



Universidad Autónoma de Querétaro

**Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología**

**Estandarización del método de Inmunotransferencia
para la detección del factor de crecimiento insulínico
tipo I, en el cuerpo estriado de la rata macho.**

TESIS

Que para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Presenta:

Maria Soledad Mendoza Trejo

Directora de tesis: Dra. María Magdalena Giordano N.

Co-directora: Dra. Maricela Luna Muñoz

Querétaro, Qro.

2001

No. Adm. H 65293
No. Título IS
Clas. 619.93
M5394

BIBLIOTECA GENERAL UAG
"ROBERTO RUIZ OBREGON"

Esta tesis fue realizada en el Centro de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México campus Juriquilla. En el departamento de Neurobiología conductual y cognitiva. En el laboratorio de Plasticidad Cerebral. Bajo la dirección de la Dra. María Magdalena Giordano, y la codirección de la Dra. Maricela Luna Muñoz.

Dedicatorias

A Dios que en los momentos más difíciles me ha abrazado hasta reconfortarme.

A mi mamá que ha sido un ejemplo de perseverancia, cariño y comprensión (lo logramos solecito). A mi padre del cual también he recibido su apoyo.

A mis hermanos Isa, Mary, Lily y Andy, que sin su apoyo moral y económico esto se hubiera logrado. A Ale y Juan muchas gracias por su apoyo. Especialmente a cuatro chiquilines que con una sonrisa me han dado fuerza cuando parecía claudicar, gracias Diego (gogo), Juan (patolín), Araña y Arturito.

A mis tíos que de una u otra forma me han apoyado, Gracias Martha, Rosy, Sergio, Dany, Rubí, Celia y mi abuelito Gonzalo.

A mis amigas de toda la vida, por compartir momentos inolvidables, gracias chicas, Laura, Bety y Wendy.

A mis amigos de generación que con su soporte lo he logrado: Poncho, Zullin, Lenin, Juan, Roberto, David, Cinthya y a todos los amigos que se quedaron en el camino, ya que me dieron el coraje de salir adelante.

A mis amigos del laboratorio que me han permitido compartir mi vida misma y sin su apoyo esto no hubiera estado listo a tiempo, gracias Vero, Clau, Fer, Talina, Andrea y Juan.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Bioquímica de Hormonas por su apoyo y paciencia, Martita, Hilda, Laurita, Gerardo, Javier y Noemí.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a la Dra. María Magdalena Giordano Noyola, por su apoyo brindado para la realización de esta tesis, por haberme brindado la oportunidad de colaborar con ella y por su comprensión y dedicación para conmigo.

A la Dra. Maricela Luna Muñoz por dedicación y paciencia, en la elaboración de este trabajo y por brindarme su amistad, apoyo y enseñanzas.

Al Dr. Carlos Aramburo de la Hoz, por las facilidades permitidas para la realización de esta tesis y por sus comentarios tan acertados.

A M. en C. Martha Carranza por su apoyo recibido a esta tesis.

A mis sinodales la Dra. Hilda Martínez Coria, Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez y Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos, por sus aportaciones y sugerencias para este trabajo.

A Ing. Rafael Favila por sus enseñanzas y aporte técnico.

A todos los que de alguna forma han compartido y contribuido para la realización de esta tesis. Mil gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	4
CAPITULO I. FACTORES DE CRECIMIENTO.....	7
I.-Neurotrofinas	8
II. Los factores hematopoyéticos (HGFs).....	10
III. Citocininas.....	10
IV. Factores Tisulares.....	11
CAPITULO II. FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINICO TIPO I (IGFI)	14
Generalidades.....	14
Estructura	15
Funciones.....	16
IGFBPs.....	17
Receptores.....	20
IGF-I en respuesta a un daño.....	22
CAPITULO III. GENERALIDADES SOBRE LOS GANGLIOS BASALES	24
CAPITULO IV. MÉTODO DE ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	27
Método de extracción	27
Cuantificación de proteína total	28
Separación de proteínas por electroforesis.....	29
Métodos de detección de proteínas por inmunotransferencia.....	31
Animales.....	34
Grupos experimentales	34
Cirugía	34
Procedimiento.....	35
Reactivos	35
Inmunodetección de punto (Dot blot)	35
Extracción	36

Inmunotransferencia	37
Método I	40
Método IA	42
Método II	43
Método II A.....	47
Método II B.....	50
Método II C.....	52
ANEXO I.....	62
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	62
ENSAYO DE PRÓTEÍNAS <i>Bio-Rad</i>	62
ANEXO II.....	63
ELECTROFORESIS.....	63
SDS-PAGE.....	63
ANEXO III	69
ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS	69
ANEXO IV.....	72
INMUNOTRANSFERENCIA	72
ANEXO V.....	74
QUIMIOLUMINISCENCIA.....	74
ANEXO VI.....	75
INMUNOTINCION EN PUNTO	75
BIBLIOGRAFÍA.....	76

RESUMEN

Al igual que otros procesos biológicos, el crecimiento y la diferenciación celular están regulados por una serie de señales que actúan de forma autócrina, parácrina o endócrina. Entre ellas, los factores de crecimiento juegan un papel especialmente importante. Los factores de crecimiento incluyen sustancias que estimulan a las células para dividirse o aumentar de tamaño. Se conocen muchos factores de crecimiento entre los cuales está el Factor de Crecimiento Insulínico tipo I (IGF-I), el cual en el estado embrionario se encarga de la diferenciación y crecimiento celular. Aunque su concentración en cerebro declina después del nacimiento, se ha observado que se mantiene la expresión de su RNAm. Cuando el cerebro sufre algún tipo de daño, ya sea mecánico o químico, se observa un aumento en la proteína. Los factores de crecimiento con frecuencia se encuentran unidos a proteínas transportadoras con las que tienen una interacción muy fuerte lo que impide su separación y por lo tanto dificulta su detección. El propósito del presente trabajo fue estandarizar un método que permita separar al IGF-I de sus proteínas de unión y facilitar su detección con la técnica de inmunotransferencia. Así mismo, se usó esta metodología para determinar los niveles de expresión de esta proteína en el cuerpo estriado de la rata lesionado con una excitotoxina. Se logró estandarizar una técnica que permite separar al IGF-I de sus proteínas de unión e identificarlo como una banda de 15 KDa, inmunopositiva que corresponde con el estándar de IGF-I. Usando esta técnica se observó un aumento en la densidad de la banda de 15 KDa, que se cree incluye al IGF-I, en el cuerpo estriado lesionado de la rata albina. Es posible que esta proteína esté involucrada en algún proceso de reparación posterior a la lesión química.

INTRODUCCIÓN

Una de las características que tiene el sistema nervioso es su plasticidad. Plasticidad implica moldeabilidad y su sinónimo es el cambio. Desde la etapa fetal hasta la vejez, el sistema nervioso central no cesa de transformarse, tanto desde los puntos de vista cuantitativo y cualitativo. Estas transformaciones van desde la división celular hasta el establecimiento de conexiones entre células que, en ocasiones, se encuentran muy alejadas unas de otras (Brailowsky y cols., 1998). Durante el desarrollo se presentan cambios importantes en el sistema nervioso a diferencia de la vida adulta en la que se presentan principalmente cambios plásticos que se dan como resultado del daño producido por una lesión.

Una lesión en el sistema nervioso central causa la destrucción de neuronas y sinapsis, lo que, a su vez, evoca una respuesta de formación de nuevas sinapsis. Si las sinapsis se forman a partir de nuevas terminales axonales de neuronas no dañadas por la lesión, el proceso se denomina sinaptogénesis reactiva. En contraste, la sinaptogénesis regenerativa tiene lugar a partir de los brotes axonales que surgen de las fibras nerviosas dañadas por la lesión. Ambos procesos requieren la iniciación y crecimiento de las nuevas terminales axonales y la formación de nuevos contactos sinápticos (Nieto y Verdú, 1998).

La existencia de la sinaptogénesis reactiva prueba que en el sistema nervioso central maduro existe la posibilidad de formación de nuevas sinapsis para sustituir a aquellas perdidas a causa de una lesión y que los nuevos contactos pueden mediar la transmisión sináptica. Aunque la sinapsis reactiva no reemplaza los circuitos originales, aumenta selectivamente las sinapsis residuales y en el caso de lesiones pequeñas, puede tener consecuencias benéficas. Sin embargo se pueden producir conexiones anormales, algunas de las cuales pueden competir con los brotes regenerativos, y por lo tanto la sinaptogénesis reactiva puede interferir con el proceso de recuperación funcional (Kar y cols., 1993).

Los cambios que surgen después del daño en la estructura celular, requieren de ajustes. Así, en respuesta a señales extracelulares, las neuronas o células nerviosas cambian el patrón de expresión de genes y la producción de ciertas proteínas específicas se incrementa (Kolb, 1995). En particular hay un aumento de la producción de moléculas especializadas como son los neuropeptidos que inducen la proliferación celular y el establecimiento de conexiones entre células.

Las investigaciones de factores de crecimiento se remontan a 1948 con el descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (NGF) que fue observado por Levi-Montalcini (1993). Durante los siguientes años se ha ido demostrando que los factores neurotróficos participan en la reparación del daño provocado al tejido nervioso adulto por diferentes causas. Entre estos factores está incluido el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I).

Se ha sugerido por estudios *in vitro* que tanto el IGF-I como IGF-II juegan un papel importante en el crecimiento y diferenciación neuronal, posiblemente participando en la maduración dendrítica, sinaptogénesis y mielinización (citado en Kar y cols, 1993). En el sistema nervioso adulto el IGF-I tiene la función de mantener la citoarquitectura del cerebro normal y está relacionado con la respuesta ante un daño farmacológico o quirúrgico (Lee y cols., 1992).

Así por ejemplo, la inyección de GPE (glicina-prolina-glutamato, que es el tripéptido amino terminal del IGF-I) reduce el daño cortical en el hipocampo, mientras que en el estriado tiende a reducir la pérdida de neuronas después de un daño hipóxico-isquémico en rata adulta (Guan y cols., 1999).

También se ha observado que la administración de IGF-I en los ganglios basales de fetos de oveja que han sido dañados por isquemia, reduce la pérdida neuronal (Guan y cols., 2000).

El cuerpo estriado forma parte de un grupo de núcleos subcorticales conocidos como ganglios basales que participan en el control del movimiento y en funciones cognitivas como es el aprendizaje. Este núcleo recibe una inervación glutamatérgica importante de toda la corteza cerebral. Es un núcleo vulnerable al daño isquémico transitorio (Xu y cols., 1999), y a los efectos de las llamadas excitotoxinas (análogos estructurales del glutamato). Alexi y cols., (1999) observaron que tras una lesión excitotóxica con ácido quinolínico en el estriado y la administración de IGF-I (GPE), se observó una protección de las neuronas estriatales. Por otra parte Giordano y cols. (1999) observaron inmunorreactividad a IGF-I en el estriado de rata lesionado con ácido kaínico.

Estos resultados sugieren que después de una lesión excitotóxica se incrementa la producción de IGF-I en el estriado y que podría estar participando en un fenómeno de recuperación o reparación neuronal.

Con el fin de detectar y cuantificar la expresión de IGF-I en el estriado después de una lesión excitotóxica, se decidió la estandarización del método de inmunotransferencia para este factor. Aunque este método se describe en la literatura, la inmunotransferencia de IGF-I y de otros factores de crecimiento representa un reto de tipo metodológico, pues estos factores se unen con alta afinidad a proteínas unidoras que regulan su acción, dificultando su separación y por consiguiente, su detección y cuantificación.

En los siguientes capítulos se describirán las principales familias de factores de crecimiento con especial énfasis en los factores insulínicos, así como la metodología de la inmunotransferencia y su aplicación para la detección de IGF-I.

CAPITULO I. FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son definidos como polipéptidos que a muy bajas concentraciones, actúan a través de receptores específicos que median el mecanismo de iniciación y el mantenimiento de complejos procesos celulares como la proliferación de células que sufren mitosis (tales como glia cerebral y células endoteliales); y en células post-mitóticas como las neuronas, participa en la supervivencia celular, crecimiento y diferenciación bioquímica. La identificación de muchos de estos péptidos en el sistema nervioso central de mamíferos sugiere que estos factores juegan un papel importante no sólo durante el desarrollo del cerebro, sino en la respuesta del cerebro maduro ante un daño (Berlove y Finklestein, 1993)

Por ejemplo, durante una etapa precoz del desarrollo, varias fibras nerviosas terminan en cada fibra muscular, no obstante, la mayor parte de estas neuronas se degeneran y sólo una establecerá un contacto duradero con el blanco. Este fenómeno de eliminación axónica está vinculado a la carencia de factores quimiotróficos, quimiotrópicos y quimiotácticos, que son factores que favorecen la sobrevivencia, el crecimiento y su orientación a grandes distancias o en contacto cercano (Dieguez y cols., 1992).

Los factores de crecimiento, aunque algunos de ellos pueden ser detectados en plasma y actuar de forma endócrina, suelen ejercer sus efectos biológicos a través de mecanismos autócrinos o parácrinos. A éstos hay que sumar el que su síntesis no suele estar restringida a una glándula o tejido celular específico, sino que ocurre en un gran número de tejidos (Dieguez y cols. 1992). Entre sus efectos está el de inducir multiplicación celular *in vivo* e *in vitro*. Típicamente ejercen su efecto biológico a muy bajas concentraciones (general 10^{-9} – 10^{-11} M) (Heath , 1993).

Los factores de crecimiento pueden ser agrupados dentro de cuatro familias de moléculas por su semejanza en cuanto a secuencia o estructura y se encuentran en cuatro categorías: Las neurotrofinas, factores hematopoyéticos, citocininas y factores tisulares.

Dado el gran número de factores de crecimiento existentes y la gran cantidad de efectos biológicos regulados por ellos, se describirán algunos de los más conocidos, desde el punto de vista del mecanismo como de sus efectos biológicos.

I.-Neurotrofinas

La familia de factores de crecimiento clasificada como neurotrofinas está representada por una serie de proteínas homólogas las cuales conservan una estructura relacionada con la del factor de crecimiento nervioso. Las neurotrofinas son sintetizadas como proteínas precursoras. Individualmente están altamente conservadas a lo largo de las especies mamíferas y comparten el 50% de la secuencia de aminoácidos con otros miembros de la misma familia (Lapchak y cols., 1993).

