



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO NEURÍTICO POR NF- κ B
DURANTE EL DESARROLLO DE NEURONAS SIMPÁTICAS”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

IMELDA GARCÍA VELASCO



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:


PRESIDENTE: Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre
VOCAL: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra
SECRETARIO: Profesor: Humberto Gutiérrez González
1er. SUPLENTE: Profesor: María Elena Ibarra Rubio
2° SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:


LABORATORIO AL-104, INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, NEUROCIENCIAS. UNAM



ASESOR DEL TEMA
HUMBERTO GUTIÉRREZ GONZÁLEZ



SUPERVISOR TÉCNICO
LETICIA RAMÍREZ LUGO



SUSTENTANTE
IMELDA GARCÍA VELASCO

La ciencia avanza a pasos, no a saltos.

Thomas Macaulay

La ciencia es un juego, pero un juego con la realidad, un juego con los cuchillos afilados...Si alguien corta con cuidado una imagen en mil trozos, puedes resolver el rompecabezas si vuelves a colocar las piezas en su sitio. En un juego científico, tu rival es el Buen Señor. No sólo ha dispuesto el juego, sino también las reglas, aunque éstas no sean del todo conocidas. Ha dejado la mitad para que tú las descubras o las determines. Un experimento es la espada templada que puedes empuñar con éxito contra los espíritus de la oscuridad pero también puede derrotarte vergonzosamente. La incertidumbre radica de cuántas reglas ha creado el propio Dios de forma permanente y cuántas parecen provocadas por tu inercia mental; la solución sólo se vuelve posible mediante la superación de este límite. Tal vez esto sea lo más apasionante del juego. Porque, en tal caso, luchas contra la frontera imaginaria entre Dios y tú, una frontera que quizás no exista.

Erwin Schrödinger

Agradezco al Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM por las facilidades en el préstamo de sus instalaciones, sala de cómputo y biblioteca para la realización de esta tesis.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el financiamiento del proyecto con número: 100673.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del personal académico-UNAM (DGAPA) por la beca otorgada durante el desarrollo de este trabajo a través del proyecto IA203211-IACOD.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma De México y Facultad de Química por la educación que me ha brindado durante todos estos años, así como por la formación académica y permitirme aprender de valiosos profesores.

Al Dr. Humberto Gutiérrez, ya que sin él este trabajo jamás hubiera sido posible, por permitirme formar parte de su equipo, muchas gracias por todas sus enseñanzas, su apoyo y consejos.

A la Dra. Leticia Ramírez Lugo por su gran interés para que este trabajo saliera adelante, por su asesoramiento, apoyo, consejos, tiempo y paciencia.

A los sinodales Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre y el Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra por el tiempo dedicado en la revisión de este trabajo y por sus opiniones para mejorarlo. Así como también a la Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio y a la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova por su tiempo y atención prestada.

A Fermín Domínguez Díaz, por su apoyo y ayuda para realizar el trabajo experimental, por esas grandes charlas y por su amistad.

A mis compañeros del laboratorio: Manuel, Abril, Rodrigo, Dirce y sobre todo a Jimena, Atahualpa y Yesica por todo su apoyo desde el inicio de este trabajo, por su ayuda, sus consejos, pláticas, y sobre todo por su amistad.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres, muchas gracias por todo, porque sin ustedes jamás hubiera sido posible lograr este sueño, porque siempre han estado ahí en las buenas y en las malas, por darme las mejores enseñanzas de vida y sobre todo por su amor y cariño.

A Gaby García, por ser mi amiga, maestra, y excelente hermana, por ser mi ejemplo a seguir, porque siempre me ha dado ánimos cuando todo es gris, por su increíble paciencia, consejos, y sobre todo porque siempre ha creído en mí.

A mi familia, primos y sobrinos, son la razón por la cual siempre sonríó, son un gran apoyo y buenos consejeros.

Al Doctor Jorge Arturo de León Rodríguez por permitirme conocer ese gran proyecto que es CEDAAT A.C., por confiar en mí, por brindarme su apoyo en todo momento y sobre todo su amistad.

A Laura Alonso, Sayda, Judith, Fabiola, Jenny, Raquel, Germán, por sus enseñanzas, por los viajes maravillosos, las tristezas y sobre todo por su valiosa amistad y enseñarme a ser mejor profesionista.

A Luis Ángel y Gaby Téllez por todos los años de amistad, por todo el apoyo que me han brindado, porque siempre me hacen sonreír, por sus valiosos consejos tanto en lo profesional como de vida, por estar presente en cada momento en las buenas y en las malas, por enseñarme a ser mejor persona.

A Iván, Mike, Laura León, Bety, Fanny, Sam, Richard, Karina, Norma, Itzia, Marisol, Ocelli, Pilar, por los desvelos, las risas, tristezas, y su ayuda en todo momento.

A Ubaldo Saúl, por ser el motorcito que siempre me impulsa a continuar y no caer, por su apoyo en cada instante, porque no sólo me brinda su amistad, apoyo, cariño y comprensión, por confiar en mí en cada paso que doy, por ser mi equilibrio.

ÍNDICE

Tema	Página
Resumen	6
Introducción	7
Planteamiento del problema	30
Objetivo	31
Metodología	32
Resultados	39
Discusión	55
Conclusiones	61
Referencias bibliográficas	62

RESUMEN

El desarrollo del sistema nervioso es un proceso extremadamente complejo en el que el organismo debe ajustar el número apropiado de neuronas en correspondencia con patrones específicos de interconectividad e innervación. Este proceso es el resultado de una enorme secuencia de eventos de regulación mediante señales extracelulares e intracelulares.

NF- κ B es un factor transcripcional que consta de homodímeros o heterodímeros de 5 proteínas estructuralmente relacionadas: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50, y p52. El heterodímero p65/p50 es el más abundante y ampliamente expresado. NF- κ B participa en la respuesta inflamatoria e inmune, en el proceso de proliferación y muerte celular, en la replicación viral, en la producción de óxido nítrico y en la interacción entre células. También está implicada en la regulación del crecimiento axonal y dendrítico en neuronas en desarrollo, aunque este aspecto se encuentra menos estudiado.

Se ha visto que NF- κ B puede promover o inhibir el crecimiento neurítico dependiendo del mecanismo de activación que en gran medida depende del estado de fosforilación de la subunidad p65. Por lo tanto, en este trabajo estudiamos el efecto del patrón de fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B mediante la expresión de variantes de la proteína con mutaciones en residuos específicos de serina que participan en la modulación adicional de NF- κ B en la etapa embrionaria y posnatal. Nuestros resultados muestran que bloqueando la fosforilación de la Ser536 por la proteína mutante p65 S536A se inhibió el crecimiento en neuronas simpáticas en etapa prenatal pero ocurrió lo contrario en etapa postnatal. Por estudios de inmunofluorescencias se determinó que NF- κ B debe estar fosforilada para estimular o inhibir el crecimiento de las neuritas en desarrollo.

INTRODUCCIÓN

♦ DESARROLLO NEURONAL

Breve descripción del desarrollo del sistema nervioso.

El desarrollo del sistema nervioso empieza con la formación de una lámina plana de células en la superficie dorsal del embrión constituida por tres capas germinativas: el ectodermo (capa más exterior, que dará origen al sistema nervioso y la piel), el mesodermo (capa de la línea media, que dará origen al músculo y esqueleto) y el endodermo (capa más interior, que dará origen a los distintos órganos interiores del organismo) (Carlson, 2009).

La notocorda está formada por células derivadas del mesodermo y de las que definen el eje primitivo del embrión. Al comenzar la tercera semana del periodo embrionario en humanos, la notocorda en desarrollo y el mesodermo adyacente estimulan al ectodermo que está encima de ellos (Smith y Schoenwolf, 1997). Este complejo proceso de inducción notocordal hace que el tejido ectodérmico (neuroectodermo) se engruese, formándose así la placa neural (Smith y Schoenwolf, 1997).

Durante la neurulación, se han descrito varios tipos de moléculas que actúan como señales en los procesos inductivos y de diferenciación del sistema nervioso central (SNC), así por ejemplo, la interacción entre BMP (bone morphogenetic protein, por sus siglas en inglés), con sus inhibidores como la cordina, la nogina y el ácido retinóico, que determinan la inducción y la diferenciación del ectodermo que da origen

a la piel de aquel que forma el tubo neural cefálico o caudal (Smith y Schoenwolf, 1997).

Una vez completado el proceso inductivo, la placa neural se alarga, desde su sitio de origen craneal al nodo primitivo hasta la membrana bucofaríngea. En humanos, por ejemplo, alrededor del día 18 del desarrollo embrionario, los bordes laterales de la placa neural se elevan y forman los pliegues neurales; la porción media entre los pliegues neurales forma el surco neural (Smith y Schoenwolf, 1997). Hacia el final de la tercera semana, los pliegues neurales se elevan aún más, se acercan y se fusionan irregularmente en la línea media formando el tubo neural, que subsecuentemente dará origen al cerebro y a la médula espinal, la cual inicia en la región cervical y sigue hacia la región cefálica y caudal (Colas y Schoenwolf, 2001). Mientras ocurre la fusión, los bordes libres del ectodermo superficial se separan del tubo neural. Posteriormente, ambos bordes se unen y forman una capa continua en la superficie que dará origen al epitelio epidérmico (Carlson, 2009; Colas y Schoenwolf, 2001).

Mientras ocurre la fusión de los pliegues neurales, los bordes libres del surco neural pierden su afinidad con células vecinas y se separan del tubo neural para formar las crestas neurales, las cuales se extienden en la porción dorsolateral a cada lado del tubo neural (Colas y Schoenwolf, 2001; Smith y Schoenwolf, 1997). Este grupo celular dará origen a un conjunto heterogéneo de tejidos de gran importancia: ganglios de la raíz posterior, ganglios autónomos, ganglios de los pares craneales V, VII, IX, X, células de Schwann, las leptomeninges (aracnoides y piamadre), melanocitos, médula suprarrenal, odontoblastos. En consecuencia, el tubo neural será el que se convertirá por diferenciación en encéfalo y médula espinal, mientras que las crestas neurales formarán la mayor parte del sistema nervioso periférico (SNP) y parte del autónomo (SNA) (Carlson, 2009; Netter, 2002).

Tras la formación del tubo neural, y como resultado de una serie de pliegues y constricciones, se desarrollan tres regiones vesiculares o neurómeros: prosencéfalo (cerebro anterior), mesencéfalo (cerebro medio) y rombencéfalo (cerebro posterior) (Carlson, 2009).

Proliferación neural, precursores y determinación neural

Una vez que el tubo neural se ha desarrollado en el cerebro primitivo y en médula espinal, inicia la generación y diferenciación de las células cerebrales (Wolpert, 2009). El tubo neural está compuesto por una capa de células neuroepiteliales, que son mitóticamente activas de modo que las células madres empiezan a diferenciarse y producir glioblastos y neuroblastos (Netter, 2002). Estas células de propiedades y funciones distintas se diferenciarán en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales, de acuerdo con los factores de transcripción y las moléculas de señalización extracelular que actúen temporal y regionalmente (Colas y Schoenwolf, 2001; Smith y Schoenwolf, 1997; Wolpert, 2009).

Las células precursoras se dividen en el neuroepitelio (placa neural y tubo neural) y se unen tanto a la superficie exterior como en la superficie ventricular del tubo neural, que es la capa celular más interna que rodea a la luz del tubo neural (Gotz y Huttner, 2005). El núcleo de las células se desplaza entre estos dos límites dentro de un estrecho cilindro citoplasmático (Gotz y Huttner, 2005). Cuando las células están cerca de la superficie exterior del tubo neural, entran en fase de síntesis de DNA (fase S); después los núcleos se mueven de vuelta a la

superficie ventricular (fase G2), donde pierden sus conexiones hacia la superficie externa y entran en mitosis (fase M). Cuando finaliza la mitosis, las células hijas extienden sus conexiones hacia la superficie externa del tubo neural, y las nuevas células precursoras entran en quiescencia (fase G0) (Gotz y Huttner, 2005). Al mismo tiempo, asimétricamente una célula precursora genera otra célula precursora que entra en división y una célula que no se dividirá (que es un neuroblasto) o simétricamente, dos células precursoras (Scott Gilbert, 2005).

Debe existir una precisa coordinación entre el ciclo celular y la diferenciación neural, la cual estará regulada por los factores que regulan ambos procesos (Carlson, 2009; Ohnuma y Harris, 2003). Se ha descrito que neurotrofinas como: NGF, BDNF, NT-3, NT4/5, NT-6, así como sus receptores son esenciales para la proliferación de precursores neuronales (Bartkowska et al, 2007).

Así mismo, las clases de neuronas que se forman durante la fase de proliferación, dependen de factores moleculares y genéticos que se manifiestan en la zona generativa y que varían con la región del SNC (Wolpert, 2009).

Migración neuronal

Cuando ha finalizado la proliferación celular, los precursores neuronales postmitóticos migran desde la luz del tubo neural (que posteriormente dará lugar a los ventrículos) hasta los lugares donde van a residir finalmente (Netter, 2002). La posición final que las neuronas van a ocupar está determinada por su posición en la zona

generativa, así como por la etapa en que la célula adquiere el carácter postmitótico (Netter, 2002; Wolpert, 2009).

Algunos factores como las moléculas de adhesión celular neuronal (NCAM, por sus siglas en inglés) y las N-cadherinas que favorecen las interacciones entre las neuronas y las células de la glía (Shikanai et al, 2011). Poco se conoce sobre los mecanismos que ejercen y regulan la migración neural. Sin embargo, se sabe que cambios en el entorno celular producen importantes efectos en la diferenciación de las neuronas, y que distintas señales pueden inducir la secreción de moléculas, incluyendo péptidos hormonales de ligandos de la superficie celular y de receptores, moléculas de adhesión y otras señales o moléculas de matriz extracelular, a lo largo de toda la ruta migratoria (Carlson, 2009; Wojcik-Stanaszek et al, 2011).

Se han documentado dos formas de migración neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso central. La migración radial se cree que es la forma "clásica" de migración neuronal y la otra forma son las que migran tangencialmente (Rao et al, 2002).

Diferenciación y crecimiento de axones y dendritas

La diferenciación neuronal se caracteriza por el crecimiento del cuerpo celular, la elaboración de axones y dendritas, seguida de su crecimiento en longitud, el grosor y el agrupamiento de los cuerpos neuronales formando acumulaciones de las que parten radialmente las neuritas (que se encuentran formadas por axones y dendritas). Esta distribución da lugar a la disposición en materia blanca y materia gris

que adoptan las neuronas en el SNC (Gibson y Ma, 2011; Wolpert, 2009).

