

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BIOLOGIA**



**DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES NEURONALES Y  
NO NEURONALES EN CEREBROS DE DOS CEPAS DE RATÓN  
ADULTO**

**EFRAIN AUGUSTO CEPEDA PRADO**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de biólogo**

**BIOLOGÍA**

**28 DE JULIO DEL 2003  
Bogotá, D. C**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

**DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES NEURONALES Y  
NO NEURONALES EN CEREBROS DE DOS CEPAS DE RATÓN  
ADULTO**

**EFRAIN AUGUSTO CEPEDA PRADO**

**APROBADO:**

---

Jaime Castellanos. M.Sc. Ph.D  
Director

---

Fabio Ruiz.  
Codirector

---

Marlen Martínez. M.Sc.  
Jurado

---

Rosalía Pérez. M.Sc.  
Jurado

**DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES NEURONALES Y  
NO NEURONALES EN CEREBROS DE DOS CEPAS DE RATÓN  
ADULTO**

**EFRAIN AUGUSTO CEPEDA PRADO**

---

Ángela Umaña Mphil.  
Decana Académica

---

Luz Mercedes Santamaría  
Directora de carrera

## FORMATO DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

### AUTOR O AUTORES

Apellidos	Nombres
CEPEDA PRADO	EFRAIN AUGUSTO

### DIRECTOR (ES)

Apellidos	Nombres
CASTELLANOS PARRA	JAIME EDUARDO

### ASESOR (ES) O CODIRECTOR

Apellidos	Nombres
RUIZ	FABIO

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: BIÓLOGO

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES NEURONALES Y NO NEURONALES EN CEREBROS DE DOS CEPAS DE RATÓN ADULTO

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA: Carrera   x   Especialización    Maestría    Doctorado   

NOMBRE DEL PROGRAMA: BIOLOGÍA

CIUDAD: BOGOTA AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO: 2003

NÚMERO DE PÁGINAS 69

TIPO DE ILUSTRACIONES: lustraciones, Tablas, gráficos, Fotografías

MATERIAL ANEXO: TABLAS DE PROMEDIOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

## DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES.

C57BL/6, neurobiología, densitometría, ICR, Inmunohistoquímica,

## RESUMEN DEL CONTENIDO

El ratón por su tamaño, acceso y costo es el modelo biológico mas utilizado en estudios de neurobiología. Sin embargo, poco se conoce sobre las diferencias en la expresión de moléculas relacionadas con el sistema nervioso entre cepas de ratones que se usan frecuentemente en laboratorio. En este trabajo, se evaluó la variación en la densidad de inmunoreactividad de nueve marcadores, en cortes de cerebro, obtenidos de dos cepas de ratones adultos (ICR Y C57BL/6); a partir de técnicas de inmunohistoquímica y análisis morfométrico de densitometría. De tal forma, se obtuvo una valoración cuantitativa de la diferencia en la expresión de los neuropéptidos: Galanina y Neuropéptido Y; filamentos intermedios del citoesqueleto (neurofilamento y proteína ácida fibrilar glial); molécula de adhesión celular neural; receptor tirosina quinasa que liga al factor de crecimiento nervioso; receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75; subunidad alfa-4 del receptor nicotínico para acetilcolina y presencia de residuos de  $\alpha$ -D-galactosa usando la lectina *Griffonia simplicifolia* (IB4).

En particular, se observó un aumento en la densidad de inmunoreactividad para los marcadores p75, IB4, NCAM y la subunidad alfa-4, en los ratones de la cepa ICR (Prueba t-Student,  $p < 0,05$ ). La densidad de marcaje para NPY fue mayor en la cepa C57BL/6 ( $p < 0,05$ ). Esto puede indicar que las diferencias genéticas entre las cepas causan profundos cambios fenotípicos que puede afectar los resultados de los estudios realizados con un modelo u otro. Así mismo, la comparación anatómica, de expresión y distribución de marcadores es una técnica sencilla que puede ayudar a la interpretación de los resultados obtenidos en estudios farmacológicos o de comportamiento en estas especies.

A mis padres que siempre han confiado en mí  
brindándome su apoyo incondicional.

A mis hermanas a quienes amo.

A Isabel por acompañarme en los buenos y  
malos momentos durante mi paso por el  
Laboratorio de Neurociencias.

A Myriam Velandia, confidente y amiga.

## AGRADECIMIENTOS

Reitero mis agradecimientos a mis pares, a mis hermanas y a Isabel. Igualmente agradezco a toda mi familia que de una u otra manera colaboraron durante el transcurso de mi carrera.

Al Dr Jaime Castellanos por recibirme en su Laboratorio, brindándome su amistad y confianza, igualmente por su apoyo académico y técnico durante mí paso por el INS.

A la Dra Marlen Martínez por sus aportes académica y técnicos durante mi estadía en el Laboratorio de Neurociencias y sus aportes durante la evaluación de este trabajo

A la Dra Rosalía Pérez por su paciencia, enseñanzas y aportes a mí trabajo en el Laboratorio

Al Dr Orlando Torres y su grupo, por su colaboración y paciencia durante mi estadía en su Laboratorio

A mis compañeros del grupo de neurociencias por sus excelentes aportes y por compartir con migo los aciertos y los fracasos, especialmente a Luis Royero por ser un excelente amigo,.a Myriam Velandia por sus buenas enseñanzas y convertirse en una gran amiga dándome fortaleza cuando decaía. Y claro esta a Samanta Aponte, Nadia Castañeda y Verónica Rincón por las risas y los buenos momentos que compartimos.

Y por ultimo, de nuevo a Isabel Ramírez (o puentes), por acompañarme y apoyarme en todo momento y en especial en este instante, cuando he alcanzado una de mis primeras metas.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Modelo biológico</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Marcadores celulares</b>	<b>6</b>
2.2.1 <i>Proteínas estructurales</i>	7
2.2.1.1 Neurofilamente (NF)	7
2.2.1.2 Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	8
2.2.1 Receptores para el virus de la rabia (VR)	8
2.2.1.1 Molécula de adhesión celular neural (NCAM)	9
2.2.2.2 Receptor nicotínico de acetilcolina (RNACH)	11
2.2.2.3 Neurotrofinas	12
2.2.2.4 El Receptor de baja afinidad para Neurotrofinas p75 (p75 <sup>NTR</sup> )	13
2.2.2 Marcadores de subpoblaciones del GRD	14
2.2.3.1 Receptor tirosina quinasa para el NGF ( TrkA).	15
2.2.3.2 IB4 ( <i>Griffonia simplicifolia</i> )	16
2.2.3.3 Galanina (GAL)	16
2.2.3.4 Neuropeptido Y (NPY)	17
<b>2.3 Inmunohistoquímica</b>	<b>17</b>
<b>2.4 Análisis de imágenes</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Estrategia experimental</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Perfusión</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Disección del cerebro</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Cortes en vibrátomo</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Inmunohistoquímica por peroxidasa indirecta para cortes de cerebro de las cepas ICR y C57BL/6.</b>	<b>25</b>
<b>3.6 Análisis densitométrico</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Análisis estadístico</b>	<b>27</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Aspecto morfológico de los cortes obtenidos en vibrátomo</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Metodología estandarizada para la inmunodetección de los nueve marcadores en cortes de cerebro</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Protocolo estandarizado de la técnica de inmunohistoquímica por peroxidasa indirecta en cortes de cerebro de 50µm de ratón adulto obtenidos en vibrátomo</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Diferencias entre ICR y C57BL/6.</b>	<b>32</b>
<b>4.5 Proteínas estructurales</b>	<b>34</b>
4.5.1 <i>Neurofilamento (NF)</i>	34

4.5.2 Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	36
<b>4.6 Receptores postulados para el virus de la rabia</b>	<b>37</b>
4.6.1 Molécula de adhesión celular neural (NCAM)	37
4.6.2 Subunidad $\alpha$ -4 del receptor nicotínico de acetilcolina (RNACH)	39
4.6.3 Receptor de baja afinidad para neurotrofinas (p75 <sup>NTR</sup> )	41
<b>4.7 Marcadores de subpoblaciones del GRD</b>	<b>43</b>
4.7.1 Receptor tirosina quinasa para NGF (TrkA)	43
4.7.2 IB4 ( <i>Griffonia simplicifolia</i> )	45
4.7.3 Galanina (GAL):	47
4.7.4 Neuropéptido Y (NPY)	49
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>54</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Los modelos murinos se han reconocido como elementos importantes para la investigación básica, y aplicada al desarrollo de productos farmacológicos y estrategias terapéuticas para un sin número de enfermedades congénitas o causadas por microorganismos. Los estudios que se han hecho en cepas de ratones de laboratorio endo y exocriados se han desarrollado sobre animales transgénicos, patrones de distribución de marcadores, expresión y regulación de genes y su uso para obtener cultivos organotípicos y celulares.

Por tanto, el conocimiento de las diferencias entre las cepas de ratones que son usadas en éste tipo de estrategias aproximaciones, permitiría establecer patrones de respuesta a condiciones predeterminadas, que pueden ser asociadas a las características genéticas de los mismos y ayudar a interpretar los hallazgos que se obtienen.

Existen varios reportes de diferencias entre cepas de animales endo y exocriados, estos hallazgos están basados principalmente en estudios de sensibilidad a diferentes fármacos (Weizman *et al.* 1999), actividad locomotora y exploratoria (Messiha *et al.* 1990), procesos de memoria y aprendizaje (Dellu *et al.* 2000, Yamada *et al.* 1992) e incluso se han reportado diferencias en el tropismo del parásito *Trypanosoma cruzi* (Andrade *et al.* 2002) y a la susceptibilidad al virus de la rabia (VR) dependiendo de la cepa de ratón usada en los experimentos (Lodmell y Chesebro 1984, Lodmell y Ewalt 1985).

Sin embargo, existe poca información sobre las diferencias entre cepas de ratón con relación a la expresión de moléculas relacionadas con el sistema nervioso (SN), que pueden estar participando en los procesos de memoria y aprendizaje, sensibilidad farmacológica o de moléculas que puedan estar interactuando con los microorganismos mencionados anteriormente.

Por lo tanto, este trabajo presenta un desarrollo experimental que tiene como objetivo general, comparar las cepas de ratones mediante técnicas de inmunohistoquímica y establecer diferencias en la expresión de moléculas presentes en

el cerebro, que cumplen con diversos papeles tanto en la estructura como en su función y mantenimiento.

En el Laboratorio de Neurociencias del Instituto Nacional de Salud (INS) se ha desarrollado un modelo de interacción entre el VR y neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) usando ratones pertenecientes a las cepas ICR y C57BL/6. Trabajos recientes en esta línea, han encontrado una relación entre el subtipo de neuronas infectadas y el tipo de marcadores que expresan estas células, permitiendo proponer la existencia de subpoblaciones neuronales con mayor susceptibilidad a la infección y que pueden ser identificadas por inmunocitoquímica con marcadores bioquímicos determinados.

Aunque en este trabajo no se usaron animales infectados con VR, los marcadores que se escogieron para evaluación hacen parte de una serie de proteínas de interés en la caracterización del modelo de interacción de VR con el GRD. Las moléculas estudiadas se pueden incluir arbitrariamente en tres grupos: aquellas que son parte estructural del tejido nervioso y que pudieran ser usadas como control de expresión, las que se han propuesto como receptores para el VR y las que definen subpoblaciones de neuronas en el GRD.

El primer grupo corresponde a proteínas estructurales del SN, que hacen parte del citoesqueleto de neuronas y células gliales: Neurofilamento (NF) y la Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) respectivamente.

El segundo grupo se compone de tres moléculas postuladas como posibles receptores para el VR: La Molécula de adhesión celular neural (NCAM), el Receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75 (p75<sup>NTR</sup>) y el Receptor nicotínico de acetilcolina (RNACH). Estas proteínas cumplen con un dinámico papel en una gran variedad de procesos celulares como migración, crecimiento, maduración, función y muerte celular. Por ambas razones, este segundo grupo de proteínas hacen parte del conjunto de marcadores que se escogieron. Es importante reiterar que en este trabajo no se pretende realizar inoculaciones con VR, sino establecer cuales son las diferencias en la expresión de estas proteínas al comparar las cepas ICR Y C57BL/6.

El tercer grupo de marcadores hace parte de la caracterización bioquímica de las subpoblaciones de GRD y era interés de este trabajo, evaluarlos también a nivel central, puesto que previamente se ha realizado una descripción en el sistema nervioso periférico (SNP). Ellos son Galanina (GAL), Neuropéptido Y (NPY), Receptores tirosina quinasa de alta afinidad para neurotrofinas (Trk) y los sitios de unión para la lectina IB4.

La mayoría de los estudios que utilizan técnicas de inmunomarcaje son valorados por un sistema de evaluación basado en una escala que comprende los niveles “ausencia”, “levemente marcado”, “moderadamente marcado” y “fuertemente marcado” o representándolos con signos (-), (+), (++) y (+++), dando una aproximación de la inmunoreactividad (IR), presente en tejidos o células, generando resultados subjetivos; de esta forma se hace necesaria una adecuación de las condiciones de procesamiento de las muestras que permitan la comparación de los resultados de forma cuantitativa, aprovechando las ventajas de la técnica de inmunohistoquímica y el análisis de imágenes, lo cual fue el propósito central del presente trabajo.

Es por esta razón, que para cumplir con el objetivo general planteado, se definieron tres objetivos específicos:

- Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica por peroxidasa indirecta en cortes de cerebro de ratones adultos pertenecientes a las cepas ICR Y C57BL/6 para los marcadores ya expuestos.
- Estimar si existen variaciones de la expresión de proteínas estructurales en cerebro, como son NF y GFAP al comparar las cepas de ratones ICR y C57BL/6
- Determinar las diferencias de IR en cerebros de las cepas ICR y C57BL/6 para moléculas propuestas como receptores para VR (NCAM, p75<sup>NTR</sup> y la

subunidad  $\alpha 4$  del RNACH) y moléculas que definen subpoblaciones en el GRD (Galanina, Neuropéptido Y, IB4 y TrkA)

El trabajo completo consistió en obtener cortes representativos del cerebro completo de ambas cepas, que correspondían a los niveles del telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo cerebelo y medula oblonga, los cuales fueron procesados para inmunohistoquímica. La intensidad de la IR se evaluó usando un sistema de análisis digital y finalmente se hicieron las comparaciones y pruebas estadísticas necesarias para evaluar las diferencias.

En particular no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la expresión de proteínas estructurales (NF y GFAP), mientras que sí se observaron diferencias significativas al comparar las moléculas postuladas como receptores para el VR, la lectina IB4 y NPY. En este sentido es importante tener en cuenta que la técnica que se ha utilizado en este trabajo representa una metodología bastante novedosa, con parámetros bien establecidos y estandarizados, que en cierta manera permiten asegurar que las diferencias que se muestran se deben exclusivamente a diferencias en la concentración del antígeno presente en las muestras, lo cual puede abrir las puertas a la interpretación de resultados en cualquier área de la investigación.

## 2. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

### 2.1 Modelo biológico

Desde comienzos del siglo XIX el ratón empezó a adquirir una importancia determinante dentro del ámbito de la investigación científica. Hoy día en los diseños experimentales en investigación biomédica son realizados en su gran mayoría en cepas de ratones endo y exocriados, especialmente por costos reducidos, fácil mantenimiento y amplio conocimiento sobre la anatomía, fisiología y características genéticas de los mismos.

Existen varios trabajos de comparación entre cepas de ratones endo y exocriados, que abarcan temas relacionados con condiciones neuroambientales y sus repercusiones en los procesos de memoria y aprendizaje (Dellu *et al.* 2000, Yamada *et al.* 1992), sensibilidad farmacológica (Weizman *et al.* 1999), actividad locomotora y exploratoria (Messiha *et al.* 1990), ansiedad (Gabriel *et al.* 2000), e incluso se pueden encontrar reportes de diferencias en la distribución de infección del *Trypanosoma cruzi* (Andrade *et al.* 2002).

Lodmell y Chesebro (1984) y Lodmell y Ewalt (1985) describen diferencias en la susceptibilidad al VR en cepas de ratones endo y exocriados, datos que han sido asociados a posibles diferencias en la respuesta inmune entre estos animales. Apoyando esto, existen reportes de diferencias en los niveles de liberación de algunas citoquinas implicadas en la diferenciación de monocitos entre cepas de ratones (Futamura 1994), lo cual podría correlacionarse con las diferencias de susceptibilidad al VR.

Por otra parte, la historia de la cepa de ratones C57BL/6, nace cuando el genetista Clarence C. Little dió inicio a los primeros trabajos con cepas singénicas, que se caracterizan por ser generadas a partir de cruces entre animales con alto grado de consanguinidad (hermanos y hermanas), Clarence deseaba obtener algunas líneas de roedores genéticamente estables. En uno de sus ensayos se sirvió de un “stock” de ratones color negro (57parejas), que dieron lugar a la cepa C57BL/6 (Clarence-57-Black/6), hoy día una de las cepas de animales mejor caracterizadas. (<http://www.informatics.Jax.Org.>)

Los ratones ICR por su parte, fueron animales generados por el Institute Cancer Research en 1958 (<http://www.informatics.Jax.Org.>), mediante cruces entre individuos no consanguíneos (animales exocriados), lo que permite a sí mismo obtener animales genéticamente heterogéneos. Estos animales se caracterizan por ser albinos, vigorosos, con una alta capacidad reproductiva y rápido crecimiento. Pero realmente poco se sabe acerca de su historia, sin embargo a pesar de esto, son animales que se usan con frecuencia en los laboratorios en el mundo, especialmente por su bajo costo, puesto que son bastante económicos en relación a otras cepas como en este caso los C57BL/6 que exceden diez veces el costo de un ratón ICR.

El esclarecimiento de las variaciones en la expresión de marcadores al comparar cepas de ratones adultos de laboratorio, en este caso, aquellos que están relacionados con el SN, representa una información valiosa, puesto que, puede ayudar a la selección de cepas de animales apropiadas para diseños experimentales que requieran de individuos con características particulares. Por tanto al determinar las diferencias entre las cepas de ratones que son de amplio uso en la investigación biomédica, favorece la interpretación de los resultados, permitiendo a su vez, escoger el modelo biológico más apropiado.

## **2.2 Marcadores celulares**

Los marcadores que son utilizados en este trabajo, cada uno de los cuales serán tratados en detalle más adelante, han sido agrupados como proteínas estructurales, receptores proteicos postulados para el VR y marcadores de subpoblaciones del GRD. Esta clasificación esta enmarcada en la línea de investigación de la interacción del VR con el SN, desarrollada por el Laboratorio de neurociencias.

Además son marcadores relacionados con varios tópicos dentro de la neurobiología como son: enfermedades neurodegenerativas (Crawley 1996, Hökfelt *et al.* 1998), plasticidad neuronal (Goridis y Brunet 1992, Ressler *et al.* 2002), memoria y aprendizaje (Benson *et al.* 2000)

### **2.2.1 Proteínas estructurales**

El citoesqueleto es un sistema citoplasmático de fibras (microtubulos, microfilamentos y filamentos intermedios), que da soporte estructural a la membrana celular, constituyendo vías de transporte para organelos y otros elementos citoplasmáticos a través de asociaciones con proteínas motoras (Lodish *et al.* 1999).

Los filamentos intermedios (FI), que están formados por proteínas con estructuras, secuencias y características comunes; cuyo nombre proviene de su diámetro intermedio (10 nm) entre los filamentos de actina (6 nm) y los microtubulos de 23 nm. Estos filamentos presentan una estructura de alfa hélice, que esta delimitada por un extremo amino (la cabeza) y un extremo carboxilo (la cola), los cuales sufren procesos de fosforilación y desfosforilación que definen el ensamblaje y desensamblaje de los mismos (Fuchs y Weber 1994).