La familia está constituida por el factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado de cerebro, neurotrofina-3, neurotrofina-4 y neurotrofina – 5 (Tabla I) (Lapchak y cols., 1992).

Tabla I.- Neurotrofinas y sus características.

Nombre e iniciales	Peso molecular (Daltones)	Tejido que lo produce	Funciones
Factor de crecimiento nervioso (NGF*)	Compuesta de tres subunidades α, β, γ 140000 (Lapchak y cols, 1992).	Glándula submaxilar, diversos sitios en el SNC como neuronas simpáticas, sensoriales primarias, colinérgicas septales e interneuronas, en hipocampo; células epidérmicas de músculo liso, etc. (Hiriart, 1997).	Estimulación del crecimiento de neuritas en células derivadas de la cresta neural. Estimulación del crecimiento, función y supervivencia de neuronas simpáticas ganglionares y colinérgicas. (Hiriart, 1997). Reducción neuronal y modular la síntesis de neurotransmisores y morfología neuronal (Dieguez y cols, 1992)
Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF*)	135000 (Leibrock y cols., 1989).	En el cerebro adulto está presente en concentraciones muy bajas ($\mu\text{g}/\text{gr}$) (Barde y cols., 1982).	Los niveles son relativamente bajos en el cerebro durante el desarrollo (Maisonpierre y cols., 1990). Induciendo el crecimiento de neuritas de ganglios sensoriales periféricos, Crecimiento axonal y supervivencia de células en la retina (Hiriart, 1997). En estado adulto alcanza altos niveles y está involucrado en el mantenimiento y supervivencia de neuronas colinérgicas, dopaminérgicas y GABAérgicas (Lapchak y cols., 1992)
Neurotrofina 3 (NT-3)	136000 (Lapchak y cols., 1992)	Hipocampo adulto (Lapchak y cols., 1992)	Desarrollo de neuronas colinérgicas, pero no en dopaminérgicas (Lapchak y cols., 1992)
Neurotrofina 4 (NT-4)	14000 (Lapchak y cols., 1993)	Caracterizada en <i>Xenopus</i> (Lapchak y cols., 1992)	

* Por sus siglas en inglés

II. Los factores hematopoyéticos (HGFs)

Están involucrados no sólo en la proliferación y la diferenciación, sino también en la sobrevivencia celular. La ausencia de factores hematopoyéticos resulta en muerte celular a una velocidad constante; cuando se adicionan se previene la muerte celular y se obtiene una rápida proliferación (Pimentel,1994b).

Tabla II. Ejemplos de algunos Factores Hematopoyéticos y sus características.

Nombre e iniciales	Tejido que lo produce	Funciones
Factores de crecimiento hematopoyéticos (HGF*)	Células hematopoyéticas (Pimentel, 1994b)	Regulación de hematopoyesis (Pimentel, 1994b).
Interleucina 3 (IL-3)	Células monocíticas (Ihle, 1991)	Formación de colonias de eritrocitos, megacariocitos, eosinófilos, basófilos. Mucha de su actividad depende de la coestimulación de citocininas (Callard y Gearing, 1994).

III. Citocininas

Las citocininas son proteínas o glicoproteínas producidas por leucocitos y por otros tipos de células del sistema inmunológico. Muchas citocininas son factores de crecimiento para con efecto sobre la diferenciación y actúan en el sistema hematopoyético (Callard y Gearing, 1994). Además del papel hematopoyético, participan en la inflamación y procesos inmunológicos, así como en funciones metabólicas y endócrinas (Tabla III) (Pimentel, 1994b).

Tabla III. Citoquininas y sus características.

Nombre e iniciales	Tejido que lo produce	Funciones
18 miembros de Interleucinas (IL) IL 1 a IL18	Sistema inmune (Fanjul y Ruíz, 1999)	Reguladoras de la proliferación y diferenciación linfocitaria (Fanjul y Ruíz, 1999). Coestimulador de activación de linfocitos como fagocitos mononucleares, neutrofilos y eosinofilos (Talamás, 1999).

* Por sus siglas en inglés

IV. Factores Tisulares

Son factores que se sintetizan en diferentes tejidos y que ejercen sus efectos sobre células que los sintetizan (efecto autócrino), y sobre las células vecinas (efecto parácrino). También se han detectado en el torrente sanguíneo el cual transporta estos factores para su funcionamiento en la célula blanco (efecto endócrino) (Heath, 1993).

Tabla IV. Factores tisulares y sus características.

Nombre e iniciales	Peso molecular (Daltones)	Tejido que lo produce	Funciones
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF*)	17000 (Hiriart, 1997)	Gránulos de las plaquetas (Hiriart, 1997). En la placenta, macrófagos, células del tejido liso de animales neonatos, en el sistema nervioso central, células endoteliales. En cultivos de células tumorales (Heath, 1993).	En células de origen mesodérmico como fibroblastos, células gliares, células de músculo liso arterial y células endoteliales, es un mitógeno potente. Las células endoteliales de aorta de embriones de rata responden a/y producen PDGF, las de adulto también responden a este factor, pero no lo producen. Lo cual sugiere que en el animal en desarrollo, en el que las células endoteliales proliferan continuamente, producen su propio factor. Más tarde en el desarrollo estas células no deben seguir proliferando y ya no producen su propio factor. No obstante, en caso de heridas es necesario que tengan la capacidad de responder al mismo y pueden volver a producirlo. Cuando se rompe un vaso sanguíneo, además de la coagulación sanguínea y agregación y lisis plaquetaria se libera PDGF (Hiriart, 1997).
Factor de crecimiento epidérmico (EGF*)	La molécula precursora consta de dos subunidades de 2000 y dos	Glándula submaxilar, riñón, glándula mamaria, páncreas, duodeno, hipófisis, cerebro, pulmón, bazo	Mitógeno de células de origen mesodérmico y ectodérmico. En el adulto juega posiblemente un papel citoprotector, a nivel gástrico. (Dieguez, 1992). Estimula la

*Por sus siglas en inglés

	de 27000 (Hiriart, 1997).	y ovario; fluidos biológicos como líquido prostático, leche, orina, fluido seminal, sudor, bilis, saliva (Dieguez y cols., 1992).	proliferación y queratinización de la epidermis. En ratones recién nacidos provoca la erupción prematura de los incisivos y la apertura de los ojos. Aumenta la proliferación de las células epiteliales y fibroblásticas. Estimula la división de las células epidérmicas (Hiriart, 1997).
Factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico (FGFa FGFb*)	16000 (Hiriart, 1997).	Hipófisis, cerebro embrionario y adulto, en neuronas y astrocitos. (Hiriart, 1997).	Estimulan la angiogénesis. Estimulan la división celular de fibroblastos, mioblastos y particularmente células endoteliales. Pueden estar involucrados en la inducción mesodérmica de la blástula en anfibios. Aumentan la sobrevivencia y el crecimiento de neuritas de diversos tipo neuronales; estos efectos son más notorios después de una lesión (Hiriart, 1997).
Factores de crecimiento transformantes TGF α * TGF β *	12000 (Hiriart, 1997).	Células tumorales, epiteliales, queratinocitos, músculo liso arterial, macrófagos activados (Hiriart, 1997). Células embrionarias, en plaquetas, hueso, cartílago, miocitos cardíacos, linfocitos B y T (Hiriart, 1997).	Potente modulador del crecimiento y diferenciación. Posibles efectos bloqueadores del desarrollo de tumores (Hiriart, 1997). Estimula el crecimiento de células endoteliales, mesenquimales y transformantes. Inhibe el crecimiento de la mayor parte de las células y de algunos tipos de tumores. Modula la diferenciación de ciertos tipos celulares (Hiriart, 1997).
Factores de crecimiento insulínicos (IGFs*) IGF-I o somatomedina C IGF-II	7500 (Hiriart, 1997).	Hígado, placenta, mioblasto, ovario, fibroblastos, microvasculatura del cerebro (Hiriart, 1997). Hígado, mioblastos, microvasculatura del cerebro (Hiriart, 1997).	Estimula la proliferación celular, la incorporación de sulfatos en condrocitos y la síntesis de colágeno. Estimula la diferenciación de las células de la granulosa ovárica, así como la síntesis de progesterona y en testículo la síntesis de andrógenos. Inhibe la secreción de GH. Ambos tienen efectos metabólicos parecido a la insulina (Hiriart, 1997).

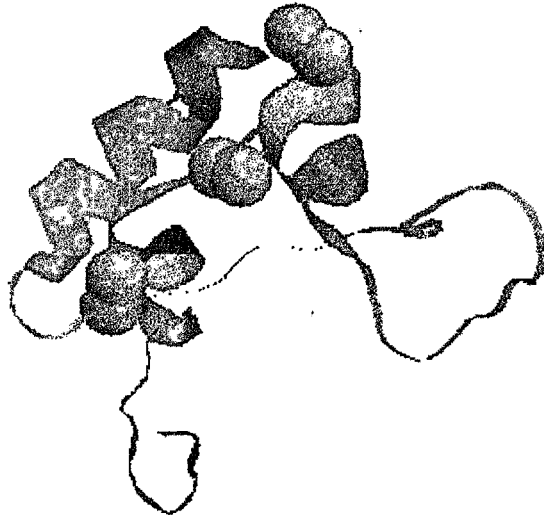


Figura 1.- Estructura tridimensional del IGF-I, cada cadena se colorea pasando por el espectro azul, verde, amarillo, naranja y rojo. El azul corresponde al amino terminal y el rojo al carboxilo. En esferas amarillas los puentes de disulfuro (Tomada de <http://molbio.info.nih.gov/cgi-bin/pdb> código IGF1, por medio de RasMol versión 2.6).



Figura 2.- Esquematación de la estructura del IGF-I. Este péptido está constituido por 70 aminoácidos y muestra una alta similitud estructural con la insulina y el IGF-II. El IGF-I maduro está formado por cuatro dominios estructurales de nominados A, B C y D. (Tomada de Gutiérrez-Ospina 1997).

Funciones

El IGF-I tiene un amplio espectro de funciones en el embrión, feto y adulto, en el sistema nervioso participa en la proliferación y desarrollo de células del cerebro, en la diferenciación neuronal incluyendo la maduración dendrítica, sinaptogénesis y mielinización, así como en la regeneración nerviosa (Bondy y cols., 1990).

Por su importancia en esta tesis en el siguiente capítulo se abordará más ampliamente al factor de crecimiento Insulínico tipo I (IGF-I).

CAPITULO II. FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINICO TIPO I (IGFI)

Generalidades

La familia de Factores de Crecimiento tipo Insulínico (IGF) consiste en: tres ligandos (insulina, IGF-I y el IGF-II), seis proteínas de unión (IGFBPs), y tres receptores (uno de insulina, un receptor a IGF-I y un receptor a IGF-II). Tradicionalmente, la insulina se considera responsable del control de procesos metabólicos como la regulación del metabolismo de los carbohidratos, en tanto que los IGFs son responsables del crecimiento y diferenciación durante el desarrollo embrionario y postnatal (LeRoith y cols., 1993, Beck y cols., 1995). Se sugiere que los IGFs no sólo regulan el crecimiento en el cerebro, también juegan un papel importante en el mantenimiento del sistema nervioso maduro (Sara, 1992).

Usando diferentes métodos como la hibridización *in situ*, inmunohistoquímica y ensayo inmunoenzimático se ha identificado al IGF-I en el sistema nervioso central de ratas y humanos en desarrollo y adultos. Se han detectado neuronas inmunorreactivas a IGF-I en el cerebro postnatal y adulto de ratas en bulbo olfatorio, neocorteza, tectum, hipocampo, estriado, núcleo endopiriforme, amígdala, núcleo diencefálico, sustancia nigra, folículo mesencefálico, células de Purkinje de la corteza cerebral y tallo cerebral (Connor, 1998).

Además. los IGFs son sintetizados en otros tejidos, especialmente en tejidos fetales como corazón, pulmón, riñón, hígado, páncreas, bazo, intestino delgado, colon, cerebro e hipófisis. Los IGFs pueden actuar de manera endócrina, o autócrina/parácrina. Su síntesis en muchos tejidos esta regulada por la somatotropina u Hormona de crecimiento. La concentración en el plasma de IGF-I libre es de 1%, y su vida media es de 10 a 20 minutos. Los IGFs se unen a proteínas de unión conocidas como IGFBPs (Insulin-Like Growth Factor Binding Protein por sus siglas en ingles), estas son seis proteínas solubles, las cuales comparten características estructurales y poseen dos regiones ricas en

cisteínas (Gutiérrez, 2001). En el plasma, el 99% del IGF está ligado a IGFBPs, dándole éstas una vida media de 18 horas. Las IGFBPs son sintetizadas en diferentes tejidos como hígado, útero, músculo liso y endotelio y son transportadas a través de la sangre a los órganos blanco (Dieguez y cols., 1992).

La acción de los IGFs se inicia con la unión a receptores específicos. Los receptores de IGFs están presentes en una gran diversidad de órganos y tejidos de mamíferos, como placenta, riñón y cerebro, entre otros.

Estructura

El IGF-I es un péptido constituido por 70 aminoácidos que forma una cadena simple unida por puentes de disulfuro (Figura 1), los aminoácidos están organizados en cuatro dominios conocidos como A, B, C, D (Figura 2). Estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio B participa en la unión de IGF-I a las IGFBPs. El dominio A, por otro lado, es indispensable para que IGF-I promueva la proliferación celular y el crecimiento tisular. Finalmente la substitución de los residuos tirosina en las posiciones 24, 31 y 60 de la secuencia primaria de IGF-I elimina la unión de éste a su receptor (Daughaday y Rotwein, 1989; Pimentel, 1994a y D'Ercole y cols., 1996a).

El peso molecular del IGF-I es de 7500 Da, mientras que el IGF-II es un polipéptido de 67 aminoácidos. El IGF-I y el IGF-II tienen una homología del 70% y sus dominios A y B son 50% idénticos a las cadenas A y B de la insulina humana (Gutiérrez, 2001).

