nervioso no están bien entendidos, se sabe, por ejemplo, que en animales juveniles los cambios en la actividad eléctrica producen alteraciones de larga duración en la estructura y el

funcionamiento de las terminales motoras (Lnenicka, G A. 1991). En apoyo a esta idea, Egid y Lnenicka (1993) han sugerido que los patrones de actividad eléctrica que se observan en las raíces motoras de explantes de la cadena ganglionar son los responsables de las diferencias morfológicas que se observan entre la ramificación de los axones motores fásicos y tónicos después de algunos días de cultivo (Egid, K. y Lnenicka, G. A. 1993).

En forma más general (es decir, al tomar en consideración otros grupos zoológicos y otros tipos de neuronas), se puede decir que, en neuronas disociadas mantenidas en cultivo, el nivel de actividad eléctrica (Cohan, C. S. y Kater, S. B. 1986), el entorno, así como sus propiedades intrínsecas (Chiquet, M. y Nicholls, J. G. 1987, Chiquet, M. y Acklin, S. E. 1986, Mattson, M. P. y Kater, S. B. 1987) son factores que interactúan y determinan el crecimiento neurítico y la subsecuente organización estructural del SNC.

## **II. 2. REGENERACIONY DEGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO DEL ACOCIL**

Desde la década de 1960 (Hoy y col., 1967) se empezó a estudiar el fenómeno regenerativo que ocurre después de lesionar el SNC del acocil. En los años 70 se incrementó la información respecto a este tema. Así, por ejemplo, en especímenes en etapas juvenil tardía y adulto de la especie *Procambarus simulans* se observó una baja habilidad en la regeneración de axones no gigantes cuando se producía una lesión entre el tercero y el cuarto ganglios abdominales, así como incapacidad total para reemplazar cuerpos celulares que hubieran sido destruidos a consecuencia de la lesión del SNC (Bittner, G. D. 1973, Bittner, G. D. y col., 1974, Meyer, M. R. y Bittner, G. D. 1978 a, b, Bittner, G. D. y Ballinger, M. L. 1980). Sólo unas cuantas íterneuronas de diámetro pequeño mostraron evidencias morfológicas y fisiológicas de regeneración a través del sitio de lesión (Bittner, G. D. y Johnson, A. 1974).

En un estudio posterior de tipo comparativo entre dos especies muy relacionadas, *Procambarus simulans* y *Procambarus clarkii*, se examinó la capacidad de regeneración del sistema nervioso en organismos recién eclosionados y adultos (Seshan, K. R. y Bittner,

G. D. 1987). Se encontró que los animales muy jóvenes (de 4 a 16 semanas) de ambas especies muestran gran capacidad de regeneración de axones nerviosos no gigantes. En este estudio, que es exclusivamente morfológico, se encontró que la habilidad regenerativa de *P. clarkii* es mayor que la de *P. simulans*. En ningún caso, sin embargo la regeneración de los axones gigantes hizo posible que éstos atravesaran por completo el sitio de la lesión aun después de que hubieran transcurrido 22 semanas desde el momento de la lesión.

Después de haber sido lesionadas las prolongaciones de las motoneuronas fásicas y tónicas, sus axones crecen en cultivo sin necesidad de que haya un tejido blanco. Así mismo, la arborización axonal de los explantes se prolonga por más de diez días de cultivo, sin importar si el explante se obtiene de un animal recién eclosionado o de uno de seis meses de edad. En cuanto a los dos tipos de motoneuronas existen claras diferencias en el mantenimiento de la actividad espontánea, en la velocidad de crecimiento y en la forma de ramificación consecuente a la lesión de las raíces motoras (Egid, K. y Lnenicka, G. A. 1993). En 36 de 37 cultivos a los que se había añadido suero fetal bovino y que habían sido obtenidos de animales juveniles, se encontró, en el cuarto día de cultivo al menos una ramificación.

En alotransplantes de un par de ganglios abdominales en un huésped previamente desnervado, las fibras fásicas motoras de la tercera raíz son capaces de regenerar y encontrar sus blancos aun cuando sean injertados los ganglios en el espacio contra lateral (Krause K. M. y Vélez S. J., 1995).

Una de las características del SNC del acocil y de otros invertebrados que más ha llamado la atención, es el largo periodo (de semanas a años) que los axones pueden sobrevivir separados del soma neuronal. Es posible que estos largos periodos se relacionen con la transferencia de proteínas desde las células adyacentes hasta los axones enucleados. Se sabe que axones enucleados de vertebrados también pueden sobrevivir por largos periodos y se atribuye la misma explicación, aunque también se ha propuesto que maniobras experimentales prolongan la vida de las neuritas, como por

ejemplo, evitar que las fibras sean fagocitadas por células implicadas en la respuesta inmune.

Mucho se ha especulado en torno a porqué los muñones distales de las motoneuronas de acocil son capaces de mantenerse sin degenerar durante periodos prolongados. Se ha propuesto, por ejemplo, que los axones segmentados gigantes laterales (SLGAs) se mantienen vivos después de la enucleación porque las uniones septales los proveen de sustancias que los mantienen, durante largo tiempo, con sus características esenciales. De hecho, el axón enucleado gigante lateral del acocil (*Procambarus clarkii*), muere sin la unión septal (Bittner, G. D. 1991). También se midieron los cambios de resistencia eléctrica de la unión septal ya que se supuso que si después de la lesión algún tipo de canal permitía el libre paso de moléculas de gran tamaño de un lado a otro de la unión septal, este mismo canal permitiría el libre paso de otras partículas más pequeñas como los iones, aumentando la conductividad para dichas partículas, lo que supondría la reducción de la resistencia en dichas uniones. Sin embargo, Anderson y Bittner (1980) confirmaron observaciones previas que describían cambios inmediatos a la lesión en la conductividad eléctrica con el aumento de la resistencia el cual persiste por lo menos 2h. Este hecho lo explicaron con base en la pérdida de uniones de baja resistencia presentes en las uniones septales; los mismos autores extendieron el tiempo de observación y demostraron que existe una recuperación posterior en la conductividad eléctrica hasta niveles anteriores a la lesión, que tarda en aparecer 7 días y dura cuando menos 80. Esto descartaba, al menos en parte, la posibilidad de que las uniones de baja resistencia, -que corresponden a uniones comunicantes- tuvieran un papel primario en la aportación de factores tróficos. Posteriormente, se encontraron vesículas que transportan proteínas radio marcadas del axoplasma del axón intacto al del axón enucleado (Bittner, G. D. 1991), lo que hace pensar en la exocitosis y la endocitosis como los mecanismos probables de “aprovisionamiento”.

En 1990 I. R. Brown menciona la posibilidad de que existan proteínas de “estrés”, las cuales se sinterizarían como consecuencia de una lesión, y de su presencia dependería la vida de los axones lesionados. Este trabajo en particular se enfocó a la

posible presencia de proteínas de tensión relacionadas con el choque térmico, hecho que actualmente se encuentra bien sustentado (Brown I. R., 1990 y 2007).

Para terminar con esta sección se hace notar que existen excepciones a la aplicación del principio de Ramón y Cajal, respecto a la degeneración del cabo distal (Walleriana). Los insectos, crustáceos y moluscos muestran un curso temporal degenerativo muy lento con respecto a lo observado en vertebrados; así, los axones motores de los quelípedos del acocil sobreviven más de 160 días después de la axotomía (Hoy y col. 1967). Sin embargo, no todos los estudios sobre degeneración neural en invertebrados coinciden en que ésta es siempre tan lenta (Govind, C. K. y col., 1992). En las fibras sensoriales la velocidad de degeneración es similar a las de las neuronas de los vertebrados. No se conocen las causas que producen las diferencias entre los tiempos de degeneración de las fibras motoras y las sensoriales, pero una posible explicación se puede encontrar en las diferencias morfométricas que existen entre ellas: 200  $\mu\text{m}$  y 60  $\mu\text{m}$  de diámetro respectivamente. Esto implica que el calibre de las fibras nerviosas está relacionado con la dinámica axonal, entendida esta última como el conjunto de procesos que distribuyen las diferentes sustancias en el axón a través de los transportes rápido y lento, anterógrado y retrógrado (Scott T B 1993).

### **II.3. INFORMACIÓN RELATIVA AL PROYECTO OBTENIDA EN NUESTRO LABORATORIO**

En nuestro laboratorio, hemos comprobado que a la sección de una hemicadena abdominal ganglionar ventral del acocil *in vitro*, sigue el restablecimiento del contacto físico entre los dos muñones de la cadena lesionada. Este hallazgo nos llevó a realizar pruebas de inmunohistoquímica dirigidas a definir si las fibras de reconexión que se observan al microscopio de luz son de tejido conectivo cicatricial o de tejido nervioso. En estas pruebas se utilizó la inmunodetección de la proteína tau que es específica para tejido nervioso, es decir, se realizó una incubación del tejido con anticuerpos dirigidos contra la proteína tau, después se aplicó un segundo anticuerpo dirigido contra el primero; el segundo anticuerpo

tenía asociado a su vez la enzima peroxidasa de rábano que reacciona con la sustancia diaminobenzidina, que se torna de color marrón y es empleada como una especie de revelador. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto el carácter nervioso de las fibras de reconexión. Por otra parte se llevaron a cabo estudios de microscopía electrónica con la pretensión de determinar la ultra estructura de las fibras de reconexión. Los primeros resultados obtenidos con esta técnica pusieron de manifiesto que las fibras que atraviesan el sitio de lesión tienen la organización estructural propia de las fibras nerviosas. Asimismo, en la zona de lesión se ve un aumento de la glía que parece acompañar a los axones en su nuevo recorrido. Estos antecedentes nos llevaron a establecer un programa de trabajo en el que la pregunta esencial se refiere al posible carácter funcional de las fibras de reconexión, es decir a conocer, en su caso, los tiempos en los que las nuevas fibras restablecen la comunicación eléctrica entre las dos zonas inicialmente separadas por la lesión.

## JUSTIFICACION

De acuerdo con la literatura consultada, el fenómeno de la regeneración neural en el acocil ha sido ampliamente estudiado sobre todo desde el punto de vista morfológico. A pesar de ello se conoce muy poco de los posibles mecanismos implicados en la formación de nuevas neuritas. Con la intención de aportar algún elemento que ayude a la comprensión de los mecanismos que subyacen al proceso de regeneración neural, se elaboró el presente proyecto, el cual tiene como meta principal establecer las condiciones esenciales que se requieren para que se restituya una reconexión funcional entre fibras nerviosas en cultivo previamente separadas como consecuencia de una lesión. El trabajo se dividió en tres etapas: a) establecer si hay reconexión funcional (a través de la evaluación de la transmisión de potenciales de acción) entre las fibras nerviosas del acocil previamente lesionadas; b) establecer el efecto del NGF en el proceso de la reconexión; c) determinar la presencia de receptores de alta afinidad TRK A en ésta especie.

Es importante hacer énfasis, que en la literatura no se encontró ningún antecedente acerca de la existencia o acción del NGF en el acocil. Tampoco se halló información relativa a la presencia de receptores al NGF en esta especie. Si se considera que: a) en algunos invertebrados como en la mosca de la fruta hay genes que potencialmente codifican para receptores tipo TRK (Wilson, C. y col. 1993) b) que tanto la secuencia del NGF (Sara, V. R. y col. 1990) y como sus efectos fisiológicos se encuentra muy conservados en términos evolutivos en el grupo de vertebrados (Gotz, R. y Schartl M. 1994). Resulta de interés estudiar en el acocil la acción de este factor en la regeneración y en caso de encontrar un efecto positivo coadyuvará a ampliar la información que se proponen en los puntos antes mencionados.

Las condiciones de cultivo *in vitro* son una magnífica herramienta para la comprensión y esclarecimiento de algunos de los fenómenos relacionados con los procesos de degeneración y regeneración, debido a que en este modelo se pueden controlar algunas de las condiciones micro ambientales a las que se somete el tejido nervioso después de una lesión. Aunque el cultivo neuronal ha sido ampliamente utilizado,

tiene la limitación de que para realizarlo hay que desorganizar el tejido nervioso por lo que no es adecuado para resolver las preguntas en donde la conservación del plano anatómico general debe mantenerse. Muy pocos trabajos emplean el cultivo de órganos que incluyan todo o la mayor parte del sistema nervioso central de un organismo para ser estudiado *in vitro* (Treherne J M 1992, Woodward S K et al 1992), debido en buena medida a las grandes dificultades técnicas que esto implica. Por ello disponer de un modelo en donde el sistema nervioso central pueda ser mantenido en condiciones de cultivo de órganos por periodos de días o semanas es una herramienta que hace factibles experimentos imposibles *in vivo* o con células dispersas, aunque resulte muy complicado de realizar. El sistema nervioso del acocil puede ser mantenido en esas condiciones con la ventaja de ser relativamente fácil de disecar, además de estar morfológica y funcionalmente bien caracterizado.

## HIPOTESIS

Cuando el tejido nervioso es lesionado y se interrumpe la comunicación nerviosa puede ocurrir que la conducción normal se recupere siguiendo una dinámica característica, o bien puede ser que la actividad no se recupere. La recuperación se atribuye, de manera general, al fenómeno conocido como regeneración nerviosa (González del Pliego y col., 1998).

Cuando el tejido conectivo nervioso de la cadena ganglionar ventral del acocil es lesionado con suficiente fuerza se interrumpe la comunicación nerviosa entre los dos ganglios aledaños a dicho segmento. Si la comunicación nerviosa se restituye después de un tiempo, entonces, según se ha propuesto (González del Pliego y col., 1998) es posible sea a través de la regeneración nerviosa. Si la comunicación nerviosa no se restituye entonces el tejido nervioso no habrá logrado regenerarse durante el periodo de estudio al que estuvo sujeto. En ambos casos la evolución a la lesión puede ser estudiada desde el punto de vista funcional y estructural, mediante electrofisiología e histología.

Por otro lado, los factores neurotróficos que promueven el crecimiento y la regeneración nerviosa en los vertebrados, actúan por la unión de la neurotrofina con su receptor de alta afinidad (Jang S. W., y col. 2009). Probablemente los invertebrados compartan esta característica con los vertebrados. Así si la dinámica de recuperación a la lesión en la cadena ganglionar se ve modificada como consecuencia de la aplicación del factor de crecimiento nervioso (NGF), entonces, posiblemente esté participando en la dicha recuperación un receptor de alta afinidad (TrkA) para esa sustancia. Si la dinámica de recuperación no se ve afectada por la aplicación de dicha neurotrofina entonces probablemente no existirá un receptor de alta afinidad para esa neurotrofina, o bien, dicho receptor no estará participando en el proceso de regeneración nerviosa. En todo caso si existe el receptor TrkA en el tejido nervioso del acocil entonces es posible su detección.

## OBJETIVOS

En el acocil *Procambarus clarkii* demostrar mediante un modelo de cultivo *in vitro* los siguientes objetivos:

1) Establecer si hay reconexión funcional entre las fibras del tejido nervioso conectivo de la cadena ganglionar ventral después de una lesión *in vitro*. Es decir, establecer el efecto y evolución de una lesión provocada entre el tercero y el cuarto ganglios abdominales sobre el registro electrofisiológico de campo de los potenciales de acción producidos en las terceras raíces tónico motoras entre el cuarto y quinto ganglios por la estimulación eléctrica del tejido conectivo próximo anterior al tercer ganglio de esa misma región.

2) Estimar el efecto de adicionar al medio de cultivo factor de crecimiento neural (NGF) sobre el objetivo anterior, así como su efecto mediante su aplicación aguda.

3) Conocer a nivel histológico (microscopia de luz), el cambio y evolución estructural de lesionar el conectivo de la cadena ganglionar ventral entre el tercero y el cuarto ganglios, en cadenas mantenidas *in vitro*.

4) Determinar la presencia de receptores de alta afinidad a neurotrofinas (TrkA) en el sistema nervioso central del animal adulto.

# MATERIAL Y METODOS

## LOS ACOCILES Y SU MANTENIMIENTO

No menos de 150 acociles adultos en estado de intermuda, de la especie *Procambarus clarkii*, sin distinción de sexo procedentes de un criadero ubicado en Mixquihuala Hidalgo, México, fueron utilizados.

Al llegar al laboratorio fueron mantenidos en estanques con agua potable libre de cloro, burbujeo de aire, temperatura constante de 19 °C y un régimen de iluminación de 12-12 h luz - oscuridad.

Los acociles fueron alimentados cada tercer día con una dieta variada que comprendía: zanahoria, calabaza y pescado crudos, así como, huevo cocido.

## MANTENIMIENTO DE ANIMALES CUYA CADENA GANGLIONAR FUE DESTINADA AL CULTIVO DE TEJIDOS

Los animales fueron mantenidos en condiciones especiales. Su alimento fue cocinado. Se les aplicó una dosis intramuscular de 8000 UI de penicilina 48 h antes de su sacrificio y fueron colocados en acuarios individuales con solución para acuario (apéndice II) que los cubría al ras. La solución fue cambiada cada 24 h y veinte minutos antes del sacrificio se colocaban en una solución fresca similar a la anterior pero a la que se le agregó 50ml de solución de Benzal (al 1%).

## DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS CONTROLES Y EXPERIMENTALES

### REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

#### GRUPO 1: VIABILIDAD (ACTIVIDAD ESPONTÁNEA)

La actividad eléctrica espontánea fue empleada como un criterio de la viabilidad de la cadena ganglionar previa a los registros de actividad inducida. Sólo las cadenas con actividad espontánea, (sin importar el número y tipo de espigas por minuto), se consideraron como vivas y fueron utilizadas para los registros del grupo 2. Los registros de este grupo no se muestran en los resultados.

Se registró la actividad eléctrica espontánea en las terceras raíces entre el cuarto y el quinto ganglios abdominales de 10 animales por condición (ver figuras A y C):

- a) Cadenas recién obtenidas y mantenidas en cultivo: 1, 3, 5 y 7 días.
- b) Cadenas lesionadas con pinzas entre el 3<sup>o</sup> y el 4<sup>o</sup> ganglio abdominales: recién obtenidas y mantenidas: 1, 3, 5 y 7 días de cultivo.
- c) Cadenas lesionadas con hilo entre el 3<sup>to</sup> y el 4<sup>to</sup> ganglio abdominales: recién obtenidas y mantenidas: 1, 3, 5 y 7 días de cultivo.
- d) Cadenas lesionadas con pinzas entre el 3<sup>to</sup> y el 4<sup>to</sup> ganglio abdominales mantenidas 1, 3, 5 y 7 días de cultivo a los que se les agregó 0.1µg/ ml de NGF (Burry y Perrone-Bizzozero, 1993)
- e) Cadenas lesionadas con hilo entre el 3<sup>to</sup> y el 4<sup>to</sup> ganglio abdominales con 1, 3, 5 y 7 días de cultivo a los que se les agregó 0.1µg/ ml de NGF (Burry y Perrone, Bizzozero, 1993)

## **GRUPO 2**

### **ACTIVIDAD INDUCIDA**

La actividad eléctrica producida por estimulación eléctrica se registró en las terceras raíces entre el cuarto y el quinto ganglios abdominales (ver figuras A, B y C) de 10 animales por cada condición:

#### **Controles**

- a) Cadenas recién obtenidas.
- b) Cadenas con 1, 3, 5 y 7 días de cultivo.
- c) Cadenas recién obtenidas (5 cadenas). Antes y después de la aplicación de 75ng de NGF por ml, en dosis acumulativas hasta un máximo de 5 dosis (es decir: 75X5ng/ml).

#### **Experimentales**

##### **Cadenas lesionadas**

- a) Cadenas ganglionares recién obtenidas, lesionadas con pinzas entre el 3<sup>to</sup> y el 4<sup>to</sup> ganglio abdominales.
- b) Cadenas ganglionares recién obtenidas, lesionadas con hilo entre el 3<sup>to</sup> y el 4<sup>to</sup> ganglio abdominales
- c) Cadenas lesionadas con pinzas entre el 3<sup>to</sup> y el 4<sup>to</sup> ganglio abdominales con 1, 3, 5 y 7 días de cultivo.
- d) Cadenas lesionadas con hilo entre el 3<sup>to</sup> y el 4<sup>to</sup> ganglio abdominales con 1, 3, 5 y 7 días de cultivo.
- e) Cadenas lesionadas con pinzas entre el 3<sup>to</sup> y el 4<sup>to</sup> ganglio abdominales con 1, 3, 5 y 7 días de cultivo a las que se les agregó 0.1µg/ ml de NGF.

- f) *Cadena lesionadas con hilo entre el 3<sup>o</sup> y el 4<sup>o</sup> ganglio abdominales con 1, 3, 5 y 7 días de cultivo a las que se les agregó 0.1µg/ ml de NGF.*

## EXPERIMENTOS HISTOLÓGICOS

### EL TEJIDO PROCESADO PARA CORTES HISTOLÓGICOS:

La siguiente lista muestra la condición control y las condiciones experimentales en las cuales el tejido fue procesado para su análisis histológico:

- a) Cadena recién obtenida intacta. Control
- b) Cadena recién obtenida lesionada con pinzas. Control de lesión con pinzas
- c) Cadena recién obtenida lesionada con hilo. Control de lesión con hilo
- d) Cadenas lesionadas con pinzas entre el 3<sup>to</sup> y el 4<sup>to</sup> ganglio abdominales con 1, 3, 5 y 7 días de cultivo.
- e) Cadenas lesionadas con hilo entre el 3<sup>to</sup> y el 4<sup>to</sup> ganglio abdominales con 1, 3, 5 y 7 días de cultivo.

Las cadenas ganglionares fueron incluidas en parafina, cortadas longitudinal o transversalmente y teñidas con la técnica tricrómica de Masson para microscopía de luz. La tinción de Masson se llevó a cabo según lo descrito en el “Manual of histologic methods of The Armed Forces Institute of Pathology”, sin embargo los tiempos de exposición a colorantes tuvieron que ser ajustados.

Cada experimento tuvo una repetición. La viabilidad del tejido antes de su fijación fue cotejada por la técnica de diacetato de fluoresceína (FDA)-bromuro de etidio (Br Et), (Hartmann y Speit, 1996).

## **EXPERIMENTOS DE DETECCIÓN MOLECULAR DE TRK A**

### **CONTROL POSITIVO**

- a) Homogeneizado de cerebro de rata neonata (24h) fue sometido a la técnica de Western blot e inmuno-electro-transferencia para TRK.

### **CONTROL NEGATIVO Y FALSOS POSITIVOS**

- b) Homogeneizado de cerebro de rata neonata (24h) fue sometido a la técnica de Western blot e inmuno electro transferencia para TRK, sin incubar la membrana en el primer anticuerpo.

### **EXPERIMENTAL POSITIVO**

- c) Homogeneizados de 10 cadenas ganglionares completas recién obtenidas, fueron sometidas a la técnica de inmuno precipitación, western blot e inmuno electro transferencia para TRK.

