

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



**“ESTUDIO DE LA NEUROGLOBINA EN EL SISTEMA NERVIOSO  
PERIFÉRICO”**

**PROTOCOLO DE TESIS**

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO CIRUJANO

**PRESENTA:**

YESSICA PATRICIA FILORIO CAMPOS

**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. EN C. ALEJANDRO MARTÍNEZ GÓMEZ  
DRA. EN C. PATRICIA VIEYRA REYES

**CO-TUTORES:**

DRA. EN C. MYRNA  
ALEXANDRA R. DENT

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, 2020

**TÍTULO**  
**“ESTUDIO DE LA NEUROGLOBINA EN EL SISTEMA NERVIOSO**  
**PERIFÉRICO”**

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN.....</b>                                      | <b>4</b>  |
| <b>MARCO TEÓRICO.....</b>                                | <b>5</b>  |
| <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>                   | <b>14</b> |
| <b>JUSTIFICACIÓN.....</b>                                | <b>15</b> |
| <b>PREGUNTAS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....</b>      | <b>16</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                                    | <b>16</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                         | <b>16</b> |
| <b>Diseño del protocolo de investigación.....</b>        | <b>16</b> |
| <b>Operacionalización de las variables.....</b>          | <b>17</b> |
| <b>Universo y muestra.....</b>                           | <b>17</b> |
| <b>Lugar y tiempo.....</b>                               | <b>18</b> |
| <b>Protocolo experimental.....</b>                       | <b>18</b> |
| <b>1. Animales experimentales.....</b>                   | <b>18</b> |
| <b>2. Muestra.....</b>                                   | <b>18</b> |
| <b>3. Extracción del nervio ciático.....</b>             | <b>18</b> |
| <b>4. Preparación de laminillas.....</b>                 | <b>18</b> |
| <b>5. Extensión del tejido.....</b>                      | <b>19</b> |
| <b>6. Condiciones del protocolo.....</b>                 | <b>19</b> |
| <b>7. Protocolo para Inmunofluorescencia simple.....</b> | <b>19</b> |
| <b>8. Protocolo para Inmunofluorescencia doble.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>9. Obtención y análisis de microfotografías.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>10. Soluciones.....</b>                               | <b>21</b> |
| <b>11. Materiales.....</b>                               | <b>22</b> |
| <b>IMPLICACIONES ÉTICAS.....</b>                         | <b>22</b> |
| <b>PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO.....</b>                 | <b>22</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                   | <b>23</b> |

## RESUMEN

El sistema nervioso en los mamíferos es el tejido conformado principalmente por neuronas y células gliales, responsable de la recepción, integración, coordinación y respuesta a señales sensoriales provenientes del mundo exterior y del propio organismo por medio de impulsos nerviosos. Este sistema está dividido anatómicamente en sistema nervioso central y periférico (Kandel & Jessell, 2012). En los últimos años la ampliación del conocimiento acerca de las funciones e interacciones de las células gliales ha hecho que nuestro conocimiento del funcionamiento del sistema nervioso sea replanteado (Armati, 2007).

Con respecto a las células gliales del sistema nervioso periférico: las células de Schwann, hoy en día sabemos que son componente vital del microambiente de los nervios periféricos en donde cumplen funciones específicas como intervenir en la comunicación entre la sangre y las fibras nerviosas, además de brindar soporte trófico y estructural a los axones neuronales jugando un papel importante en la integridad y homeostasis de los nervios (Mizisin, 2014). Existen dos principales tipos de células de Schwann en los nervios, las células de Schwann que forman mielina y las células de Schwann que no forman mielina, cada una de ellas cumple funciones específicas acorde con las interacciones moleculares que forman con los axones (Armati, 2007).

Por otro lado, la Neuroglobina, es una proteína que en el sistema nervioso central por medio de estudios experimentales se ha encontrado localización en neuronas y astrocitos (células gliales) y se le han sido atribuidas propiedades neuroprotectoras especialmente bajo condiciones hipóxicas, además de inhibición apoptótica y eliminación de especies reactivas de oxígeno, sin embargo, en el sistema nervioso periférico no ha sido estudiada (Cabezas et al., 2018).

De esta manera la realización del presente protocolo tiene la finalidad de estudiar la inmunolocalización de la Neuroglobina en el nervio ciático de la rata, un tejido del sistema nervioso periférico, para contribuir al conocimiento científico de esta proteína caracterizando su localización celular y subcelular, de esta manera proponer sus posibles funciones fisiológicas en el sistema nervioso periférico.

## MARCO TEÓRICO

### **Sistema Nervioso**

El sistema nervioso (SN) es el tejido responsable de la recepción, integración, coordinación y respuesta a diversas señales sensoriales provenientes de un organismo y del mundo exterior, a su vez controla, regula y coordina muchos otros mecanismos y sistemas dentro de un ser vivo para preservar su homeóstasis; además de ser el medio de comunicación con otros organismos (Eric R. Kandel & Thomas M. Jessell, 2012).

En los vertebrados el SN se clasifica anatómicamente en sistema nervioso central (SNC) constituido por encéfalo y la médula espinal; y sistema nervioso periférico (SNP) constituido por los nervios y ganglios fuera de las estructuras que componen el SNC (Eric R. Kandel & Thomas M. Jessell, 2012).

Cabe destacar que el SN esta conformado por tejido nervioso, el cual a su vez esta constituido por neuronas y células de la glía (Welsch & Sobotta, 2008). Las neuronas se reconocen como los elementos celulares responsables del procesamiento de información del SN debido a una de sus propiedades fundamentales, la excitabilidad eléctrica, la cual les permite llevar a cabo el potencial de acción (Eric R. Kandel & Thomas M. Jessell, 2012).

Por su parte las células gliales son células diferentes a las neuronas, pero estrechamente relacionadas con ellas, las cuales cumplen una gran variedad de funciones específicas en el SN para preservar su homeostasis, entre las cuales podemos considerar la de formar mielina, proveer soporte, protección, sustratos metabólicos y aislar a las neuronas; además de que juegan un papel muy importante en la neurotransmisión, sinapsis, entre otras (Schirmeier, Matzat, & Klämbt, 2016).

### **Sistema Nervioso Periférico.**

El SNP de los mamíferos adultos, esta conformado por una extensa red nerviosa, que conecta a los múltiples órganos y sistemas miembros de un organismo a través de ganglios y nervios con el SNC. Los ganglios son principalmente agrupaciones

de somas de neuronas sensoriales situados fuera del SNC que sirven como puntos de conexión entre el SNC y el SNP (Hall, 2016).