El IGF-I incrementa la superficie y estimula a las neuritas a crecer del centro hacia la periferia de las neuronas; este efecto ha sido descrito en neuronas mesencefálicas dopaminérgicas, neuronas colinérgicas del cerebro medio y motoneuronas de la médula espinal. Al igual que otros factores de crecimiento, el IGF-I incrementa la supervivencia y la síntesis de mielina en cultivos de oligodendrocitos (Beck y cols., 1995).

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso central la expresión del IGF-I en neuronas de varias regiones del cerebro coincide temporalmente con períodos de proliferación de las células precursoras de las neuronas. Esto, aunado a que se sabe que el IGF-I estimula la proliferación y/o la sobrevivencia de neuronas y oligodendrocitos en cultivo y que los ratones transgénicos, con sobreexpresión de IGF-I, tienen un sobrecrecimiento cerebral sin anomalías anatómicas, sugiere que el IGF-I puede influir en el desarrollo de casi todas las regiones del cerebro (D'Ercole y cols., 1996b).

Además, el IGF-I media algunos de los efectos de la hormona somatotropina sobre el crecimiento somático, participa en las funciones reproductivas promoviendo la maduración de algunos linajes celulares gonadales, estimula la reabsorción del hueso regulando la actividad osteoclástica, funge como factor quimiotáctico de las células endoteliales promoviendo así la neovascularización y fomenta la proliferación de los precursores hematopoyéticos de la línea eritroide (Pimentel, 1994a).

También estimula la síntesis de prolactina en cultivos de hipófisis anterior, sugiriendo que juega un papel importante en la regulación de lactótrofos (Michels y cols., 1993).

IGFBPs

La actividad biológica de los IGFs se modula por una familia de proteínas estructuralmente similares conocidas como IGFBPs, que se han identificado tanto en la circulación como en los distintos tejidos blanco del IGF-I. Todas ellas se producen de manera local por tipos celulares específicos

presentes en los distintos tejidos. La modulación de los efectos de IGF-I por estas proteínas difieren en los distintos órganos y tipos celulares (ver tabla V). Por ejemplo, mientras IGFBP-2 potencia los efectos mitogénicos de IGF-I sobre condrocitos, la misma proteína producida por astrocitos bloquea la proliferación celular (Pimentel, 1994a; Jones y Clemmons, 1995; D'Ercole y cols. 1996b).

Las IGFBPs tienen varias funciones: (1) Prolongan la vida media en la circulación de los IGFs, (2) previenen la hipoglucemia inducida por el IGF, (3) regulan el paso de IGFs del espacio intravascular al espacio extravascular, (4) limitan la biodisponibilidad del IGF libre, (5) aumentan la acción de los IGFs al unirse a ellas y retrasan su liberación y (6) actúan sobre las células directamente a través de su propio receptor, independientemente de los IGFs (Collett-Solberg y Cohen, 2000).

Tabla V. IGFBPs y sus características (Tomada de Shimasaki y Ling, 1991)

IGFBPS	Peso molecular aproximado en kilodaltones (KDa) en rata, por electroforesis.	Tejido productor	Otros comentarios
IGFBP-1	Condiciones no reductoras 32	Hígado, riñón, próstata, útero, decidua, líquido amniótico	Involucrado en metabolismo de carbohidratos. Independiente de hormona de crecimiento.
IGFBP-2	Condiciones reductoras 34-36	Líquido cerebroespinal, múltiples tejidos neuronales, hígado estomago, riñón, pulmón intestino, músculo, corazón y tejido fetal (declina después del nacimiento) y cerebro (tallos, corteza e hipocampo),	Inhibe el crecimiento celular.
IGFBP-3	Condiciones reductoras Banda de 50 y Banda de 56	Hígado, riñón, estómago, corazón, ovario, bazo, suero.	Depende de la hormona de crecimiento y del estado nutricional.
IGFBP-4	Condiciones reductoras en humanos 36	Hígado, hueso, testículo, bazo, corazón, pulmón, riñón, estomago, hipotálamo y corteza cerebral.	Inhibe a los IGFs.
IGFBP-5	En humano 29-34	Riñón, hueso, tejido endócrino, testículo, estómago, bazo, corazón, pulmón, cerebro, hígado.	En la pubertad. Unido fuertemente a matriz extracelular.
IGFBP-6	En humano 34	Testículo, intestino, riñón, estómago, bazo, corazón, pulmón, cerebro e hígado	Mayor afinidad para IGF-II que IGF-I

Es importante hacer notar que los mismos tejidos que expresan IGF-I, producen en paralelo su receptor y algunas IGFBPs (Lee y cols., 1992; Bondy, 1991). Esto sugiere : 1) la existencia de un mecanismo parácrino y/o autócrino por medio del cual IGF-I ejerce sus acciones sobre sus órganos blanco, y 2) que las IGFBPs modulan los efectos de IGF-I directamente en el sitio en donde éste se expresa (Gutiérrez-Ospina, 1997).

En muchas áreas del cerebro, el patrón de expresión temporal y espacial del IGFBP-2 durante el desarrollo embrionario y postnatal se parece a la expresión del ligando IGF-I, lo que sugiere una importante interacción local (Bondy y Lee 1993). En el cerebro, la IGFBP-2 es la proteína de unión más abundante y está presente en altas concentraciones en el fluido cerebroespinal (Beck y cols.,1995).

Receptores

Los receptores a insulina e IGF-I son estructuralmente similares. Ambos receptores son sintetizados a partir de polipéptidos precursores de cadena simple que, ya sintetizados, se glicosilan y separan en las subunidades α y β (LeRoith y cols., 1993).

El receptor a IGF-I tipo I es un heterotetrámero glicosilado con una estructura similar al receptor de insulina. Está compuesto por dos subunidades α de 125 KDa y dos subunidad β de 90 KDa, unidas por puentes disulfuro, para formar un complejo β - α - α - β (Ver figura 3) (Pimentel E., 1994a).

Las dos subunidades α se localizan extracelularmente y contienen el sitio de unión al ligando. Las dos subunidades β contienen un dominio extracelular, uno transmembranal y un dominio citoplasmático. La porción citoplasmática de la subunidad β de los receptores de insulina e IGF-I contiene un sitio de unión para ATP y un dominio tirosina cinasa, que favorece la interacción con el ligando específico y la subunidad α del receptor. El mecanismo por el cual la unión del ligando induce este efecto es poco conocido, pero probablemente involucre un cambio conformacional en el

receptor (LeRoith y cols., 1993) (ver figura 3). Por ejemplo se ha descrito que el IGF-I estimula la autofosforilación de los receptores neuronales a IGF-I, las cinasas del receptor fosforilan una proteína intermediaria que a su vez activa a otras cinasas (S6, PKC ϵ) que inducen la síntesis de proteínas relacionadas directamente con el crecimiento neuronal y la diferenciación (Heidenreich, 1993).

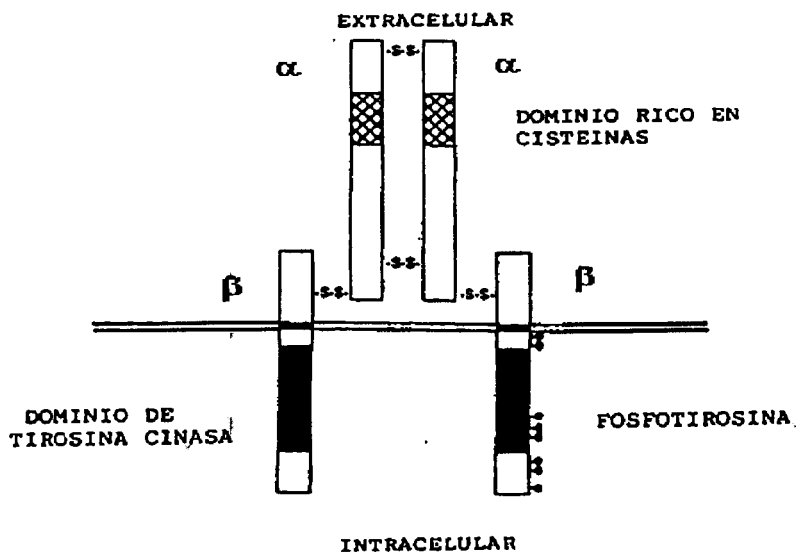


Figura 3.- Representación esquemática del receptor tipo 1 que es responsable de mediar los efectos de IGF-I sobre sus órganos blanco. Está constituido por dos subunidades α extracelulares responsables de unirse al IGF-I, y dos subunidades β con un dominio extracelular, uno intramembranal, y otro intracelular que poseen actividad de tirosina cinasa. La estructura terciaria del receptor tipo 1 para IGF-I es estabilizada por 4 enlaces disulfuro (s-s). (Tomada de Gutiérrez-Ospina, 1997).

El receptor a IGF-I está conservado en los vertebrados, lo que sugiere que regula funciones biológicas importantes que comparten las especies animales. Este receptor muestra diferentes patrones de expresión durante el desarrollo por lo que se considera que juega un papel importante durante la embriogénesis y organogénesis, además de sus funciones en el animal adulto (LeRoith y cols., 1993).

IGF-I en respuesta a un daño

El factor de crecimiento insulínico tipo I ejerce efectos benéficos en la regeneración del tejido. Desde 1986 Hansson y colaboradores publicaron datos que evidenciaron la importancia trófica del IGF-I en la regeneración de nervios periféricos. Los niveles tisulares de IGF-I se incrementan de manera transitoria en relación directa con el daño y, una vez rebasada la etapa de respuesta postlesión, descienden a la normalidad. En respuesta a una lesión del tejido nervioso adulto, de manera local se elevan los niveles del IGF-I, dando como resultado efectos neuroprotectores importantes encaminados a aumentar la población neuronal sobreviviente y facilitando el restablecimiento de la normalidad en el tejido (Macias-Islas y cols., 2000).

Se especula que después de un daño en el sistema nervioso central se activa un mecanismo endógeno que reduce la magnitud del daño. Esto puede incluir la liberación de neuromoduladores inhibidores. En estudios *in vitro* se ha examinado al IGF-I después de un daño y se han encontrado cambios en la expresión, tanto en IGF-I como sus proteínas acarreadoras, lo que ha permitido suponer que el IGF-I puede ser una neurotrofina endógena (Gluckman y cols., 1993).

Alexi y cols.,(1999) observaron que el GPE (glicina-prolina-glutamato, que es el tripéptido amino terminal del IGF-I) protege a las neuronas estriatales lesionadas tras un daño excitotóxico con ácido quínolinico, además de que es capaz de restaurar el daño, elevando los niveles de regeneración de las neuronas que han sido dañadas. Esto como resultado que las neuronas estriatales rescatadas recuperen la habilidad de expresar el fenotipo de calbindina y de las interneuronas colinérgicas y nicotina-adenina-dinucleótido-fosfato-diaforasa (NADPHd). El GPE previene también la pérdida de acetil transferasa de colina, glutamato descarboxilasa y somatostatina contenidas en las neuronas del estriado e incrementan también la cantidad de los niveles de óxido nítrico sintetasa neuronal (Alexi y cols.,1999).

El IGF-I también reduce el daño neuronal después de un daño isquémico. La administración de GPE 2 horas después del daño por hipoxia-isquemia en ratas adultas redujo el daño cortical y la pérdida neuronal de la subregión de CA1-2 del hipocampo y en el estriado se halló una tendencia hacia la reducción de la pérdida neuronal después del tratamiento. Esto sugirió que la adición de este tripéptido GPE ayuda a la recuperación de las regiones afectadas produciendo una actividad neuronal (Guan y cols., 1999).

Además se ha observado en ovejas de 117 y 124 días de gestación, que después de un daño isquémico bilateral, la administración de IGF-I inyectándolo al ventrículo lateral, reduce la pérdida neuronal en el estriado, en comparación con la administración del vehículo solamente. El IGF-I previene la pérdida de neuronas positivas para calbindina-28kd, acetil transferasa de colina, neuropéptido Y, óxido nítrico sintetasa y glutamato descarboxilasa, pero no protege a neuronas que expresan parvoalbúmina (Guan y cols., 2000).

CAPITULO III. GENERALIDADES SOBRE LOS GANGLIOS BASALES

En este capítulo se describirá brevemente la anatomía y fisiología de los ganglios basales ya que es en estos núcleos en donde nos interesa detectar al IGF-I.

Se denominan ganglios basales a un grupo de núcleo subcorticales que, por los síntomas clínicos que aparecen tras su lesión se han considerado siempre como centros motores (Rubia, 1998). Los principales componentes de los ganglios basales son: el estriado (caudado-putamen), el globo pálido, la sustancia nigra y el núcleo subtalámico (Figura 4) (Albin y cols., 1989). Existe en el estriado una segregación funcional: el caudado se vincula primordialmente con las funciones cognitivas, y el putamen con las motoras (Cardinali, 1992). En los roedores, esta diferenciación no existe y la diferenciación funcional parece darse entre distintas regiones del cuerpo estriado.

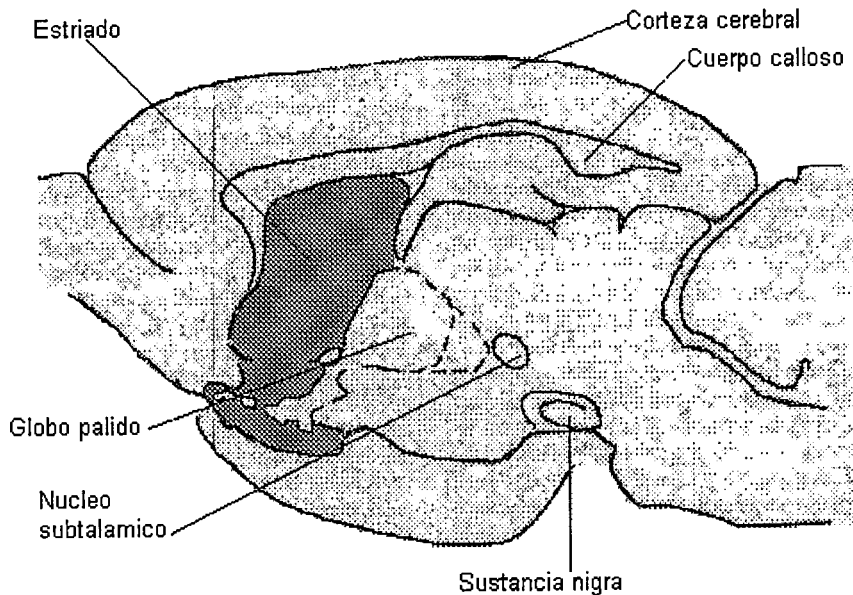


Figura 4.- Representación de algunas de las estructuras que forman parte de los ganglios basales en un corte parasagital del cerebro de ratona. (Tomada de Heimer y cols., 1995).