Durante el desarrollo de una neurona, del cuerpo celular, crecen una o varias neuritas que exploran el entorno en busca de un blanco para conectarse. Posteriormente una neurita se puede diferenciar en un axón o una dendrita. En la punta de una neurita está el cono de crecimiento, que como su nombre lo indica, es una estructura que le sirve de guía durante su crecimiento. Con la polimerización de cadenas de actina se producen protuberancias del cono de crecimiento llamadas filopodia (Netter, 2002; Wolpert, 2009). Las filopodia se van adhiriendo al sustrato en el que crecen, "palpando" el espacio por el que la neurita crece (Wolpert, 2009).

Los conos de crecimiento reconocen diferencias entre los sustratos en los que crecen y esto puede regular la dirección y la velocidad de su crecimiento (Wolpert, 2009). Se han identificado numerosas sustancias capaces de favorecer el crecimiento *in vitro* de los axones, tales como el colágeno, la fibronectina y algunos proteoglicanos. Son de especial importancia las lamininas, componentes de todas las láminas basales de los seres vivos. Los conos de crecimiento poseen una serie de proteínas llamadas integrinas capaces de interaccionar con las lamininas de la matriz extracelular que intervienen en la adherencia intercelular, así como para favorecer el crecimiento del axón (Wolpert, 2009).

La unión con el sustrato no es suficiente para que se produzca el desarrollo de las neuronas inmaduras, es fundamental la presencia de factores neurotróficos (Wolpert, 2009).

En la formación de las dendritas es imprescindible la proteína asociada a microtúbulos MAP-2 y en la generación de los axones interviene la proteína asociada al crecimiento GAP-43 (Dent y Gertler, 2003).

En la diferenciación neuronal se ha descrito que los neuropéptidos como la somatostatina, colecistoquinina, VIP o la sustancia P, los componentes de la matriz extracelular: laminina, fibronectina y colágeno, los factores tróficos como NGF, EGF, FGF, IGF, entre otros, promueven el crecimiento axones, elongación y ramificaciones; los neurotransmisores serotonina, dopamina o acetilcolina y las interacciones con las células gliales pueden estar estrechamente vinculados con los fenómenos de elongación axónica e interconexión celular, la familia de las proteínas WNT (WNT3, WNT5A) han sido implicadas en la regulación de ramificaciones (Gibson y Ma, 2011).

El proceso de diferenciación neuronal está favorecido por la insulina y los factores de crecimiento insulínico IGF-1 e IGF-2. La insulina estimula la síntesis de proteínas, favorece la producción de neuritas y la adquisición de la capacidad de neurotransmisión (Baskin et al, 1987).

La elongación de axones y dendritas es un proceso de extraordinaria importancia ya que es esto lo que permitirá a las neuronas establecer contacto entre ellas y con otros tejidos (Netter, 2002).

Sinaptogénesis

Las sinapsis (uniones sinápticas), son regiones de contacto especializado entre neuronas, y entre estas células y órganos efectores o entre dos fibras musculares (Noback, 1980).

La sinaptogénesis es un proceso tardío de la diferenciación neuronal, aunque algunas sinapsis aparecen durante fases más tempranas (Wolpert, 2009).

La mayoría de las sinapsis consisten en una región axónica presináptica, una región receptora en una dendrita postsináptica, y entre ambas una estrecha hendidura sináptica (Williams et al, 2010). La forma en que las neuronas alcanzan sus dianas y establecen sus conexiones precisas durante el desarrollo se basa en el reconocimiento molecular. Cada neurona tiene especificada una identidad molecular que le permite ser reconocida por otras neuronas que establecen contacto con ella y generan la actividad neuronal (Wolpert, 2009). El patrón de actividad neuronal generado por estímulos externos durante el desarrollo podría cambiar las conexiones, basándose en el principio de que las conexiones que se utilizan quedan asentadas y las menos usadas son eliminadas (Wolpert, 2009). Estas conexiones están determinadas en gran parte por factores genéticos, y una vez establecidas permanecen estables. Sin embargo, las interacciones con el medio durante el desarrollo postnatal pueden provocar cambios en la plasticidad de las neuronas y sus conexiones. También, pueden ocurrir cambios de conectividad o de plasticidad durante el aprendizaje o después de un daño cerebral (Williams et al, 2010).

Muchos factores promueven la formación de sinapsis, como las moléculas de adhesión celular como las neuroliginas, proteínas de membrana postsináptica que se unen a otras proteínas denominadas neurexinas β sobre la superficie axónica presinápticas e inducen la diferenciación en la terminal presináptica. Las neuroliginas promueven la función de las sinapsis excitatorias, las cadherinas participan en la formación de la sinapsis, la señalización por Wnt y los factores tróficos NGF, EGF, FGF, IGF, por mencionar algunos, esenciales para la supervivencia y el funcionamiento normal de las células presinápticas y postsinápticas (Williams et al, 2010; Wolpert, 2009).

Muerte neuronal

Las neuronas necesitan determinados factores de crecimiento para sobrevivir durante ciertas etapas del desarrollo, puesto que estos factores se encuentran en cantidades limitantes, las neuronas compiten por ellos de tal manera, que si no pueden conseguirlos, mueren. Este fenómeno se denomina muerte celular natural. Entre los diferentes factores de crecimiento por los que compiten las neuronas se encuentran: el factor de crecimiento neuronal (NGF por sus siglas en inglés), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) y las neurotrofinas 3 y 4 (NT-3 y NT4 respectivamente), Todos pertenecientes a la familia de las neurotrofinas (Gibson y Ma, 2011).

La muerte neuronal programada ocurre de manera natural durante el desarrollo del sistema nervioso, resultado en la eliminación de las neuronas que han formado sinapsis defectuosas, y está regulada por la actividad de diversas señales extracelulares (Giordano y Costa, 2011). La muerte neuronal programada ocurre mediante apoptosis, proceso que se caracteriza por la existencia de condensación de la cromatina, desorganización del citoesqueleto, fragmentación del ADN, con escasa o nula modificación estructural de los organelos citoplasmáticos, burbujas de membrana plasmática y el mantenimiento de la membrana plasmática hasta la finalización del proceso (Hengartner, 2000).

♦ NEURONAS PERIFÉRICAS COMO UN MODELO DE ESTUDIO DEL DESARROLLO NEURONAL

La precisa coordinación de los diversos eventos en el desarrollo del sistema nervioso, es absolutamente crítico para el correcto establecimiento de circuitos funcionales. Las neuronas simpáticas han sido un modelo de estudio de la formación del sistema nervioso periférico (Glebova y Ginty, 2005). Los diversos factores que controlan numerosos eventos durante el desarrollo neuronal, incluyendo múltiples etapas en la extensión del axón, la supervivencia neuronal y la muerte, dentritogénesis, sinaptogénesis y el establecimiento de la diversidad funcional, han sido identificados en esta población de neuronas periféricas (Glebova y Ginty, 2005). Esto ha permitido integrar los diversos procesos implicados en la formación funcional del sistema nervioso simpático constituyéndose así en un paradigma experimental para comprender el desarrollo neuronal en general (Glebova y Ginty, 2005).

Las neuronas sensoriales del ganglio nodoso también han sido un buen modelo para el estudio del sistema nervioso ya que representa una de las regiones del cerebro que también es utilizada debido a que su población neuronal es bastante homogénea (Gutiérrez et al, 2005).

♦ NF- κ B

NF- κ B fue descrito inicialmente en el sistema inmune (Kaltschmidt et al, 2005) en donde observaron que actúa como modulador de la

transcripción de la cadena ligera de las inmunoglobulinas de los linfocitos B (Sen y Baltimore, 1986); tiene importancia en la regulación de la expresión de genes de las respuestas inflamatoria e inmune, en el proceso de proliferación y muerte celular, en la replicación viral, en la interacción entre células y apoptosis (Hayden y Ghosh, 2011). NF- κ B se ha visto implicado en la regulación del crecimiento axonal y dendrítico en neuronas en desarrollo (Gallagher et al, 2007; Gutiérrez et al, 2008; Kaltschmidt et al, 2005).

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción, en mamíferos que incluye a 5 proteínas de la familia Rel estructuralmente relacionadas: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 y p52, los cuales forman homodímeros o heterodímeros (Glebova y Ginty, 2005; Hayden y Ghosh, 2011; Liang et al, 2004). Los miembros de esta familia son los encargados de activar la transcripción de los genes blanco. El término NF-kappaB comúnmente se refiere específicamente a un heterodímero p50-RelA, que es el dímero común en la mayoría de las células (Hayden y Ghosh, 2011).

Estructuralmente, cada una de las proteínas de la familia NF- κ B comparte una región muy conservada NH₂-terminal, conocida como el dominio de homología Rel (RHD) de aproximadamente 300 aminoácidos (Figura 1A). RHD contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) y participa en la dimerización, la unión al ADN e interacción con las proteínas inhibidoras de I κ B (Liang et al, 2004). Las proteínas p65, RelB y c-Rel adicionalmente, poseen un dominio transactivacional C-terminal (TAD), necesario para la regulación positiva de la expresión de genes (Hayden y Ghosh, 2008). RelB tiene un zipper de leucina (LZ, por sus siglas en inglés), p52, p50 y sus precursores tiene regiones ricas en glicina (GRR, por sus siglas en inglés) y los precursores de este último, además, poseen regiones con homología a los dominios de la muerte (DD, por sus siglas en inglés) (Hayden y Ghosh, 2011).

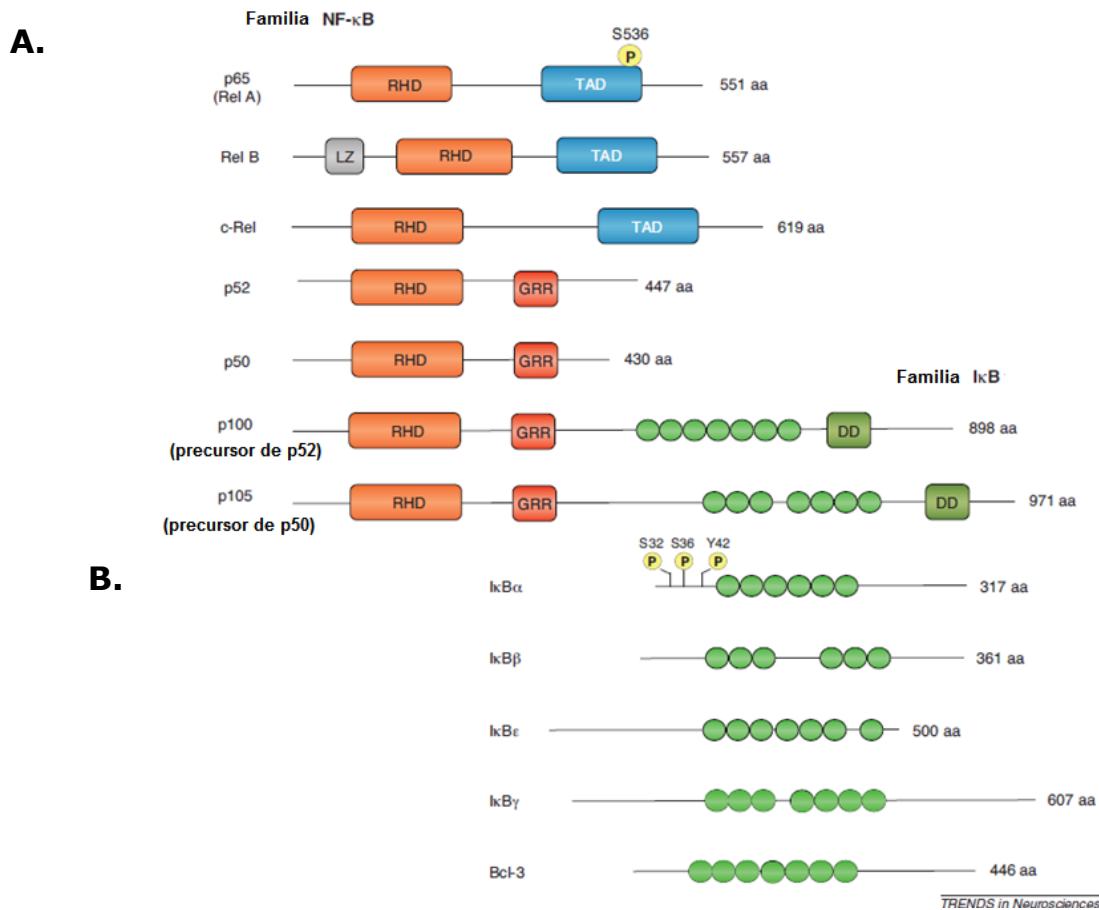


Figura 1. Diagrama esquemático, ilustrando los miembros de la familia NF- κ B e I κ B. **A.** Los miembros de la familia NF- κ B en mamíferos, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 y p52, juntos con p100 y p105 precursores de p52 y p50 comparten un conservado dominio homólogo multifuncional Rel (RHD). p65, RelB y c-Rel poseen un dominio transactivacional C-terminal (TAD) no relacionado, RelB tiene un zipper de leucina (LZ), p52, p50 y sus precursores tiene regiones rica en glicina (GRR) y los precursores de este último, además, poseen regiones con homología a los dominios de la muerte (DD). **B.** La proteína I κ B (p100, p105, I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ y Bcl-3) contiene motivos repetidos de anquirina en regiones C-terminal (denotado por óvalos verdes) que median la unión por RHDs (Hayden y Ghosh, 2008; Perkins, 2007) Figura tomada y modificada de Gutiérrez y Davies, 2011.

Inhibidores de NF- κ B (I κ B)

En la mayoría de los tipos celulares los dímeros de NF- κ B se encuentran predominantemente retenidos en el citosol, formando un complejo con proteínas inhibitoras de la familia I κ B (Malek et al, 2001); por lo tanto, estas proteínas mantienen la vía de NF- κ B inactiva (Malek et al, 2001). No obstante, en respuesta a diferentes estímulos los dímeros NF- κ B del citosol son liberados por su inhibidor y se translocan al núcleo, donde regularán la transcripción de genes específicos (O'Dea y Hoffmann, 2009; Perkins, 2006).

En mamíferos se han descrito seis isoformas de la proteína inhibidora I κ B: p100, p105, I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ y Bcl-3 (Figura 1B). Todas ellas tienen en común su estructura tridimensional y se distinguen por el número de repeticiones de los dominios de anquirina en la región C-terminal, responsables de la interacción con el dímero (Beinke y Ley, 2004). Varios estudios han demostrado la importancia de los sitios de fosforilación en I κ B α para regular la activación de NF- κ B (Hayden y Ghosh, 2004).

La unión de las proteínas I κ B con los dímeros NF- κ B, provoca que una de las dos secuencias o señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) quede oculta y por ello, el dímero debe primero disociarse del inhibidor para así, alcanzar su destino nuclear (Hayden y Ghosh, 2004). El proceso de separación de I κ B requiere de su fosforilación en los residuos Ser32 y Ser36, por un complejo de serina-treonina cinasas llamado IKKs (I κ B cinasas), que conlleva la liberación del dímero NF- κ B (Hayden y Ghosh, 2004).