### **Nervios Periféricos**

Por su parte los nervios periféricos son prolongaciones axonales acompañados de células gliales, rodeados a su vez de varias cubiertas de tejido conjuntivo constituidas mayormente por fibroblastos, vasos sanguíneos y tejido adiposo, embebidos en una matriz extracelular rica en colágeno, formando fascículos nerviosos, la agrupación de múltiples fascículos genera un nervio periférico (Kandel et al., 2012).

Los nervios periféricos, están conformados por axones mielinizados y no mielinizados de distintos diámetros, estos axones poseen a su vez cubiertas de tejido conjuntivo de organización jerárquica (Fig. 1) que se conocen como, el epineuro, que es la capa más externa de matriz extracelular que recubre todo el nervio, está conformada por un tejido irregular abundante en colágeno, contiene vasos linfáticos y sanguíneos. El perineuro que es la capa intermedia que rodea a los fascículos de fibras nerviosas, cada fascículo puede tener desde 10 hasta algunos centenares de axones, esta capa contiene múltiples anastomosis capilares y es una extensión de la aracnoides y el endoneuro que es la capa más interna de matriz extracelular contigua a la lámina basal de las células de Schwann que rodea cada fibra nerviosa individualmente, sobre el transcurre una red de capilares (Eric R. Kandel & Thomas M. Jessell, 2012; Smith, 2006).

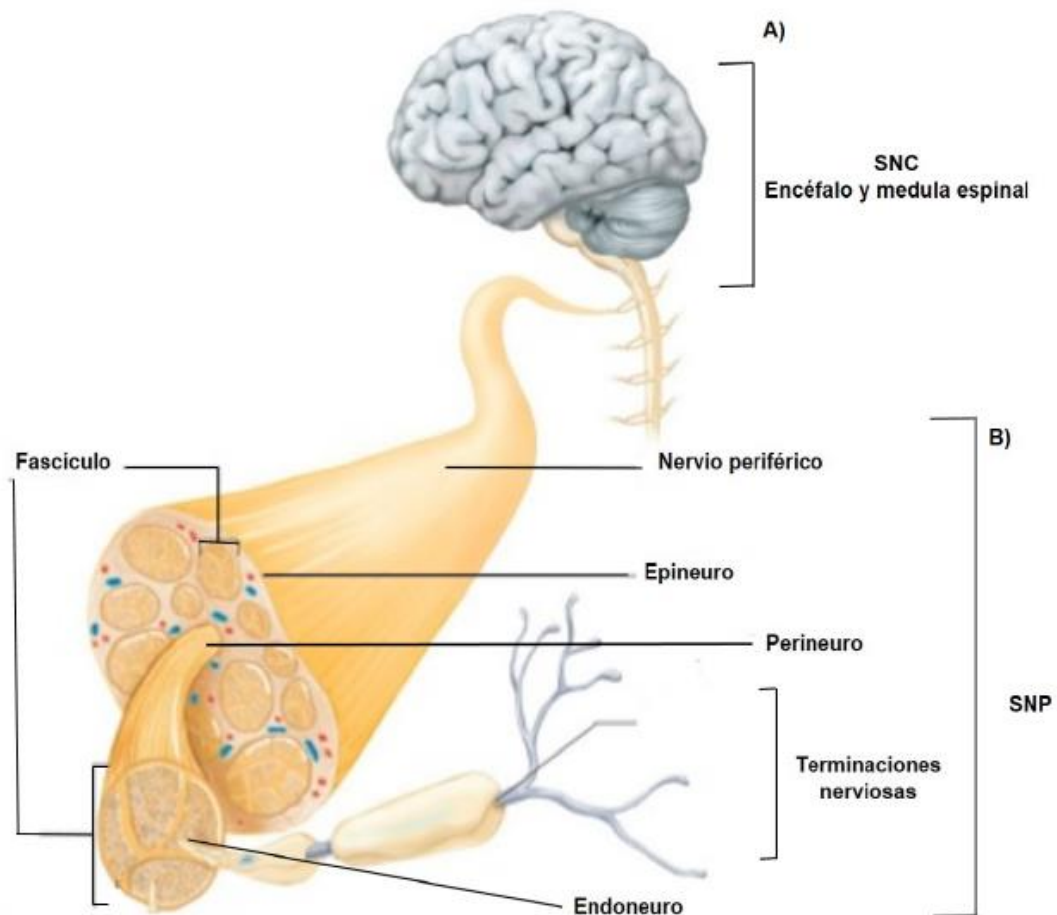


Figura 1. Anatomía esquemática del sistema nervioso del humano. A) En los vertebrados el SNC se encuentra protegido por el cráneo y la columna vertebral que albergan el encéfalo y la médula espinal respectivamente. B) Los nervios que se extienden desde las raíces de la médula espinal conforman el SNP. Cada nervio se encuentra constituido por múltiples fascículos que albergan una gran cantidad de axones rodeados de tejido conjuntivo de organización jerárquica: epineuro, perineuro y endoneuro. (Imagen tomada de (Flores Miranda, 2017)).

### Irrigación del nervio periférico

La forma en que las estructuras vasculares aseguran la entrada de  $O_2$  y nutrientes a las CS y los axones que conforman los nervios periféricos, es mediante vasos sanguíneos conocidos como *vasa nervorum*, los cuales transcurren longitudinalmente sobre el epineuro, penetrando a distintos niveles y formando una red de anastomosis entre arteriolas y vénulas (Smith, 2006); que llegan al perineuro y avanzan de manera paralela a las fibras nerviosas sobre el endoneuro; destacando que los vasos con características capilares que transcurren sobre el endoneuro son conocidos como *vasa vasorum* y tienen la característica de estar

conectados entre si a través de vasos comunicantes transversos cortos para así garantizar una adecuada irrigación de cada fibra y células acompañantes (Rohkamm, 2004).

Podemos señalar que tanto la *vasa nervorum* como la *vasa vasorum*, son susceptibles a la compresión mecánica externa (Moore, Dalley, & Agur, 2013), teniendo una importante repercusión en el desarrollo de diferentes neuropatías como las presentadas en la neuropatía diabética y las arteritis (Imboden, Hellmann, & Stone, 2013). Por otra parte, en tratamientos de tipo diagnóstico invasivos así como en tratamientos terapéuticos, el uso de vasoconstrictores muy cercana a los nervios periféricos puede reducir el flujo sanguíneo a los vasos y de esta forma inducir daño neural isquémico (Chelly, 2009).