El estriado es el elemento "receptor" de los ganglios basales y sobre él convergen aferencias de casi todas las áreas de la corteza cerebral. Sus eferencias van hacia el globo pálido y a la sustancia nigra que constituyen el

elemento "eferente" de los ganglios basales. Estas eferencias se encaminan hacia los núcleos ventral lateral y ventral anterior del tálamo a través de los cuales los ganglios basales devuelven la información hacia la corteza cerebral manteniendo una organización somatotópica. De esta manera se establecen diversos circuitos funcionales entre corteza-ganglio basales-tálamo-corteza (Zarranz, 1998).

Aunque al estriado le falta una organización citoarquitectónica determinada, sus células están organizadas en compartimientos. Se han descrito dos niveles de organización compartimental. La primera, la agrupación de las células intrínsecas en regiones y compartimientos denominados parches y matriz. El segundo nivel, la separación de las proyecciones del estriado al segmento externo del globo pálido y a la sustancia nigra. Las neuronas intrínsecas del estriado son células espinosas de 12-20 μm de diámetro y con dendritas que se extienden con una longitud de 150-250 μm . Se conocen como neuronas medianas espinosas. Estas células son neuronas de proyección que representan la mayoría de las neuronas intrínsecas del estriado. Otras neuronas intrínsecas se pueden incluir en dos grandes grupos: las gigantes no espinosas que son colinérgicas (2%) y las interneuronas medianas divididas a su vez en dos grupos que expresan GABA y péptidos y las que expresan nicotina-adenina-dinucleótido-fosfato-diaforasa (NADPH-d) somatostatina y neuropéptido Y (Parent y Hazrati, 1995).

La corteza cerebral que envía sus aferencias al estriado formando la proyección corticoestriada utiliza glutamato como neurotransmisor excitatorio. La otra proyección al estriado es la proyección dopaminérgica proveniente del área tegmental ventral y de la sustancia nigra. Las células intrínsecas del estriado utilizan el neurotransmisor inhibitorio GABA en su proyección al globo pálido y a la sustancia nigra y expresan péptidos particulares. Las neuronas que se proyectan al globo pálido externo contienen una encefalina, las que van al globo pálido interno tienen sustancia P y dinorfina y la que llega a la sustancia nigra puede contener cualquier de los tres péptidos. El tipo neuronal principal del globo pálido es también GABAérgico, por lo que inhibe el núcleo subtalámico y la sustancia nigra. La vía estriado-sustancia nigra es pues una

vía inhibitoria tanto para las neuronas GABAérgicas como dopaminérgicas de la sustancia nigra aunque la inhibición hacia las células dopaminérgicas es menor (Rubia, 1998).

Los ganglios basales y el cerebelo están involucrados en el control de los sistemas motores corticales y del tallo cerebral. Se conoce desde hace mucho tiempo que los ganglios basales están asociados con trastornos del movimiento (corea, atetosis y balismos). Sin embargo, en la actualidad, se ha renovado el interés por el estudio de las funciones cognitivas del estriado y su participación en el aprendizaje (Alonso-Onofre, 1999).

CAPITULO IV. MÉTODO DE ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para el desarrollo de esta tesis fue necesario llevar a cabo diversas metodologías bioquímicas para la purificación y cuantificación de una proteína (IGF-I) en diversos tejidos. En este capítulo se abordarán los aspectos básicos de estas técnicas que van desde la extracción, cuantificación de proteínas, aislamiento e identificación por método de electroforesis e inmunotransferencia.

Método de extracción

La estrategia inicial para poder purificar y analizar una proteína depende de la fuente o tejido de donde se inicia la purificación. Por otra parte, la etapa inicial es la extracción de la proteína de interés de una muestra con gran cantidad y variedad de proteínas, después de romper las células mediante métodos como la homogenización. Dependiendo de las características de la proteína se requieren diferentes componentes en el amortiguador de extracción para que ésta sea eficiente.

En el caso del IGF-I se sabe que mediante una solución ácido-alcohólica (HCl 12.5%-Etanol 87.5%), se puede llevar a cabo la extracción de IGF-I de muestra de suero de ratas fetales y neonatales (Daughaday y cols., 1982). Vasilopoulou y cols. (1982) ha descrito otro método en el cual usan soluciones de ácido fórmico al 10%, acetato de amonio 0.1M y ácido acético 5M, para extraer IGF-I. Los resultados muestran una mejor extracción con el ácido acético 5M, lo que indica que el pH ácido favorece la extracción. Este hallazgo ha sido complementado por un trabajo posterior del grupo de D'Ercole y cols., (1984), en el cual se utilizó ácido acético 1M con pH desde 2.2, 2.6, 3.6 y hasta 4.2, para extraer el IGF-I de diferentes tejidos y observó que el pH óptimo para la extracción fue 3.6 y 4.2. Con base en estos resultados se seleccionó la metodología para la extracción (figura 5).

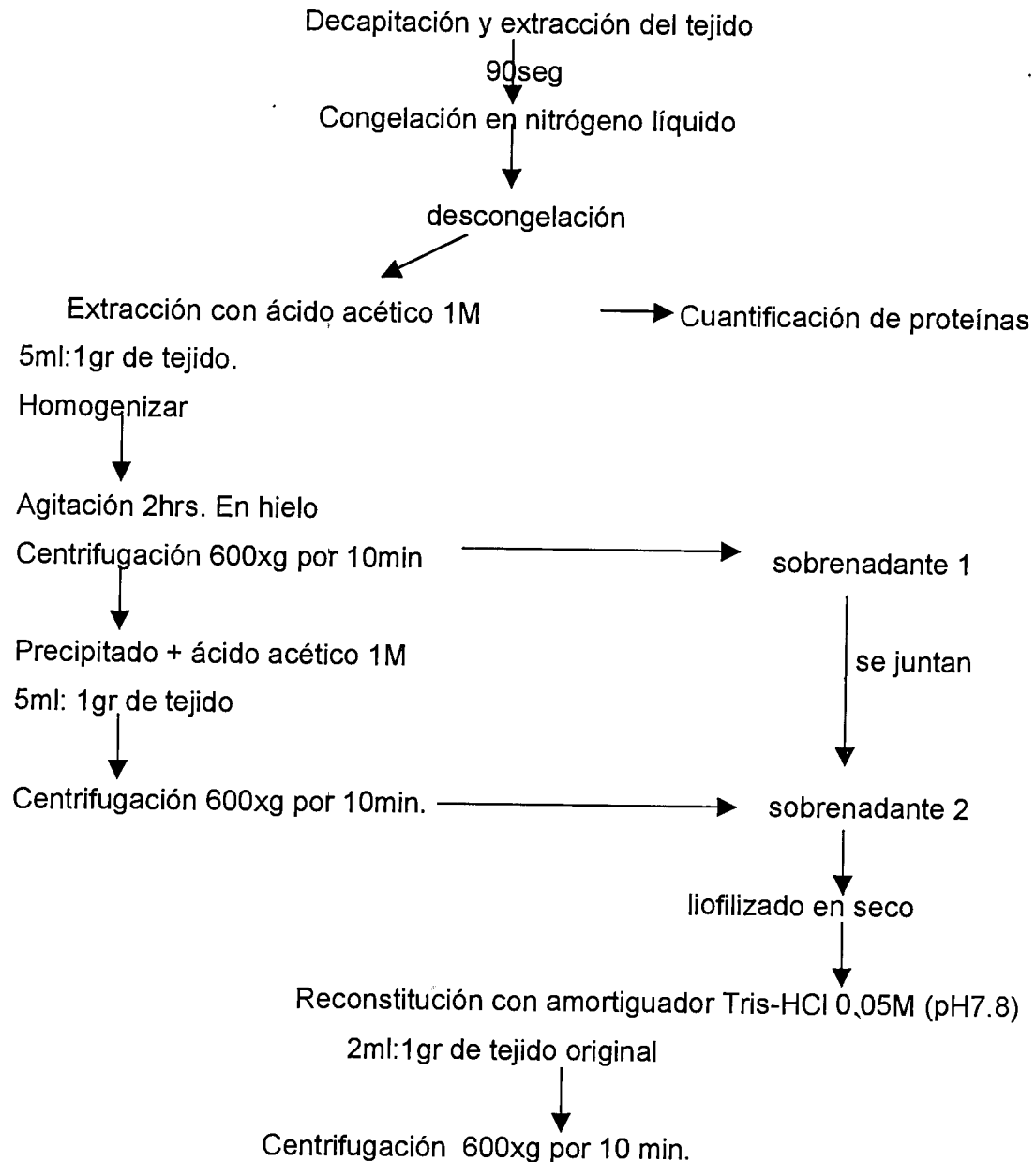


Figura 5.- Método de extracción por D'Ercole y cols. (1984) para la separación de las IGFbPs del IGF-I.

Cuantificación de proteína total

Los métodos más utilizados son colorimétricos y se basan en la acción de compuestos que al unirse generan un cromóforo que se puede cuantificar.

Utilizando un intervalo específico de concentración de proteínas se cuantifica el aumento en la absorción que es proporcional a la concentración de proteínas (Copeland,1994).

El método de Bradford está basado en la unión del colorante con la proteína. El colorante contiene azul brillante de Coomassie G-250. Esta unión causa un cambio de absorción máxima de la solución colorida que va de 465 a 595nm y este incremento de absorbencia es el que se detecta. Este ensayo es reproducible y rápido. La unión de las proteínas y el colorante inicia en 2 minutos y es estable durante una hora. Tiene poca interferencia con los cationes (como sodio y potasio) y ninguna interferencia con carbohidratos (como sacarosa) (Bradford,1976).

Este método tiene varias ventajas como la rapidez y la sensibilidad. El intervalo de sensibilidad va de 1-200 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína en solución (Bollag y cols., 1996).

Separación de proteínas por electroforesis

Las proteínas suelen tener una carga neta positiva o negativa, que refleja los aminoácidos cargados que contienen. Si se aplica un campo eléctrico a una solución que contenga una molécula proteica, la proteína migrará a una velocidad que dependerá de su carga neta, de su tamaño y de su forma. Esta técnica conocida como electroforesis, se utilizó inicialmente para separar mezclas de proteínas tanto libres en soluciones acuosas como incluidas en una matriz sólida porosa tal como el almidón. A mediados de 1960 se desarrolló una versión modificada de este método conocida como electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Alberts y cols.,1996).

El gel está compuesto de una pequeña molécula orgánica (acrilamida) unida mediante enlaces transversos para formar una matriz molecular la preparación permite la polimerización a partir de los monómeros de acrilamida

(Karp, 1996). Esta matriz es inerte en la cual migran las proteínas (Alberts y cols.,1996).

Se pueden usar geles con un gradiente en la concentración de acrilamida que, tiene la ventaja de que incrementa el intervalo de peso molecular de las proteínas por separar y por la alta concentración de acrilamida se forman bandas nítidas (Bollag y cols., 1996). El tamaño del poro del gel puede ajustarse de forma que sea el adecuado para retrasar la migración de las moléculas proteicas de interés (Alberts y cols.,1996).

Cuanto mayor sea la densidad de carga, la proteína avanza con mayor fuerza a través del gel y por lo tanto su velocidad de migración es más rápida. Sin embargo puesto que la poliacrilamida forma una red molecular con enlaces transversos, cuanto mayor sea la proteína más se enredará conforme avanza y por lo tanto menor será su velocidad de movimiento, por lo tanto, la capacidad de una proteína de determinado tamaño para desplazarse a través del gel depende de la concentración de la poliacrilamida empleada para constituir la red (Karp,1996).

El gel puede ser homogéneo (continuo) o heterogéneo (discontinuo). El sistema homogéneo tiene el mismo pH en el amortiguador de la muestra, el gel y el amortiguador del electrodo. Mientras que en el sistema heterogéneo hay dos geles con diferentes pH donde un gel se le llama concentrador y el otro resolventor (Copeland,1994). Y tanto el homogéneo como el heterogéneo, pueden formarse con un gradiente de acrilamida.

Las proteínas se exponen antes y durante la electroforesis, al detergente duodecil sulfato sódico (SDS), este detergente se une a las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteicas, haciendo que se desplieguen las cadenas polipeptídicas, las diferentes moléculas proteicas o lipídicas y se disuelven libremente en la solución del detergente. Además se puede añadir un agente reductor como el 2-mercaptoetanol con objeto de romper los enlaces S-S que pudieran existir en las proteínas, de forma que pueden analizarse

separadamente todo los polipéptidos constitutivos de las moléculas que tengan varias subunidades (Darnell y cols.,1993).

La muestra de proteínas se prepara en solución de sacarosa o glicerol cuya densidad evita que la muestra se mezcle con el amortiguador en el compartimiento superior (Karp, 1996).

Las ventajas de este método son: bajo costo, es reproducible y rápido en cuanto a semicuantitativo, comparación y caracterización de proteínas. Este método se usa para analizar la pureza de las soluciones proteicas proteínas, verificación de concentración de proteínas, detección de proteolisis y detección de proteínas modificadas (Bollag y cols.,1996).

Métodos de detección de proteínas por inmunotransferencia

EN 1979 Towbin y cols. introdujeron un método de inmunodetección de proteínas eléctricamente transferidas de un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Esto se lleva acabo bajo un campo eléctrico y una solución conductora conocido como amortiguador de transferencia que contiene metanol. Este último contrarresta la deformación del gel, disminuyendo el tamaño del poro del gel de poliacrilamida y facilitando la disociación del complejo SDS-proteína, además, incrementa la interacción hidrofóbica entre la proteína y la membrana, y de este modo se da la transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa (Maio, 1994).

