



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Efecto de la axotomía sobre la expresión *in vivo* del factor de crecimiento nervioso y tirosina hidroxilasa en el ganglio cervical superior de la rata.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LIBB. Berardo Manuel Sánchez Tafolla

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Fredy Cifuentes Navarro
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Rudolf Marinus Buijs
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Septiembre, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C.P. AGUSTÍN MERCADO
Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM
Presente

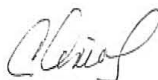
Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión de día 17 de septiembre del 2018, el Subcomité Académico acordó nombrar el siguiente Jurado para Examen de **Maestría en Ciencias del/la Lic. en Inv. Biomédica Básica. Sánchez Tafolla Berardo Manuel** con número de cuenta 101000721, con la tesis titulada "Efecto de la axotomía sobre la expresión del factor de crecimiento nervioso y tirosina hidroxilasa en el ganglio cervical superior de la rata", dirigida por el/la Dr(a). Cifuentes Navarro Fredy Roberto.

Jurado integrado por los doctores:

PRÉSIDENTE	Hiriart Urdanivia Marcía
VOCAL	Aguilar Roblero Raúl
VOCAL	Escobar Rodríguez Martha Lilia
VOCAL	González Arenas Aliesha Araceli
SECRETARIO	Cerbón Cervantes Marco Antonio

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de febrero del 2019.
COORDINADORA



DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

El presente trabajo se realizó dentro del programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas, con sede en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con financiamiento del proyecto CONACYT #128332, bajo la tutoría del Dr. Fredy Cifuentes Navarro y con el Dr. Rudolf Marinus Buijs y el Dr. Juan Carlos Gómora Martínez como miembros del comité tutorial.

Berardo Manuel Sánchez Tafolla fue becado durante sus estudios de maestría por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), becario # 270191.

ÍNDICE:

• Agradecimientos	5
• Lista de abreviaturas	7
• RESUMEN	8
• INTRODUCCIÓN	
PARTE 1: Neurotrofinas y factor de crecimiento nervioso.	
Descubrimiento de las neurotrofinas.	10
Familia de las neurotrofinas.	12
Factor de crecimiento nervioso.	13
Acción del factor de crecimiento nervioso.	16
PARTE 2: Axotomía del GCS como herramienta experimental.	
Expresión del factor de crecimiento nervioso en el GCS.	22
Axotomía del GCS.	23
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
METODOLOGÍA	30
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	55
ANEXOS	56
REFERENCIAS	65

AGRADECIMIENTOS:

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, por su apoyo en mi formación académica y para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento de este proyecto y el otorgamiento de una beca para mis estudios de posgrado.

Al Dr. Fredy Cifuentes Navarro, por abrirme las puertas de su laboratorio y por su valiosa dirección para la planeación, desarrollo, discusión y conclusión de este proyecto. Por sus enseñanzas, su paciencia y sus consejos dentro y fuera del laboratorio que permitieron materializar una idea y darle forma, logrando avanzar un paso adelante en la generación del conocimiento.

Al Dr. Miguel Morales Mendoza, por la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Por sus constantes recomendaciones y discusiones que permitieron cumplir con los objetivos planteados.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Juan Carlos Gómora y Dr. Rudolf Buijs. Por evaluaciones estrictas, recomendaciones y gran número de preguntas generadas en un principio que permitieron definir un objetivo y responderlo mediante la aplicación rigurosa del método científico. A los miembros del jurado, por sus correcciones, recomendaciones, y preguntas para la escritura de esta tesis.

A Pedro Medina, por su importantísima ayuda y enseñanza para el manejo experimental de los animales. A María Elena Zetina, por su gran labor como técnica del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda día con día, su valiosa amistad, experiencias y permitirme aprender de cada uno de ellos. Gracias Rommel, Diana, Anabel, Jesica, Filiberto y Ángeles, los considero un equipazo.

Al Dr. Everardo Hernández Plata, por su ayuda para la implementación de las técnicas de Biología Molecular que permitieron llevar a cabo este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por dar tanto al país, con tan poco.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y todo el personal que lo conforma.

A mis amigos, científicos y no científicos: Daniela V, Mariana Esther M, Liber P, Alejandro F, Alejandra RV, Laurita D, los biomédicos, los teóricos, los compañeros de clases y las personas valiosas que conocí en Biomédicas. Gracias por lo que pudimos compartir y permanecer a mi lado. Esta experiencia no hubiera sido lograda ni la hubiera disfrutado tanto sin su compañía. Por los que no pudieron acompañarme hasta este momento, esto también va por ustedes.

A mis tutores y profesores, que me han enseñado el mundo de la ciencia, lo bueno y lo complicado, por seguir cultivando ese deseo de continuar en este camino mágico y misterioso.

A Ana VJ, por ser mi mejor amiga, cómplice y persona especial. Por todo lo que somos, lo que hemos aprendido, conocido, ñoñeado, saboreado y disfrutado juntos. Por el valor y coraje que me has enseñado para seguir mis sueños.

Por último, pero mi mayor agradecimiento: A mi familia. A mis papás José y Catarina, por ser mi mayor orgullo y a quien más admiro. Por su apoyo incondicional, amor y cariño cada día de mi vida. A mis hermanos, por ser mis grandes compañeros, amigos y modelos a seguir. Y al pequeño Elián. Por formar la mejor familia que podría tener y formarme como la persona que soy.

Muchas gracias a todos. Misión cumplida.

LISTA DE ABREVIATURAS:

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

AP-1: Proteína activadora 1

Axt: Rata con axotomía del GCS.

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro.

Ctl: Rata control.

EE: Error estándar.

ERK: Cinasa relacionada con la señal extracelular de Ras.

F-TrkB: Forma completa del receptor TrkB.

GCS: Ganglio cervical superior.

kDa: Kilodaltones.

JNK: Cinasa c-Jun N-terminal.

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

NF-κB: Factor nuclear κB.

NT: Neurotrofina.

p75: Receptor de neurotrofinas p75.

PC: Proteína convertasa.

pb: Pares de bases.

proNGF: Precursor de NGF.

PI3K: Cinasa de fosfatidil inositol 3.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero

Rt: Rata con axotomía del GCS y restitución exógena de NGF.

RT-PCR: Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa.

TH: Tirosina hidroxilasa.

T-TrkB: Forma truncada del receptor Trk-B.

Trk: Receptor de cinasa relacionado con tropomiosina.

WB: Western Blot.

RESUMEN

El factor de crecimiento nervioso (**NGF**) es un miembro de la familia de las neurotrofinas que se expresa en las neuronas del sistema nervioso simpático durante el desarrollo y su expresión disminuye a partir de la etapa adulta. La expresión de NGF es abundante en los órganos inervados por las neuronas simpáticas, por lo que se acepta la idea de que el NGF que requieren las neuronas en la etapa adulta proviene del órgano blanco. NGF es producido inicialmente como precursores (de 34 y 27kDa) y procesado por acción de convertasas para formar la proteína de 13.2kDa. NGF tiene efectos de sobrevivencia o muerte neuronal, que dependen del tipo de receptor al que se una. NGF también regula la expresión de tirosina hidroxilasa (TH), enzima clave en la producción de catecolaminas e indicador de la actividad simpática.

La axotomía es una estrategia experimental que interrumpe el suministro de NGF de los órganos blanco. En el ganglio cervical superior (GCS), parte del sistema nervioso simpático, la axotomía causa cambios en la morfología y función de las neuronas. Se desconoce la capacidad de las neuronas ganglionares para expresar NGF en condiciones en las que su suministro normal desde el órgano blanco ha sido interrumpido. En el presente estudio se determinó la expresión *in vivo* de NGF en el GCS axotomizado de rata tanto en ARN mensajero (ARNm) como en las diferentes isoformas de la proteína, así como la expresión de ARNm de TH.

Se encontró que en el GCS aumenta la expresión de ARNm de NGF después de 7 días post-axotomía, mediante experimentos de RT-PCR. Este aumento se revierte al restituir de forma exógena el NGF. La axotomía no cambia los niveles de la forma madura de la proteína (13.2kDa), determinado por experimentos de Western Blot. Se observó en cambio la disminución en los niveles de los intermediarios de NGF inmaduro de 27 y 34kDa. La restitución de exógena de NGF revierte estos cambios. Lo anterior indica que el GCS tiene la capacidad de producir NGF maduro ante la falta de un suministro externo para mantener su nivel, aunque existe un cambio en la dinámica del procesamiento de la proteína. La axotomía no modifica la expresión de TH, lo cual refleja que el NGF producido en el GCS es funcional.

Por último, se caracterizó la expresión de los distintos receptores a neurotrofinas en neuronas simpáticas. Se encontró la presencia de ARNm tanto de la forma completa como troncada del receptor TrkB, con mayor presencia de la forma troncada, y se discute el posible mecanismo efector de NGF que incluye al receptor TrkB, no considerado en estudios previos.

Los resultados de la presente tesis son parte de las siguientes publicaciones:

Vega A, Cancino-Rodezno A, Valle-Leija P, **Sánchez-Tafolla BM**, Elinos D, Cifuentes F, Morales MA (2015). "Neurotrophin-dependent plasticity of neurotransmitter segregation in the rat superior cervical ganglion in vivo". *Developmental Neurobiology* 76(8), 832-846.

Valle-Leija P, Cancino-Rodezno A, **Sánchez-Tafolla BM**, Arias E, Elinos D, Feria J, Zetina ME, Morales MA, Cifuentes F (2017). "Presence of Functional Neurotrophin TrkB Receptors in the Rat Superior Cervical Ganglion". *Frontiers in Physiology* 8 (474).

INTRODUCCIÓN

PARTE 1: NEUROTROFINAS Y FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO

DESCUBRIMIENTO DE LAS NEUROTROFINAS

Durante el desarrollo del sistema nervioso, las neuronas están sujetas a mecanismos que aseguran su correcta diferenciación, sobrevivencia y conexión con otras células. La investigación de estos mecanismos comenzó durante las décadas de 1930 y 1940 cuando Rita Levi-Montalcini y Viktor Hamburguer demostraron en el sistema nervioso periférico que los blancos neuronales promueven la sobrevivencia y mantenimiento de las neuronas ganglionares que los inervan, a través de proteínas secretadas llamadas neurotrofinas (Levi-Montalcini y Booker, 1960).

A partir de este descubrimiento surgió la denominada teoría neurotrófica (revisada por Purves *et al.*, 2012), la cual postula que:

- Durante el desarrollo del sistema nervioso las neuronas compiten por una cantidad limitada de factores tróficos producidos en los órganos blancos que inervan y su sobrevivencia depende de recibir un aporte mínimo de estos factores.
- De lo contrario, la neurona no sobrevive debido a la activación de mecanismos de muerte celular programada (**Figura 1**).
- Los factores tróficos también determinan el mantenimiento apropiado de las conexiones ya establecidas entre las neuronas y sus blancos.
- Los tejidos de los órganos blancos sintetizan solamente los factores tróficos adecuados a las neuronas en desarrollo que los inervan.

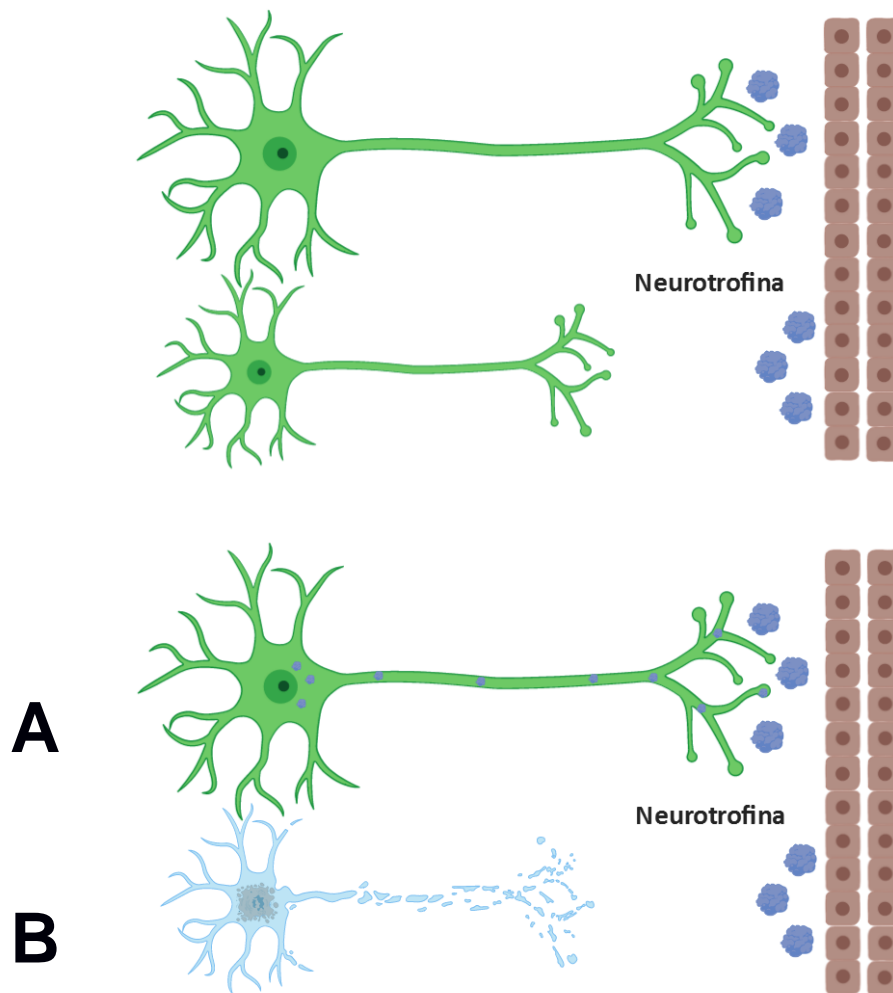


Figura 1: Teoría neurotrófica

El aporte de factores tróficos producidos en el órgano blanco permite la supervivencia y mantenimiento de procesos neuronales (A). Aquellas neuronas que no reciben un aporte mínimo de neurotrofinas son eliminadas (B).

La teoría neurotrófica permitió comprender la forma en que se forman, se desarrollan y mantienen las conexiones entre las neuronas y sus blancos, que pueden ser otras neuronas, músculos, órganos, vasos sanguíneos u otros tejidos.

FAMILIA DE LAS NEUROTROFINAS.

Actualmente el término neurotrofina se aplica a la familia de proteínas encargadas de funciones de desarrollo, supervivencia y señalización en neuronas del sistema nervioso. Entre otras funciones de estas proteínas, se descubrió que regulan el crecimiento axonal y dendrítico, la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Revisado por Tyler *et al.*, 2002 y Gómez-Palacio-Schjetnan *et al.*, 2013).

La primera neurotrofina descubierta fue el factor de crecimiento nervioso (“nerve growth factor”, **NGF**). La familia de las neurotrofinas está conformada además por el factor neurotrófico derivado de cerebro (“brain-derived neurotrophic factor”, **BDNF**), la neurotrofina 3 (**NT-3**) y la neurotrofina 4 (**NT-4**), junto con el homólogo de éste último **NT-5** en mamíferos (**Figura 2**).

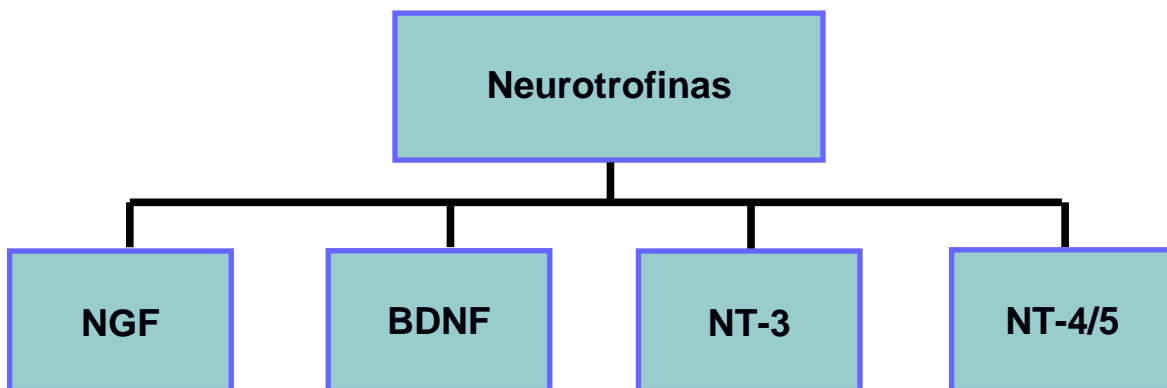


Figura 2: Familia de las neurotrofinas

FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO.

Las características del gen de NGF han sido revisadas ampliamente por Sofroniew *et al.* (2001). En el ser humano NGF está codificado por un único gen de aproximadamente 45 kilobases de longitud (Ullrich *et al.*, 1983), el cual está localizado en el cromosoma 1 (NCBI GenBank CAA37703.1).

El NGF maduro (también llamado β -NGF) es una proteína de 118 aminoácidos de longitud (Angeletti y Bradshaw, 1971) y 13.2kDa de peso molecular, obtenida a partir de precursores de mayor peso molecular mediante cortes proteolíticos. El procesamiento de NGF se describe con detalle más adelante.

La forma madura de NGF de 13.2kDa se presenta en forma de dímeros unidos por tres puentes disulfuro. La proteína comparte un alto grado de homología y estructura similar con respecto a los otros miembros de la familia de neurotrofinas presentes en mamíferos: BDNF, NT-3 y NT-4 (Butte *et al.*, 1998).

El factor de crecimiento nervioso, al igual que el resto de las neurotrofinas, es sintetizado inicialmente como una proteína precursora inicial (denominada **preproNGF**) que es procesada en la red del trans Golgi mediante cortes proteolíticos en otros intermediarios (llamados **proNGF**) hasta generar la forma madura de la proteína.