### **EXPERIMENTAL NEGATIVO Y FALSOS POSITIVOS**

- d) Homogeneizados de 10 cadenas ganglionares completas recién obtenidas, fueron sometidas a la técnica de inmuno precipitación, western blot e inmuno electro transferencia para TRK, sin incubar la membrana en el primer anticuerpo.

## **TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **OBTENCIÓN DE UNA CADENA GANGLIONAR**

#### **EXPOSICIÓN DE LA CADENA GANGLIONAR**

##### **CASO GENERAL**

1. El animal fue anestesiado por frío
2. El acocil fue decapitado mediante un corte transversal siguiendo la comisura céfalo-torácica.
3. Los pereiópodos incluyendo las pinzas del quelípodo y los pleópodos fueron cortados desde su base.
4. El cuerpo del acocil fue sujetado en posición de decúbito ventral con tres alfileres a una plataforma de corcho, uno atravesando el exoesqueleto dorsal y dos sujetando los urópodos.
5. En la región ventral del tórax se realizó un corte longitudinal sobre la línea media del cuerpo hasta el inicio de la región abdominal.
6. El exoesqueleto del primer segmento abdominal ventral fue cortado dos veces bajo control microscópico: primero transversalmente desde la línea media hasta el borde derecho y después igualmente hasta el borde izquierdo.
7. Desde cada uno de estos extremos se realizaron cortes en dirección caudal paralelos a los bordes del abdomen.
8. Cuidadosamente se retiró el exoesqueleto desde el primero hasta el último segmento abdominal.
9. La cadena ganglionar abdominal (CGA) queda expuesta y a partir de ese momento es indispensable evitar que se seque, para lo cual se agregaba solución de van Harreveld (van Harreveld, 1936) constantemente.

## **CASO DE LESIÓN CON PINZAS**

Se siguió el protocolo de “caso general” hasta el punto 9. Si la cadena estaba destinada al cultivo de tejidos se empleaba material esterilizado y condiciones de asepsia. Se continuó con los siguientes pasos:

1. Las puntas abiertas de una pinza de cierre automático del número 5 se colocaban entre el tercero y el cuarto ganglio abdominal cerca del cuarto ganglio.
2. La pinza se cerraba su cierre por aproximadamente un segundo, lo que provocaba una lesión transversal.

## **CASO DE LESIÓN CON HILO**

Se siguió el protocolo de “caso general” hasta el punto 9. Si la cadena estaba destinada al cultivo de tejidos se empleaba material esterilizado y condiciones de asepsia. Se continuó con los siguientes pasos:

1. Una hebra de hilo de seda del No. 5 se colocaba atravesando la cadena ganglionar entre el tercero y el cuarto ganglio abdominales.
2. Los extremos eran entrelazados y cerrados poco a poco hasta que el vilo formado se reducía muy cerca de la superficie de la cadena.
3. Una de las puntas de hebra era regresada por el vilo hasta casi zafar el entrelazado
4. Los extremos del hilo próximos a la región entrelazada se sujetaban con pinzas y se corría el nudo
5. El nudo se soltaba jalando la punta de la hebra.

## **CASO DE CULTIVO DE TEJIDOS**

Todas las maniobras se realizaron con el material estéril, en un cuarto de cultivo y en el interior de una campana de flujo laminar en condiciones asépticas.

1. Una serie de tres cajas de Petri (3.5mm) con 2ml de medio con antibiótico eran preparadas.
2. Una caja de Petri con 4ml de medio de cultivo "L-15 modificado" (Egid y Lnenicka, 1993) era preparada para cada cadena.
3. El animal era anestesiado por frío
4. Se colocaba por 2 minutos en un vaso de precipitados que contenía alcohol de 96°
5. Se proseguía el protocolo de "casos generales" desde el paso 2.
6. Para cadenas lesionadas, al llegar al paso 9 de "casos generales" se seguía el paso 1 de "caso lesión con pinzas" o el paso 1 de "caso de lesión con hilo", en condiciones asépticas.

## **CASO DE CULTIVO DE TEJIDOS EN NGF**

El paso número 2 de los procedimientos de "caso de cultivo de tejidos" se modificó por el siguiente procedimiento.

1. Una caja de Petri con 4ml de medio de cultivo "L-15 modificado" adicionado con 1, 0.1 o 0.01 $\mu$ g de NGF por mililitro era preparada para cada cadena. La dosis de 1 $\mu$ g de NGF resultó, por lo que en este estudio se reporta el efecto de la concentración de 0.1 $\mu$ g de NGF por mililitro.

## EXTRACCIÓN DE LA CADENA GANGLIONAR PARA REGISTRO INMEDIATO

1. El conectivo nervioso que une el último ganglio torácico con el primer abdominal y las raíces nerviosas después del VI ganglio abdominal eran anudados con hilos de seda.
2. La cadena se cortaba antes del nudo después del quinto ganglio torácico.
3. Se pinzaba el hilo (de la región anterior) y se levantaba suavemente, eran cortadas una a una las raíces nerviosas por su región más periférica.
4. Al levantar el sexto ganglio se cortaban las raíces nerviosas después del nudo.
5. La cadena se colocaba en solución de van Harreveld (van Harreveld, A. 1936) dentro de una caja de Petri tratada previamente con una capa de 3mm de sylgard.
6. Los cabos de hilo de la región anterior eran sujetados al sylgard por un extremo de la caja de Petri con la ayuda de agujas diminutas.
7. Se sujetaba uno de los cabos de hilo del sexto ganglio y se estiraba la cadena hasta una longitud aproximadamente igual a la que tenía cuando se encontraba en el animal.
8. La cadena se orientaba con ayuda del microscopio estereoscópico, dejando la región ventral hacia arriba y vigilando que no se torciera el tejido en ningún punto.
9. El tejido muscular, los tejidos conjuntivo y circulatorio, arrastrados involuntariamente, eran removidos cuidadosamente del tejido nervioso con ayuda del microscopio estereoscópico.
10. Las terceras raíces tónicas entre el cuarto y quinto ganglio abdominal eran liberadas con la ayuda de puntas de vidrio.
11. Las demás raíces vecinas eran cortadas casi desde su base para evitar su interferencia al poder montarse en los electrodos de registro.

## **EXTRACCIÓN DE LA CADENA GANGLIONAR PARA EL CULTIVO DE TEJIDOS**

Todas las maniobras se realizaron con el material estéril, en un cuarto de cultivo y en el interior de una campana de flujo laminar en condiciones asépticas.

1. Los tejidos muscular, conjuntivo y circulatorio se retiraban hasta donde era posible del tejido nervioso con ayuda del microscopio estereoscópico.
2. La cadena abdominal fue cortada cerca del ganglio torácico entre el quinto ganglio torácico y el primer abdominal.
3. El segmento resultante anterior al primer ganglio abdominal era sujetado con una pinza del No. 5 y se levantaba suavemente. Durante esta acción eran cortadas una a una las raíces nerviosas con ayuda de una tijera de iris. Esta operación se repitió hasta cortar los nervios del sexto ganglio sin soltar el pinzado inicial.
4. La cadena era depositada por 15 minutos en cada una de las cajas de Petri de la serie de medio antibiótico previamente preparadas.
5. La cadena era depositada en la caja de Petri con 4ml de medio L-15 modificado
6. La caja de Petri con la cadena era colocada en una incubadora, a 19 °C con humedad a saturación por 1, 3, 5 o 7 días según el protocolo respectivo.
7. Cada tercer día el 50% del medio era sustituido por medio de cultivo fresco.
8. La esterilidad del medio se verificaba mediante su análisis microscópico y se desecharon las preparaciones que presentaban cualquier tipo contaminación biológica.
9. Cumplido el periodo de cultivo, la cadena fue colocada con extremo cuidado en 6ml de solución glucosada de van Harreveld (SGVH) dentro de una caja de Petri tratada previamente con una capa de 3mm de sylgard.
10. El conectivo nervioso que une el último ganglio torácico con el primer abdominal y las raíces nerviosas después del VI ganglio abdominal fueron anudados con hilos de seda.
11. Se seguía el protocolo a partir del paso No. 6 de "Extracción de la cadena ganglionar para registro electrofisiológico inmediato"

12. Se deba reposar la preparación 20 minutos en la SVGH antes de su uso.

## TÉCNICA ELECTROFISIOLÓGICA

### DESCRIPCIÓN DEL CIRCUITO DE REGISTRO

Dos sondas fueron puestas en continuidad al cerrar el circuito GND-G2-G2-GND con un alambre de plata en el interior de una jaula de Faraday debidamente aterrizada.

El blindaje de los electrodos de registro fue enviado a su respectiva sonda en el GND y los electrodos fueron montados en su respectivo micromanipulador.

La señal recogida por cada electrodo de registro fue enviada al G1 de su propia sonda de baja impedancia (Grass, HIP511), a su preamplificador de AC-DC (Grass, P511) y desde ahí a (figura A):

- un osciloscopio
- un amplificador de sonido y desde este a una bocina
- una tarjeta convertidora AC-DC (Medical Systems, Mod. PCM4) y desde esta a una videograbadora para su análisis posterior.

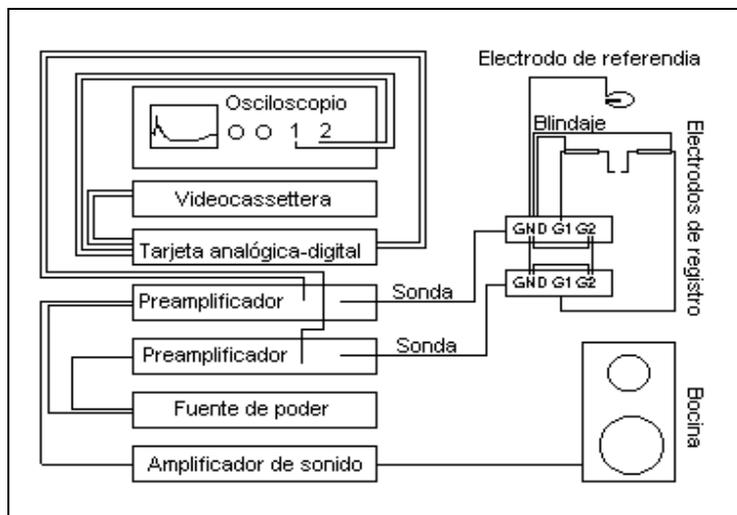


Figura A. Se muestra el sistema de registro, los electrodos y las entradas de las sondas se encuentran en una jaula de Faraday, (no esquematizada). El sistema fue debidamente conectado a tierra física, (no esquematizado).

## REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA ESPONTÁNEA

1. La región cefálica de la cadena ganglionar desde el primero hasta el tercer ganglio abdominal fue colocada sobre la plataforma del electrodo de referencia, con la posición ventral hacia arriba.
2. Las terceras raíces tónico motoras entre el cuarto y quinto ganglio abdominal fueron localizadas visualmente y se desplazó la caja de Petri hasta poner dicha región en la cercanía del lente objetivo del microscopio invertido.
3. Se localizaron y enfocaron ambas raíces, con el lente objetivo 4X
4. Se ubicaron los electrodos a cada lado de las raíces con ayuda de micromanipuladores.
5. Cada raíz fue enganchada con un electrodo de registro y levantada suavemente.
6. Se retiraron 5ml de solución.
7. Al quedar descubierta se inicio el registro de la actividad eléctrica espontánea.

## DESCRIPCIÓN DEL CIRCUITO DE ESTIMULACIÓN

La señal de la unidad de estimulación (Grass S8800) se envió a dos unidades de aislamiento: una de corriente (Grass SIU6) conectada a otra de voltaje (Grass SIU5) y la resultante se envió a la preparación con la ayuda de un micromanipulador a través de un micro electrodo de estimulación bipolar Narishige SS-2 modificado (figura B).

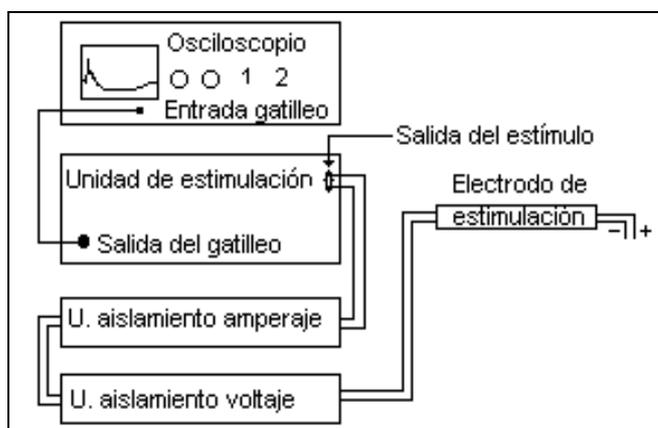


Figura B. Muestra un esquema del circuito de estimulación eléctrico empleado. El sistema desde su primera unidad (U) de aislamiento hasta el electrodo de estimulación se ubicó dentro de una jaula de Faraday conjuntamente con el sistema de registro mostrado en la Fig. A.

## **ESTANDARIZACIÓN DEL ESTIMULO**

1. Se generó una curva de relación entre los valores de estimulación y los valores reales de amperaje y voltaje.
2. Se estableció el valor de frecuencia de estimulación más práctico para realizar los registros.
3. Se establecieron los valores adecuados de intensidad, duración y frecuencia que permitieran observar el mayor número de componentes en la respuesta a la estimulación por parte de la cadena, con el mínimo de registro inespecífico.

## **REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA PRODUCIDA POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA**

1. Se siguió el procedimiento descrito en “Registro de la actividad eléctrica espontánea” desde el primero hasta el quinto punto.
2. El electrodo bipolar de estimulación se colocó en la región ventral de la cadena ganglionar en la los linderos del tercer ganglio, entre este y cuarto ganglio abdominal.
3. Se continuó como en el sexto y séptimo paso de “Registro de la actividad eléctrica espontánea”. Ver figura C.
4. La estimulación consistió de pulsos cuadrados de 420  $\mu$ A, 1.65V, 0.5ms, con frecuencia de 10Hz durante 60 segundos, que fueron sincronizados con el sistema de registro mediante la conexión de la señal de salida del estimulador y el de entrada del: osciloscopio y el cuarto canal de la tarjeta convertidora analógica digital.
5. Como consecuencia se obtuvo el registro de la actividad producida por la estimulación eléctrica en las terceras raíces tónicas entre el cuarto y quinto ganglio abdominal.

6. La actividad fue recogida y amplificada con preamplificador Grass p51 bajo el siguiente protocolo: Amplificación: 1000; Filtro de baja frecuencia: 20 Hz; Filtro de alta frecuencia: 10000 Hz.
7. La actividad amplificada fue video grabada con la ayuda de una tarjeta analógica digital y una videograbadora para su análisis posterior (figura 1) y enviada a un osciloscopio digital.
8. La actividad eléctrica fue promediada 100 veces por un mínimo de 100 eventos según las siguientes especificaciones técnicas: Amplificación: 200mV /división; Velocidad de barrido: 5ms /división; Precisión de la captura digital: 10KS/s; Modalidad: promedio 100.
9. El registro anterior fue catalogado y archivado como un conjunto de datos para hoja de cálculo.
10. El archivo fue modificado para su análisis con el procedimiento descrito en la sección “Análisis. Modificación matemática de los registros eléctricos provocados”.

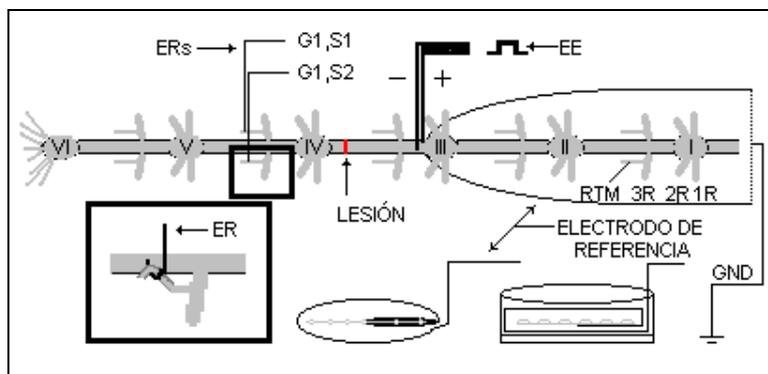


Fig. C. Esquema del sistema de registro y estimulación en la caja de Petri. Arriba: la cadena con los ganglios enumerados, la posición de los electrodos y el sitio de lesión (cuando se hizo). Abajo: izquierda, amplificación que muestra como el electrodo elevó la raíz tónica motora (RTM); centro, representa la forma del electrodo de referencia, con la cadena ganglionar encima; derecha, la preparación vista de lado, se ilustra un espacio ocupado en el fondo de la caja que corresponde a la capa de Sylgar, encima el electrodo de referencia y luego la cadena. ERs, electrodos de registro; ER electrodo de registro; EE: electrodo de estimulación; 1R, 2R y 3R: primera, segunda y tercera raíces; RTM: raíz tónica motora.

## TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

### TÉCNICA DE FIJACIÓN DEL TEJIDO

1. La cadena ganglionar se colocó en solución de van Harreveld (1936)
2. El tejido conectivo de cada una de las cadenas a fijar se cortó transversalmente entre el cuarto y el quinto ganglio.
3. La viabilidad (Hartmann y Speit, 1996) del segmento entre el quinto y el sexto ganglio abdominal se analizó mediante la técnica de di acetato de fluoresceína (FDA)- bromuro de etidio (Br Et). Solo el material vivo fue empleado.
4. La cadena fue nuevamente cortada en la parte intermedia entre el segundo y el tercer ganglio.
5. Un mondadientes se etiquetó con lápiz.
6. Cada segmento que contenía el tercero y cuarto ganglios fue cuidadosamente acomodado en un mondadientes con la ayuda de agujas entomológicas y microscopio estereoscópico. La región ventral fue colocada hacia arriba, la caudal hacia el extremo, se evitó la rotación del tejido y se procuró ajustar la longitud del segmento a la similar en el animal vivo.
7. En un frasco para 20ml se colocó solución fijadora\*
8. El palillo con el tejido fue sumergido en el frasco.
9. Se tapó y conservó por 24h

### INCLUSIÓN EN PARAFINA

El tejido fue pasado por las siguientes soluciones de alcohol etílico.

- |                |       |
|----------------|-------|
| 1. Alcohol 70% | 10min |
| 2. Alcohol 80% | 10min |

---

\* Ver apéndice II "soluciones histológicas"

- |                              |                        |
|------------------------------|------------------------|
| 3. Alcohol 90%               | 10min                  |
| 4. Alcohol 96%               | 10min                  |
| 5. Alcohol absoluto, 2 pases | 15min                  |
| 6. Alcohol – xilol           | 15min                  |
| 7. Alcohol – xilol           | 15min                  |
| 8. Xilol                     | 15min                  |
| 9. Xilol-parafina            | 15min                  |
| 10. Parafina                 | Toda la noche a 55 °C. |
11. El tejido fue colocado en un molde y se le aplicó parafina nueva.
12. Una vez fría se desmontó.

### CORTES HISTOLÓGICOS

1. Portaobjetos esmerilados limpios y secos fueron colocados en solución de poli-L-lisina al 0.01% cubriendo la parte no esmerilada de su longitud, luego fueron colocados en un sitio libre de polvo para su secado.
2. Se realizaron cortes seriados trasversales o longitudinales de 6µm con un micrótopo.
3. Los cortes fueron extendidos en un baño de agua a 45 °C
4. Los cortes se montaron en los portaobjetos tratados con poli L lisina.
5. Las muestras se desparafinaron e hidrataron:
  - a. Se colocaron en la estufa a 46 °C toda la noche
  - b. Xilol por 20 minutos
  - c. Xilol limpio por 20 minutos
  - d. Xilol-Alcohol absoluto 1:1, 10 minutos
  - e. Alcohol absoluto 1 min.
  - f. Alcohol 96%, 1 min.
  - g. Alcohol 90%, 1 min.
  - h. Alcohol 80%, 1 min.
  - i. Alcohol 70%, 1 min.

- j. Alcohol 50%, 1 min.
- k. Agua destilada 10min

## **TINCIÓN DE TRICRÓMICA DE MASSON**

1. Las laminillas fueron colocadas a temperatura ambiente en solución de Bouin toda la noche. Nota. Dicha solución se emplea como mordente y se puede emplear muchas veces siempre y cuando no sea calentada, ya que también puede ser usada por 1 hora a 56 °C pero debe ser desechada.
2. Se lavaron con agua fría hasta que el color amarillo desapareció
3. Se enjuagó con agua destilada
4. Se colocaron en hematoxilina férrica de Weigert 10 minutos y se lavaron con agua corriente por 10 minutos.
5. Se enjuagaron con agua destilada.
6. Se colocaron en solución de escarlata de Biebrich y fucsina ácida por 5 minutos. Nota. La solución puede ser conservada.
7. Se enjuagaron tres veces con agua destilada
8. Se colocaron en solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico por 15 minutos. Nota. La solución debe ser desechada y no se deben enjuagar las laminillas.
9. Se colocaron en solución de anilina azul por 20 minutos. Nota. La solución puede ser conservada.
10. Se enjuagaron en agua destilada hasta ver que no se desprende algún precipitado azul de las laminillas
11. Se colocaron en solución de ácido acético por 5 minutos. Nota. el ácido debe ser desechado.
12. Se deshidrataron en alcohol al 95%, alcohol absoluto y se aclaró en xilol, realizando dos cambios en cada solución.
13. Se montó con resina sintética. Nota. Se debe tener cuidado de que no se deseque la preparación, los núcleos se tiñen de negro; el citoplasma, la queratina, las fibras

musculares y la fibras intercelulares, se tiñen de rojo; la colágena se tiñe de azul. La poli-l-lisina no da coloración de fondo en esta tinción.

## PROCEDIMIENTOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE TRK-A

### HOMOGENEIZADO

#### ACOCIL

Las siguientes maniobras fueron realizadas en un cuarto frío y el homogeneizado era mantenido en tubos insertados en hielo.

1. Las cadenas ganglionares de 20 acociles, (desde el ganglio subesofágico hasta el sexto ganglio abdominal), fueron extraídas en un cuarto frío y con un micro escarpelo fueron rotas sus vainas. Una vez obtenida cada una, era colocada con las demás en una caja de Petri con solución de van Harreveld a 4 °C hasta que concluyeron todas las disecciones. Nota. Vea la sección “Exposición de la cadena ganglionar. Caso general” el método de extracción es muy parecido a lo descrito en la sección “extracción de la cadena ganglionar para cultivo de tejidos”, puntos 1,3 y 5 pero con vH y en condiciones no estériles.
2. El tejido fue pesado en un tubo Eppendorf:
  - a. Se peso el tubo limpio y seco
  - b. Se colocaron una a una las cadenas en el interior
  - c. El exceso de medio fue secado con un papel filtro
  - d. Se peso el tubo con las cadenas y la diferencia con el peso inicial fue considerado el peso del tejido.
3. El tejido se colocó en un homogeneizador de vidrio, (elaborado ex profeso en los talleres del CINVESTAV), previamente enfriado en hielo, al que se le agregó solución amortiguadora de RIPA adicionada con inhibidores de las proteasas 80µl /ml y 80U de ADNasa /ml, hasta lograr una proporción del 20% peso del tejido /volumen del amortiguador de RIPA.
4. El tejido se homogeneizó manualmente con un par de pases del pistilo por segundo por aproximadamente 5 minutos con la base del homogeneizador en hielo y el pistilo frío.