De modo similar en la vasculitis necrotizante, especialmente la que se observa en la poliarteritis nodosa (PAN), se afecta a las arterias del epineuro induciendo isquemia nerviosa ante la oclusión la *vasa nervorum*. Por su parte el grupo de las arteritis necrotizantes se asocian también a lesiones vasculares con implicaciones nerviosas sintomáticas y asintomáticas que pueden ocurrir de manera secundaria a infección, malignidad y neuropatía diabética focal (Said, 1997).

### **La glía del SNP**

Con respecto a las células gliales, antiguamente se consideraba que tenían únicamente un papel de pegamento en el SN, y actuaban como espectadores pasivos, es decir, como asistentes de soporte estructural, trófico y metabólico de las neuronas. No obstante, durante los últimos años el conocimiento del funcionamiento de las células gliales las ha hecho emerger de las sombras y las ha convertido en un paradigma contemporáneo de comunicación celular que nos permite replantearnos la integración del funcionamiento del SN (Armati, 2007; Jessen & Mirsky, 2005).

Existen dos principales tipos de células gliales en los nervios periféricos, las células de Schwann que forman mielina (CSFM) y las células de Schwann que no forman mielina (CSNFM), ambos tipos tienen su origen ontogénico en tejido ectodérmico derivado de la cresta neural (Jessen & Mirsky, 2005) y comparten la propiedad de



dar soporte trófico, metabólico, además de envolver a los axones motores y sensitivos en el SNP (Armati, 2007; Schirmeier et al., 2016).

Las CS son un componente vital del microambiente dentro del endoneuro de los nervios periféricos. Así mismo intervienen en la relación de la comunicación entre la sangre y los axones, además de brindar soporte trófico durante el desarrollo, la edad adulta y la lesión a los axones, indicando que estas células están ampliamente involucradas en la conservación de la integridad estructural y adecuada funcionalidad de los nervios (Mizisin, 2014).

### Las CSFM

Las CSFM (Fig. 2) y los axones que mielinizan, forman interacciones con los axones para generar una polarización longitudinal y una polarización radial, con funciones, morfología y estructuras propias. Esta organización es una característica emergente derivada de la interacción entre complejos moleculares de adhesión celular y de unión a matriz extracelular, los cuales son cruciales para la conducción rápida del impulso nervioso (Salzer, 2003a).

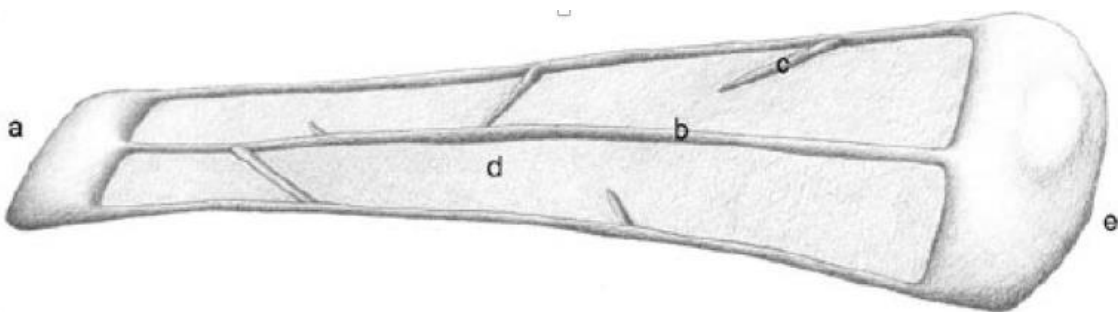


Figura 2. Representación de una CSFM desarrollada (a) membrana adaxonal, (b) incisuras de Schmidt-Lanterman (c) procesos transversos de las incisuras de Schmidt-Lanterman (d) regiones de mielina compacta, (e) membrana abaxonal, la cual esta envuelta por la lámina basal secretada por las CS (Imagen tomada de Armati, 2007).

Con respecto a la formación de mielina, esta se lleva a cabo mediante giros en espiral de membrana especializada de las CSFM sobre el axón, que pueden ser de hasta 100 giros, cabe destacar que un solo axón de largo como los presentes en el nervio ciático puede llegar a tener hasta 100,000 CSFM (Armati, 2007; Salzer, 2003).

La polaridad longitudinal de las CSFM establece regiones anatómicas especializadas como son, las incisuras de Schmidt-Lanterman (que son canales de citoplasma) presentes mayoritariamente a lo largo de la mielina compacta de la CSFM y por otra parte, el los nodos de Ranvier, que son los sitios donde se interrumpe la mielina debido a la terminación de las CSFM que se encuentran situadas de manera contigua. El nodo de Ranvier se subdivide en tres principales regiones, la región nodal, la región paranodal y la región juxtapanodal (Arancibia-Carcamo & Attwell, 2014), esta arquitectura anatómica puede ser observada con mayor detenimiento en la (Fig. 3).

La región nodal propiamente dicha expresa una gran cantidad de canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje cuya función principal es la despolarización de la fibra nerviosa permitiendo la conducción saltatoria del impulso nervioso, esta región además está cubierta por las micovellosidades de las CSFM (Poliak & Peles, 2003; Salzer, 2003). En la región paranodal es en donde se ubican las asas paranodales; en esta región la membrana axonal es rica en moléculas de adhesión como Caspr y Contactina, su finalidad es anclar moléculas y proteínas del axón con la membrana adaxonal de la CS (Poliak & Peles, 2003), la principal función de esta región es el fijar la vaina de mielina al axón, aislar la actividad eléctrica del nodo y actuar como barrera que limita la difusión lateral de proteínas expresadas en el nodo (Fehmi, Scherer, Willison, & Rinaldi, 2018; Flores Miranda, 2017). La región juxtapanodal se ubica debajo de la mielina compacta adyacente a la región paranodal, es particularmente rica en canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje, estos canales actúan como amortiguador de la reentrada del potencial de acción, restableciendo el potencial de acción transmembrana después de la conducción del impulso nervioso (Fehmi et al., 2018; Flores Miranda, 2017; Poliak & Peles, 2003).

Una de las principales funciones de las CSFM consiste en formar una capa aislante sobre el axón, lo que permite la propagación saltatoria del impulso nervioso a lo largo del axón, de nodo de Ranvier a nodo de Ranvier, que llega a ser de 120 m/s aproximadamente; mientras que en un axón no mielinizado es significativamente lenta (10 m/s), por lo tanto en un axón mielinizado la conducción del impulso

nervioso es más rápida y por otra parte, consume una menor cantidad de energía (Armati, 2007; Salzer, 2003).