Una vez fosforilado, I κ B α se poliubiquitina en los residuos de lisina 21 y 22, y son degradadas en el proteosoma 26S (Hayden y Ghosh,

2004). Sin embargo, I κ B α puede separarse de NF- κ B al ser fosforilado en el residuo Tyr 42 (Bui et al, 2001; Gallagher et al, 2007). Esta fosforilación induce la separación del inhibidor I κ B α de NF- κ B pero no su degradación en el proteosoma como ocurre en respuesta a la fosforilación de los residuos de serina (Gallagher et al, 2007).

Las I κ B α e I κ B β son las isoformas de la proteína inhibidora I κ B que se encuentran prácticamente en todos los tipos celulares y por ello regulan la mayor parte de los efectos de NF- κ B (Malek et al, 2001).

I κ B cinasas (IKKs)

La fosforilación del inhibidor I κ B en respuesta a distintos estímulos, requiere la activación catalítica de cinasas de serina-treonina, llamadas cinasas I κ B (IKKs) (Perkins, 2007). El complejo IKK está constituido por 3 subunidades: 2 con un dominio cinasa, IKK α e IKK β , y una subunidad reguladora, NEMO (IKK γ) (Perkins, 2007). Las cinasas IKK α e IKK β contienen tres dominios: uno dominio cinasa, un dominio *hélix-loop-helix* y un dominio de *leucine zipper* (Hayden y Ghosh, 2008; Perkins, 2007).

La proteína IKK γ regula la fosforilación de IKK β con la ayuda de una proteína rica en ácido glutámico, leucina, lisina y serina, permitiendo su activación. A su vez, el inhibidor I κ B α es fosforilado en la Ser 32 y Ser36 por IKK β activo (Gutiérrez y Davies, 2011). Todas estas cascadas de señalización convergen en la activación de las proteínas IKK y en la degradación de I κ B α permitiendo la liberación de los heterodímeros p50/ RelA (Gloire et al, 2006).

Vía canónica de activación de NF- κ B

La vía canónica (clásica) es la forma más común de activación de NF- κ B en todos los tipos celulares. Está relacionada con la activación de dímeros compuestos por RelA o C-Rel y p50 (O'Dea y Hoffmann, 2009). La forma de NF- κ B más abundante en las células de mamíferos es RelA/p50. La vía canónica se activa en respuesta a citocinas como TNF α , IL-1 (Hayden y Ghosh, 2004; Perkins, 2007). Como se mencionó antes, la activación de esta vía depende de la fosforilación de I κ B por I κ B cinasa- β (IKK β), marcándolas así para su ubiquitinización y posterior degradación en el proteosoma (Perkins, 2007). Por otro lado, siguiendo una vía alterna no canónica independiente del inhibidor I κ B, la activación de IKK α e IKK β puede dar lugar a la fosforilación de p105, el cual, tras un procesamiento proteolítico da lugar a la forma madura p50 (Perkins, 2007). Una vez liberado de su inhibidor, ya sea por remoción proteolítica de un fragmento de p105 o eliminación de I κ B, la NLS de RelA queda expuesta, lo que conlleva su translocación nuclear, donde desarrolla su función transcripcional uniéndose a los motivos κ B en el ADN, activando la expresión de genes determinados (Gloire et al, 2006; Perkins, 2007).

Las dos cinasas IKK α e IKK β no tienen la misma importancia en la activación de la vía canónica de NF- κ B. La IKK β se ha descrito como una cinasa predominante en la fosforilación de I κ B α y de p105 (Hayden y Ghosh, 2004).

Vía no canónica de activación de NF- κ B

La vía no canónica, también conocida como la vía I κ B independiente, se caracteriza por la activación del heterodímeros RelB/p52. Generalmente la activación de esta vía está relacionada con un número limitado de estímulos que incluyen la limfotoxina B, el ligando de CD40, y el factor de activación de las células B (O'Dea y Hoffmann, 2009). La activación de la vía no canónica de NF- κ B también depende de la activación del homodímeros IKK α a través de una cinasa llamada NIK (NF- κ B-inducing kinase, por sus siglas en inglés) (Hacker y Karin, 2006; Scheidereit, 2006; Sun, 2011).

La activación de NIK lleva a cabo la fosforilación de IKK α la cual por su parte es la responsable de la fosforilación de p100, que tras un procesamiento en el proteosoma da lugar a la forma activa p52 (Gloire et al, 2006; O'Dea y Hoffmann, 2009; Sun, 2011). La forma madura p52 se une a RelB provocando su translocación nuclear y la respuesta génica (Gloire et al, 2006; O'Dea y Hoffmann, 2009).

La vía canónica y no canónica de NF- κ B participan en la regulación transcripcional de diferentes genes (Hayden y Ghosh, 2004; Sun, 2011).

Vía atípica de activación de NF- κ B

La activación de esta vía está relacionada con la regulación, independiente de IKK, de NF- κ B y está caracterizada por la fosforilación de I κ B α en un residuo de tirosina (Tyr 42) en vez de los habituales residuos de serina 32 y 36, su disociación del dímero y la

subsecuente activación de NF- κ B (Gutiérrez y Davies, 2011). Diversos estímulos provocan la activación de la vía atípica (vía dependiente de tirosina cinasas) en el sistema nervioso entre los cuales están los factores neurotróficos, el peróxido, la eritropoyetina (Bui et al, 2001; Gallagher et al, 2007). Una vez fosforilado I κ B α se separa del heterodímero RelA/p50, permitiendo que el complejo NF- κ B entre en el núcleo y active diversos genes (Bui et al, 2001).

Diversos estudios han demostrado que las proteínas NF- κ B son modificadas posteriormente de la traducción, y esos cambios influyen en la actividad transcripcional. Algunos ejemplos de la modificación postraducciona incluyen la acetilación de p65 para facilitar la retención del complejo NF- κ B en el núcleo (Chen et al, 2001). Además, la S-nitrosilación de la cisteína 62 de p50 ha demostrado que afecta a NF- κ B la unión a ADN. De particular importancia en este trabajo es también la fosforilación de la subunidad RelA en el residuos de serina 536 (Sasaki et al, 2005).

♦ **NF- κ B EN EL SISTEMA NERVIOSO**

Una amplia variedad de señales extracelulares regulan la actividad de NF- κ B en el sistema nervioso, incluyendo neurotransmisores, neuropéptidos, neurotrofinas, las citocinas y NCAM (Memet, 2006; Romano et al, 2006). NF- κ B se ha asociado con la regulación de la expresión de un creciente número de genes implicados en el desarrollo neuronal y / o funcional, por ejemplo, los que codifican para NCAM (Simpson y Morris, 2000) y los receptores de algunos

neurotransmisores, neuropéptidos y factores neurotróficos (Kraus et al, 2003).

La señalización de NF- κ B está implicada en varios aspectos del desarrollo neural como es la regulación de la neurogénesis embrionaria y adulta (Young et al, 2006), la regulación de la supervivencia en determinadas poblaciones de neuronas periféricas y centrales (Memet, 2006) y en la promoción de la mielinización de los nervios periféricos (Nickols et al, 2003). En el sistema nervioso maduro, se ha implicado la señalización de NF- κ B en diversos procesos de aprendizaje y memoria (Kaltschmidt y Kaltschmidt, 2009; Romano et al, 2006). Además NF- κ B participa en las respuestas celulares neuronales en enfermedades neurodegenerativas. También se sabe es activado por algunas vías de transducción de señales asociadas a receptores de neurotransmisores como el glutamato, la forma secretada de la proteína precursora del β -amiloide (β APP) o estrés oxidativo (Qin et al, 2007). Por otra parte, NF- κ B se ha implicado en la apoptosis neuronal asociada con la lesión cerebral isquémica, en enfermedades neurodegenerativas y enfermedades inflamatorias (Malek et al, 2007).

Se ha establecido un papel clave en la señalización de NF- κ B en la promoción del crecimiento de los procesos neuronales en el sistema nervioso periférico (SNP) y el desarrollo del SNC (Gutiérrez et al, 2005; Gutiérrez et al, 2008; Sole et al, 2004). La señalización de NF- κ B contribuye al crecimiento de las dendritas corticales piramidales y a la promoción del crecimiento por efecto de NGF y BDNF en células PC12 y neuronas sensoriales, respectivamente (Gutiérrez et al, 2005), y es fundamental para el crecimiento neurítico inducido por el factor neurotrófico ciliar (CNTF, por sus siglas en inglés) en neuronas sensoriales (Gallagher et al, 2007).

♦ EVIDENCIA DE LA PROMOCIÓN E INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO NEURÍTICO REGULADA POR NF- κ B

Las neuronas sensoriales del ganglio nodoso sobreviven y extienden sus neuronas en respuesta a BDNF y CNTF (Davies 1993; Gutiérrez et al, 2005; Lee et al, 1994; Middleton et al, 2000).

En ratones, BDNF activa NF- κ B en etapa prenatal entre el día 15 y 17 de gestación (E-15 y E-17, respectivamente), sin embargo, entre E-18 y p1 (1 día después del nacimiento), la actividad basal de NF- κ B contribuye a que promueva el crecimiento de las neuritas, pero BDNF no activa directamente NF- κ B (Gavalda et al, 2009; Gutiérrez et al, 2005).

Durante una estrecha ventana de desarrollo, entre E-15 y E-17, BDNF activa la vía dependiente de tirosina cinasas NF- κ B, a través de la activación de los receptores TrkB (receptores tirosina cinasa tipo B) y la posterior activación de los miembros de la familia de las tirosina cinasas SYK, Src y Lck. Estas cinasas fosforilan a su vez I κ B α en Tyr 42 resultando en su disociación del dímero p65/p50 y el traslado de éste al núcleo, que promueve el crecimiento de las neuritas (Figura 2c) (Davies, 2003; Gavalda et al, 2009).

BDNF promueve el crecimiento neuronal en etapa postnatal. Por medio de la vía de señalización canónica (figura 2b). Los activadores de esta vía de señalización durante esta etapa del desarrollo, aún no han sido identificados (Gutiérrez et al, 2005).

La razón por la cual, en neuronas nodosas, hay este cambio de la vía atípica a la vía canónica, en la señalización de NF- κ B necesarios para que BDNF promueva el crecimiento del axón durante esta etapa del desarrollo, no es claro, pero puede que sea necesario para facilitar otros cambios fisiológicos o de desarrollo que ocurren en las neuronas durante este período (Gutiérrez y Davies, 2011).

NF- κ B también puede ejercer un efecto inhibitorio en el crecimiento neuronal. Y esto depende del mecanismo de activación (Gutiérrez et al, 2008).

Las neuronas simpáticas postnatales, sobreviven y extienden sus axones en respuesta a NGF, sin embargo, en etapa postnatal NGF no activa NF- κ B (Glebova y Ginty, 2005; Gutiérrez et al, 2008).

Se ha reportado que las neuronas simpáticas al ser tratadas con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , un potente activador de NF- κ B por la vía canónica), p65, p65/p50 o IKK β , aumentan la actividad transcripcional de NF- κ B, dando lugar a la inhibición del crecimiento neurítico, (figura 2a) (Gutiérrez et al, 2008).

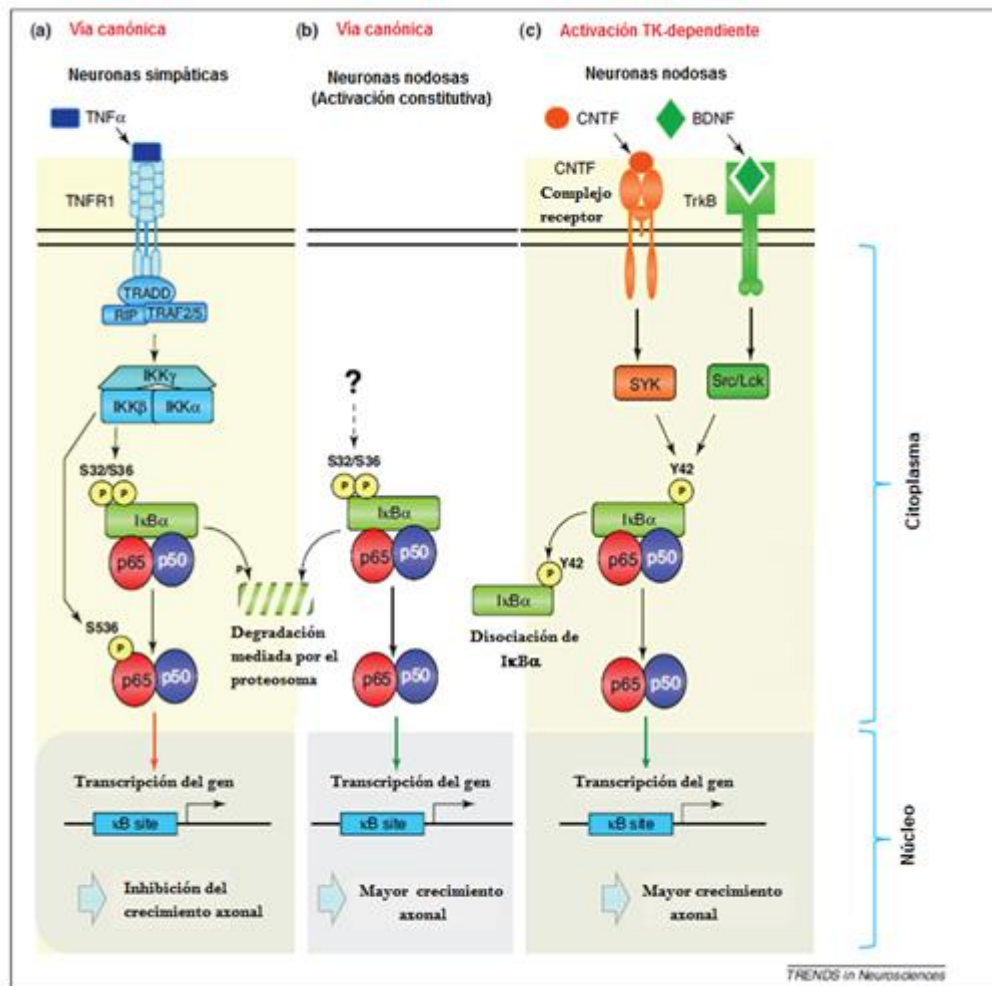


Figura 2. Vías de señalización de NF- κ B que regulan el

crecimiento de neuritas en cultivos neuronales. *La vía canónica en neuronas simpáticas (a), y neuronas sensoriales (b). La vía TK-dependiente en neuronas nodosas (c). (P) Fosforilación. Figura tomada y modificada de (Gutiérrez y Davies, 2011)*

Sin embargo, en neuronas sensoriales nodosas, la sobreexpresión de p65/p50 da lugar, a un incremento en el crecimiento de las neuritas, pero si, por el contrario, se sobreexpresa IKK β , éste inhibe el crecimiento de las neuronas, además de activar NF- κ B y fosforilar la proteína p65 en el residuo de serina 536. Dado que se ha demostrado que el efecto inhibitorio de NF- κ B, justamente depende de esta modificación por fosforilación del dímero activo, se ha podido concluir que, NF- κ B puede promover o inhibir el crecimiento neuronal dependiendo del mecanismo de activación (Gutiérrez et al, 2008). En efecto, si en este mismo grupo de células sensoriales nodosas se sobreexpresa IKK β y además se tratan con una proteína mutante p65 S536A, que previene la fosforilación en el residuo de serina 536 (S536), éste no inhibe la actividad transcripcional de p65, se observa que no hay inhibición del crecimiento (Gutiérrez et al, 2008).