5. El homogeneizado fue centrifugado a 12,000 rpm durante 10 minutos.
6. El precipitado fue resuspendido con la ayuda de una jeringa con aguja 21 X 32, con 30 pases.
7. Se repitió el punto 5 y 6.
8. El homogeneizado fue centrifugado a 12,000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se continuó con el protocolo de "inmunoprecipitación de TRK"

### **CEREBRO DE RATA**

1. Una rata macho de 1 día de nacida fue anestesia por enfriamiento.
2. La rata fue decapitada
3. El cerebro fue extraído rápidamente, para ello, se colocó una tijera fina en el orificio del axis y el atlas y se cortó el techo del cráneo; primero hacia la región parietal derecha y luego a la izquierda, se retiró el segmento resultante del cráneo, y con una pinza curva se removió el cerebro entero.
4. El cerebro fue dividido en sus dos hemisferios por un corte limpio con escarpelo.
5. Los hemisferios fueron colocados en PBS a 4 °C.
6. Los hemisferios fueron pesados.
7. Un hemisferio se colocó en un tubo y fue congelado.
8. El otro hemisferio fue homogeneizado. El tejido se colocó en un homogeneizador de vidrio, previamente enfriado en hielo, al que se le agregó solución amortiguadora de RIPA adicionada con inhibidores de las proteasas 80µl /ml y 80U de ADNasa /ml, hasta lograr una proporción del 20% peso del tejido /volumen del amortiguador de RIPA.
9. El tejido se homogeneizó manualmente con un par de pases del pistilo por segundo por aproximadamente 5 minutos con la base del homogeneizador en hielo y el pistilo frío. Después fue pasado a través de una aguja 21 X 32 por treinta ocasiones a 4 °C.

10. Del homogeneizado se separaron 50 $\mu$ l para determinar la concentración de proteínas por el método del ácido bicouclínico. Se continuó con el paso 20 de "Inmunoprecipitación de TRK"

### INMUNOPRECIPITACIÓN

1. Al sobrenadante se le agregó 60 $\mu$ l de proteína G-agarosa /ml de y fue mantenido en agitación, (suficientemente fuerte para evitar cualquier indicio de precipitación de la agarosa), continua, por 2 horas a 4 °C.
2. La mezcla fue centrifugada a 14,000 rpm por 10 minutos.
3. El sobrenadante ("aclarado") se rescató.
4. El sobrenadante se incubo en agitación suave 18 horas a 4 °C con anticuerpos (IG-g) anti-TRK (C14 Santa Cruz) 40 $\mu$ l /ml.
5. Se agregó 60 $\mu$ l de proteína G- agarosa y se incubo por 2 horas a 4 °C.
6. La mezcla se centrífugo por 2 minutos a 14000 rpm
7. El sobrenadante se descarto
8. El precipitado fue resuspendido en 1ml de "solución lavado para inmunoprecitado"<sup>\*</sup>.
9. La mezcla fue centrifugada a 14,000 rpm por dos minutos
10. Se repitió el paso 8 y 9 cinco ocasiones más.
11. El precipitado fue resuspendido nuevamente, pero ahora en 500 $\mu$ l y cambiado a un tubo Eppendorf más pequeño.
12. La mezcla fue centrifugada a 15,000 rpm por 2 minutos y se descartó todo el sobrenadante posible.
13. Al tubo conteniendo el precipitado se le agregaron 100 $\mu$ l de "solución amortiguadora de muestra 2X". Vea apéndice II.
14. Se agitó vigorosamente con vortex por 40 segundos
15. Se colocó en baño María de agua hirviendo por 5 minutos

---

\* Apéndice II. Soluciones para Western-blot

16. Se centrifugo a 12000 rpm por 2 minutos.
17. El sobrenadante fue dividido en dos volúmenes iguales.
18. Cada volumen fue conservado en hielo antes de ser cargado en su carril respectivo en la lámina de SDS-PAGE, operación que se realizó casi inmediatamente después de su obtención.
19. El homogeneizado se alicuotó en 10 partes iguales que fueron colocadas  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para su uso posterior.
20. De una de las alícuotas del homogeneizado se tomaron  $100\mu\text{g}$  de proteínas ( $20\text{-}35\mu\text{l}$  aproximadamente).
21. Los  $100\mu\text{g}$  de proteína fueron mezclados con un volumen 1:1 de “solución amortiguadora de muestra 2X”.
22. La mezcla fue agitada vigorosamente con vortex por 40 segundos.
23. La mezcla se colocó en baño María de agua hirviendo por 5 minutos.
24. La mezcla se cargó en su respectivo carril del gel de SDS-PAGE

## WESTERN BLOT

Se realizaron geles de poliacrilamida en placas y en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), con un gel concentrador al 4.5% y un gel separador de 7.5% y se emplearon soluciones amortiguadoras para la corrida según lo descrito por Laemmli U. K. (1970). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Bennett J y Scott KJ 1971) previo a la inmuno- electro-transferencia (Tsang V. C., y col. 1983). Para mayores detalles ver el apéndice V, “pormenores del Western Blot”.

## INMUNO ELECTRO TRANSFERENCIA (IET)

1. El gel se colocó en una en una cámara semi húmeda de electro transferencia, en contacto con una membrana de nitrocelulosa (al ánodo), la membrana de

nitrocelulosa en contacto con dos trozos justos al tamaño del gel de papel filtro y al cátodo un trozo como los anteriores en contacto con el gel.

2. Se corrió 1:20 h a 110mA con una oscilación en el voltaje registrable entre 0-6V.
3. La membrana se tiñó con Rojo Ponceau durante 5min, se lavo con agua, y se ratificó la presencia adecuada del marcador de peso molecular de 200 y demás proteínas.
4. Se lavó la membrana con PBS-Tween.
5. La membrana se colocó en agitación suave con solución bloqueadora a 4 °C toda la noche.
6. Se lavó con 250 ml de PBS-Tween por 6 ocasiones. Cada cambio de 5 minutos.
7. Se aplicó el primer anticuerpo 1:500, 15ml. Se incubó toda la noche en agitación suave.
8. Se lavó con 200ml de PBS-Tween por 4 ocasiones de 10 minutos.
9. Se incubó con 2 ml del segundo anticuerpo 1:1500, 2 h a 37 °C. Agitación media
10. Se lavó con 200ml de PBS-Tween por 3 ocasiones de 10 minutos.
11. En una cámara de auto fotografía se aplicó 1ml de ECL a la membrana, según las instrucciones de uso del fabricante y fue auto fotografiada con tiempos de exposición de 1 a 30min en placa profesional Kodak cortada al tamaño adecuado.
12. La placa fotográfica fue revelada.

# RESULTADOS

En la figura 1 se muestran 4 trazos, cada uno correspondiente al registro de la actividad eléctrica producida en una raíz tónico motora inmediatamente después de que se extrajo la cadena y se inició el registro de las estructuras en cultivo (ver la sección de Métodos). Cada trazo se obtuvo de una cadena diferente y representa la actividad promedio de por lo menos 60s de estimulación con una frecuencia de 10Hz y está constituido de 500 puntos (es decir, cada punto es el promedio de no menos de 600 adquisiciones). Los registros muestran la típica actividad inicial, que se caracteriza por la presencia de un conjunto de ondas, de una magnitud variable, pero con la particularidad de que la onda más rápida (con una latencia de 5ms aprox.) se encuentra presente en todos los casos.

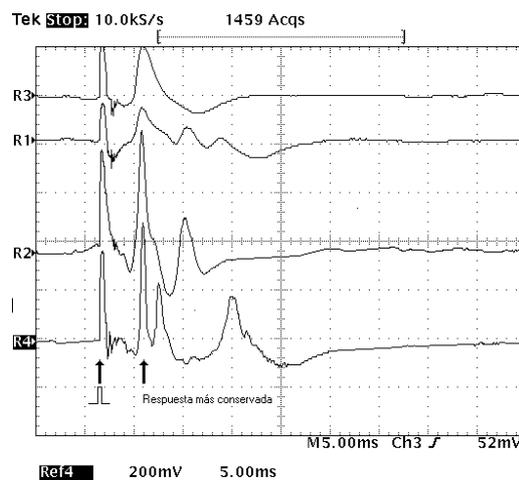


Fig. 1. Muestra el promedio de la actividad eléctrica producida en cadenas recién extraídas. La cadena ganglionar ventral fue estimulada entre el 2do y 3er ganglios abdominales y el registro se llevó a cabo en la tercera raíz tónico motora entre el 4to y 5to ganglios. La actividad que se muestra es un ejemplo del tipo de los registros obtenidos.

Todos los trazos obtenidos son diferentes, esto es el resultado de que se estimulan y se registran conjuntos de fibras nerviosas; por ello entre cada experimento la variación aunque sea pequeña en la posición de los electrodos modifica el registro eléctrico. Por esa razón resultó indispensable presentar en un solo trazo el promedio

de la actividad de cada uno de los grupos experimentales. Para evitar que al promediar toda la actividad global, el valle de un trazo anulara la cresta de otro, se sumó a los trazos un valor constante y se ajustó una curva por debajo de los puntos experimentales (normalmente una función exponencial), y el valor así obtenido se sumó a cada punto, de manera que desaparecieran, -en la medida de lo posible-, los valores negativos. Este procedimiento se aplicó para cada registro de cada experimento. Los trazos resultantes se muestran en las siguientes figuras.

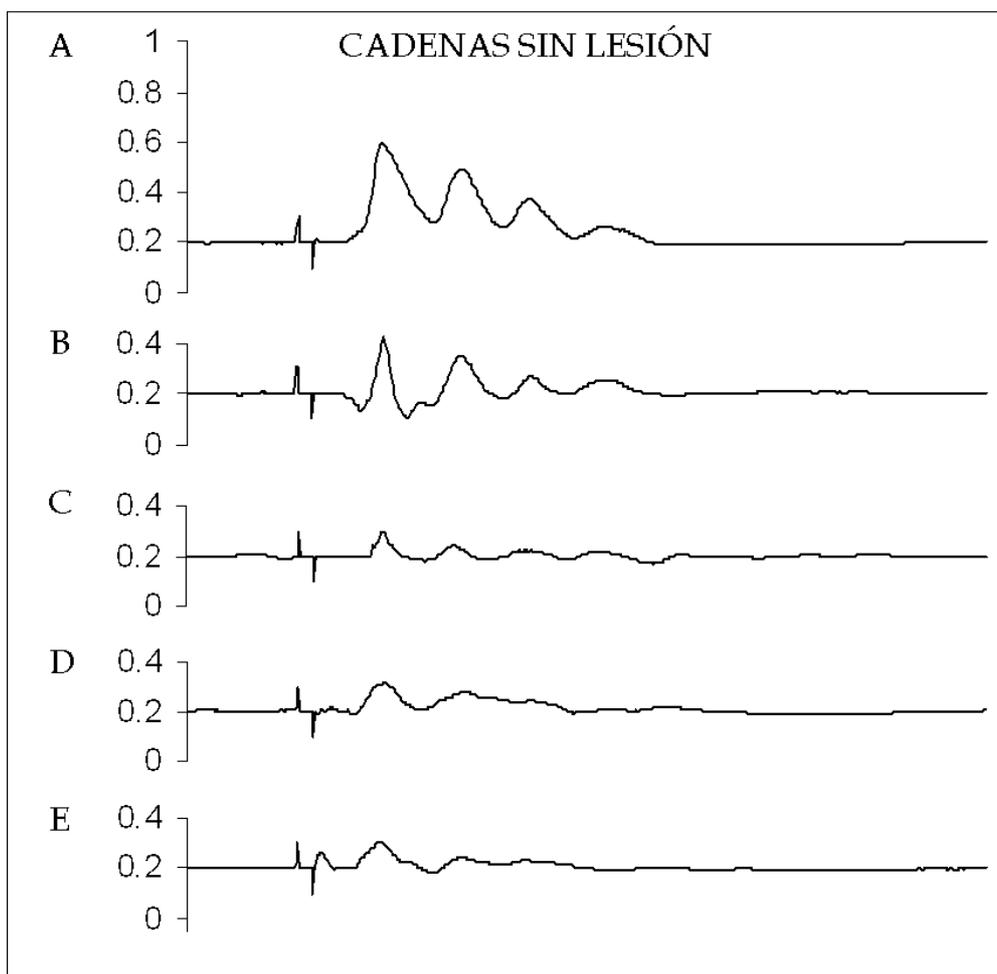


Fig. 2. Muestra el cambio en la actividad eléctrica producida en las raíces tónicas motoras por estimulación del conectivo ganglionar, como consecuencia del periodo durante el cual la cadena ganglionar se mantuvo en condiciones de cultivo (*in vitro*). Cada trazo corresponde al promedio de las repeticiones (5) realizadas para cada grupo. El trazo completo comprende 50 ms., en las ordenadas 1 equivale a 1 mV del registro de salida.

En la figura 2 se muestra el promedio de la actividad eléctrica del total de las raíces tónicas control de cada grupo, es decir: de las cadenas recién aisladas (Fig. 2 A), durante los días uno (Fig.2 B), tres (Fig. 2 C), cinco (Fig. 2 D) y siete (Fig. 2 E) de cultivo.

Es importante resaltar de la figura 2, que la actividad eléctrica de las estructuras evidentemente disminuye con el transcurrir de los días de cultivo, lo que expresa el deterioro general y progresivo de las funciones biológicas.

La figura 3, muestra la interrupción de la actividad eléctrica de las estructuras por la lesión aguda realizada mediante el machacamiento del conectivo nervioso y su progresiva restauración después de 1, 3, 5, y 7 días de cultivo.

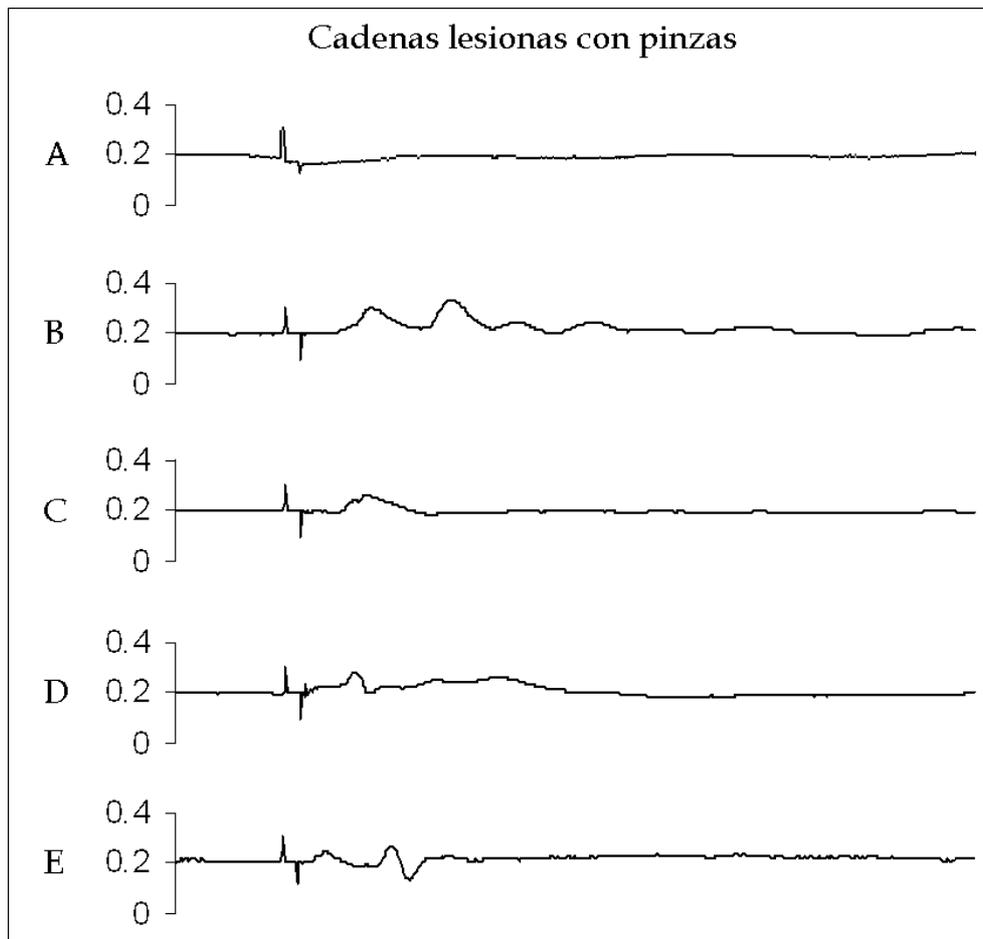


Fig. 3. Muestra los cambios en la actividad producida, en cada uno de los periodos de recuperación a una lesión aguda con pinzas (A). Cadenas con 1 (B), 3(C), 5 (D) y 7 (E) días de recuperación en condiciones de cultivo.

Como consecuencia de la lesión con pinzas o con hilo, la conducción de potenciales de acción a través del conectivo nervioso se interrumpe, por lo que resulta imposible registrar la propagación de potenciales de acción producidos por la estimulación eléctrica de la parte proximal de la lesión en las raíces tónico motoras distales al lugar de la lesión (compare las figuras 3A y 2A).

El conectivo nervioso se recupera rápidamente de una lesión ligera (lesión con pinzas), y en tan sólo un día de cultivo es posible observar nuevamente la conducción de potenciales de acción que terminan en sinapsis funcionales y producen la actividad de las motoneuronas de las terceras raíces motoras, como se puede observar en la figura 3 B. Por otro lado, cuando se realiza una lesión más severa (lesión con hilo), la recuperación de la conectividad es más lenta, como puede observarse en la figura 4 A

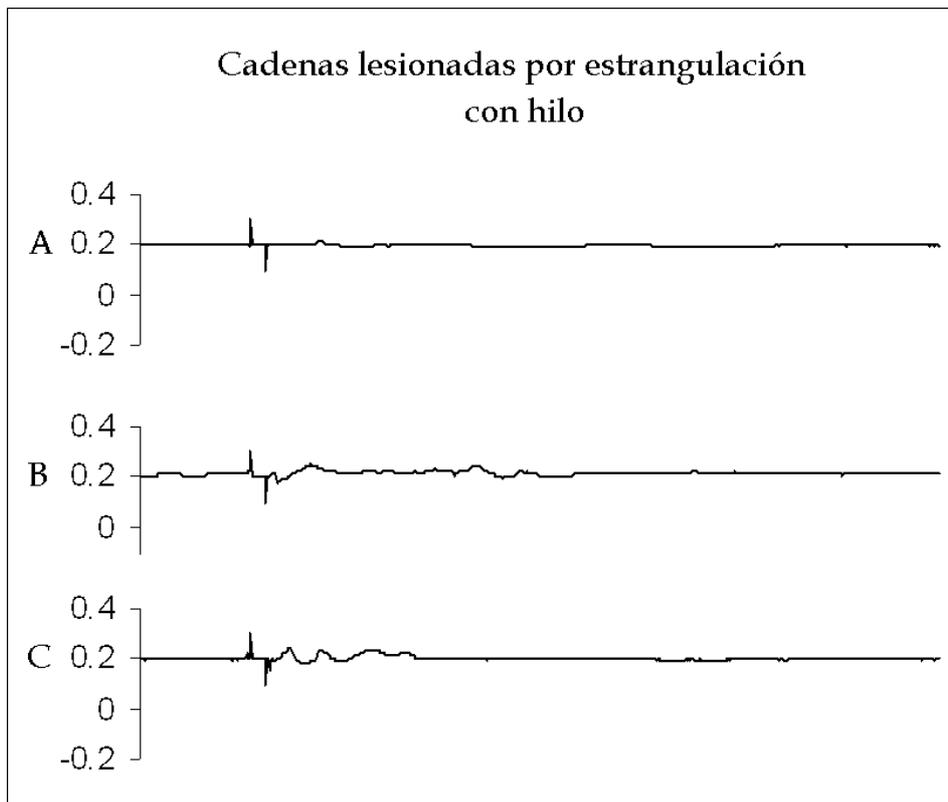


Fig. 4. Cambios en la actividad producida, en cadenas con 3(A), 5 (B) y 7 (C) días de recuperación en condiciones de cultivo a una lesión aguda con hilo. Las cadenas recién lesionadas y con un día de cultivo carecen de actividad y los registros son equivalentes al de la figura 3 A.

La figura 4 A muestra el promedio de la actividad de todo el grupo experimental lesionado con hilo y mantenido durante 3 días de cultivo. Se puede observar una diminuta actividad, que resulta de los pocos potenciales provocados. En lo que respecta a las cadenas recién lesionadas, tras un día de cultivo, la actividad fue completamente nula. En las figuras 4 B y 4 C se observa que en estas estructuras sólo se llevó a cabo una ligera recuperación de la conductividad nerviosa.

El efecto de enriquecer el medio de cultivo con NGF sobre la actividad producida, de las cadenas lesionadas con pinzas o con hilo, se muestra en las figuras 5 y 6.