#### **2.2.1.1 Neurofilamente (NF)**

Este heteropolímero se expresa en axones, dendritas y somas en SNC Y SNP (Fusch y Weber 1994), se compone de tres subunidades que se ensamblan en el pericarión y dendritas proximales (Hoffman *et al.* 1987) Estas subunidades se diferencian por sus pesos moleculares, la subunidad de NF liviano (NF-L) tiene un peso entre 62-68 kDa, ésta representa el eje del heteropolímero, donde se entrelazan las subunidades de medio (NF-M) y alto (NF-H) peso molecular, con pesos entre 95-102 y 110-115 kDa respectivamente. Estas dos ultimas subunidades cuentan con múltiples secuencias repetitivas de tripéptidos de lisina-serina-prolina (KSP) en su extremo carboxi-terminal, que son altamente fosforiladas por quinasas tales como cdc2 que fosforilan residuos de prolina, lo cual genera un aumento desmesurado de su peso entre 145-160 kDa para NF-M y 200 kDa para NF-H (Tsuda *et al.* 2000)

Dentro de las principales funciones del NF están: dar soporte estructural a las neuronas, participar en procesos de maduración y regeneración involucrándose en crecimiento y calibre axonal (Hoffman *et al.* 1987; Hsieh *et al.* 1994; Tsuda *et al.*

2000), y en procesos de memoria y aprendizaje, ya que se incrementa su transcripción durante los eventos de consolidación de la memoria (Ressler *et al.* 2002)

### **2.2.1.2 Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)**

Los astrocitos pueden expresar tres tipos de FI: Vimentina, Nestina y GFAP. Vimentina y Nestina se encuentran principalmente en astrocitos inmaduros. Mientras que astrocitos maduros son principalmente reconocidos por la presencia de GFAP y Vimentina (Ellasson *et al.* 1999)

A diferencia de NF, la proteína GFAP puede existir como homopolímero, aunque en estudios *in vitro* se ha observado que puede también heteropolimerarse mediante un entrecruzamiento con proteínas tipo III, grupo al cual pertenece, o en su defecto, interactúa con NF-L (Fusch y Weber 1994)

Los procesos de fosforilación de GFAP que son cruciales para el desensamblaje e inicio de la mitosis en los astrocitos, se llevan a cabo en múltiples residuos de aminoácidos ubicados en el extremo amino, lo cual es una característica general de los FI tipo III. Esta fosforilación es realizada por proteínas quinasa A y C, quinasas II dependientes de calmodulina/ $Ca^{2+}$ , quinasas Rho y quinasas cdc2 (Inagaki *et al.* 1990)

A GFAP se le atribuye una participación en el mantenimiento de la arquitectura cerebral (Liedtke 1996) y la formación de la barrera hematoencefálica (Pekny *et al.* 1998).

Ratones deficientes para la proteína GFAP, presentan disminución en la población de astrocitos, pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica, disminución de la sustancia blanca, aumento de los potenciales a largo plazo (LTP), aunque estos ratones pueden sobrevivir, lo que hace suponer que muy posiblemente la Vimentina pueda estar remplazando a GFAP (Takemura *et al.* 2002)

### **2.2.1 Receptores para el virus de la rabia (VR)**

Al parecer la preferencia del VR por el SN, esta relacionada con moléculas especiales presentes en las neuronas que actúan como receptores, hasta ahora se han

postulado tres posibles receptores: La Molécula de adhesión celular neural (NCAM), el Receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75 (p75<sup>NTR</sup>) y el Receptor nicotínico de acetilcolina (RNACH).

### ***2.2.1.1 Molécula de adhesión celular neural (NCAM)***

La NCAM fue una de las primeras moléculas de adhesión que se aisló y caracterizó en vertebrados. Esta molécula se expresa en diferentes tejidos y tipos celulares durante el desarrollo y la vida adulta (Dickson *et al.* 1987). Su estructura se caracteriza por la presencia de cinco dominios similares a inmunoglobulinas (Ig- like) en su extremo amino-terminal ubicado en la región extracelular y secuencias similares repetitivas de unión a fibronectina tipo III en la región yuxtamembranal (Goridis y Brunet 1992). Las diferencias de la parte 3' del RNA mensajero de ésta molécula define el tamaño del dominio citoplasmático que da lugar a las isoformas de NCAM denominados por peso molecular como: la isoforma 120 que no presenta dominio citoplasmático, simplemente se halla anclada a la membrana a través de un Glicofosfatidilinositol y las isoformas 140 y 180 las cuales si cuentan con este dominio, las diferencias entre estas dos isoformas radica en el largo del mismo. Las isoformas de la NCAM son generadas por “splicing” alternativo y por la presencia de pequeñas regiones codificantes, como es el caso del exón “VASE” o  $\pi$ , que se ubican en la región extracelular.

El exón VASE se inserta en el cuarto dominio Ig-like y permite un cambio estructural de esta región del tipo C2 (tipo constante) a un tipo V (o tipo variable) (Santoni *et al.* 1989). También pueden encontrarse los exones 15 y 18 que definen los dominios citoplasmáticos de las isoformas 140 y 180 respectivamente (Small *et al.* 1988; citado por Goridis 1992). Esta molécula media interacciones entre células independientes de calcio por interacciones homofílicas. Además es modulada por el ácido polisialico (PSA), que se une al quinto dominio Ig-like y proteoglicanos de heparan sulfato que se ligan a segundo dominio Ig-like modulando su gran parte de sus funciones en la adhesión.

NCAM está implicada en la mediación de adhesión célula-célula e interacciones entre célula-matriz, igualmente en la regulación de la migración de precursores neuronales durante estadios embrionarios y adulto, por ejemplo, la porción anterior de la zona subventricular telencefálica neonatal, contiene células proliferantes encargadas de dar origen a un inmenso número de células granulares y periglomerulares en bulbo olfatorio (Smith y Luskin 1998), las cuales siguen rutas específicas reguladas por moléculas de adhesión como la NCAM, lo que se conoce como corriente migratoria rostral (Baker *et al.* 2001). La particularidad de este hecho es, que esta migración se mantiene constante durante toda la vida en el individuo.

Cremer y colaboradores (1994), generaron ratones deficientes para la proteína NCAM encontrando que estos animales presentaban una reducción del bulbo olfatorio y deficiencias en el aprendizaje espacial. Años mas tarde el mismo autor (Cremer *et al.* 1997), reportó que estos animales presentan además, deficiencias cognoscitivas y problemas en la fasciculación en áreas del hipocampo afectando principalmente fibras que se conectan con la capa de células piramidales del mismo, interviniendo en los procesos de memoria y aprendizaje, eventos en los cuales esta molécula cumple un papel bastante activo, al mediar procesos de plasticidad y transmisión sináptica (Benson *et al.* 2000, Ryan 2001. Por ultimo Rafuse y colaboradores (2000) dan a conocer algunas deficiencias que se presentan en la formación de los acoples neuromusculares, debido a la ausencia de la molécula NCAM utilizando el modelo de ratones deficientes para NCAM.

Otra de las funciones que se le atribuyen a la NCAM es su participación como posible receptor del VR. Thoulouze y colaboradores (1998), presentaron una serie de evidencias que explican el neurotropismo del VR y su facilidad para infectar células no neuronales. Encontrando que las líneas celulares con mayor susceptibilidad a la infección poseen NCAM. Por ejemplo, células de tipo neuronal (neuroblastomas humanos y murinos) o de tipo fibroblástico (BHK, VERO, NIH 3T3) presentan fuerte inmunofluorescencia para ésta proteína. En cambio las células resistentes a la infección (L-929, HEp-2 y HeLa) son negativas para ésta molécula de adhesión. Los autores bloquearon la infección por VR en células BHK (*baby hamster Kidney*) y

neuroblastoma murino (N2a) usando anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra la NCAM, adicionalmente produjeron inhibición de la infección pre-incubando ambos tipos celulares con Heparán sulfato (reconocido como el principal ligando natural de la NCAM). Las proporciones de células BHK infectadas se disminuyeron casi de manera absoluta, al hacer una pre-incubación del inóculo viral con diferentes concentraciones de proteína NCAM soluble, sugiriendo que ésta se une de manera específica a la glicoproteína viral impidiendo que el virus pueda entrar finalmente en contacto con las células.

### **2.2.2.2 Receptor nicotínico de acetilcolina (RNACH)**

El neurotransmisor acetilcolina (ACh) actúa en dos clases de receptores: los Nicotínicos y los Muscarínicos, receptores ionotrópicos y metabotrópicos respectivamente (Karlín 1993, Castellanos *et al.* 2001).

Los receptores ionotrópicos se encuentran presentes principalmente en células musculares y neuronales. Se sabe que hay cinco genes que codifican para subunidades de tipo muscular  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\delta$  (Gastka *et al.* 1996), y once genes que codifican para las subunidades de tipo neuronal ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 4$ ) (Goldman *et al.* 1987), dando origen a formas funcionales mediante la combinación de sus subunidades (Ross *et al.* 2000, Boyd 1990).

La combinación de las subunidades  $\alpha 4\beta 2$  son las más comunes en el SN, representando cerca del 90% (Whitin *et al.* 1991; citado por Castellanos *et al.* 2001). Por lo tanto, estas subunidades representan marcadores apropiados para definir la presencia de este receptor en tejido nervioso.

La distribución de RNACH en el SNC se remite principalmente, a la médula medial, núcleos interpedunculares, núcleos sensoriales y motores del tálamo, corteza y la capa molecular de giro dentado en el hipocampo (Luetje *et al.* 1990).

Aparte de su papel dentro de la transmisión sináptica química, este receptor ha sido objeto de estudio en un sin número de investigaciones farmacológicas especialmente por su activación a partir de ligandos como la nicotina, también tiene

implicaciones en enfermedades como Parkinson, Alzheimer, miastenia gravis y esquizofrenia (Castellanos *et al.* 2001).

El papel de RNACH como presunto receptor se conoce hace aproximadamente dos décadas, cuando se describió la homología entre la toxina peptídica (-Bungarotoxina ((-BGT) (que se une con alta afinidad a los RNACH) y la glicoproteína del VR, así se ha establecido que la toxina bloquea la infección por VR en cultivos de músculo; también se ha encontrado una interacción bioquímica entre el RNACH y el VR (Lentz *et al.* 1990, Gatska *et al.* 1996). Además, en trabajos realizados en el Laboratorio de Neurociencias del INS, se ha descrito la inhibición parcial de la infección *in vitro* por VR en neuronas sensoriales, haciendo un pretratamiento con antagonistas para RNACH como mecamilamina y tubocurarina, y agonistas nicotínicos en el caso de nicotina y carbacol (Castellanos *et al.* 1997, Castañeda-Castellanos *et al.* 2002).

### ***2.2.2.3 Neurotrofinas***

Antes de comenzar a hablar sobre los receptores Trk y p75<sup>NTR</sup>, los cuales funcionan como receptores de las diferentes neurotrofinas, hay que aclarar algunas generalidades de éstas.

Las neurotrofinas (NT) son pequeñas proteínas relacionadas estructuralmente entre sí, que tienen una gran cantidad de efectos en el SN. Es muy bien sabido que las NTs participan activando señales relacionadas con la génesis neuronal, diferenciación, supervivencia y regeneración. Se han identificado cuatro genes diferentes (tanto en murinos como en humanos) que codifican para el Factor de Crecimiento Nervioso (Nerve Growth Factor, NGF), el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF), la Neurotrofina 3 (Neurotrophin 3, NT-3) y la Neurotrofina 4/5 (NT-4/5). Estas cumplen su papel a través de receptores de alta y baja afinidad (Trk y p75<sup>NTR</sup>), ubicados en la membrana de la célula.

#### 2.2.2.4 El Receptor de baja afinidad para Neurotrofinas p75 (p75<sup>NTR</sup>)

Las neuronas que responden a las NTs deben poseer los receptores específicos para que se produzca la respuesta celular adecuada. Parte de estas respuestas son reguladas por las señales generadas por la activación de p75<sup>NTR</sup>.

La estructura del p75<sup>NTR</sup> fue descrita desde hace muchos años, pues fue el primer receptor de NTs clonado y caracterizado. Es una proteína altamente glicosilada, que posee en su porción extracelular cuatro dominios homólogos, cada uno de los cuales contienen seis residuos de cisteínas que funcionan como dominio de unión al ligando (Radeke *et al.* 1987). Las cisteínas de estos dominios forman tres puentes disulfuro que generan una estructura rígida alargada (Banner *et al.* 1993). Como todos los receptores de esta familia (ricos en cisteínas), p75<sup>NTR</sup> no posee dominios catalíticos conocidos en su segmento citoplasmático. Los 80 aminoácidos finales (de los 115) del extremo carboxilo intracelular son homólogos al "dominio letal" presente en otros receptores (como el receptor para el factor de necrosis tumoral, TNF), que cumple el papel de reclutador y activador de proteínas quienes participan en la cascada proteolítica durante la apoptosis (Carter y Lewin 1997).

El receptor p75<sup>NTR</sup> se expresa ampliamente en el SN durante el desarrollo, encontrándose por ejemplo en neuronas motoras espinales y del tallo, neuronas de Purkinje y núcleos profundos del cerebelo entre otros, pero solamente se mantiene la expresión en el adulto en las neuronas del núcleo basal magnocelular y en los núcleos putamen/caudado, células de Purkinje y núcleo mesencefálico trigeminal (Koh *et al.* 1989).

Las funciones de p75<sup>NTR</sup> se pueden dividir en las que en colaboración con los receptores Trk potencian (Barker y Shooter 1994) o reducen la respuesta de la neurona estimulada por las NT (McPhee y Barker 1997) y aquellas otras funciones en las que p75<sup>NTR</sup> de manera autónoma, activa cascadas de señalización involucradas en la apoptosis celular (Frade *et al.* 1996). Por tanto, la presencia de p75<sup>NTR</sup> en una célula, dará como resultado una u otra actividad dependiendo de los receptores de alta afinidad para NT expresados en la célula y del aporte específico del blanco que inervan, lo que

hace presumir un complejo papel de este receptor en el mantenimiento de la homeostasis de las células del SN.

Por otra parte, este receptor tiene una vital importancia dentro de las investigaciones relacionadas con el VR. Evidencia presentada por el Laboratorio de Neurociencias (Castellanos *et al.* 2000), ha mostrado que es posible modular la infección por VR en neuronas sensoriales, usando los factores neurotróficos NGF y NT-3, permitiendo sugerir la eventual participación de los receptores de alta afinidad Trk además de lo ya descrito para el p75<sup>NTR</sup>. Tuffereau y colaboradores (2001), postularon la participación de p75<sup>NTR</sup> como receptor para el VR, usando líneas celulares que expresan p75<sup>NTR</sup> y tiene una alta afinidad por la glicoproteína viral. El pretratamiento con NGF mostró una inhibición de la infección atribuida a una competencia de éste con el VR por p75<sup>NTR</sup>.

### **2.2.2 Marcadores de subpoblaciones del GRD**

Algunas de las moléculas que han desempeñado un papel importante en la caracterización bioquímica de las poblaciones y subpoblaciones del GRD, son la lectina IB4 y TrkA los cuales reconocen dentro de las neuronas pequeñas subpoblaciones de neuronas no peptidérgica y peptidérgicas respectivamente.

Otras moléculas son los neuropéptidos (NP) que representan los marcadores bioquímicos más utilizados en el reconocimiento de poblaciones y subpoblaciones en el GRD. Estos son pequeñas moléculas de tamaño variable entre 3-40 aminoácidos (aa), estas son sintetizadas por neuronas a partir de largos precursores polipeptídicos que pueden generar más de un péptido biológicamente activo. Estas poliproteínas son fraccionadas por enzimas específicas (peptidasas) que reconocen aminoácidos básicos como lisina y arginina como punto de corte (Seidah y Chretien 1999). Los NP intermedian comunicaciones célula-célula actuando como neurotransmisores, neuromoduladores, ó como hormonas al ser liberados en el espacio extracelular (García-López *et al.* 2002). Dentro del GRD también se le atribuyen otras funciones: una función inflamatoria neurogénica que provoca el aumento en la liberación de histaminas por monocitos, la regulación del flujo sanguíneo cutáneo y la inducción de

edema y eritema y una función inmunológica actuando como factores quimiotácticos y mitóticos sobre las células inmunes (Sánchez y España 1997).

### ***2.2.3.1 Receptor tirosina quinasa para el NGF ( TrkA).***

Los Trk son proteínas transmembranales que son receptores para NT, que se caracterizan por la presencia de un dominio extracelular que cuenta con dos regiones ricas en cisteínas (dominios 1 y 3), que se ubican a lado y lado de una región rica en leucinas (dominio 2), las cisteínas del dominio 3 están seguidas a su vez por dos estructuras similares a inmunoglobulinas (Ig-like) que representan los dominios 4 y 5. (Windisch *et al.* 1995).

Las interacciones entre NGF y TrkA a través de uno de los dominios Ig-like, dan como resultado la autofosforilación de sus residuos de tirosina llevada a cabo por un dominio quinasa que acompaña al receptor, ubicado en la región citoplasmática donde a su vez se encarga de la fosforilación de algunos otros residuos de tirosina, generando serie de señales en cascada y activando moléculas de señalización que regulan el crecimiento celular y la supervivencia neuronal (Kaplan *et al.* 1991). El NGF a su vez tiene un papel importante durante la formación del hipocampo y la maduración de células colinérgicas en el prosencéfalo basal (Fagan *et al.* 1997), al igual que en procesos de maduración en neuronas presentes en el GRD y ganglios de cervicales con poblaciones neuronales simpáticas (Molliver y Snider 1997, Miller *et al.* 1994)

La distribución de TrkA es bastante acentuada en el prosencéfalo basal ya que involucra algunas estructuras tales como: núcleo olfatorio anterior y posterior, banda diagonal de miembro horizontal y vertical, núcleo basal magnocelular, núcleo medial septal y palidum ventral; también se expresa en corteza, glóbulus pallidus e hipocampo especialmente en el giro dentado y capas infra y supragranular (Pioro y Cuello 1990).

### **2.2.3.2 IB4 (*Griffonia simplicifolia*)**

*Griffonia simplicifolia* es un arbusto africano de la familia Bandeiraa, a partir del cual se pudo aislar la isolectina B4 por técnicas de cromatografía, la cual se ancla a residuos de  $\alpha$ -D-galactosa (Gabiús y Gabiús 1997).

Estudios de inmunohistoquímica reportan que IB4 muestra una fuerte asociación con el nervio vomeronasal y neuronas de la capa glomerular del bulbo olfatorio accesorio en ratas (Salazar y Quintero 1998), neuronas piramidales del hipocampo en rata (Kawai *et al.* 2001) y neuronas de pequeño diámetro en el GRD, que son no peptidérgicas (no reactivas para SP, CGRP o TrkA). Estos hallazgos son similares en humanos, ratas y ratones (Nagao *et al.* 1994, Gulati *et al.* 1986, Guerrero-Tarraco *et al.* 1999), y en otros animales como cerdos, conejos, zorros, gatos y monos que muestran similares patrones de expresión de residuos  $\alpha$ -D-galactosa en la membrana plasmática y nuclear (Gerke y Plenderleith 2001).

### **2.2.3.3 Galanina (GAL)**

GAL es un péptido de 29-30 aa, con una amplia distribución en el SNC, fue aislado de extractos intestinales de porcinos (Tatemoto *et al.* 1983). Se origina a partir del clivaje de un prepropéptido de 123 aa, dando a su vez lugar a una secuencia de 56 aa que se conoce como el péptido asociado a la molécula de la GAL (GMAP, por su sigla en inglés), estos NPs actúan a través de tres receptores que se conocen como GalR1, GalR2, GalR3 (Chen *et al.* 1993, Takenoya *et al.* 2002)

Por otra parte, GAL aumenta su expresión en etapas avanzadas de algunos procesos neurodegenerativos como demencia senil asociada a la enfermedad de Alzheimer. Después de realizar técnicas de inmunohistoquímica *postmortem* en pacientes que presentaban este tipo de enfermedad encontrando un apreciable aumento de GAL en dendritas y terminaciones nerviosas de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal que sufren de hiperinnervación, característica que se ha reportado en pacientes con síntomas severos de Alzheimer. Así mismo hay una correlación con la disminución de la síntesis de acetilcolina, lo cual le atribuye un papel regulador para la

liberación de este neurotransmisor implicado en procesos de memoria y aprendizaje (Crawley 1996)

#### **2.2.3.4 Neuropéptido Y (NPY)**

Este péptido tiene una secuencia de 36 aa y amplia distribución en SNC y se le atribuye un papel fisiológico bastante dinámico a este nivel. Aislado por primera vez del cerebro de porcinos por cromatografía, el NPY presenta una alta homología con los péptidos YY y el polipéptido pancreático, lo que los cataloga como miembros de una misma familia. La Y se refiere a los cinco residuos de tirosina presentes en su estructura primaria, que junto con la presencia de una  $\alpha$ -amida en su carboxilo terminal definen las principales características de esta familia. (Tatemoto 1982)

Las caracterizaciones farmacológicas revelan la existencia de dos subtipos de receptores para NPY, conocidos como Y1 y Y2-Rs que son receptores post y presinápticos respectivamente (Hökfelt *et al.* 1998). Estos receptores han sido bien caracterizados en estructuras a nivel hipotalámico principalmente en el complejo de núcleos paraventriculares, donde cumple con un papel estimulante para la ingesta de alimentos. La administración de NPY a nivel hipotalámico en ratas genera un incremento en la recaptura, especialmente de carbohidratos (Stanley y Leibowitz 1985). Al igual que GAL, NPY está implicado en procesos neurodegenerativos, pues se encuentra IR aumentada en neuronas corticales que presentan inclusiones citoplasmáticas típicas de la enfermedad de Alzheimer (Beal *et al.* 1985).