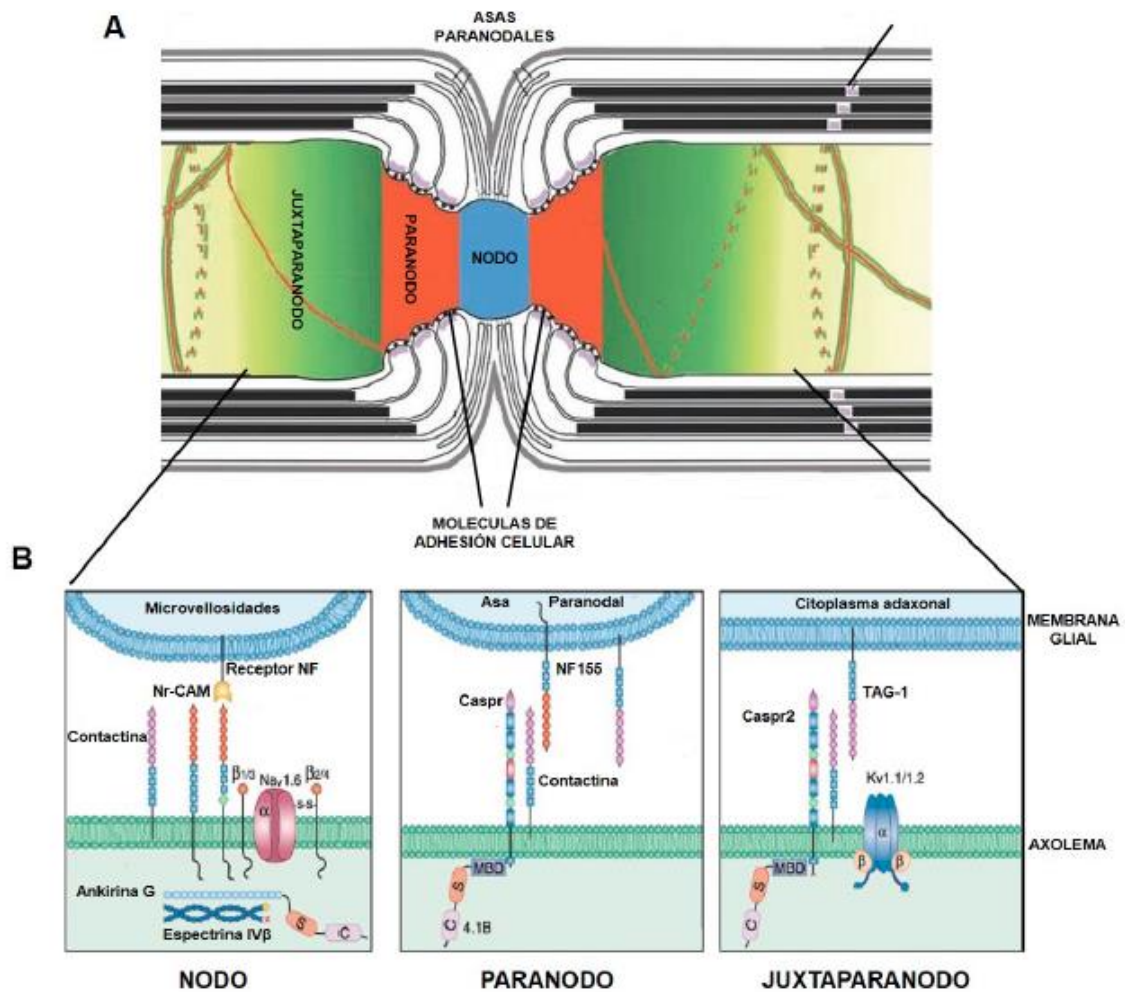


Figura 3. El aparato nodal de mamífero. A) Polaridad longitudinal y organización en regiones del aparato nodal. B) Interacciones moleculares de los dominios celulares. Existen tres regiones con características morfológicas y funcionales propias; el nodo de Ranvier (azul) enriquecido en canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje, así como ankirina G y espectrina IV $\beta$ . El paranodo (rojo) donde se ubican las asas paranodales con abundantes moléculas de adhesión celular como contactina, Caspr y NF155 que participan en la formación de las llamadas uniones septadas axo-gliales. El juxtapanodo (verde) donde se localizan abundantes canales de potasio dependientes de voltaje. Se muestran además las incisuras de Schmidt Lanterman, canales de citoplasma que interrumpen la mielina compacta, abundantes en la región internodal (amarillo). Representación esquemática mostrando los diferentes dominios axonales del nodo de Ranvier. (Imagen tomada de (Flores Miranda, 2017)).

## CSNFM

Por su lado las CSNFM (Fig. 4) conforman lo que se conoce como los haces de Remark, los cuales consisten en una sola CSNFM que agrupa de 1 a más de 10 axones no mielinizados de diámetro pequeño que por lo regular son fibras tipo C originadas de los ganglios sensoriales o axones del sistema nervioso simpático (Armati, 2007).

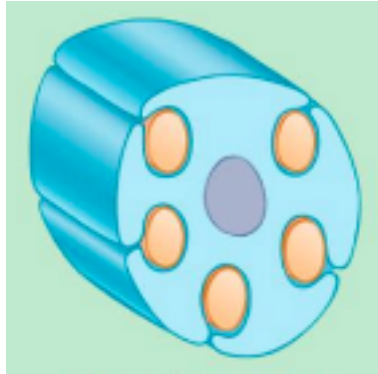


Figura 4. Representación de una célula de Schwann (en color azul) que no forma mielina cubriendo con una delgada capa de citoplasma a 5 axones  $<1\mu\text{m}$  de diámetro (en color amarillo). Núcleo de las CSNFM (en color morado). (Imagen adaptada de (Salzer, 2008).

Cabe destacar que las CSFM y las CSNFM pueden ser diferenciadas entre si en una muestra de tejido, mediante inmunohistoquímica haciendo uso de anticuerpos contra proteínas que son utilizadas como marcadores específicos para cada tipo de célula e incluso de regiones subcelulares concretas, como es el ejemplo de la Fluoromielina que como su nombre lo dice es un marcador específico para mielina marcando únicamente a las CSFM, otro marcador específico es la proteína fibrilar glial ácida (GFAP) que se utiliza para identificar de manera específica a las CSNFM (Smith, 2006).