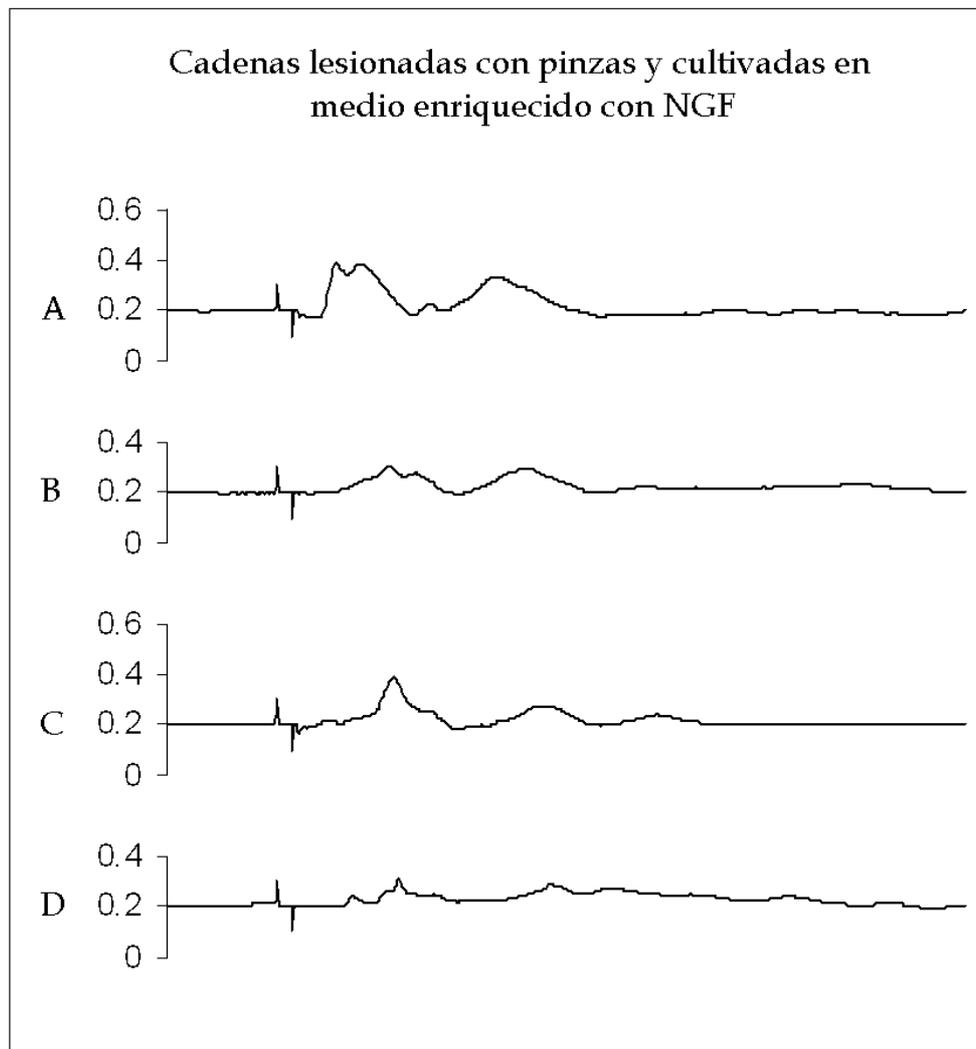


Fig. 5. Muestra los cambios en la actividad producida, en cada uno de los periodos de recuperación a una lesión aguda con pinzas de cadenas mantenidas en un medio de cultivo enriquecido con NGF. Cadenas con 1 (A), 3(B), 5(C) y 7(D) días de cultivo.

En la figura 5 se observa que el efecto del enriquecimiento del medio de cultivo en las cadenas lesionadas con pinzas fue una actividad superior a la observada en el grupo sin NGF, (Fig. 3).

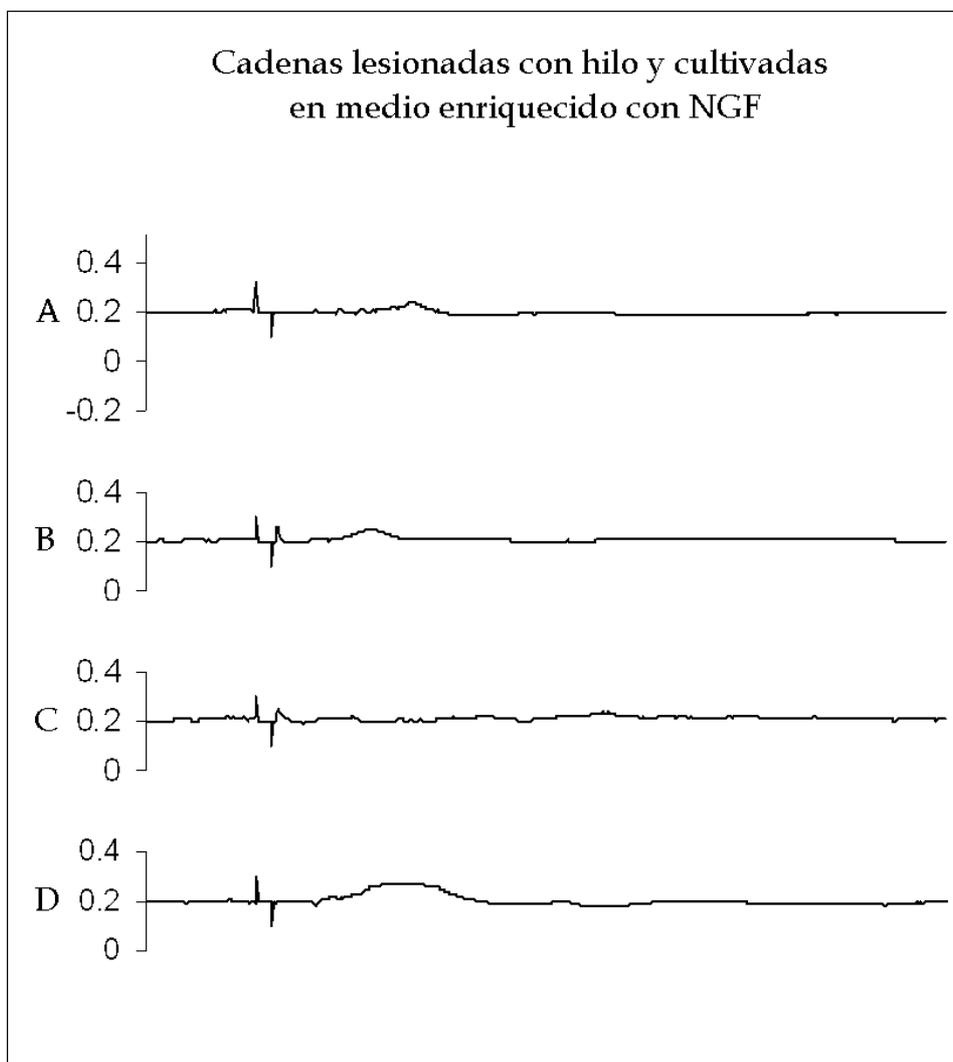


Fig. 6. Muestra los cambios en la actividad producida, en los periodos de 1 (A), 3(B), 5(C) y 7(D) días en recuperación de una lesión aguda con hilo en cadenas mantenidas en un medio de cultivo enriquecido con NGF.

Otro efecto producido al enriquecer el medio de cultivo con NGF sobre las cadenas lesionadas con hilo, fue un rápido restablecimiento de la comunicación, lo que se infiere de la obtención de una pequeña respuesta en el día uno posterior a la

lesión (Fig. 6 A). En contraste el grupo sin NGF tuvo la primera respuesta en el día tres post lesión (Fig. 4A). Se aprecia, sin embargo que las respuestas del grupo con NGF **no** son más robustas que las del grupo sin el mismo ya que carece de efecto en los días de cultivo restantes (3, 5, y 7, Fig. 6 B, C, D respectivamente).

Los resultados que se presentan en la figura 2 muestran que en los cultivos existe una reducción progresiva de la respuesta, que está vinculada al periodo de cultivo, esto complica determinar con exactitud el efecto que tiene la lesión o el NGF. Por esa razón decidimos analizar como el tiempo de cultivo afecta algunos parámetros de la respuesta eléctrica, como el número de espigas y área bajo la curva de las mismas. La finalidad de este análisis fue poder descontar el efecto que ejerce el tiempo de cultivo del efecto de la lesión y del enriquecimiento del medio de cultivo con NGF.

### Promedio del número de espigas

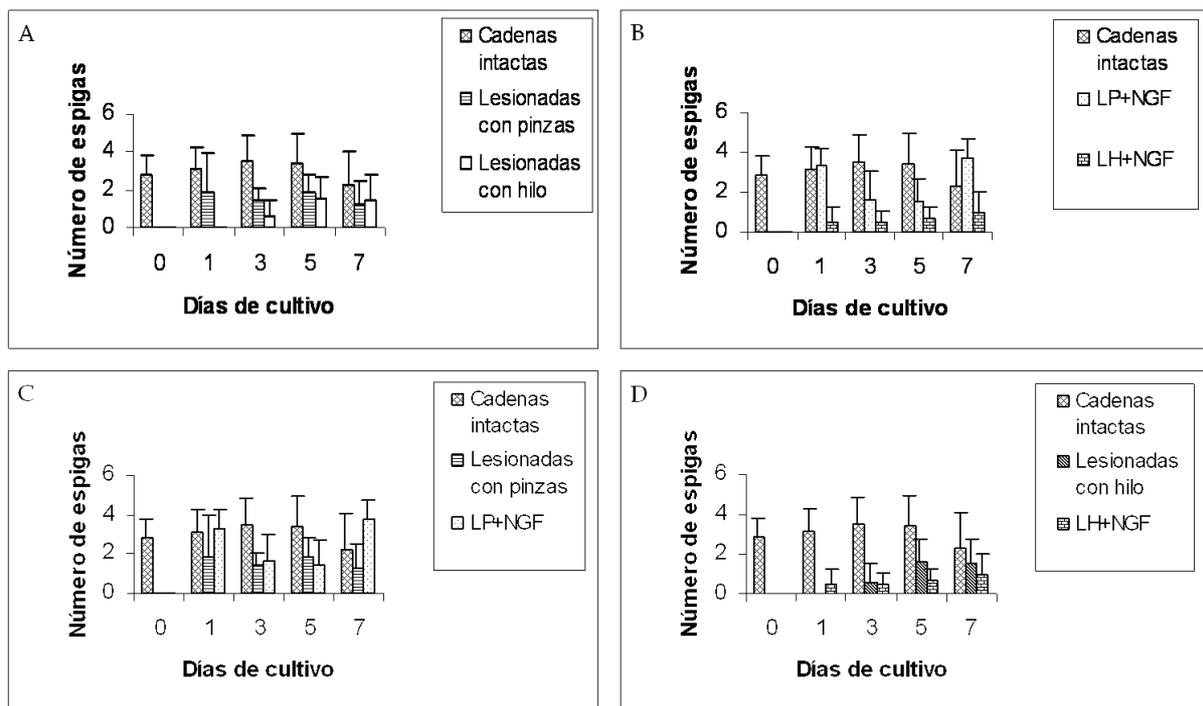


Fig. 7. Muestra el promedio del número de espigas en cada uno de los grupos control y experimentales con su respectiva desviación estándar. En la gráfica A se muestra el grupo control comparado con los grupos de lesión con pinzas (segundas barras iluminadas) e hilo (barras claras). En B se muestra el grupo control comparado contra los grupos lesionados en medio con NGF. En C y D, se compara el control con los grupos respectivos de lesión tratados o no con NGF. LH lesión con hilo, LP lesión con pinzas

En la figura 7 se compara el promedio del número de espigas de cada grupo experimental contra el control de cada periodo de cultivo. Algunos datos aparecen en más de una figura para facilitar la comparación. La tabla 1 del apéndice VI muestra el análisis estadístico de la distribución de “t” de Student empleada con el fin de determinar si las diferencias entre los grupos resultaron significativas (Wayne W. D. 1979).

La figura 7 A compara el número de espigas observadas en las cadenas control (0, 1, 3, 5 y 7 días de cultivo) con los dos grupos lesionados (pinzas o hilo). En el día 0, las cadenas recién lesionadas no presentan respuesta, a diferencia, de los controles. El número de espigas en los controles muestra diferencia significativa después de los 7 días de cultivo, con una reducción del 20% (p .05).

Se observó una reducción general en el número de espigas como consecuencia de las lesiones, esto puede apreciarse en la gráfica A de la Fig. 7. Aunque el análisis estadístico por pares (Ej. control día 1 vs., lesión día 1) no muestra diferencias significativas para el primer día entre la actividad control y la lesión con pinzas (ver apéndice VI tabla1), sin embargo, en un análisis global, es decir, comparando el grupo experimental con el grupo control, a través de todos los días que dura el experimento se encontró que es significativamente menor. La razón por la cual en el análisis presentado en la tabla 1 no muestra diferencia significativa es la enorme variabilidad de la respuesta.

El efecto de enriquecer al medio con NGF sobre las cadenas lesionadas con pinzas fue incrementar el número de espigas, bajo este criterio es imposible distinguir entre las cadenas lesionadas y el control en el día 5 e incluso resulta significativamente mayor el número de espigas en el grupo con NGF que en el control después de 7 días de cultivo. Por su parte, el efecto del NGF sobre las cadenas lesionadas con hilo fue disminuir el tiempo de recuperación a la lesión Fig. 7 D, pero resultó ser incapaz de incrementar el número de espigas en los días posteriores al primero.

La figura. 7 B, compara el efecto del NGF entre los dos grupos lesionados y el control, se observa que el grupo lesionado con pinzas presenta más espigas que el lesionado con hilo.

La figura. 7 C compara la actividad entre el grupo lesionado con pinzas, su par donde se administró NGF y el control. Se observa un incremento en el número de espigas como consecuencia del NGF.

El NGF mejoró la respuesta de las cadenas lesionadas de manera temprana como puede observarse en la figura 8. Dicha figura muestra el porcentaje de cadenas que fueron capaces de conducir algún potencial de acción a través del sitio de la lesión, resultado de dividir el número de cadenas que presentaron actividad producida entre el número de cadenas que sólo presentaron actividad tónico motora (vivas).

En la figura 8 A, se puede observar que el 100% de las cadenas intactas que presentaron actividad espontánea, también presentaron actividad producida durante todos los días de cultivo, por su parte en las lesionadas con pinzas se pudo observar que más 50% de las cadenas con actividad tónico motora condujeron potenciales de acción después de un día de cultivo y el 100% de las cadenas respondieron a partir del día 3 de cultivo hasta el último día. Por otro lado, en esa misma figura se muestra que la totalidad de las cadenas lesionadas con pinzas a las que se les agregó NGF presentaron actividad eléctrica producida desde el primer día de cultivo.

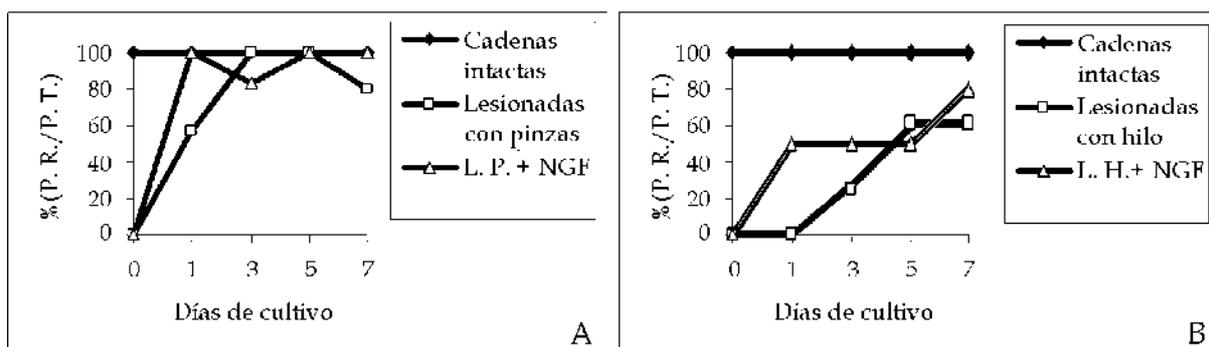


Fig. 8. Muestra el porcentaje de cadenas con respuesta a la estimulación eléctrica después de 0, 1, 3, 5 y 7 días de cultivo. Con o sin lesión y lesionadas más NGF. L. H. Lesionadas con hilo L. P. Lesionadas con pinzas P. R. Preparaciones con respuesta. P. T. Preparaciones totales con actividad tónico motora.

En la figura 8 B, se puede observar que el 20% de las cadenas lesionadas con hilo presentaron actividad eléctrica producida hasta después de tres días de cultivo y se observa el máximo de recuperación a partir del día 5, en aproximadamente el 60% de las cadenas. Por otro lado, el 50% de las cadenas mantenidas en medio enriquecido con NGF, mostraron actividad eléctrica provocada desde el primer día de cultivo, permaneciendo constante este valor hasta el día 5. En el día 7 se presentó un incremento en este porcentaje elevándose hasta 80%.

La figura 9 muestra el promedio del área de los potenciales de acción de cada grupo en los diferentes periodos de cultivo. Para ello se evaluó el área de las espigas en cada trazo y se promedió con los de su grupo. Se representan en unidades arbitrarias (aunque estrictamente son voltaje por duración) y en forma normalizada que resulta de dividir el área de cada grupo entre el área del grupo control respectivo (0, 1, 3, 5, 7 días de cultivo).

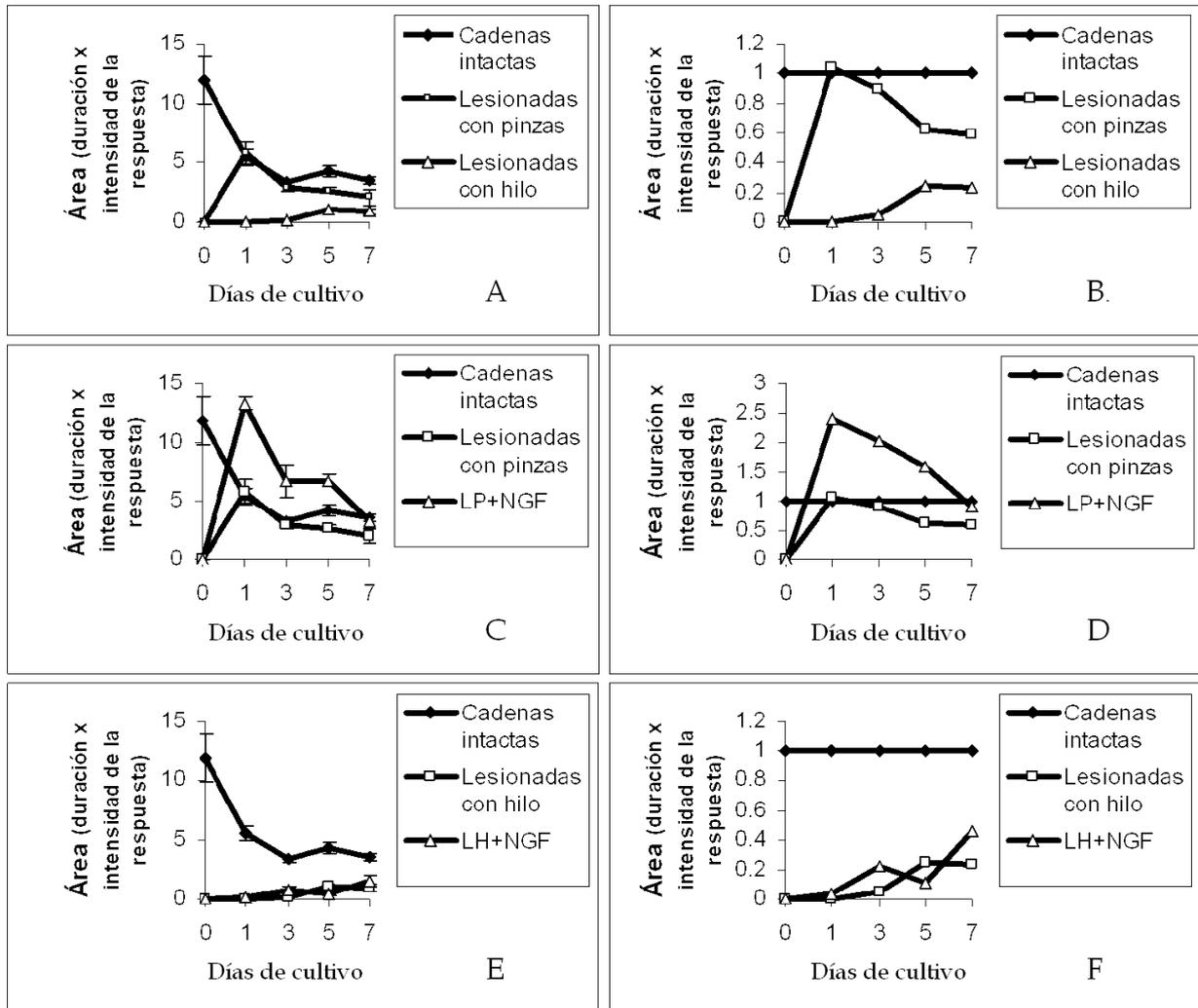


Fig. 9. Se muestra el área bajo la curva de los trazos de los potenciales de acción provocados de cada uno de los grupos (A, C, E) y los datos normalizados para facilitar su comparación (B, D, F).

El grupo de lesión con pinzas presentó una rápida recuperación, sin embargo fue incapaz de mantener una respuesta robusta después de tres días de cultivo (Fig. 9 A y B), también resultó sorprendente que el NGF incrementara hasta 2.5 veces el área de los potenciales de acción de las cadenas lesionadas con pinzas con respecto al control (Fig. 9 C y D). Sin embargo, en lesiones severas el efecto del NGF fue realmente notorio hasta el final del periodo de cultivo, resultando superior al de su contraparte sin NGF en casi 100%, no obstante, aunque así lo sugiera el resultado, debido a la dispersión de los datos, las diferencias apenas resultaron significativas;

también es posible observar en la figura 9 E y D, que las tendencias de recuperación son relativamente parecidas y siempre están muy por debajo de las cadenas control.

## Efecto agudo de la aplicación de NGF sobre cadenas intactas

En la figura 10 se muestra el efecto de la aplicación de NGF, sobre la actividad eléctrica provocada y espontánea de una cadena ganglionar recién obtenida, después de tres dosis acumulativas de NGF. El registro tiene una duración de dos minutos. El artefacto que se produce entre el segundo 40 y 50 se observa como consecuencia de la aplicación del NGF.