### **2.3 Inmunohistoquímica**

La técnica de inmunohistoquímica con la que se evaluaron las diferencias de expresión de los marcadores anteriormente presentados, consiste en la identificación de interacciones antígeno-anticuerpo sobre estructuras celulares o titulares. Los antígenos pueden ser proteínas, carbohidratos o lípidos; los cuales a su vez pueden tener uno o varios sitios de unión de los anticuerpos (epitopes). Cinco tipos de anticuerpos pueden encontrarse, conocidos como inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgH. Las más

usadas son las IgG, ya que son las más abundantes en el suero de los mamíferos (Javois 1994). Estas moléculas están compuestas por dos pares de cadenas polipeptídicas, una pesada y otra liviana que se encuentran formando una estructura similar a una Y, gracias a puentes disulfuro. Las regiones terminales de cada brazo de la Y varía en su secuencia de aminoácidos, esta variabilidad es la que le provee a la inmunoglobulina una especificidad particular para cada epítotope (Leeuwen 1986).

Los anticuerpos que normalmente se usan son: los policlonales (conjunto de clones de células plasmáticas donde cada clon produce un anticuerpo diferente) y los monoclonales (clones obtenidos a partir de un hibridoma que solamente reconocen un epítotope específico) (Leeuwen 1986).

Hay dos modalidades: directa e indirecta. En las técnicas directas solamente se utiliza un anticuerpo que se encuentra conjugado con una molécula marcadora. Las indirectas utilizan dos anticuerpos, un anticuerpo primario dirigido contra varios epítotope y un anticuerpo secundario que se encuentra acoplado a la molécula marcadora. Los fluorocromos y la biotina son las moléculas más utilizadas para ser acopladas covalentemente a los anticuerpos o lectinas. La biotina presenta una alta afinidad por la avidina, una molécula que cuenta con cuatro subunidades de anclaje para ésta, formando el complejo Avidina-Biotina (Guesdon *et al.* 1979). Este complejo cuenta con una biotina que viene conjugada a una enzima (peroxidasa), la cual reacciona con su sustrato (peróxido de hidrogeno), haciendo que el cromógeno (3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro o DAB) precipite, generando un color marrón que indica la ubicación del antígeno de interés (García del Moral 1993)

## **2.4 Análisis de imágenes**

El desarrollo de las técnicas histológicas y de microscopia electrónica, ha permitido fusionar ambos campos para ofrecer una herramienta de evaluación que combina los aspectos morfológicos con aspectos funcionales de los tejidos o cultivos tales como la proliferación celular o la expresión de proteínas particulares. Al adicionar técnicas inmunohistoquímicas, se pueden, inclusive, distinguir patrones de expresión entre tejidos o células, que no pueden ser evaluados por el método corriente

de puntajes semi-cuantitativos. Por lo tanto los datos obtenidos son también susceptibles de ser tratados como cifras para análisis estadístico. Adicionalmente, la posibilidad de evaluar una gran cantidad de campos fortalece aún más la potencia y valor agregado de los sistemas de análisis morfométrico digital.

Las medidas morfométricas se basan en la evaluación de parámetros estructurales (Kronqvist 1998) o en la evaluación del marcaje posterior a un procesamiento de inmunodetección (Oud *et al.* 1997). Por tanto, como las variables estudiadas se extraen de las imágenes digitales, se logra obtener información, que de otra manera resulta inaccesible (Por ejemplo: escala de grises).

Los pasos necesarios para hacer un análisis digital son: Adquisición de la imagen, almacenamiento, compresión (si es necesario), corrección de defectos, segmentación (si es necesario), medición de los parámetros y por último análisis de la información. Los parámetros que pueden ser evaluados, son de diferentes tipos:

- Localización y distancia
- Tamaño, forma, diámetro, perímetro y longitud.
- Intensidad de la reacción de inmunomarcaje y densidad óptica

La adquisición (o captura) se hace normalmente usando una cámara de video que posee una serie de celdas fotosensibles (CCD, charge-coupled devices) que detectan la luz proyectada a su interior. La señal analógica es convertida en señal digital y almacenada como una imagen “bitmap”, que consiste en un mapa bidimensional de píxeles, cada uno con una información única de localización e intensidad (de color). En el caso de imágenes en blanco y negro, se usa una escala de 256 tonos (de 0 a 255, negro a blanco respectivamente) y cada píxel tendrá su valor, que puede ser promediado con el de todos los presentes dentro de una imagen en particular.

En este caso, el tono de gris promedio presente en cada imagen representa la intensidad del inmunoprecipitado logrado durante el procesamiento con los anticuerpos, y puede ser interpretado como una concentración relativa del antígeno presente en cada espécimen (Nabors *et al.* 1988). Además, con el objeto de asegurar

resultados válidos en un análisis de imagen, se deben controlar las posibles fuentes de variación en cada tipo de experimento.

El análisis densitométrico se fundamenta en el principio de que existe una relación lineal entre la concentración de una molécula y la absorbancia que ella tiene, si el espesor del corte es homogéneo (los parámetros incluidos son absorbancia de la sustancia, longitud del recorrido del haz de luz y concentración de la sustancia). En el caso de inmunoprecipitados generados por una enzima acoplada a un anticuerpo, se puede concluir que la cantidad de enzima que reacciona es proporcional a la cantidad de antígeno presente en el tejido.

Los requisitos de un adecuado análisis de imágenes son varios: se requiere de una fuente estable de luz, con intensidad uniforme y estabilidad en las condiciones de captura. El principal requisito es el procesamiento técnico de las muestras en muy similares condiciones de incubaciones, lavados y tiempos de revelado; de esta manera se puede concluir al final, que las diferencias en las intensidades de marcaje son debidas a diferencias en las concentraciones del antígeno presente en los cortes.

Aunque la variable mas utilizada en morfometría es el tamaño o la forma de estructuras, también puede ser evaluada la densidad de marcaje después de un procesamiento por inmunoquímica o histoquímica. La densidad de cada uno de los píxel de la imagen se transforma en densidad óptica que puede ser manipulada y analizada como una cifra, lo que representa una ventaja adicional de los métodos cuantitativos de análisis de imagen, es la posibilidad de procesar y evaluar un gran número de muestras, en poco tiempo, facilitando su análisis, aspecto que se ve representado en un gran poder de discriminación, que es capaz de detectar incluso muy pequeñas diferencias entre muestras.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Estrategia experimental

Para cumplir los objetivos propuestos se realizó la perfusión por vía intracardiaca de dos individuos machos de las cepas de ratones ICR y C57BL/6 de seis semanas de edad. Se obtuvieron los cerebros, que fueron luego seccionados en tres porciones las cuales fueron designadas arbitrariamente como zona A que corresponde a la parte anterior del cerebro, la cual involucra estructuras pertenecientes al telencéfalo, zona B o parte media del cerebro, donde se pueden encontrar estructuras correspondientes al telencéfalo (formación hipocampal), diencefalo (epitálamo, tálamo e hipotálamo) y mesencefalo, y por último, zona C que corresponde a la zona posterior del cerebro, encontrando el cerebelo y la medula oblonga (ver figura 1A). De cada una de estas zonas se realizaron cortes seriados de 50µm, ubicando tres cortes de cada cepa, en una sola lámina, teniendo en cuenta que fueran cortes muy similares entre las cepas y que a su vez fueran representativos de cada una de las zonas. Con este mismo diseño se escogieron cuatro láminas para cada marcador y una quinta lámina como control negativo (cortes sin anticuerpo primario). Posteriormente cada grupo de láminas fue sometido a una técnica de inmunohistoquímica para peroxidasa indirecta, donde las láminas fueron inmersas en cada uno de los reactivos y los tiempos de revelado fueron estandarizados, al igual que se utilizó los mismos lotes y volúmenes de cada buffer con los que se trataron las láminas, permitiendo descartar posibles errores de procedimiento. Luego se realizó la captura de aproximadamente 40 imágenes de la zona A, 80 de la zona B y 50 de la zona C, para cada marcador. Y por ultimo se llevó a cabo un análisis morfométrico de densitometría, basado en la escala de grises que va de 0 a 255, datos con los cuales se realizó una prueba t-Student para estimar las diferencias de la densidad de IR existentes al comparar las cepas.

### **3.2 Perfusión**

Los ratones fueron anestesiados intraperitonealmente con ketamina (90mg/kg) y xilazina (15mg/kg). Una vez el animal estuvo inmobilizado se colocó sobre una lámina de icopor en decúbito dorsal asegurándolo con agujas ubicadas en cada uno de los miembros. Inicialmente se hizo un corte longitudinal desde la parte media del abdomen hasta el cuello. Se despejó la zona con el fin de encontrar el diafragma a través del cual se siguió el avance generando una abertura en la caja torácica sobre la línea media de la misma, hasta dejar completamente despejado el corazón. En este momento los siguientes pasos se realizaron rápidamente pues se había generado una diferencia en la presión torácica, que implica un colapso pulmonar ocasionando la muerte al animal por paro respiratorio. El corazón es perforado con una aguja de pequeño calibre (3/4X27 pulgadas), en el ápice del ventrículo izquierdo, la cual está conectada a un catéter que parte de una bomba peristáltica (Masterflex de Coler Parmer Instrument co. Modelo 7016-42) que suministrará vía intracardiaca 30 ml de solución de lavado (glucosa 0.1%, procaina 0.1% y NaCl 0.8%) y posteriormente 50 ml de solución de fijadora (paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino (PBS)) soluciones que fueron preparadas en igualdad de condiciones (temperatura y pH). Al final del procedimiento los tejidos quedaron completamente fijados.

### **3.3 Disección del cerebro**

Se realizó a partir de una incisión longitudinal desde la zona occipital del cráneo hasta la parte más anterior alcanzando las fosas nasales, después se realizaron cortes a lado y lado del cráneo lo que procede a separar las mitades y dejar al descubierto los dos hemisferios, para luego levantar cuidadosamente el cerebro de su base, y seccionar los nervios craneales que lo mantienen sujeto. Después del proceso de disección, los cerebros fueron postfijados en paraformaldehído al 4% por 48 horas a 4°C, y luego criopreservados en 20% de sacarosa preparada en PBS, más anfotericina (7.5 µg/ml), por 24 horas. Estos tejidos son mantenidos a 4°C hasta el momento de cortarlos.

### 3.4 Cortes en vibrátomo

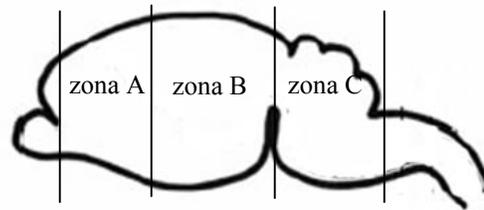
Después de la criopreservación, se realizaron cortes coronales seriados de 50  $\mu\text{m}$  obtenidos en un vibrátomo (Pelco 102/Ted-pella 1000 plus Section System), y recogidos en PBS, para luego ser montados en láminas Starfrost (Menzel-Glaser) previamente tratadas con poli-L lisina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ya que permite obtener una mayor adhesión del tejido, y evitar su desprendimiento durante los procesos de la inmunohistoquímica.

En esta parte era necesario obtener estructuras muy similares entre las cepas al comparar cada uno de las zonas (zona A, zona B y zona C). Con este fin, los cortes se realizaron teniendo como base estructuras que se reconocen fácilmente y que definen los límites de cada una de las zonas. Para la zona A se tomó como punto de partida (momento en el cual se recoge el primer corte a este nivel), los primeros esbozos de la formación del cuerpo calloso y el putamen caudado, hasta alcanzar el hipocampo, que representa la estructura con la cual se definió el inicio de la zona B, en esta zona se obtuvieron cortes que comprometían estructuras dentro de los niveles del telencéfalo, diencéfalo y mesencéfalo, hasta alcanzar los inicios de cerebelo, a partir del cual se define la zona C, que concluye en el momento en que finaliza el cerebelo. (Figura 1 A).

Posteriormente los cortes se ubicaron en series de tres (en la parte superior de la lámina tres cortes de la cepa ICR y en la parte inferior de la misma lámina tres cortes de la cepa C57BL/6) en orden antero-posterior, cada uno de los cuales era representativo de la zona A, B y C respectivamente. Con este diseño se obtuvieron dos grupos correspondientes a los cerebros de los cuatro individuos sacrificados, cada uno de los grupos (Grupo I y Grupo II) contaba con aproximadamente 35 láminas, las cuales fueron enumeradas en forma secuencial (1-35); es decir la lámina número uno cuenta con el primer corte representativo de cada uno de las zonas, tanto para ICR como para C57BL/6 (Figura B). Esto permite asegurar que los cortes presentes en cada lámina son muy similares entre las cepas al comparar cada una de los cortes realizados por zona. Esto mismo sucede con las siguientes 34 láminas.

De cada grupo se escogieron cinco láminas por marcador; cuatro láminas experimentales y un control (lámina que no fue tratada con anticuerpo primario). Para las láminas experimentales se escogieron dos láminas del grupo I y dos del grupo II, teniendo en cuenta que los niveles de corte presentes en las láminas escogidas por grupo no fueran sucesivos entre sí, pero sí, muy similares entre grupos. Por ejemplo, se escogieron las láminas 1 y 11 de un grupo, igualmente para el otro grupo (Figura 1B), lo que en cierta manera aseguraba que las láminas que iban a ser procesadas por marcador, tenían cortes realizados a niveles que eran muy similares entre las laminas con la misma numeración (la lamina 1 del grupo I presenta cortes que son muy similares con la lamina 1 del grupo II). Y por último, se escogió una lámina para control negativo. Esto mismo se hizo para cada uno de los marcadores.

A



B

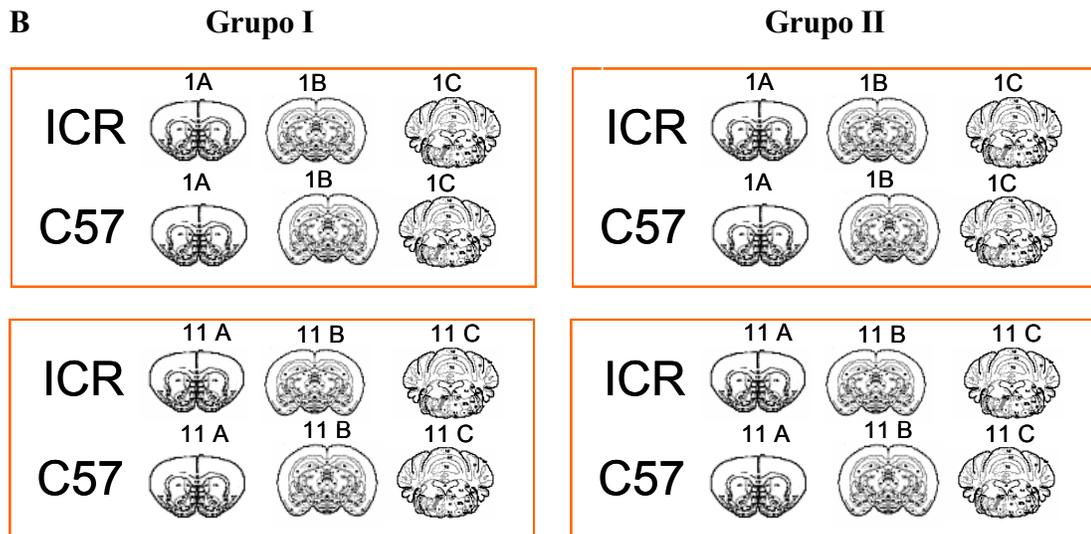


Figura 1: Representación esquemática de las zonas de corte y diseño de las láminas procesadas. A. Niveles a los cuales fueron realizados los cortes: zona A, zona B y zona C. B. Representación gráfica de los grupos de laminas que fueron evaluados junto con el diseño de montaje de los cortes de cerebro de cada una de las cepas. 1 y 11 representa el primer y onceavo corte y A, B y C cada una de las zonas de corte. (las plantillas de los cerebros fueron tomadas de Pérez *et al.* 2001).

### 3.5 Inmunohistoquímica por peroxidasa indirecta para cortes de cerebro de las cepas ICR y C57BL/6.

Con el fin de obtener datos que pudiesen ser comparados, fue necesaria la estandarización de una técnica de inmunohistoquímica en bloque, caracterizada por la inmersión de las láminas escogidas por marcador en cada uno de los reactivos en forma simultánea, los cuales fueron preparados en igualdad de condiciones y de forma independiente cada uno de los marcadores. Así mismo, fue necesaria la adecuación y estandarización de las concentraciones del grupo de anticuerpos evaluados, por medio de curvas de dilución (Tabla 1). Para escoger la concentración más favorable se tuvieron en cuenta aspectos como la intensidad de marcaje y la no presencia de precipitados inespecíficos, puntos fundamentales para obtener datos aun más confiables en los análisis densitométricos.

El protocolo básico de la técnica está fundamentado en el usado para la detección de VR en cortes de cerebro, el cual fue previamente estandarizado en el Laboratorio de Neurociencias (Castellanos *et al.* 1998).

Anticuerpo primario	Producido en:	Casa comercial	Concentraciones ensayadas		
			1:100	1:200	1:300
Anti-NF-200kDa	Conejo (P)	Sigma	1:100	1:200	1:300
Anti-GFAP	Conejo (P)	Dako Corporation	1:150	1:200	1:250
Anti-NPY	Conejo (P)	Sigma	1:150	1:200	1:250
Anti-GAL	Conejo (P)	Sigma	1:75	1:50	1:25
Anti- NCAM	Ratón (M)	Pharmingen	1:200	1:250	1:300
Anti- $\alpha$ 4 /RNACH	Cabra (P)	Santacruz Biotechnology	15 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml	25 $\mu$ g/ml
Anti- p75	Conejo (P)	Promega	10 $\mu$ g/ml	15 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml
Lectina IB4	Aislada de Gs	Vector	2,5 $\mu$ g/ml	5 $\mu$ g/ml	7.5 $\mu$ g/ml

Tabla 1: Concentraciones ensayados de cada uno de los anticuerpos. Policlonal (P), monoclonal (M) y *Griffonia simplicifolia* (Gs)

### 3.6 Análisis densitométrico

Inicialmente se realizó la captura de las imágenes. Para ello los cortes fueron divididos por hemisferios, de tal manera que se obtuvo seis regiones nombradas como:

regiones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, las cuales a su vez fueron divididas por campos, que acogían las principales estructuras del cerebro como: corteza frontal, prosencéfalo basal y putamen caudado localizadas en el telencéfalo; la formación hipocampal, hipotálamo, tálamo y epitálamo ubicadas a nivel del diencéfalo y por ultimo cerebelo (capa molecular y granular), puentes y medula oblonga.

Estas divisiones se realizaron para ambas cepas de la misma manera (Figura 2). Este diseño tuvo como fin realizar la captura de imágenes en forma organizada, para obtener así, datos representativos del cerebro completo de las dos cepas de ratón.