Después de electrotransferir la proteína (antígeno), la membrana de nitrocelulosa es saturada con una solución bloqueadora que va a cubrir los sitios de unión inespecíficos. Después de incubar con un primer anticuerpo contra el antígeno transferido se incuba con un segundo anticuerpo el cual va dirigido contra el primer anticuerpo. Este segundo anticuerpo está marcado con una enzima (peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) que permite visualizar el complejo mediante la utilización de un sustrato. Los sustratos pueden ser cromogénicos, fluorescentes o quimioluminiscentes (Bollag y cols., 1996).

El método de quimioluminiscencia es muy sensible y se basa en la emisión de fotones que se registran en una película fotográfica. Este método permite detectar menos de un picogramo de proteína (antígeno) (Copeland, 1994).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que la presencia de IGF-I en diferentes tejidos embrionarios y adultos, en el cerebro declina después del nacimiento. Sin embargo, tras una lesión, mecánica o excitotóxica, la síntesis de este factor aumenta y la administración de IGF-I previene el daño inducido por lesiones excitotóxicas en el estriado. Por lo tanto, es posible que los niveles de IGF-I endógeno se incrementen después de lesiones excitotóxicas del estriado. El método de inmunotransferencia representa una herramienta para detectar y cuantificar el IGF-I en tejido y así determinar si después de la lesión excitotóxica en el estriado se incrementan los niveles de este factor de crecimiento.

OBJETIVOS

1. -Estandarizar el método de extracción del IGF-I en diferentes muestras de tejido (hígado y estriado).
2. -Evaluar semicuantitativamente por medio del método de inmunotransferencia la presencia de IGF-I en el estriado lesionado de rata albina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Sprague Dawley* de 67 días de edad, de 250-300g de peso corporal, mantenidas antes y después de la lesión en cajas individuales con agua y alimentación *ad libitum*, en un ciclo luz-oscuridad invertido (la luz se enciende de 22:00 – 10:00 hrs.).

Grupos experimentales

Se utilizaron dos grupos de animales. Los experimentales y los controles, los animales del primer grupo recibieron una inyección unilateral de ácido kaínico en el cuerpo estriado, el grupo control no recibió ningún tratamiento.

Cirugía

Las ratas lesionadas fueron anestesiadas con un anestésico disociativo (mezcla de ketamina 70 mg/kg e hidrocloreuro de xilazina 6mg/Kg i.p.); una vez anestesiada cada rata, se le rasuró el pelo de la piel del cráneo y se colocó en el aparato estereotáxico. Se procedió a efectuar una incisión de 1.5 cm en la piel que recubre el cráneo y se hizo una trepanación en las siguientes coordenadas con respecto a Bregma de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986): Anterior- posterior: 1.5 mm; medial-lateral: -2.6mm; dorsal-ventral: -4.5mm.

La microinyección se realizó mediante una bomba de infusión marca KD Scientific modelo 200, acoplada a una jeringa Hamilton de 50 μ l, conectada a través de un tubo de polietileno calibre PE-20 a una aguja dental #27, que fue introducida al trepano realizado anteriormente. La microinyección se realizó de manera unilateral en el estriado derecho a una velocidad de 0.2 μ l/min. inyectando ácido kaínico (Sigma) (5nm/0.5 μ l de amortiguador de fosfatos). Al terminar cada microinyección, se mantuvo durante un minuto la aguja para permitir la difusión de la solución, el estriado contralateral sirvió como control.

Quince días después de la administración de ácido kaínico, los animales experimentales se sacrificaron por decapitación. Se disecó el cerebro para obtener el cuerpo estriado, que se pesó y se congeló en nitrógeno líquido (el tiempo de sacrificio y disección fue alrededor de 90 seg.). También se disecó el hígado que fue usado como control positivo.

Procedimiento

Se llevaron cabo las inmunodetecciones en punto (Dot blot), para los anticuerpos anti-IGF-I que se utilizaron para el método de inmunotransferencia, para determinar la concentración del anticuerpo y estándar a utilizar.

Con base en el método de extracción de D'Ercole y cols. (1984) (figura 5) y con algunas modificaciones se llevaron a cabo las primeras inmunotransferencias para tejido cerebral e hígado (figura 6). También se determinó la cantidad mínima-máxima de estándar IGF-I recombinante humana (rhIGF-I) y de extracto de proteína para usar en los geles.

Reactivos

IGF-I recombinante humana, anticuerpo monoclonal (clona 8EG donado por Genetech Inc.) y anticuerpo policlonal anti IGF-I (Chemicon). El anticuerpo secundario fue anti-IgG-HRP (marcado con peroxidasa de rábano) generado en cabra contra ratón para el anticuerpo monoclonal y contra conejo para el policlonal. Sustrato quimioluminiscente (ECL).

Inmunodetección de punto (Dot blot)

Usando dos concentraciones de rhIGF-I (0.5 y 1.0mg, en 10 μ l) como antígeno se probaron varias diluciones (1:100 – 1:2000) de los anticuerpos primarios anti-IGF-I, se incubaron durante 60 minutos. Después se lavaron con TPBS 1X y se incubaron con el segundo anticuerpo (anti-IgG-HRP 1:2000), durante 1 hora. El revelado se obtuvo por la reacción enzimática de la peroxidasa de rábano con la diaminobencidina y peróxido de hidrógeno.

Extracción

El método usado por D'Ercole y cols. (1984) (figura 5), fue modificado de la siguiente manera:

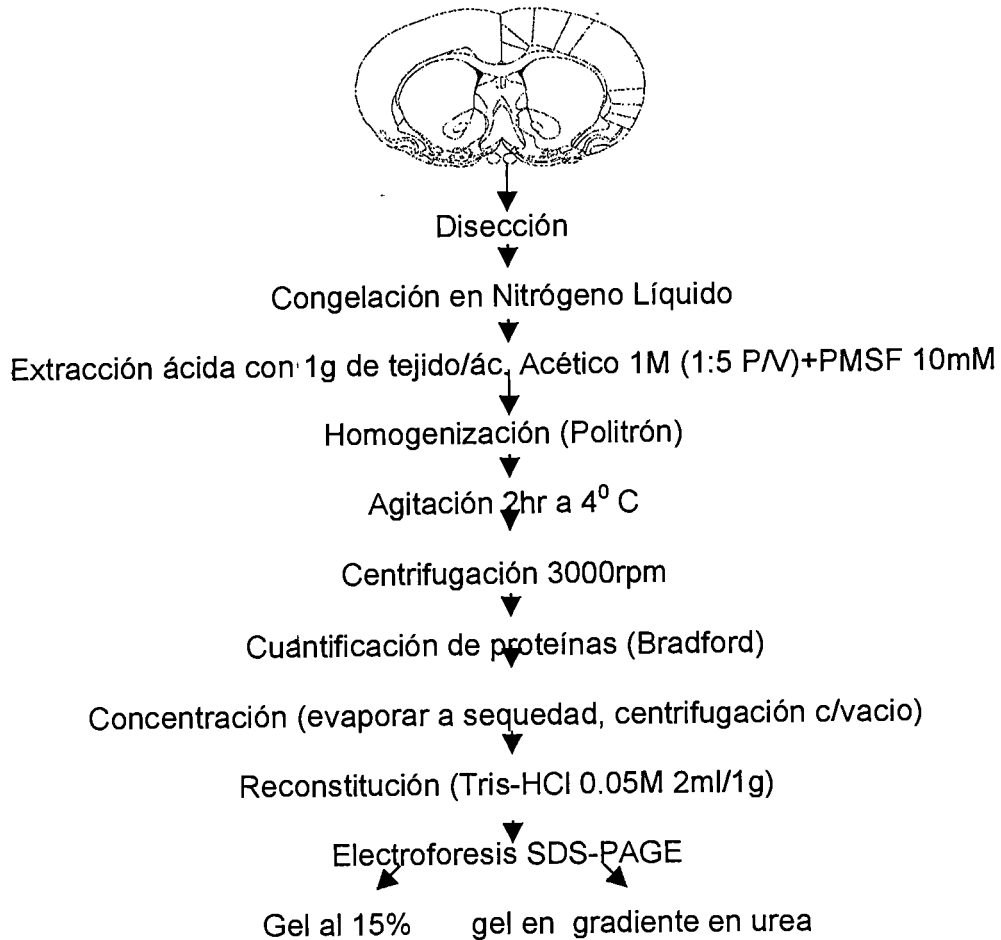


Figura 6.- Método modificado para la extracción del IGF-I.

A lo largo del proyecto fue necesario hacer cambios importantes en el método, ya que los resultados no fueron óptimos (figura 6). Tomando como base el método descrito por D'Ercole y cols. (1984), se especificarán los cambios que se hicieron en este método en la sección de resultados para facilitar su comprensión.

Inmunotransferencia

Las muestras fueron sometidas a una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en condiciones reductoras (en presencia de 2-mercaptoetanol). Se usaron inicialmente geles del 15% y posteriormente geles en gradiente de 10-20%.

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se electrotransferieron en membranas de nitrocelulosa durante una hora a 200mA. Posteriormente fueron inmunodetectadas con un anticuerpo monoclonal o bien policlonal contra IGF-I humano y un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano (HRP). El revelado se realizó utilizando un sustrato quimioluminiscente (Western blotting detección reagents ECL).

El análisis de los luminogramas se llevó a cabo mediante densitometría digitalizando la imagen con el scan AGFA Duoscan T1200 y se analizó con el programa Gel Analysis and Densitometry para Macintosh (IPLab Gel versión 2.2).

RESULTADOS

Utilizando ambos anticuerpos se pudieron detectar puntos inmunoreactivos a las diluciones de 1:1000 del anticuerpo monoclonal (clona 8EG) (figura 7) y 1: 500 para el policlonal (figura 8). En estas figuras se muestran los resultados de la titulación de éstos anticuerpos por el método de inmunodetección en punto (Dot blot).

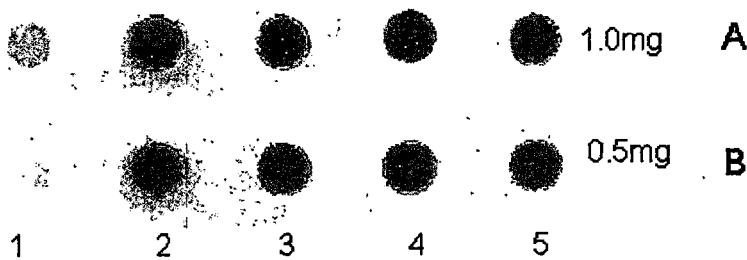


Figura 7.- Inmunodetección en punto. Para el anticuerpo monoclonal (clona 8EG, Genetech Inc.). En la fila A se agregó 1mg de rhIGF-I y en la fila B 0.5mg de rhIGF-I. En la columna 1 no hay rhIGF-I, las columnas 2 se usó una dilución 1:100; en la columna 3, 1:500; en la columna 4, 1:1000; en la 5, 1:2000 del anticuerpo.

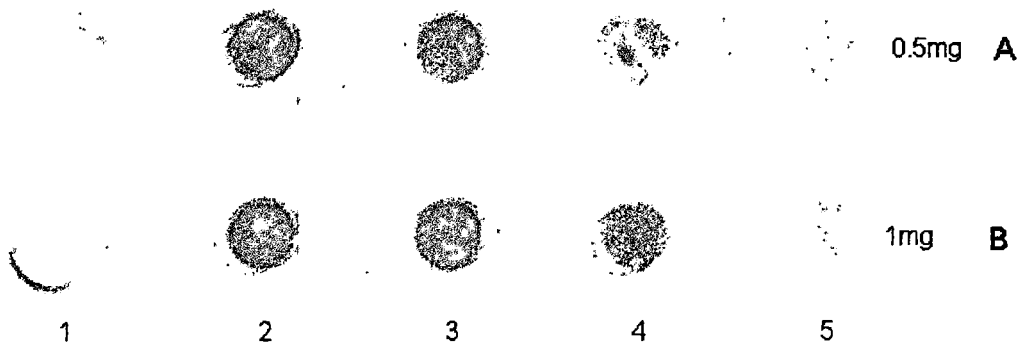


Figura 8.- Inmunodetección en punto. Para el anticuerpo policlonal (CHEMICON). En la fila A se agregó 0.5mg de rhIGF-I y en la fila B 1mg de rhIGF-I. En las columnas: 1 no hay rhIGF-I, 2 se uso una dilución 1:50, en la columna 3, 1:100; en la columna 4, 1:500 del anticuerpo y en la columna 5 no hay segundo anticuerpo.

Se determinó la cantidad de rhIGF-I necesaria para ser detectado por inmunotransferencia para cargar en los carriles. Se hizo una curva del estándar

de 33-1000ng (Figura 9). De acuerdo con los resultados obtenidos se decidió usar la concentración de 50ng por carril. El peso molecular aproximado para el estándar fue de 15 KDa.

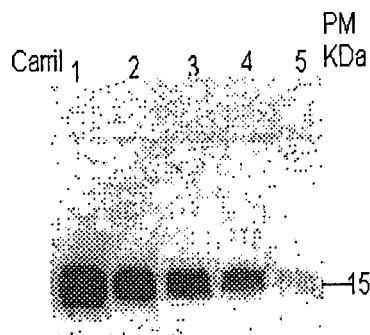


Figura 9.- Luminograma de la inmunotransferencia para rhIGF-I con anticuerpo monoclonal. Se muestran las diferentes cantidades del estándar rhIGF-I. En el carril 1) 1000ng; en el 2) 500 ng; en 3) 125 ng ; en 4) 62 ng y carril 5) 33ng.

Por otra parte, para determinar la cantidad de proteína necesaria para detectar por inmunotransferencia el contenido de IGF-I, se procesó el hígado de un animal como patrón. Se utilizaron concentraciones crecientes de proteínas (30-90 μ g) para hacer un gel. La figura 10 muestra el resultado de la inmunotransferencia, como se puede observar hay bandas inmunoreactivas con un peso molecular de 28 y 50 KDa. La densidad óptica muestra una correlación positiva con respecto a la cantidad de proteína usada (figura 11). Estos resultados muestran que 30 μ g de proteína son suficiente para su detección con este método y que hay una buena separación de las bandas entre 30 y 60 μ g de proteína total.