## Neuroglobina

Por otra parte, en el año 2000 fue descubierta una nueva proteína perteneciente al grupo de las globinas, la neuroglobina (Ngb) que fue nombrada así debido a su localización abundante en el SNC, es una proteína de 151 aminoácidos, peso molecular de 17 kDa, de la cual han sido descritos varios ortólogos en diferentes especies de vertebrados (Burmester, Weich, Reinhardt, & Hankeln, 2000). La Ngb

de manera similar a otras globinas como son la hemoglobina (Hb), la mioglobina (Mb) y la citoglobina (Cygb), contiene un grupo hemo el cual le permite unir oxígeno (O<sub>2</sub>). Los dos miembros de la familia de las globinas más estudiados son la Hb, la cual se encuentra en los eritrocitos, encargados de transportar el O<sub>2</sub> de los pulmones a todos los tejidos del cuerpo y la Mb, la cual tiene la capacidad de almacenar O<sub>2</sub> en las células musculares (Brunori & Vallone, 2007; Burmester & Hankeln, 2014).

A la Ngb se le han atribuido diferentes funciones, debido a que no se ha encontrado un desempeño fisiológico concreto en las células, algunas de estas funciones tienen que ver con el suministro de O<sub>2</sub> a la célula, en este contexto la Ngb fortalece la viabilidad celular cuando se encuentra en condiciones de hipoxia; por otro lado, estudios *in vitro* muestran que la Ngb puede estar involucrada en la desintoxicación de especies reactivas de O<sub>2</sub> así como de óxido nítrico y algunos otros estudios muestran que la Ngb puede estar relacionada con la inhibición de la apoptosis, entre otras funciones que se han descrito (Ascenzi, Gustincich, & Marino, 2014a; Fiocchetti et al., 2016).

En roedores a nivel de RNAm mediante hibridación *in situ* (ISH), la Ngb es principalmente expresada en neuronas del SNC así como en tejidos neuroendocrinos (Reuss et al., 2002), también se ha descrito un nivel de expresión muy alto en la retina (Schmidt et al., 2003). A nivel de proteína la Ngb tiene una localización muy similar a la encontrada en la ISH, sin embargo, a nivel subcelular la Ngb se ha encontrado en el citoplasma, en la mitocondria y en los núcleos neuronales (Hankeln et al., 2004; Hundahl et al., 2010). De esta manera, la localización subcelular de la Ngb sugiere posibilidades más específicas para su función.

El estudio de la localización de la Ngb en el SNP, ha sido poco investigada (Reuss et al., 2002), motivo por el cual hemos decidido estudiar la distribución anatómica y subcelular en el nervio ciático de la rata, un tejido del SNP. La Ngb es una proteína que además de ser descrita en las neuronas del SNC, también presenta distribución en una de las células gliales características del SNC, los astrocitos. La función de la Ngb en los astrocitos de igual manera que en las neuronas, es hasta el momento

desconocida; sin embargo, han sido atribuidas funcionalidades neuroprotectoras durante desregulaciones prolongadas de suministro de O<sub>2</sub> tanto *in vitro* como *in vivo* a la localización de la Ngb en los astrocitos (Alekseeva, Grigor'ev, & Korzhevskii, 2017; De Marinis et al., 2013).

Como resultado del análisis de la localización celular, subcelular y su comportamiento, a la Ngb se le han atribuido posibles funciones específicas, aunque no se ha encontrado un desempeño fisiológico concreto. Algunas de las funciones que le han sido atribuidas a esta proteína tienen que ver con el suministro de O<sub>2</sub> a la célula, en este contexto la Ngb fortalece la viabilidad de la célula cuando se encuentra en condiciones de hipoxia; mientras que, estudios *in vitro* muestran que la Ngb también puede estar involucrada en la desintoxicación de especies reactivas de O<sub>2</sub> así como de óxido nítrico y la inhibición de la apoptosis (Ascenzi, Gustincich, & Marino, 2014b; Cabezas et al., 2018).

Otra función que se ha descrito para la Ngb, por medio de análisis bioinformáticos, es la tendencia a establecer interacciones proteína-proteína, mostrando que más del 80% de los aminoácidos de la molécula tienen propensión a establecer dichas interacciones, sugiriendo que la Ngb en teoría tiene diversos sitios para interactuar con otras proteínas (Guidolin, Tortorella, Marcoli, Maura, & Agnati, 2016).

De esta manera, el presente estudio de la inmunolocalización de la Ngb en el SNP, abre las puertas a una línea de investigación de su función en el SNP y dar pauta a nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades neuropáticas de alto impacto biopsicosocial además de que los resultados obtenidos permitirán continuar con la elaboración de un protocolo de neuropatía, induciendo daño axonal isquémico y posterior análisis de cambios en el comportamiento de su expresión ante el daño.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Ngb es una proteína que ha sido ampliamente descrita en el SNC de los mamíferos tanto neuronas como astrocitos. La función fisiológica de la Ngb hasta el momento es desconocida; sin embargo, de acuerdo a la localización subcelular de la proteína y la modificación de expresión bajo ciertas circunstancias patológicas en el SNC como la hipoxia, se le han sido atribuidas distintas funcionalidades como fortalecer la viabilidad de la célula cuando se encuentra en condiciones de hipoxia, de esta manera puede ser considerada como un neuroprotector, especialmente durante desregulaciones prolongadas de suministro de O<sub>2</sub> tanto *in vitro* como *in vivo* (Ascenzi et al., 2014a; Cabezas et al., 2018). Sin embargo, la Ngb no ha sido estudiada en el SNP, en condiciones normales o bajo algún modelo patológico.

De esta manera, el estudio de la expresión y localización anatómica y subcelular de la Ngb en el SNP en condiciones fisiológicas, así como su papel en las neuropatías periféricas; es una línea de investigación novedosa que permite explorar posibles funciones de la Ngb en condiciones normales así como estrategias terapéuticas para diferentes neuropatías.

## **JUSTIFICACIÓN**

La Ngb es una proteína que pertenece al grupo de las globinas, su afinidad por el O<sub>2</sub> es mayor que la Hb, pero menor que la Mb, esta propiedad puede facilitar el transporte de O<sub>2</sub> a través de la barrera hematoencefálica e incrementar la disponibilidad del O<sub>2</sub> a los tejidos neuronales metabólicamente activos del SNC (Burmester et al., 2000); por tal motivo la Ngb ha sido ampliamente estudiada en el SNC. Sin embargo, dada su localización subcelular en las neuronas del SNC, la Ngb se ha propuesto cumpla otro tipo de funciones como la desintoxicación de especies reactivas de O<sub>2</sub> así como de óxido nítrico y la inhibición de la apoptosis.