Se hizo la captura de aproximadamente 40 imágenes en la zona A, 80 en la zona B y 50 en la zona C (las diferencias en el número de imágenes capturadas por zona es debida a diferencias en el tamaño de la misma). Estas imágenes se capturaron con el objetivo de 10X utilizando un microscopio Olympus (MODELO BX50F), estabilizando las condiciones de luz. Este equipo se encuentra conectado a una cámara de video SONY DXC 107A, la cual envía las imágenes en blanco y negro a una computadora que cuenta con un software de análisis de imágenes conocido como Scion Image, quien realiza las medidas densitométricas que se expresan en valores que están basados en la escala de grises que va de 0 a 255. Se obtuvo aproximadamente 1530 imágenes para cada cepa correspondientes a los nueve marcadores estudiados.

	ZONA A	ZONA B	ZONA C			
	Región 1	Región 2	Región 3	Región 4	Región 5	Región 6
ICR						
C57BL/ 6						

Figura 2: Representación esquemática de las regiones evaluadas y campos donde se capturaron las imágenes representativas, por marcador en cada uno de los cortes.

### 3.7 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con una prueba estadística de t-Student de una cola, con un nivel de significancia del 95%, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de la p fue inferior a 0.05. De esta manera se comparó la densidad de IR en cerebros de ICR y C57BL/6, por regiones y zonas (agrupando los datos obtenidos para las tres zonas). Posteriormente se graficaron los promedios de la densidad media comparando los promedios de densidad media de IR obtenidos de las tres zonas evaluadas entre las dos cepas. Además se hicieron igualmente gráficas comparando los promedios obtenidos de forma independiente de las zonas A, B y C. Esto tenía como objetivo establecer las diferencias que se encuentran en estas zonas al comparar las cepas. Este análisis se realizó para cada uno de los marcadores.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados serán presentados y discutidos de acuerdo a los objetivos planteados, es por esta razón que se mostrarán inicialmente las concentraciones de los anticuerpos utilizados y los tiempos de revelado, los cuales fueron estandarizados durante el proceso experimental. Posteriormente se darán a conocer tablas y gráficos comparativos para los nueve marcadores, que serán presentados de acuerdo a los grupos preestablecidos: proteínas estructurales, receptores para VR, y por último marcadores para subpoblaciones de GRD de neuropéptidos; donde se muestran las principales diferencias de densidad de IR, encontradas entre las cepas que fueron objeto de estudio.

### **4.1 Aspecto morfológico de los cortes obtenidos en vibrátomo**

El procedimiento histológico de cortes en vibrátomo es un sistema ampliamente utilizado en neurobiología, pues permite conservar de manera óptima las pequeñas estructuras anatómicas del cerebro.

En el presente trabajo se escogió hacer la evaluación morfométrica sobre cortes de 50  $\mu\text{m}$  (Figura 3), con el objeto de garantizar tanto la integridad morfológica, como el mantenimiento de la IR que normalmente se pierde en los procesamientos con parafina o de congelación.

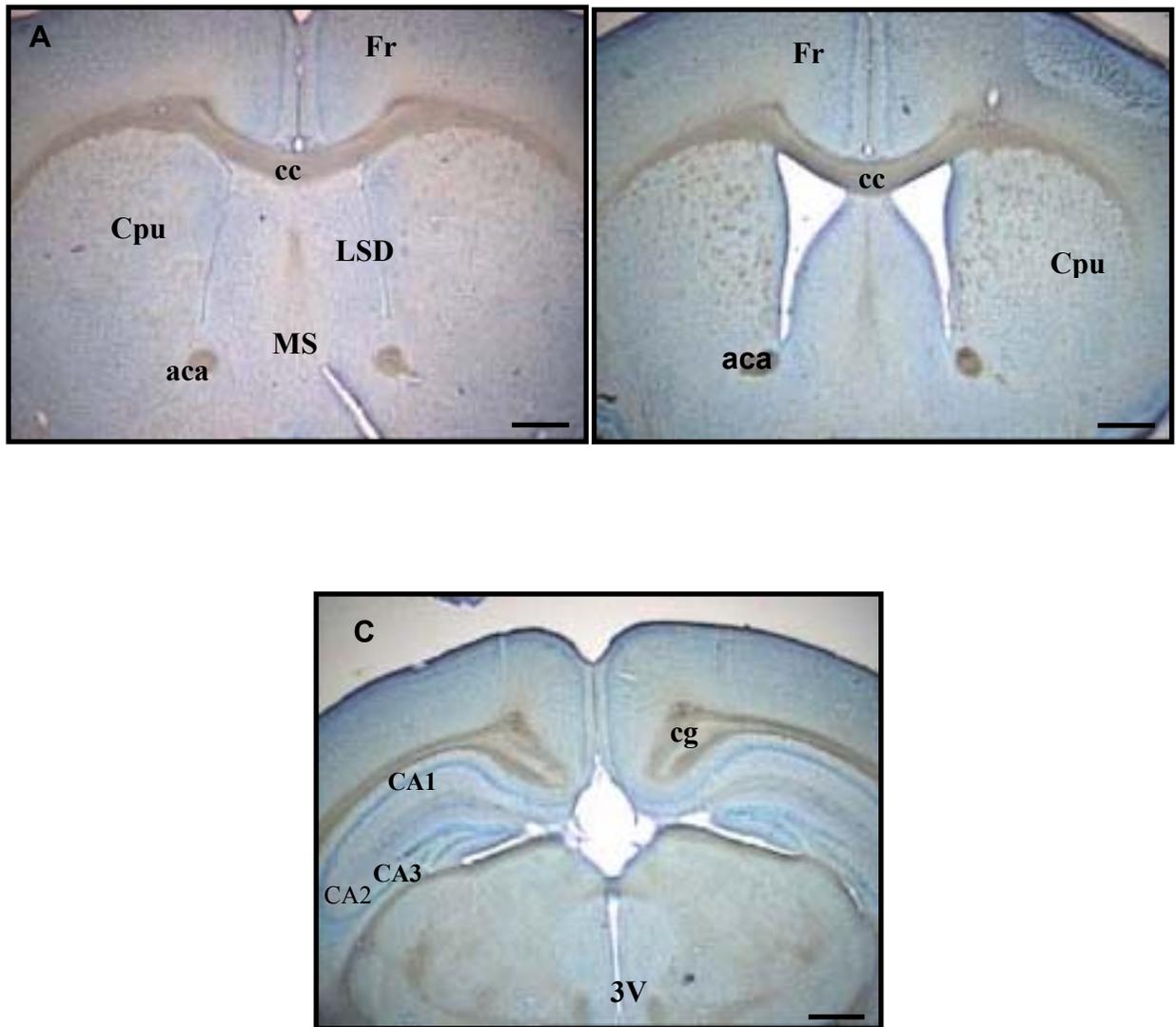


Figura 3. Se observan cortes teñidos con Giemsa, en los que se pueden observar algunas estructuras anatómicas en forma general como: cuerpo caloso (cc), putamen caudado (Cpu), comisura anterior (aca), núcleo lateral septal intermedio (LSD) núcleo septal medial (MS) corteza frontal (Fr), las áreas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, cingulum (cg). En general, cortes similares fueron procesados por la técnica de inmunohistoquímica para los marcadores evaluados. Los cortes A-B son representativos de las cepas ICR y C57BL/6 respectivamente, a nivel del telencéfalo. C representa un corte realizado a nivel de diencefalo de la cepa C57BL/6. La nomenclatura de las estructuras anatómicas está basada en la utilizada en el atlas de Paxinos y Watson 1986. La escala de la barra equivale a 1000 $\mu$ m

#### 4.2 Metodología estandarizada para la inmunodetección de los nueve marcadores en cortes de cerebro

Con este trabajo se logró obtener un protocolo con concentraciones de anticuerpos apropiadas (Tabla 2) para realizar una valoración cuantitativa de las diferencias en la densidad de IR al comparar las cepas ICR y C57BL/6.

El diseño de montaje de los cortes seriados con características muy similares entre las cepas, el desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica en bloque, las concentraciones de anticuerpo utilizadas, la adecuación de tiempos de revelado y el análisis de las imágenes obtenidas con condiciones de luz apropiadas y estables, son estrategias esenciales que fortalecieron el diseño experimental, con el que se obtuvo resultados que pueden ser reproducibles y confiables. Por lo tanto ésta constituye una metodología novedosa que deja de lado las valoraciones subjetivas, comúnmente utilizadas para la descripción de este tipo de trabajos, tal vez por la falta de un modelo de análisis cuantitativo de este tipo.

<b>MARCADOR</b>	<b>Concentración anticuerpos primario</b>	<b>Anticuerpo secundario y diluciones</b>	<b>Tiempo de revelado (minutos)</b>
NCAM	1:250	Anti-ratón (1:200)	45
p75 <sup>NTR</sup>	20µg/ml	Anti-conejo (1:200)	8
ALFA-4	25µg/ml	Anti-cabra (7.5µg/ml)	25
TrkA	20µg/ml	Anti-conejo (1:200)	7
NF	1:300	Anti-conejo (1:200)	5
GFAP	1:250	Anti-conejo (1:200)	20
IB4	5µg/ml	Anti-conejo (1:200)	30
GAL	1:25	Anti-conejo (1:200)	7
NPY	1:250	Anti-conejo (1:200)	5

Tabla 2. Resultado final de las concentraciones y tiempo de revelado para la lectina IB4 y los anticuerpos primarios y secundarios de cada marcador.

#### **4.3 Protocolo estandarizado de la técnica de inmunohistoquímica por peroxidasa indirecta en cortes de cerebro de 50 $\mu$ m de ratón adulto obtenidos en vibrátomo**

- Hidratar con PBS por 15 min.
- Permeabilizar con Triton X-100 (0.1%) por 30min a temperatura ambiente, preparado en PBS.
- Realizar tres lavados con PBS por 5 minutos cada uno.
- Bloquear peroxidasa endógena por 1 hora a temperatura ambiente, con 0.5% de peróxido de hidrogeno preparado en PBS con metanol al 50%.
- Realizar tres lavados con PBS por 5 minutos cada uno.
- Bloquear sitios inespecíficos por 30 minutos a temperatura ambiente con Suero de Recién Nacido (SRN), al 10% preparado en PBS.
- Incubar con anticuerpo primario (según marcador) preparado en PBS con SRN al 5% toda la noche en cámara húmeda a 4°C con las concentraciones predefinidas.
- Realizar tres lavados con PBS, cada uno por 10 minutos.
- Incubar con anticuerpo secundario biotinilado (según el anticuerpo primario) preparado en PBS con SRN al 5% por 30 min a temperatura ambiente.
- Realizar tres lavados con PBS por 5 minutos cada uno.
- Colocar complejo ABC (Complejo Avidina-Peroxidasa biotinilada), realizando un mezcla con una proporción 1:1 de la solución A (avidina) y de la solución B (Peroxidasa biotinilada), con una concentración de 1:100 para ambas soluciones, estas deben ser preparadas en PBS, 30 minutos antes de su aplicación, para después dejar en contacto con el tejido por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar tres lavados con PBS por 5 minutos.
- Revelar con Diaminobenzidina (DAB) al 0.1% en Tris-HCl con un pH 7.2 y peróxido de hidrógeno al 0.02% en agua destilada, proporción 1:1.
- Los cortes se deshidrataron dejándolos a temperatura ambiente por 12 horas, este paso tiene una variación importante, puesto que normalmente se realiza la

deshidratación con concentraciones ascendentes de alcoholes y lavados con xilol. Este tratamiento es bastante agresivo puesto que en la mayoría de los casos se observan fuertes contracciones del tejido, propiciando un desgarramiento de estos y afectando en forma severa la morfología. Esto no sucede cuando los cortes son deshidratados a temperatura ambiente, puesto que el proceso se lleva a cabo más lentamente.

- Montar con Entellan

Nota: Todos los reactivos, se aplicaron por inmersión de las láminas con el fin de que los tejidos fueran tratados con volúmenes y reactivos preparados en igualdad de condiciones. Se estandarizaron los tiempos de revelado para cada marcador.

En el caso de los anticuerpos se aplicaron 200µl por corte, volumen que fue suficiente para cubrir el tejido en su totalidad. Esto permite un ahorro substancial en la cantidad de anticuerpo que se utiliza, sin poner en riesgo la igualdad de las condiciones que implica cada uno de los tratamientos.

#### **4.4 Diferencias entre ICR y C57BL/6.**

Como se explicó en el aparte de materiales y métodos, se hizo una evaluación cuantitativa de la IR que se presentó en las regiones escogidas para las dos cepas trabajadas. Después del proceso de inmunodetección, se digitalizaron las imágenes con condiciones de luz estables y se cuantificó la intensidad del marcaje en cada corte, estos fueron promediados y analizados estadísticamente (los datos se pueden encontrar en los anexos 1, y 2).

Al realizar las comparaciones entre las cepas de ratones, correspondientes a las regiones 1 y 2, no se encontraron diferencias para la mayoría de marcadores (Tabla 3). De manera contraria, el análisis de IR, realizado a las zonas que acogen a las regiones 3, 4, 5 y 6, evidenció diferencias entre las dos cepas. Las estructuras comprometidas en estas diferencias fueron la corteza frontal, células piramidales del hipocampo, fibras del cuerpo calloso, fimbria, núcleos del complejo amigdalóide y células de Purkinje en cerebelo, las cuales están relacionadas con procesos de aprendizaje, memoria y algunas

enfermedades neurodegenerativas. En general los valores de densidad media de IR para las zonas y regiones analizadas son muy cercanos, teniendo en cuenta que son moléculas que deben estar presentes para el funcionamiento normal del SN. Sin embargo al realizar el análisis estadístico se encontró que esas diferencias entre las cepas eran significativas.

Una observación subjetiva de las láminas, no permitiría definir si realmente existen diferencias o no. El valor de la técnica estandarizada en el presente trabajo se confirma al detectar diferencias muy pequeñas, que no son obviadas cuando se hacen evaluaciones cualitativas de la IR.

A	REGIÓN 1				REGIÓN 2		
	MARCADOR	Diferencias	Promedios		Diferencias	Promedios	
			C57BL/6	ICR		C57BL/6	ICR
NCAM	-	26,91	25,76	-	25,84	26,24	
TrkA	-	25,77	25,51	-	25,64	24,81	
p75	-	26,91	25,76	-	25,84	26,24	
GFAP	-	27,02	27,59	-	27,27	28,59	
NPY	-	31,42	32,42	-	32,38	31,37	
NF	*	30,27	32,27	-	32,31	33,68	
ALFA-4	-	22,72	24,09	-	22,27	23,30	
IB4	-	32,15	32,15	-	32,62	33,49	
GAL	-	28,98	29,42	*	28,28	29,52	

B	REGIÓN 3				REGIÓN 4		
	MARCADOR	Diferencias	Promedios		Diferencias	Promedios	
			C57BL/6	ICR		C57BL/6	ICR
NCAM	-	23,83	25,98	*	23,85	26,70	
TrkA	-	27,30	27,72	-	26,96	27,77	
p75	*	23,83	25,98	*	23,85	26,70	
GFAP	-	29,98	29,37	-	29,99	29,15	
NPY	*	36,27	32,96	*	36,20	32,16	
NF	-	39,15	37,70	-	38,52	36,11	
ALFA-4	*	21,20	23,64	*	21,27	24,81	
IB4	-	32,42	32,92	-	32,46	33,79	
GAL	-	31,11	29,67	-	30,29	29,51	

C	REGIÓN 5				REGIÓN 6		
	MARCADOR	Diferencias	Promedios		Diferencias	Promedios	
			C57BL/6	ICR		C57BL/6	ICR
	NCAM	*	27,59	31,68	*	27,40	31,12
	TrkA	-	29,59	28,83	-	28,77	28,29
	p75	*	27,89	31,68	*	27,40	31,12
	GFAP	-	34,03	35,37	-	34,71	36,72
	NPY	-	39,41	38,11	-	37,65	37,43
	NF	-	46,67	49,49	-	44,97	45,82
	ALFA-4	*	23,72	26,67	*	23,69	25,91
	IB4	-	33,67	34,85	*	32,77	34,98
	GAL	-	33,06	32,67	-	31,61	32,16

Tabla 3: Resultado de la prueba t-Student realizada para cada una de las regiones entre las cepas ICR y C57BL/6. El asterisco en rojo corresponde a diferencias que son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.5 Proteínas estructurales

Como se esperaba se encontró marcaje intenso para los filamentos intermedios (ver figuras 5 y 7), pero no hubo diferencias en la IR al comparar las dos cepas de ratones. Probablemente el hecho de que estas proteínas hagan parte de la estructura general del tejido nervioso (astrocitos y neuronas), permite suponer que la regulación de su expresión es muy estricta y por lo tanto poco variable durante el estado maduro adulto de los animales procesados.

El no encontrar diferencias para los filamentos entre las cepas, fortalece el hecho de que para otros marcadores sí haya diferencias, pues el sistema permite detectar discrepancias en proteínas relacionadas con la fisiología cerebral, manteniendo los valores equitativos en proteínas de tipo estructural.

##### 4.5.1 Neurofilamento (NF)

El marcaje para NF fue un marcaje homogéneo que no presentó diferencias significativas al comparar los promedios totales de IR de las dos cepas (Figura 4A y 4B), los resultados del análisis estadístico para las zonas, confirman que no hay variación de la expresión de IR de NF, y lo mismo sucede con las valoraciones para cada una de las regiones, con acepción de la región 1 (hemisferio izquierdo) en la que se

presenta una diferencia que es estadísticamente significativa (Tabla A), posiblemente por la presencia de alguna estructura diferente con respecto a la región 2 (hemisferio derecho), pero fue una particularidad con respecto a lo que se observa en las demás regiones y no afecta de forma significativa al promediar los datos totales.

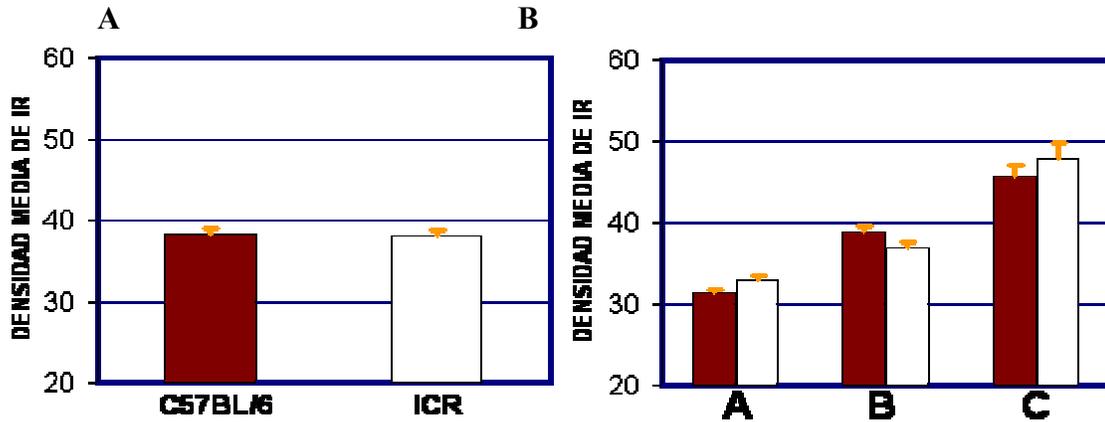


Figura 4. Comparación de la intensidad de IR para NF en cerebros de los ratones C57BL/6 (barras rojas) e ICR (barras blancas). A. Promedio general de intensidad de IR, comparando los datos totales obtenidos para cada cepa B. Promedio de intensidad de IR para NF en las zonas A, B y C. Las barras de error equivalen al error estándar de la media (E.E.M.).