Por otra parte han hecho experimentos sobreexpresando una dominante positiva como la proteína P65 S536D, la cual han demostrado que se comporta como una proteína p65 fosforilada en el residuo de serina 536 (Buss et al, 2004; Sasaki et al, 2005), la cual, produce inhibición del crecimiento en neuronas simpáticas y nodosas (Gutiérrez et al, 2008).

En resumen, NF- κ B promueve o inhibe el crecimiento axonal dependiendo del mecanismo de activación de NF- κ B y del estado de fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B (Gutiérrez et al, 2008).

Las diferentes actividades que tiene NF- κ B en estas dos poblaciones neurales (simpáticas y nodosas) es debido a las diferencias en su activación y subsecuente diferencia en el patrón de fosforilación de p65; en las neuronas simpáticas inhibe el crecimiento sin embargo en neuronas sensoriales promueve el crecimiento. Por lo anterior, se ha propuesto un mecanismo de activación de NF- κ B capaz de regular diferencialmente la promoción o inhibición del crecimiento neuronal (figura 3), el cual se basa en el funcionamiento de la flexibilidad de señalización de NF- κ B enfocado en el estado de fosforilación de p65 en S536 (Gutiérrez et al, 2008).

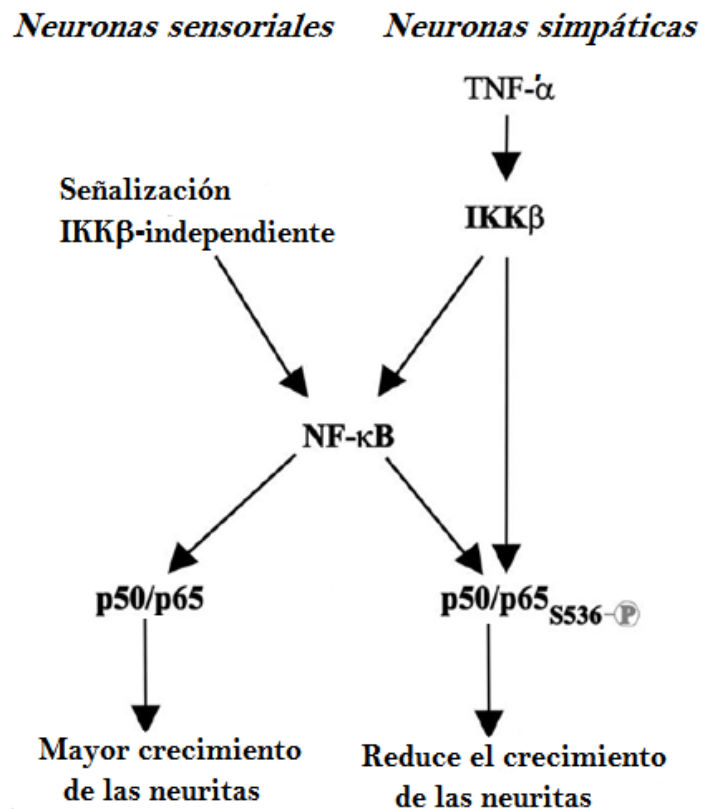


Figura 3. Modelo que muestra el mecanismo propuesto del funcionamiento de la flexibilidad de señalización de NF- κ B. Se basa en los efectos opuestos de la señalización de NF- κ B sobre el crecimiento de las neuritas, entre neuronas simpáticas y sensoriales. Figura tomada y modificada de (Gutiérrez et al, 2008).

Este mecanismo (figura 3), se basa en los efectos opuestos de la señalización de NF- κ B sobre el crecimiento de las neuritas. En el ganglio nodoso las neuronas sensoriales, al tratarlas con BDNF, por medio de la vía IKK-independiente, la señalización constitutiva de NF- κ B, conduce a una forma transcripcionalmente activa de p65 que no está fosforilado en S536, el cual promueve el crecimiento de las neuritas. En neuronas simpáticas, a través de la vía IKK-dependiente con una mayor señalización de NF- κ B después del tratamiento con TNF conduce a una forma transcripcionalmente activa de p65 que es fosforilado en la S536 e inhibe el crecimiento de las neuritas (Gutiérrez et al, 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como hemos visto, NF- κ B ejerce un control inhibitorio del crecimiento neurítico en neuronas simpáticas postnatales. Por otra parte, esta población neuronal depende de NGF tanto para su supervivencia como para el crecimiento neurítico. Esto nos lleva a preguntarnos si existe una relación antagónica entre NGF y NF- κ B sobre la regulación del crecimiento de procesos durante el desarrollo. Alternativamente, NF- κ B podría alterar su función reguladora, dependiendo de variaciones en los requerimientos de crecimiento de las neuronas simpáticas en distintos puntos del desarrollo. Con el objeto de esclarecer esta posibilidad, nos propusimos en este trabajo explorar el papel de NF- κ B en distintos puntos del desarrollo de las neuronas simpáticas y en particular la relación entre este factor transcripcional y la estimulación del crecimiento mediada por NGF en esta población neuronal.

OBJETIVO

En este trabajo me propongo determinar la relación entre el crecimiento axonal promovido por NGF durante el desarrollo de neuronas simpáticas y la regulación que NF- κ B ejerce sobre el crecimiento neurítico durante el desarrollo de esta misma población.

Para ello me propongo específicamente:

1. Determinar la interacción entre NGF y la activación de NF- κ B en distintos puntos del desarrollo de neuronas simpáticas.
2. Determinar si la influencia regulatoria de NF- κ B es la misma en todo momento durante el desarrollo postmitótica de las neuronas simpáticas o si su función varía a través del tiempo.
3. Determinar si la variación o constancia de la función de NF- κ B durante el desarrollo, se corresponde o correlaciona con el patrón de fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B.

METODOLOGÍA

♦ CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS NEURONALES

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas periféricas (neuronas simpáticas dependientes de NGF, y neuronas sensoriales nodosas dependientes de BDNF) obtenidos de ratones (CD1) en distintos estadios del desarrollo.

Los ratones CD1 se pusieron a cruzar y una vez que se observó el tapón fueron consideradas como preñadas y son E-1 (1 día de gestación), son E-18 cuando llevaban 18 días de gestación. Una vez que nacieron los ratones son P0, con 1 día postparto son P1.

Los platos de cultivo fueron tratados con poliornitina (Sigma; 0.5 mg/ml, en buffer de boratos 0.15 M, pH 8.3), se dejaron a temperatura ambiente por 8h, posteriormente se removió la poliornitina para lo cual se lavó con agua 3 veces, se dejaron secar y se les adicionó laminina [1mg/mL] en HBSS (Hank's Balance Salt Solution sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) para favorecer la adhesión de las células y se incubaron a 37 °C /1 hr.

Se sacrificó a los ratones CD 1 a través la decapitación del ratón prenatal o postnatal, se remueve la piel y cerebro, se corta por la mitad siguiendo la línea media. El SGC se reconoce al abrir el foramen yugular, por estar situado a un lado de la arteria carótida y el nodoso a lado del SCG, del nodoso se deriva el nervio vago. La disección se realiza en medio Leibowitz L-15, en un microscopio de disección y fuente de luz, con la ayuda de pinzas de micro disección de acero inoxidable (Dumont No.5) y tijeras de disección.

Para la disociación de las células se utilizó tripsina al 0.25% como agente proteolítico, incubando durante 20-30 minutos en HBSS (Hank's Balance Salt Solution sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) a 37°C. La digestión enzimática es detenida mediante el uso de suero fetal bovino (FBS) en medio F12, con el cual se realizaron 2 lavados y se centrifugó por 2 minutos a 1500 rpm, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS (Phosphate Buffer Saline; Gibco) y se centrifugó por 2 minutos a 1500 rpm.

La disociación se realizó de manera mecánica, utilizando una micropipeta y suavemente para evitar el daño celular.

Las transfecciones se realizaron por electroporación (Microporador mini digital bio technology), utilizando el kit de invitrogen para microporación. Las condiciones para la transfección de las células neuronales fueron: voltaje 1300, 30 pulsos y duración del pulso 1ms por pulso.

Las células disociadas y transfectadas resultantes del ganglio nodoso o SCG se sembraron en un medio con F12/DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con los siguientes suplementos: glutamina [2mM], N2 [1%], B27 [2%] y penicilina/estreptomina [1%] como antibióticos y sus respectivos factores neurotróficos: para las neuronas sensoriales con BDNF [10ng/mL] y para las neuronas simpáticas, NGF [10ng/mL].

Actividad de NF- κ B. Para estimar los niveles relativos de activación de NF- κ B, se transfectaron las células neuronales expresando un plásmido reportero que contiene la proteína verde fluorescente (GFP, siglas en inglés), bajo el control de un promotor dependiente de NF- κ B. una vez transfectadas las células, se sembraron en platitos de cultivo con laminina-poliornitina en dos condiciones con NGF y sin NGF. En ambas condiciones se adicionaron inhibidores de caspasas para inhibir

la apoptosis de las células y se mantuvieron en incubación a 37°C y 5%CO₂. A las 16h se realizó el conteo de las células fluorescentes. Se utilizaron ratones en diferentes etapas del desarrollo desde embrionarios E-16, E17, E-18 y postnatales P0, P1 y P2.

Sobreexpresión de p65. Se realizó una co-transfección por medio de electroporación, utilizando el plásmido p65, así como con YFP (Yellow Fluorescent Protein, por sus siglas en inglés) para poder visualizar las neuronas transfectadas. El cultivo control sólo fue transfectado únicamente con YFP. Se realizaron los cultivos en las etapas: E-17, E-18 y P1 de donde a E-17 y P1 el efecto era mucho más claro (datos no mostrados), por lo que los experimentos posteriores se realizaron a estas etapas.

Manipulación de la modulación de p65 por fosforilación: La manipulación de la fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB se llevó a cabo mediante la sobreexpresión de un plásmido que expresa una proteína p65 con una sustitución en la serina por una alanina en el residuo 536 que previene la fosforilación en este sitio pero no inhibe la actividad transcripcional de p65. No tiene efecto en la supervivencia de neuronas nodosas o simpáticas (O'Keeffe et al, 2008; Sasaki et al, 2005). Se co-transfectaron las neuronas simpáticas por medio de electroporación con la proteína mutante p65 (S536A) junto con YFP, en una segunda condición se co-transfectaron p65 junto con YFP y en una tercera condición como control, se transfectaron sólo con YFP.

Como último experimento, se transfectaron las neuronas simpáticas con un plásmido expresando una mutante dominante positiva fosfomimética p65 (S536D) que se comporta como fosfo p65 S536

constitutivamente activa (Sasaki et al, 2005) junto con YFP. Expresando esta mutante no tiene efecto en la supervivencia neuronal (O'Keefe et al, 2008). Como segunda condición se co-transfectaron con la mutante p65 S536A y YFP, como tercera condición se cotransfectó la proteína p65 junto con YFP y en un cuarta condición como control se transfectaron sólo con YFP.

Todos los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂ por 24h.

Para cada experimento se tomaron fotos a través de microscopio de fluorescencia (60 fotos por condición). La cuantificación de arborización y crecimiento neurítico se llevó a cabo mediante el análisis de *Sholl*, de acuerdo con un procedimiento descrito en (Gutiérrez y Davies, 2007).

♦ **Análisis de Sholl**

El análisis de Sholl (Sholl, 1953) es un método ampliamente utilizado para cuantificar y representar gráficamente las características morfológicas del árbol neurítico (Gutiérrez y Davies, 2007) En el procedimiento básico se cuentan el número de intersecciones de los procesos de las neuritas con una serie de anillos concéntricos centrados en el soma de la célula (Gutiérrez y Davies, 2007). Para lo cual se utilizó un método semiautomático que reconstruye el patrón completo de la intersección entre las neuritas y los anillos concéntricos (Gutiérrez y Davies, 2007). El perfil de Sholl se obtiene representando el número de intersecciones *versus* la distancia radial desde el soma celular (Gutiérrez y Davies, 2007). Con este análisis se permite tener una estimación de la longitud total del del árbol neurítico además de la cuantificación del número de eventos de bifurcación.

♦ **Tratamiento de datos de la actividad de NF- κ B**

Transcurridas 16 horas post-transfección se realizó el conteo de las células fluorescentes por cada condición (donde se sembró un número igual de células en cada condición). Se expresó el nivel de activación dividiendo el número de células fluorescentes en ambas condiciones entre el conteo medio de células fluorescentes en ausencia de NGF.

♦ **Normalización de datos P1 y E-17**

Para la normalización de los experimentos realizados, se determinó el número medio de intersecciones totales en las neuronas del grupo control. Cada valor de intersecciones para cada una de las neuronas en cada una de las distintas condiciones fue dividido entre el promedio de intersecciones totales en el control (YFP), con lo cual, el área bajo la curva dado por el perfil de sholl para el control es 1. De esta forma son comparables los datos de cada experimento.

INMUNOFLUORESCENCIA

Los cultivos de células neuronales SCG o nodosas se fijaron con 2mL de metanol frío (20°C) por 5 min, posteriormente se procedió a realizar 2 lavados con PBS (Gibco) de 5–10 min por lavado. Enseguida se procedió a incubar con Albúmina Sérica Bovina (ABS; Santa Cruz) en

PBS al 5% a temperatura ambiente por 1h para bloquear las posibles reacciones inespecíficas. Transcurrido el tiempo, se quitó la Albúmina Sérica Bovina en PBS al 5% e inmediatamente después se adicionó el anticuerpo primario: anti p65 (sensible a la proteína total, se encuentre o no fosforilada) o anti fosfo p65 (S36) (1:50; cell signaling technology) diluido en PBS con ABS al 1% y tritón al 0.1% y se incubó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 min cada lavado y se adicionó el anticuerpo secundario (marcado con rodamina) de conejo [anti-IgG; 1:1000] (*invitrogen*) diluida en PBS con ABS al 1%, se dejó incubar por 2h a temperatura ambiente, posteriormente se lavó con PBS, se observó en microscopio de fluorescencia en presencia de rodamina de las cuales se adquirieron imágenes para su posterior análisis.