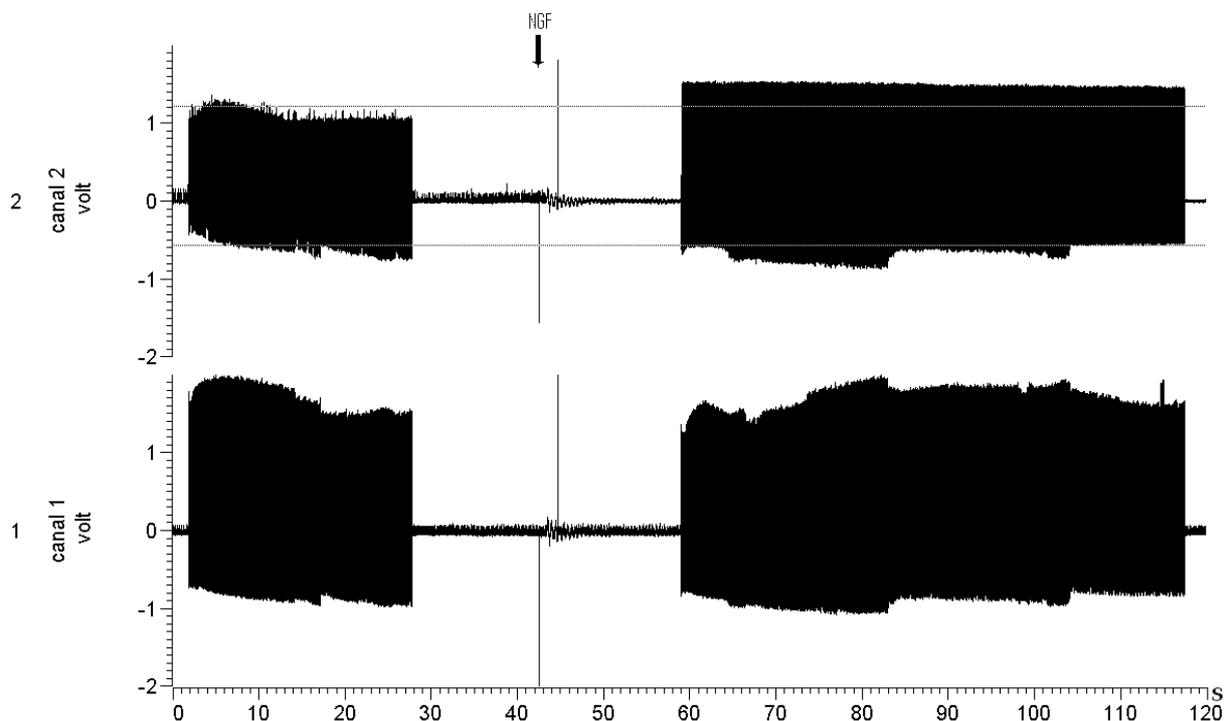


Fig.10. Registro simultáneo de las dos raíces tónico motoras entre los ganglios 3 y 4 de la cadena ganglionar abdominal del acocil. Los trazos grandes corresponden a los periodos en los que se estimuló eléctricamente la cadena ganglionar entre el segundo y el tercer ganglios abdominales mientras que los trazos comprendidos entre los segundos 30 y 60 corresponden a actividad eléctrica espontánea. Las ondas de gran tamaño que se observan entre los segundos 40 y 50 del registro corresponden al periodo en que se aplicó la cuarta dosis de NGF. Estos registros fueron obtenidos con electrodos de succión y los datos fueron capturados y analizados con el sistema Spike 4.

Es importante hacer notar que después de la aplicación de NGF, la actividad espontánea en la raíz tónico motora (RTM) que se registra en el canal 2 se ve notablemente deprimida, mientras que la actividad espontánea del canal 1 se ve poco afectada y muestra incluso un pequeño incremento a los pocos segundos. Esto se

observa más claramente al disminuir la escala de tiempo del registro de la figura 10 como lo muestra la figura 11. En ella se detecta una serie de ondas correspondientes al artefacto generado por la aplicación del NGF. Previo a las ondas de baja frecuencia, se puede observar una onda negativa rápida en ambos canales, la cuál coincide con el momento de contacto de la punta de la micropipeta con el medio. La actividad en la raíz del canal 2 cesa prácticamente al contacto con la solución de NGF, mientras que la del canal 1 permanece casi inalterada. Como consecuencia del cambio en el patrón que se venía observando en el registro, se inspeccionó visualmente si el micro electrodo se encontraba succionando el tejido en su posición original, sin detectar cambio alguno, y se corroboró que el tejido estuviera bien unido a la punta del electrodo de registro. Se continuó con el protocolo de estimulación y se pudo observar que la actividad producida no desaparece (Fig. 15).

Las figuras siguientes ilustran con mayor detalle el fenómeno. En la figura 12 se muestra un trazo de la actividad espontánea varios milisegundos después de introducir la punta de la micropipeta. Se observa con mayor claridad una onda negativa que coincide con el momento de contacto de la punta de la micropipeta con el medio, en seguida se observan ondas de baja frecuencia que coinciden con la liberación del NGF al medio y la desaparición en el canal 2 de las ondas de alta frecuencia que corresponden a la actividad eléctrica espontánea, pero esto último no ocurre en el canal 1.

La figura 5 muestra que la actividad espontánea en el canal 2 desapareció completamente, incluso antes de la salida de la punta de la micropipeta (deflexión rápida y positiva antes del segundo 44.75). En el canal 1 se registro la actividad espontánea sin cambios aparentes.

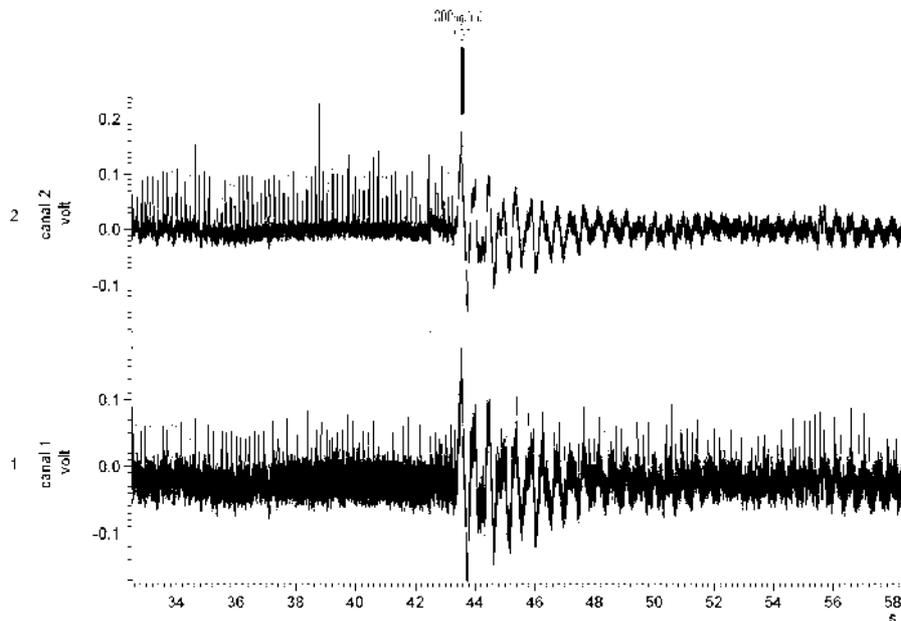


Fig. 11. En esta figura se muestra un segmento temporal entre los segundos 33 y 59 de la figura 18. La finalidad fue mostrar la modificación diferencial de la actividad espontánea en las dos raíces tónico motoras. Con una flecha se señala el momento en el que se aplica el NGF. Observe que la actividad espontánea en la raíz del canal 2 desaparece mientras que en la del canal 1 se mantiene. Las ondas de baja frecuencia corresponden al artefacto eléctrico producido al introducir la punta de la micropipeta y el NGF al medio de registro. La dosis señalada es la acumulativa. Nota señal amplificada 5000.

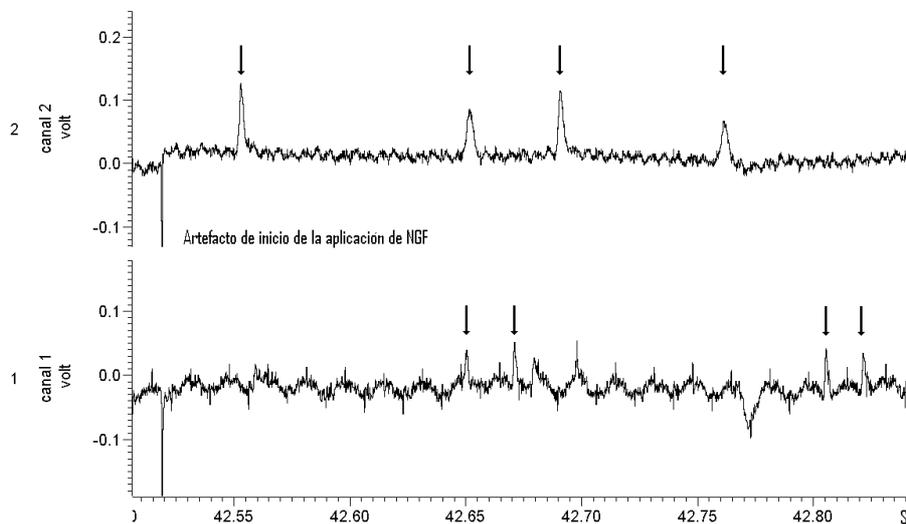


Fig.12. Se muestra el momento de introducción de la pipeta para la aplicación de NGF. Las flechas señalan la actividad espontánea. En el canal 1 se observa ondas de ruido eléctrico de 60Hz claramente distinguibles de la actividad espontánea. La deflexión negativa corresponde al contacto de la punta de la micropipeta con el medio.

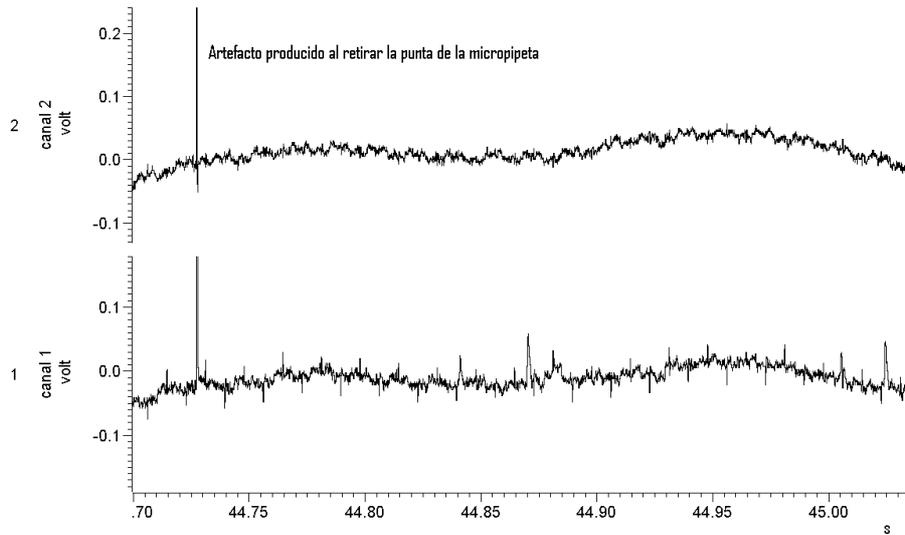


Fig. 13. Muestra el cambio en la actividad eléctrica espontánea tras la aplicación de NGF. Observe que la actividad espontánea en el canal 1 persiste mientras que la raíz registrada en el canal 2 está silente

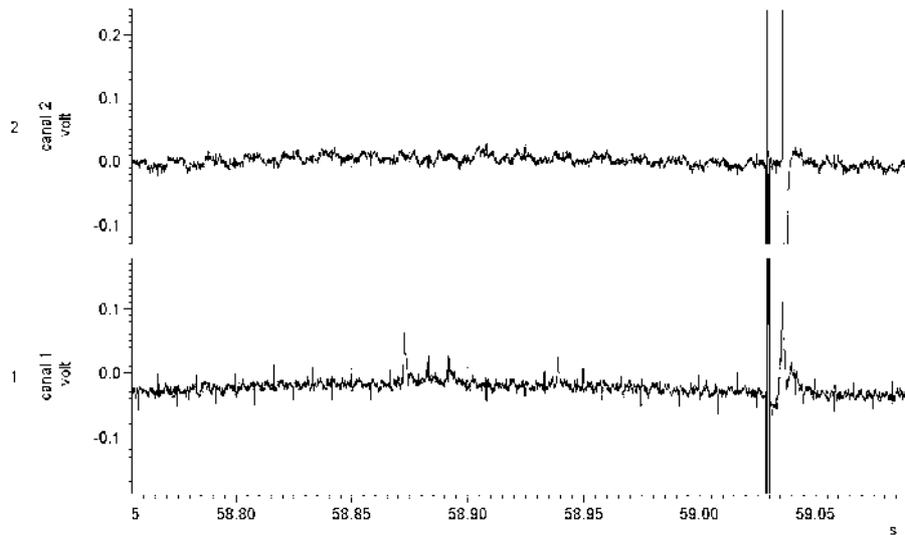


Figura 14.- En esta figura se muestra el fin del registro de la actividad espontánea y el inicio de la actividad producida. Observe que en ambos canales existe respuesta provocada, y que la actividad espontánea se encuentra completamente silente en el canal 2 mientras que persiste en el canal 1.

La persistencia de actividad producida (evocada) en el canal 2 es una prueba de que el electrodo permaneció en su lugar y con la misma calidad de succión, esto se ilustra en la figura 14.

En las figuras 15 y 16 se muestra la actividad producida previa y posteriormente a la aplicación de NGF.

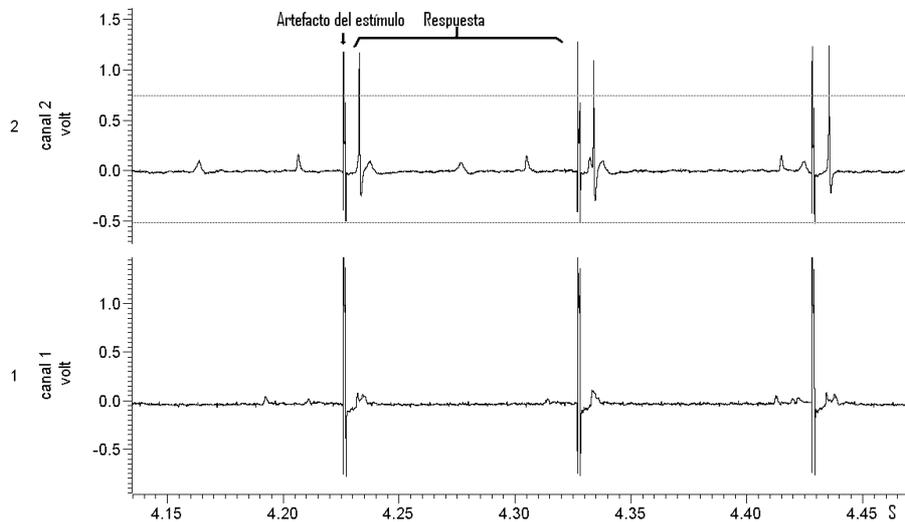


Fig. 15. Actividad producida al estimular la cadena ganglionar ventral entre el segundo y tercer ganglios abdominales previo a la aplicación de la 4ta dosis acumulativa de NGF (en cada dosis se aplicaban aproximadamente 75ng/ml de medio).El estímulo aplicado (7V, 1ms) paso por una unidad de aislamiento para voltaje (x1) conectada a un electrodo de estimulación bipolar de platino (con micro puntas separadas por 1mm aprox.).

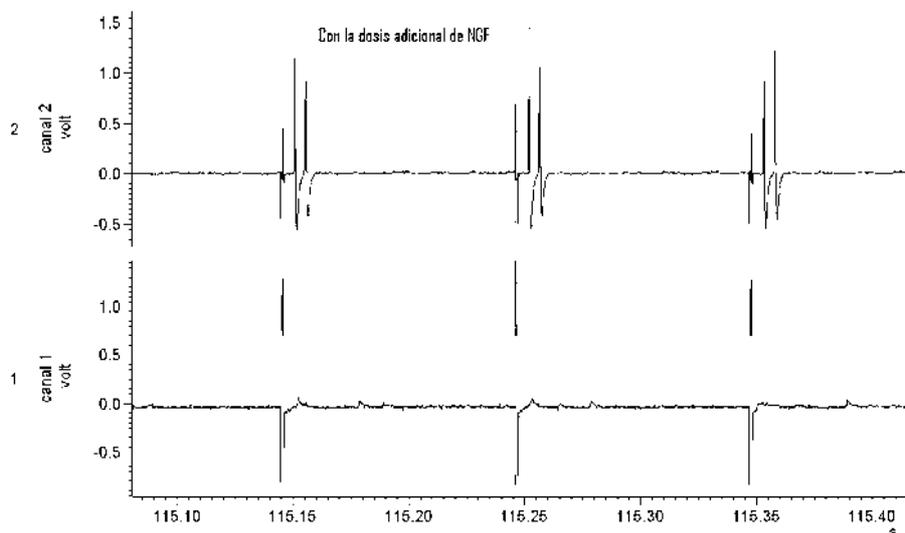


Fig. 16. Muestra el mismo tipo de actividad que en la figura 15, después de unos segundos de aplicada la dosis de NGF. Note en el canal 1 aparición de espigas "tardías", y una disminución del primer componente, mientras que en el canal dos desaparecen las espigas "tardías" y aparecen componentes rápidos parecidos al inicio de una ráfaga de actividad.

La actividad provocada se vio afectada de manera diferencial, como se observa en la figura 15. La raíz registrada en el canal 1 muestra una espiga única con una latencia de 5ms aproximadamente la cuál disminuye tras la aplicación de NGF y aparecen espigas de latencias mayores a los 20ms (Fig.16). A diferencia de lo anterior la raíz registrada en el canal 2 presenta en un inicio espigas con latencias superiores a los 20ms, e igual que la del canal 1 una espiga principal con una latencia aproximada de 5ms. Al agregar NGF las espigas de latencia superior a 20ms desaparecen y en su lugar aparece una nueva espiga con una latencia aproximada de 12ms, mientras que la espiga de 5ms se incrementa. En las figuras 17 y 18 se muestra el promedio de la actividad producida antes y después de la aplicación del NGF, para cada uno de los canales respectivamente.

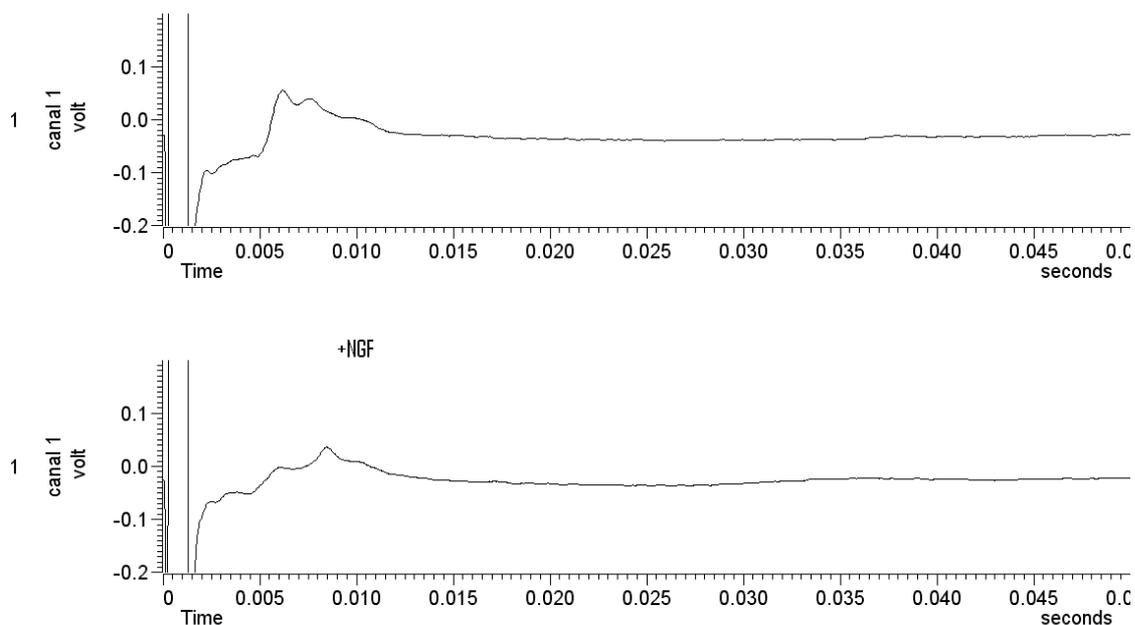


Fig. 17 Muestra el promedio de la actividad producida antes y después de la aplicación de NGF en el canal 1. Se destaca la disminución en la amplitud de la primera espiga (con latencia de 6ms) mientras que aparece una nueva espiga con una latencia de aproximadamente 8.5ms. Por otro lado, se observa que al promediar la actividad desaparecen las espigas con latencia superior a los 20ms.

En ambas figuras (17 y 18), desaparecen los componentes con latencia superior a los 15ms, lo que se debe a la inconsistencia de su periodo de latencia. Las causas por las cuales se presenta esta inconsistencia no las conocemos aunque es posible que

corresponda a la activación alternativa de diversos circuitos neuronales. Por otro lado, se hace claro el contraste del efecto del NGF en el registro simultáneo de cada una de las raíces, ya que mientras en la raíz del canal 1 se abate la amplitud del primer componente (Fig. 17), en la del canal 2 se incrementa. Sin embargo parecen compartir la aparición de nuevas espigas con un periodo de latencia mayor. El posible significado funcional de esto será discutido más adelante, pero en principio sugiere que la actividad presináptica se vio afectada.

Los registros que se muestran en las figuras 1 a 6 fueron realizados mediante electrodos de gancho de platino e iridio, mientras que, los registros de las figuras 10 a 18 fueron obtenidos con electrodos de succión.

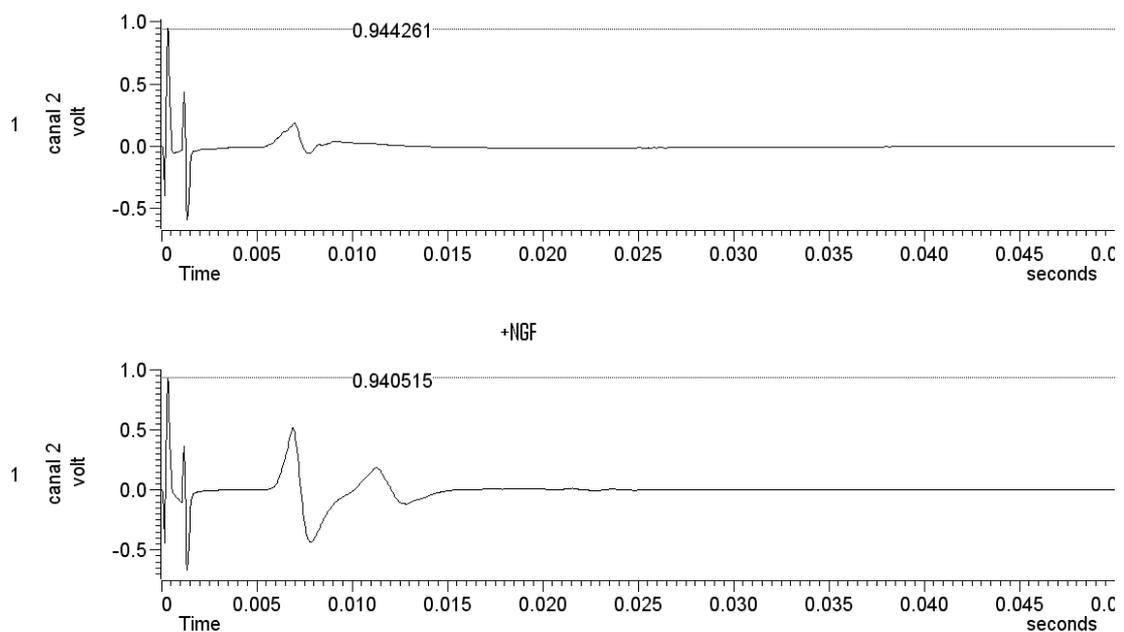


Fig. 18. Muestra el promedio de la actividad eléctrica producida antes y después de la aplicación de NGF en el canal 2. Se destaca el gran incremento en la amplitud de la primera espiga con latencia aproximada de 7ms y la aparición de una segunda espiga con una latencia aproximada de 12ms.