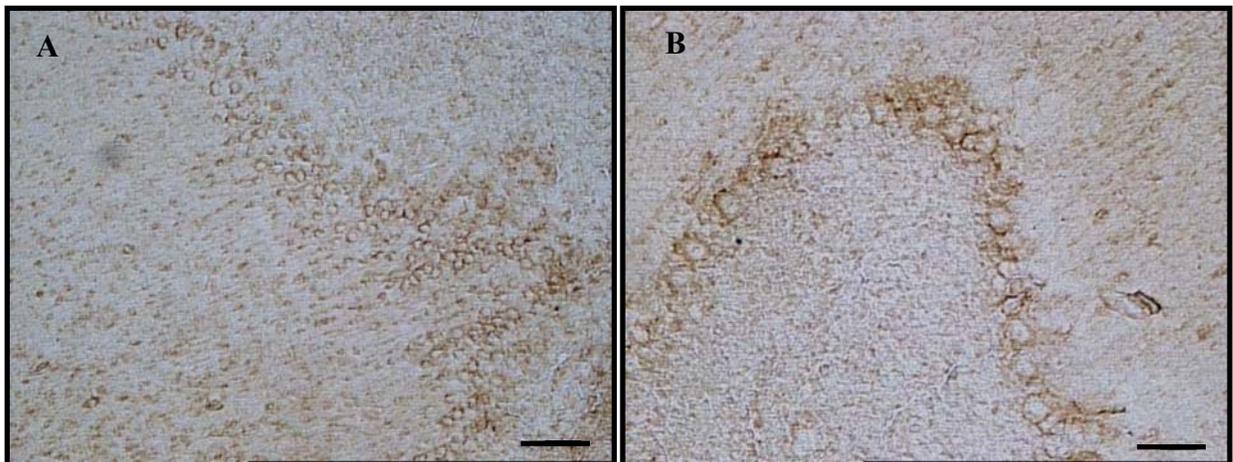


Figura 5: Imágenes representativas de la IR para NF de 200kDa. Células de Purkinje del cerebelo. C57BL/6 (A). ICR (B). Barra 50µm

#### 4.5.2 Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

GFAP no presentó diferencias estadísticamente significativas al comparar los datos totales de densidad de IR obtenidos para este marcador (Figura 6A), igualmente sucedió al comparar cada una de las zonas (Figura 6B). La evaluación de las regiones de forma independiente confirman que hay una similitud en la IR entre las dos cepas para GFAP (Tabla 3 A, B y C).

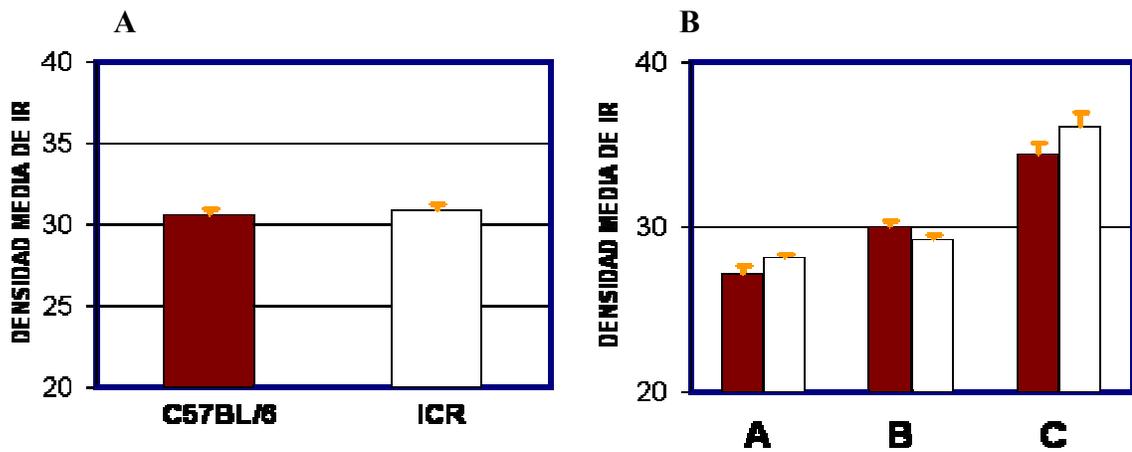


Figura 6: Comparación de la intensidad de IR para GFAP en cerebros de los ratones C57BL/6 (barras rojas) e ICR (barras blancas). A. Promedio general de intensidad de IR, comparando los datos totales obtenidos para cada cepa B. Promedios de intensidad de IR para GFAP en las zonas A, B y C. Las barras de error equivalen al E.E.M.

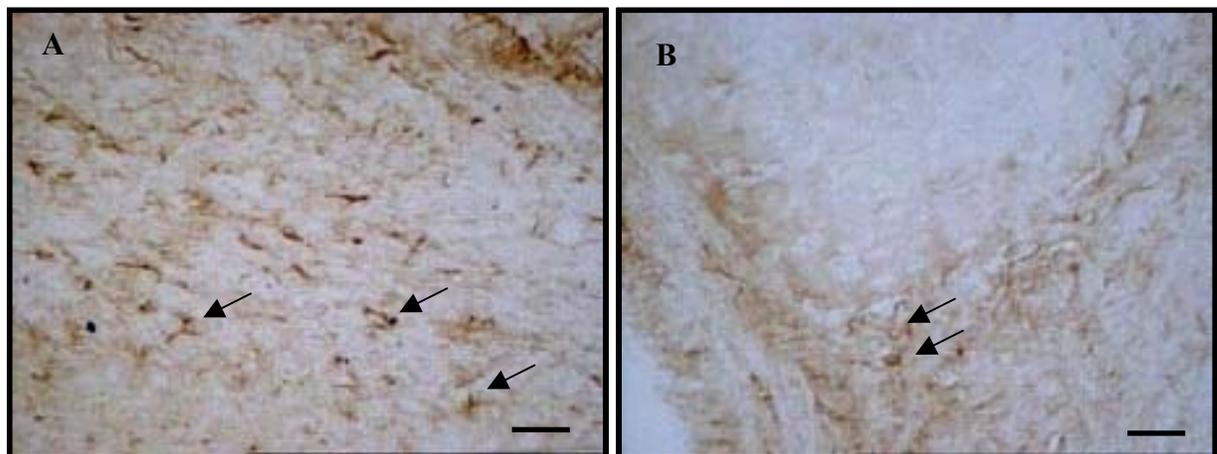


Figura 7. Imagen de representativa de la IR observada para GFAP. Las flechas indican algunos astrocitos positivos para este marcador ubicados en la fimbria del hipocampo. C57BL/6 (A). ICR (B). Barra 50µm

## **4.6 Receptores postulados para el virus de la rabia**

Al realizar la comparación de la densidad de la IR para los receptores propuestos para el VR, se encontró que en los ratones ICR el valor de densidad media fue mayor que en los ratones C57BL/6.

Es bien sabido, que el VR después de una inoculación intracerebral tiene una rápida dispersión; distribuyéndose por las principales regiones del cerebro como: corteza, hipocampo, tálamo, striatum, cerebelo (núcleos profundos y células de Purkinje) y tallo cerebral (Jackson *et al.* 2001; Perez 1999) estructuras que hacen parte de las zonas donde se acentúan las diferencias entre ICR y C57BL/6.

Es posible que se pueda encontrar una correlación en las diferencias de expresión de receptores y la susceptibilidad al VR por parte de estas dos cepas. Existen reportes de cepas de ratones resistentes al VR, al parecer estas diferencias en la susceptibilidad está íntimamente relacionada con título de anticuerpos neutralizantes que genera una cepa en particular (Lodmell y Ewalt 1985) y la presencia de características genéticas (Lodmell y Chesebro 1984). También existen diferencias en la cantidad de citoquinas entre cepas de ratones (Futamura 1994), lo cual puede generar una diversidad en la respuesta inmune entre diferentes cepas de ratones frente a microorganismos como el VR.

Por tanto, estos hallazgos son bastante interesantes para el Laboratorio de Neurociencias, y dan luz verde a la generación de nuevos diseños experimentales con animales endo y exocriados y el VR, fortaleciendo las evidencias del papel que tienen estas moléculas en interacción con el VR.

### ***4.6.1 Molécula de adhesión celular neural (NCAM)***

La densidad de la IR para NCAM en los ratones ICR, fue de 25,98 (zona C) 26.70 (zona D), 31.68 (zona E) y 31.12 (zona F) mientras que para las mismas zonas y el mismo antígeno, la densidad de IR en los ratones C57BL/6 fue de 23.83, 23.85, 27.59 y 27.40 respectivamente. El análisis estadístico detectó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) que se pueden observar en la figura 8. Estas diferencias se remiten a las zonas

B y C (Figura 8B) principalmente en las regiones 4, 5, y 6. (Tabla 3B y C) que involucran estructuras del cerebro medio (Figura 9) y cerebelo, donde se asientan funciones como: supervivencia, comportamientos emocionales, aprendizaje y memoria.

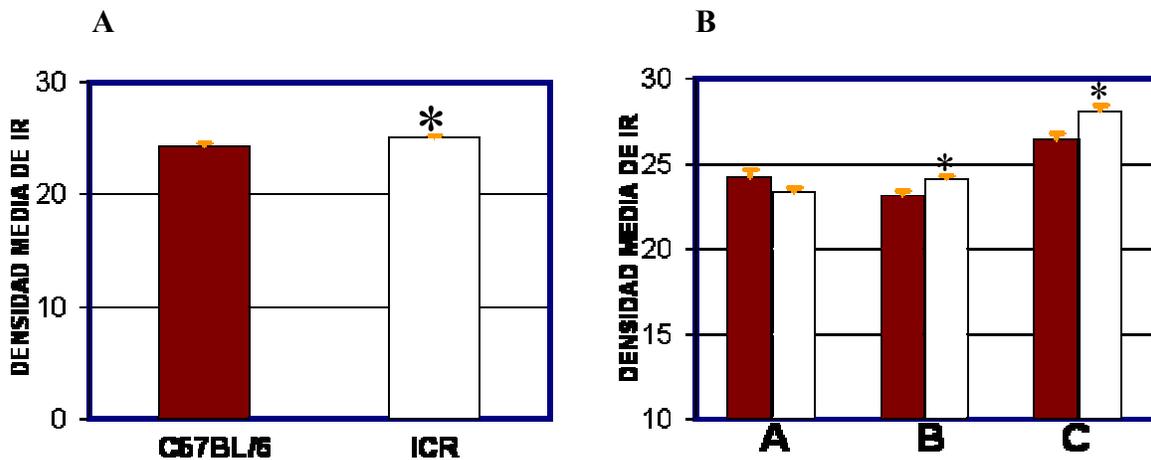


Figura 8. Comparación de la intensidad de IR para NCAM en cerebros de los ratones C57BL/6 (barras rojas) e ICR (barras blancas). A. Promedio general de intensidad de IR, comparando los datos totales de las seis regiones obtenidos para cada cepa B. Promedios de intensidad de IR para NCAM en las zonas A, B y C. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de error equivalen al E.E.M.

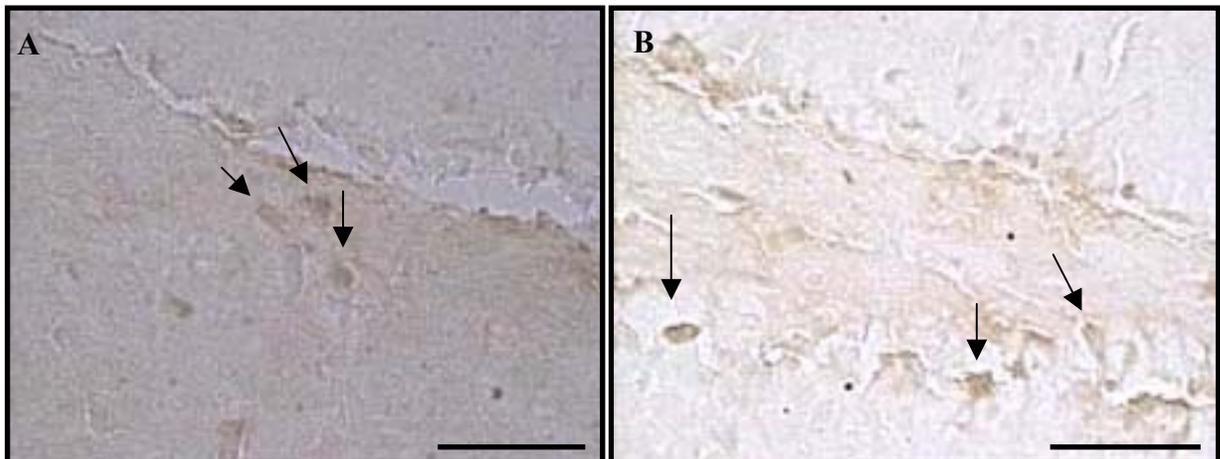


Figura 9. Imagen representativa de la IR observada para NCAM. Las flechas indican algunas células piramidales del hipocampo positivas para este marcador. C57BL/6 (A). ICR (B). Barra 50µm.

En estudios realizados en ratones deficientes (knock-out) para la proteína NCAM se reportan diferencias de tamaño del bulbo olfatorio y deficiencias en el aprendizaje espacial (Cremer *et al.* 1994), reducción en el crecimiento axonal y desfasciculación de fibras en el hipocampo (Cremer *et al.* 1997) e insuficiencia en el transporte vesicular (Ryan 2001) que conllevan a problemas en algunas tareas cognitivas como memoria, aprendizaje y reducción del ambiente exploratorio en los ratones.

El resultado encontrado en este trabajo, supone que las diferencias existentes entre las cepas estudiadas pueden extrapolarse a un nivel cognoscitivo partiendo del papel que tienen las moléculas de adhesión dentro de la consolidación de la memoria y el aprendizaje (Benson *et al.* 2000) que posiblemente puedan ser diferentes entre las cepas, atribuyéndole a la cepa ICR ventajas cognitivas con relación a la cepa C57BL/6.

#### ***4.6.2 Subunidad $\alpha$ -4 del receptor nicotínico de acetilcolina (RNACH)***

La evaluación densitométrica de la IR para la subunidad  $\alpha$ -4 del RNACH en los cortes procesados para las dos cepas de ratones estudiadas, permitió encontrar diferencias altamente significativas ( $p = 6.3^{-10}$ ) al comparar el promedio de todas las áreas (Figura 10A), lo cual se puede apreciar fácilmente en la figura 11. Nuevamente se evidenció que las zonas B y C de los ratones ICR fueron las que presentaron mayor densidad de marcaje ( $p= 8,1^{-08}$  y  $p= 6,9^{-5}$  respectivamente) (Figura 10B).

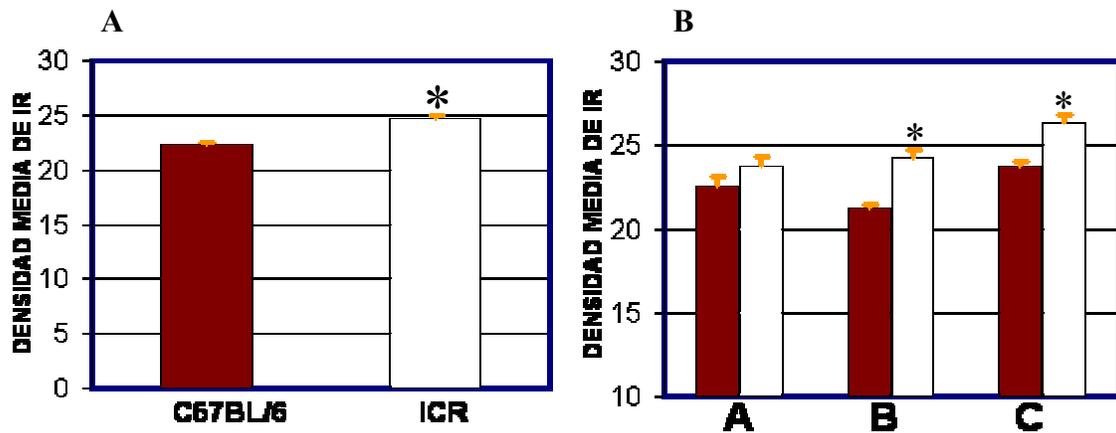


Figura 10. Comparación de la intensidad de IR para  $\alpha 4$  en cerebros de los ratones ICR (barras blancas) y C57BL/6 (barras rojas). A. Promedio general de intensidad de IR, comparando los datos totales de las seis regiones obtenidos para cada cepa B. Promedios de intensidad de IR para la subunidad  $\alpha 4$  del RNACH en las zonas A, B y C. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de error equivalen al E.E.M

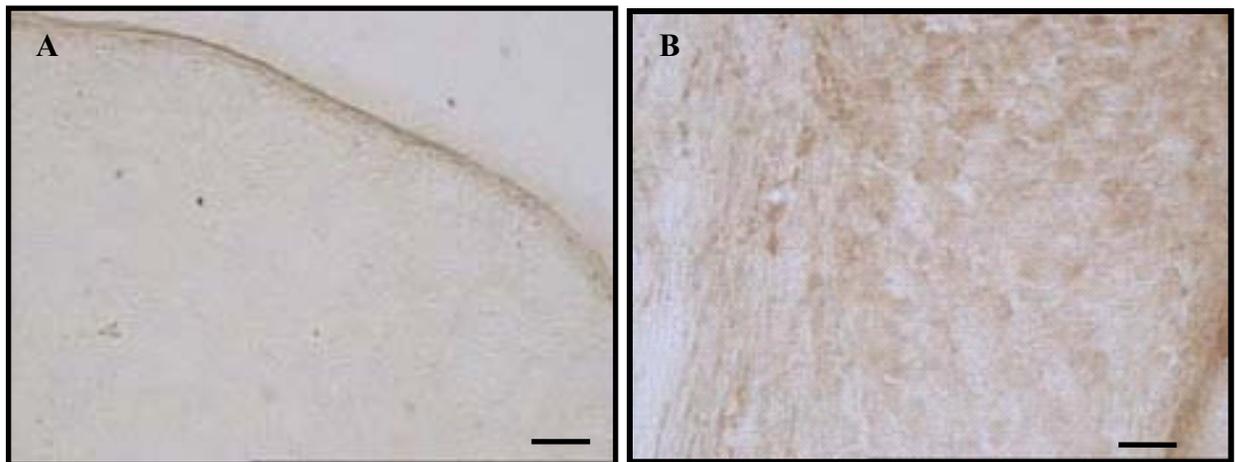


Figura 11. Imagen representativa de las diferencias observadas en la IR para RNACH donde se observa claramente las diferencias en la intensidad del marcaje. Esta foto corresponde a una imagen de la corteza. C57BL/6 (A). ICR (B). Barra 50 $\mu$ m.

Existe una amplia diversidad de receptores RNACH dada por los patrones de expresión de las subunidades que los componen, que pueden estar asociados a las características genóticas de cada cepa. Ratones knock-out para la subunidad  $\alpha 4$

presentan un aumento en los niveles de ansiedad al igual que en su actividad exploratoria y una reducción en la capacidad de adaptación a nuevos ambientes que puede ser modulada al suministrar el agonista nicotina, sugiriendo que la subunidad  $\alpha 4$  del RNACH puede cumplir con una papel modulador de la actividad motora y exploratoria (Ross *et al.* 2000). Avgustinovich y colaboradores (1998) realizaron estudios con el fin de evaluar el índice de ansiedad para 6 genotipos de ratones con pruebas de “plus-maze” y cajas de luz–oscuridad (light–dark box) que miden la capacidad exploratoria y ansiedad de los ratones de acuerdo al número de visitas que hacen a un sitio determinado y su correlación con las características de luz del área visitada (iluminada o oscura), encontrando fuertes diferencias entre los genotipos evaluados. El diseño experimental para este estudio incluyó ratones de las cepas ICR y C57BL/6 las cuales mostraron diferencias en sus conductas exploratorias y ansiedad, en ese estudio los ratones C57BL/6 muestran una reducida actividad exploratoria con relación a ratones ICR los cuales permanecieron más tiempo en áreas despejadas.

#### **4.6.3 Receptor de baja afinidad para neurotrofinas ( $p75^{NTR}$ )**

Al realizar la evaluación morfométrica del promedio de IR de las seis regiones para  $p75^{NTR}$  (Figura 12A) entre las dos cepas de ratones, se encontró que el marcaje fue mas intenso en los ratones ICR que en los C57BL/6 ( $p=0,000003$ ).

En los análisis para cada una de las zonas evaluadas, se encontraron diferencias en la densidad de marcaje en zona B ( $p=0,00007$ ) y zona C ( $p= 4,2^{-06}$ ) siendo mayor en ratones ICR (Figura 12B), variaciones que no son apreciables a simple vista (Figura 13), pero que sí son detectadas por el sistema que se ha utilizado. Esto mismo se encontró al comparar las regiones escogidas entre las cepas (Tabla 3 A, B y C).