El procesamiento de NGF se puede visualizar en la **Figura 3**. El gen de NGF cuenta con dos promotores independientes y 4 exones. Como resultado, la transcripción del gen puede producir dos variantes de ARNm debido al posicionamiento alternativo, con la secuencia codificante en el extremo 3' del exón 4 en ambos casos. La traducción del ARNm da como resultado dos especies de proteínas precursoras iniciales: **preproNGF** A y B. El análisis mediante electroforesis ha identificado su peso molecular en 34 y 27kDa, con el sitio de inicio de la traducción en las

posiciones -187 y -121 respectivamente. Lo anterior significa que la variante A cuenta con una secuencia adicional en el extremo 5' (Edwards *et al.*, 1986) y el resto es igual.

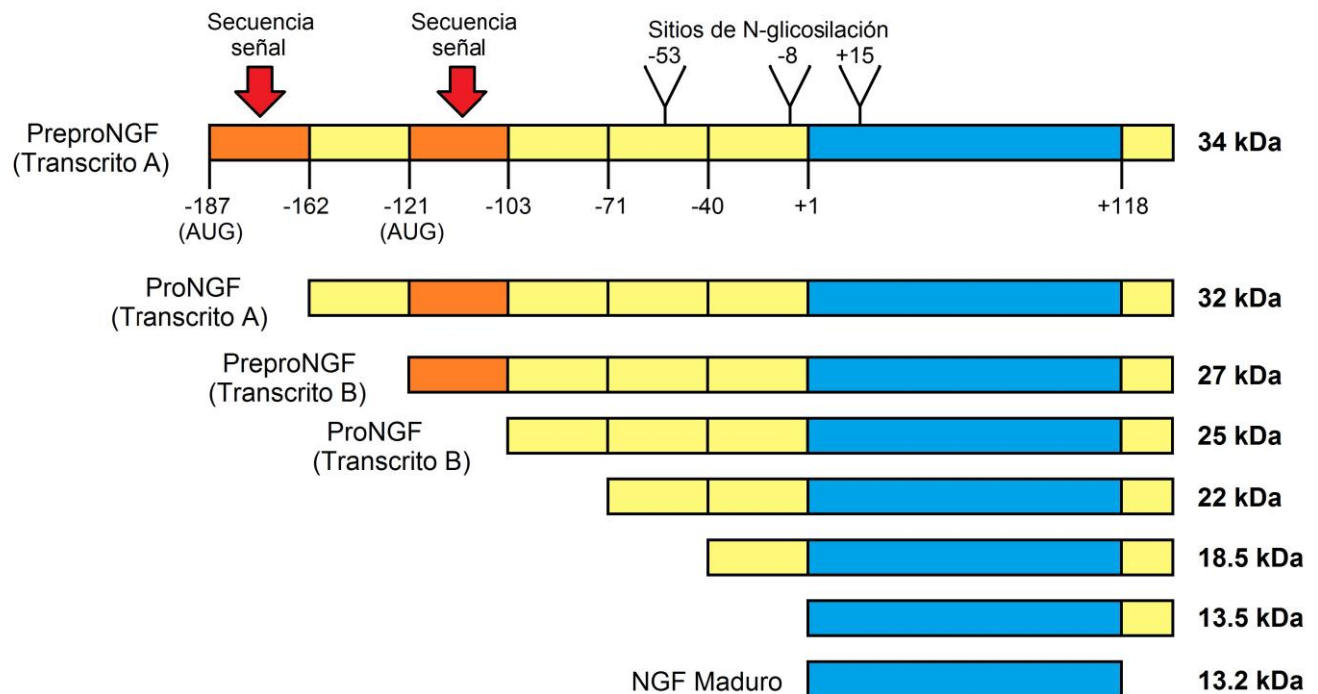


Figura 3: Procesamiento de NGF

La expresión del gen de NGF puede generar dos transcritos (preproNGF) que dan lugar a dos isoformas de proteínas precursoras. Su corte proteolítico por convertasas genera otros intermediarios (proNGF) y posteriormente NGF maduro (Fahnestock *et al.*, 2004).

Posteriormente, las proteínas precursoras son transportadas al retículo endoplásmico en donde se remueve la secuencia señal en el extremo 5' y resultan dos productos de 32 y 25kDa, dependiendo del precursor de origen. Estos dos nuevos intermediarios inmaduros reciben el nombre de **proNGF A** y **B** (Darling *et al.*, 1983).

Los intermediarios proNGF cuentan con tres sitios potenciales de glucosilación, dos dentro del segmento inicial presente sólo en los precursores (posiciones -53 y -8) y uno más en el segmento presente tanto en los precursores como en la proteína madura (+15). El resultado de la glucosilación es la producción de especies de proNGF de mayor peso molecular. En modelos murinos se ha identificado mediante electroforesis la presencia de proNGF altamente glucosilado, de 53kDa (Edwards *et al.*, 1988; Lakshmanan *et al.*, 1988). Se ha demostrado que la glucosilación de NGF, que ocurre en la red del trans Golgi, no modifica su actividad biológica (Murphy *et al.*, 1989). Entre las posibles funciones de la glucosilación se encuentran la salida adecuada desde el retículo endoplásmico y la regulación de la expresión eficiente de la proteína. Sin embargo, la forma sin glucosilar de proNGF está presente en varios tejidos (Suter *et al.*, 1991).

El siguiente paso en la maduración del proNGF es su procesamiento mediante más cortes proteolíticos tanto en los extremos N-terminal y C-terminal. Al ser conservados estos sitios de corte en las variantes A y B de proNGF, la proteína resultante del procesamiento en ambos casos es la misma. Se han identificado algunos intermediarios en este proceso de corte de 27-29kDa al igual que un intermediario de 18kDa (Edwards *et al.*, 1986; Darling *et al.*, 1983). El producto final del procesamiento en todos los casos es la proteína madura (β -NGF) de 13.2kDa.

Los cortes proteolíticos durante el proceso de maduración de NGF son producidos por proteasas pertenecientes a la familia de las pro-proteína convertasas (Seidah *et al.*, 1996), la cual comprende 6 miembros descritos: furina, PC1, PC2 (o PC3), PACE4, PC4, PC5/6B. Furina ha sido identificada como la principal responsable del procesamiento de NGF, a través del corte en pares de residuos de aminoácidos básicos Lis-Arg y Arg-Arg (Bresnahan *et al.*, 1990). También se ha identificado una vía alterna de procesamiento mediante plasmina y la metaloproteasa de matriz 7 (MMP-7) que son capaces de cortar los intermediarios para producir la forma madura de NGF y un intermediario de 17kDa, respectivamente (Le y Friedman, 2012).

ACCIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO.

Como se mencionó anteriormente, los estudios que determinaron las características de NGF y la postulación de la teoría neurotrófica fueron realizados en neuronas del sistema nervioso simpático (una subdivisión del sistema nervioso periférico) y se aceptó la idea que el NGF requerido por estas neuronas proviene de los órganos blancos inervados.

Los efectos neuronales de NGF inician cuando la proteína madura o sus intermediarios son liberados desde los órganos blancos hacia la hendidura sináptica. Una vez en este espacio, NGF se une a sus receptores localizados en la membrana presináptica de la neurona y se internaliza por endocitosis, junto con su receptor. En la terminal de la neurona, NGF y su receptor son transportados de manera retrógrada a lo largo del axón, es decir, desde la terminal hacia el soma, mediante el sistema axonal de dineína, en donde ejerce sus funciones tróficas.

NGF cuenta con dos receptores, uno de alta afinidad (TrkA) y uno de baja afinidad (p75). Es importante señalar que la afinidad de NGF por sus receptores es diferente dependiendo si se trata de la proteína madura o de alguno de sus intermediarios. Como se ilustra en la **Figura 4**, los precursores de NGF (proNGF) se unen con mayor afinidad al receptor p75, al cual también pueden unirse la forma madura de NGF (13.2kDa) y los precursores de otras neurotrofinas. Sin embargo, no se ha observado en estos precursores la capacidad de unirse a los receptores Trk. Una vez procesado NGF hasta su forma madura adquiere la capacidad de unirse con alta afinidad al receptor TrkA y mantiene su unión al receptor p75, aunque con menor afinidad.

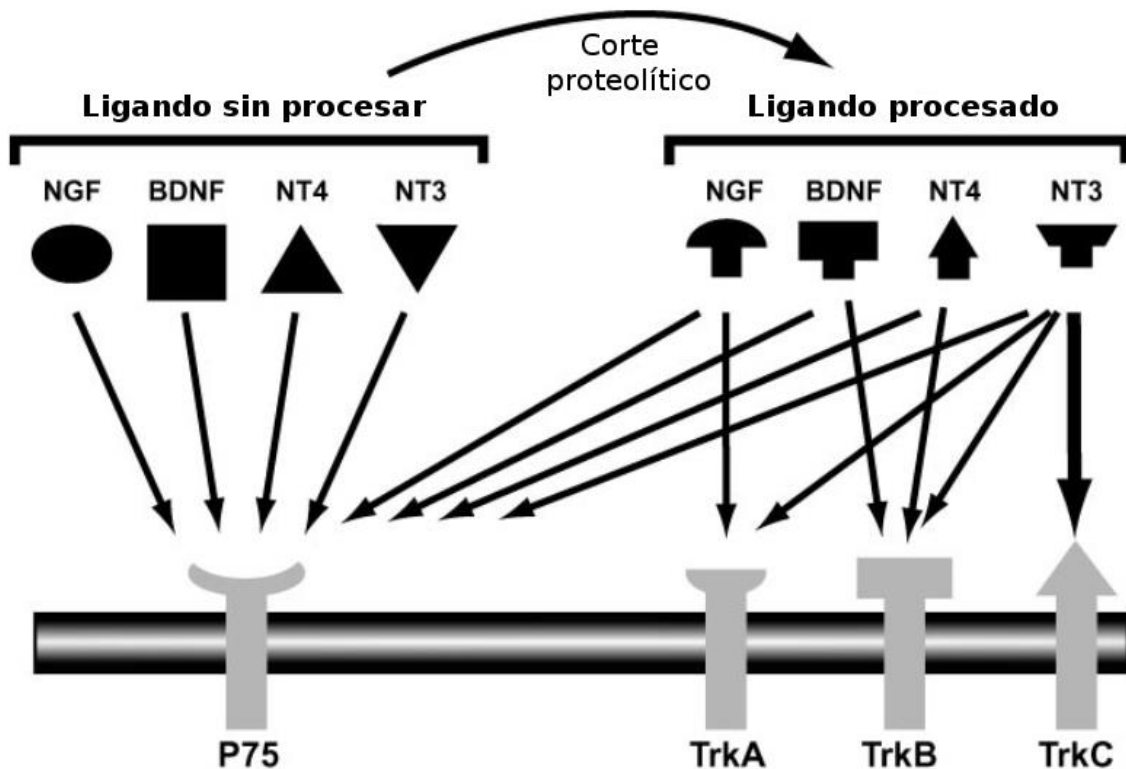


Figura 4: Receptores de neurotrofinas y especificidad como consecuencia del procesamiento de sus ligandos (modificado de Segal, 2003).

El receptor TrkA pertenece a la familia de los receptores cinasa de tirosina. Está constituido por un dímero. En la región extracelular de cada monómero se encuentran el sitio de unión al ligando y en la región intracelular se encuentra el dominio de cinasa de tirosina, así como los sitios de unión a moléculas de señalización, una vez activado el receptor (Klein *et al.*, 1990). Al igual que otros receptores de tipo cinasa de tirosina, la unión del ligando NGF provoca dimerización del receptor TrkA (Jing *et al.*, 1992). El receptor (ahora en forma de dímero) se autofosforila en *trans*, esto significa que un monómero fosforila los residuos de tirosina del monómero opuesto. Esta fosforilación produce la activación de la cinasa y el inicio de la señalización intracelular a través de la creación de sitios de unión para proteínas adaptadoras, las cuales permiten la interacción del receptor a proteínas que participan en vías de señalización dentro de las que se encuentran las

vías de **JNK**, **ERK** (cinasa relacionada con la señal extracelular de Ras), **PI3K** (cinasa de fosfatidil inositol 3) y la fosfolipasa C- γ 1 (revisado por Kaplan y Miller, 2000). En el primer caso, Ras es una proteína implicada en la regulación de la diferenciación neuronal. De la misma manera, en muchos tipos neuronales también promueve la sobrevivencia a través de dos vías de señalización: la vía PI3K y la vía MAPK/ERK 8.

TrkB es otro receptor de la familia de neurotrofinas estrechamente relacionado con TrkA en cuanto a estructura y mecanismo de acción, aunque su sitio de unión no es específico para la forma madura de NGF. Sin embargo, sus efectos tróficos y funcionales en las neuronas simpáticas (en las que se centra el presente trabajo) deben considerarse. Existen dos isoformas en que puede presentarse el receptor TrkB. La primera isoforma, denominada forma completa de Trk-B (**F-TrkB**), de 140kDa, es la que normalmente traduce la activación hacia las vías de señalización intracelulares como consecuencia de la unión de BDNF. La segunda, la forma truncada de Trk-B (**T-TrkB**), de 90kDa, recibe este nombre al no contar con el dominio intracelular de cinasa de tirosina. Por lo tanto, se considera esta forma como no funcional (Yan *et al.*, 1997). En cuanto a su expresión en neuronas, los primeros estudios en ganglios periféricos encontraron expresión de T-TrkB no funcional pero no de F-TrkB, mediante inmunohistoquímica y análisis de protección de ARNasa (Wetmore y Olson 1995; Dixon y McKinnon, 1994). Posteriormente otras investigaciones demostraron con métodos más sensibles como RT-PCR la presencia post-natal de TrkB en el GCS y en otros ganglios periféricos, sin determinar la forma de TrkB presente, además de demostrar el diferente patrón de expresión de receptores de neurotrofinas en el GCS con respecto a otras estructuras periféricas, lo cual puede explicar la falta de detección en los primeros estudios (Ehrhard y Otten, 1994). Además, resultados recientes de nuestro grupo de trabajo, mediante el estudio de fenómenos de plasticidad sináptica (potenciación de largo plazo) y marcaje inmunohistológico, han sugerido la expresión de receptores TrkB también en el GCS sin que se haya determinado la forma del receptor presente (Arias *et al.*, 2014). Por lo anterior, la presencia funcional del receptor TrkB en la etapa post-natal y su participación como efector de la acción de las neurotrofinas se encuentra todavía bajo investigación.

Por último, dentro de los receptores para NGF se encuentra el receptor de baja afinidad **p75**, el cual es miembro de la familia de receptores de TNF (Chao, 1994). Tiene un sitio de unión al cual pueden unirse todos los miembros de la familia de las neurotrofinas, aunque con baja afinidad con respecto a los receptores Trk (Rodríguez-Tébar *et al.*, 1991). La unión de cualquiera de los ligandos de p75 activa diversas vías de señalización intracelular (revisado por Kaplan y Miller 1997).

Los efectos que el NGF produce en las neuronas simpáticas varían dependiendo del tipo de receptor al que se una. La unión y activación de los receptores TrkA tiene como consecuencia la sobrevivencia y la diferenciación en la mayoría de las poblaciones neuronales. Por otra parte, la coexpresión de los receptores Trk con p75 (y su activación simultánea) altera la capacidad de unión de NGF a Trk (Barker y Shooter, 1994), modifica sus efectos (Davies *et al.*, 1993) y la transducción de señales resultante (Verdi *et al.*, 1994). Por el contrario, se ha observado que la activación de receptores p75 por NGF en ausencia de los receptores Trk provoca la muerte neuronal (Friedman, 2000) a través de la activación de vías relacionadas con la muerte celular programada. Este efecto opuesto, producto de la activación de receptores p75, se ha descrito que ocurre como consecuencia de la producción de ceramida C₂, que actúa como segundo mensajero y promueve la acción apoptótica del factor transcripcional NF-κB y la activación de la vía JNK (Brann *et al.*, 2002).

Además de los efectos en el crecimiento y sobrevivencia neuronal descritos inicialmente, NGF tiene efectos importantes en la función neuronal simpática, entre los cuales se pueden mencionar la regulación de patrones de disparo de las neuronas (Luther y Birren, 2006), la regulación de fenómenos de plasticidad sináptica (Arias *et al.*, 2014) y la producción de neurotransmisores. En el caso de los ganglios periféricos simpáticos, el principal neurotransmisor involucrado en la función simpática es la noradrenalina, cuya producción está regulada por la expresión y acción de la enzima tirosina hidroxilasa (**TH**), reacción clave en la síntesis de noradrenalina y otras

catecolaminas. (**Figura 5**). Con respecto a esta enzima, se ha observado que NGF en el soma de la neurona induce selectivamente la actividad de TH (Thoenen *et al.*, 1971) y esta actividad de TH depende de un suministro mínimo de NGF. Posteriormente se descubrió que las proteínas c-fos y c-jun, que conforman a la proteína activadora 1 (**AP-1**) y que son activados como consecuencia de NGF y la señalización de los receptores TrkA, son los responsables del aumento de expresión de TH, a través de la formación de complejos heterodiméricos, los cuales se unen a una región dentro de promotor del gen de TH (Gizang-Ginsberg y Ziff, 1990). Por lo tanto, el estudio de la expresión de TH es un mecanismo para determinar la correcta función neuronal y es reflejo de un aporte suficiente de NGF en los ganglios simpáticos.

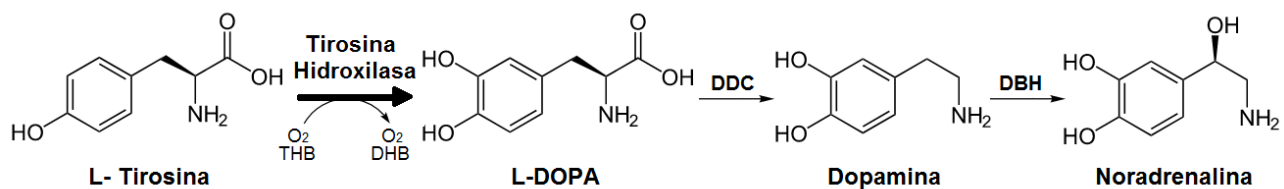


Figura 5: Síntesis de noradrenalina en el sistema nervioso y acción de TH.