## Observaciones Histológicas

Con objeto de tener una aproximación objetiva de la magnitud del daño producido por cada caso y el grado de recuperación a nivel estructural, decidimos realizar el estudio histológico de cadenas lesionadas, en circunstancias equivalentes a las realizadas en el estudio electrofisiológico. Para lograrlo, se realizaron cortes longitudinales en serie en cadenas no lesionadas, recién lesionadas con pinzas o con hilo, y los diferentes tiempos de recuperación. Cortes histológicos realizados en parafina de entre 10 y 20 $\mu$ m, fueron teñidos con la técnica tricrómica de Masson para su análisis, mostraron los siguientes resultados:

La lesión con pinzas produjo la separación de tejido conectivo nervioso en su totalidad. Sin embargo, la vaina quedó íntegra. El segmento rostral a la lesión mostró la formación de un cono, que fue resultado de la orientación y la forma de pinzado (Fig. 19 B). La separación producida entre los muñones resultó con un mínimo de 75 $\mu$ m y un máximo de 1.4mm en las regiones más distantes.

Por otro lado, al igual que en el control (Fig. 19 A), en las cadenas recién lesionadas no se observa ningún movimiento de células de la microglía o glía adaxonal (Fig. 19 B), cuyos núcleos se encuentran fuertemente teñidos y es posible observarlos como puntos negros de aproximadamente 5 $\mu$ m a 8 $\mu$ m, alineados longitudinalmente en "filas", dicho arreglo se interrumpe, pero no se pierde, con la lesión.

Después de un día de cultivo tras la lesión con pinzas, en la figura 19 C, se puede observar el avance de nuevas neuritas que invaden el espacio libre entre los dos muñones y que atraviesan el sitio de la lesión, aparecen como filamentos teñidos de rosa pálido acompañados de núcleos ovoides teñidos en negro, mismos que pertenecen a la glía adaxonal (González del Pliego y col. 1998), que se encuentra estrechamente asociada a las nuevas ramificaciones.

Después de tres días de cultivo tras la lesión con pinzas, se puede observar que la glía adaxonal se ha concentrado en la región lesionada, aparentemente en mayor cantidad en la región anterior y que las fibras nerviosas han cruzado por completo el

sitio de la lesión, sin embargo existen libres espacios remanentes (19 D). Al cabo de 5 días de cultivo es posible observar claramente restos de tejido necrótico en forma de restos tisulares pigmentados en negro y disociados del resto del tejido (figura 19 E). Por otro lado, el espacio libre entre los muñones se encuentra más reducido que en su contraparte de 3 días y se observa que la glía adaxonal empieza a ordenarse forma de hileras asociada al tejido nervioso de manera parecida a la del control (19 A).

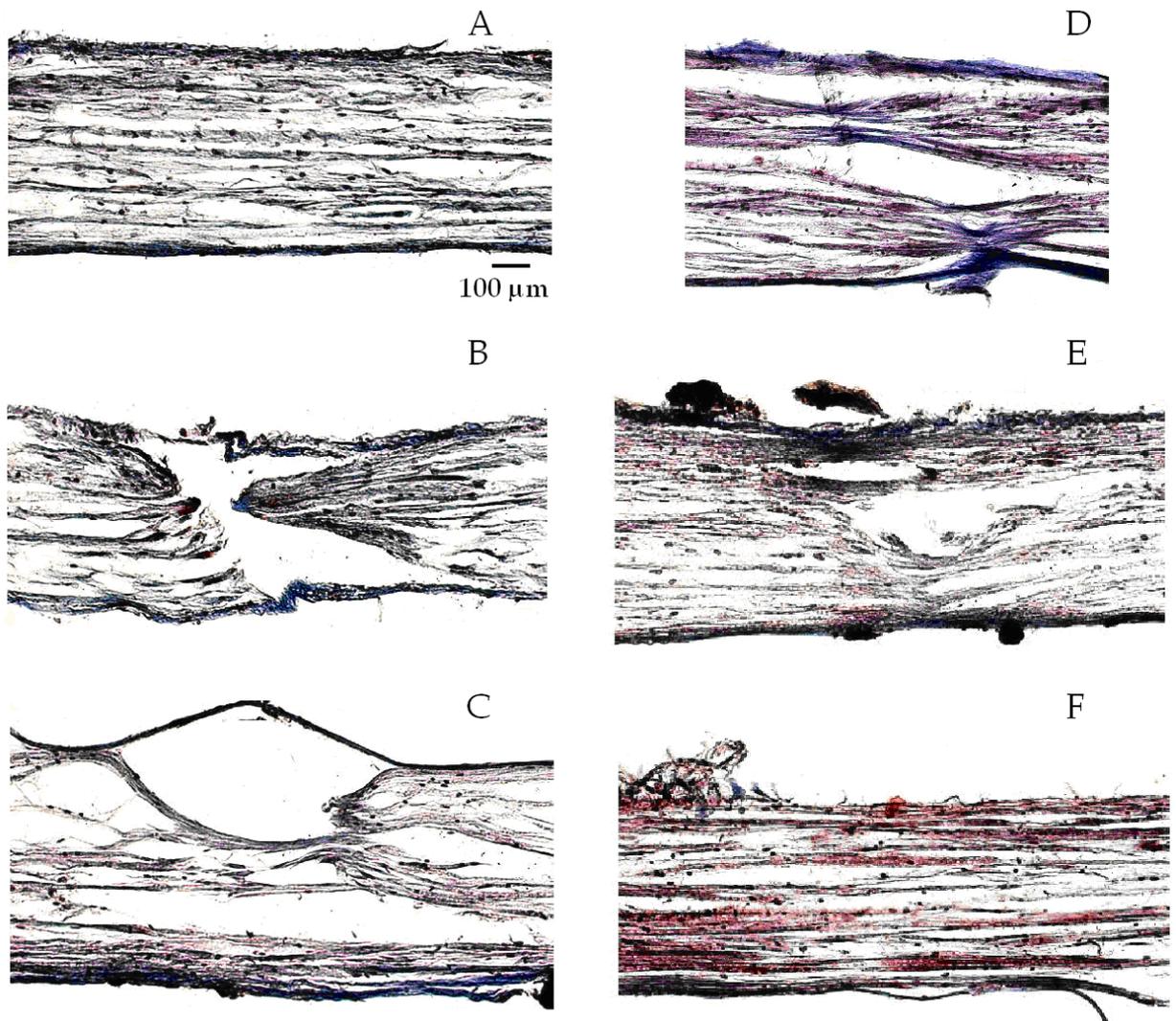


Fig. 19. Se muestra los cambios estructurales y su evolución después de una lesión aguda con pinzas. A control, B recién lesionada; C, D, E, F: 1, 3, 5 y 7 días de cultivo respectivamente. Ver el texto para su explicación.

Al cabo de 7 días después de la lesión con pinzas (figura 19F), se observa un arreglo histológico muy parecido al control, aunque persisten restos tisulares necróticos y desorganización de la vaina que envuelve la cadena ganglionar.

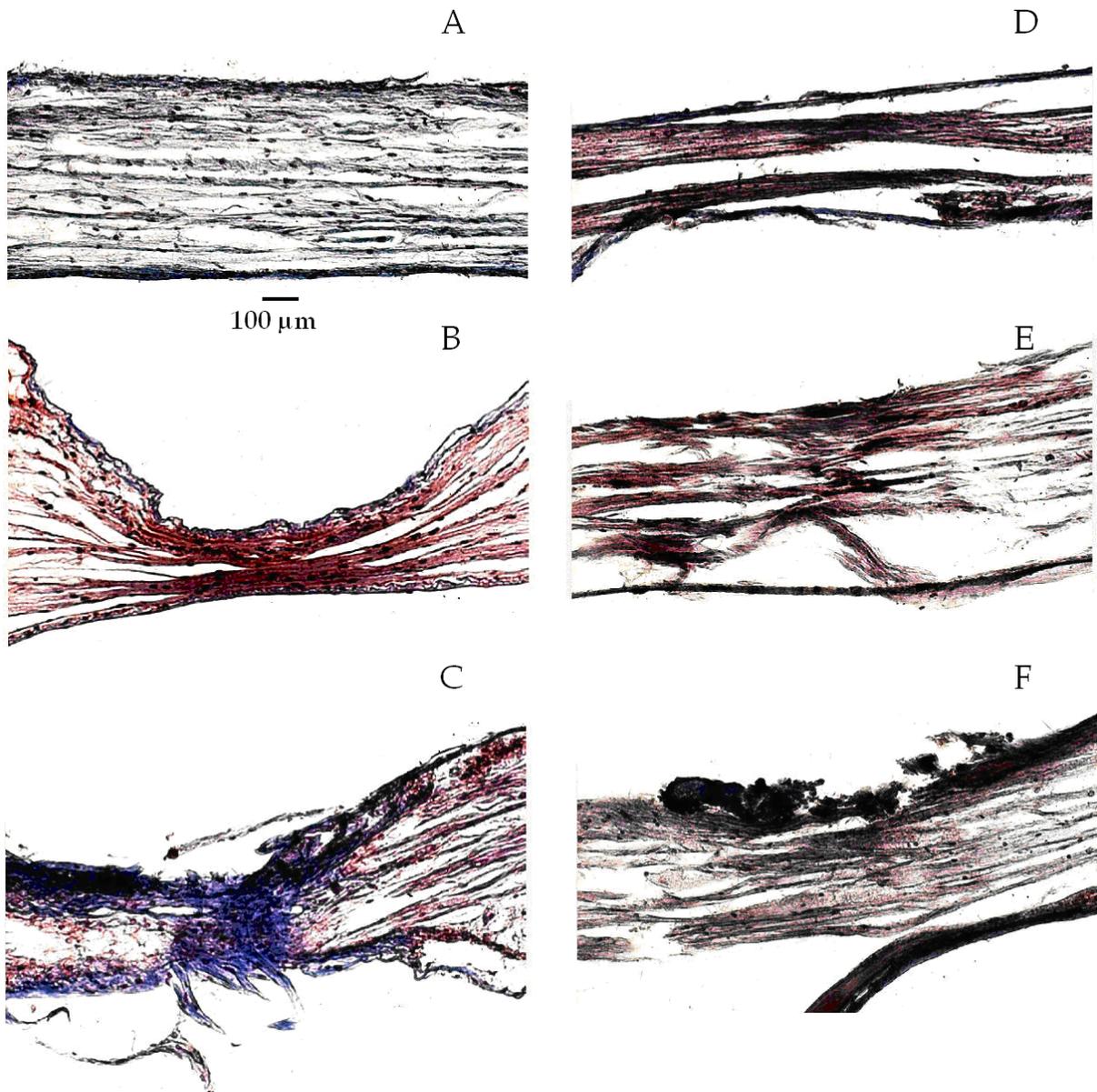


Fig. 20. Micrografías de cadenas lesionadas con hilo. A control, B recién lesionada; C, D, E, F: 1, 3, 5 y 7 días de cultivo respectivamente. Ver el texto para su explicación.

Por otro lado, la lesión con hilo (Fig. 20), produjo un fuerte aplastamiento de las fibras del conectivo nervioso, sin que necesariamente hubiera una separación inicial del tejido. La lesión principal se extendió alrededor de 400µm, pero se observa daño estructural hasta cerca de 800µm, lo que es menor longitudinalmente que la lesión con pinzas. El aplastamiento produjo, posteriormente, la retracción del tejido y su separación, por lo que después de un día de cultivo (Fig. 20 C), se observa una separación entre los muñones de aproximadamente 300 µm. También es posible observar la presencia de necrosis, la compactación de la vaina, una fuerte desorganización general, la presencia de numerosas células de la microglía en el sitio de la lesión y una asimetría entre las regiones rostral y caudal a la lesión, es decir, que mientras en una se conservan las neuritas, en la otra (región caudal a la lesión) la desorganización es completa.

Después de tres días de cultivo, se observa una descompresión de la región lesionada, aunque persiste una importante reducción del ancho de la cadena lesionada comparada con el control (del orden de un 40%). Esta descompresión genera espacios libres por donde pueden crecer nuevos procesos neuríticos. Es posible observar también tejido neurítico que atraviesan el sitio de la lesión aunque suele quedar enmascarado por la fuerte tinción que produce el tejido necrótico.

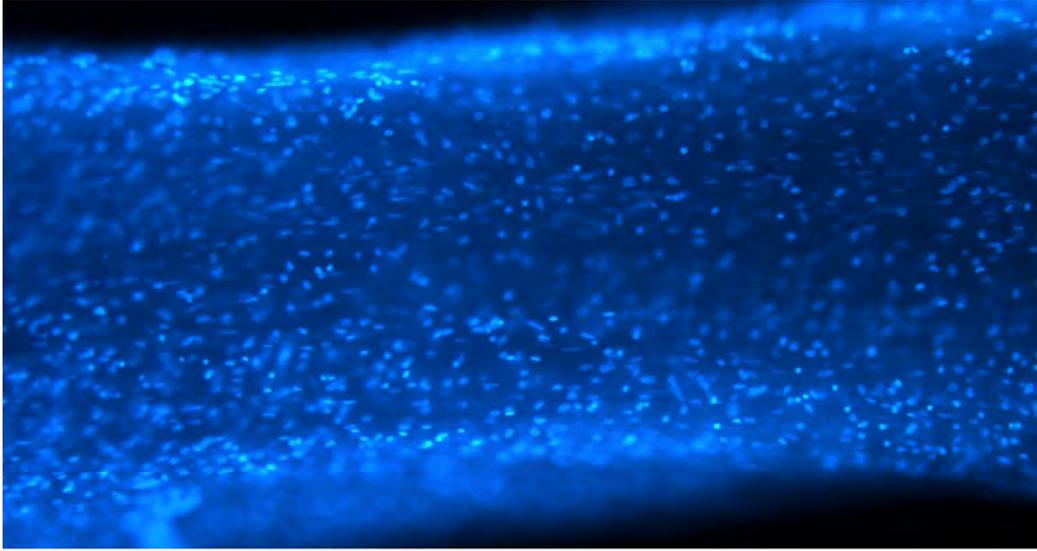
Después de 5 días de cultivo, (figura 20 E) el tejido se ha descompactado casi por completo. Se puede observar que el espacio generado por la lesión es invadido por nuevos procesos neuríticos y que la glía adaxonal empieza a mostrar su distribución característica. Todo ello se acentúa aun más después de 7 días, (figura 20 F) lo que no significa, sin embargo que la apariencia del tejido sea normal.

La figura 21 muestra la distribución de las células de la glía adaxonal antes y después de lesionar la cadena ganglionar por aplastamiento con pinzas. Se puede observar que antes de la lesión la distribución es homogénea pero relativamente ordenada. Poco después de la lesión, (1 hora), se puede observar que se ha generado una discontinuidad en el tejido nervioso que es equivalente a la observada en la figura 19 B (recién lesionada)

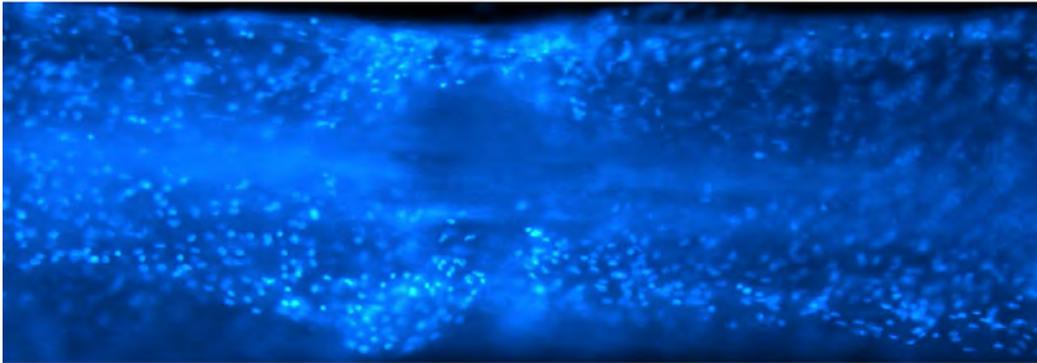
En la preparación recién lesionada la microglía es desplazada mecánicamente del sitio de lesión hacia los costados, lo que deja a la lesión prácticamente libre de estas células. Hay también homogeneidad en cuanto a la distribución de las células en las regiones rostral y caudal.

Al cabo de un día de cultivo, se observa sobre todo en la región rostral, que algunas células de la microglía han penetrado en la lesión, (lo que apoya lo observado por González del Pliego y col. 1998) y sus núcleos se ven apiñados en los bordes de la lesión y el área circundante.

A



B



C

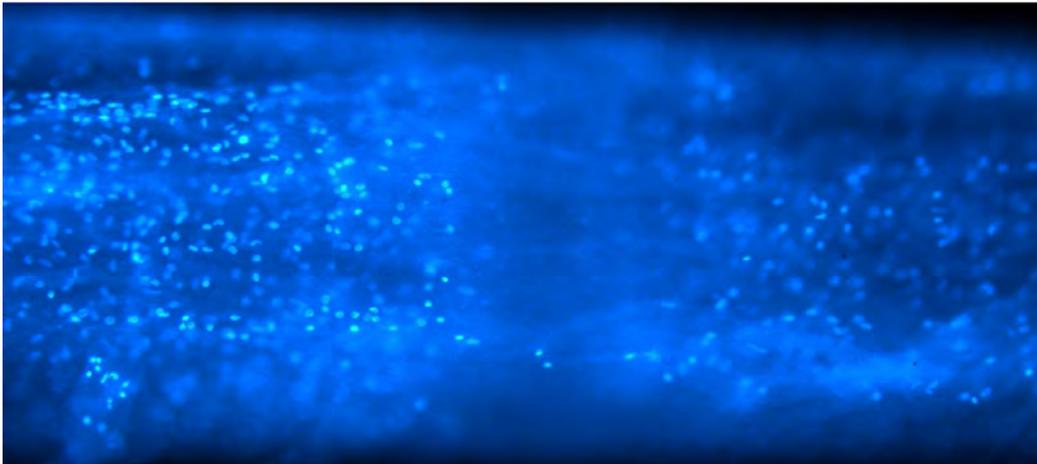


Fig.21. Cadenas teñidas mediante la técnica de Hoechst, recién obtenida A, recién lesionada B y un día de cultivo C. Los puntos brillantes corresponden a núcleos de la microglía. Región ventral. 10X

## DetECCIÓN DEL TRK A

En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos de los experimentos de inmuno detección de TRK A. Se pueden observar diferentes bandas inmunorreactivas, de las cuales la de 140KDa corresponde a la posible presencia de TRK A. En los carriles 1 y 2 se muestran los controles para falsos positivos; en los cuales se omitió la incubación con el primer anticuerpo; en los carriles 3 y 4 se muestran las pruebas positivas. Cada uno de los carriles corresponde a la corrida electroforética de las siguientes muestras:

Carril	Alícuota corrida
1	Inmunoprecipitado de la cadena ganglionar del acocil sin el primer anticuerpo
2	Homogeneizado de cerebro de rata sin primer anticuerpo
3	Homogeneizado de cerebro de rata con anticuerpo anti TRK A
4	Inmunoprecipitado de la cadena ganglionar del acocil con anticuerpo anti TRK A

Las bandas presentes en el carril uno corresponden a los restos de los anticuerpos empleados para la inmunoprecipitación, mientras que el carril dos esta libre de cualquier banda ya que el cerebro de rata neonata tiene concentraciones suficientes de TRK A que hacen innecesario inmunoprecipitarlo. El carril tres muestra una única banda muy intensa que corresponde a la presencia de TRK A. En el carril cuatro se observan 4 bandas, la de mayor peso molecular es equivalente a la del control positivo y podemos estar razonablemente seguros de que se trata de TRK A. Las bandas de bajo peso molecular presentes en el carril cuatro corresponden a los restos de inmunoglobulinas. Por otro lado, existen otras tres bandas de peso molecular superior a 50KDa, de las cuales las dos mayores podrían corresponder a isoformas del

receptor. Debe añadirse que en la literatura no se encuentra reporte alguno sobre ellas. La más pequeña podría ser una fracción del receptor original que podría haberse producido como consecuencia de las condiciones desnaturalizantes del procedimiento, sin embargo, tampoco se puede descartar que trate, al igual que las anteriores, de una isoforma del receptor.

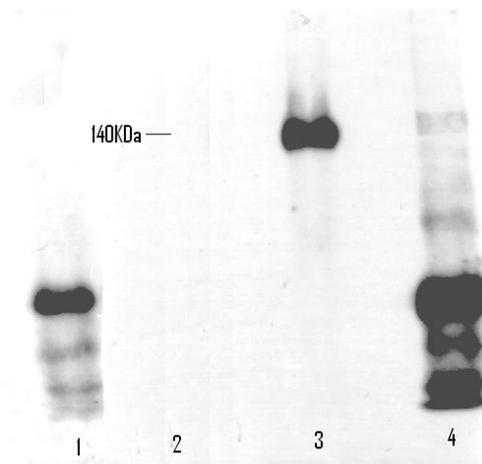


Figura 22.- En el carril 1, se muestra un control para falsos positivos, en el cuál se corrió el inmuno precipitado de acocil sin agregar el anticuerpo anti TRK A; en el carril 2 se muestra un control para falsos positivos en el que se corrió el homogeneizado del cerebro de una rata neonata (CNR) sin el anticuerpo anti TRK A; en el carril 3 se muestra el control positivo para TRK A en el que se corrió el homogeneizado del CNR con el anticuerpo anti NGF; en el carril 4 se corrió el inmunoprecipitado de acocil. Obsérvese en este último la presencia de una banda de 140Kda correspondiente al reconocimiento de TRK A y 3 bandas de inferior peso molecular, las que podrían corresponder isoformas del receptor no reportadas en la literatura

# DISCUSIÓN

## **Evolución de la recuperación y efecto del NGF en las condiciones de cultivo de tejidos**

Una consecuencia de mantener las cadenas ganglionares en condiciones *in vitro* es la disminución de las actividades espontánea y provocada, se puede atribuir a que con el pasar de los días la preparación se deteriora, según se muestra en la figura 2.