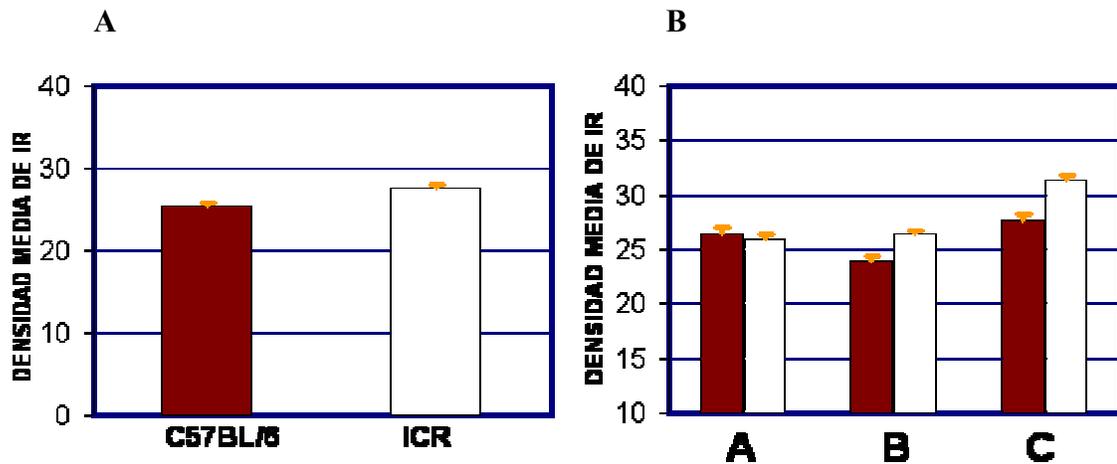


Figura12. Comparación de la intensidad de IR para p75<sup>NTR</sup> en cerebros de los ratones C57BL/6 (barras rojas) e ICR (barras blancas). A. Promedio general de intensidad de IR, comparando los datos totales de las seis regiones, obtenidos para cada cepa B. Promedios de intensidad de IR para p75<sup>NTR</sup> en las zonas A, B, C. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de error equivalen E.E.M.

El receptor p75<sup>NTR</sup> participa en una amplia variedad de actividades biológicas, e involucra a múltiples proteínas adaptadoras que median diferentes patrones de cascadas de señalización, generando respuestas de supervivencia o muerte celular, elongación axonal y transmisión sináptica (Dechant y Barde 1997). Así mismo p75<sup>NTR</sup>, ha sido involucrado en varias patologías. La sobre-expresión de p75<sup>NTR</sup> está implicada con muerte neuronal en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Mufson y Kordower 1992), también se conocen modelos de epilepsia donde se encuentra una correlación de procesos apoptóticos de neuronas corticales con la sobre expresión de p75<sup>NTR</sup> después de la aplicación de inyecciones de pilocarpina (Roux *et al.* 1999). Las diferencias altamente significativas entre las cepas ICR y C57BL/6, son una variable que puede ser aprovechada para la evaluación de modelos de las múltiples actividades biológicas donde interviene p75<sup>NTR</sup>, como en el caso de la epilepsia.

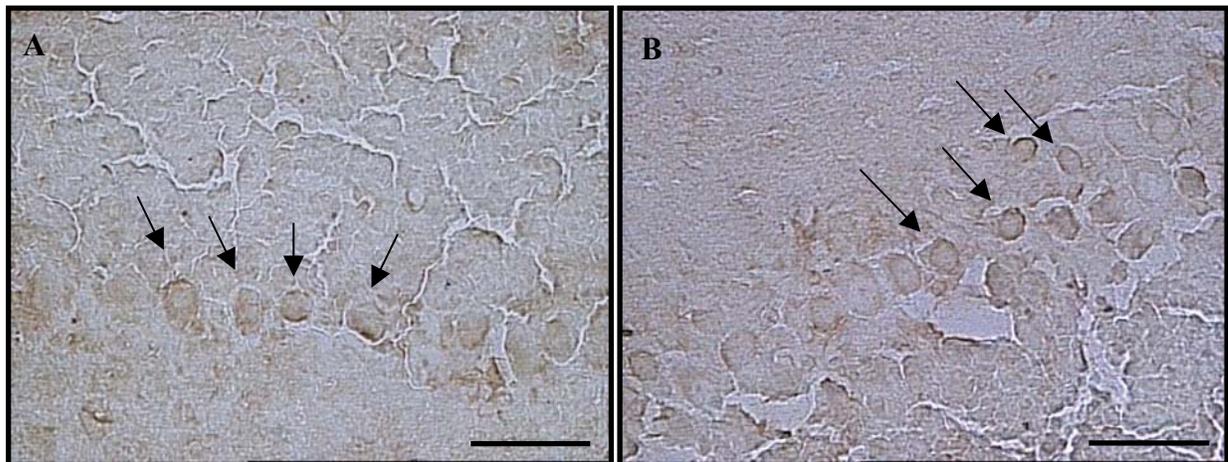


Figura 13: Imagen representativa de la IR observada para  $p75^{\text{NTR}}$ . Las flechas muestran células de Purkinje del cerebelo positivas para este marcador. C57BL/6 (A). ICR (B). Barra 50 $\mu\text{m}$ .

#### 4.7 Marcadores de subpoblaciones del GRD

TrKA presentó un marcaje intenso, principalmente en áreas de la corteza (ver figura 15) y lóbulos del cerebelo. Mientras que IB4 se observó principalmente en el Alveus hipocampal (ver figura 17) células piramidales del hipocampo y algunas áreas en los lóbulos del cerebelo.

Por otra parte la IR para GAL y NPY (ver figuras 19 y 21) muestra una amplia distribución a través de los diferentes niveles representativos del cerebro, marcaje que se caracteriza por la presencia de pequeñas vesículas citoplasmáticas cercanas a membrana y a lo largo de los axones.

##### 4.7.1 Receptor tirosina quinasa para NGF (*TrkA*)

De manera contraria a lo encontrado para los otros marcadores, este receptor no mostró diferencias ( $p=0,41$ ) en su expresión entre las dos cepas de roedores después de realizar el análisis de los datos de la densidad IR total (Figura 14A). La evaluación por separado las zona A, B y C tampoco detectó diferencias en la intensidad de marcaje para este antígeno (Figura 14B, Tabla 3 A, B y C). Se obtuvo entonces, que el promedio de IR fue muy similar entre las cepas lo cual se puede apreciar en la Figura 15.

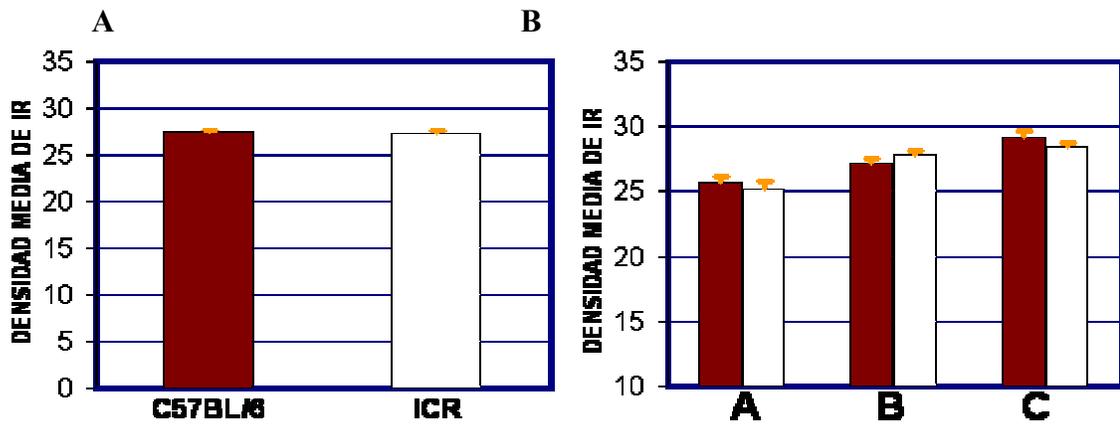


Figura 14. Comparación de la intensidad de IR para TrkA en cerebros de los ratones C57BL/6 (barras rojas) e ICR (barras blancas). A. Promedio general de intensidad de IR, comparando los datos totales de las seis regiones, obtenidos para cada cepa B. Promedios de intensidad de IR para TrkA en las zonas A, B y C. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) Las barras de error equivalen al E.E.M..

El receptor de alta afinidad para el NGF (TrkA) cumple con un papel muy dinámico durante el desarrollo del SNC (Knüsel *et al.* 1992, Fagan *et al.* 1997) y SNP (Smeyne *et al.* 1994, Miller *et al.* 1994, Shadiack y Zigmond. 2001, Liu *et al.* 2001) especialmente en procesos de maduración, diferenciación y crecimiento axonal. Entrando en las primeras etapas postnatales se genera una fuerte reducción del receptor quedando su expresión confinada a una pequeña parte de la población neuronal, la cual se encargará de mantener el soporte trófico por señalizaciones paracrinas y autocrinas (Molliver y Snider 1997), lo que hace pensar que el receptor TrkA durante la adultez alcanza un equilibrio de expresión que sólo varía en procesos de restauración principalmente evitando la muerte celular.

Por otra parte, de acuerdo con algunos hallazgos obtenidos en el Laboratorio de Neurociencias (Castellanos *et al.* 2001), se observa un bloqueo de la infección por VR en cultivos de neuronas sensoriales de GRD, tratados previamente con NGF NT-3, permitiendo postular la hipótesis de la probable participación de los receptores Trk como posibles mediadores en la infección por VR. Lo particular de esta molécula, es que es poco variable entre cepas, puesto que esto no sucede en el grupo de los

receptores postulados para el VR. Su papel como mediador de la infección sea el de coreceptor, o no tenga una función muy importante en los procesos de infección en el cerebro, pero sí en el GRD.

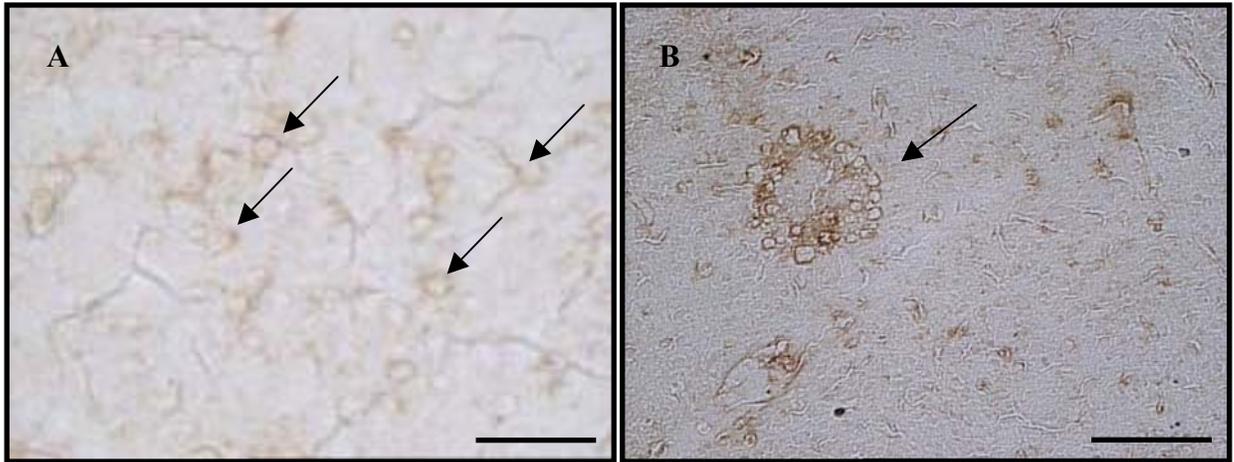


Figura 15. Imagen representativa de la IR para TrkA. Las flechas indican células de la corteza positivas para este marcador. C57BL/6 (A). ICR (B). Barra 50 $\mu$ m

#### 4.7.2 IB4 (*Griffonia simplicifolia*)

Al comparar los datos de densidad media de reactividad (R) total entre ICR Y C57BL/6 para IB4 se pueden observar diferencias que son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) encontrando que hay una mayor expresión de residuos de  $\alpha$ -D.-galactosa en los ratones ICR (Figura 16A). Estas variaciones entre las cepas son al parecer ocasionadas por un fuerte precipitado en la región 5 (Tabla 3 C) repercutiendo sobre el análisis que se hizo para la zona C, donde se generan las diferencias significativas ( $p = 0.004$ ) (Figura 16B).

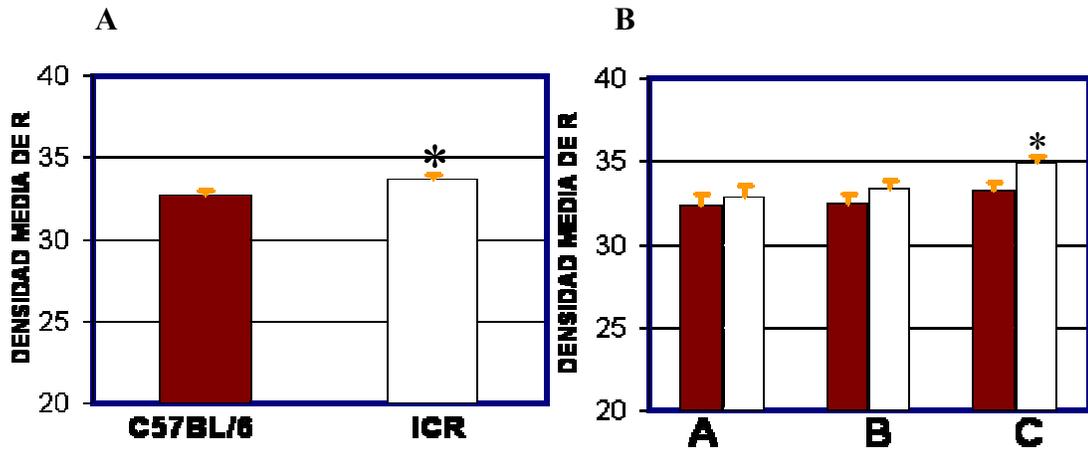


Figura 16. Comparación de la intensidad de R para IB4 en cerebros de los ratones C57BL/6 (barras rojas) e ICR (barras blancas). A. Promedio general de intensidad de R, comparando los datos totales de las seis regiones, obtenidos para cada cepa B. Promedios de intensidad de R para IB4 en las zonas A, B y C. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de error equivalen al E.E.M

Este marcador presentó una distribución reducida, apareciendo solamente en algunas células de corteza, células piramidales del hipocampo (CA1), álveus del hipocampo (Figura 17), meninges, vasos sanguíneos del cerebro medio y cerebelo, una distribución muy similar a lo reportado en rata (Kawai *et al* , 2001).

Las células epiteliales producen secreciones exocrinas dentro de las cuales se pueden hallar diferentes epitopes de oligosacaridos como  $\alpha$ Gal y  $\beta$ Gal, los cuales tienen diferentes patrones de R dentro de las mismas especies de cerdos (Gabiús y Gabiús 1997) sugiriendo que estos oligosacaridos están sujetos a las diferencias genéticas que puedan existir entre las cepas de una misma especie. En este caso las diferencias que se observan entre las cepas ICR y C57BL/6 podrían estar relacionadas con diseños en la expresión de epitopes para oligosacaridos generadas por sus diferencias genéticas

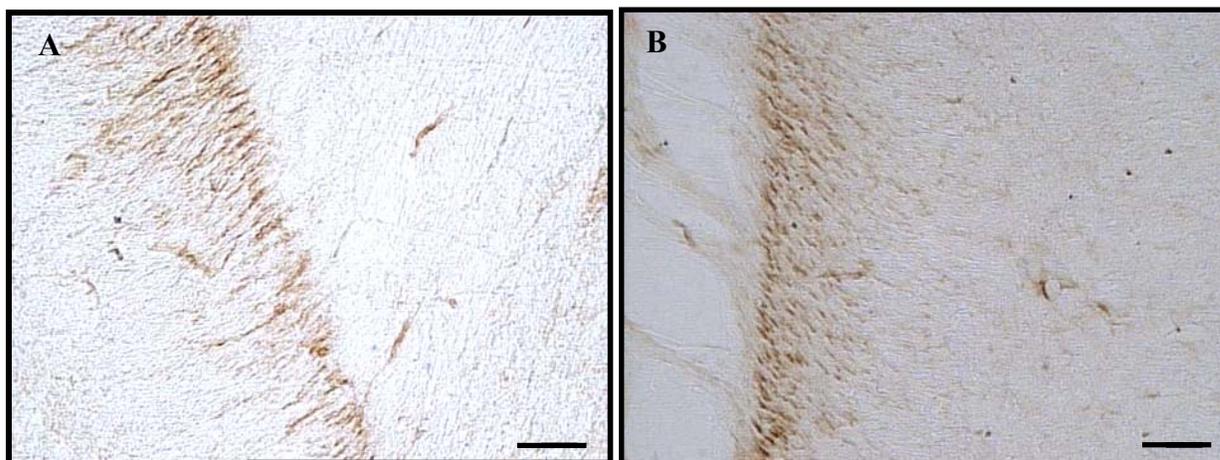


Figura 17: Imagen representativa de la R para IB4. Se observan fibras y células en el alveus del hipocampo positivas para este marcador. C57BL/6 (A). ICR (B). Barra 50 $\mu$ m

Por otra parte, IB4 es una molécula que ha sido utilizada como herramienta para el reconocimiento de subpoblaciones no peptidérgicas presentes en el GRD (Ju *et al.* 1997), junto con TrkA que reconoce neuronas peptidérgicas. Partiendo de esta base, se podría suponer que las diferencias observadas en la densidad de R en IB4, puedan estar correlacionadas con el número de neuronas que expresan péptidos en el cerebro, lo cual, es un indicio que se puede apoyar sobre los resultados que más adelante se muestran para NPY.

#### **4.7.3 Galanina (GAL):**

No se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,26$ ) para GAL al comparar los datos totales de IR entre las dos cepas (Figura 18A), estos resultados se mantuvieron al hacer la prueba estadística para cada una de las zonas (Figura 18B). Solo se presentaron diferencias significativas ( $p=0.008$ ) en la región 2 (Tabla 3 A) correspondiente al telencéfalo, pero que no repercuten en los análisis donde se comparan los promedios de los datos totales obtenidos para las seis regiones y las zonas en conjunto.

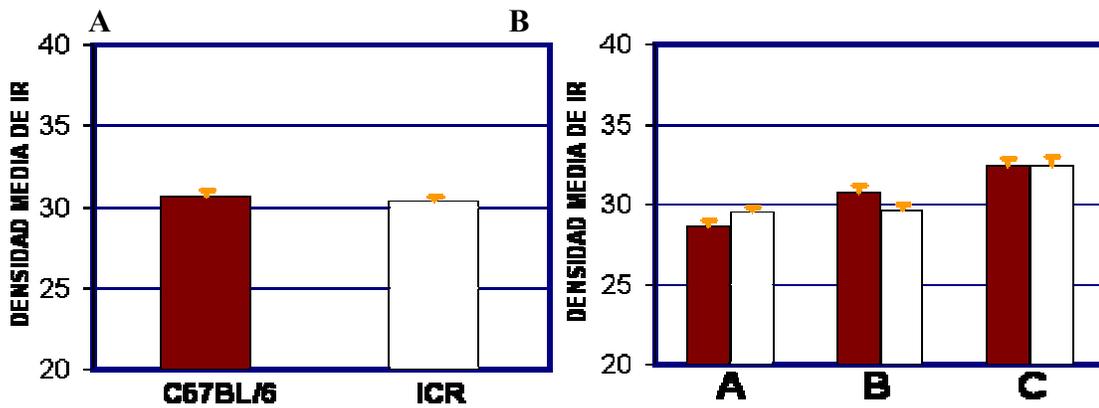


Figura 18. Comparación de la intensidad de IR para GAL en cerebros de los ratones C57BL/6 (barras rojas) e ICR (barras blancas). A. Promedio general de intensidad de IR, comparando los datos totales de las seis regiones, obtenidos para cada cepa B. Promedios de intensidad de IR para GAL en las zonas A, B y C. Las barras de error equivalen al E.E.M.