Por último, cabe señalar que además de sus funciones tróficas en neuronas, NGF tiene funciones no tróficas en otros tejidos ajenos al sistema nervioso. Entre otras funciones de NGF se pueden mencionar la regulación de la producción hormonal de adrenocorticotropina a través de la activación del eje adrenocortical (Otten, 1979), la maduración de células T del sistema inmune (Lambiase *et al.*, 1997), la sobrevivencia de células beta pancreáticas (Pierucci *et al.*, 2001) y la inducción de la ovulación en mamíferos (Maranesi *et al.*, 2018). Se ha observado que estas acciones, al igual que la función trófica en neuronas, ocurren a través de la activación de receptores TrkA.

La acción de NGF como promotor de la supervivencia neuronal y regulador de la expresión de TH se resume de manera general en la **Figura 6**, en donde se observa que parte de sus efectos tróficos y funcionales ocurren a través de mensajeros intracelulares compartidos, como es el caso de la activación de AP-1. La interrupción en el suministro de NGF altera el estado de activación/inactivación de estas proteínas mensajeras que provoca tanto el desencadenamiento de mecanismos de muerte celular (apoptosis) como alteraciones en la función neuronal (como la expresión de TH).

PARTE 2: La axotomía como herramienta para el estudio de cambios en la función simpática.

EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO EN EL GANGLIO CERVICAL SUPERIOR.

Durante el desarrollo, las neurotrofinas (precursores y proteínas maduras) se expresan en diversos tipos celulares, neuronales y no neuronales, tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico, al igual que en otros tipos celulares ajenos a la función neuronal.

Con respecto al sistema nervioso simpático, la presencia de ARNm de proNGF disminuye considerablemente a partir de la etapa adulta (Hasan *et al.*, 2003). Al estudiar la expresión de NGF en la etapa adulta, los primeros estudios no encontraron ARNm de proNGF (Korsching y Thoenen, 1983), con lo cual se asumió que todo el NGF maduro que requieren las neuronas simpáticas proviene de los órganos blanco, tal como establece la teoría neurotrófica.

En las células de los tejidos de los órganos inervados se ha identificado la expresión, y procesamiento de NGF, el cual se libera a la hendidura sináptica de la inervación periférica, se une a su receptor en la terminal nerviosa simpática y se internaliza para posteriormente ser transportado de manera retrógrada al soma neuronal y cubrir de esta manera los requerimientos neuronales de NGF.

AXOTOMÍA DEL GANGLIO CERVICAL SUPERIOR.

La participación del NGF en la función neuronal puede ser estudiada mediante la interrupción del suministro de NGF y otras moléculas transportadas desde el órgano blanco. Una forma de conseguirlo es la inhibición del transporte axonal mediante el uso de fármacos como la colchicina (Karlsson *et al.*, 1971). Otra estrategia experimental, en la cual está centrada el presente trabajo, es la axotomía.

La **axotomía** consiste en el corte quirúrgico de los nervios ganglionares eferentes y, como consecuencia, el corte de los axones pertenecientes a las neuronas simpáticas. En el caso del ganglio cervical superior, el corte se realiza en ambos nervios eferentes: el nervio carotideo interno y el nervio carotideo externo (como se observa en la **Figura 7**). La estructura anatómica estudiada en el presente trabajo es el ganglio cervical superior (**GCS**), el cual es un ganglio periférico de tipo simpático localizado en el extremo superior del tronco simpático cervical y que por su fácil acceso representa un buen modelo para el estudio de los ganglios periféricos. Recibe inervación de la médula espinal y tiene proyecciones hacia varios órganos entre los cuales se encuentran la arteria carótida interna, la glándula pineal, las glándulas salivales submandibulares, el iris y la glándula tiroides. El neurotransmisor liberado en las terminales nerviosas de las neuronas que lo constituyen y el responsable de su función simpática es la noradrenalina.



Figura 7: Axotomía del GCS.

En el GCS y otros ganglios periféricos, la axotomía causa cambios en la morfología, y función de las neuronas (Hendry, 1992) lo cual se refleja en cambios en la expresión de diversos genes relacionados principalmente con la supervivencia y la producción de neurotransmisores (Zigmond, 1997; Del Signore *et al.*, 2006).

Los primeros estudios que relacionaron la comunicación neuronal con la expresión de genes de neurotrofinas y sus receptores en el sistema nervioso periférico y específicamente en las neuronas relacionadas con el GCS, se dieron al denervar el nervio del tronco simpático, que conecta a corta distancia las neuronas de la médula espinal con el GCS. En las neuronas de la médula espinal, se observó un aumento en la expresión de BDNF y de su receptor TrkB (forma F-TrkB) en neuronas de la médula espinal, la disminución en la expresión de acetilcolintransferasa (reflejo de su actividad colinérgica disminuida) así como del volumen del soma y por último el aumento en la expresión del marcador de daño, el Factor de activación de la transcripción 3 (Coulibaly *et al.*, 2013). Estos cambios son transitorios ya que se observan a partir de los 7 días post-axotomía y a los 21 días regresan a valores cercanos a los iniciales, al mismo tiempo que no se observó durante este periodo muerte neuronal por apoptosis. Lo anterior sugiere que existen mecanismos neuronales para la recuperación de la función neuronal a corta distancia (entre la médula espinal y el GCS) después de la interrupción de la comunicación neuronal aferente.

Sin embargo los cambios que ocurren en neuronas con proyecciones más largas y distales, como los eferentes del GCS que inervan directamente a los órganos blanco y regulan su actividad, no ha sido descrita. Se desconoce si las neuronas ganglionares son capaces de presentar estos mecanismos de recuperación neuronal que se vería reflejado en cambios en la expresión de genes de neurotrofinas y sus receptores, así como de genes relacionados con su función noradrenérgica. En cuanto a la producción de neurotrofinas, como primera aproximación en modelos *in vitro*, se ha observado que en respuesta a la axotomía, el ganglio cervical superior disminuye drásticamente la disponibilidad de NGF proveniente de los órganos blanco (Yamamoto *et al.*, 1996). Se desconoce el efecto que tiene la axotomía sobre la expresión de NGF en las neuronas ganglionares *in vivo*,

así como la identidad de las proteínas de NGF producto de la traducción de dicho ARNm, recordando que se puede presentar en varias isoformas con funciones diferentes.

En condiciones *in vivo*, en donde se considera que todo el aporte de NGF del GCS adulto proviene de los órganos blanco, la axotomía es suficiente para representar un escenario en donde la neurona carece de NGF, tal como se ilustra en la **Figura 8** junto con los principales mecanismos identificados en la muerte celular programada como consecuencia de esta falta de NGF.

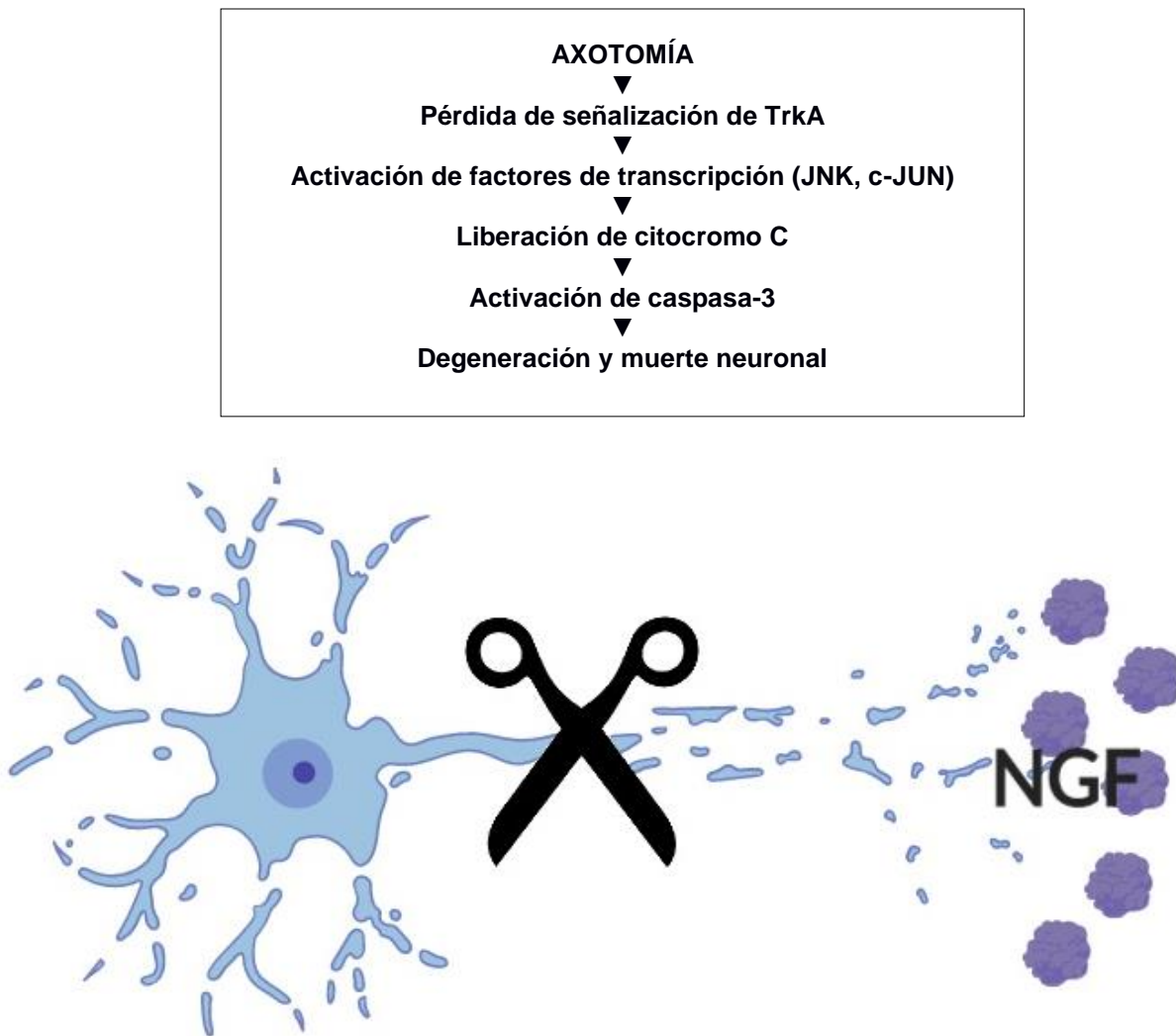


Figura 8: Mecanismos celulares activados por la carencia de NGF.

Sin embargo, en experimentos *in vivo* de axotomía, mediante el uso de marcadores de muerte celular y proteínas relacionadas con el proceso de apoptosis, no se ha observado apoptosis en la mayoría neuronas del GCS axotomizado después de una semana, sino que la muerte celular se restringe principalmente a células satélite (Hou *et al.*, 1998). Con lo anterior, se ha sugerido que las neuronas del GCS (y otros ganglios periféricos) pueden presentar signos de regeneración neuronal en respuesta a la interrupción de su conexión con el órgano blanco inervado, sin que hasta el momento se haya identificado el mecanismo responsable de esta aparente ausencia de muerte celular. La presencia de NGF apunta como el principal mecanismo candidato para explicar los resultados anteriormente descritos.

Considerando que la neurona del GCS adulto cuenta con los genes y los mecanismos requeridos para la producción y procesamiento de NGF y que éstos se activan manera natural durante el desarrollo del sistema nervioso, el principal mecanismo para restituir la falta de NGF en la etapa adulta puede ser la reactivación de la producción de NGF y su posterior procesamiento hacia las formas maduras de la proteína. El mismo efecto puede ser reproducido de manera experimental al administrar NGF maduro de forma exógena al ganglio axotomizado.

Por lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue determinar los cambios que ocurren *in vivo* en las neuronas ganglionares del GCS adulto en respuesta a la axotomía, así como si estos cambios pueden ser reversibles mediante la administración exógena de NGF.

Por otra parte, dado que NGF requiere un procesamiento para obtener la forma madura de la proteína y que los intermediarios de este procesamiento ejercen diversas funciones que derivan en efectos diferentes (dependiendo del receptor al que se unan), se estudió también mediante WB la presencia de cada intermediario del procesamiento de NGF. De la misma manera, se determinó si los posibles cambios en el contenido de proteína de NGF son reversibles mediante la administración exógena de la proteína madura de NGF.

A continuación, para determinar si la interrupción del suministro normal de NGF modifica la función simpática de las neuronas del GCS, en el presente trabajo se determinó el efecto de la axotomía sobre la expresión de TH, como gen indicador de la producción normal de catecolaminas y de la función simpática noradrenérgica, en las condiciones experimentales especificadas anteriormente.

Por último, en el presente trabajo se determinó la expresión de las isoformas de los receptores TrkB, ya que la presencia de los receptores TrkB y su activación podría significar un mecanismo adicional que interaccione con los efectos de NGF a través de sus dos receptores identificados. Como primera aproximación, únicamente se estudió la expresión de F-TrkB y T-TrkB en condiciones control. Por otra parte, aunque hasta el momento no se ha encontrado que NGF maduro pueda activar a otros receptores de neurotrofinas de tipo Trk (TrkB o TrkC), se desconoce si el cambio de especificidad a los receptores de NGF antes de ser procesado pueda representar alguna capacidad de los precursores de NGF presentes en el GCS para activar otro tipo de receptor Trk además de TrkA.

HIPÓTESIS:

Las conexiones neuronales intactas entre las neuronas periféricas con su blanco regulan la expresión post-natal del factor de crecimiento nervioso (NFG) y la actividad simpática mediante TH.

La axotomía del GCS adulto induce la expresión del gen de NGF y la producción de una o varias isoformas de su proteína, lo cual resulta en un efecto trófico de sobrevivencia y reparación axonal.

OBJETIVO:

Determinar el papel de las conexiones neuronales intactas entre las neuronas periféricas con su blanco en la expresión del factor de crecimiento nervioso (NGF) y en la actividad simpática.

Objetivos particulares:

- Determinar el efecto de la axotomía sobre la expresión del factor de crecimiento nervioso (NGF) y TH en el ganglio cervical superior de la rata y si los cambios provocados son reversibles mediante la administración exógena de NGF en el GCS.

a. Determinar cambios en la expresión de ARNm de proNGF.

b. Determinar cambios en la presencia de las diferentes isoformas de proteína de NGF.

c. Determinar cambios en la expresión de ARNm de TH.

- Caracterizar la expresión de los diferentes receptores de neurotrofinas en el GCS, con especial énfasis en TrkB.

METODOLOGÍA

ANIMALES UTILIZADOS

Todos los experimentos fueron realizados en ratas machos de la cepa Wistar, de 12 semanas de edad y 250g de peso. Los animales fueron proporcionados por la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El uso de los animales fue autorizado como parte del proyecto CONACYT #128332 del laboratorio. Los animales fueron manejados, tratados y sacrificados de acuerdo a las normas impuestas del Comité de Bioética del Instituto y de acuerdo a las guías internacionales de ética para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

GRUPOS EXPERIMENTALES

Cada grupo experimental consistió en 3 ratas de las características antes descritas, identificadas como:

- Animal Control (**Ctl**)

- GCS axotomizado (**Axt**)

- GCS axotomizado + Restitución NGF (**Rt**)

La expresión de NGF se estudió en ratas sometidas a la axotomía del GCS para interrumpir la inervación ganglionar eferente (Axt), la cual fue comparada con ratas control con el GCS intacto (Ctl) y un tercer grupo (Rt) al que además de la axotomía se le administró NGF de forma exógena (70ng de NGF contenido en un parche de Elvax, implantado sobre el GCS axotomizado).

Para realizar la axotomía los animales fueron anestesiados de acuerdo a su peso mediante la administración intramuscular de ketamina (90mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). A continuación se realizó una incisión longitudinal de 1.5cm aprox. en la línea media del cuello a la altura de la tráquea, zona donde se localiza el ganglio cervical superior. Se localizó el GCS derecho en todos los experimentos para la axotomía. No se han observado diferencias de ningún tipo entre

axotomizar el ganglio derecho e izquierdo del animal en diversos experimentos en el laboratorio. Una vez localizado el GCS, se realizó el corte de ambos nervios eferentes del ganglio (nervios carotídeos interno y externo) utilizando una tijera quirúrgica. En caso de los animales Rt (en los que se administró NGF exógeno) se implantó un parche de polímero Elvax de 3x5x0.1m equivalente a 70ng de la forma madura (β -NGF, 13.2kDa) de NGF, sobre el GCS. En el caso de los animales Ctl se colocó un parche de las mismas características sin NGF (sólo vehículo) sobre el ganglio. El GCS contralateral en todos los casos se mantuvo intacto. La incisión fue suturada y la rata se dejó en recuperación durante 7 días antes de la disección del GCS.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE NGF y TH MEDIANTE RT-PCR

El GCS diseccionado de cada rata (Ctl, Axt y Rt) fue colocado dentro de un tubo de microcentrífuga y congelado inmediatamente en N₂ líquido. Posteriormente se adicionaron 400 μ L de TRIzol a cada tubo y el ganglio fue triturado con la ayuda de un homogeneizador de tejido Polytron (Kinematica, New York, NY, USA).

El ARN total fue purificado mediante el método con TRIzol (Ver **Anexo 3**: Aislamiento de ARN total con TRIzol). La integridad estructural del ARN total obtenido fue confirmada mediante una electroforesis de 400ng de ARN total en un gel de agarosa 1% y visualización con tinción de bromuro de etidio con luz UV.

La concentración de ARN total se cuantificó por espectrofotometría con un Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) y se realizó la reacción reversa en cadena de polimerasa (“Reverse transcription polymerase chain reaction”, **RT-PCR**), con 1.3 μ g de ARN total de cada muestra. (Ver **Anexo 4**: RT-PCR para proNGF, TH y GAPDH). El ADNc resultante fue amplificado mediante el uso de oligonucleótidos específicos para la secuencia del gen de proNGF y TH, por separado. Simultáneamente, con las mismas muestras se realizó la amplificación del ADNc con oligonucleótidos específicos para el gen constitutivo GAPDH como gen referencia de expresión de ARN (**Tabla 1**). Los oligonucleótidos (Kondo *et al.*, 2010) fueron diseñados a partir del transcriptoma de *Rattus norvegicus* para amplificar un fragmento de 543pb para proNGF (Secuencia de Referencia NCBI NM_001277055.1), un fragmento de 646pb para TH y un fragmento de 306pb para GAPDH.