Los resultados obtenidos de los cultivos de órganos demuestran que la cadena ganglionar sobrevive y se recupera a una lesión, a través del crecimiento de procesos neuríticos que atraviesan el sitio de la lesión que se reconectan mediante sinapsis funcionales. Dicho de otra forma, las fibras lesionadas muestran regeneración. La cinética de recuperación es muy superior a la que se reporta en otros trabajos, en los que la lesión se realizó en animales, a los que se les permitió sobrevivir hasta 90 días (Bittner y col. 1974, González del Pliego y col. 1998). Las diferencias más notables entre las situaciones de un animal lesionado y las de los cultivos de órganos son que, en estos se mantienen las siguientes condiciones: absoluta inmovilidad, presencia de factores tróficos contenidos en el suero fetal bovino, libre paso para las neuritas a través del sitio de lesión, condiciones ambientales constantes enriquecidas con oxígeno en altas concentraciones, uso de antibióticos y, en su caso, de factor de crecimiento nervioso (NGF). Se señala al libre paso de las neuritas a través del sitio de lesión, porque cuando se lesiona la cadena ganglionar en un animal, se llevan a cabo reacciones tempranas que se pueden extender hasta por meses, como por ejemplo la hemorragia, la formación de coágulos, tanto en la lesión como en su periferia, la transformación de los coágulos en tejido fibroso al cabo de un par de días y que permanece por varios meses, la deformación del exoesqueleto el cuál se cierra con dificultad, y suele presentar bordes engrosados, las infecciones e incluso la necrosis del tejido. Este conjunto de factores son una barrera física sumamente importante que podría impedir el que las fibras nerviosas que inician su crecimiento atraviesen el área

lesionada. En condiciones de cultivo de tejidos todos estos inconvenientes se ven eliminados.

En lo que respecta a la reproducibilidad de los resultados, que se muestran, se puede afirmar que es viable debido a los siguientes motivos: 1) La lesión con pinzas se realizó con una pinza recta estándar (No. 5), la cual se cerró con firmeza por tres segundos, evitando con ello cambios importantes en la fuerza aplicada que pudiera romper la cadena. Posibles ajustes, de la fuerza requerida se detectarán con el registro electrofisiológico que se lleva a cabo inmediatamente después de la lesión. 2) Las lesiones con hilo se realizaron siempre con el mismo tipo de seda quirúrgica de cinco ceros, La fuerza que se aplica nunca será tan grande que rompa la vaina.

Por otra parte la pérdida de la conductividad de potenciales de acción en el 100% de las cadenas ganglionares recién lesionadas, muestra la pérdida completa de la excitabilidad del área lesionada, aun cuando no haya habido la ruptura de las fibras nerviosas, mientras que el análisis histológico dichas las lesiones demuestra la interrupción física de la continuidad de las fibras nerviosas. Por ello, nos parece pertinente señalar que tanto la lesión con hilo como la lesión con pinzas fueron efectivas para seccionar el tejido conductivo.

La lesión con pinzas presentó una recuperación más precoz que la infringida con hilo. Es posible que esto se deba al hecho de que la vaina se pudo haber convertido en una barrera mecánica para el paso de las nuevas neuritas. Al estrangular las cadenas con hilo, la vaina se deforma y produce un "cuello de botella". De acuerdo con los resultados histológicos, el tejido se compactó lo que pudo haber impedido el paso de los procesos neuríticos y la microglía a través de la lesión. En apoyo a esta idea está el hecho de que el poner objetos en el la ruta de reconexión de las neuronas impide el paso de los axones y demora el proceso de recuperación (Guth L., y col.1981).

La recuperación en el caso de la lesión con pinzas es sorprendentemente rápida ya que en sólo un día de cultivo (24 a 32 horas) post lesión se pueden observar una recuperación en la conductividad nerviosa. Esto podría implicar un rápido crecimiento de las fibras nerviosas y necesariamente una rápida reconexión, ya que los potenciales registrados en

las raíces tónico motoras son de tipo post sináptico. Existe, sin embargo, la posibilidad de que no todas las fibras nerviosas se interrumpen con la lesión y entre ellas precisamente estuvieran las que están vinculadas con los circuitos neuronales que producen actividad de las motoneuronas tónicas. Más aún pudiera presentarse el caso de que la lesión fuera lo suficientemente fuerte para que las membranas plasmáticas quedaran inexcitables inmediatamente después de la lesión y al cabo de unas horas (24 a 32) los mecanismos celulares las hubieren reparado, lo cual no requiere del crecimiento de neuritas ni del establecimiento de nuevas sinapsis. Aunque es poco probable esta posibilidad ya que el análisis de los cortes seriados muestra que se lesiona prácticamente todo el tejido nervioso.

La recuperación, a cualquiera de los tipos de lesión infringidos se presenta primero en los componentes que se conducen con mayor velocidad, y posteriormente en los más lentos, lo que va acorde con la dinámica de los axones, de los que sabe que poseen mecanismos de transporte intracelular más rápidos en las fibras con grueso calibre (Scott T. 1993). Nuestros datos nos permiten concluir que en 3 días la cadena se ha recuperado, prácticamente por completo, de una lesión con pinzas, misma que *in vivo* tarda más de 90 días (González del Pliego y col. 1998). Trabajo realizado en nuestro laboratorio muestra que *in vitro* existe un crecimiento de varios milímetros de las fibras que abandonan ambos muñones de cadenas ganglionares seccionadas en un solo día de cultivo (datos no publicados). Este crecimiento es suficiente para atravesar el espacio que se produjo entre los extremos de la lesión en cualquiera de los protocolos de lesión que seguimos en este trabajo.

#### TRK A y efectos agudos del NGF

Hasta ahora sólo en pocas especies de invertebrados se ha demostrado la presencia de neurotrofinas o sus receptores; en consecuencia, poco se sabe respecto a su función en el desarrollo, crecimiento y reparación del sistema nervioso de los invertebrados. Sin embargo, han sido vinculadas con la plasticidad neuronal, la

sinaptogénesis, la inhibición postsináptica, el crecimiento neuronal (Moreno y col. 1998), así como la modulación de la activación de las cinasas reguladas por señales extracelulares que intervienen en la facilitación a largo plazo (memoria) (Ormond et al., 2004).

Nuestros resultados muestran la presencia del TRK A en el tejido nervioso del acocil así como de un conjunto de moléculas inmunorreactivas adicionales. El TRK A está presente en la banda de la Fig. 22, con un peso molecular de 140 Kda, equivalente al peso molecular del TRK A de la banda del tejido control (cerebro de rata neonata). Las bandas de menor peso molecular de las cuales la más destacada posee un peso aproximado de 70KDa, podrían ser isoformas o formas truncas, o bien componentes disociados del receptor. Nada de esto ha sido reportado en la literatura y su posible función queda aún por ser investigada.

A la fecha, se han identificado cerca de 5 *phyla* de invertebrados que poseen receptores tipo TRK, lo que indica que las neurotrofinas y sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal. Se desconoce si existen otros receptores a neurotrofinas en crustáceos por lo que sería interesante indagar la presencia del receptor de baja afinidad a neurotrofinas p75, así como de otros posibles receptores en especies como el acocil. Más interesante resulta aún la posibilidad de que en estos animales haya receptores a neurotrofinas diferentes a los que se han descubierto en vertebrados.

Algunos trabajos (Moreno y col., 1998) parecen excluir en el calamar la presencia de otros receptores de alta afinidad a las neurotrofinas diferentes al TRK A. Si esto se generaliza a los moluscos, anélidos y artrópodos, supondría que las formas "B" y "C" del TRK fueron una adquisición de la línea de los cordados una vez que radiaron los celomados. En apoyo a esta idea, el AmphiTrk un TRK que se presenta en el anfioxo, es capaz de unir NGF, BDNF, NT3 y NT4 (Benito Gutiérrez E., y col. 2005).

La presencia de TRKA en invertebrados celomados, sugiere que existe o existió un ancestro común antes de su separación de los acelomados, con un papel funcional que queda por ser caracterizado. Sin embargo, resulta importante indagar la presencia de dicho receptor en los acelomados lo que incluye un número grande de *phyla*. Pensamos

que resultaría interesante determinar su presencia y función, por ejemplo, en Cnidaria, ya que en este grupo que posee uno de los sistemas nerviosos más primitivos en animales, las neurotrofinas podrían estar involucradas en la génesis misma del sistema nervioso. En ausencia de estas, por otra parte, podríamos suponer que su papel podría asociarse con un incremento en la complejidad del mismo. Para mayor detalle en la información acerca de la evolución de los receptores tipo TRK, se pueden consultar los trabajos de van Kesteren y col., 1998 y Benito y col. 2006.

El efecto farmacológico de la aplicación aguda de NGF sobre la actividad eléctrica de la cadena ganglionar (figuras 11-18), sugiere fuertemente que uno de los posibles papeles de las neurotrofinas sobre las neuronas de invertebrados sea la modulación de vías nerviosas específicas. Para demostrarlo, sin embargo requeriríamos extender nuestros estudios a fin de determinar su relevancia fisiológica sobre redes nerviosas específicas, así como establecer que tipo de receptor se asociaría con ésta respuesta.

Los registros electrofisiológicos en los que se realizó la aplicación aguda de NGF, muestran que después de 10 minutos de su aplicación se presenta una disminución general de la actividad producida. Esto sugiere la participación del receptor TRK A en las motoneuronas postsinápticas al sitio de estimulación, resultados que son consecuentes con los datos reportados por Moreno y col. (1998).

Sin embargo, queda por investigar las causas del efecto excitador que se produce pocos segundos después de la aplicación del NGF, al igual que la aparición de nuevas ondas, cuando se aplican concentraciones de dicho factor inferiores a los 100ng. Es probable que el NGF produzca una inhibición sobre interneuronas inhibitorias que afectan la activación de las eferentes motoras sobre todo de las eferentes de más pequeño calibre, aunque es posible también que se produzca un incremento de la actividad de dichas motoneuronas (3, 4 o 5) de manera directa. Queda entonces por ser investigado con más detalle el efecto del NGF sobre las motoneuronas tónicas y sus circuitos, así como los receptores moleculares implicados en el proceso. Es importante considerar que el NGF que se empleó se obtiene de veneno de víbora (apéndice III), lo que supone la posibilidad

de efectos tóxicos, lo que apunto a la utilidad de emplear formas activas y altamente purificadas del  $\beta$ NGF.

La facilitación en la aparición de ondas de alto umbral como consecuencia de la aplicación de NGF abre la posibilidad de la existencia de alguna vía mediada por TRK A de algún otro tipo de receptor activado por NGF, que podría ser alternativa a la inhibición postsináptica que se ha demostrado en invertebrados (Moreno y col., 1988).

Los resultados que se muestran en las figuras 11-18, sugieren que el NGF puede producir excitación en una raíz y e inhibición en la contralateral. De ser así es posible que las neurotrofinas desempeñen un papel modulador de la actividad de redes nerviosas específicas, lo que no ha sido abordado de manera puntual en ningún otro modelo hasta el momento.

## CONCLUSIONES

- 1) La cadena ganglionar ventral presenta regeneración nerviosa *in vitro*
- 2) El NGF facilita la regeneración del tejido nervioso de la cadena ganglionar a una lesión en condiciones *in vitro*.
- 3) El tejido nervioso del acocil posee receptores tipo TRK A
- 4) El NGF exhibe propiedades farmacológicas que permiten suponer que interactúa con receptores tipo TRK; además de comportarse aparentemente como un fármaco neuromodulador.
- 5) La cadena ganglionar sobrevive por un periodo relativamente largo en condiciones de cultivo de tejidos (más de 7 días)

## BIBLIOGRAFIA

1. Abramchick G. V., Yermakova S. S., Kaliunov V. N., Tanina R. M. and Tumilovich M. K. (1988). The immunomodulatory effect of nerve growth factor. *J. of Neurosci. Res.* 19: 349-356
2. Acklin S. E. and Nicholls J. G. (1990). Intrinsic and extrinsic factors influencing properties and growth patterns of identified leech neurons in culture. *J. of Neurosci.* Apr. 10 (4): 1082-90.
3. Alvarez Buylla A., Theelen M. and Nottebohm F. (1988). Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during and after song learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 85: 9722-8726
4. Anderson T. E. and Bittner G.D. (1980). Long term alterations of electronic synapses. *Brain Research*, 184: 224-228.
5. Arias Carrión O, Olivares Bañuelos T., y Drucker Colín. (2007). Neurogénesis en el cerebro adulto. Revisión en Neurociencia, *Rev. Neurol.* 44(9): 541-550
6. Barde Y. A. (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2 (6): 1525-34
7. Benito Gutiérrez E., Garcia Fernández and Comella J. X. (2006). Origin and evolution of the Trk family of neurotrophic receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* 31: 179-192
8. Benito Gutiérrez E., Nake C., Llovera M., Comella J X., and García Fernández J. (2005). The single AmphiTrk receptor highlights increased complexity of neurotrophin signalling in vertebrates and suggests an early role in developing sensory neuroepidermal cells. *Development* 132: 2191-2202
9. Bennett J and Scott K. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem.* 43(1). 173-182
10. Berkelaar M., Clarke D.B., Wang Y.C., Bray G.M. and Aguayo A.J. (1994). Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *The J. of Neurosci.* 14(7): 4368-4374

11. Bermúdez-Rattoni F. and Escobar M. L. (1994). Nerve growth factor accelerates recovery of conditioned taste aversion learning by insular cortical Olfaction & Taste Kurihara K. (De.) Springer-Verlag Tokyo 475-478 grafts.
12. Bittner G. D. (1973). Degeneration and regeneration in crustacean neuromuscular system. *Am. Zool.* 13: 379-408
13. Bittner G. D. (1981). Trophic interaction of CNS giant axons in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 68: 299-306
14. Bittner G. D. (1991). Long term survival of anucleate axons and its implications for nerve regeneration. *TINS*, Vol 14 (5): 188-1993
15. Bittner G. D. and Ballinger M. L. (1980). Ultrastructural changes at gap junctions between lesioned crayfish axons. *Cell Tissue Res.* 207: 143-153
16. Bittner G. D. and Johnson A. (1974). Degeneration and regeneration in crustacean peripheral nerves. *J Comp. Physiol.* 89: 1-21
17. Bittner G. D., Ballinger M. L. and Larimer J. L. (1974). Crayfish CNS: minimal degenerative-regenerative changes after lesioning. *J. Exp. Zool.* 189: 13-36
18. Bocchini V. and Angeletti P.U. (1969). The nerve Growth factor: Purification as a 30,000 molecular weight protein. *Biochemistry.* Vol. 64: 787-794
19. Brown I. R. (1990). Induction of heat shock (stress) genes in the mammalian brain by hyperthermia and other traumatic events: a current perspective *J Neurosci. Res.* Nov. 27(3):247-55.
20. Brown I. R. (2007). Heat shock proteins and protection of the nervous system. *Ann N Y Acad. Sci.* 1113:147-58
21. Burry R. W. and Perrone-Bizzozero N. I. (1993). Nerve growth factor stimulates GAP-43 expression in PC 12 cell clones independently of Neurite outgrowth. *J. of Neurosci. Res.* 36: 241-251
22. Carter D. A., Bray G. M. and Aguayo A. J. (1994). Long-term growth and remodeling of regenerated retino-collicular connections in adult hamsters. *J. of Neurosci.* 14(2): 590-598

23. Chiquet M. and Acklin S. E. (1986). Attachment to CoA or extracellular matrix initiates rapid sprouting by cultured leech neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83. 6188-6192
24. Chiquet M. and Nicholls J. G. (1987). Neurite outgrowth and synapse formation by identified leech neurons in culture. *J. Exp. Biol.* 132. 191-206
25. Cohan C. S. and Kater S. B. (1986). Suppression of neurite elongation and growth cone motility by electrical activity. *Science* 232: 1638-1640
26. Cohen A., Bray G. M. and Aguayo A. J. (1994). Neurotrophin 4/5 (NT-4/5) increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth in vitro. *Journal of Neurobiology*, 25 (8). 953-959
27. Cohen-Cory S., Dreyfus C. F. and Black I. B. (1989). Expression of high- and low-affinity nerve growth factor receptors by Purkinje cells in the developing rat cerebellum. *Experimental neurology* 105: 104-109.
28. Drucker-Colin R, Madrazo I., Ostrosky-Solis F, Shkurovich M., Franco R., Torres C. (1988). Adrenal medullary tissue transplants in the caudate nucleus of Parkinson's patients *Prog Brain Res*; 78. 567-74
29. Ducray A., Bondier J. R., Michel G., Bon K, Propper A. and Kastner A. (2002). Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 15. 1907-1917
30. Ebendal T. (1992). Function and evolution in the NGF family and its receptors (Review). *J. Neuroscience Res.* 32. 461-470
31. Egid K. and Lnenicka G. A. (1993). Regeneration from crayfish phasic and tonic motor axons in vitro. *Journal of Neurobiology*. Vol. 24 (8). 1111-1120
32. Fernández de Miguel F, Cooper R. L., and Adams W. B. (1992). Synaptogenesis and calcium current distribution in cultures leech neurons. *Proc. Biol. Sci.* Vol. 247 1320. 215-221
33. Fernández de Miguel F. (1997). Outgrowth patterns and directed growth of identified neurons induced by native substrates in culture. *The J. of Com. Neurology* 380. 1-15
34. Fernandez H. L., Burton P. R., Samson F. E. (1971). Axoplasmic transport in the crayfish nerve cord. *J. Cell Biol.* 51. 176-197

35. Fernandez H. L., Huneeus F. C. and Davison P. F. (1970). Studies on the mechanism of axoplasmic transport in the crayfish cord. *J. Neurobiol.* 1. 395-409
36. Frank K. and Fuortes M. G. F. (1957). Presynaptic and postsynaptic inhibition of monosynaptic reflexes. *Fed. Proc.* 16. 39–40
37. Fukuda J. (1985). Nerve cells of adult and aged mice grown in a monolayer culture: age-associated changes in morphological and physiological properties of dorsal root ganglion cells in vitro. *Dev Neurosci.* 7(5-6). 374-94
38. Goldman, S. A. and Nottebohm F. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80. 2390-2394
39. González del Pliego M., Hernández-Falcón J., Aguirre-Benítez E., Gutiérrez-Novoa R., and Fuentes–Pardo B. (1998). Ventral nerve cord transection in crayfish: a study of functional anatomy. *J. of Crustacean Biol.*, 18(3), 449-462
40. Gorio A., Di Giulio A. M. and Mantegazza P. (1993). Historical bases for an introduction to neuroregeneration. *Neuroregeneration* edited by A. Gorio. Raven Press. Ltd. N.Y. 1-5
41. Gotz R. and Scharl M. (1994). The conservation of neurotrophic factors during vertebrate evolution. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 108 (1). 1-10
42. Govind C. K. and Atwood, H. L. (1982). Organization of neuromuscular systems. *Biol. Crustacea* 3. 63-103
43. Govind C. K., Blundon J. A. and Kirk M. D. (1992). Functional degeneration of isolated central stumps of crayfish sensory axons. *J. of Comp. Neurol.* 322. 111-120
44. Guest J.D., Rao A., Olson L., Bartlett M., and Bunge R. P. (1997). The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Experimental Neurology* Vol. 148, (2). 502-522
45. Guth L., Barrett C. P., Donati E.J., Deshpande S.S. and Albuquerque E. X. (1981). Histopathological reactions and axonal regeneration in the transected spinal cord of hibernating squirrels. *J. Comp. Neurol.* Dec 1; 203(2):297-308.
46. Hartmann A. and Speit G. (1996). Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ Mutagen* 27. 98-104

47. Hirji R., Coulthard R. and Govind C. K. (2000). Regenerated synaptic terminals on a slow muscle identify with transplanted phasic or tonic axons. *Journal of Neurobiology* 45. 185–193
48. Hoy R. R., Bittner G. D., and Kennedy D. 1967. Regeneration in crustacean motor neurons: evidence for axonal fusion. *Science* 156. 251-252
49. Iwashita Y., Kawaguchi S. and Murata M. 1994. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* 367(6459). 167-170
50. Jang S. W., Liu X, Chan CB, Weinshenker D, Hall RA, Xiao G, Ye K. 2009. Amitriptyline is a TrkA and TrkB receptor agonist that promotes TrkA/TrkB heterodimerization and has potent neurotrophic activity. *Chem. Biol.* 26,16 (6). 644-56.
51. Jiang Z. G., Smith R. A. and Neilson M. M. (1995). The effects of nerve growth factor on neurite outgrowth from cultured adult and aged mouse sensory neurons. *Brain Res Dev Brain Res* APR 18, 85 (2). 212-219
52. Kennedy D. & Takeda K. (1965a). Reflex control of abdominal flexor muscles in crayfish. I. The twitch system. *Journal of Experimental Biology* 43. 211–227.
53. Kennedy D. & Takeda K. (1965b). Reflex control of abdominal flexor muscles in crayfish. II. The tonic system. *Journal of Experimental Biology* 43, 229–246.
54. Koistinaho J., Hatanpää K, Hervonen A. (1991). Light and electron microscopic features of peripheral ganglion cells cultured from young and aged Wistar rats. *Mech Ageing Dev*, Nov 15; 61(1). 23-32
55. Krause K. M., Vélez S. J. (1995). Regeneration of neuromuscular connections in crayfish allotransplanted neurons. *Neurobiol.* 27(2). 154-71
56. Kuffler D.P. (1994). Promoting and directing axon outgrowth. *Molecular Neurobiology* 9(1-3). 233-243
57. Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227. 680
58. Levi-Montalcini R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237. 1154-1162

59. Levi-Montalcini R. (2000). Rom Turin to Stockholm via St. Louis and Rio de Janeiro. *Science* Feb 4; 287 (5454). 809
60. Lnenicka G.A. (1991). The role of activity in the development of phasic and tonic synaptic terminals. *Ann. N. Y. Acad., Sci.* 627. 197-211
61. Lucini C., Castaldo L., Lamanna C., Maruccio L., Vega JA., Gargiulo G. (1999). Neuronal and no-neuronal Trk neurotrophin receptor –like proteins in *Eisenia foetida* (Annelida Oligochaeta). *Neuroscience Letters* 261. 163-166
62. Macias M. Y., Battocletti J. H., Sutton C H., Pintar F A. and Maiman D. (2000). Directed and enhanced neurite growth with pulsed magnetic field stimulation. *Bioelectromagnetics* 21. 272-286
63. Madison R. D and Archibald S. J. (1994). Point sources of Schwann cells result in growth into a nerve entubulation repair site in the absence of axons: effects of freeze-thawing. *Neurol.* 128(2). 266-75
64. Mansour-Robaey S., Clarke D. B., Wang Y.C., Bray G. M. and Aguayo A. J. (1994). Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91. 1632-1636
65. Manual of histologic methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. Edited by Lee G and Luna HT. McGraw-hill Book Company
66. Marzullo T. C., Britt J. M Stavisky Ronda C., Bittner G. D. (2002). Cooling enhances in vitro survival and fusion-repair of severed axons taken from the peripheral and central nervous systems of rats. *Neuroscience Letters.* July 327(1). 9-12
67. Matsukawa T., Aral K., Koriyama Y, Liu Z., and Kato S. (2004). Axonal Regeneration of fish optic nerve after injury. *Biol. Pharm. Bull.* 27(4). 445-451
68. Mattson M. P. and Kater S. B. (1987). Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J. Neurosci* 7. 4034-4043
69. Mendell L. M., Munson J. B and Arvanian V. L. (2001). Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. *J. of Physiol.* 533(1). 91-97