♦ **Cuantificación de fluorescencia**

Las imágenes obtenidas de las inmunofluorescencias fueron analizadas por medio del programa Image J, por medio del cual se medió el nivel de fluorescencia de cada célula.

De cada célula analizada obtuvimos un área de ésta, su media, mínima y máxima "nivel de fluorescencia", con el fin de poder obtener el nivel de fosforilación en las diferentes condiciones.

♦ **Tratamiento de los datos de inmunofluorescencias**

De los datos obtenidos, primero a la media de cada dato se le resta su valor mínimo "de fluorescencia", con el fin de eliminar fondo de la imagen.

De estos datos se obtuvo el índice de fosforilación, para el caso de la comparación entre simpático y nodoso; se dividió la cantidad de proteína p65 fosforilado en neuronas simpáticas (grupo llamado pp65SCG) entre el promedio de la cantidad de proteína total p65 de las neuronas simpáticas (grupo llamado p65 SCG), en neuronas nodosas (grupo llamado pp65 nodoso) se dividió entre promedio de la cantidad total de proteína p65 en el nodoso, de esta forma se obtiene un valor relativo del nivel de fosforilación los cuales son comparables entre sí. Estos valores fueron graficados y se muestran en la figura 7.

En el caso de la comparación entre las etapas E-17 y p-1 en neuronas simpáticas, se dividió la cantidad fosforilada de fosfo p65 en p-1 (grupo llamado pp65 p1) entre el promedio de p65 total en p1 y la cantidad fosforilada de fosfo p65 en E-17 (grupo llamado pp65 E-17) entre el promedio de proteína total p65 en E-17.

♦ **Análisis estadístico**

Todos los resultados se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba post-hoc de Fisher para poder determinar diferencias entre los diferentes patrones observados. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Patrón de activación de NF- κ B en respuesta a NGF durante el desarrollo neuronal postmitótico.

Como se ha dicho, el aumento en la señalización de NF- κ B inhibe el crecimiento de las neuritas de las neuronas simpáticas postnatales, promoviendo, por el contrario, el crecimiento en neuronas sensoriales del ganglio nodoso (Gutiérrez et al, 2008). Dado que, por otra parte las neuronas simpáticas requieren NGF tanto para su supervivencia y crecimiento nos preguntamos cuál es la relación entre NGF y la actividad transcripcional de NF- κ B.

Se evaluó el patrón de activación de NF- κ B durante la etapa postmitótica del desarrollo de las neuronas simpáticas mediante la transfección, en neuronas en cultivo, de un plásmido reportero que contiene GFP, bajo el control de un promotor dependiente de NF- κ B. Para ello se establecieron cultivos primarios obtenidos en distintos puntos del desarrollo, comenzando por el día 16 de gestación (E16) hasta el día dos postnatal (P2). Las neuronas fueron cultivadas en presencia o ausencia de NGF. Dado que las neuronas simpáticas mueren por apoptosis en ausencia de NGF y esta apoptosis es dependiente de la activación de la vía de caspasas, todos los cultivos fueron suplementados con inhibidores de caspasas. Se realizó el conteo de las células fluorescentes a las 16 horas post-transfección y se expresó el nivel de activación dividiendo el número de células fluorescentes en presencia de NGF entre el conteo medio de células fluorescentes en ausencia de NGF. En la figura 4 se observa que NGF estimula la activación de NF- κ B sólo en etapa embrionaria en E-17, encontrándose

la mayor activación en E-18, y bajando en etapa postnatal aunque se sigue detectando cierta actividad transcripcional de NF- κ B (P-0 y P-2). Estos datos demuestran que NGF activa a NF- κ B exclusivamente en la etapa embrionaria desapareciendo esta capacidad en la etapa postnatal.

Debido a que las neuronas simpáticas en desarrollo requieren NGF para promover el crecimiento neurítico y por otra parte sabemos que NF- κ B ejerce una influencia inhibitoria sobre el crecimiento en esta población neuronal, deberíamos esperar que NGF regulara negativamente la activación de NF- κ B. Es decir, sorprendentemente, no sólo no observamos esto sino que por el contrario NGF estimula la actividad transcripcional de NF- κ B en la etapa embrionaria, careciendo de influencia sobre esta vía en la etapa postnatal.

Este resultado nos lleva por lo tanto a preguntarnos si NF- κ B lleva acabo la misma función tanto en la etapa embrionaria como en la etapa postnatal.

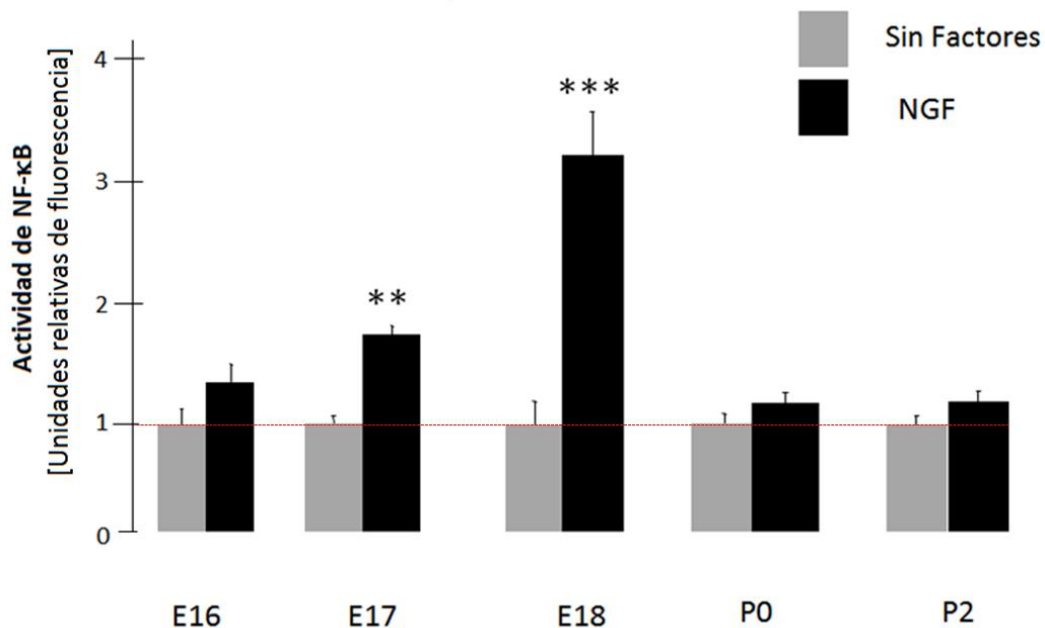


Figura 4. Patrón de activación de NF- κ B durante la etapa postmitótica del desarrollo de las neuronas simpáticas. Actividad transcripcional de NF- κ B en respuesta a NGF por medio de un plásmido

*reportero que contiene la proteína verde fluorescente (GFP), bajo el control de un promotor dependiente de NF- κ B, en diferentes etapas del desarrollo desde el día de gestación 16, hasta dos días postnatales, en células neuronales simpáticas, el conteo se realizó a las 16h post transfección. Las comparaciones estadísticas (ANOVA con post hoc de Fisher) se muestran con respecto a las neuronas control (sin factores) suplementadas con inhibidores de caspasas (** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).*

2. Efectos de la sobre expresión de NF- κ B durante la etapa prenatal

Con base en el resultado descrito en el apartado anterior decidimos determinar el efecto de sobre estimular NF- κ B en neuronas simpáticas en la etapa prenatal y contrastar este efecto con el reportado para neuronas postnatales. Para esto, se evaluó la sobreexpresión de la subunidad p65 de NF- κ B en neuronas simpáticas en etapa prenatal (E-17) y postnatal (P1), mediante la transfección con un plásmido de expresión conteniendo la región codificante de p65. Con objeto de identificar y visualizar a las neuronas transfectadas se co-transfectaron con un plásmido de expresión de la proteína YFP. El cultivo control fue únicamente transfectado con el plásmido que expresa la proteína YFP.

Tras llevar a cabo el procedimiento de transfección, las neuronas fueron mantenidas en cultivo, en presencia de NGF, durante 24 horas. Transcurrido este periodo de cultivo se adquirieron imágenes de las neuronas transfectadas y se cuantificó el crecimiento mediante el análisis de Sholl (Gutiérrez y Davies, 2007; Sholl, 1953). Este procedimiento permite cuantificar el patrón espacial de crecimiento de los árboles neuríticos (ver "análisis de Sholl" en la sección de

Metodología) basado en el conteo de intersecciones entre las neuritas y una serie de círculos concéntricos centrados en el soma de la neurona. Este análisis permite la estimación de la longitud total del árbol neurítico además de la cuantificación del número de eventos de bifurcación.

Los resultados en la figura 5, se muestra que en p1, la sobreexpresión de p65 da lugar reducción del 20% en el número de bifurcaciones (figura 5B) y de un 25% en la longitud total (figura 5C), con lo cual se observa una inhibición en el crecimiento de las neuritas que es estadísticamente significativa. En las figuras 5 D y E se muestran campos representativos de las neuritas control y transfectadas.

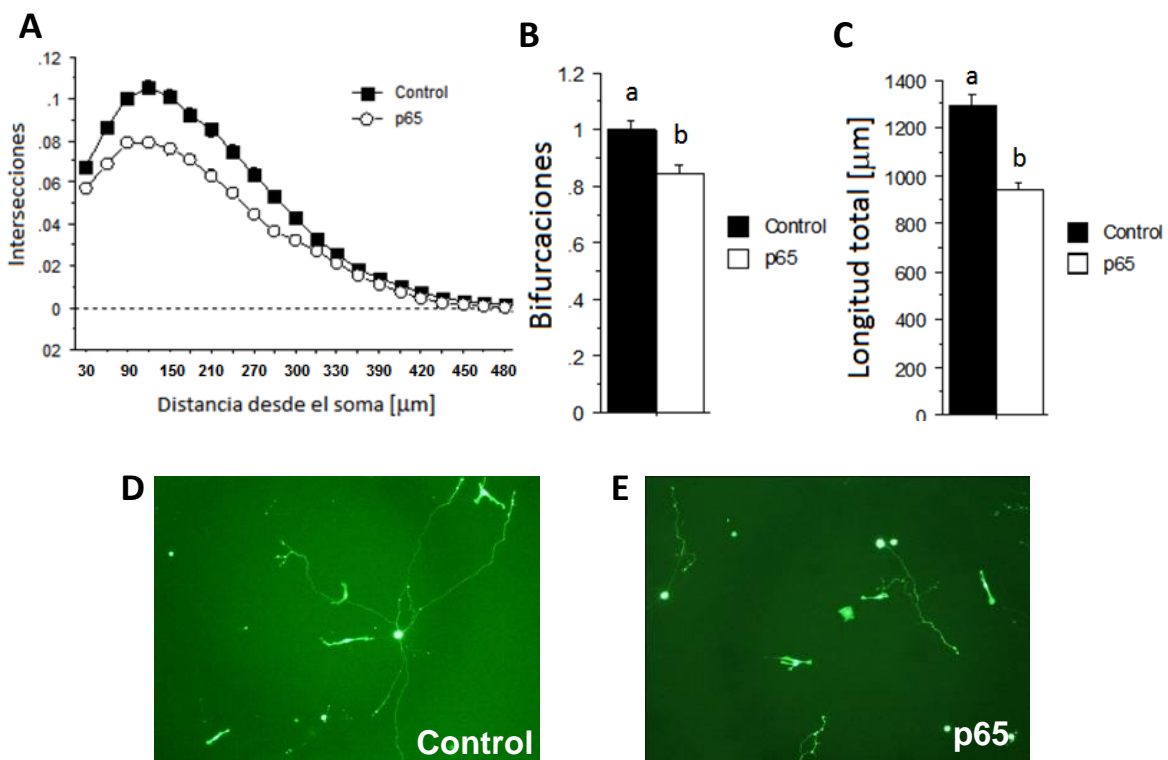


Figura 5. Sobreexpresión de la proteína p65 de NF- κ B durante la etapa postnatal en neuronas simpáticas. Sobreexpresando la subunidad p65 de NF- κ B se inhibe el crecimiento neurítico en cultivos de

células neuronales simpáticas postnatales. Las neuronas simpáticas P1 fueron transfectadas con un plásmido de expresión conteniendo la región codificante de p65 en conjunto con YFP para visualizarlas. Se muestra el análisis de Sholl (A), Número de Ramificaciones en las neuritas 24h post transfección (B) y longitud total de las neuritas 24h post transfección (C), e imágenes representativas de neuronas transfectadas con un plásmido control (D) o con un plásmido de sobreexpresión de p65 (E). Las comparaciones estadísticas (ANOVA con post hoc de Fisher) se muestran con respecto a las neuronas transfectadas con YFP como el grupo control (todos los datos fueron normalizados con respecto al control). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Las neuronas obtenidas en etapa embrionaria (figura 6) observamos que, contrariamente a lo que ocurre en neuronas postnatales, la sobreexpresión de p65 dio lugar a un incremento en el número de bifurcaciones con un incremento de un 80% (figura 6B), y en el tamaño de un 18% (figura 6C) y los cuales son estadísticamente significativos. En las figuras 6 D y E se muestran campos representativos de las neuritas control y transfectadas.

Este resultado muestra que la sobre activación de NF- κ B promueve el crecimiento neurítico en etapa embrionaria y lo inhibe en la etapa postnatal.