Tabla 1: Oligonucleótidos empleados para la amplificación del ADNc de proNGF y TH.

ADNc blanco	Oligo 5'-3' (Forward/Reverse)	Posición de amplión (nt)	Secuencia de referencia NCBI	Tamaño de amplión (pb)
proNGF	GGACTAAACTTCAGCATTCC CCTGTTTGTCTGTCTGTTGTC	292-835	NM_001277055.1	543
TH	GAAGGGCCTCTATGCTACCCA TGGGCGCTGGATACGAGA	720-1365	NM_012740.3	646
GAPDH	CCTTCATTGACCTCAACTAC TTCACACCCATCACAAC	176-476	NM_017008.4	301

La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo en un termociclador de gradiente T100 (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA). El programa para amplificar los fragmentos de NGF fue el siguiente: un ciclo inicial de 94°C durante 2min, seguido de 20 ciclos de 94°C por 30s, 63°C por 30s y 72°C por 30s, con un ciclo final de extensión de 72°C por 7min. Para los fragmentos de TH el programa fue el siguiente: un ciclo inicial de 94°C durante 2min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, 43°C por 30s y 72°C por 30s, con un ciclo final de extensión de 72°C por 7min. Para los fragmentos de GAPDH el programa fue el siguiente: un ciclo inicial de 94°C durante 2min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, 43°C por 30s y 72°C por 30s, con un ciclo final de extensión de 72°C por 7min.

En cada experimento se incluyó como control negativo una amplificación en la que el ADNc fue sustituido por ARN de GCS sin retro-transcripción. Como control positivo se incluyó una reacción con ADNc de glándula salival submaxilar de la misma rata, en donde se sabe que la expresión de NGF es abundante.

Los productos de la reacción de amplificación fueron analizados mediante una electroforesis en un gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. La imagen resultante de cada gel fue digitalizada con un escáner de alta resolución Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, USA). La intensidad de las bandas en las imágenes resultantes

fue cuantificada mediante densitometría utilizando el programa ImageJ (NIH, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Los promedios de los valores de intensidad obtenidos para NGF fueron normalizados contra los valores de GAPDH. En todos los experimentos los valores observados de expresión del gen constitutivo GAPDH fueron similares entre las tres condiciones.

El experimento fue repetido de manera independiente con 4 o 5 grupos de animales (n=y y n=5), según se indica en cada figura. A continuación los promedios fueron comparados y analizados estadísticamente mediante la prueba T de Student de dos colas sin aparear, tomando $p < 0.05$ como diferencia significativa entre cada condición.

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE PROTEÍNAS DE NGF POR WESTERN BLOT

La presencia de las diferentes isoformas de proteína de NGF se estudió de forma semi-cuantitativa a través experimentos de Western Blot. El uso de un anticuerpo que reconoce una región común a todas las isoformas de NGF permitió identificar por peso molecular la presencia tanto de la proteína madura como de los intermediarios del procesamiento de NGF en el GCS de cada condición experimental.

Se siguió la misma maniobra experimental para obtener GCS de ratas Ctl, Axt y Rt. El GCS de la rata de cada condición fue diseccionado, colocado dentro de un tubo de microcentrífuga y congelado inmediatamente en N₂ líquido. A continuación se adicionaron 250µL de buffer de lisis (en mM: 150 NaCl, 1 EDTA, 0.5 DTT, 20 Tris, 0.5% Triton X100, 1% SDS y 1X mezcla de inhibidores de proteasas, pH=8.0) a cada tubo y el ganglio fue triturado con la ayuda de un homogeneizador de tejido Polytron.

Después de una centrifugación a 12000 x g, la cantidad de proteína total del sobrenadante se cuantificó por el método BCA. 1.5 mg de cada muestra se analizó mediante una electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida 12.5% con SDS 1% y de 0.75mm de espesor, para separar las proteínas presentes. Se incluyó un carril con proteína recombinante β-NFG purificada (NGF, Millipore Chemicon, USA, #cat. GF028) para confirmar la unión del anticuerpo a NGF.

Al terminar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PDVF. La transferencia de las proteínas fue confirmada mediante la tinción de la membrana con rojo de Ponceau. La membrana fue bloqueada con 5% BSA para reducir las uniones inespecíficas de anticuerpos y posteriormente fue incubada con anticuerpos primarios específicos para NGF, así como para la proteína constitutiva GAPDH. Los anticuerpos utilizados y su concentración para la incubación se especifican en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados para los experimentos de Western Blot.

Anticuerpo	Especie	Acoplado a	Dilución	Fuente	#cat.
Anti-βNGF	Conejo	-	1 : 10 000	Millipore	AB1526
IgG Anti-conejo	Cabra	HRP	1 : 10 000	Invitrogen	65-6120
Anti-GAPDH	Ratón	-	1: 80 000	Chemicon	MAB374
IgG Anti-Ratón	Cabra	HRP	1: 100 000	Millipore	12-349

Enseguida, las membranas fueron incubadas con su respectivo anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y visualizadas mediante un sustrato químico luminiscente asociado al sustrato de la peroxidasa, que indica la presencia de anticuerpo unido a la membrana mediante una señal luminosa, la cual fue detectada mediante placas fotográficas. Las placas fotográficas fueron reveladas en un cuarto oscuro y digitalizadas con un escáner ImageQuant (GE Healthcare, USA). Se realizó a continuación un análisis por densitometría de las bandas obtenidas en cada imagen, utilizando el software incluido por el fabricante con el escáner.

El experimento fue repetido de manera independiente con 4 grupos de animales (n=4). A continuación los promedios de los valores obtenidos fueron comparados y analizados estadísticamente mediante la prueba T de Student de dos colas sin aparear, tomando $p < 0.05$ como diferencia significativa entre cada condición.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE TrkB por RT-PCR

Por último, se determinó la expresión del ARNm de los receptores Trk-B. Debido a que, como se mencionó anteriormente, este receptor puede presentarse en dos isoformas que se diferencian en la presencia o ausencia del dominio intracelular (F-TrkB, T-TrkB respectivamente), se utilizaron dos pares de oligonucleótidos diseñados para amplificar de manera diferencial el ARNm de cada una de las isoformas. Lo anterior se logró mediante la unión de los oligonucleótidos a secuencias presentes únicamente en el ARNm de la isoforma completa o truncada, ya que el procesamiento del ARNm las elimina en el mensajero de la otra isoforma.

Para estos experimentos se emplearon ratas Ctl de las mismas características que los demás experimentos (machos, cepa Wistar, 250g de peso) a las cuales se diseccionaron ambos GCS.

El procesamiento del tejido y la metodología para el experimento de RT-PCR fue la misma con respecto a los experimentos de NGF. Como control positivo, el experimento se repitió en paralelo con muestras de la porción anterior del cerebro, que se sabe expresa de manera abundante ambas formas del receptor TrkB. El ARN total de ambas muestras fue cuantificado y se utilizó la misma cantidad de ARN para la reacción en ambas muestras. Los oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación se enlistan en la **Tabla 3**, diseñados para la amplificación del ADNc correspondiente a F-trkB, T-trkB, así como a GAPDH como mensajero de gen constitutivo que permita la semi-cuantificación de la expresión.

Tabla 3: Oligonucleótidos empleados para la amplificación del ADNc de TrkB.

ADNc blanco	Oligo 5'-3' (Forward/Reverse)	Posición de amplicón (nt)	Secuencia de referencia NCBI	Tamaño de amplicón (pb)
F-trkB	TGACGCAGTCGCAGATGCTG TTTCCTGTACATGATGCTCTCTGG	2601-2845	NM_012731.2	245
T-trkB	CGGGAGCATCTCTCGGTCT AGGGGGATCTTATGAAACAAA	1955-2097	NM_001163168.2	143
GAPDH	CCTTCATTGACCTCAACTAC TTCACACCCATCACAAC	176-476	NM_017008.4	301

El programa para amplificar los fragmentos de F-trkB y T-trkB fue el siguiente: un ciclo inicial de 94°C durante 2min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30s, 61°C por 30s y 72°C por 30s, con un ciclo final de extensión de 72°C por 7min. Para los fragmentos de GAPDH el programa fue el siguiente: un ciclo inicial de 94°C durante 2min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, 43°C por 30s y 72°C por 30s, con un ciclo final de extensión de 72°C por 7min.

El experimento fue repetido de manera independiente con 5 ratas (n=5). Los resultados expresión de F-trkB y T-trkB fue normalizada con la expresión de GAPDH. A continuación los promedios de la expresión de cada gen fueron comparados y analizados estadísticamente mediante la prueba T de Student de dos colas sin aparear, tomando $p < 0.05$ como diferencia significativa entre cada condición.

RESULTADOS

LA AXOTOMÍA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE ARNm DE proNGF

Los resultados de la electroforesis de los productos de RT-PCR se muestran en la **Figura 9**.

Se muestra la imagen de un gel obtenido en un experimento representativo y la gráfica de barras del promedio de los valores obtenidos, a partir cociente de la intensidad de las bandas proNGF/GAPDH para cada condición experimental.

Los resultados indican que la axotomía del GCS aumenta la expresión del ARNm de proNGF. En condiciones Ctl se observó una menor expresión de ARNm con respecto al GCS de ratas Axt y Rt. El análisis estadístico de los valores obtenidos después de 4 experimentos permitió establecer dicho aumento de la expresión a más del doble (2.4 veces) y una diferencia significativa entre las condiciones Ctl y Axt ($p=0.02$).

Por otra parte, la administración exógena de la proteína madura de NGF sobre el GCS axotomizado (Rt) no revierte los niveles de expresión a los que se presentan en el animal Ctl. Los niveles de expresión del gen de proNGF se mantienen elevados, en valores similares al ganglio axotomizado. El análisis estadístico de la expresión de NGF normalizada con GAPDH después de 4 experimentos permitió determinar que existe una diferencia significativa ($p<0.05$) entre la expresión presente el ganglio intacto (Ctl) y la restitución exógena de NFG (Rt), mientras que no se encontró diferencia al comparar las condiciones Axt y Rt.

En todos los casos, los valores obtenidos de normalizar contra GAPDH los valores del análisis por densitometría de las imágenes de las electroforesis fueron consistentes con la señal luminosa visible con luz UV, así como los valores de GAPDH fueron similares entre las diferentes condiciones.

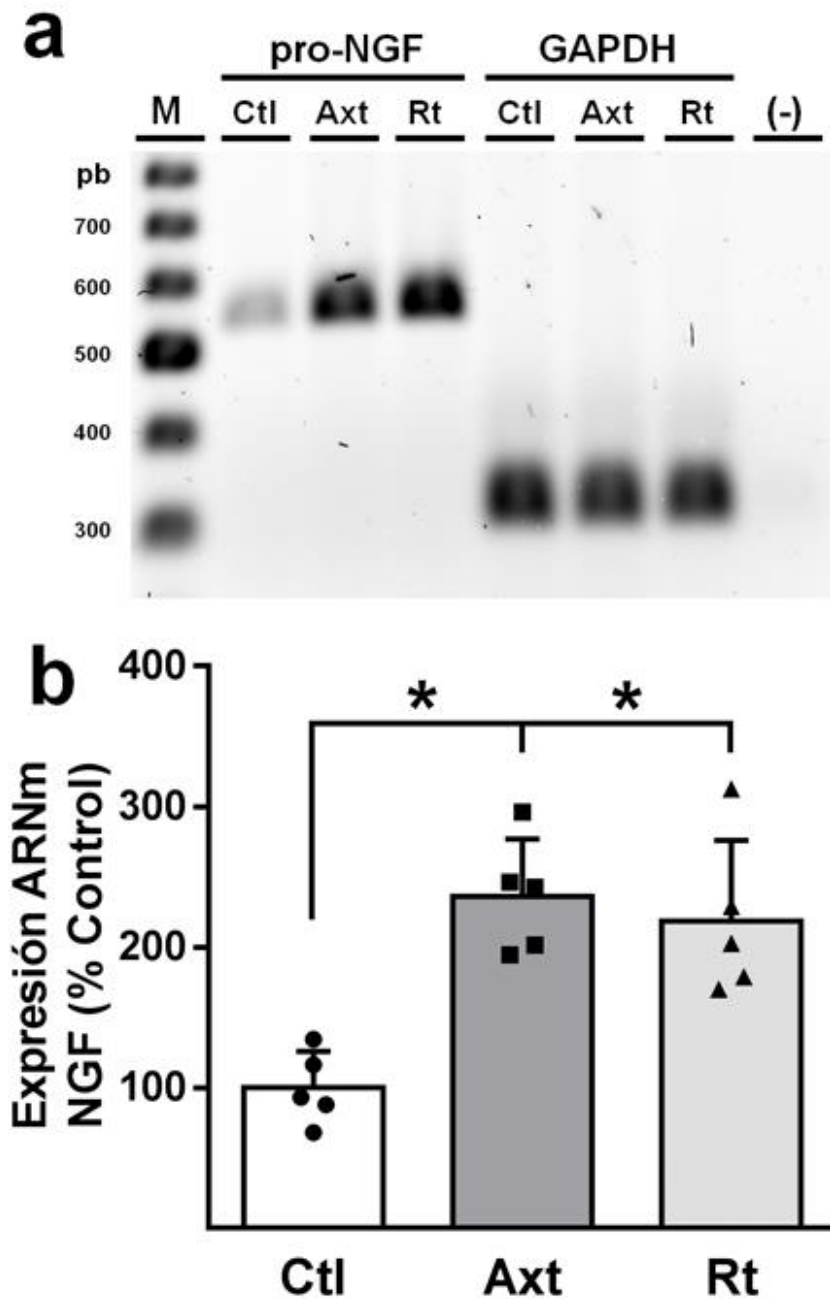


Figura 9: Efecto de la axotomía sobre la expresión de ARNm de NGF.

a. RT-PCR de proNGF de GCS de animales control (Ctl), con axotomía del GCS (Axt) y axotomizados con restitución exógena de NGF (Rt).

b. Semi-cuantificación de la expresión de NGF, normalizado con la expresión de GAPDH (* = $p > 0.05$).

Ctl (rata control), Axt (axotomía), Rt (axotomía con restitución de NGF) y M (marcador de peso molecular). Valores de Promedio \pm E.E de 4 experimentos. (Vega *et al.*, 2015)

LA AXOTOMÍA MODIFICA LOS NIVELES DE ISOFORMAS DE NGF

Las bandas de proteína obtenidas con los experimentos de Western Blot muestran varios cambios en el contenido de proteína de las diferentes isoformas de NGF. La imagen mostrada en la **Figura 10** es un experimento representativo de las placas reveladas. La gráfica de barras mostrada en la **Figura 11** expresa los resultados obtenidos, como el cociente de la intensidad de las bandas NGF/GAPDH para cada condición experimental.

Los experimentos de Western Blot muestran que en el GCS en condiciones control (Ctl) NGF se encuentra presente en todas sus isoformas conocidas (13.2, 18.5, 34 y 53kDa), siendo observada más abundante la forma de 18.5kDa seguida de la de 34kDa. La forma madura de la proteína (13.2kDa) fue observada en menor cantidad.

La axotomía (Axt) no modifica la cantidad de proteína presente de las formas de 13 (madura) y 16kDa, que conservaron su contenido bajo y alto, respectivamente. Sin embargo, la presencia de las isoformas de 34 y 53kDa se redujo notablemente. Después de 4 experimentos, los valores cuantificados de la reducción fueron $49 \pm 10\%$ para 34kDa y $43 \pm 12\%$ para 53kDa. En ambos casos la reducción fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En condiciones de restitución de NGF, mediante la administración exógena de la proteína madura (Rt), la presencia de todas las isoformas de NGF tiene niveles similares a las del GCS en condiciones Ctl. En el caso de las isoformas de 34 y 53kDa, la disminución en el contenido de proteínas que induce la axotomía es revertido. Las isoformas de 13.2 (madura) y 18.5kDa conservaron su contenido bajo y alto, respectivamente.

En todos los casos, los valores obtenidos de normalizar contra GAPDH los valores del análisis por densitometría de las imágenes de las placas de WB fueron consistentes con la señal luminosa visible a simple vista, así como los valores de GAPDH fueron similares entre las diferentes condiciones.