De esta manera, puesto que no se han hecho estudios sobre la distribución celular de la Ngb en el SNP, nosotros tomando como modelo experimental el nervio ciático de la rata, haremos la descripción anatómica mediante inmunohistoquímica de la localización anatómica y subcelular de la Ngb. En primer lugar determinaremos la presencia de la Ngb en las células del nervio ciático y posteriormente determinaremos la localización subcelular de la Ngb de manera concreta mediante el uso de marcadores específicos para las CSFM y las CSNFM.

Los resultados del estudio de la inmunolocalización de la Ngb en condiciones normales del nervio ciático permitirán continuar con la elaboración de un protocolo de neuropatía induciendo un daño axonal isquémico.

## **PREGUNTA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la localización anatómica y subcelular de la Ngb en las células de Schwann del nervio ciático de la rata?



## **OBJETIVOS**

### **General.**

Determinar la localización anatómica y subcelular de la Ngb en las células de Schwann del nervio ciático de la rata.

### **Específicos.**

1. Identificar la distribución y localización de Ngb en las células del nervio ciático de la rata mediante inmunohistoquímica.
2. Determinar la localización anatómica de la Ngb en las CS del nervio ciático de la rata mediante inmunohistoquímica.
3. Describir la distribución subcelular de la Ngb en las CS del nervio ciático de la rata mediante doble-inmunihistoquímica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del protocolo de investigación

Se realizará un protocolo de investigación experimental tipo transversal, descriptivo, analítico, morfológico a nivel celular y molecular en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma del Estado de México bajo la tutoría del Dr. en C. Alejandro Martínez Gómez.

### Operacionalización de las variables

| VARIABLE   | DEFINICION<br>CONCEPTUAL   | DEFINICION<br>OPERACIONAL   | INDICADOR   | ESCALA<br>DE<br>MEDICIÓN |
|--|--|---|---|--------------------------|
| <b>PRESENCIA DE LA Ngb EN EL NERVIIO CIÁTICO</b> | Disposición de la proteína en el nervio ciático de la rata.  | Determinar o descartar la presencia de Ngb en el nervio ciático de la rata por medio de inmunohistoquímica    | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presente</li> <li>2. Ausente</li> </ol>   | Cualitativa              |
| <b>TIPO CELULAR DE LA Ngb</b>                    | Tipo de Célula de Schwann del nervio ciático de la rata que expresa la proteína.                     | Determinar la expresión celular de la Ngb en el nervio ciático por medio de doble-inmunohistoquímica.         | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Células de Schwann que forman mielina.</li> <li>2. Células de Schwann que no forman mielina.</li> </ol>   | Cualitativa              |
| <b>DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA Ngb</b>         | Patrón de expresión de la proteína en los compartimentos y estructuras de las células de Schwann del | Determinar los compartimentos y estructuras en los que se distribuye la Ngb en el nervio ciático por medio de | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Núcleo</li> <li>2. Citoplasma</li> <li>3. Internodos</li> <li>4. Incisuras de Schmit-Landerman</li> </ol> | Cualitativa              |

|  |                            |                            |  |  |
|--|----------------------------|----------------------------|--|--|
|  | nervio ciático de la rata. | doble-inmuno-histoquímica. |  |  |
|--|----------------------------|----------------------------|--|--|

Tabla 1.

### **Universo y muestra**

Muestra de tejido fresco de nervio ciático obtenido de modelos mamíferos experimentales *Rattus norvegicus*, cepa Wistar adultas.

### **Lugar y tiempo**

Los experimentos se realizarán en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México en el periodo comprendido del 1 de Febrero del 2018 al 30 de Febrero de 2019.

### **Protocolo experimental**

#### **1. Animales experimentales:**

Ratas de laboratorio: *Rattus norvegicus*, cepa Wistar macho adultas de 250 a 350 gramos de peso alimentadas *ad libitum*.

#### **2. Muestra:**

Tejido fresco de nervio ciático de aproximadamente 1.5 cm de largo, obtenido quirúrgicamente mediante acceso y disección dorsal de ratas adultas de la cepa Wistar.

#### **3. Extracción del nervio ciático:**

Se llevará a cabo eutanasia de los animales experimentales por sobredosis de CO<sub>2</sub> inhalado. Se extraerá de forma quirúrgica, retirando el tejido tegumentario con tijeras, una vez expuesto el músculo, mediante disección dorsal del muslo posterior y masa muscular adyacente, se expondrá el nervio ciático, se disecará con pinzas evitando hemorragias en el área y extraerá el nervio ciático, tratando de extraer la mayor cantidad de tejido posible (1.5 cm aproximadamente). A continuación, el tejido fresco será colocando en una caja de *Petri* con solución buffer de fosfatos 1X (PBS 1X) y será trasladado al microscopio estereoscópico para su manipulación.

#### **4. Preparación de laminillas:**

Los portaobjetos en los cuales se hará el análisis mediante microscopía de fluorescencia serán lavados previamente utilizando una solución de etanol-ácido clorhídrico al 70% - 1% respectivamente, para eliminar impurezas y serán impregnados con poli-L-lisina (Sigma P8920) para evitar que el tejido se desprenda fácilmente, deberán secarse previamente en la estufa de calor a 60°C durante una hora.

#### **5. Extensión del tejido:**

- Se obtendrá el nervio del PBS, se colocará sobre los portaobjetos y por medio de pinzas de disección, observando en un microscopio estereoscópico se quitará el epineuro.
- Se extenderán los axones del tejido con ayuda de las pinzas de disección sobre cada portaobjetos con poli-L-lisina, separando lo mejor que sea posible cada fibra, con la finalidad de poder visualizar axones aislados en el análisis de microscopía de campo claro.
- Se dejará secar el tejido en el portaobjetos durante 60 minutos.
- Una vez secas las laminillas, se rotularán y se colocará cera al contorno del tejido para evitar derrames de anticuerpos.

#### **6. Condiciones de protocolo:**

Se determinarán las condiciones experimentales como el tipo de fijador, tiempo de permeabilización de la membrana celular, la concentración de anticuerpo, entre otras, para identificar exitosamente la proteína Ng2 mediante Inmunohistoquímicas en los nervios ciáticos, y posteriormente analizar la distribución anatómica y subcelular de la localización de Ng2 en las CS y los axones.

#### **7. Protocolo para Inmunofluorescencia simple:**

Se determinará la presencia y localización anatómica de la Ng2 mediante inmunohistoquímicas en el nervio ciático, para lo cual utilizaremos anticuerpo primario de Ng2 *Rabbit* (Sigma) a una concentración de [1:300].