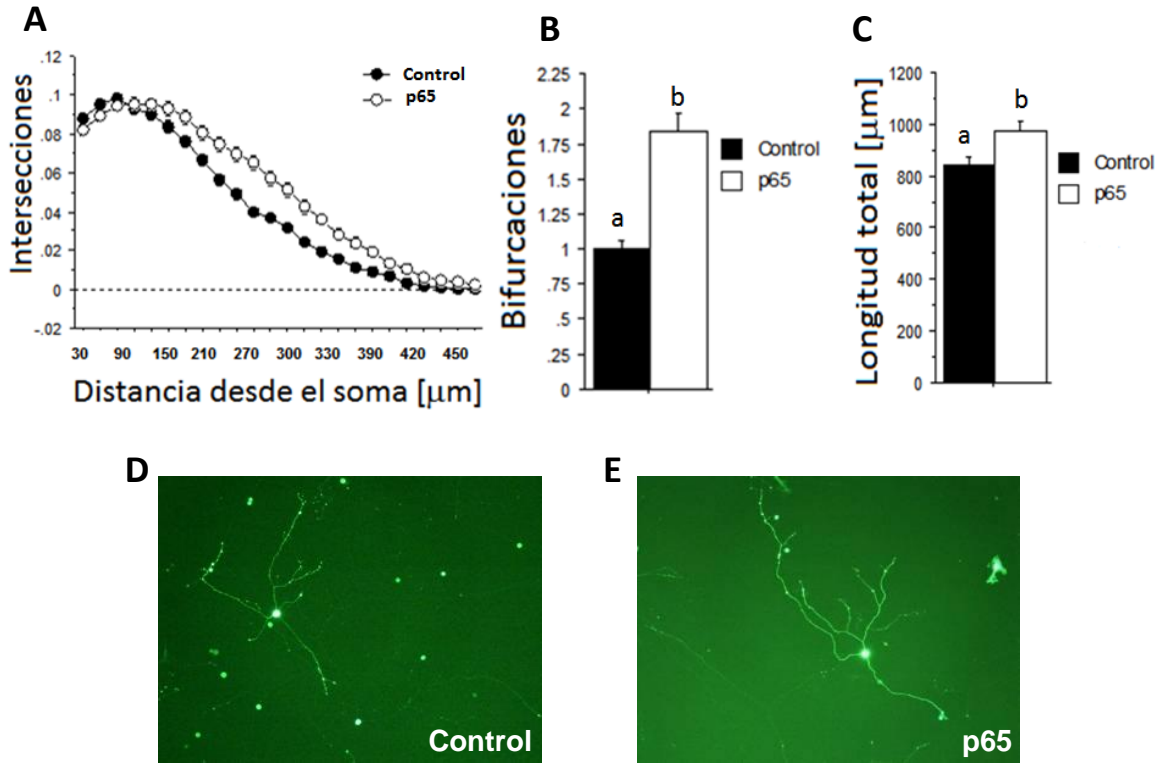


Figura 6. Sobreexpresión de la proteína p65 de NF- κ B durante la etapa embrionaria en neuronas simpáticas. Sobreexpresando la subunidad p65 de NF- κ B se promueve el crecimiento neurítico en cultivos de células neuronales simpáticas embrionarias (E-17). Neuronas simpáticas E-17 fueron transfectadas con un plásmido de expresión conteniendo la región codificante de p65 junto con YFP para visualizarlas. Se muestra el análisis morfológico de Sholl (**A**), Número de Ramificaciones en las neuritas 24h post transfección (**B**) y longitud total de la neurita 24h post transfección (**C**), e imágenes representativas de neuronas transfectadas con un plásmido control (**D**) o con un plásmido de sobreexpresión de p65 (**E**). Las comparaciones estadísticas (ANOVA con post hoc de Fisher) se muestran con respecto a las neuronas transfectadas con YFP como control. Los datos fueron normalizados con respecto al control (todos los datos

fueron normalizados con respecto al control). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3. Patrón de fosforilación de p65 en neuronas embrionarias y postnatales.

Como se mencionó anteriormente, la señalización de NF- κ B promueve el crecimiento axonal en neuronas sensoriales, pero lo inhibe en neuronas simpáticas. Esta diferencia en la función de NF- κ B se ha visto que se encuentra determinada por el patrón de fosforilación de la subunidad p65 (Gutiérrez et al, 2008). En la sección anterior, sin embargo, observamos que la influencia inhibitoria de NF- κ B en las neuronas simpáticas ocurre en la etapa postnatal pero no en la etapa embrionaria de la misma población en donde, por el contrario, la sobre expresión de NF- κ B estimula el crecimiento neurítico hasta en un 80% en el número de bifurcaciones y de un 18% en la longitud total. Esta inversión en la función de la vía de NF- κ B nos lleva a preguntarnos si, como sucede al contrastar neuronas sensoriales con neuronas simpáticas, se debe a una modificación en el patrón de fosforilación de la subunidad p65 o si es independiente de dicha modificación postraducciona.

Con objeto de determinar el patrón de fosforilación en la subunidad p65 de NF- κ B, llevamos a cabo la detección de fosfo p65 mediante inmunofluorescencia en neuronas en cultivo obtenidas tanto en E-17 como en P1.

Se llevó a cabo una cuidadosa cuantificación de la fosforilación mediante el muestreo extenso de células inmunoreactivas en cultivos derivados de ambas edades, contrastando el nivel medio de fluorescencia observada mediante anticuerpos anti fosfo p65 con la observada mediante anticuerpos anti p65 (sensibles a la proteína total, se encuentre o no fosforilada).

La comparación entre ambas etapas diferentes del crecimiento en neuronas simpáticas embrionarias (E-17) y postnatales (p1), mostró que los niveles de fosforilación de p65 son muy similares (Figura 7B). En contraste esto último, al comparar neuronas postnatales simpáticas con neuronas sensoriales del ganglio nodoso, corroboramos que hay una mayor cantidad de fosfo p65 en las neuronas simpáticas, que en las neuronas nodosas (figura 7A). En las figuras 7 C y D se muestran campos representativos de las inmunofluorescencias con anti fosfo p65 en dos diferentes etapas E-17 y p1.

Estos resultados sugieren que el nivel de fosforilación de p65 en neuronas simpáticas es el mismo, tanto en la etapa embrionaria como en la postnatal, por lo tanto la diferencia observada en la función de NF- κ B entre ambos puntos temporales del desarrollo es independiente de la modificación por fosforilación de la subunidad p65.

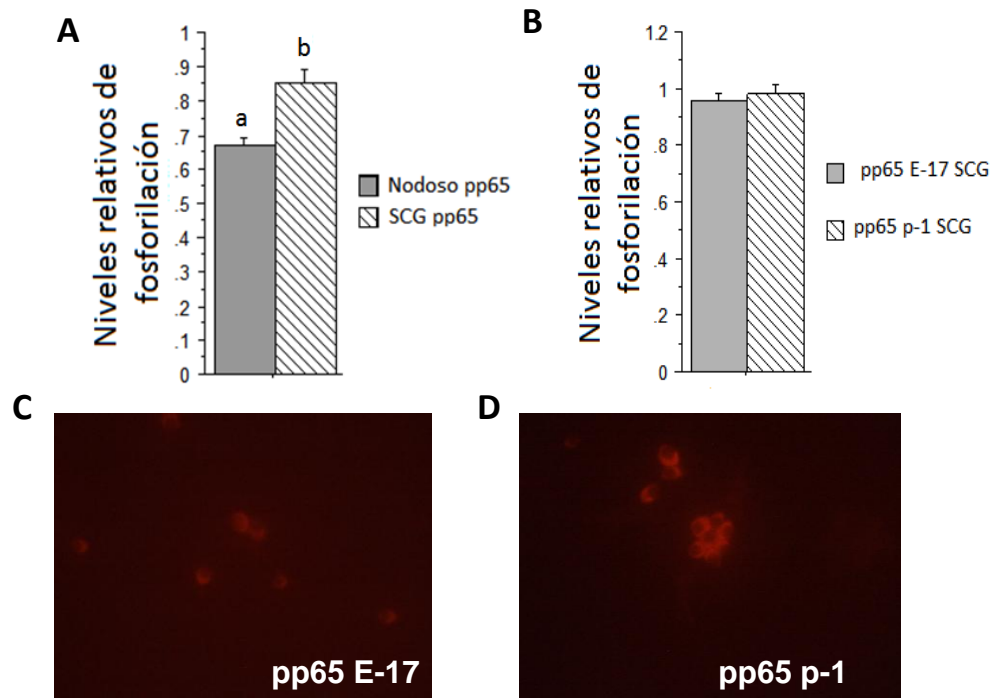


Figura 7. Patrón de fosforilación de p65 en cultivos de células neuronales simpáticas. Cuantificación de la fosforilación de p65 por inmunofluorescencia, mediante anticuerpos anti p65 o anti p65-S36. Se muestran la comparación de los niveles relativos de fosfo p65 en dos tipos neuronales diferentes, neuronas sensoriales y simpáticas, en etapa postnatal (p1) (**A**), así como en dos etapas diferentes del desarrollo E17 y p1 en neuronas simpáticas (**B**) e imágenes representativas de las neuronas simpáticas tratadas con anti p65-S536 en E-17 (**C**) y p-1 (**D**). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA con post hoc de Fisher, $p < 0.05$).

4. Efecto del bloqueo de la fosforilación de p65.

Para probar directamente si la fosforilación de p65 en S536 es necesaria tanto para la promoción como la inhibición del crecimiento en neuronas simpáticas, llevamos a cabo transfecciones en estas neuronas con un plásmido que expresa una proteína p65 con una serina sustituida por una alanina en el residuo 536 que previene la fosforilación de este sitio pero no bloquea la actividad transcripcional de p65 (p65 S536A) (Gutiérrez et al, 2008; Sasaki et al, 2005).

Con objeto de visualizar a las neuronas transfectadas, el vector de expresión de p65 S536A fue co-transfectado con un plásmido de expresión de YFP. Un segundo cultivo fue transfectado con vector de expresión de p65 (la proteína normal) en combinación con YFP, mientras que el grupo control fue únicamente transfectado con YFP. En la figura 8 B y C se muestra, para neuronas simpáticas postnatales, el efecto de inhibición causado por la sobre expresión de p65 en comparación con el cultivo control que como se había mencionado en p65 produce una inhibición de un 20% en las bifurcaciones y de una 25% en el tamaño. La transfección con la proteína mutante p65 S536A, sin embargo, dio lugar a una reversión del efecto de la inhibición causada por p65, de un 16% tanto en el número de bifurcaciones como en la longitud total, estadísticamente significativa. En las figuras 8 D, E y F se muestran campos representativos de las neuritas control y transfectadas con la proteína p65 y la mutante p65 S536A.

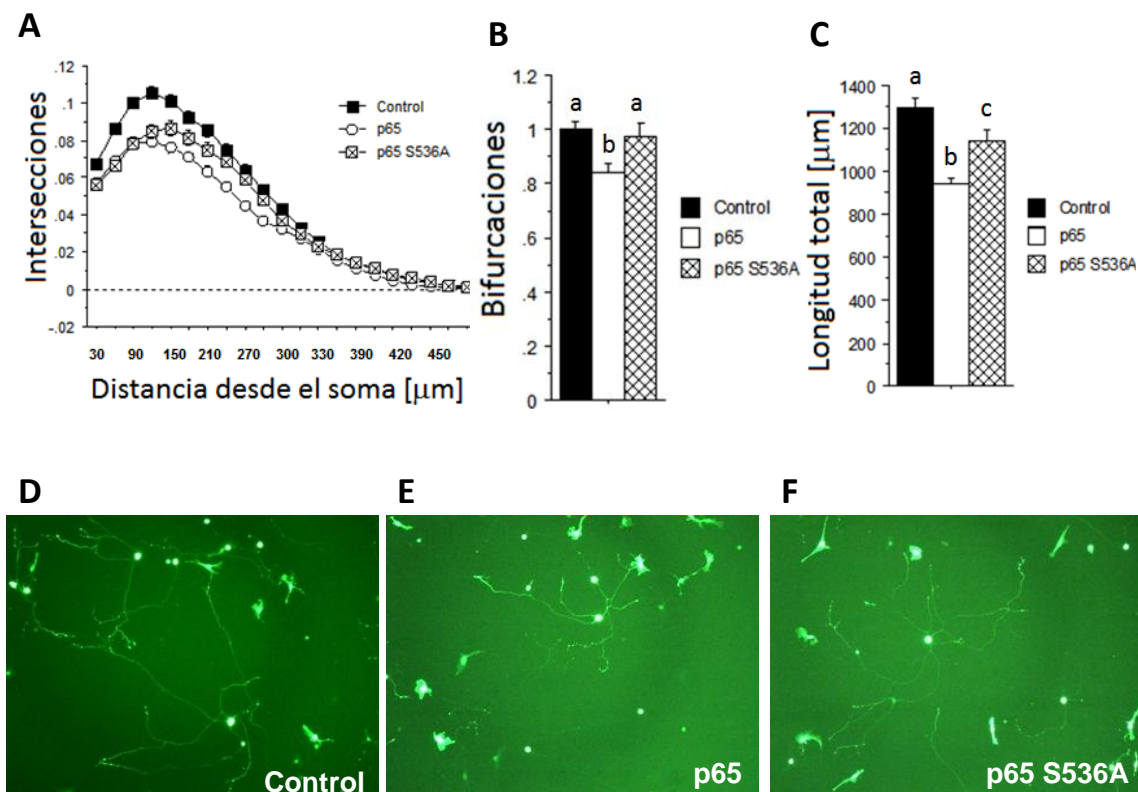


Figura 8. Manipulación del patrón de fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B en neuronas simpáticas postnatales. Neuronas simpáticas P1 fueron transfectadas con un plásmido de expresión conteniendo la región codificante de p65, o mediante la expresión de variantes de la proteína con mutaciones en residuos específicos de serina (p65 S536A) que participan en la modulación adicional de NF- κ B en neuronas simpáticas (p1), cada condición fue transfectado junto con YFP. Se muestra el análisis morfológico de Sholl (**A**), Número de Ramificaciones en las neuritas 24h post transfección (**B**) y longitud total de la neurita 24h post transfección (**C**) e imágenes representativas de neuronas transfectadas con un plásmido control (YFP) (**D**), con un plásmido de sobreexpresión de p65 (**E**), o con la proteína mutante p65 S536A (**F**). Las comparaciones estadísticas

(ANOVA con post hoc de Fisher) se muestran con respecto a las neuronas transfectadas con YFP como control, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Al realizarse este mismo estudio en la etapa embrionaria (E-17), (Figura 9) se observa que la mutante p65 S536 revierte la promoción del crecimiento neurítico causado por p65 en estos cultivos. Esta reversión se observa tanto en el perfil del análisis de Sholl (Figura 9A, como en el número de bifurcaciones con una reversión del efecto de un 33% (figura 9B) y la longitud total del árbol neurítico de un 26% (figura 9C). En las figuras 9 D, E y F se muestran campos representativos de las neuritas control y transfectadas con la proteína p65 y la mutante p65 S536A.

Estos resultados demuestran que para la promoción en etapa prenatal o inhibición en etapa postnatal del crecimiento en las neuronas simpáticas es necesaria la fosforilación de p65 en el residuo de serina 536.