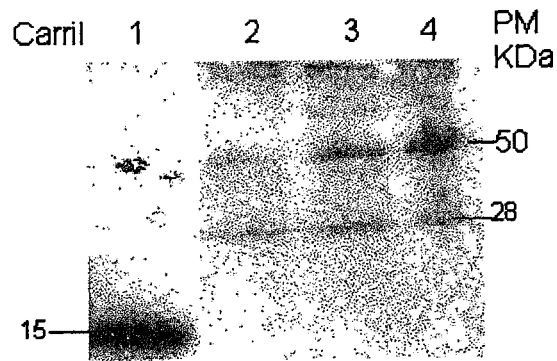


Figura 10.- Luminograma de la inmunotransferencia para IGF-I con anticuerpo monoclonal. Se muestra las diferentes cantidades de proteína total en hígado de animales experimentales. En el carril 1) rhIGF-I, (50ng); en el 2) 30μg de proteína total; en 3) 60μg de proteína total; y carril 4) 90μg de proteína de extracto.

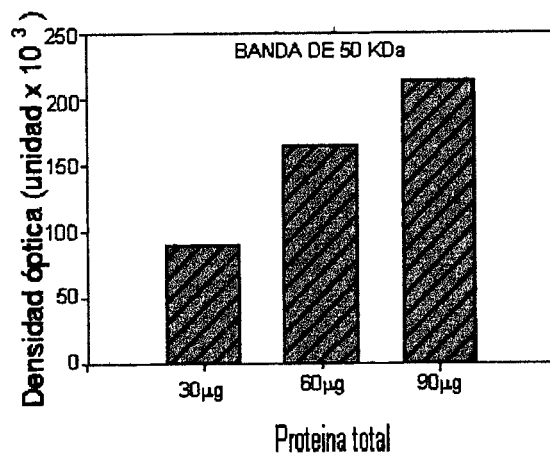


Figura 11.- Densitometría del luminograma de la cantidades de proteínas. Se muestra la densidad óptica de la banda inmunoreactiva de 50KDa para cada una de las cantidades de proteína total utilizada.

Método I

En este método el gel que se utilizó para la electroforesis fue unidimensional discontinuo de poliacrilamida a un porcentaje 15%. En el amortiguador de la muestra la concentración del Tris-HCl fue de 0.5M.

Se realizó un gel con sobrenadante de tejido de animales control centrifugado a dos velocidades. Las cantidades de proteína total fueron las siguientes: 100ng rhIGF-I (estándar) (carril 1); 54μg sobrenadante de hígado

(1200rpm) (2); 64 μ g Hígado 3000rpm (3); 58 μ g Estriado izquierdo (4); 68 μ g estriado derecho (5). Figura 12. En el hígado y el estriado se probaron sobrenadantes de 3000 rpm y para hígado también se probó el de 12000 rpm para determinar con cual teníamos una mayor cantidad y una mejor separación del IGF-I.

Los resultados muestran bandas inmunoreactivas al anticuerpo contra IGF-I en los pesos moleculares de 122 y 86 KDa. Es posible que la de 122 KDa incluya al complejo de IGF-I y las IGFBPs, que corresponde a las 6 proteínas unidoras y la de 86 KDa a la unión de dos o más IGFBPs con el IGF-I o bien agregada con otra proteína.

La densitometría muestra que en hígado se encuentran bandas de proteínas inmunoreactivas de 122 KDa y de 86 KDa, en tanto que en el estriado control se encuentran también las proteínas de 122 KDa y sólo en algunas muestras las proteínas de 86 KDa. Como lo muestran las gráficas de la figura 13, hay una mayor cantidad de proteína en el hígado con respecto al estriado.

Como se puede observar con este método no se logró separar el IGF-I de otras proteínas que pudieran ser las proteínas unidoras. Por otra parte, el estándar (rhIGF-I) migró a un peso molecular de aproximadamente 21 KDa. Tres veces más alta que el reportado en la literatura (7.5 KDa).

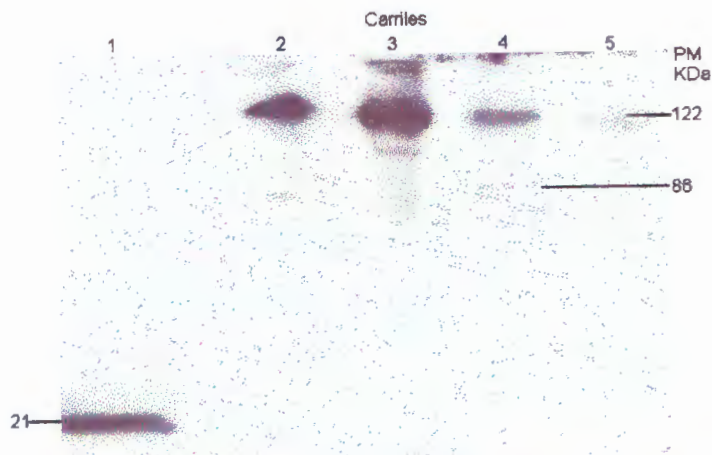


Figura 12.- Luminograma de la inmunotransferencia para IGF-I usando el método I y el anticuerpo monoclonal. El carril 1 muestra rhIGF-I (100ng); los carriles 2 y 3 hígado; carril 4 estriado control izquierdo; carril 5 estriado control derecho. Se puede observar que la banda inmunoreactiva se encuentra a un peso molecular mucho más alto que el del peso del IGF libre (7.5 KDa).

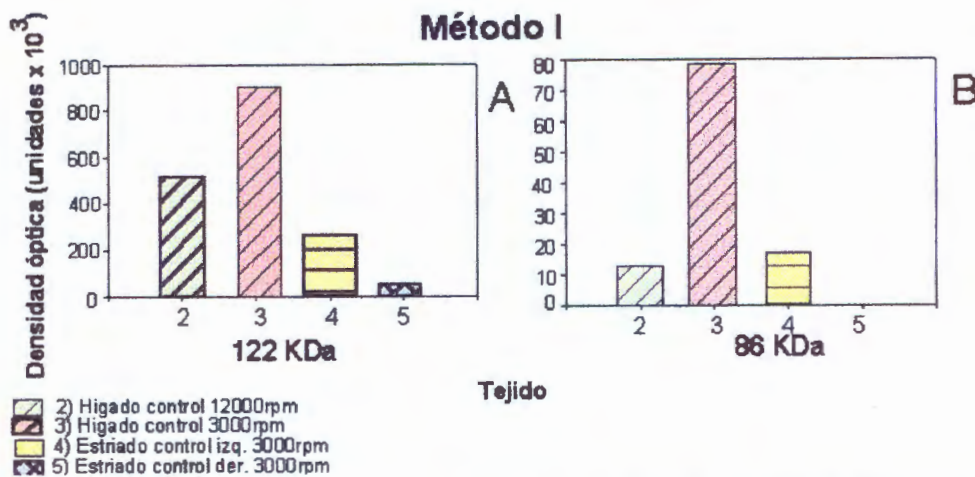


Figura 13.- Densitometría del luminograma para el método I. Se muestra la densidad óptica de las bandas inmunoreactivas de 122 KDa (A) y 86 KDa (B) para cada uno de los carriles. Es evidente la mayor concentración de proteínas en el hígado en comparación con el estriado.

Método IA

La modificación que se hizo en este método fue el uso de un gel de gradiente y la adición de urea (8 M) al gel. Se preparó un gel utilizando diferentes concentraciones de acrilamida que fueron al 10% y 20% en el gel

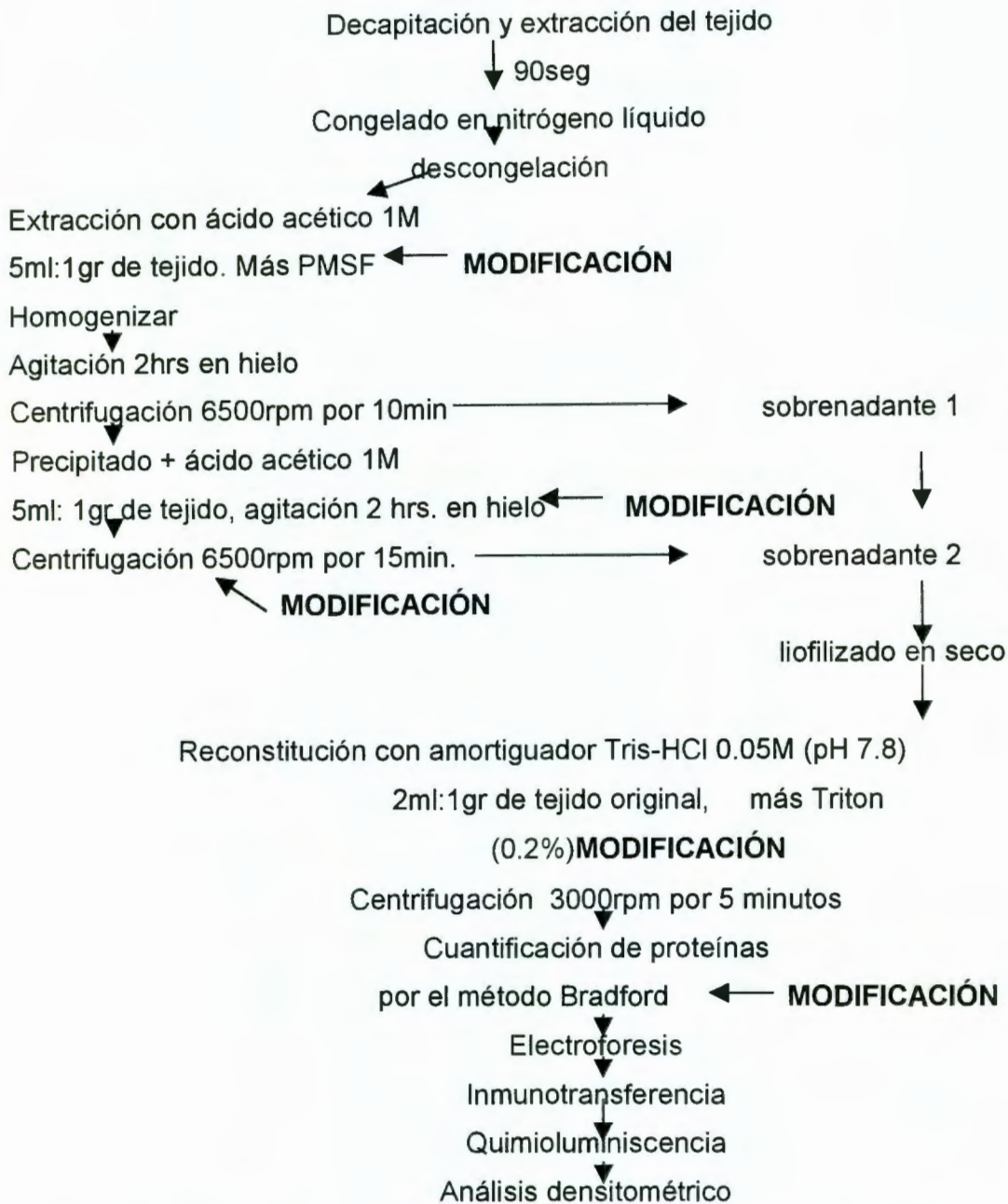


Figura 14.- Adaptaciones al método de extracción descrito por D'Ercole y cols., (1984).

Para mejorar la separación de la proteína se utilizaron geles en gradiente de 10-20%. Se utilizaron alícuotas de 50µg de proteína total por carril.

Con este método se observaron bandas inmunoreactivas al IGF-I de un peso aproximado de 50 y 28 KDa. Estos resultados permiten señalar que los pesos moleculares de las muestras y el estándar de rhIGF-I (peso 15 KDa)

corrieron en pesos moleculares menores a los observados con el método I. En el caso del patrón el peso molecular al cual se detectó se acerca más al peso molecular que es de 7.5 KDa (Figura 15).

La banda de 50 KDa se presentó solamente en los estriados control, mientras que la banda de 28 KDa se presentó en todas las muestras incluyendo al estriado lesionado. El análisis densitométrico mostró que esta última banda tiene una densidad similar en las cuatro muestras (figura 16).

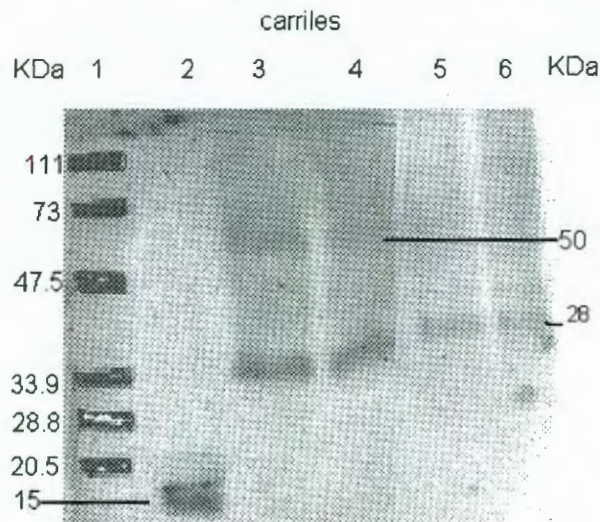


Figura 15.- Luminograma de la inmunotransferencia para IGF-I usando el método II y el anticuerpo monoclonal. El carril 1) muestra pesos moleculares de bajo rango; el 2) rhIGF-I (50ng); el 3) estriado control izquierdo; 4) estriado control derecho; 5) estriado kaínico; 6) estriado contralateral.