- I. Obtención quirúrgica de muestra de tejido fresco de nervio ciático proveniente de *Rattus norvegicus*, cepa Wistar por acceso dorsal y disección evitando hemorragias en el área.
- II. A continuación, el tejido fresco será colocado en una caja de *Petri* con solución buffer de fosfatos 1X (PBS 1X) pH: 7.4 y será trasladado al microscopio estereoscópico para su manipulación.
- III. Se retirará el nervio del PBS y se colocará sobre los portaobjetos, y por medio de pinzas de disección y observando en un microscopio estereoscópico se quitará el epineuro.
- IV. Se extenderán los axones con ayuda de las pinzas de disección sobre cada portaobjetos con poli-L-lisina, extendiendo lo mejor que sea posible cada fibra.
- V. Se dejará secar el tejido en el portaobjetos durante 60 minutos.
- VI. Una vez secas las laminillas, se rotularán y se colocará cera al contorno del tejido.
- VII. Los portaobjetos se transferirán a vasos de *Coplin* con paraformaldehído al 4% pH: 7.4, Metanol y Acetona (Sigma) para la fijación de los tejidos durante 10 min a 4 °C.
- VIII. Se harán tres lavados consecutivos con PBS 1X de 5' cada uno.
- IX. Se bloqueará y permeabilizarán las membranas celulares con leche al 10% diluida en PBS1X Triton 0.5% - Tween 0.5% por 60 minutos.
- X. Posteriormente se colocará el anticuerpo primario de Nbg Rabbit [1:300] (Sigma) y se dejará incubando toda la noche en cámara húmeda a 4°C.
- XI. Al día siguiente se harán tres lavados consecutivos con PBS 1X de 5' cada uno.
- XII. Se colocarán los anticuerpos secundarios Alexa (*Green 488 anti-Rabbit*) a una concentración de [1:500] y se dejará incubando en medio húmedo a 4°C durante 2 horas.
- XIII. Se harán tres lavados consecutivos con PBS 1X de 5' cada uno.
- XIV. Se colocará las laminillas en vasos de *Coplin* con Hoersch durante 5 minutos.
- XV. Se harán tres lavados consecutivos con PBS 1X de 5' cada uno.
- XVI. Se montarán en medio acuoso (VectaShield).
- XVII. Se dejarán secar durante 10 minutos.

- XVIII. Se observarán en el microscopio de fluorescencia y analizará la distribución anatómica y subcelular de la localización de Ngb en las CS y los axones.

### **8. Protocolo para las Inmunofluorescencias dobles:**

Se determinará la localización subcelular precisa de la Ngb mediante dobles inmunohistoquímicas en el nervio ciático, para lo cual utilizaremos diferentes marcadores contra regiones anatómicas de las CS y los axones, utilizaremos además del anticuerpo contra Ngb, la Fluoromielina marcador de las CSFM, proteína acida glial fibrilar (GFAP) marcador de las CSNM, Faloidina; un marcador específico de actina que nos permitirá visualizar el citoplasma, además de las incisuras de Schmit Lanterman, utilizaremos también Fibrilarina un marcador específico de núcleos celulares.

- I. Se repetirán los pasos para al Inmunofluorescencia simple descritos anteriormente del I al XIII.
- II. Posteriormente se colocarán los anticuerpos primarios del 2º anticuerpo a evaluar (Fluoromielina-*Mouse* [1:100], GFAP-*Mouse* [1:1500], Faloidina [1:100] o Fibrilarina-*Mouse* [1:100]) y se dejarán incubando toda la noche en cámara húmeda a 4°C.
- III. Al día siguiente se harán tres lavados consecutivos con PBS 1X de 5' cada uno.
- IV. Se colocarán los anticuerpos secundarios conjugados del 2º anticuerpo con Alexa (Red 594 anti-*Mouse*) [1:500] se dejan incubando en medio húmedo a 4.C durante 2 horas para GFAP-*Mouse* y Fibrilarina-*Mouse*.
- V. Se harán tres lavados consecutivos con PBS 1X de 5' cada uno.
- VI. Se montarán en medio acuoso con DAPI (VectaShield).
- VII. Se dejarán secar durante 10 minutos.
- VIII. Se observarán en el microscopio de fluorescencia y analizará la distribución anatómica y subcelular de la localización de Ngb en las CS y los axones.

### **9. Obtención y análisis de microfotografías:**

Las laminillas se visualizarán mediante microscopía de campo claro y microscopía de fluorescencia usando el microscopio OLYMPUS Modelo BX60 con un objetivo 100X. Para tomar las fotografías de los campos observados al microscopio se

utilizará la cámara Q Imaging (QI Click) y las imágenes se convertirán, guardarán y analizarán mediante los programas Q-Capture e Image J para Windows y Mac.

### **10. Soluciones:**

Solución Buffer de Fosfatos (PBs): Solución buffer empleada en investigación biológica cuya osmolaridad, pH y concentración de iones es semejante a la del líquido extracelular.

- Se preparará disolviendo 27 gramos de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 gramos de cloruro de potasio (KCl), 1.15 gramos de bifosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0.2 gramos de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en un litro de agua ultrapura ajustando el pH de la solución en 7.4.

Solución de paraformaldehído al 4% en PBS 1X: Solución para fijación de muestras histológicas.

- Se pesarán 4 gramos de paraformaldehído y se disolverán con ayuda de calor y perlas de NaOH bajo la campana de extracción en 100 mililitros (ml) de PBS 1X y se ajustará el pH a 7.4 .

Solución de leche Triton (0.5%) Tween (0.5%) al 10%: Solución para bloqueo de las proteínas celulares y permeabilización de membrana con detergente no iónico.

- Se preparará disolviendo 5 gramos de leche en polvo en 50 ml de solución PBS 1X - Triton 0.5% Tween 0.5%.

### **11. Materiales:**

El equipo necesario para la realización del trabajo será: Sistema desionizador de agua EASY modelo D8611, microscopio estereoscópico OLYMPUS, microscopio de contraste de fases y fluorescencia OLYMPUS modelo BX60, Cámara Q Imaging (QI Click), campana de flujo laminar ALDER, y demás equipo de uso corriente en un laboratorio de biología molecular, material de papelería y equipo de oficina; computadora e impresora. Los programas para captura, procesamiento y análisis de imagen Q-Capture, Image J y Photoshop para Windows y Mac.