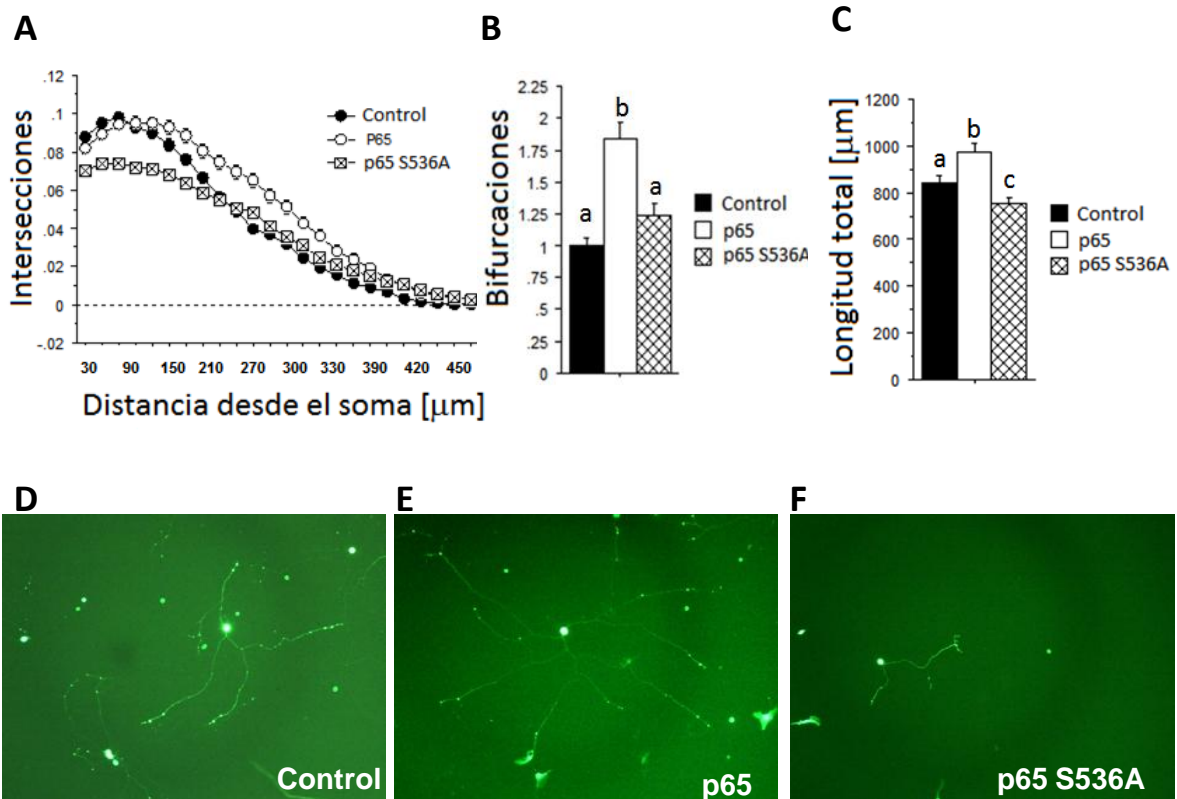


Figura 9. Manipulación del patrón de fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B en neuronas simpáticas embrionarias. Neuronas simpáticas E-17 fueron transfectadas con un plásmido de expresión conteniendo la región codificante de p65, o mediante la expresión de variantes de la proteína con mutaciones en residuos específicos de serina (p65 S536A) que participan en la modulación adicional de NF- κ B en neuronas simpáticas (E-17), cada condición fue transfectado junto con YFP. Se muestra el análisis morfológico de Sholl (**A**), Número de Ramificaciones en las neuritas 24h post transfección (**B**) y longitud total de la neurita 24h post transfección (**C**) e imágenes representativas de neuronas transfectadas con un plásmido control (**D**) o con un plásmido de sobre expresión de p65 (**E**), o con la proteína mutante p65 S536A (**F**). Las comparaciones estadísticas (ANOVA con post hoc de Fisher) se muestran con respecto a las neuronas

transfectadas con YFP control. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Finalmente, en una cuarta condición, se realizaron transfecciones con la mutante positiva fosfomimética p65 (S536D) que se comporta como fosfo p65 S536 activa constitutivamente (Sasaki et al, 2005). La expresión de esta mutante no tiene efecto en la supervivencia (Gutiérrez et al, 2008).

Como se observa en la figura 10, esta mutante promueve el crecimiento neurítico a niveles comparables con la promoción inducida por la sobre expresión de la proteína p65 normal, demostrando que la proteína fosfomimética no sólo no inhibe el crecimiento en neuronas embrionarias sino que lo potencia al mismo nivel que la proteína normal, hay una reversión del efecto producido por la proteína p65 S536A, observándose un crecimiento de hasta un 94% en el número de bifurcaciones (figura 10B) y de un 41% en la longitud total (figura 10C). En las figuras 10 D, E, F y G se muestran campos representativos de las neuritas control, las transfectadas con la proteína p65 y las mutantes p65 S536A y p65 S536D.

Estos resultados muestran que la modificación por fosforilación en la serina 536 de p65 es necesaria tanto para la inhibición en la etapa postnatal como para la promoción en la etapa embrionaria.

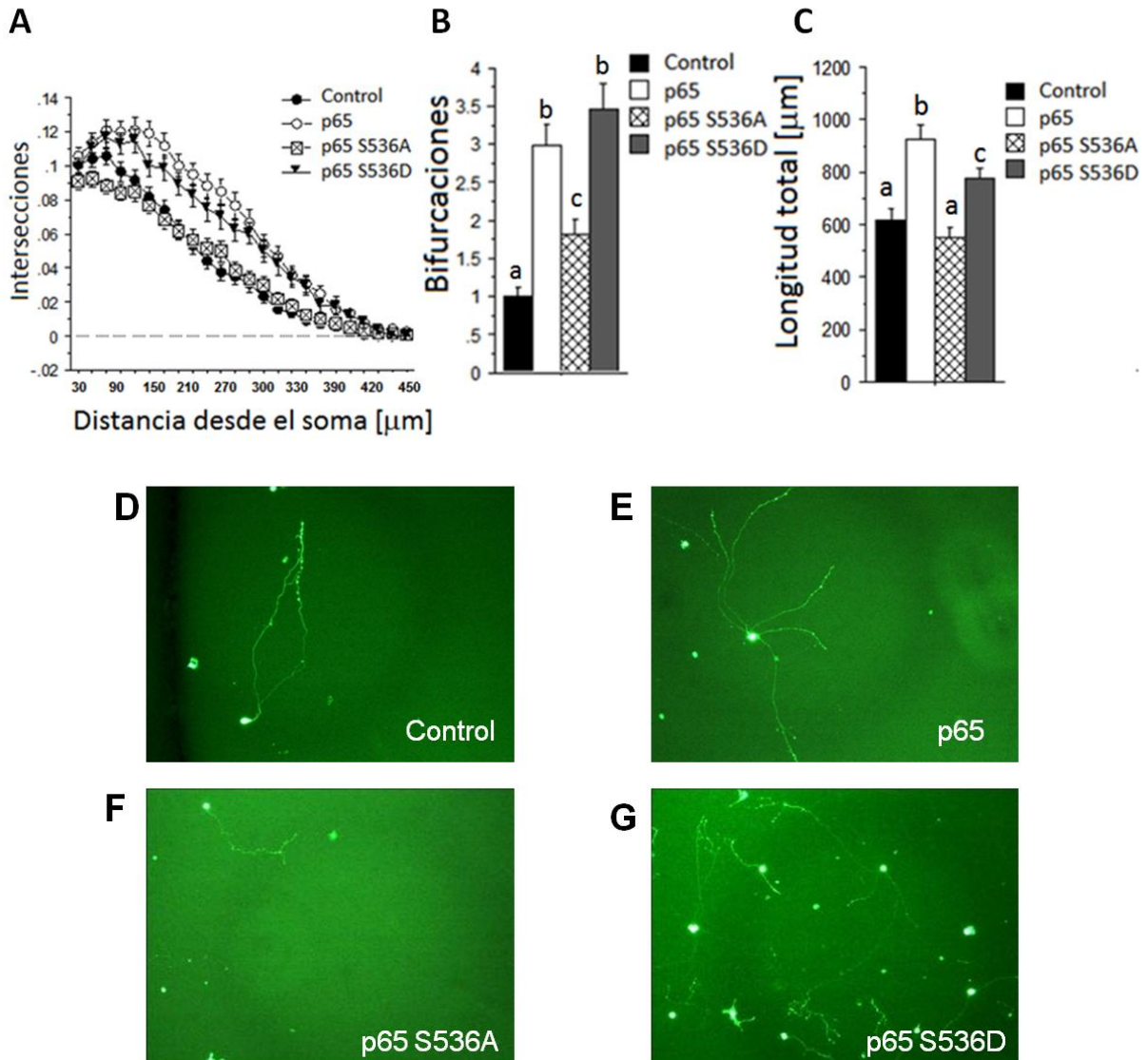


Figura 10. Manipulación del patrón de fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B en neuronas simpáticas en etapa embrionaria. Neuronas simpáticas E-17 fueron transfectadas con un plásmido de expresión conteniendo la región codificante de p65, o mediante la expresión de variantes de la proteína con mutaciones en residuos específicos de serina (p65 S536A y p65 S536D) que participan en la modulación adicional de NF- κ B en neuronas simpáticas (E-17), cada condición fue transfectado junto con YFP para visualizarlas. Se muestra el análisis morfológico de Sholl (**A**), Número de Ramificaciones

en las neuritas 24h post transfección (**B**) y longitud total de la neurita 24h post transfección (**C**) e imágenes representativas de neuronas transfectadas con un plásmido control (**D**) o con un plásmido de sobreexpresión de p65 (**E**), así como variantes de la proteína p65: la proteína mutante p65 S536A (**F**) y p65 S536D (**G**). Las comparaciones estadísticas (ANOVA con post hoc de Fisher) se muestran con respecto a las neuronas transfectadas con YFP control. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Para determinar la interacción entre NGF y la activación de NF- κ B se realizó un monitoreo de la activación de NF- κ B en presencia y ausencia de NGF, a lo largo del desarrollo en neuronas simpáticas de ratón. En este estudio se demostró que NGF activa NF- κ B en etapa embrionaria, mas no en etapa postnatal en neuronas simpáticas en desarrollo. Además se sabe que la señalización constitutiva de NF- κ B en neuronas simpáticas no promueve el crecimiento neurítico (Gutiérrez et al, 2008). Por otra parte se sabe que BDNF promueve el crecimiento de las neuritas en neuronas sensoriales nodosas (Davies 1993). BDNF activa NF- κ B en estas neuronas durante una estrecha ventana del desarrollo antes del nacimiento entre la etapa E16-E17 (Gavalda et al, 2009). Además la señalización basal de NF- κ B contribuye a la promoción de BDNF en el crecimiento de las neuritas en neuronas nodosas postnatales, pero sin activar directamente NF- κ B en esta particular etapa del desarrollo (Gutiérrez et al, 2005). Tomando en conjunto todo lo anterior, se muestra que NF- κ B desempeña un papel importante en la modulación del crecimiento neurítico y en las ramificaciones de las terminales de los axones.

Este cambio regulatorio en la actividad de NF- κ B, nos llevó a preguntarnos si puede haber alguna diferencia en la modulación del crecimiento entre la etapa prenatal y postnatal en neuronas simpáticas, por lo que se procedió a sobreexpresar la proteína p65 de NF- κ B en etapa embrionaria (figura 6), encontramos que hay promoción del crecimiento neuronal en la etapa embrionaria hasta en un 80% en las bifurcaciones y de un 18% en el tamaño mientras que en etapa postnatal (figura 5) se observó que sobreexpresando p65, se inhibe el crecimiento de los procesos neuronales dando la mayor inhibición en la

longitud de los procesos de en un 25%. Estos resultados obtenidos en etapa postnatal son congruentes a lo reportado, ya que se han realizado estudios incrementando la señalización de NF- κ B en neuronas simpáticas por sobreexpresión de IKK β , p65 o p65/p50, encontrando que se reduce en gran medida el crecimiento neurítico, indicando que la señalización de NF- κ B puede ejercer un potente efecto inhibitorio en el crecimiento de las neuritas en neuronas simpáticas en etapa postnatal (Gutiérrez et al, 2008), sin embargo, sorprendentemente, se encontró que en etapa prenatal, la sobreexpresión de la subunidad p65 de NF- κ B promueve el crecimiento de las neuritas en las neuronas simpáticas. Lo cual es sumamente inesperado, ya que en una misma población neuronal, en dos etapas diferentes del desarrollo, al sobreexpresar p65 hay un cambio en la señalización de NF- κ B, de promoción del crecimiento a inhibición del crecimiento.

La proteína p65 es constitutivamente fosforilada en la serina 536 en neuronas simpáticas postnatales, mientras que las neuronas nodosas contienen bajos niveles de p65 fosforilado en S536 (Gutiérrez et al, 2008). BDNF promueve el crecimiento de las neuritas en neuronas nodosas en estado embrionario gracias a la ausencia de fosforilación de p65 en la Ser536, mientras que la fosforilación de p65 en la Ser536 ejerce un marcado efecto inhibitorio en el crecimiento de las neuritas en neuronas sensoriales y simpáticas posnatales (Gutiérrez et al, 2008). Se propone que la diferencia entre estas dos etapas (prenatal y postnatal) en el ganglio simpático puede ser debido a el estado de fosforilación en la subunidad p65 de NF- κ B, es decir, si p65 se encuentra fosforilado inhibirá el crecimiento neuronal y si se encuentra no fosforilado, esta promoverá el crecimiento en esta misma población neuronal.

Para determinar si había diferencias en el nivel de fosforilación en neuronas simpáticas en estas dos etapas (E-17 y P-1) del desarrollo, se realizaron inmunofluorescencias, ya que de acuerdo al mecanismo

propuesto en la figura 3, al encontrarse fosforilado la proteína p65 este inhibirá el crecimiento neurítico, pero si se encuentra sin fosforilar la proteína p65, esta promoverá el crecimiento neurítico.

El análisis se realizó por medio de un anticuerpo anti-p65 que determina la cantidad de proteína total de p65 (se encuentre o no fosforilada) (figura 7B), y otro específico para p65 en su forma fosforilada; interesantemente, se encontró que no hay diferencias en la fosforilación de la subunidad de p65 de NF- κ B en neuronas embrionarias y postnatales simpáticas. Para validar el método se compararon dos poblaciones neuronales diferentes en este caso neuronas nodosas y simpáticas, ya que, sabemos que hay un nivel de fosforilación muy bajo en las neuronas nodosas en contraste con las neuronas simpáticas (Figura 7A) (Gutiérrez et al, 2008).

Se sabe que el nivel de fosforilación de p65 en S536 se eleva aún más en neuronas simpáticas al ser tratadas con TNF α o por sobreexpresión de IKK β . Por otra parte la proteína p65 fosforilado en S536 es detectable en neuronas nodosas al sobreexpresar IKK β , dando lugar a la inhibición del crecimiento de las neuritas en estas población neuronal (Gutiérrez et al, 2008).

Dado lo anterior, y que sabemos que p65 es la responsable de la promoción del crecimiento en etapa prenatal e inhibición del crecimiento neurítico en etapa postnatal en neuronas simpáticas y de acuerdo al modelo propuesto en la figura 3, se decidió probar si la fosforilación de p65 en la Ser 536 es la responsable del efecto observado en las neuronas simpáticas.