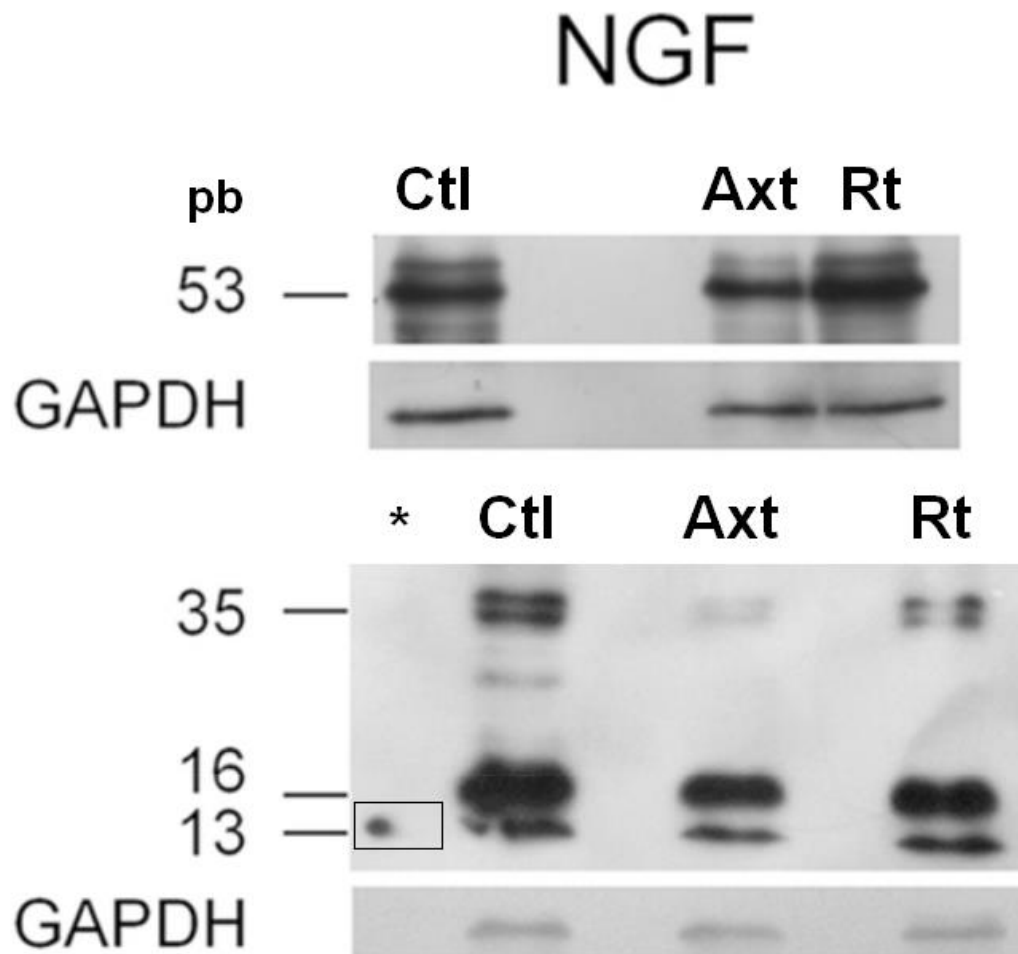


Figura 10: Efecto de la axotomía sobre la expresión de proteínas de NGF.

Experimento representativo de Western Blot. La axotomía (Axt) disminuye los niveles de la isoforma de 53kDa (A) y de 34kDa (B) con respecto al control (Ctl). Esta disminución se revierte con la restitución exógena de NGF (Rt). Los niveles de las isoformas de 13.2kDa y 18.2kDa no se modifican. * = Proteína recombinante β -NGF. (Vega *et al.*, 2015)

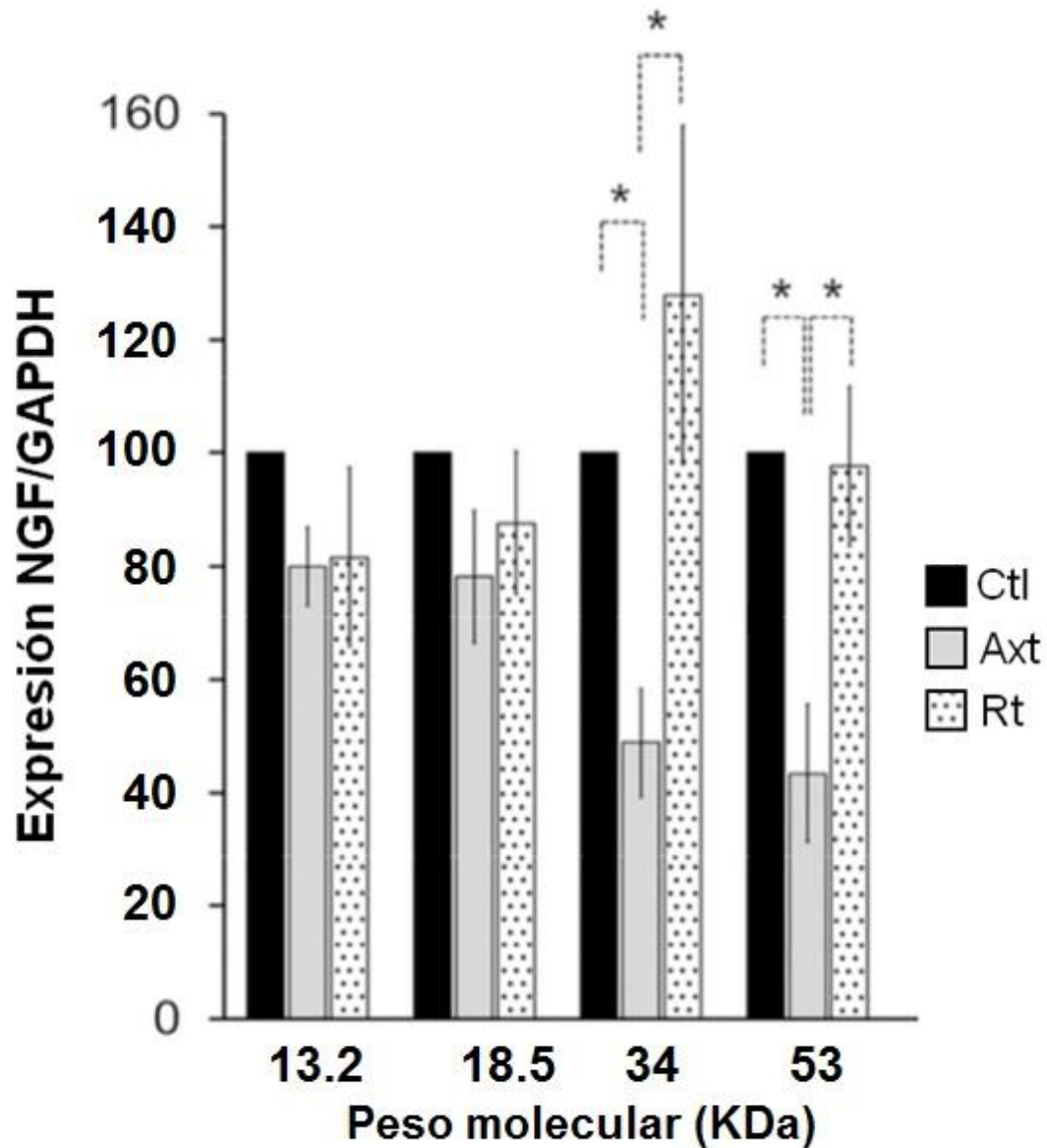


Figura 11: Efecto de la axotomía sobre el contenido de proteína de NGF.

Expresión normalizada contra GAPDH. La axotomía disminuye los niveles de la isoforma de 34kDa y de 53kDa. Esta disminución se revierte con la restitución exógena de NGF. Los niveles de las isoformas de 13.2kDa y 18.5kDa no se modifican con la axotomía ni con la restitución de NGF (* = $p < 0.05$). Valores de Promedio \pm E.E de 4 experimentos.

Ctl (rata control), Axt (axotomía) y Rt (axotomía con restitución de NGF).

(Vega *et al.*, 2015)

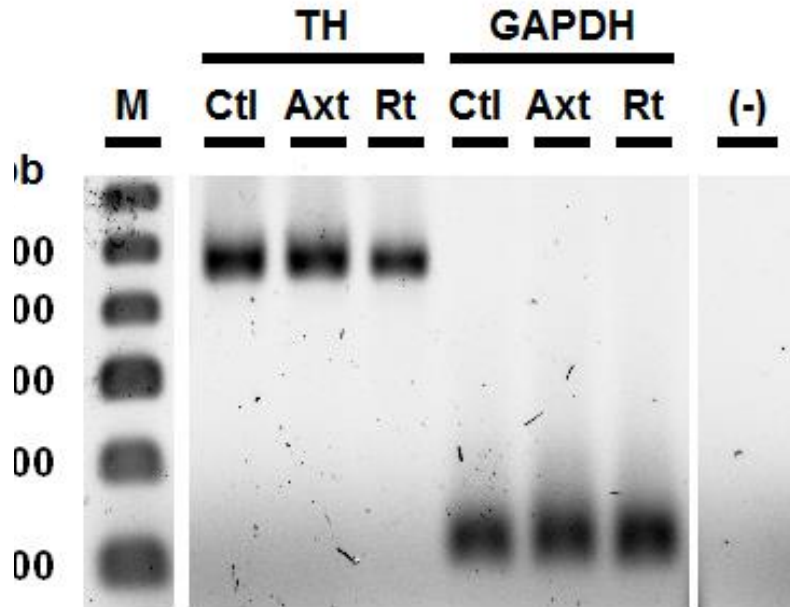
LA AXOTOMÍA NO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE TH

Los resultados de la electroforesis de los productos de RT-PCR (mostrados en la **Figura 12**) indican que la axotomía del GCS no modifica la expresión del ARNm de TH, indicador de la función simpática del GCS. En condiciones Ctl se observó la misma expresión de ARNm con respecto al CCS de ratas Axt y Rt. El análisis estadístico de los valores obtenidos después de 4 experimentos no permitió establecer una diferencia significativa entre las condiciones ($p > 0.05$).

Previamente se realizó una estandarización del número de ciclos en el protocolo de RT-PCR contra TH, por lo que se puede descartar que esta ausencia de cambios entre las condiciones se deba a una saturación en la reacción de amplificación por exceso de producto. Lo anterior también pudo comprobarse en otros experimentos de nuestro grupo de trabajo en los cuales un modelo experimental de estrés provoca un claro aumento en la expresión de ARNm de TH en el GCS con respecto al observado en condiciones control (Merino-Jiménez *et al.*, 2018).

En todos los casos, los valores obtenidos de normalizar contra GAPDH los valores del análisis por densitometría de las imágenes de las electroforesis fueron consistentes con la señal luminosa visible con luz UV, así como los valores de GAPDH fueron similares entre las diferentes condiciones.

a



b

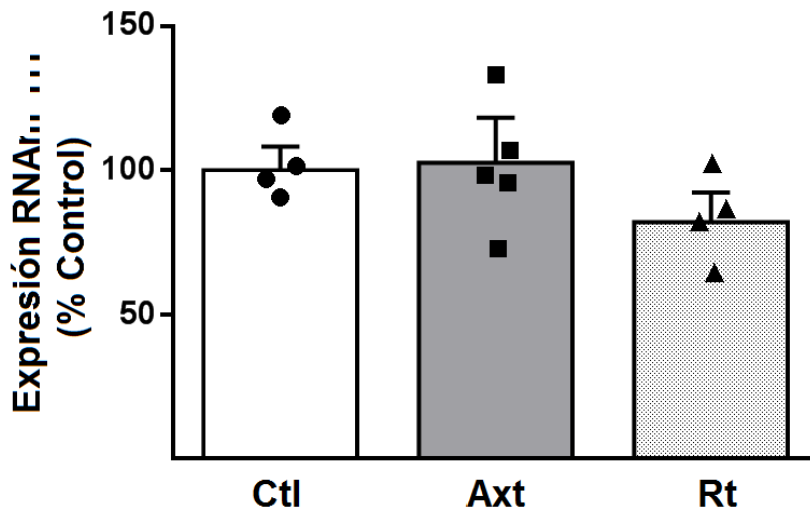


Figura 12: Efecto de la axotomía sobre la expresión de ARNm de TH.

a. RT-PCR de TH de muestras de GCS control (Ctl), con axotomía del GCS (Axt) y axotomizados con restitución exógena de NGF (Rt).

b. Semi-cuantificación de la expresión de TH, normalizado con la expresión de GAPDH ($p < 0.05$ entre las 3 condiciones)

Ctl (rata control), Axt (axotomía), Rt (axotomía con restitución de NGF) y M (marcador de peso molecular). Valores de Promedio \pm E.E de 4 experimentos.

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE NGF Y TH

Los resultados de los experimentos de RT-PCR y Western Blot para determinar los cambios con respecto a los animales control en la expresión de NGF y TH por efecto de la axotomía se resumen en la **Tabla 3** y **Tabla 4**:

Tabla 3: Cambios en la expresión y el contenido de NGF.

Especie NGF	Axt (% de Ctl)	Rt (% de Ctl)
ARNm	[+]	[+]
13.2 kDa	79.8 ± 4.7 [=]	80.8 ± 8.4 [=]
18.2 kDa	78.2 ± 7.5 [=]	86.3 ± 7.2 [=]
34 kDa	48.2 ± 11.3 [+]	106.9 ± 29.8 [=]
53 kDa	43.3 ± 12.4 [+]	97.5 ± 16.2 [=]

[+] Aumento de expresión

[=] Misma expresión

Tabla 4: Cambios en la expresión de TH.

Especie TH	Axt (vs. Ctl)	Rt (vs. Ctl)
ARNm	[+]	[+]

[=] Misma expresión

EL GCS EXPRESA EL RECEPTOR Trk-B

El trabajo en conjunto de nuestro grupo de trabajo para investigar la expresión de los diferentes receptores de neurotrofinas en el GCS permitió confirmar la expresión de receptores TrkA y p75 en condiciones control (Valle-Leija *et al.*, 2017). El presente trabajo se enfocó en determinar la expresión del gen del receptor TrkB, mediante el análisis del ARN total por RT-PCR.

La electroforesis de los productos de RT-PCR muestran la expresión de ARNm tanto de la forma F-TrkB como de T-TrkB en el GCS adulto, con mayor expresión de la forma completa del receptor ($p < 0.05$). La **Figura 13** ilustra el resultado de un experimento representativo (**A**) y la gráfica de barras (**B**) compara los promedios de la expresión de trkB normalizado contra GAPDH. En todas las repeticiones del experimento se observó una banda más tenue para F-TrkB y una banda más marcada para T-TrkB. La semi-cuantificación, normalizando con respecto a la expresión de GAPDH, indica que la forma truncada de TrkB se expresa aproximadamente el doble que la forma completa.

En todos los casos, los valores obtenidos de normalizar contra GAPDH los valores del análisis por densitometría de las imágenes de las electroforesis fueron consistentes con la señal luminosa visible con luz UV, así como los valores de GAPDH fueron similares entre las diferentes condiciones.

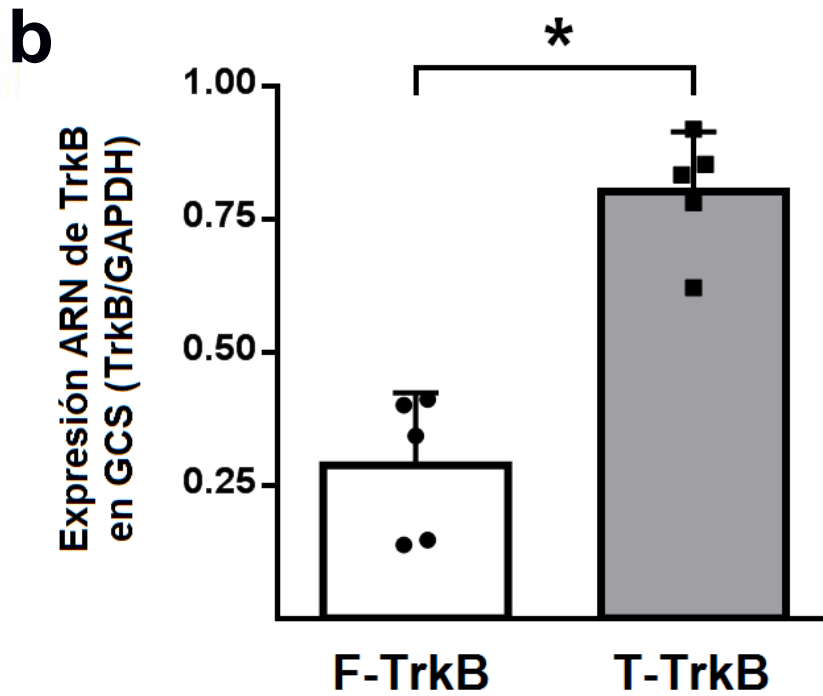
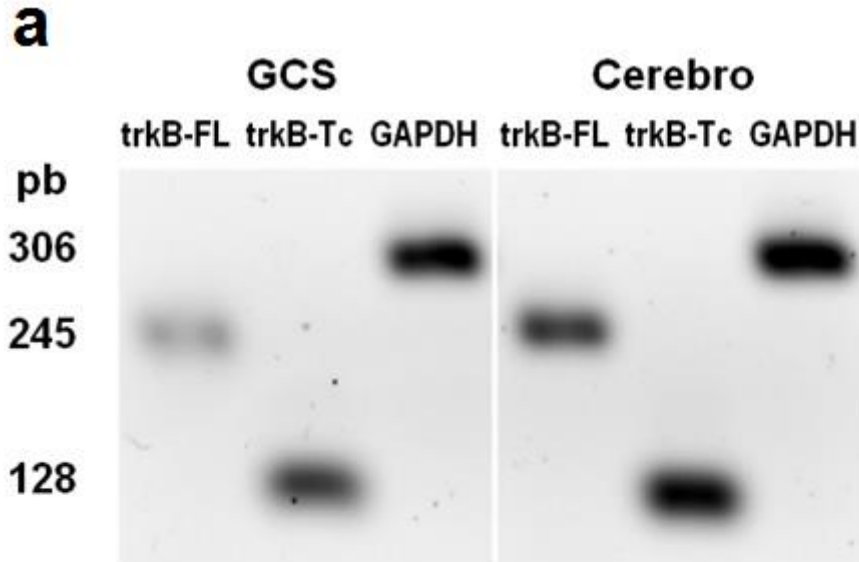


Figura 13: Expresión de ARNm de los receptores trkB.
a. El GCS expresa mensajero tanto la forma completa (trkB-FL) como la forma truncada (trkB-Tc), siendo mayor la expresión de la forma completa (**b**) (*= $p < 0.05$). Valores de Promedio \pm E.E de 5 experimentos. (Valle-Leija *et al.*, 2017)

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontró que la axotomía aumenta la expresión de ARNm de proNGF en el GCS, mientras que disminuye el contenido de proteína de los intermediarios de NGF y se mantienen los niveles de proteína de NGF maduro. El aumento en la expresión de ARNm de proNGF no es reversible al administrar NGF exógeno, contrario a los niveles de los intermediarios de proteína de 53 y 34kDa que recuperan sus niveles iniciales al administrar NGF exógeno. Se observó que el contenido de la proteína madura de NGF (13.2kDa) se mantiene constante frente a la axotomía y al administrar NGF exógeno. Por otra parte, el GCS expresa al receptor TrkB en condiciones control.