## IMPLICACIONES ÉTICAS

Todos los animales serán manejados de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

## PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO

Los costos derivados del uso de infraestructura técnica, tecnológica, reactivos y material de laboratorio serán absorbidos por el laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alekseeva, O. S., Grigor'ev, I. P., & Korzhevskii, D. E. (2017). Neuroglobin, an oxygen-binding protein in the mammalian nervous system (localization and putative functions). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 53(4), 249–258. <https://doi.org/10.1134/S0022093017040019>
- Arancibia-Carcamo, I. L., & Attwell, D. (2014). The node of Ranvier in CNS pathology. *Acta Neuropathologica*, 128(2), 161–175. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1305-z>
- Armati, P. J. (2007). *The Biology of Schwann Cells* (1<sup>o</sup>). New York: Cambridge.
- Ascenzi, P., Gustincich, S., & Marino, M. (2014a). Mammalian nerve globins in search of functions. *IUBMB Life*, 66(4), 268–276. <https://doi.org/10.1002/iub.1267>
- Ascenzi, P., Gustincich, S., & Marino, M. (2014b). Mammalian nerve globins in search of functions. *IUBMB Life*, 66(4), 268–276. <https://doi.org/10.1002/iub.1267>
- Brunori, M., & Vallone, B. (2007). Neuroglobin, seven years after. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(10), 1259. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7090-2>
- Burmester, T., & Hankeln, T. (2014). Function and evolution of vertebrate globins. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 211(3), 501–514. <https://doi.org/10.1111/apha.12312>
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S., & Hankeln, T. (2000). A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 407(6803), 520–523.



<https://doi.org/10.1038/35035093>

Cabezas, R., Baez-Jurado, E., Hidalgo-Lanussa, O., Echeverria, V., Ashrad, G. M., Sahebkar, A., & Barreto, G. E. (2018). Growth Factors and Neuroglobin in Astrocyte Protection Against Neurodegeneration and Oxidative Stress. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1203-9>

Chelly, J. E. (2009). *Peripheral Nerve Blocks: A Color Atlas*. Lippincott Williams & Wilkins.

De Marinis, E., Acaz-Fonseca, E., Arevalo, M. A., Ascenzi, P., Fiocchetti, M., Marino, M., & Garcia-Segura, L. M. (2013). 17 $\beta$ -Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor  $\beta$ -mediated neuroglobin up-regulation. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(3), 260–270. <https://doi.org/10.1111/jne.12007>

Eric R. Kandel, J. H. S., & Thomas M. Jessell. (2012). *Principles of Neural Science* (5th ed). New York. USA.: McGraw-Hill.

Fehmi, J., Scherer, S. S., Willison, H. J., & Rinaldi, S. (2018). Nodes, paranodes and neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 89(1), 61–71. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-315480>

Fiocchetti, M., Cipolletti, M., Leone, S., Naldini, A., Carraro, F., Giordano, D., ... Marino, M. (2016). Neuroglobin in Breast Cancer Cells: Effect of Hypoxia and Oxidative Stress on Protein Level, Localization, and Anti-Apoptotic Function. *PLOS ONE*, 11(5), e0154959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154959>

Flores Miranda. (2017). *Variación morfológica de las células de Schwann en cinco clases de vertebrados*.

Guidolin, D., Tortorella, C., Marcoli, M., Maura, G., & Agnati, L. F. (2016). Neuroglobin, a Factor Playing for Nerve Cell Survival. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11). <https://doi.org/10.3390/ijms17111817>

Hall, J. E. (2016). *Tratado de fisiología médica* (13a ed.). España: Elsevier.

Hankeln, T., Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Gerlach, F., Saaler-Reinhardt, S., ... Burmester, T. (2004). The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function? *IUBMB Life*, 56(11–12), 671–679. <https://doi.org/10.1080/15216540500037794>

Hundahl, C. A., Allen, G. C., Hannibal, J., Kjaer, K., Rehfeld, J. F., Dewilde, S., ... Hay-Schmidt, A. (2010). Anatomical characterization of cytoglobin and neuroglobin mRNA and protein expression in the mouse brain. *Brain Research*, 1331, 58–73.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.056>

Imboden, J. B., Hellmann, D. B., & Stone, J. H. (2013). *Current Diagnosis & Treatment in Rheumatology, Third Edition*. McGraw Hill Professional.

Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(9), 671–682. <https://doi.org/10.1038/nrn1746>

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2012). *Principles of Neural Science, Fifth Edition*. McGraw Hill Professional.

Mizisin, A. P. (2014). Chapter 27 - Mechanisms of diabetic neuropathy: Schwann cells. In D. W. Zochodne & R. A. Malik (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 126, pp. 401–428). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53480-4.00029-1>

Moore, K. L., Dalley, A. F., & Agur, A. M. R. (2013). *Clinically Oriented Anatomy*. Lippincott Williams & Wilkins.

Poliak, S., & Peles, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(12), 968–980. <https://doi.org/10.1038/nrn1253>

Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M. H., Burmester, T., & Hankeln, T. (2002a). Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience*, 115(3), 645–656.

Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M. H., Burmester, T., & Hankeln, T. (2002b). Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience*, 115(3), 645–656.

Rohkamm, R. (2004). *Color Atlas of Neurology*. Georg Thieme Verlag. Retrieved from [http://125.234.102.146:8080/dspace/handle/DNULIB\\_52011/2724](http://125.234.102.146:8080/dspace/handle/DNULIB_52011/2724)

Said, G. (1997). Necrotizing peripheral nerve vasculitis. *Neurologic Clinics*, 15(4), 835–848.

Salzer, J. L. (2003). Polarized domains of myelinated axons. *Neuron*, 40(2), 297–318.

Salzer, J. L. (2008). Switching myelination on and off. *The Journal of Cell Biology*, 181(4), 575–577. <https://doi.org/10.1083/jcb.200804136>

Schirmeier, S., Matzat, T., & Klämbt, C. (2016). Axon ensheathment and metabolic supply by glial cells in *Drosophila*. *Brain Research*, 1641(Pt A), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.003>

Schmidt, M., Giessl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., & Burmester, T. (2003).

How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1932–1935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209909200>

Smith, B. E. (2006). Chapter 1 Anatomy and histology of peripheral nerve. In J. Kimura (Ed.), *Handbook of Clinical Neurophysiology* (Vol. 7, pp. 3–22). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1567-4231\(09\)70062-0](https://doi.org/10.1016/S1567-4231(09)70062-0)

Welsch, U., & Sobotta, J. (2008). *Histología*. Ed. Médica Panamericana.