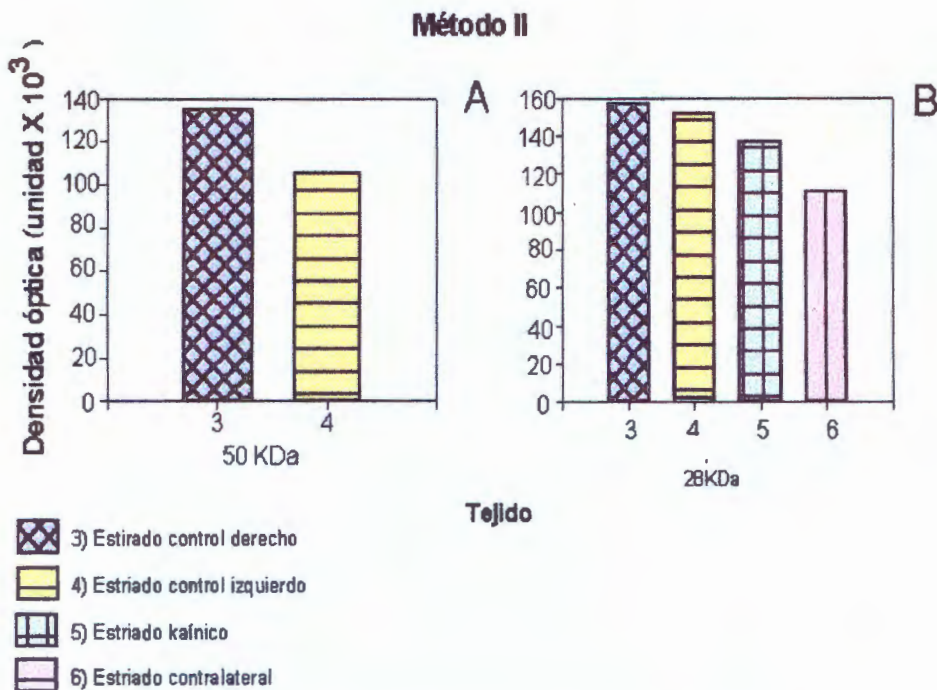


Figura 16.- Densitometría del luminograma para el método II. Se muestra la densidad óptica de las bandas inmunoreactivas de 50 KDa (A) y 30 KDa (B) para cada uno de los carriles.

Método II A

Con el objetivo de separar mejor esta proteína el método II se modificó en la etapa de la reconstitución, agregándole a las muestras $1\mu\text{l}$ MgCl_2 0.1M, por cada $200\mu\text{l}$ de Tris-HCl 0.05 M + Triton (0.2%) y se agitaron durante 1 minuto. Por otra parte, al preparar la muestra para someterla a electroforesis se incrementó la molaridad del amortiguador de la muestra a 2M (figura 17). Además se disminuyó la cantidad de proteína total de las muestras a $10\mu\text{g}$ por carril.

liofilizado en seco



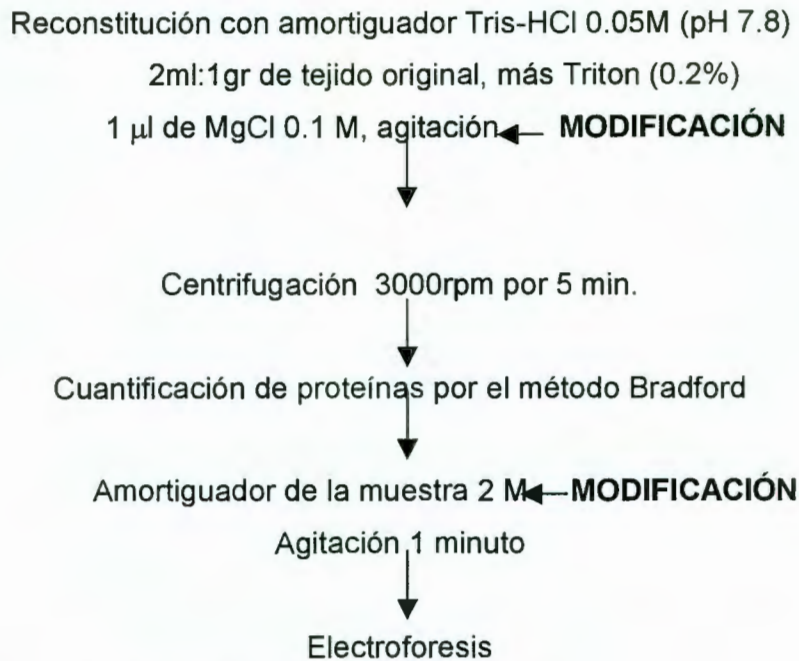


Figura 17.- Modificaciones al método II A.

Para poder determinar si el IGF-I se mantenía unido a otra proteína como las IGFbps, a las muestras se les agregó 50ng rhIGF-I antes de cargar el gel y se continuó con la inmunotransferencia.

Los resultados se muestran en la figura 18 donde se observan bandas inmunoreactivas de 30, 28, 21, 17 y 15 KDa. Cabe señalar que el IGF-I migra alrededor de 15 KDa en lugar de 7.5 KDa, tanto en el carril del estándar como en aquellos carriles en los que se les agregó este a la misma concentración que tiene el del carril 1 (50ng).

Este método permitió una mejor separación del IGF-I endógeno ya que las bandas de proteínas inmunoreactivas detectadas bajaron a 15, 21 y 28 KDa. La banda de 15 KDa se detectó en todas las muestras a las que se agregó IGF-I. La banda inmunoreactiva de 21 KDa se observó en todos los carriles y fue más evidente en aquellos a los que se les agregó el IGF-I exógeno. Estos resultados se correlacionaron con las diferencias en densidad óptica encontrada en esta banda (figura 19B). La concentración de proteínas con este peso molecular 21 KDa es mayor en las muestras de estriado control y estriado contralateral a las que se les agregó IGF-I exógeno (50ng) (carril 4 y

8) que en las muestras sin IGF-I exógeno (carril 2, 3,5 y 7). La banda de 28 KDa también presenta una mayor densidad en el estriado control con IGF-I exógeno (carril 4) en comparación con el estriado control sin IGF-I exógeno (carril 3) (figura 19).

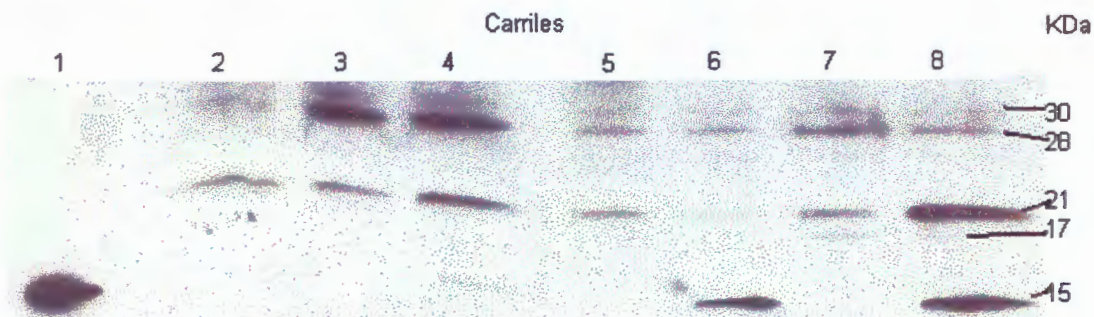


Figura 18.- Luminograma de la inmunotransferencia para IGF-I usando el método II A y el anticuerpo policlonal. El carril 1 muestra el rhIGF-I (50ng). Carril 2, estriado control derecho; carril 3 y 4 estriado control izquierdo; carril 5 y 6, estriado kainico; carril 7 y 8, estriado contralateral; a los carriles 4, 6 y 8 se les agregó rhIGF-I (50ng).

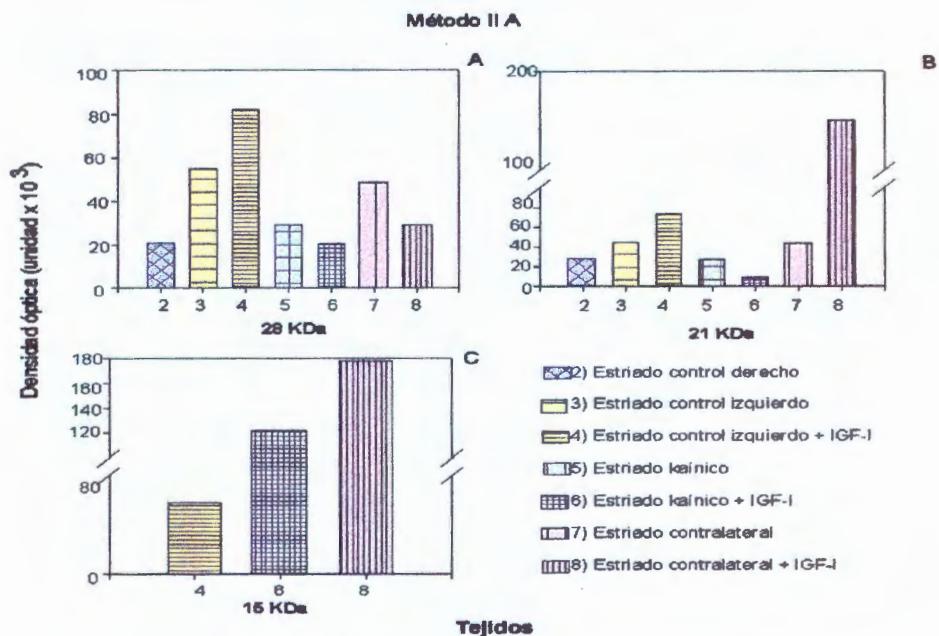


Figura 19.-Densitometría del luminograma para el método IIA. Se muestra la densidad óptica de las bandas inmunoreactivas de 28 KDa (A), 21 KDa (B) y 15 KDa (C) para cada uno de los carriles. Es evidente la mayor densidad óptica para los carriles que contienen rhIGF-I

exógeno. Sólo los carriles 4, 6 y 8 presentaron bandas inmunoreactivas para 15 KDa que corresponde al IGF-I exógeno (C).

Método II B

Se procedió igual que el método II A, sólo se modificó el tiempo de agitación cuando se le agregó el amortiguador de la muestra (2M); el tiempo fue de 30 minutos (figura 20).

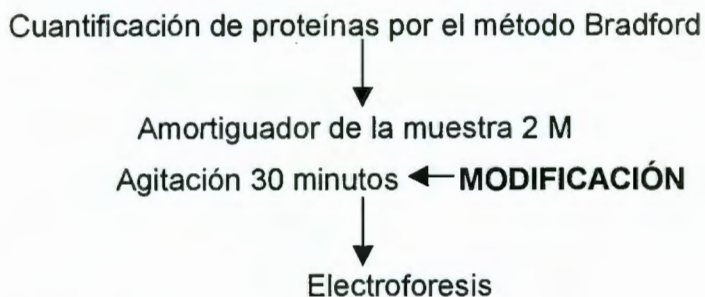


Figura 20.- Modificación del método II B.

Se observaron bandas inmunoreactivas con pesos aproximados de 116, 105, 90, 70, 67, 50, 30, 21 y 15 KDa; el de 15KDa pertenece al estándar de IGF-I (Figura 21)

Las proteínas inmunoreactivas de 21 KDa y 70 KDa se presentaron en todos los tejidos (figura 22 A y B). Donde hay mayor cantidad de IGF- I, para la banda de 21 KDa fue en los carriles 3 (estriado control izquierdo) y 6 (estriado contralateral) (figura 22B). La banda inmunoreactiva de 30 KDa sólo se presenta en los carriles 5 (estriado kaínico) y 6 (estriado coontralateral) (figura 21), que pertenece a los animales experimentales.

Con este método se puede apreciar una mejor separación de las bandas inmunoreactivas detectadas con el anticuerpo policlonal contra IGF-I.

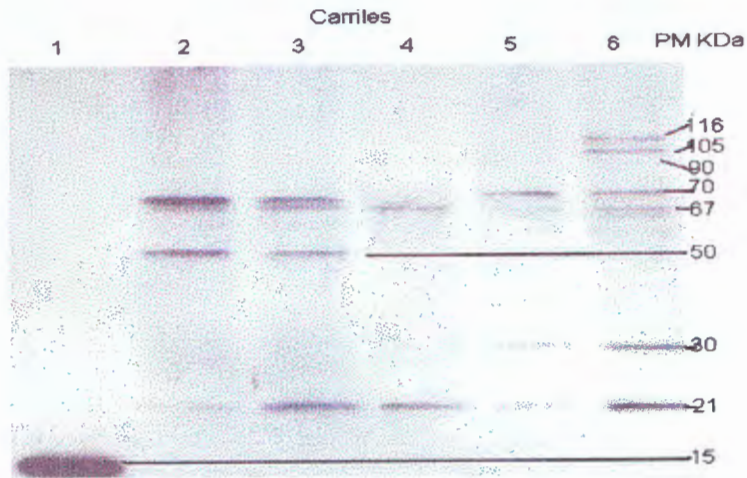


Figura 21.-Luminograma de la inmunotransferencia para IGF-I usando el método II B y el anticuerpo policlonal. El carril 1 muestra rhIGF-I (50ng); el carril 2 estriado control derecho; carril 3 estriado control izquierdo; carril 4 hígado; carril 5, estriado kaínico; carril 6 estriado contralateral.

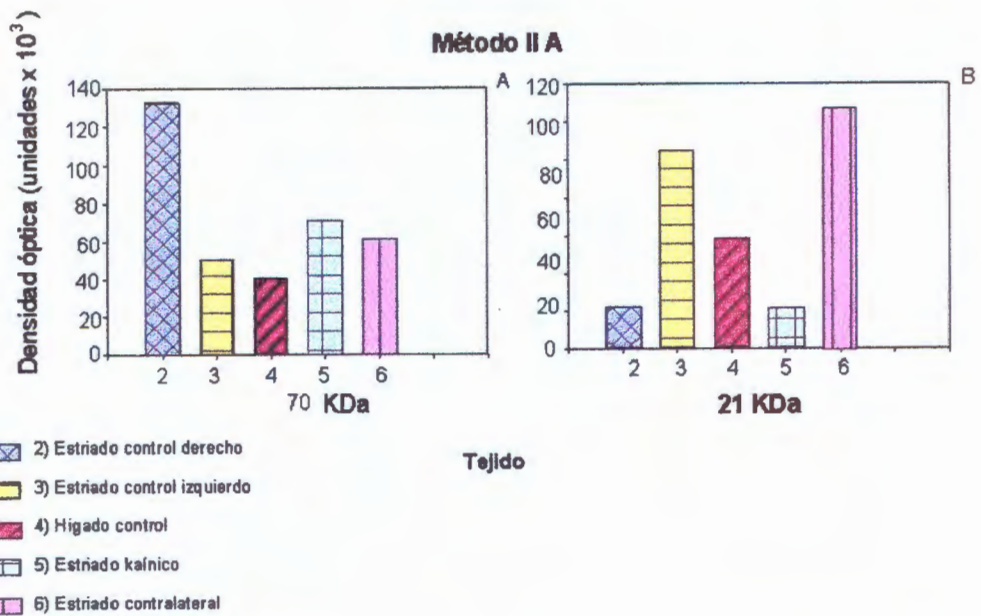


Figura 22.- Densitometría del luminograma para el método II B. Se muestra la densidad óptica de las bandas inmunoreactivas de 70 KDa (A) y 21 KDa (B) para cada uno de los carriles.