Los estudios sobre los efectos neuronales de la privación de NGF han sido realizados principalmente en modelos *in vitro* en donde los cultivos de neuronas disociadas o los fragmentos de tejidos son mantenidos en medios de cultivo que contienen NGF que posteriormente es retirado del medio. En estos modelos, tanto el soma como los axones de las neuronas se exponen directamente a NGF (Kristiansen y Ham, 2014). Sin embargo, se sabe que en condiciones *in vivo* no ocurre de esta manera, sino que el NGF se produce en los órganos blanco inervados y se transporta de manera retrógrada a través del axón hasta el soma por lo que el aporte desde las terminales es suficiente para mantener la sobrevivencia neuronal a pesar de que no se encuentre NGF en otras regiones. El modelo *in vivo* utilizado en este estudio conserva estas condiciones y permite estudiar de manera puntual y precisa la privación de NGF en las neuronas simpáticas. Asimismo, nuestro modelo permite la restitución de NGF mediante su administración exógena a través de parches.

El presente trabajo explora los cambios en la expresión de NGF en el GCS de rata adulta como respuesta a la axotomía del ganglio. En concordancia con estudios previos de denervación (corte de los nervios aferentes del GCS), se demostró que la axotomía (corte de los nervios eferentes) modifica la actividad del GCS relacionada con la producción de neurotrofinas, estudiada a nivel de expresión de ARNm de NGF con RT-PCR y del contenido de la proteína mediante Western Blot.

Durante el desarrollo, las neurotrofinas se expresan en varios niveles en diversos tipos celulares, neuronales y no neuronales, tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico, al igual que en tipos celulares ajenos a la función neuronal. Sin embargo, en la etapa adulta, la presencia de ARNm de proNGF disminuye considerablemente (Hasan *et al.*, 2003). La

cantidad limitada de tejido en el GCS y el bajo rendimiento en el aislamiento del ARN mediante técnicas convencionales dificulta el estudio de la expresión de ARNm. La cantidad de ARNm de NGF muchas veces se encuentra por debajo del umbral de detección para los métodos menos sensibles de identificación como el Northern Blot, nucleasas S1 o el ensayo de protección de ARNasa. La hibridación *in situ* permite la detección dentro de células individuales, pero la posibilidad de cuantificar la expresión es muy limitada. Por estas razones, el método de RT-PCR tiene la ventaja de ser un método suficientemente sensible y versátil para el estudio y cuantificación de la expresión de NGF y otras neurotrofinas en el sistema nervioso. Esta técnica puede ser utilizada para determinar la presencia o ausencia de transcritos de ARNm de un gen, y medirla de forma semi-cuantitativa al comparar la expresión del gen de interés con la de un gen constitutivo (Chie *et al.*, 2001).

Los experimentos de RT-PCR mostraron que en condiciones control existe una baja expresión de proNGF en el GCS de la rata adulta al identificarse cantidades mínimas de ARNm del gen de proNGF. La expresión de NGF encontrada no es nula, lo cual demuestra que las neuronas simpáticas cuentan con los mecanismos necesarios para la expresión del gen aún en condiciones control. Al estudiar la presencia de la proteína en el ganglio mediante WB se identificó proteína correspondiente a NGF maduro (13.2kDa), lo cual puede explicarse con el principio generalmente aceptado de la teoría neurotrófica, en la cual el NGF maduro presente en los ganglios periféricos proviene de los órganos blanco y se transporta de manera retrógrada hasta el soma de las neuronas simpáticas. Por lo tanto, una posible explicación es que este aporte externo de NGF cubre los requerimientos de las neuronas simpáticas y éstas no requieren sintetizar la proteína con mecanismos propios.

La axotomía es una maniobra experimental que interrumpe el suministro normal de NGF antes mencionado. A los 7 días posteriores de la axotomía, los experimentos de WB indican la disminución en la cantidad de proteína de NGF maduro en el GCS. Lo anterior concuerda con otros experimentos de nuestro grupo de trabajo en los cuales se observó que la axotomía disminuye el contenido total de NGF en somas de neuronas ganglionares, determinado por inmunohistoquímica (Vega *et al.*, 2015). En conjunto, estos resultados indican que las neuronas del GCS no son capaces de restituir al NGF para conservar las condiciones existentes previas a la axotomía, ya sea mediante la producción de la proteína madura a través del procesamiento del

proNGF o bien mediante el aporte de NGF proveniente de otro origen diferente al órgano blanco. El presente trabajo identificó que la axotomía aumenta la expresión de ARNm de proNGF en el GCS observada a los 7 días posteriores a la axotomía, lo cual podría indicar que la expresión se desencadena como mecanismo para proveer de NGF a las neuronas simpáticas. Hasta ahora se ha aceptado que la producción de NGF maduro no ocurre en neuronas ganglionares, sino que es producido únicamente por células blanco (Hendry *et al.*, 1974) o por células no neuronales en respuesta a un daño (Heumann *et al.*, 1987). En contraste, en el presente trabajo se encontró baja expresión tanto de ARNm de NGF y del contenido de proteína madura en condiciones control.

La administración exógena de NGF ha demostrado reproducir los efectos neuronales del NGF producido normalmente (Isaacson *et al.*, 1992). En el presente estudio en el GCS axotomizado, la restitución de NGF de forma exógena mantuvo el aumento en la expresión de ARNm de proNGF. Esto significa que el mecanismo de producción de NGF que desencadena la axotomía se mantiene y no se modifica aunque neuronas cuentan nuevamente con un suministro de NGF maduro para cumplir sus requerimientos. Una posibilidad es que el NGF recién producido por la neurona axotomizada active principalmente a los receptores TrkA. Como consecuencia, mediante la regulación de la actividad de la vía de JNK, el mantenimiento de los niveles normales de las proteínas Fos y c-Jun, y la formación del factor transcripcional AP-1, se mantiene la expresión continua de proNGF. La presencia de una mayor concentración de NGF que representa la condición de restitución de NGF permitiría la activación del receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75. Sin embargo, al no observarse cambios en la expresión de proNGF con respecto a la condición de axotomía, se sugiere que el receptor p75 no participa en la regulación de dicha expresión.

Al considerar que la presencia de ARNm no representa necesariamente el contenido celular de la proteína, a continuación se determinó el contenido de las diferentes isoformas de proteínas de NGF. Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo demostró por inmunohistoquímica que la axotomía disminuye los niveles de NGF en el GCS y que la restitución con NGF exógeno revierte el número de neuronas inmunopositivas para NGF (Vega *et al.*, 2015). En el presente estudio, el análisis por WB reveló que la axotomía no disminuye los niveles de la isoforma de 13.2kDa (correspondientes a la proteína madura de NGF) ni la isoforma de 18.5 kDa. Sin embargo, los resultados mostraron que los intermediarios de 34kDa y 56kDa (pre-proNGF) disminuyeron su expresión a menos de la

mitad con respecto a los controles. Estos cambios por efecto de la axotomía pueden explicarse si el daño axonal y la interrupción del suministro normal de neurotrofinas activan simultáneamente la transcripción de NGF y la actividad de las convertasas de proNGF, lo cual resultaría en el aumento observado de ARNm, la disminución de los precursores proNGF y el mantenimiento sin cambio del NGF maduro.

Los precursores de 34 y 56kDa se consideran como los intermediarios iniciales del proceso de maduración de la proteína. La isoforma de 34kDa es reconocida como el primer intermediario en la maduración del ARNm después de ser transcrito, mientras que la isoforma de 56kDa es producto de su procesamiento en el aparato de Golgi mediante la glucosilación de la proteína (Fahnestock *et al.*, 2004). La siguiente etapa de la maduración del NGF requiere un corte proteolítico, lo cual es un paso que se ha descrito como irreversible (Seidah *et al.*, 1996). Por lo tanto, una posible explicación para estos cambios puede ser un aumento en la actividad de las convertasas que procesan a los intermediarios pre-proNGF (34 y 53kDa) para conservar los niveles de las isoformas de menor peso molecular (proNGF y NGF maduro). Para responder esta pregunta se requiere un futuro análisis detallado de la actividad enzimática en condiciones control y en respuesta a la axotomía. Cabe señalar que entre ambos pares de intermediarios se han descrito funciones diferentes, incluso opuestas, siendo identificada la forma de 34kDa como promotora de la apoptosis al activar a los receptores p75 (Fahnestock *et al.*, 2004). Por lo tanto, la disminución únicamente en los niveles de los dos intermediarios de 34 y 53kDa pueden reflejarse en la disminución de la función simpática y trófica en de las neuronas simpáticas.

De la misma manera, los resultados de la restitución de NGF pueden explicarse si la administración de NGF maduro exógeno induce una disminución en la actividad de las convertasas de proNGF mientras se mantiene la transcripción de ARNm en el mismo nivel, como lo reflejan los experimentos de RT-PCR. Es conocido que el procesamiento de intermediarios de NGF para obtener NGF maduro no ocurre normalmente en las neuronas simpáticas sino en los órganos blanco. Por ejemplo, en la glándula salival submaxilar, mediante marcaje metabólico se identificó la producción de NGF maduro a partir del intermediario de 18.5kDa (Edwards *et al.*, 1988). Por ello, es posible que la actividad de las convertasas que presentan actividad en las neuronas por efecto de la axotomía no sea la misma que las neuronas simpáticas. En ambos casos el efecto observado es el mismo: mantener el nivel de NGF maduro constante en el soma de las neuronas simpáticas.

Sin embargo, el efecto trófico de NGF no debe atribuirse únicamente a la forma madura de la proteína. Varios estudios han demostrado que los precursores proNGF también pueden participar como activadores de los receptores TrkA. Por ejemplo, se encontró que en neuronas en cultivo, proNGF promueve la sobrevivencia neuronal y el crecimiento dendrítico mediante la unión y fosforilación del receptor TrkA aunque con menor actividad que la forma madura de NGF (Fahnestock *et al.*, 2004). Por lo tanto mucha de la actividad que normalmente se atribuye al NGF maduro puede deberse en realidad a la acción de su precursor proNGF, ya sea a través de los receptores TrkA o de otros receptores de neurotrofinas presentes.

Como se mencionó anteriormente, la activación de los receptores p75 mediante la unión de baja afinidad de NGF maduro, así como la unión de alta afinidad de los precursores de NGF, induce la respuesta pro-apoptótica en las neuronas simpáticas. Por lo tanto, surge la posibilidad de que en las neuronas simpáticas, que coexpresan p75 y receptores Trk, NGF tenga efectos opuestos como promotor de la sobrevivencia o de muerte neuronal dependiendo de su estado de maduración. El aumento en el procesamiento de NGF podría favorecer la sobrevivencia neuronal mediada por receptores Trk, mientras que la disminución en el procesamiento de NGF (que aumentaría los niveles de los intermediarios y la activación de los receptores p75) favorecería la muerte celular (Chao y Bothwell, 2002). Esta hipótesis, que se encuentra actualmente bajo investigación, ayudaría a mejorar la comprensión sobre la forma en que funcionan las neurotrofinas durante el desarrollo y en enfermedades neurodegenerativas (Segal, 2003).

A continuación, se estudió el efecto de la axotomía sobre la expresión de TH, enzima cuya acción es el paso limitante en la producción de noradrenalina (principal neurotransmisor efector en el GCS) y, por consiguiente indicador de la correcta función simpática del ganglio. El NGF maduro regula estrechamente la expresión de TH, a través de la unión de AP-1 Fos-Jun y su disponibilidad es fundamental para mantener dicha expresión (Gizang-Ginsberg y Ziff, 1990). Anteriormente se ha descrito que la interrupción de las conexiones de las neuronas del GCS con su órgano blanco, como ocurre en modelos *in vitro* de axotomía o muerte inducida de las células blanco inervadas, las neuronas del GCS presentan un aumento inicial en la expresión de ARNm de TH, el cual se atribuye al estrés neuronal que ocurre durante las primeras horas. Si la interrupción de la comunicación neuronal persiste, después de varios días se observa la disminución de la expresión de TH, reflejo de la disminución de la actividad simpática como consecuencia de la falta del aporte normal de factores tróficos que regulan la expresión de TH.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo en un modelo *in vivo* de axotomía, indican que después de 7 días la axotomía no modifica la expresión de TH, lo cual indica que la actividad simpática en el GCS se mantiene a pesar a la interrupción en el suministro de NGF desde el órgano blanco. La producción de NGF maduro en el GCS axotomizado, demostrada mediante los experimentos de RT-PCR, se propone como mecanismo mediante el cual el GCS mantiene su funcionalidad. La expresión de TH observada en el GCS axotomizado con restitución de NGF es la misma que el condiciones control y que el GCS axotomizado, lo cual indica que el NGF producido por GCS axotomizado es suficiente para alcanzar la expresión máxima de TH, ya que la condición de restitución de NGF (que representaría un mayor aporte de NGF) no presenta mayor expresión de ARNm de TH.

Otros autores han propuesto anteriormente que las neuronas simpáticas son capaces de cambiar su función global de transmisión simpática hacia regeneración o plasticidad neuronal para hacer frente a situaciones adversas como la falta de factores tróficos. Esta hipótesis puede apoyarse en el efecto de la axotomía para aumentar la expresión de otras proteínas relacionadas con la sobrevivencia neuronal, como la sustancia P y la galanina (Kessler y Black, 1982, Villar *et al.*, 1989). Del mismo modo, el aumento inducido por la axotomía en la expresión de proteínas relacionadas con el crecimiento celular, como la actina y la tubulina, está relacionado con la disminución de la expresión de enzimas para la síntesis de neurotransmisores (Hall *et al.*, 1978). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la producción de NGF en el GCS adulto como consecuencia de la axotomía es capaz de mantener la función simpática intacta, a través de la expresión constante de ARNm de TH. No se descarta que las neuronas puedan presentar cambios a corto plazo en la expresión de TH, como consecuencia del estrés inicial producido por la axotomía o porque la inducción de la expresión de NGF observada no permita alcanzar los niveles normales de la proteína inmediatamente.

Por último, para definir otros posibles mecanismos celulares implicados en la respuesta neuronal a NGF, se estudió la expresión de los distintos receptores de neurotrofinas en el GCS, con especial énfasis en la expresión de TrkB. La información obtenida en otros estudios hasta la fecha han indicado TrkB no se expresa en el GCS. Sin embargo, nuestro grupo de trabajo sugirió la expresión de receptores TrkB, mediante el estudio de fenómenos de plasticidad sináptica

(potenciación de largo plazo) y herramientas farmacológicas (Arias *et al.*, 2014). En el presente trabajo, mediante RT-PCR se encontró expresión tanto de la forma T-TrkB como de la forma F-TrkB, lo cual concuerda con estudios previos de RT-PCR (Ehrhard y Otten, 1994) en otras estructuras del sistema nervioso periférico y contrasta con los estudios anteriores que mediante técnicas inmunológicas no detectaron la forma completa del receptor (Dixon y McKinnon; Wetmore y Olson, 1995), lo cual puede ser reflejo de la mayor sensibilidad de las técnicas de biología molecular con respecto a las técnicas inmunológicas para la detección de la expresión de proteínas.

Al considerar nuevamente que la presencia de ARNm no representa necesariamente la expresión celular de las proteínas, estudios paralelos en nuestro grupo de trabajo mediante WB e inmunohistoquímica confirmaron que la proteína de TrkB está presente en las neuronas del GCS, con un porcentaje de expresión de la forma F-TrkB y T-TrkB de 19% y de 55% del total de neuronas del GCS respectivamente (Valle-Leija *et al.*, 2017), consistente con los presentes experimentos de RT-PCR que muestran mayor expresión de la forma truncada. Esto apoyaría la presencia receptores TrkB funcionales y no funcionales en el GCS como posible blanco de neurotrofinas. Aunque es conocida la especificidad del NGF maduro por los receptores TrkA y de BDNF por los receptores TrkB, la presencia de intermediarios del procesamiento de NGF que presentan cambios en la afinidad por receptores como efecto de la axotomía abre la posibilidad de explorar en el futuro si estos intermediarios son capaces de unirse también a otro tipo de receptores Trk como TrkB, o bien, que los receptores TrkB puedan actuar como mediadores de la respuesta de TrkA, resaltando que hasta hace poco no se consideraba su presencia en el escenario de la función simpática del GCS.

Adicionalmente, se ha observado que la axotomía puede modificar la expresión de receptores Trk, (incluyendo a TrkB) en nervios periféricos. El corte del nervio ciático en ratas adultas disminuyó la expresión de T-TrkB en el segmento distal del axón, lo cual se relacionó con el favorecimiento de la unión de su ligando BDNF a los receptores funcionales F-TrkB como mecanismo de respuesta al daño axonal (Funakoshi *et al.*, 1993). La sobrevivencia en respuesta a la axotomía a través de la señalización por la activación de receptores TrkB ya ha sido identificada en otros modelos neuronales (Alcántara *et al.*, 1997). Nuestro hallazgo de que el GCS también expresa ambos tipos de receptores Trk-B podría significar la existencia de mecanismos de reparación y sobrevivencia

similares en otros nervios periféricos. Con este propósito, el siguiente paso propuesto es determinar cambios en la expresión de receptores TrkB por efecto de la axotomía.

Los eventos descritos en el presente trabajo pueden resumirse en la **Figura 14**. La axotomía del GCS interrumpe el suministro normal del NGF desde su órgano blanco. Sin embargo, la apoptosis esperada como consecuencia de la interrupción del suministro de factores tróficos no ocurre (1). Previamente se ha identificado que la expresión de proNGF ocurre mediante la activación de la vía de señalización de JNK y la expresión de c-jun y c-fos, lo cual favorece la formación de AP-1 (2). Los resultados obtenidos indican la expresión del gen de proNGF en el GCS axotomizado por lo que el mecanismo mencionado a través de AP-1 sería el mejor candidato para permitir dicha expresión (3). El proNGF se expresa y las proteínas precursoras son procesadas mediante convertasas para la formación de NGF maduro (4). A su vez, este NGF recién producido refuerza la activación de la vía JNK y la formación de AP-1, lo cual permite la regulación de otros genes, como TH (5). El resultado sería el mantenimiento de la producción de noradrenalina en el GCS y, como resultado, el mantenimiento de la función simpática.