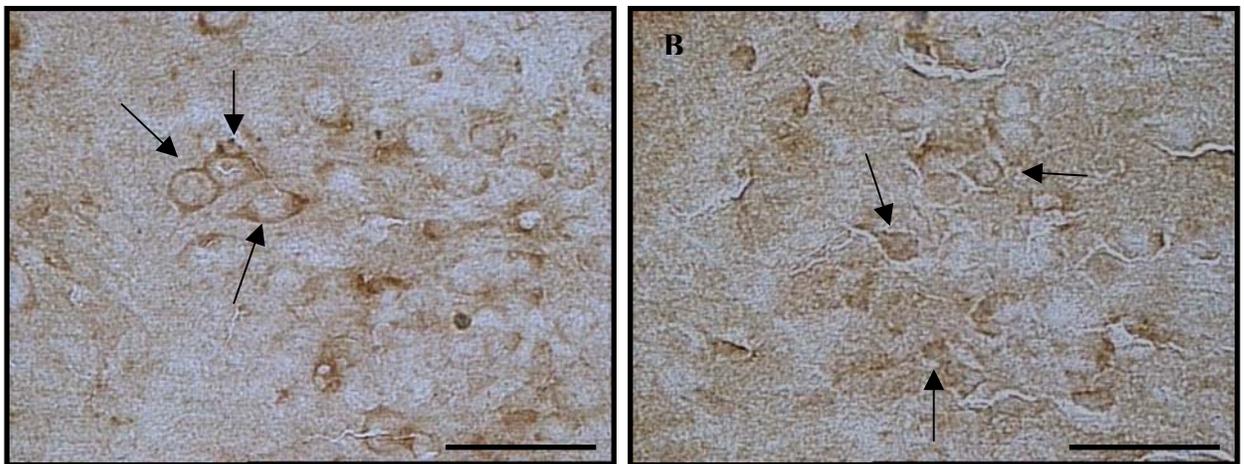


Figura 19 Imagen representativa de al IR observada para GAL. Las flechas señalan algunas células ubicadas en el complejo amigdalóide que son positivas para este marcador. C57BL/6 (A). ICR (B). Barra 50µm.

La regulación de peso corporal está asociada con interacciones entre el encéfalo y la periferia. Los NP como GAL y el NPY hacen parte de una serie de sustancias anabólicas, que favorecen la ingesta de alimentos, el descenso del gasto energético y por tanto el almacenamiento de grasas y carbohidratos (García-López *et al* 2002). Aunque GAL también puede actuar en otros procesos fisiológicos como la inhibición de la liberación de insulina en el páncreas, lo que genera hiperglicemia sugiriendo que podría participar en enfermedades asociadas a la obesidad en humanos (Invitti *et al.*

1995). Por otra parte, inhibe la liberación de ACh en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Crawley 1996). La variedad de reportes que se refieren a una descompensación en la liberación de GAL están asociados a características patológicas, muy posiblemente sea ésta una de las causas por las cuales no se encontraron diferencias entre las cepas, y más aún, cuando hay que tener en cuenta que estos animales se encuentran en ambientes relativamente controlados.

#### 4.7.4 Neuropéptido Y (NPY)

En los marcadores evaluados hasta el momento, se ha reportado una leve, pero significativa, mayor densidad de marcaje en los ratones de la cepa ICR. Para el caso del NPY, la intensidad de marcaje en los ratones C57BL/6 fue significativamente mayor que en los ratones ICR ( $p=0,0007$ ) (Figura 20). Estas diferencias son particularmente evidentes en los valores de la densidad encontrados en las regiones provenientes de las zonas B ( $p=0,00002$ ) (Figura 20B). Un resultado que no se aprecia a simple vista pero que con la metodología que se ha desarrollado en este trabajo, se muestra claramente.

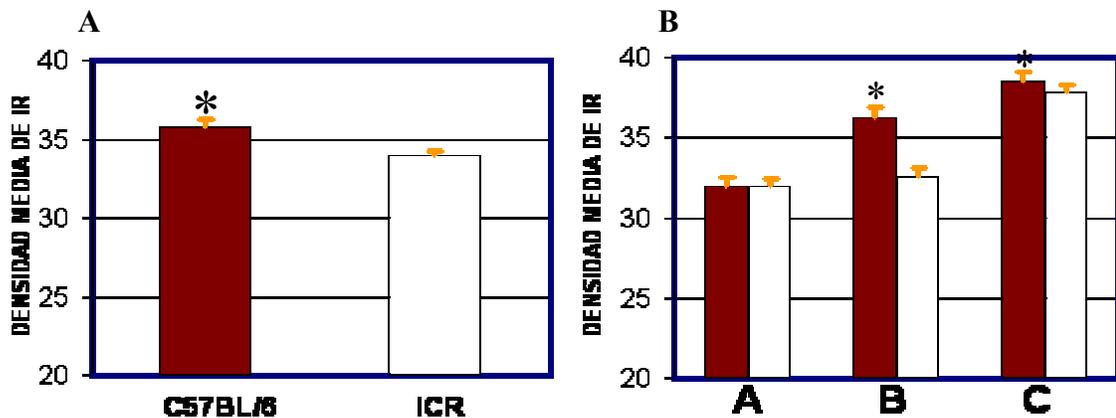
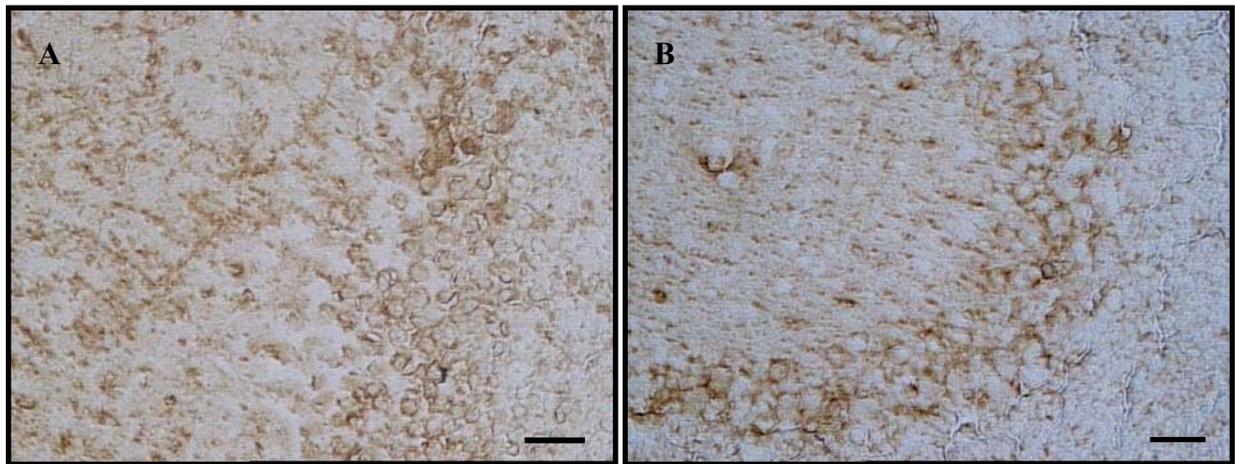


Figura 20. Comparación de la intensidad de IR para NPY en cerebros de los ratones C57BL/6 (barras rojas) e ICR (barras blancas). A. Promedio general de intensidad de IR, comparando los datos totales de las seis regiones obtenidos para cada cepa B. Promedios de intensidad de IR para NPY en las zonas A, B, y C. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de error equivalen al E.E.M.

NPY por su parte es un neuropéptido orexigénico, es decir que favorece la ingesta de alimentos y reduce el gasto energético, por tanto está implicado en problemas de obesidad (Segal-Lieberman *et al.* 2003). Los ratones C57BL/6 por ser

una cepa susceptible a la obesidad (Ziotopoulou *et al.* 2000) son muy utilizados en estudios relacionados con centros cerebrales implicados en el balance energético e ingesta de alimentos y dietas.

Messiha y colaboradores (1990) realizaron estudios la interrelación genética y ambiental entre la actividad locomotora y algunas aminos, encontrando que ratones ICR y C57BL/6 muestran promedios de actividad diferentes. Los ratones ICR son más activos que los C57BL/6 y así mismo, estos últimos estarían más propensos a la acumulación de tejido adiposo, lo cual podría estar relacionado con las diferencias en la expresión de NPY encontradas entre estas dos cepas.



Figuras 21: Imágenes representativas de la IR observada para NPY. Células de Purkinje del cerebelo que muestran una fuerte IR característica de este marcador. C57BL/6 (A). ICR (B). Barra 50µm

En resumen, la técnica estandarizada en el presente trabajo permitió detectar diferencias significativas en los valores de IR para varios de los marcadores ensayados. Se debe resaltar que, obviamente en los cortes provenientes de ambas cepas de ratones se encontró IR para los antígenos escogidos. Al observar los tejidos procesados directamente es casi imposible detectar diferencias, sin embargo la herramienta de análisis densitométrico permitió hacer una evaluación mas objetiva de la variable densidad de marcaje. Los valores encontrados para un marcador en zonas muy similares entre cepas, fue cercano pero no igual. En general, se encontró un

aumento significativo en la densidad media de IR de los ratones ICR al evaluar los receptores propuestos para VR (NCAM, p75<sup>NTR</sup>, RNACH) y uno de los marcadores que previamente se han usado para clasificar neuronas del GRD (IB4). El marcador NPY se encontró aumentado significativamente en los ratones C57/BL6, mientras que no se encontraron diferencias en la expresión de TrkA y GAL. Como era de esperarse, las diferencias en la expresión de los FI (NF y GFAP) no fueron significativas.

Como se anotó previamente, en el presente trabajo se ha desarrollado una estrategia experimental que tuvo en cuenta aspectos como el diseño de montaje de los cortes seriados con características muy similares entre las cepas, el desarrollo de una técnica de inmunohistoquímica en bloque, el establecimiento concentraciones de anticuerpo apropiadas, la adecuación de tiempos de revelado y obtención de imágenes con condiciones de luz apropiadas y estables, un análisis densitométrico y pruebas estadísticas, que fueron puntos esenciales dentro del proceso experimental, que en cierta manera permiten asegurar, que las diferencias encontradas entre las cepas se deben exclusivamente a diferencias en la concentración del antígeno presente en las muestras, que de otra manera hubieran podido pasar inadvertidas.

Las diferencias pueden explicar también hallazgos previos sobre comportamiento, aprendizaje, memoria, actividad exploratoria, sensibilidad farmacológica y diferencias metabólicas como es el caso de las variaciones encontradas con respecto a NPY y su correlación con acumulación de tejido adiposo.

La técnica desarrollada y estandarizada a su vez, le permitirá al Laboratorio de Neurociencias del INS, usarla en la evaluación de sus hipótesis de trabajo también a nivel central, utilizando esta herramienta económica y sensible, facilitando la interpretación de los resultados encontrados en animales infectados con VR.

## 5. CONCLUSIONES

- La técnica de inmunohistoquímica y el diseño experimental utilizado para este trabajo representa una metodología novedosa que permitió realizar una valoración objetiva de la IR para los nueve marcadores analizados.
- Existen diferencias entre las cepas de ratones ICR y C57BL/6 para los receptores postulados para el VR, la lectina IB4 y NPY que pueden estar asociadas a sus predestinaciones genéticas y a conductas relacionadas con su actividad exploratoria, aprendizaje y memoria.
- La comparación anatómica y de expresión y distribución de marcadores es una técnica sencilla que puede ayudar a la interpretación de los resultados obtenidos en estudios farmacológicos o de comportamiento en estas especies.

## 6. RECOMENDACIONES

- Establecer si hay una correlación de las diferencias de expresión de los receptores postulados para el VR y la susceptibilidad a la infección por VR entre las cepas de ratones C57BL/6 e ICR.
- Corroborar estos resultados con otras técnicas (inmunofluorescencia, ELISA e hibridación *in situ*).
- Adicionar otras cepas de ratones endo y exocriados a este diseño, con el fin de obtener más datos que puedan ayudar a sustentar los hallazgos que aquí se presentan.

## 7. REFERENCIAS

- ANDERSON C., SWANSON R. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*.32:1-14
- ANDRADE L., MACHADO, C. CHIARI, E. PENA S. and MACEDO A. 2002. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Experimental Parasitology*. 100:269-275
- AVGUSTINOVICH, D. ALEKSEENKO, O. and POPOVA N. 1998. The behavior of mice from 6 genotypes in 2 test for anxiety (Abstract). *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I PPavlova* 48:1080-1089.
- BANNER D, D'ARCY J, JANES W, GENTZ R, SCHOENFELD J, BROGER C . 1993. Crystal structure of the soluble human 55kDa TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73:431-445
- BARKER PA, SHOOTER EM. 1994. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> reduces NGF binding to trkA on PC12 cells. *Neuron* 13: 203-215
- BEAL F., MAZUREK M., CHATTHA G., SVENDSEN C., BIRD E. AND MARTIN J.1985. Neuropeptide Y immunoreactivity is reduced in cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 20:282-288.
- BAKER, H. LIU, N. CHUN, H. SAINO, S. BERLIN, R. VOLPE, B AND SON, J. 2001. Phenotypic differentiation during migration of dopaminergic progenitor cells to the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*. 21:8505-8513.
- BENSON, D. SCHNAPP, L. SHAPIRO, L. AND HUNTLEY G. 2000. Making memories stick: Cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biology* 10:473-482
- BOYOD RT, JACOB MH, MCEACHERM AE, CARON S, BERG D. 1990. Nicotinic acetylcholine receptor: RNAm in dorsal root ganglion neurons. *Journal Neurobiology* 22:1-14
- CARTER B, LEWIN G. 1997. Neurotrophins live or let die: does p75<sup>NTR</sup> decide? *Neuron* 18: 187-190
- CASTAÑEDA-CASTELLANOS, D. CASTELLANOS, J. HURTADO, H. 2002. Differential usage of nicotinic receptors by rabies virus according to substrate of virus harvesting. *Journal Neurovirology* 8:150-154

CASTELLANOS J, CASTAÑEDA D, VELANDIA A, HURTADO H. 1997 Partial Inhibition of the in vitro infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons by rabies virus using nicotinic antagonists. *Neuroscience Letters* 216 :198-200.

CASTELLANOS J., GUAYACÁN O., CASTAÑEDA D., HURTADO H. 1998. Uso de una técnica de inmunoperoxidasa para la detección de virus de la rabia en cortes gruesos de cerebro. *Biomédica* 18:141-146.

CASTELLANOS, J., MARTINEZ, M., HURTADO, H., ACOSTA, O. 2000. Nerve growth factor and Neurotrophin-3 modulates the rabies infection of adult sensory neurons in primary cultures. *Brain Research* 871: 120-126

CASTELLANOS. J. E., HURTADO H. 2001. Receptores para virus de la rabia. *Biomédica* 21:389-401.

CASTELLANOS J., BENITO M., RAMÍREZ R. 2001. Receptores nicotínicos neuronales. Universidad Nacional de Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina* 43:155-161.

CHEN Y., FOURNIER A., COUVINEAU A., LABURTHE M., AMIRANOFF B. 1993. Purification of galanin receptor from pig brain. *Proceedings National Academy Society. USA* 90:3845-3849

CRAWLEY J. 1996. Galanin-acetylcholine interactions: relevance to memory and Alzheimer's disease. *Life Science*.58:2185-2199.

CREMER H., CHAZAL G., GORIDIS C, AND REPRESA A. 1997. NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 8:323-335.

CREMER, H., LANGE, A., CHRISTOPH, M., PLOMANN, G., VOPPER, J., ROES, R., BROWN, S., BALDWIN, P., KRAEMER, S., SCHEFF, R. 1994. Inactivation of the NCAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*. 367; 455-459

DECHANT G, BARDE Y. 1997 Signaling through the neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup>. *Current Opinion Neurobiology* 7: 413-418

DELLU, F. CONTARINO A, SIMON H, KOOB F, AND GOLD L 2000. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 73: 31-48

DICKSON G., GOWER H., BARTON H., PRENTICE H., ELSOM S., ROGER M., CHRISTOPHER., PUTT W. 1987. Human muscle neural adhesion molecule (N-

CAM): identification of a muscle-specific sequence in the extracellular domain. *Cell*. 50:1119-1130.

ELIASSON , C. SAHLGREN, C. BERTHOLD, C-H. STAKEBERG, J. CELISI, J. BETSHOLTZ C, ERIKSSON, J. AND PEKNY, M. 1999 Intermediate Filament Protein Partnership in Astrocytes *The Journal of Biological Chemistry* 274: 23996–24006.

FAGAN A., GARBER M., BARBACID M., SILOS-SANTIAGO I., HOLTZMAN D. 1997. A role for TrkA during maturation of striatal and basal forebrain cholinergic neurons *in vivo*. *Journal of Neuroscience*, 17(20):7644-7654.

FRADE JM, RODRIGUEZ-TEBAR A, BARDE Y. 1996. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75<sup>NTR</sup> receptor. *Nature* 383: 166-168

FUCHS E, AND WEBER K. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annuals Review Biochemistry*. 63:345-382.

FUTAMURA Y. 1994. Strain and age-associated in cytokine release from endotoxines-treated mouse monocytes (Abstract). *Jikken Dobutsu* 43:545-549.

GABIUS H., AND GABIUS S. 1997. *Glico-Sciences: Status and perspectives*. Chapman & Hall. Weinheim. Germany. Pp:416-439.

GARCIA DEL MORAL R. 1993 *Laboratorio de anatomía y patología*. Primera edición. interamericana MacGrawl-Hill.

GARCÍA-LÓPEZ M., MARTÍNEZ-MARTOS M., MAYAS M., CARRERA M., RAMÍREZ-ESPÓSITO M. 2002. Fisiología de los neuropéptidos. *Revista Neurológica*, 35:784-793.

GASTKA, M., HORVATH, J. LENTZ, T.1996. Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay. *Journal of Gene Virology*. 2437-2440

GERKE M., PLENDERLEITH M. 2001. Binding sites for the plant lectin *Bandeiraea simplicifolia* I-isolectina B4 are expressed by nociceptive primary sensory neurons. *Brain Research*. 911:101-104.

GOLDMAN D., DENERIS E., LUYTEN W., KOHCHAR A., PATRICK J., AND HEINEMANN S. 1987. Members of nicotinic acetylcholine receptor gene family are expressed in different regions of the mammalian central nervous system. *Cell* 48: 965-973.

GORIDIS C AND BRUNET F., 1992. NCAM: Structural diversity, function and regulation of expression. *Cell Biology*. 3:189-197.

GABRIEL G, BELZUNG C, PERRAULT G, SANGER DJ. 2000. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 148:164-70.

GUERRERO-TARRAGO M., YUSTE V., IGLESIAS M., PEREZ J. AND COMELLA J. 1999. Binding patterns of lectins with GalNAc specificity in the mouse dorsal root ganglia and spinal cord. *Journal of neurocytology*. 28:75-84

GUESDON JL., TERNYNCK T. AND AVRAMEAS S. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and cytochemistry* 27:1131-1139.

GULATI A., ZALEWSKI A., SHARMA D. AND SOHAL G. 1986. A comparison of lectin binding in rat and human peripheral nerve. *Journal of Histochemistry and cytochemistry*. 34(11):1487-1493.

HOFFMAN P., CLEVELAND J., GRIFFIN J., LANDES P., COWAN N., PRICE D. 1987. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proceedings National Academy Society. USA* 84:3472-3476

HÖKFELT T., BROBERGER C., ZHANG X., DIEZ M., KOPP J., XU Z., LANDRY M., BAO L., SCHALLING M., KOISTINAHO J., DEARMOND J., PRUSINER S., GONG J., WALSH J. 1998. Neuropeptide Y: some viewpoints on a multifaceted peptide in the normal and disease nervous system. *Brain Research*. 26:154-166.

HSIEH ST., CRAWFORD T., GRFFIN J. 1994. Neurofilament distribution and organization in the myelinated axons of the peripheral nervous system. *Brain Research*, 642:316-326.