Se procedió a sobreexpresar la proteína p65 con una serina sustituida por una alanina en la posición 536, que se sabe, revierte el efecto de la inhibición del crecimiento neurítico en células neuronales nodosas y simpáticas postnatales ya que con esta mutante se impide la

fosforilación en este residuo (S536) pero no suprime la actividad transcripcional de p65 (Gutiérrez et al, 2008).

Para investigar si el grado de fosforilación de p65 en S536 es necesario para promover o inhibir el crecimiento en las neuronas simpáticas, se realizaron transfecciones con la mutante de p65 S536A. Nuestros resultados muestran que bloqueando la fosforilación de la serina 536 con la proteína mutante p65 S536A inhibimos el crecimiento en neuronas simpáticas en etapa prenatal en un 33% para las bifurcaciones y de un 26% para la longitud total, y que en etapa postnatal se abate la inhibición del crecimiento de las neuritas en un 16% (figuras 8 y 9).

Además se utilizó la proteína fosfomimética p65 S536D que sabemos que se comporta como p65 fosforilado en S536 (Sakurai et al, 1999); con la expresión de esta mutante en neuronas simpáticas en etapa prenatal (figura 10), se encontró hay un incremento en el crecimiento de las neuritas en hasta en un 94% en las bifurcaciones y un 41% en la longitud total, sugiriendo la necesidad de fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B. Esto nos sugiere que el requerimiento de la forma fosforilada de p65 en la serina 536 es el mismo en ambas etapas del crecimiento (E-17 y P-1) en esta población neuronal.

El modelo propuesto en la figura 3, se plantea la posibilidad de efectos opuestos en el crecimiento de las neuritas en dos poblaciones diferentes como las neuronas simpáticas y nodosas, y que esta es mediada por el estado de fosforilación de p65 en S536, ya que si es activado IKK β en neuronas simpáticas, p65 se encuentra fosforilada en la serina 536, produciendo la inhibición del crecimiento de las neuritas, mientras que en neuronas nodosas por medio de una señalización independiente de IKK β , p65 permanece sin fosforilar este residuo(S536), con lo cual promueve el crecimiento de las neuritas (Gutiérrez et al, 2008); sin embargo, los resultados obtenidos nos llevan a plantear que

este modelo no es general, ya que al contrastarlo con nuestros resultados encontramos que sobreexpresando p65 en las neuronas simpáticas en etapa embrionaria se promueve el crecimiento de las neuritas, sin embargo en etapa postnatal se inhibe el crecimiento de las neuritas y en ambos casos es necesario que p65 se encuentre fosforilado en la Ser536, es decir, que la subunidad p65 de NF- κ B no necesariamente requiere estar fosforilado o no fosforilado para promover o inhibir, respectivamente, el crecimiento neuronal (figura 11). Esto nos lleva a pensar que la regulación neuronal vía NF- κ B es mucho más compleja de lo esperado, y el mecanismo por el cual NF- κ B en particular, promueve o inhibe el crecimiento de las neuritas debe ser otro diferente que la fosforilación de ese residuo (S536).

Neuronas simpáticas

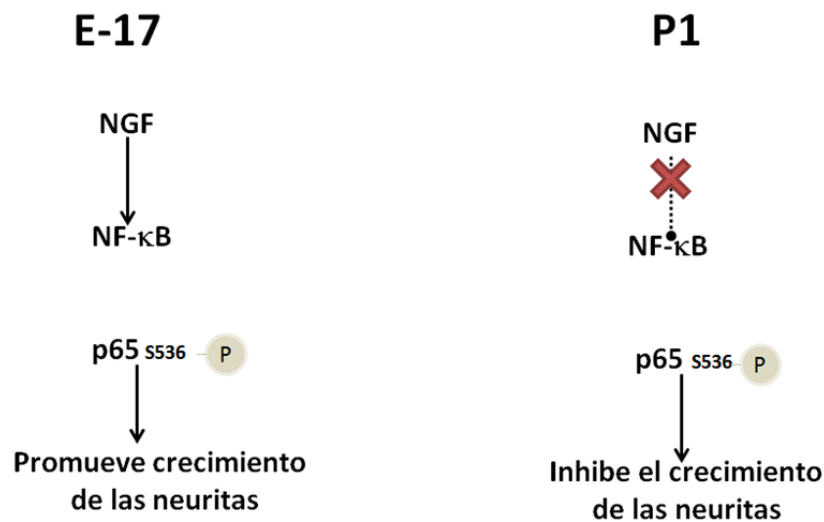


Figura 11. Modelo de la vía de señalización de NF- κ B en las neuronas simpáticas. De acuerdo a los resultados obtenidos, las neuronas simpáticas necesitan estar fosforilado la proteína p65 para promover o inhibir el crecimiento neurítico.

No podemos descartar la posible participación de otras cinasas que modifiquen a la proteína p65 en las neuronas en desarrollo. La serina 536 de la proteína p65 es muy conocida, ya que es el blanco de varias cinasas incluyendo IKK β , RSK1, IKK ϵ y TBK1 (Jeong et al, 2005; Sakurai et al, 1999) Esto podría plantear la posibilidad que otra vía de señalización podría influenciar el estado de fosforilación de p65 de las neuronas en particular y por lo tanto modular la función de NF- κ B en el crecimiento axonal y dendrítico.

También es posible que las proteínas de NF- κ B sean modificadas posteriormente de la traducción, y esos cambios influyan en la actividad transcripcional. Algunos ejemplos, incluyen la acetilación de p65 para facilitar la retención del complejo NF- κ B en el núcleo (Chen et al, 2001), la S-nitrosilación de la cisteína 62 de p50 ha demostrado que afecta a NF- κ B la unión a ADN (Sasaki et al, 2005).

Otra posibilidad es que existan estímulos externos que limiten el crecimiento de las neuritas del ganglio simpático, en particular en etapa postnatal.

CONCLUSIONES

Se determinó la interacción entre NGF y la activación de NF- κ B, demostrando que NGF activa NF- κ B en etapa embrionaria (E-17), y deja de hacerlo en etapa postnatal (P1), siendo en la etapa embrionaria en la cual NF- κ B promueve el crecimiento neurítico en neuronas simpáticas, y en etapa postnatal lo inhibe, comprobamos que la influencia regulatoria de NF- κ B no es la misma a lo largo del desarrollo en neuronas simpáticas. Para ambas etapas, encontramos que es necesario que se encuentre fosforilado la proteína p65 en la Serina 536.

Con esto se demuestran que, NF- κ B puede estimular o inhibir el crecimiento de las neuritas en desarrollo y que es dependiente del estado de fosforilación de p65, es decir, requiere estar fosforilado la subunidad p65 en la Serina 536 en neuronas del ganglio cervical superior simpático. Pero esto no es general como se creía, ya que en contraste con el ganglio nodoso este no requiere estar fosforilado para promover el crecimiento neurítico, por lo que el mecanismo por el cual NF- κ B regula el crecimiento e inhibición de las neuritas es diferente a la fosforilación de p65 en S536, y que esta regulación es mucho más complejo de lo esperado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bartkowska K, Paquin A, Gauthier AS, Kaplan DR, Miller FD (2007) Trk signaling regulates neural precursor cell proliferation and differentiation during cortical development. *Development* **134**: 4369-4380.
- Baskin DG, Figlewicz DP, Woods SC, Porte D, Jr., Dorsa DM (1987) Insulin in the brain. *Annu Rev Physiol* **49**: 335-347.
- Beinke S, Ley SC (2004) Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* **382**: 393-409.
- Bui NT, Livolsi A, Peyron JF, Prehn JH (2001) Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha. *J Cell Biol* **152**: 753-764.
- Buss H, Dorrie A, Schmitz ML, Hoffmann E, Resch K, Kracht M (2004) Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J Biol Chem* **279**: 55633-55643.
- Carlson M. Bruce M, PhD (2009) *Embriología Humana y Biología del desarrollo*, (4º Edición). Editorial Mosby.
- Colas JF, Schoenwolf GC (2001) Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* **221**: 117-145.
- Chen L, Fischle W, Verdin E, Greene WC (2001) Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* **293**: 1653-1657.

- Davies AM (1993) p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins *Neuron*. **11**: 565-74.
- Davies AM, Lee KF, Jaenisch R (2003) Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *EMBO J* **22**: 2537-2545.
- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* **40**: 209-227.
- Gallagher D, Gutiérrez H, Gavalda N, O'Keeffe G, Hay R, Davies AM (2007) Nuclear factor-kappaB activation via tyrosine phosphorylation of inhibitor kappaB-alpha is crucial for ciliary neurotrophic factor-promoted neurite growth from developing neurons. *J Neurosci* **27**: 9664-9669.
- Gavalda N, Gutiérrez H, Davies AM (2009) Developmental switch in NF-kappaB signalling required for neurite growth. *Development* **136**: 3405-3412.
- Gibson DA, Ma L (2011) Developmental regulation of axon branching in the vertebrate nervous system. *Development* **138**: 183-195.
- Giordano G, Costa LG (2011) Measurements of neuronal apoptosis. *Methods Mol Biol* **758**: 179-193.
- Glebova NO, Ginty DD (2005) Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu Rev Neurosci* **28**: 191-222.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J (2006) NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* **72**: 1493-1505.
- Gotz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 777-788.

- Gutiérrez H, Davies AM (2007) A fast and accurate procedure for deriving the Sholl profile in quantitative studies of neuronal morphology. *J Neurosci Methods* **163**: 24-30.
- Gutiérrez H, Davies AM (2011) Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-kappaB. *Trends Neurosci* **34**: 316-325.
- Gutiérrez H, Hale VA, Dolcet X, Davies A (2005) NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* **132**: 1713-1726.
- Gutiérrez H, O'Keefe GW, Gavalda N, Gallagher D, Davies AM (2008) Nuclear factor kappa B signaling either stimulates or inhibits neurite growth depending on the phosphorylation status of p65/RelA. *J Neurosci* **28**: 8246-8256.
- Hacker H, Karin M (2006) Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* **2006**: re13.
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**: 2195-2224.
- Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**: 344-362.
- Hayden MS, Ghosh S (2011) NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* **21**: 223-244.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
- Jeong SJ, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Park HU, Brady JN (2005) A novel NF-kappaB pathway involving IKKbeta and p65/RelA Ser-536 phosphorylation results in p53 Inhibition in the absence of NF-kappaB transcriptional activity. *J Biol Chem* **280**: 10326-10332.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2009) NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**: a001271.

- Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C (2005) Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* **1745**: 287-299.
- Kraus J, Borner C, Giannini E, Hollt V (2003) The role of nuclear factor kappaB in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene. *Mol Pharmacol* **64**: 876-884.
- Lee KF, Davies AM, Jaenisch R (1994) p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development* **120**: 1027-1033.
- Liang Y, Zhou Y, Shen P (2004) NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol* **1**: 343-350.
- Malek R, Borowicz KK, Jargiello M, Czuczwar SJ (2007) Role of nuclear factor kappaB in the central nervous system. *Pharmacol Rep* **59**: 25-33.
- Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G (2001) IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* **276**: 45225-45235.
- Memet S (2006) NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol* **72**: 1180-1195.
- Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, Wyatt S, Pennica D, Jaffray E, Hay RT, Davies AM (2000) Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol* **148**: 325-332.
- Netter FH (2002) *Sistema Nervioso: Anatomía y Fisiología*, Editorial Elsevier-Masson.
- Nickols JC, Valentine W, Kanwal S, Carter BD (2003) Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat Neurosci* **6**: 161-167.

- Noback RCPD (1980) *Sistema Nervioso Humano. Fundamentos de Neurobiología*, Editorial McGraw-Hill.
- O'Dea E, Hoffmann A (2009) NF-kappaB signaling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **1**: 107-115.
- O'Keefe GW, Gutiérrez H, Pandolfi PP, Riccardi C, Davies AM (2008) NGF-promoted axon growth and target innervation requires GITRL-GITR signaling. *Nat Neurosci* **11**: 135-142.
- Ohnuma S, Harris WA (2003) Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* **40**: 199-208.
- Perkins ND (2006) Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* **25**: 6717-6730.
- Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 49-62.
- Qin ZH, Tao LY, Chen X (2007) Dual roles of NF-kappaB in cell survival and implications of NF-kappaB inhibitors in neuroprotective therapy. *Acta Pharmacol Sin* **28**: 1859-1872.
- Rao Y, Wong K, Ward M, Jurgensen C, Wu JY (2002) Neuronal migration and molecular conservation with leukocyte chemotaxis. *Genes Dev* **16**: 2973-2984.
- Romano A, Freudenthal R, Merlo E, Routtenberg A (2006) Evolutionarily-conserved role of the NF-kappaB transcription factor in neural plasticity and memory. *Eur J Neurosci* **24**: 1507-1516.
- Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W (1999) IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* **274**: 30353-30356.
- Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P, Longo DL (2005) Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I{kappa}B{alpha}-independent NF- κ B pathway. *J Biol Chem* **280**: 34538-34547.

- Scott Gilbert F (2005) *Biología del desarrollo*, (7ª edición). Editorial Médica panamericana.
- Scheidereit C (2006) IκB kinase complexes: gateways to NF-κB activation and transcription. *Oncogene* **25**: 6685-6705.
- Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-κB by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**: 921-928.
- Shikanai M, Nakajima K, Kawauchi T (2011) N-cadherin regulates radial glial fiber-dependent migration of cortical locomoting neurons. *Commun Integr Biol* **4**: 326-330.
- Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* **87**: 387-406.
- Simpson CS, Morris BJ (2000) Regulation of neuronal cell adhesion molecule expression by NF-κB. *J Biol Chem* **275**: 16879-16884.
- Smith JL, Schoenwolf GC (1997) Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci* **20**: 510-517.
- Sole C, Dolcet X, Segura MF, Gutiérrez H, Diaz-Meco MT, Gozzelino R, Sanchis D, Bayascas JR, Gallego C, Moscat J, Davies AM, Comella JX (2004) The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-κB signaling. *J Cell Biol* **167**: 479-492.
- Sun SC (2011) Non-canonical NF-κB signaling pathway. *Cell Res* **21**: 71-85.
- Williams ME, de Wit J, Ghosh A (2010) Molecular mechanisms of synaptic specificity in developing neural circuits. *Neuron* **68**: 9-18.
- Wojcik-Stanaszek L, Gregor A, Zalewska T (2011) Regulation of neurogenesis by extracellular matrix and integrins. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **71**: 103-112.

- Wolpert L (2009) *Principios del desarrollo*, (3° edición). Editorial Médica Panamericana.
- Young KM, Bartlett PF, Coulson EJ (2006) Neural progenitor number is regulated by nuclear factor-kappaB p65 and p50 subunit-dependent proliferation rather than cell survival. *J Neurosci Res* **83**: 39-49.