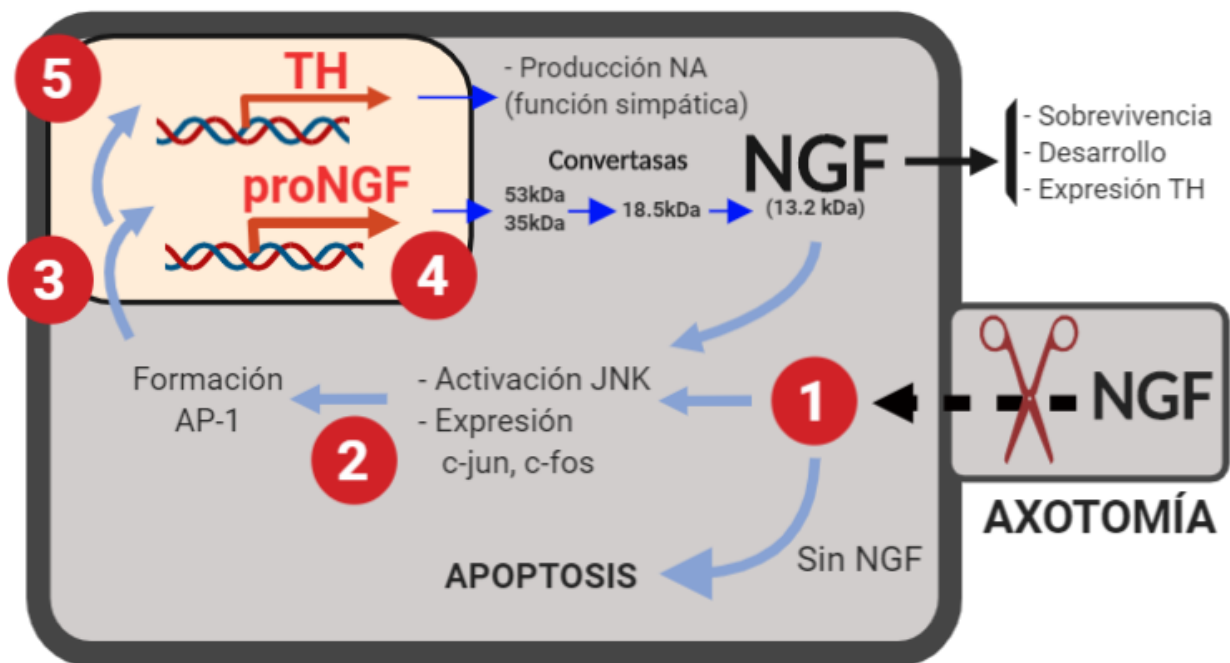


Figura 14: Expresión de NGF y TH en el GCS axotomizado.

CONCLUSIONES:

- El GCS de la rata adulta presenta una expresión mínima de NGF. La axotomía del GCS aumenta la expresión de ARNm de NGF a los 7 días post-axotomía. Este aumento de expresión se revierte al administrar NGF de forma exógena.
- La axotomía no cambia los niveles de la forma madura de NGF (13.2kDa) ni del intermediario de 18.5kDa. En cambio, la axotomía disminuye los niveles de los intermediarios de 34 y 53kDa. La restitución de exógena de NGF revierte estos cambios.
- La axotomía no modifica los niveles de expresión de ARNm de TH, lo cual indica que la función simpática se mantiene en el GCS axotomizado. Se propone a la expresión de NGF maduro en el GCS como mecanismo responsable.
- En condiciones control, el GCS de la rata expresa ARNm del receptor TrkB en sus formas completa y truncada, con mayor expresión de la forma truncada.

Anexo 1: Vega A, Cancino-Rodezno A, Valle-Leija P, **Sánchez-Tafolla BM**, Elinos D, Cifuentes F, Morales MA (2015). **Neurotrophin-dependent plasticity of neurotransmitter segregation in the rat superior cervical ganglion in vivo.** *Dev Neurobiol.* 76(8), 832-846.

Neurotrophin-Dependent Plasticity of Neurotransmitter Segregation in the Rat Superior Cervical Ganglion *In Vivo*

A. Vega, A. Cancino-Rodezno, P. Valle-Leija, B.M. Sánchez-Tafolla, D. Elinos, F. Cifuentes, M.A. Morales

Departamento de Biología Celular & Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. 3er Circuito Exterior s/Número, Cd. Universitaria, México, D.F, 04510, México

Received 28 April 2015; revised 16 October 2015; accepted 6 November 2015

ABSTRACT: Neurons are able to segregate transmitters to different axon endings. Segregation is a plastic neuronal feature; it can be modulated by synaptic environment. We have demonstrated that neurotrophin and other cellular factors regulate segregation in sympathetic neurons in culture. Herein we tested the hypothesis that sympathetic neurons *in vivo* are also capable to exhibit neurotrophin-dependent plasticity of segregation. To explore the effect of neurotrophin on segregation, we reduced ganglionic NGF content by the transection of postganglionic nerves (axotomy) of the superior cervical ganglia. By immunohistochemistry, Western blot, and PCR analyses, we explored the effect of axotomy on the NGF and BDNF content of ganglionic neurons, and on the segregation extent of vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) and methionine enkephalin (mENK) in pre-ganglionic varicosities. We analyzed NGF-dependence of the changes found by applying

exogenous NGF. Axotomy reduced ganglionic NGF and BDNF content, increased NGF transcripts, and increased VAcHT-mENK segregation. Axotomy also increased the number of VAcHT immunopositive varicosities, and caused the appearance of a population of VAcHT-, mENK- or SV2-containing varicosities lacking Synaptophysin (Syn). Administration of NGF prevented changes in NGF content, kept NGF transcripts increased, and counteracted changes in segregation and in the number of cholinergic varicosities. The exogenous NGF did not preclude change in BDNF content or in the occurrence of the VAcHT- or mENK-containing varicosities lacking Syn. Data demonstrate that segregation of transmitters *in vivo* is plastic and it is modulated by environmental signals like NGF. We propose a possible functional correlate of segregation plasticity in the sympathetic ganglia. © 2015

Wiley Periodicals, Inc. *Develop Neurobiol* 00: 000-000, 2015

Keywords: NGF; sympathetic; BDNF; axotomy

INTRODUCTION

For many years, it has been assumed that neurons store and release the same set of neurotransmitters at all varicosities throughout its neuronal arbor, a

neuronal feature known as co-localization (Burnstock, 1976; Yang et al., 2002; Burnstock, 2004; Lorentz et al., 2013). However, in the last decades evidence has shown that neurotransmitters can be stored and independently released from distinct axon endings of single neurons, which challenges the co-localization idea. These new data support the hypothesis that neurons segregate their neurotransmitters to different synapses (Sulzer et al., 1998; Sulzer and Rayport, 2000; Schäfer et al., 2002; Landry et al., 2003; Nishimaru et al., 2005; Kawano et al., 2006; Dal Bo et al., 2008; Descarries et al., 2008; Shutoh

Correspondence to: M.A. Morales (mam@biomedicas.unam.mx).
Contract grant sponsor: CONACYT (México); contract grant numbers: 49807Q, 128332.
© 2015 Wiley Periodicals, Inc.
Published online 00 Month 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI 10.1002/dneu.22362

Anexo 2: Valle-Leija P, Cancino-Rodezno, **Sánchez-Tafolla BM**, Arias E, Elinos D, Feria J, Zetina ME, Morales MA, Cifuentes F (2017). **Presence of Functional Neurotrophin TrkB Receptors in the Rat Superior Cervical Ganglion.** *Front Physiol.* 8 (474).



Presence of Functional Neurotrophin TrkB Receptors in the Rat Superior Cervical Ganglion

Pablo Valle-Leija¹, Angeles Cancino-Rodezno², Berardo M. Sánchez-Tafolla¹, Erwin Arias¹, Diana Elinos¹, Jessica Feria¹, María E. Zetina¹, Miguel A. Morales¹ and Fredy Cifuentes^{1*}

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ²Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Sympathetic neurons express the neurotrophin receptors TrkA, p75NTR, and a non-functional truncated TrkB isoform (TrkB-Tc), but are not thought to express a functional full-length TrkB receptor (TrkB-F). We, and others, have demonstrated that nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) modulate synaptic transmission and synaptic plasticity in neurons of the superior cervical ganglion (SCG) of the rat. To clarify whether TrkB is expressed in sympathetic ganglia and contributes to the effects of BDNF upon sympathetic function, we characterized the presence and activity of the neurotrophin receptors expressed in the adult SCG compared with their presence in neonatal and cultured sympathetic neurons. Here, we expand our previous study regarding the immunodetection of neurotrophin receptors. Immunohistochemical analysis revealed that 19% of adult ganglionic neurons expressed TrkB-F immunoreactivity (IR), 82% expressed TrkA-IR, and 51% expressed p75NTR-IR; TrkB-Tc would be expressed in 36% of neurons. In addition, using Western-blotting and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses, we confirmed the expression of TrkB-F and TrkB-Tc protein and mRNA transcripts in adult SCG. Neonatal neurons expressed significantly more TrkA-IR and TrkB-F-IR than p75NTR-IR. Finally, the application of neurotrophin, and high frequency stimulation, induced the activation of Trk receptors and the downstream PI3-kinase (phosphatidylinositol-3-kinase) signaling pathway, thus evoking the phosphorylation of Trk and Akt. These results demonstrate that SCG neurons express functional TrkA and TrkB-F receptors, which may contribute to the differential modulation of synaptic transmission and long-term synaptic plasticity.

Keywords: neurotrophin receptors, NGF, BDNF, signaling pathways, sympathetic neurons, synaptic plasticity

OPEN ACCESS

Edited by:

Alan Lomas,
Queen's University, Canada

Reviewed by:

Michael G. Blennerhassett,
Queen's University, Canada
Darrin O'Malley,
University College Cork, Ireland

***Correspondence:**

Fredy Cifuentes
fcifuent@biomedicas.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Autonomic Neuroscience,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 03 March 2017

Accepted: 21 June 2017

Published: 11 July 2017

Citation:

Valle-Leija P, Cancino-Rodezno A,
Sánchez-Tafolla BM, Arias E, Elinos D,
Feria J, Zetina ME, Morales MA and
Cifuentes F (2017) Presence of
Functional Neurotrophin TrkB
Receptors in the Rat Superior Cervical
Ganglion. *Front. Physiol.* 8:474.
doi: 10.3389/fphys.2017.00474

INTRODUCTION

Neurotrophins carry out multiple functions in the central and peripheral nervous system, including survival, growth, differentiation, and synaptogenesis (Lu and Figurero, 1997). In addition, neurotrophic factors, such as nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), acutely regulate synaptic transmission and plasticity (Lu et al., 2004). Neurotrophins bind to, and activate, two types of membrane receptors: the low-affinity p75 neurotrophin receptor (p75NTR) and the tropomyosin-related kinase (Trk) receptor. The Trk receptors, TrkA, TrkB,

Anexo 3: Aislamiento de ARN total con TRIzol

1. Cada experimento consto de un grupo de animales conformado tres ratas Wistar adultas (250g de peso). El primer animal funcionó como el control del grupo, en el que se implantó un parche de polímero Elvax con vehículo solamente, en el GCS. En la segunda rata se axotomizaron los dos nervios eferentes del ganglio cervical superior derecho, además de colocarse en el GCS un parche de polímero Elvax con vehículo. En la tercera rata además de la axotomía se administró NGF en forma de un parche de polímero Elvax con 70ng de la proteína madura (13.2kDa) NGF.

2. Después de 7 días de la cirugía, se obtuvo el ganglio cervical superior de cada una de las tres ratas y un pedazo de cerebro anterior de la rata control, el cual es un tejido que expresa las diferentes formas de NGF de manera constitutiva y funcionó como Control positivo de su expresión. Los tejidos fueron colocados en tubos microcentrífuga de 2.0mL y etiquetados de acuerdo a su origen:
 - Control (Ctl)
 - Axotomía (Axt)
 - Restitución NGF (Rt)

3. Después de ser diseccionados, los tejidos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Con una hoja de bisturí estéril fueron cortados en pedazos pequeños, sin descongelarlos, para facilitar su homogenización. Los fragmentos de tejido se colocaron en tubos de microcentrífuga de 2.0mL y se adicionaron 800µL de TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a cada tubo.

4. El tejido fue triturado con un homogeneizador Polytron (Kinematica, New York, NY, USA) hasta que no quedaron fragmentos visibles de tejido. Los tubos se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron (12 000 x g durante 10 min) a 4°C para retirar restos de tejido no homogenizado. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo.

5. A cada tubo (con el tejido homogenizado en 800 µL de TRIzol) se adicionaron 160µL de cloroformo y se mezclaron por inversión de los tubos. Se centrifugaron nuevamente los tubos para formar dos fases: una roja (en la parte inferior con el TRIzol) y otra transparente (con el cloroformo) que contiene al ARN, en la parte superior.

6. El ARN se encuentra en la fase acuosa superior. Se recuperó esta fase y se adicionaron 400µL de alcohol isopropílico para precipitar el ARN. Se incubaron los tubos durante 5' a T.A y se centrifugaron nuevamente.
7. La pastilla de color blanco obtenida está formada por el ARN. Se lavó la pastilla con 400µL de etanol 75%. Se centrifugaron nuevamente los tubos.
8. La pastilla de ARN de GCS se resuspendió en 25 µL agua estéril. En el caso de las muestras de ARN de cerebro, éstas se resuspendieron en 50 µL agua estéril.
9. La concentración de ARN fue cuantificada por espectrofotometría con un Nanodrop, de acuerdo su absorbancia, con la fórmula $[ARN] = (40 \text{ ng}/\mu\text{L}) \times A_{260\text{nm}}$.

Anexo 4: Protocolo detallado de Western Blot.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

1. Cada grupo de animales se conformó de tres ratas Wistar adultas (250g de peso) de la misma manera que en los experimentos de RT-PCR: Control (Ctl), Axotomía (Axt) y Restitución NGF (Rt).
2. Después de 7 días de la cirugía, se obtuvo el ganglio cervical superior de cada una de las tres ratas y un pedazo de cerebro anterior de la rata control, el cual es un tejido que expresa las diferentes formas de NGF de manera constitutiva y funcionó como Control positivo de su expresión. Los tejidos fueron colocados en tubos microcentrífuga de 2.0mL y etiquetados de acuerdo a su origen:

- Control (Ctl)

- Axotomía (Axt)

- Restitución NGF (Rt)

3. Después de ser diseccionados, los tejidos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Con una hoja de bisturí estéril fueron cortados en pedazos pequeños, sin descongelarlos, para facilitar su homogenización. Los fragmentos de tejido se colocaron en tubos de microcentrífuga de 2.0mL y se adicionaron 500µL de Buffer de lisis a cada tubo.
4. El tejido fue homogenizado con un homogeneizador Polytron (Kinematica, New York, NY, USA) hasta que no quedaron fragmentos visibles de tejido. Los tubos se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron (12 000 x g durante 10 min) a 4°C para retirar restos de tejido no homogenizado. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo.
5. La concentración de proteínas de cada muestra fue cuantificada por el Método BCA sobrenadante y posteriormente las muestras fueron almacenadas a -70°C para los experimentos posteriores.
6. Las proteínas fueron analizadas de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, 1970) mediante un gel de poliacrilamida 12.5% con SDS para separar las muestras de proteínas. En cada carril se adicionó 15 mg de proteína. Se incluyó un carril con marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA Cat. #1610374) para corroborar el mismo. Se incluyó también un carril con 1mg de la proteína β -NGF purificada NGF de 13.2kDa (Millipore Chemicon, CA, USA, Cat. #GF028),
7. La electroforesis se realizó en una cámara vertical húmeda a 70V durante 1hr 10min.
8. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDVF Immobilon-P (Merck Millipore, USA) mediante la aplicación de 120V durante 3hrs. El proceso fue confirmado mediante la tinción de la membrana con rojo de Ponceau.

9. La membrana fue bloqueada con 5% de BSA (albúmina sérica bovina) para prevenir uniones inespecíficas de los anticuerpos. Anticuerpo secundario: conjugado a HRP (peroxidasa de rábano). Para la visualización se utilizó un sustrato químico luminiscente de peroxidasa (Millipore, USA). La presencia de la proteína de interés se manifestó como la aparición de una banda luminosa en su respectivo peso molecular.
10. Las imágenes fueron capturadas en una película fotográfica, revelada y digitalizada mediante el sistema de escaneo ImageQuant LAS4000 Imaging System (GE Healthcare, USA).

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR MÉTODO DE BRADFORD (BCA)

- Reactivo BCA (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Incluir una curva estándar de albúmina BSA (Rango: 0.063-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).
 1. En un tubo pequeño adicionar 20 μL de muestra experimental o de la curva estándar de BSA. Las primeras pueden ser en dilución 1:1 con PBS.
 2. Mezcla BCA: 1mL Reactivo A + 25 μL Reactivo B.
 3. Agregar 150 μL de mezcla BCA a cada tubo y mezclar.
 4. Calentar las muestras a 40°C durante 20min.
 5. Cuantificar la concentración de proteína de cada muestra el Nanodrop (método BCA), con su respectiva curva estándar.

SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

1.- Acrilamida/bis acrilamida

- pesar 29.2g de acrilamida + 0.8 g de N´N´-Bis-Metil acrilamida
- aforar a 100mL con agua MQ
- Filtrar y cubrir con papel aluminio
- Guardar a 4°C.