70. Meyer M. R. and Bittner G. D. (1978a). Histological studies of trophic interactions in crayfish giant axons. *Brain Res.* 143. 195-211
71. Meyer M. R. and Bittner G. D. (1978b). Biochemical studies of trophic interactions in crayfish giant axons. *Brain Res.* 143. 218-232
72. Moreno, H., Nadal, M., Leznik, E., Sugimori, M., Lax, I., Schlessinger J., and Llinas, R. (1998). Nerve growth factor acutely reduces chemical transmission by means of postsynaptic TrkA-like receptors in squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95. 14997–15002.
73. Ormond J., et al. (2004). ApTrkl, a Trk-like receptor, mediates serotonin-dependent ERK activation and long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron*, Vol. 44. 715-728
74. Ostrosky Solis F, Quintanar L, Madrazo I, Drucker Colin R, Franco Bourland R, Leon Meza V. (1988) Neuropsychological effects of brain autograft of adrenal medullary tissue for the treatment of Parkinson's disease *Neurology* Sep;38(9). 1442-50.
75. Ramón y Cajal Santiago. (1914). *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso*. Madrid España, Editores Hijos de Nicolás Moza
76. Robbins S. L (1975). *Patología estructural y Funcional*. Primera edición. Editorial Interamericana. Capitulo 1 y 32.
77. Rudomín P. 1995- *Obra Científica*. Ed. Colegio Nacional. Tomos I-VI.
78. Sandeman D. C. (1982a). *Neurobiology structure and function*. In H.L: Atwood and D.C. Sandeman (Eds). *The Biology of Crustacea*. Vol. III New York Academic Press.
79. Sandeman D.C. (1982). *Neurobiology structure and function*. In H.L: Atwood and D.C. Sandeman (Eds). *The Biology of Crustacea*. Vol. IV New York Academic Press.
80. Sara V. R., Hall K. and Löw Hans (Eds). (1990). *Growth factors from genes to clinical application*. Raven Press. pp. 168
81. Scott T. B. (1993). *Axonal dynamics and regeneration*. *Neuroregeneration* edited by A. Gorio. Raven Press. Ltd. N.Y. 7-36

82. Segal R. A., Takahashi H. and McKay R. D. G. (1992). Changes in neurotrophin responsiveness during the development of cerebellar granule neurons. *Neuron*. Vol. 9. 1041-52
83. Seri B, Garcia-Verdugo J. M., Mc Ewen B. S., and Alvarez Buylla A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, September 15, 2001, 21(18). 7153-7160
84. Server C. A. and Shooter E. M. (1977). Nerve growth factor. *Av. Protein. Chem.* 31. 339-409
85. Seshan K. R. and Bittner G. D. (1987). Developmental and other factors affecting regeneration of crayfish CNS axons. *The Journal of Comparative Neurology* 262. 532-545
86. Shen N. J. and Wang S. C. (1999). Using a direct current electrical field to promote spinal-cord regeneration. *J Reconstr. Microsurg.* Aug. 15(6). 427-31
87. Treherne J. M., Woodward S. K., Varga Z. M., Ritchie J. M., and Nicholls J. G. (1992). Restoration of conduction and growth of axons through injured spinal cord of neonatal opossum in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, Jan 1, 89(1) p431-4
88. Tsang V. C, Peralta J. M, Simons A. R. (1983). Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 92. 377-91.
89. Twiss J. L. and Shooter E. M. (1995). Nerve growth factor promotes neurite regeneration in PC12 cells by translational control. *J. Neurochem* 64(2). 550-7
90. Van Harreveld A. (1936). A physiological solution for freshwater crustaceans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 34. 428-432.
91. Van Kesteren R. E., Fainzilber M., Hauser G., van Minnen J., Vreugdenhil E., Smit A. B., Ibáñez C. F., Geraerts W. P. M., and Bulloch A. G. M. (1998). Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *The EMBO journal* vol.17 No.9. 2534-2542
92. Varón S., Nomura J. and Shooter. (1967). The isolation of mouse nerve growth factor protein in high molecular weight form. *Biochemistry.* Vol. 6 (7). 2202-09

93. Varón S., Nomura J. and Shooter. (1968). Reversible dissociation of the mouse nerve growth factor protein different subunits. *Biochemistry* Vol. 7 (4). 1296-1303
94. Vázquez E., Calzada B., Naves J., Gatnacho S. S., del Valle M., Vega J. A., Represa J. (1994). Developmental changes in nerve growth factor (NGF) binding and NGF receptor proteins trkA and p75 in the facial nerve. *Anat Embryol (berl)* (Germany) 190(1). 73-85
95. Vellis de J. 1993. Supporting Cells Central and Peripheral. Capítulo 4 del libro "Neuroregeneration". Editado por Alfredo Gorio. Editorial Raven Press. ISBN 0-88167-952-6
96. Viancour T.A., Seshan K.R., Bittner G.D. and Sheller A. (1987). Organization of axoplasm in crayfish giant axons. *Journal of Neurocytology* 16. 557-566
97. Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Pérez MP, Thanos S, Aguayo AJ. (1987). Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J. Neurosci.* 7 (9). 2894-2909.
98. Wayne W. D. 1979. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa. Capítulo 5. 132-140
99. Wilson C. Gøberdhan D. C. I. and Steller H. (1993). Dror, a potential neurotrophic receptor gene, encodes a Drosophila homolog of the vertebrate Ror family of Trk-related receptor tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. i. USA.* Vol. 90. 7109-7113.

## APÉNDICE I

### Material de la sección de obtención de una cadena ganglionar

Cristalería y Consumibles	Equipo de disección
Agujas o alfileres nuevos 56	Hilo de seda de cinco cerros, un carrete.
Alcohol de 96 (no reactivo) 12 litros	Micro escarpelo de disección.
Caja de Petri pretratada con 3mm de Sylgard	Pinza de Adson, puntas de sierra de 12cm.
Cajas de Petri (Nunc) estériles 448	Pinza de cerrado automático del número cinco.
Cristalería y consumibles	Pinza curva del número cinco.
Espátulas. Varios tamaños	Pinza recta del número cinco.
Gasas estériles 10cm*10cm 280	Tijeras curvas tipo Vannas de 8cm y hojas de 3mm.
Lamina de corcho de 7mm espesor: 12cm X 6cm	Tijeras de disección de 10cm.
Matraz aforado 1000ml	Tijeras de Mayo de 18cm.
Mechero de gas o alcohol	
Minutens (alfileres muy pequeños) 4	Equipo General
Pipeta de alta precisión 100 l	Agitador magnético y mosca
Pipeta de alta precisión 1000 l	Balanza analítica
Pipeta de alta precisión 20 l	Campana de flujo laminar
Pipeta de alta precisión 200 l	Cuarto de temperatura controlada
Vaso de precipitados 1000ml	Incubadora
Vaso de precipitados 150ml	Microscopio de disección
Vaso de precipitados 20ml	Microscopio invertido

### Material de la sección técnica electrofisiológica

Cristalería y consumibles	Microscopio invertido
Cables y conectadores diversos	Osciloscopio (Tektroniks, Mod. A-300).
Jeringa con cánula flexible	Preamplificador de AC-DC (Grass, Mod. P511)
Electrodo de referencia, plata	Sonda de baja impedancia (Grass, Mod. HIP511)
	Tarjeta convertidora AD (Medical Systems, Mod. PCM4)
Equipo	
Electrodo de registro Narishige SS1	Unidad de aislamiento de corriente (Grass SIU6)
Electrodo de estimulación Narishige SS2	Unidad de aislamiento de voltaje (Grass SIU5)
Jaula de Faraday	Unidad de estimulación (Grass S8800)
Micromanipuladores	Video casetera
Peculiaridades del material de la sección electrofisiológica.	

El electrodo de referencia fue construido con alambre de plata de 1.0 mm, ajustándose a todo el rededor de las paredes de la caja de Petri pretratada con Sylgard 184, uno de sus extremos fue doblado para internarse en hacia el centro de la caja, y fue aplanado para generar una plataforma en la que se pudiera poner encima la mitad de la cadena ganglionar, el extremo contrario fue doblado hacia arriba hasta alcanzar el borde de la caja y hacia fuera en el plano horizontal para conectarse con un conductor hasta la sonda.

Los electrodos Narishige SS-1 fueron adelgazados hasta 0.500 mm y doblados para facilitar el enganchado de las raíces tónico motoras.

El electrodo bipolar Narishige SS-2 fue modificado al cambiarse sus extremos de platino grueso por alambre de platino de 0.457 mm en cubierta de teflón.

## APÉNDICE II

### Soluciones

Solución para acuario		
NaCl	1g	0.1%
KCl	0.1g	0.01%
Agregar H <sub>2</sub> O destilada	950ml	95%
Ajustar pH con NaHCO <sub>3</sub>	7.34 en agitación y burbujeo de aire constante	
Aforar con H <sub>2</sub> O destilada	1 litro	

### Amortiguadores de pH

PBS		
NaCl	80g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g	
KCl	2g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.64g	
Ajustar a Ph	De 7.30 a 7.40	
Aforar con H <sub>2</sub> O	1 litro	
Nota. Si es Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O agregar 14g y si es Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O agregar 25g		

### RIPA

TRIS	0.2442g	40mM
NaCl	0.4383g	150mM
EDTA	0.0380g	2mM
Glicerol	5ml	10%
Triton x-100	0.5ml	1%
Desoxicolato de sodio	0.25g	0.5%
SDS	0.1g	0.2%
Aforar con H <sub>2</sub> O	50ml	

### Soluciones, antibióticas, salinas y de cultivo.

Solución antibiótica de penicilina		
Bencilpenicilina procaínica	600000UI	
Bencilpenicilina sódica cristalina	200000UI	
Agregue agua inyectable	2ml	

### Solución modificada de van Harreveld (vH)

Hepes	1.2g	2mM
CaCl <sub>2</sub>	1.5g	5mM
KCl	0.4g	13mM
MgCl <sub>2</sub>	0.4g	2mM
NaCl	12g	205mM
Ajustar pH	De 7.3 a 7.4	
Aforar con H <sub>2</sub> O desionizada	1 litro	

### Solución glucosada de van Harreveld

D-glucosa	5.0g	5% p/ v
Ajustar pH	De 7.3 a 7.4	
Aforar con solución vH	100ml	

L-15	
En condiciones de esterilidad aforar un sobre de L-15 en un litro de agua desionizada estéril, agite hasta que se disuelva y filtre a presión con papel millipore o equivalente de un poro de 1µm	

L-15 modificado	
Suero fetal bovino	10% v/ v
NaCl	7.9g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.132g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.8g
D-glucosa	10g
Hepes	4.76g
Gentamicina	10mg
Penicilina	100,000UI
Estreptomicina	100mg
Fungizona	250µg
Solución de L-15	500ml
Aforar con H <sub>2</sub> O desionizada	1 litro
Ajustar pH	7.4
Osmolaridad final	420-440mOs

Medio antibiótico	
L-15 modificado	2ml
Solución antibiótica de penicilina	20µl
Solución antibiótica de gentamicina	10µl

#### SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

El agua de estas soluciones debe de ser hervida previamente para disminuir su contenido de oxígeno ya que este interfiere con la rápida formación del gel de la poliacrilamida. Se emplea a temperatura ambiente.

Solución A		
Acrilamida	58.4g	30%
Bisacrilamida	1.6g	2.7%
Aforar con H <sub>2</sub> O desionizada	200ml	

Solución B		
Tris-HCl	36.3g	1.5M
Ajustar pH	8.8	
Aforar con H <sub>2</sub> O desionizada	200ml	

Solución C		
Tris-HCl	3.0g	0.5M
Ajustar pH	6.8	
Aforar con H <sub>2</sub> O desionizada	50ml	

Solución D		
SDS	50g	10%
Aforar con H <sub>2</sub> O desionizada	500ml	

Solución de persulfato de amonio		
Persulfato de amonio	100mg	10%
Aforar con H <sub>2</sub> O desionizada	1ml	
Esta solución debe ser preparada preferentemente al momento de su uso		

Las siguientes soluciones no requieren se hierva el agua previamente

Solución de alineación		
SDS	1ml de solución D	0.1%
Tris-HCl	25ml de solución B	0.375M
Ajustar pH	8.8	
Aforar H <sub>2</sub> O bidestilada	100ml	

Solución amortiguadora de muestra 2X		
β-mercaptoetanol	1.0ml	10%
Azul de bromofenol	10mg	0.1%
Glicerol	2.0ml	20%
SDS	4.0ml solución D	4%
Tris HCl	2.5ml solución C	0.125M
Aforar con H <sub>2</sub> O bidestilada	10ml	

Amortiguador de corrida		
Glicina	57.6g	0.192M
SDS	40ml solución D	0.1%
Tris-HCl	2g	0.025M
Aforar con H <sub>2</sub> O bidestilada	4 litros	
No se requiere verificar pH	8.3	

Solución para teñir geles		
Azul de Commasie R-250	0.5g	.025%
Metanol	800ml	40%
Agitar hasta que se disuelva		
Ácido acético glacial	140ml	7%
Aforar con H <sub>2</sub> O bidestilada	2 litros	

Solución decolorante para geles		
Metanol	500ml	50%
Ácido acético glacial	100ml	10%
Aforar con H <sub>2</sub> O bidestilada	1 litro	

Amortiguador de Transferencia		
Tris	6.05g	48mM
Glicina	28.8g	0.39M
Metanol	200ml	20%
PH	7.7	

En agua bidestilada	1 litro
---------------------	---------

Solución de lavado para el inmunoprecipitado		
NaCl	438.3mg	150mM
Np40	500µl	1%
Tris-HCl	78mg	10mM
EDTA	0.0380g	4.3mM
Aforar con H <sub>2</sub> O	50ml	

Solución de lavado para membranas de nitrocelulosa PBS-Tween		
Twenn 20	200µl	2ml
Aforar con PBS	100ml	1000ml

Solución de Bloqueo para membranas de nitrocelulosa		
Leche descremada	17.5g	3.5%
Albúmina bovina	5g	1%
Aforar con PBS	500ml	
Almacenar a 4 °C	3 días. PBS-Tween si se almacenará hasta por 5 días	

Solución de Rojo de Ponceau		
Temporal		
Rojo de Ponceau	0.1%	
TCA	7.0%	
En H <sub>2</sub> O desionizada		
Se destiñe con PBS		
Permanente		
Isopropanol	25ml	25%
Ácido acético glacial	10ml	10%
Afora con H <sub>2</sub> O desionizada	100ml	
Solución de Revelado		
B. alcalino	5ml	
BciP	8.5µl	
MTB	16.6µl	

#### Soluciones Histológicas

Solución fijadora	
Formol (solución comercial)	10ml
H <sub>2</sub> O bidestilada	85ml
Ajusta pH con NaOH o HCl	7.4
Aforar con H <sub>2</sub> O desionizada	100ml

### APÉNDICE III Reactivos

Anticuerpo primario: policlonal de conejo gp 140. AntiTRKA TRK (C-14): Cat # sc-11.  
Santa Cruz Biotechnology, Inc. Reacciona de manera cruzada con TRK-B y C

Anticuerpo secundario: policlonal anti conejo conjugado a peroxidasa de rábano

ECL. Amersham Pharmacia Biotech RPN 2108

Gentamicina. Formula: Gentamicina 10mg /10ml. In Vitro S. A. de C. V.

Hidrocilina 800000U. USV Grossman Fórmula: 600000U Bencilpenicilina procaínica y  
200000U Bencilpenicilina sódica cristalina

Hilo de seda: grosor: 5(0), cinco ceros, longitud comúnmente empleada: 5 cm esterilizado

NGF extraído de veneno *Vipera lebetina*. Sigma N8133

Sylgard 184 de Down Corning

Técnica de viabilidad por di acetato de fluoresceína (FDA) bromuro de etidio (Br Et)

## APENDICE IV

### ADECUACIÓN MATEMÁTICA DE LOS REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Debido a la capacitancia eléctrica que temporalmente se produce en el sistema de registro durante la actividad eléctrica inducida, producto del elevado voltaje y amperaje al que debieron ser sometidas las cadenas ganglionares y a la carencia de un interruptor sincronizado disponible que suspendiera el registro eléctrico durante el pulso de estimulación, se diseñó una metodología matemática que permitió discriminar el componente capacitivo del equipo de la respuesta celular.

Se asumió que el componente capacitivo presentaría una o algunas funciones matemáticas regulares y continuas o discontinuas, y que por lo tanto era posible aunque difícil encontrar dicha relación matemática. Esto permitiría restar el artefacto electrónico del registro de la respuesta propiamente dicha, al restar el cálculo teórico a los datos experimentales.

Procedimiento:

1. El osciloscopio digital generó un archivo de datos con dos columnas de 500 datos cada una, correspondientes la base de tiempo y al voltaje de la respuesta eléctrica.
2. En una hoja de cálculo se abrió el archivo de datos y se colocó a los datos del tiempo en la columna "A" y al de voltaje en la columna "B"
3. En la hoja de cálculo en cada columna después de la columna A y B, se introdujeron las siguientes formulas de cambio de variable:

Columna C:  $\log "A"$ . Columna D:  $\log "B"$ . Columna E:  $\log "C"$ . Columna F:  $\log "D"$ .  
Columna G:  $1.08^{x="A"}$ . Columna H:  $1.08^{x="B"}$ . Columna I:  $1/"A"$ . Columna J:  $1/"B"$  Columna  
K:  $1/"C"$ . Columna L:  $1/"D"$ . Columna M:  $1/"E"$ . Columna N:  $1/"F"$ . Columna O:  $1/"G"$   
Columna P:  $1/"H"$ . Columna Q:  $1/(1+1/"A")$ . Columna R:  $1/(1+1/"B")$  Columna S:  
 $1/(1+1/"G")$ . Columna T:  $1/(1+1/"H")$ . Columna U:  $"A"^2$ . Columna V:  $1/(1+1/"U")$ . Columna  
W:  $1/U1$ . Columna X:  $"B"^2$ . Columna Y:  $1/(1+1/X)$ . Columna Z:  $1/"X"$ .

Columna AA: pendiente "m". Columna AB: ordenada al origen "b" Columna AC:  
 $("A1"*"AA")+ "AB"$

4. Se graficaron los datos de la columna "B" y sus dependientes contra todos los datos de la columna "A" y sus dependientes.
5. Se observó cuidadosamente que gráfica o gráficas mostraban una tendencia lineal y se seleccionaron.
6. Se calculó para esta la pendiente y ordenada al origen por regresión lineal, y en el caso de haber dos o más candidatas, se ordenaron por índice de correlación y por segmentos.
7. Se generó una columna de valores teóricos, bajo la forma de ecuación de una recta, es decir  $y = mx + b$ , donde "y" es la variable dependiente, "m" es la pendiente, "x" es la variable independiente y "b" la ordenada al origen.
8. Dichos valores fueron transformados a valores "reales", es decir a los comparables a los de la gráfica de la columna "B" vs. "A" y se contrastó la curva teórica contra los datos experimentales.
9. Cuando los índices de correlación fueron muy aproximados y se determinó visualmente que una tendencia se ajustó mejor a la tendencia experimental, se empleó esta como teórica.
10. Se restaron los datos teóricos a los experimentales.
11. En caso de observarse la presencia de una nueva función sumada a la anterior se recalculó, la función resultante y fue restada nuevamente.
12. Se archivaron los registros en la computadora con nombres cifrados
13. Se determinó el número de espigas y su duración.

## Apéndice V

### Pormenores del Western Blot

Se armó el contenedor para fabricar la placa de gel, según el instructivo del fabricante: entre la placa de lucita y la lámina de vidrio se colocaron los separadores laterales, con ayuda de dos pares de pinzas se adosaron al bastidor de la cámara de electroforesis cuyo hule de unión previamente fue untado con petrolato especial.

1. Sellado: En la base del artefacto, en posición horizontal se aplicó un mililitro de solución de agarosa al 1%, entre el vidrio y la lucita se espero algunos minutos y antes de que solidificase se enderezo verticalmente para formar un sello uniforme en su grosor.
2. El gel separador se preparo en un recipiente, se mezclaron: 2.5ml de solución A, 3.75ml de solución B, 100 $\mu$ l de solución C, 3.58ml de agua (bidestilada, hervida y fría), 40 $\mu$ l de persulfato (recién preparado) y 17 $\mu$ l de TEMED.
3. Se aplicó rápidamente por la parte superior entre las placas, se colocó en una superficie nivelada.
4. Se aplanó con 1 ml de Isopropanol.
5. Una vez cuajado se retiró el Isopropanol con papel filtro.
6. El gel concentrador se preparo en un recipiente de la siguiente manera: 650 $\mu$ l de solución A, 50 $\mu$ l de solución C, 1.25ml de solución D, 3 ml de agua (bidestilada, hervida y fría), 25 $\mu$ l de persulfato, y 5 $\mu$ l de TEMED.
7. Igual al paso cuatro, pero se colocó enseguida el peine separador.
8. Se colocó en la cámara y se lleno con solución amortiguadora de corrida
9. Se aplicó la muestra en los carriles según resultó conveniente.
10. Se corrió el gel concentrador a 35mA a 100V
11. Se corrió el gel separador a 40mA a 120V

## Apéndice VI

TABLA 1. ANALISIS ESTADISTICO				
PRUEBA DE "T" PARA NÚMERO DE ESPIGAS				
Grupo	L. P 1D	LP+NGF 1D	LH 1D	LH+NGF 1D
Control 1D	N. S.	N. S.	S, C>E	S, C>E
Grupo	L. P 3D	LP+NGF 3D	LH 3D	LH+NGF 3D
Control 3D	S, C>E	S, C>E	S, C>E	S, C>E
Grupo	L. P 5D	LP+NGF 5D	LH 5D	LH+NGF 5D
Control 5D	S, C>E	N. S.	S, C>E	S, C>E
Grupo	L. P 7D	LP+NGF 7D	LH 7D	LH+NGF 7D
Control 7D	N. S.	S, C < E	S, C>E	S, C>E
Sección 2				
PRUEBA DE T EN NÚMERO DE ESPIGAS				
Grupo	LP+NGF1D	LP+NGF 3D	LP+NGF 5D	LP+NGF 7D
LP 1D	N. S.	X	X	X
LP 3D	X	N. S.	X	X
LP 5D	X	X	N. S.	X
LP 7D	X	X	X	S, C<+NGF
Sección 3				
PRUEBA DE T EN NÚMERO DE ESPIGAS				
Grupo	LH+NGF1D	LH+NGF 3D	LH+NGF 5D	LH+NGF 7D
LH 1D	N. S.	X	X	X
LH 3D	X	N. S.	X	X
LH 5D	X	X	N. S.	X
LH 7D	X	X	X	S, C>+NGF

Tabla 1. C. Control; E. experimental; L. H. Lesión con hilo; L. P lesión con pinzas; N. S. No significativo; S. Significativo; X no aplicable.