INAGAKI M., GONDA Y., NISHIZAWA K.. 1990. Phosphorilation sites linked to glia filament disassembly *in vitro* locate in a non-alpha-helical head domain. *Journal Biology Chemistry*. 265:4722-4729.

INVITTI C, BRUNANI A, PASQUALINOTTO L, DUBINI A, BENDINELLI P, MARONI P, CAVAGNINI F. 1995. Plasma galanin concentrations in obese, normal weight and anorectic women. *International Journal Obesity Related Metabolism Disorder* 19:347-349

JACKSON, A. YE, H. RIDAURA-SANZ , C. CORELLA-LOPEZ E. 2001. Quantitative study of the infection in brain neurons in human rabies. *Journal Medical Virology* 65:614-618.

JAVOIS C. LORETTE.1994 Immunocytochemical methods and protocols. First edition. Humana press. New Jersey. Totowa. U.S.A.52p

JU G, HOKFELT T, BRODIN E., FAHRENKRUG J., FREY P., *et al* . 1997. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-somatostatin , galanin vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. Cell Tissue Research. 247:417-431.

JU, G. HOKFELT, T. BRODIN, E. FAHRENKRUG, J. FISCHER, J. FREY, P. *et al*. 1987. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gen- related peptide immunoreactivity and their relation to substance P- somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin – immunoreactive ganglion cells. Cells Tissue Research. 247:417-431.

KAPLAN, D., HEMPSTEAD, B., MARTIN-ZANCA, D, CHAO, V., PARADA, L. 1991. The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. Science 252, 554–558.

KARLIN A. 1993. Structure of nicotinic acetylcholine receptors. Current Opinion Neurobiology 3:299-309.

KAWAI K., ISHIZU H. AND KURODA S. 2001. Lectin cytochemistry of rat cerebral and cerebellar neuronal cells. Neuropathology.21:13-18

KNÜSEL B., RABIN S., WIDMER H., HEFTI F., AND KAPLAN D.1992. Neurotrophin-induced *trk* receptor phosphorylation and cholinergic neuron response in primary cultures of embryonic rat brain neurons. NeuroReport. 3:885-888

KOH S, OYLER GA, HIGGINS GA. 1989. Localization of nerve growth factor receptor RNA and protein in adult rat brain. Experimental Neurology 106: 209-221

KRONQVIST P, KUOPIO T, COLLAN Y. 1998. Morphometric grading of invasive ductal breast cancer. I. Thresholds for nuclear grade. Br.J.Cancer 78:800-805

LEEUWEN F. 1986. Pitfalls in immunocytochemistry with special reference to the specificity in the localization of neuropeptides. The American Journal of Anatomy 175:363-377.

LENTZ T. 1991. Structure-function relationships of curaremimetics neurotoxins loop 2 and of a structurally similar segment of rabies virus glycoprotein in their interaction with nicotinic ACh-R. Biochemistry. 30. 10949-10957.

LENTZ, T.L.1990. The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. *Journal Gene Virology* 71: 751-766.

LIEDTKE, W., EDELMAN, W., BIERI, P. L., CHIU, F. C., COWAN, N. J., KUCHERLAPATI,R., AND RAINE, C. S. 1996. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17:607–615

LIU A, PRENGERT M, NORTON D., MEI L., KUSIAK J. 2001. Nerve Growth factor uses RAS/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase cascades to up-regulated the *N*-methyl-D-aspartate receptor 1 promoter. *Journal of Biological Chemistry* 276:45372-45379.

LODISH H., BERK A., LAWRENCE Z., MATSUDAIRA P., BALTIMORED., DARNELL J.1999. *Molecular Cell Biology*. Fourth edition. W.H. Freeman and Company. New York. USA. Pp: 837-838

LODMELL D. AND CHESEBRO B. 1984. Murine resistance to street rabies virus: Genetic analysis by testing second backcross progeny and verification of allelic resistance genes in SJL/J and CBA/J mice. *Journal Virology* 50:359-362.

LODMELL D., AND EWALT L. 1985. Pathogenesis of street rabies virus infections in resistant and susceptible strains of mice. *Journal Virology*. 55:788-795.

LUETJE C., PATRICK J., SEGUELA P. 1990. Nicotine receptors in the mammalian brain. *FASEB Journal* . 4:2753-2760

McPHEE IM, BARKER PA. 1997. Brain derived neurotrophic factor binding to the p75<sup>NTR</sup> neurotrophin receptor reduces trkA signaling while increasing serine phosphorylation in the trkA intracellular domain. *Journal Biology Chemistry* 272: 23547-23551

MESSIHA F., MARTIN M., AND BUCHER K. 1990. Behavioral and genetic interrelationship between locomotor activity and brain biogenic amines (Abstract). *Gene Pharmacology* 21:459-464.

MILLER F., SPEELMAN A., MATHEW T., FABIAN J., CHANG E., POZNIAK C, AND TOMA J. 1994. Nerve growth factor derived from terminals selective increases the ratio of p75 to trkA NGF receptor on mature sympathetic neurons. *Developmental Biology* 161:206-217.

MOLLIVER D., SNIDER W. 1997. Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons. *Journal Comparative Neurology*, 381:428-438.

Mouse Genome Informatics. The Jackson Laboratories database .May20-2003  
(<http://www.informatics.Jax.Org.>)

MUFSON E AND KORDOWER J. 1992. Cortical neurons express nerve growth factor receptor in advanced age and Alzheimer disease. Proceedings National Academy Society. USA 89:569-573.

NABORS L, SONGU-MIZE E, MIZE R. 1988. Quantitative immunocytochemistry using an image analyzer. II. Concentration standards for transmitter immunocytochemistry. Journal Neuroscience. Methods 26:25-34.

NAGAO, M. OKA, N. KAMO, H. AKIGUCHI, I. KIMURA J. 1994. Differential localization of lectin binding sites and neuropéptidos in human dorsal root ganglia. Histochemistry. 102:279-286.

ODD S, BAUWENS A, NAUWELAERS A .1997 Multiparameter absorption measurements in automated microscopy. Simultaneous quantitative determination of DNA and nuclear antigen. Acta Cytology. 41:188-196

PAXINOS G AND WATSON C.1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. INC. London.

PEKONY M, STANNESS KA, ELIASSON C, BETSHOLTZ C, JANIGRO D. 1998. Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. Glia 22:390-400.

PÉREZ R. 1999. Descripción ultraestructural de la infección por virus de rabia en cultivos de neuronas sensoriales de ratón adulto. Maestría en biología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Programa de postgrado. Bogotá. Pp:48-53

PÉREZ, S WYNCK, D STEINER, R. AND MUFSON E. 2001. Distribution of galaninergic immunoreactivity in the brain of the mouse. Journal of Comparative Neurology 434:158-185.

PIORO E., CUELLO C. 1990. Distribution of nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the adult rat central nervous system. Effect of colchicine and correlation with the cholinergic system-I forebrain. International Brain research Organization 34:57-87.

RADEKE MJ, MISKO T, HSU C, HERZENBERG LA, SHOOTER E. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor: a new class of receptors. Nature 325: 593-597

RAFUSE V., POLO-PARADA L, AND LANDMESSER L. 2000. Structural and functional alterations of neuromuscular junctions in NCAM- deficient mice. *Journal of Neuroscience*. 20:6529-6539.

RESSLER KJ, PASCHALL G, ZHOU XL, DAVIS M. 2002. Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *Journal Neuroscience* 22:7892-902

ROSS S, WONG Y., CLIFFORD J., KINSELLA A., MASSALAS J., HORNE M., SCHEFFER I., KOLA I., WADDINGTON J., BERKOVIC S., AND DRAGO J. 2000. Phenotypic Characterization of an  $\alpha 4$  Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Knock-Out Mouse. *Journal Neuroscience* 20:6431–6441.

ROUX P., COLICOS M., KENNEDY E. 1999. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *Journal Neuroscience* 19: 6887-6896.

RYAN T. 2001. NCAM and vesicles cycling: the importance of good glue in the long run. *Neuron*, 32:759-765.

SALAZAR P. SÁNCHEZ QUINTERO. 1998. Lectin binding patterns in the vomeronasal organ and accessory olfactory bulb of the rat. *Anatomical Embryology*. 198:331–339

SANCHEZ, C. ESPAÑA A. 1997. Papel de los neuropéptidos en la dermatología. *Revista Neurológica*. 25:s222-231

SANTONI M., BARTHELS D., VOPPER G., BONED A., GORIDIS C., WILLE W. 1989. Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least 8 types of NCAM cDNA in mouse brain. *European Molecular Biology Organization Journal* 8:385-392.

SEGAL-LIEBERMAN, TROMBLY D, JUTHANI V, WANG X, MARATOS-FLIER E. 2003. NPY ablation in C57BL/6 mice leads to mild obesity and to an impaired refeeding response to fasting. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism*. 284:1131-1139.

SEIDAH AND CHRETIEN. 1999. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Research*. 848:45-62.

SHADIACK A., ZIGMOND. 2001. Nerve Growth factor antiserum induces axotomy-like changes in neuropeptide expression in intact sympathetic and sensory neurons. *Journal of Neuroscience*. 21:363-371.

SMEYNE R., KLEIN R., SCHNAPP A., LONG L., BRYANT. S., LEWIN A., LIRA S., AND BARBACID M. 1994. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 368:246-251

SMITH, C. AND LUSKIN M. 1998. Cells cycle length of olfactory bulb neuronal progenitor in de rostral migratory stream. *Developmental Dynamics* 213:220-227.

STANLEY B. AND LEIBOWITZ S. 1985. Neuropeptide Y Injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proceedings National Academy Society*. 82:3940-3943.

TAKEMURA M, NISHIYAMA H., AND ITOHARA S. 2002. Distribution of phosphorylated glial fibrillary acidic protein in mouse central nervous system. *Genes to cells*. 7:295-307.

TAKENOYA F., FUNAHASHI H., MATSUMOTO H., OHTAKI T., KATOH S., KAGEYAMA H., SUSUKI R., TAKEUCHI M., SHIODA S. 2002. Galanin-like peptide is co-localized with  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone but not with neuropeptide Y in the rat brain. *Neuroscience Letter*, 331:119-122.

TATEMOTO K. 1982. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proceedings National Academy Society*. USA 79:5485-5489.

TATEMOTO, K RÖKAEUS A., JÖRNVALL H., MACDONALD T., MUTT V. 1983. Galanin a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Letter*, 164:124-128.

THOULOUBE, M., LAFAGE, M., \_SCHACHNER, M., HARTMANN, U., CREMER, H., LAFON, M.1998. The neural cell adhesion Molecule is a receptor for rabies virus. *Journal Virology* 72: 7181-7190.

TSUDA M., TASHIRO T AND KOMIYA Y. 2000 Selective Solubilization of high-molecular- mass neurofilament subunit during nerve regeneration. *Journal of Neurochemistry* 74:860-868.

TUFFEREAU C., DESMEZIERES E., BENEJEAN J., JALLET C., FLAMNANDA. 2001. Interaction of lissaviruses with the low-affinity nerve-growth factor receptor p75<sup>NTR</sup>. *Journal of General Virology* 82:2861-2867.

TUFFEREAU, C., BÉNÉJEAN, J., BLONDEL, D., KIEFFER, B., FLAMAND, 1998. A Low-affinity nerve growth factor receptor (p75<sup>NTR</sup>) can serve as a receptor for rabies virus. *European Molecular Biology Organization Journal*. 17: 7250-7259.

WEILAND F., COX J., MEYER S., DAHME E., REDDEHASE M. 1992. Rabies virus neuritic paralysis: immunopathogenesis of nonfatal paralytic rabies. *Journal Virology* 66:5096-5099.

WEIZMAN R., PAZ L., BACKER M., AMIRI Z., MODAI I., PICK C. 1999. Mouse strain differ in their sensitivity to alprazolam effect in the staircase test. *Brain Research*. 839:58-65.

WINDISCH, J.M., MARKSTEINER, R., LANG, M.E., AUER, B., SCHNEIDER, R. 1995. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 bind to a single leucine-rich motif of TrkB. *Biochemistry* 34:11256–11263.

YAMADA K, SATOH M., TOKOI J., TSUBOI M, NAGASAKA T. 1992. Strain differences of mice in learning of swimming behavior and effect of hemicholinium and vasopressin. Observation by a simple water maze apparatus (Abstract). *Yakugaku Zasshi*. 122:824-831.

ZIOTOPOULOU M, MANTZOROS CS, HILEMAN SM, FLIER JS. 2000. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism* 279:838-845.

## ANEXO 1

### PROMEDIOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR ZONA

NF					
ZONA	C57			ICR	
A	PROMEDIO	31,29		PROMEDIO	32,98
	DESV EST	2,54		DESV EST	3,63
	EEM	0,57		EEM	0,81
	PRUEBA t		0,01		
B	PROMEDIO	38,86		PROMEDIO	36,94
	DESV EST	6,32		DESV EST	6,04
	EEM	1,41		EEM	1,35
	PRUEBA t		0,04		
C	PROMEDIO	45,77		PROMEDIO	47,85
	DESV EST	8,08		DESV EST	10,69
	EEM	1,81		EEM	2,39
	PRUEBA t		0,19		

GFAP					
ZONA	C57			ICR	
A	PROMEDIO	27,15		PROMEDIO	28,09
	DESV EST	3,05		DESV EST	1,69
	EEM	0,68		EEM	0,38
	PRUEBA t		0,05		
B	PROMEDIO	32,44		PROMEDIO	33,35
	DESV EST	5,22		DESV EST	3,86
	EEM	1,17		EEM	0,86
	PRUEBA t		0,11		
C	PROMEDIO	33,25		PROMEDIO	34,91
	DESV EST	3,12		DESV EST	2,97
	EEM	0,70		EEM	0,67
	PRUEBA t		0,00		

---

<b>NCAM</b>				
<b>ZONA</b>	<b>C57</b>			<b>ICR</b>
A	PROMEDIO	24,16		PROMEDIO 23,27
	DESV EST	2,90		DESV EST 1,96
	EEM	0,65		EEM 0,44
	PRUEBA t		0,06	
B	PROMEDIO	23,08		PROMEDIO 24,06
	DESV EST	2,59		DESV EST 1,63
	EEM	0,58		EEM 0,36
	PRUEBA t		0,00	
C	PROMEDIO	26,40		PROMEDIO 28,04
	DESV EST	2,78		DESV EST 2,62
	EEM	0,62		EEM 0,59
	PRUEBA t		0,00	

---



---

<b>ALFA-4</b>				
<b>ZONA</b>	<b>C57</b>			<b>ICR</b>
A	PROMEDIO	22,49		PROMEDIO 23,70
	DESV EST	3,69		DESV EST 3,80
	EEM	0,82		EEM 0,85
	PRUEBA t		0,08	
B	PROMEDIO	21,24		PROMEDIO 24,21
	DESV EST	1,57		DESV EST 4,56
	EEM	0,35		EEM 1,02
	PRUEBA t		8E-08	
C	PROMEDIO	23,70		PROMEDIO 26,29
	DESV EST	2,27		DESV EST 3,91
	EEM	0,51		EEM 0,87
	PRUEBA t		7E-05	

---

---

<b>p75</b>				
<b>ZONA</b>	<b>C57</b>			<b>ICR</b>
A	PROMEDIO	26,38		PROMEDIO 26,00
	DESV EST	3,83		DESV EST 1,72
	EEM	0,86		EEM 0,38
	PRUEBA t		0,31	
B	PROMEDIO	23,84		PROMEDIO 26,34
	DESV EST	3,92		DESV EST 3,00
	EEM	0,88		EEM 0,67
	PRUEBA t		7E-05	
C	PROMEDIO	27,65		PROMEDIO 31,40
	DESV EST	3,73		DESV EST 2,84
	EEM	0,83		EEM 0,63
	PRUEBA t		4E-06	

---



---

<b>TrkA</b>				
<b>ZONA</b>	<b>C57</b>			<b>ICR</b>
A	PROMEDIO	25,70		PROMEDIO 25,16
	DESV EST	3,14		DESV EST 3,80
	EEM	0,70		EEM 0,85
	PRUEBA t		0,24	
B	PROMEDIO	27,13		PROMEDIO 27,74
	DESV EST	3,89		DESV EST 4,08
	EEM	0,87		EEM 0,91
	PRUEBA t		0,17	
C	PROMEDIO	29,18		PROMEDIO 28,41
	DESV EST	2,90		DESV EST 2,91
	EEM	0,65		EEM 0,65
	PRUEBA t		0,10	

---

<b>IB4</b>				
<b>ZONA</b>	<b>C57</b>		<b>ICR</b>	
A	PROMEDIO	32,38	PROMEDIO	32,82
	DESV EST	4,02	DESV EST	4,23
	EEM	0,90	EEM	0,95
	PRUEVA t		0,32	
B	PROMEDIO	32,44	PROMEDIO	33,35
	DESV EST	5,224	DESV EST	3,86
	EEM	1,168	EEM	0,86
	PRUEVA t		0,11	
C	PROMEDIO	33,25	PROMEDIO	34,91
	DESV EST	3,12	DESV EST	2,97
	EEM	0,70	EEM	0,67
	PRUEVA t		0,00	

<b>PY</b>				
<b>ZONA</b>	<b>C57</b>		<b>ICR</b>	
A	PROMEDIO	31,90	PROMEDIO	31,89
	DESV EST	3,76	DESV EST	3,21
	EEM	0,84	EEM	0,72
	PRUEBA t		0,50	
B	PROMEDIO	36,24	PROMEDIO	32,57
	DESV EST	6,24	DESV EST	4,54
	EEM	1,40	EEM	1,02
	PRUEBA t		3E-05	
C	PROMEDIO	38,47	PROMEDIO	37,77
	DESV EST	4,04	DESV EST	3,50
	EEM	0,90	EEM	0,78
	PRUEBA t		0,19	

		<b>GAL</b>			
<b>ZONA</b>	<b>C57</b>			<b>ICR</b>	
A	PROMEDIO	28,63		PROMEDIO	29,47
	DESV EST	2,61		DESV EST	2,00
	EEM	0,58		EEM	0,45
	PRUEBA t		0,06		
B	PROMEDIO	30,69		PROMEDIO	29,59
	DESV EST	4,43		DESV EST	3,99
	EEM	0,99		EEM	0,89
	PRUEBA t		0,05		
C	PROMEDIO	32,34		PROMEDIO	32,41
	DESV EST	3,55		DESV EST	4,06
	EEM	0,79		EEM	0,91
	PRUEBA t		0,46		

## ANEXO 2

### PROMEDIOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS DATOS TOTALES OBTENIDOS PARA CADA MARCADOR

NF		
	C57	ICR
<b>PROMEDIO</b>	38,31	38,08
<b>DESV EST</b>	8,08	8,58
<b>EEM</b>	0,69	0,74

GFAP		
	C57	ICR
<b>Promedio</b>	30,57	30,85
<b>DESV EST</b>	4,74	4,82
<b>EEM</b>	0,38	0,38

NCAM		
	C57	ICR
<b>PROMEDIO</b>	24,29	25,02
<b>DESV EST</b>	3,05	2,82
<b>EEM</b>	0,24	0,22

ALFA-4		
	C57	ICR
<b>PROMEDIO</b>	22,25	24,69
<b>DESV EST</b>	2,63	4,31
<b>EEM</b>	0,20	0,33

p75		
	C57	ICR
<b>PROMEDIO</b>	25,49	27,64
<b>DESV EST</b>	4,08	3,50
<b>EEM</b>	0,36	0,30

TrkA		
	C57	ICR
<b>PROMEDIO</b>	27,38	27,31
<b>DESV EST</b>	3,67	3,90
<b>EEM</b>	0,28	0,30

IB4		
	C57	ICR
<b>PROMEDIO</b>	32,65	33,67
<b>DESV EST</b>	4,44	3,79
<b>EEM</b>	0,35	0,29

GAL		
	C57	ICR
<b>PROMEDIO</b>	30,69	30,38
<b>DESV EST</b>	4,16	3,75
<b>EEM</b>	0,31	0,28

NPY		
	C57	ICR
<b>PROMEDIO</b>	35,78	33,89
<b>DESV EST</b>	5,66	4,65
<b>EEM</b>	0,44	0,37