2.- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

- Pesar 13.61g de tris base
- Disolver en 40mL de agua MQ
- Ajustar el pH a 8.8 con HCl 6N
- Aforar a 75mL con agua MQ
- Esterilizar y guardar a 4°C

3.- 0.5M Tris-HCl, pH 6.8

- Pesar 6g de tris base
- Disolver en 80mL de agua MQ
- Ajustar el pH a 6.8 con HCl 6N
- Aforar a 100mL con agua MQ
- Esterilizar y guardar a 4°C

4.- SDS 10%

- Pesar 1g de SDS
- Disolver en agua MQ
- Aforar volumen a 10mL
- Guardar a 4°C

5.- Buffer de corrida 10x, pH 8.3

- Tris base 30.3g
- glicina 44g
- SDS 10g
- Agua MQ aforar a 1,000 mL
- No ajustar pH
- Guardar a 4°C

6.- Buffer de transferencia, pH 8.1-8.4

- Tris base (25mM) 3.03g
- Glicina (192mM) 14.4g
- Metanol 200mL
- Agua MQ Aforar a 1,000mL
- Ajustar pH a 8.3

7.-Azul de Coomasie

Azul de Coomasie R-250-0.1% en 0.25g

- Ácido acético 10mL
- Metanol 40mL
- Agua MQ 50mL

8.-Solución para desteñir el gel

- Ácido acético 10mL
- Etanol 15mL
- Agua MQ 75mL

*si se requiere desteñir más rápidamente

- Ácido acético 10mL
- Metanol 50mL
- Agua MQ 40mL

9.-Buffer de muestra

	<u>2x</u>	<u>8x</u>
-Agua MQ (mL)	14.2	3.55
-Tris 0.5M pH 6.8 (mL)	5	5
-Glicerol (mL)	10	10
-SDS 10% (mL)	8	8
-Azul de bromofenol 0.5% (mL)	0.8	0.8

-β-mercaptoetanol: agregar 50μL por cada 950μL de buffer antes de usarlo.

10.- Buffer de Lisis

		Para 25 mL:
NaCl	150mM	219 mg
Tris	20 mM	6057 mg
EDTA	1 mM	10.405 mg
Tritón X-100	0.5%	0.125 mL
DTT	0.5mM	1.925mg o 0.125 mL Stock
H2O		25 mL

pH = 8.0 con HCl 1N

- Inhibidores de proteasas (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN, USA)
1mL por cada 100mL de lisado (1:100)
0.25mL para 25mL Totales
o 1 Tableta (depende de la presentación)

GELES DE ACRILAMIDA/BIS

Gel separador (para 2 geles de 1.5mm de grosor)	12.5%	18%
-Agua	4.75 mL	1.8 mL
-Tris 1.5M pH 8.8	3.75 mL	3.9 mL
-SDS 10%	150 µL	150 µL
-Acrilamida/bis	6.25 mL	9 mL
PSA 10%	150 µL	150 µL
TEMED	12.5 µL	12.5 µL

- Agregar 1-2 isopropanol hasta cubrir toda la superficie del gel.
- Decantar isopropanol una vez que haya polimerizado el gel
- Retirar remanente de isopropanol con un papel filtro

Gel concentrador (para 2 geles de 1.5mm de grosor)	
-Agua	3.4 mL
-Tris 0.5M pH 6.8	600 µL
-SDS 10%	47 µL
-Acrilamida/bis	640 µL
PSA 10%	25 µL
TEMED	3 µL

- Colocar peine, rellenar con acrilamida las orillas del gel.
- Retirar peine una vez polimerizado el gel.
- Rellenar con agua, cubrir con plástico y guardar a 4°C.
- El PSA debe almacenarse a -20°C.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNA

- 1.-Calentar tubos con muestra + buffer de muestra a 96°C por 8 min. (El estándar de P.M. no se calienta ni se mezcla con buffer).
- 2.-Cargar proteínas en el gel, de acuerdo a la concentración deseada (Volumen máximo para geles de 0.75 mm de grosor = 40µL; 1.5mm = 60µL.
- 3.-Montar cámara de electroforesis.
- 4.- Poner buffer de corrida 1X en el compartimiento interior de la cámara, éste debe estar rebosando. En la parte extrema de la cámara el volumen de buffer debe estar por encima de la línea marcada en el plástico.
- 5.-Conectar cámara de transferencia a la fuente de poder. Aplicar 85V para que las proteínas de los distintos carriles se encuentren alineadas en el gel concentrador. Una vez alcanzado este punto, cambiar a 70V hasta que el frente de corrida alcance el límite inferior del gel separador.
 - Para comprobar que el voltaje está actuando sobre los geles, revisar que en el compartimiento interior de la cámara haya espuma ascendiendo desde donde está la resistencia éste.
 - Si las proteínas no bajan, revisar el volumen del buffer en el compartimiento interior de la cámara, debe estar rebosando.

TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

- 1.- Inmediatamente después de la electroforesis desmontar los geles en un recipiente con buffer de transferencia frío (mientras más frío se encuentre mejor), quitar gel concentrador. Dejar reposar por al menos 20 min. Humedecer también en este recipiente el papel filtro y esponjas del casete de transferencia.
- 2.- Cortar la membrana a transferir del tamaño del gel. Las membranas de PVDF requieren ser activadas antes de su utilización: sumergirlas en metanol durante 10s seguido de 2 lavados con agua destilada (las membranas de nitrocelulosa no requieren ser activadas). Dejar equilibrar la membrana en buffer de transferencia frío por al menos 20min.
- 3.- Armar los casetes de transferencia (LADO NEGATIVO= COLOR NEGRO)

+ (Rojo o transparente)

Esponja
Papel filtro
Membrana
Gel
Papel filtro
Esponja

- (Negro)

Orientar el lado negativo del casete hacia el lado negativo de la unidad de transferencia. Colocar unidad congelante.

- 4.- Colocar la cámara de transferencia en una hielera (o recipiente aislante térmico) llena de hielo.
- 5.- Transferir a 120V durante 2h 30min.
- 6.- Desarmar casete y mantener membranas en buffer.
- 7.- Teñir membranas con rojo de Ponceau para observar las proteínas transferidas. RECICLAR COLORANTE. Lavar abundantemente con agua destilada en agitación hasta que desaparezca la coloración rosa/roja. Marcar con una aguja el inicio y final de los distintos carriles.
- 8.- Lavar membrana con PBS 1X.

REFERENCIAS (En orden de aparición):

Vega A, Cancino-Rodezno A, Valle-Leija P, Sánchez-Tafolla BM, Elinos D, Cifuentes F, Morales MA (2015). **Neurotrophin-dependent plasticity of neurotransmitter segregation in the rat superior cervical ganglion *in vivo***. *Dev Neurobiol.* 76(8), 832-846.

Valle-Leija P, Cancino-Rodezno A, Sánchez-Tafolla BM, Arias E, Elinos D, Feria J, Zetina ME, Morales MA, Cifuentes F (2017). **Presence of Functional Neurotrophin TrkB Receptors in the Rat Superior Cervical Ganglion**. *Front Physiol.* 8 (474).

Hamburger V (1934). **The effects of wing bud extirpation on the development of the central nervous system in chick embryos**. *J Exp Zool.* 68, 449–494.

Levi-Montalcini R, Hamburger V (1953). **A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo**. *J Exp Zool* 123, 233–287.

Levi-Montalcini R, Booker B (1960). **Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve-growth protein**. *Proc Natl Acad Sci USA* 46(3), 384–391.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS White LE (Editores) (2012). **Neuroscience** (5° edición). Sinauer Associates Inc. Estados Unidos.

Tyler WJ, Perrett SP, Pozzo-Miller LD (2002). **The role of neurotrophins in neurotransmitter release**. *Neuroscientist* 8(6), 524-531.

Gómez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML. (2013). **Neurotrophins and synaptic plasticity**. *Curr Top Behav Neurosci.* 2013;15, 117-136.

Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001). **Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair**. *Annu Rev Neurosci.* 24, 1217-1281.

Ullrich, A., Gray, A., Berman, C. and Dull, TJ (1983). **Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse**. *Nature*, 303, 821–825.

Angeletti RH, Bradshaw RA (1971). **Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: Amino acid sequence**. *Proc Natl Acad Sci USA* 68, 2417-2420.

Butte MJ, Hwang PK, Mobley WC, Fletterick RJ (1998). **Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors**. *Biochemistry* 37:16846–52.

Fahnestock M, Yu G, Coughlin MD (2004). **ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule?**. *Prog Brain Res.* 146, 101-110.

Edwards RH, Selby MJ, Rutter WJ (1986). **Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors**. *Nature* 319, 784–787.

Darling TL, Petrides PE, Beguin P, Frey P, Shooter EM, Selby M, Rutter WJ (1983). **The biosynthesis and processing of proteins in the mouse 7S nerve growth factor complex**. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 48(1), 427-434.

Edwards RH, Selby MJ, Mobley WC, Weinrich SL, Hruby DE, Rutter WJ (1988). **Processing and secretion of nerve growth factor: expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector.** Mol Cell Biol. 8(6), 2456-2464.

Lakshmanan J, Burns C, Smith RA (1988). **Molecular forms of nerve growth factor in mouse submaxillary glands.** Biochem Biophys Res Commun. 152(3),1008-1014.

Murphy RA, Chlumecky V, Smillie LB, Carpenter M, Nattriss M, Anderson JK, Rhodes JA, Barker PA, Siminoski K, Campenot RB (1989). **Isolation and characterization of a glycosylated form of beta nerve growth factor in mouse submandibular glands.** J Biol Chem. 264(21), 12502-12509.

Suter U, Heymach JV Jr, Shooter EM (1991). **Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF.** EMBO J. 10(9), 2395-2400.

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chrétien M, Murphy RA (1996). **Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases.** Biochem J. 314(3), 951-960.

Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, Thorner J, Gibson HL, Brake AJ, Barr PJ, Thomas G (1990). **Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo.** J Cell Biol. Dec;111(6-2), 2851-2859.

Le AP, Friedman WJ (2012). **Matrix metalloproteinase-7 regulates cleavage of pro-nerve growth factor and is neuroprotective following kainic acid-induced seizures.** J Neurosci. 32(2),703-712.

Segal RA (2003). **Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations.** Annu Rev Neurosci. 26, 299-330.

Klein R, Martin-Zanca D, Barbacid M, Parada L (1990). **Expression of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system.** Development 109(4), 845–850.

Jing S, Tapley P, Barbacid M (1992). **Nerve growth factor mediates signal transduction through *trk* homodimer receptors.** Neuron 9(6),1067-79.

Kaplan DR, Miller FD (2000). **Neurotrophin signal transduction in the nervous system.** Curr Opin Neurobiol. 10, 381-391.

Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC (1997). **Immunocytochemical localization of *TrkB* in the central nervous system of the adult rat.** J Comp Neurol. 378, 135–157.

Wetmore C, Olson L (1995). **Neuronal and nonneuronal expression of neurotrophins and their receptors in sensory and sympathetic ganglia suggest new intercellular trophic interactions.** J Comp Neurol. 353, 143–159.

Dixon JE, McKinnon D (1994). **Expression of the *trk* gene family of neurotrophin receptors in prevertebral sympathetic ganglia.** Brain Res. Dev. Brain Res. 77, 177–182.

- Ehrhard PB, Otten U (1994). **Postnatal ontogeny of the neurotrophin receptors trk and trkB mRNA in rat sensory and sympathetic ganglia.** *Neurosci Lett.* 166, 207–210.
- Chao MV (1994). **The p75 neurotrophin receptor.** *J Neurobiol.* 25(11),1373-1385.
- Rodriguez-Tébar A, Dechant G, Barde YA (1991). **Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 331(1261):255-258.
- Kaplan DR, Miller FD (1997). **Signal transduction by the neurotrophin receptors.** *Curr Opin Cell Biol.* 9(2), 213–221.
- Barker PA, Shooter EM (1994). **Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells.** *Neuron* 13(1), 203-215.
- Davies AM, Lee KF, Jaenisch R (1993). **P75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins.** *Neuron.* 11(4), 565-574.
- Verdi JM, Birren SJ, Ibáñez CF, Persson H, Kaplan DR, Benedetti M, Chao MV, Anderson DJ (1994). **p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells.** *Neuron* 12(4), 733-745.
- Friedman WJ (2000). **Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor.** *J Neurosci.* 20(17), 6340-6.
- Brann AB, Tcherpakov M, Williams IM, Futeran AH, Fainzilber M (2002). **Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase.** *J Biol Chem.* 277(12), 9812-9818.
- Luther JA, Birren SJ (2006). **Nerve growth factor decreases potassium currents and alters repetitive firing in rat sympathetic neurons.** *J Neurophysiol.* 96(2), 946-958.
- Arias ER, Valle-Leija P, Morales MA, Cifuentes F (2014). **Differential contribution of BDNF and NGF to long-term potentiation in the superior cervical ganglion of the rat.** *Neuropharmacology* 81, 206-214.
- Thoenen H, Angeletti PU, Levi-Montalcini R, Kettler R (1971). **Selective induction by nerve growth factor of tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase in the rat superior cervical ganglia.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 68(7),1598-1602.
- Gizang-Ginsberg E, Ziff EB (1990). **Nerve growth factor regulates tyrosine hydroxylase gene transcription through a nucleoprotein complex that contains c-Fos.** *Genes Dev.* 4(4), 477-91.
- Otten U, Baumann JB, Girard J (1979). **Stimulation of the pituitary-adrenocortical axis by nerve growth factor.** *Nature* 282(5737), 413–414.
- Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Bonini S, Starace G, D'Elis MM, De Carli M, Aloe L (1997). **Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors.** *J Allergy Clin Immunol.* 100(3), 408-414.

Pierucci D, Cicconi S, Bonini P, Ferrelli F, Pastore D, Matteucci C, Marselli L, Marchetti P, Ris F, Halban P, Oberholzer J, Federici M, Cozzolino F, Lauro R, Borboni P, Marlier LN (2001). **NGF-withdrawal induces apoptosis in pancreatic beta cells in vitro**. *Diabetologia* 44(10), 1281-1295.

Maranesi M, Petrucci L, Leonardi L, Piro F, Rebollar PG, Millán P, Cocci P, Vullo C, Parillo F, Moura A, Mariscal GG, Boiti C, Zerani M (2018). **New insights on a NGF-mediated pathway to induce ovulation in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)**. *Biol Reprod*. 98(5), 634-643.

Hasan W, Pedchenko T, Krizsan-Agbas D, Baum L, Smith PG (2003). **Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein**. *J Neurobiol*. 57, 38-53.

Korsching S, Thoenen H (1983). **Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervations**. *Proc Natl Acad Sc USA*. 80(11), 3513–3516.

Karlsson JO, Hansson HA, Sjöstrand J (1971). **Effect of Colchicine on Axonal Transport and Morphology of Retinal Ganglion Cells**. *Z Zellforsch*. 115, 265-283.

Hendry IA (1992). **Responses of autonomic neurones to target deprivation: axotomy and regeneration**. En: Hendry IA, Hill CE (Editores). **Development, Regeneration and Plasticity of the Autonomic Nervous System**. Vol. 2. Harwood Academic Publishers, Switzerland, 415–462.

Zigmond RE (1997). **LIF, NGF, and the cell body response to axotomy**. *Neuroscientist*. 3, 176–185.

Del Signore A, De Sanctis V, Di Mauro E, Negri R, Perrone-Capano C, Paggi P (2006). **Gene expression pathways induced by axotomy and decentralization of rat superior cervical ganglion neurons**. *Eur J Neurosci*. 23(1), 65-74.

Coulibaly AP, Gannon SM, Hawk K, Walsh BF, Isaacson LG (2013). **Transection of preganglionic axons leads to CNS neuronal plasticity followed by survival and target reinnervation**. *Auton Neurosci*. 179(1-2), 49-59.

Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, Terao S, Mitsuma T (1996). **Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues**. *Neurochem Res*. 21, 929-938.

Geden MJ, Deshmukh M (2016). **Axon degeneration: context defines distinct pathways**. *Curr Opin Neurobiol*. 39, 108-115.

Kondo Y, Saruta J, To M, Shiiki N, Sato C, Tsukinoki K (2010). **Expression and role of the BDNF receptor-TrkB in rat adrenal gland under acute immobilization stress**. *Acta Histochem Cytochem*. 43(6), 139-147.

Merino-Jiménez C, Miguel F, Feria-Pliego JA, Zetina Rosales ME, Cifuentes F, Morales MA (2018). **Sympathetic Hyperactivity and Age Affect Segregation and Expression of Neurotransmitters**. *Front Cell Neurosci*. 12(411).

Kristiansen M, Ham J (2014). **Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model.** Cell Death Differ 21, 1025-1035.

Chie E, Liu D, Zhou XF, Rush R (2001). **Quantification of neurotrophin mRNA by RT-PCR.** Methods Mol Biol. 169, 81-90.

Hendry IA, Stöckel K, Thoenen H, Iversen LL (1974). **The retrograde axonal transport of nerve growth factor.** Brain Res. 68(1), 103-121.

Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H (1987). **Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection.** J Cell Biol. 104, 1623-1631.

Isaacson LG, Saffran BN, Crutcher KA (1992). **Nerve growth factor- induced sprouting of mature, uninjured sympathetic axons.** J Comp Neurol 326, 327–336.

Chao MV, Bothwell M (2002). **Neurotrophins: to cleave or not to cleave.** Neuron 33(1), 9-12.

Kessler JA, Black IB (1982). **Regulation of substance P in adult rat sympathetic ganglia.** Brain Res. 234: 182–187.

Villar MJ, Cortés R, Theodorsson E, Wiesenfeld-Hallin Z, M. Schalling, Fahrenkrug J, Emson PC, Hökfelt T (1989). **Neuropeptide expression in rat dorsal root ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin.** Neuroscience 33, 587–604.

Hall ME, Wilson DL, Stone GC (1978). **Changes in synthesis of specific proteins following axotomy: detection with two-dimensional gel electrophoresis.** J Neurobiol. 9(5), 353-366.

Funakoshi H, Frisén J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, Persson H (1993). **Differential expression of mRNAARNs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve.** J Cell Biol. 123(2), 455-465.

Alcántara S, Frisén J, del Río JA, Soriano E, Barbacid M, Silos-Santiago I (1997). **TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death.** J Neurosci. 17(10), 3623-3633.

Laemmli UK (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227(5259), 680-685.