Método II C

A pesar de tener una buena separación de las bandas inmunoreactivas a IGF-I se realizó otra nueva modificación al método II B. Se incrementó el tiempo (una hora) de agitación para tener una mejor solubilización de los complejos con IGFBPs (figura 23) y ver si se podría detectar una banda inmunoreactiva al mismo peso molecular que el estándar.

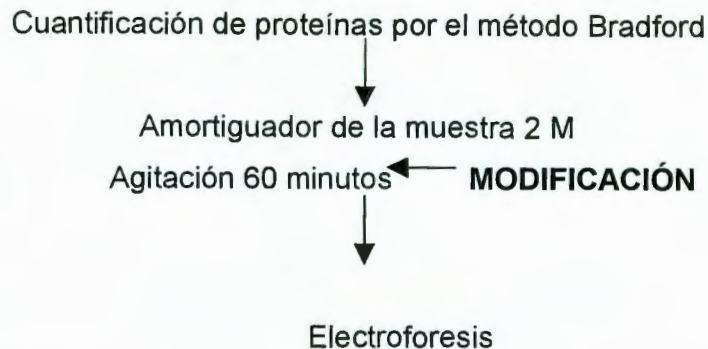


Figura 23.- Modificaciones al método II C.

En este experimento la banda inmunoreactiva de 15 KDa se presentó tanto en el estriado control izquierdo y los estriado kaínico y contralaterales (figura 24). El estriado kaínico también presentó bandas inmunoreactivas para los pesos de 15, 21, 30, 67, 70, y 94. Al comparar éstas para el hígado, se puede observar que no se encuentran las bandas de 15 ni de 30 KDa. Con respecto al estriado de los diferentes animales, se muestra una mayor densidad para la banda de 15 KDa en los animales con kaínico y su contralateral.

En la figura 25 A y C se muestra la densidad óptica de las bandas inmunoreactivas de 90 y 21 KDa; como se puede observarse, se detectó la mayor densidad en el estriado de los animales tratados con ácido kaínico, seguido del estriado contralateral de estos mismos animales (figura 25 D). En contraste para la banda de 70 KDa la mayor densidad se observó en el hígado y en los estriados de los animales control.

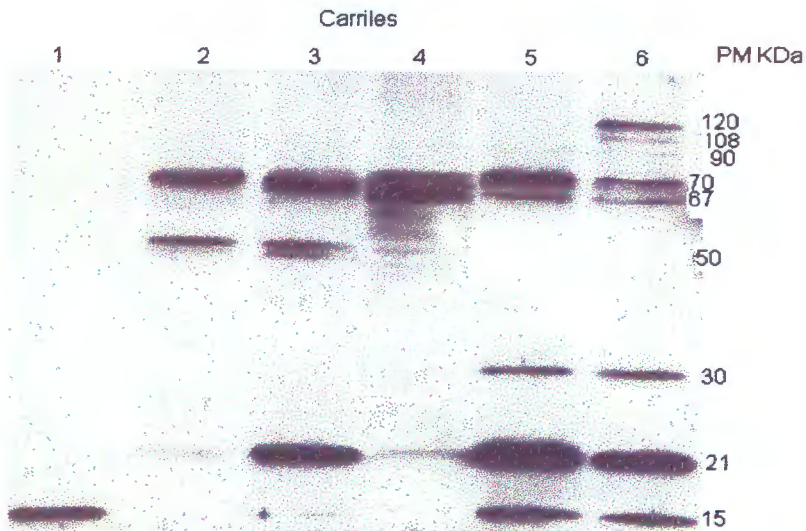


Figura 24.- Luminograma de la inmunotransferencia para IGF-I usando el método II C y el anticuerpo policlonal. El carril 1 se muestra rhIGF-I (50ng); el carril 2 estriado control derecho; carril 3 estriado control izquierdo; carril 4 hígado; carril 5, estriado kainico; carril 6 estriado contralateral.

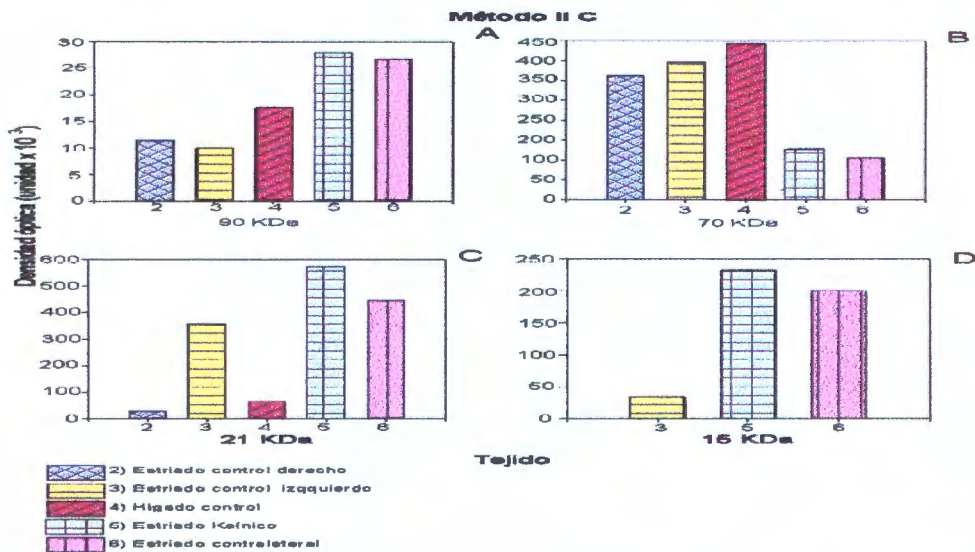


Figura 25.- Densitometría del luminograma obtenido por el método II C. Se muestra la densidad óptica de cuatro bandas inmunoreactivas de 90, 70, 21 y 15 KDa, En el carril 4 se muestra hígado, en los carriles 2 y 3 al estriado control en el 6 al estriado contralateral y en el 5 al estriado kainico.

Los factores de crecimiento se han definido como polipéptidos que actúan biológicamente a bajas concentraciones y por ello interactúan con proteínas transportadoras o unidoras cuyas funciones son las de prolongar la vida media y la de transportar los factores de crecimiento a sus órganos blanco. La estrecha interacción entre los factores de crecimiento y sus proteínas unidoras representan un problema para la detección de estos factores, ya que los complejos que se forman son de alta afinidad y es difícil separar sus elementos.

El principal logro de este proyecto fue obtener la separación de las proteínas transportadoras (IGFBPs) del IGF-I y obtener la extracción y semicuantificación del IGF-I, por inmunotransferencia tanto en cerebro como en hígado.

Villafan (2000) reportó el uso de inmunotransferencia para la detección de IGF-I en testículo de ratón; en ese estudio, detectó moléculas de pesos moleculares entre 100 y 30 KDa, pero no detectó moléculas de menor peso. Este autor sugiere que esas moléculas representan complejos de IGFBPs ya que el IGF-I tiene un peso molecular de 7.5 KDa. Salvo ese trabajo no se ha reportado el uso de inmunotransferencia de proteínas para el IGF-I y esto se debe a la complejidad de su separación.

El objetivo de este proyecto fue estandarizar un método que permitiera separar el IGF-I de sus IGFBPs y detectar y cuantificar el IGF-I. Con esta finalidad se utilizaron diversos métodos que involucraron modificaciones a métodos previamente estandarizados.

Con el método I, lo primero que se probó fue la velocidad de centrifugación después de la reconstitución de la muestra. Las velocidades probadas para el hígado fueron 3000 y 12000 rpm. Esto con el fin de recuperar mayor cantidad de IGF-I. Se observó que hay mayor recuperación con la velocidad de 3000 rpm para todos los pesos moleculares.

Con este método se detectó una banda inmunoreactiva de 122 KDa que podría incluir al complejo de IGF-I y hasta 6 IGFBPs y la de 86 KDa la unión de dos o más IGFBPs con el IGF-I. En la densitometría se observó una mayor concentración en el hígado que en los estriados. En el estriado se observó mayor densidad en el izquierdo que en el derecho en la banda de 122 KDa.

Para el método IA, se incorporó urea 8M al gel. La presencia de la urea en el gel interfirió con la resolución de la inmunotransferencia, además incrementó la tinción del fondo de la membrana y no permitió identificar las bandas inmunoreactivas, por lo que estos resultados no se presentan.

Método II, las modificaciones incluyeron la adición de PMSF (inhibidores de proteasas) para que el IGF-I libre no se degradara ya que se sabe que el IGF-I se degrada rápidamente por proteasas tisulares cuando se encuentra libre, es decir, cuando no está unido a sus proteínas transportadoras (IGFBPs)(Macías-Islas y cols., 2000) y se modificó la velocidad de centrifugación de 600xg por 10 minutos a 6500 rpm por 15 minutos. Además se adicionó Triton X-100 al amortiguador de reconstitución ya que con el Triton X-100 se mantuvo la solubilidad y se cuantificaron las proteínas para conocer de manera más certera la cantidad que se cargaba en el gel. Con este método se observó mayor densidad óptica en la banda de 50 KDa para los estriados control derecho en comparación con el izquierdo, así como mayor densidad en la banda de 28KDa en el estriado lesionado con el kaínico que en el contralateral.

Las bandas inmunoreactivas al IGF-I que se detectaron mostraron un peso molecular de 50 KDa sugiriendo que en esta banda se encuentra un complejo IGF-I con IGFBP-3, mientras que en la banda de 30KDa podría tratarse de una asociación entre IGF-I con la IGFBP-1 o IGFBP-5.

Los cambios incluidos en este método sí representan una mejoría en la inmunotransferencia, aunque todavía no se obtuvo una buena separación del IGF-I de sus proteínas transportadoras, ya que se detectaron bandas

inmunoreactivas de entre 50 y 30 KDa, mientras que el estándar (rhIGF-I) se localizó en la banda de los 15 KDa.

En el método IIA, la adición de cloruro de magnesio ($MgCl_2$ 0.1M) permitió una mejor separación de las proteínas ya que se obtuvieron pesos moleculares de 21KDa que no se habían detectado con los otros métodos. Esto se debe a que el magnesio se une a puntos específicos de las proteínas produciendo un cambio conformacional. En el caso de las proteínas unidoras, al modificarse liberan al IGF-I, permitiendo que se acerque más al peso molecular reportado en la literatura. Además, la adición del amortiguador de la muestra a una concentración más alta (2M), permitió el cambio de pH de la muestra de ácido a básico lo que facilitó que la proteína migrara homogéneamente, así como probablemente un cambio conformacional de la proteína que permitió la desnaturalización de las proteínas transportadoras y por ende la separación.

Usando este método se evaluó el efecto de la adición de IGF-I exógeno a la muestra. Al adicionar IGF-I exógeno a las muestras de estriado control, estriado lesionado con kaínico y estriado contralateral (figura 18, carriles 4, 6 y 8) se observó una banda inmunoreactiva de 15 KDa, igual al peso molecular que detecta el estándar de IGF-I. En estas muestras también se detectaron bandas inmunoreactivas de 21 y 28 KDa. Para esta última se encontró una mayor densidad en la muestra de estriado control con IGF-I exógeno, que en la muestra sin IGF-I exógeno (carriles 3 y 4). Para la banda de 21 KDa, en el caso del estriado control y el estriado contralateral con IGF-I, hay mayor densidad que en las muestras sin IGF-I exógeno (carriles 3, 4, 7 y 8). En la muestra de estos mismos tejidos sin IGF-I exógeno, no se detectó la banda de 15 KDa sino solamente las bandas 28 y 21 KDa (carriles 3, 5 y 7), aunque en el caso del estriado con kaínico la densidad de estas bandas es menor cuando se agregó IGF-I. Estos resultados sugieren, primero, que todavía el IGF-I endógeno no está migrando normalmente y que puede estar siendo atrapado por las IGFBPs presentes en la muestra, ya que la adición del IGF-I exógeno se refleja en un incremento en las bandas de 28 y 21 KDa, aunque una porción del IGF-I exógeno sí migra hasta los 15 KDa. Segundo, en el estriado lesionado

con kaínico, el IGF-I exógeno no parece estar siendo atrapado ya que la densidad de las bandas de 21 y 28 KDa no incrementan en comparación con la muestra sin IGF-I exógeno; sin embargo esta aseveración debe considerarse con cuidado ya que esta muestra de kaínico lesionado no presenta la mayor densidad en la banda de 15 KDa. Además se observó una asimetría entre el estriado derecho y el izquierdo en la densidad de las bandas de 21 y 28 KDa, siendo la densidad mayor en la muestra del estriado izquierdo. La banda de 28 KDa podría estar incluyendo al la IGFBP-5.

Con el método II B, se aumentó el tiempo de agitación lo que permitió que las bandas inmunoreactivas a IGF-I se desplazaran con mayor definición encontrándose en las bandas de 70 y 21 KDa para todos los tejidos. Para el peso de 70 KDa se observó una mayor densidad óptica en el estriado derecho y menor en el izquierdo y lo mismo ocurrió con en el kaínico y el contralateral, aunque aumentó la densidad en el contralateral comparando con el izquierdo control. Esto podría indicar que el estriado contralateral aunque no recibe la lesión directamente podría verse afectado por el daño excitotóxico y por ello empieza a producirse IGF-I para que se lleve a cabo una recuperación celular. En el caso del peso molecular de 21KDa se invierten los valores, es decir, la densidad óptica del estriado derecho es menor comparado con el izquierdo y en el kaínico y contralateral pasa lo mismo. De igual manera en el estriado contralateral aumenta la densidad óptica en comparación con el estriado izquierdo y podría ser una señal de recuperación.

Con este método hay una mejor separación y definición del IGF-I, donde se detectaron bandas con pesos moleculares de 70, 30 y 21 KDa.

Es importante señalar que hasta este momento aparecen bandas inmunoreactivas de 30 KDa sólo en los animales que recibieron el tratamiento con kaínico (figura 21). Esto sugiere que el daño causado por la excitotóxina pudiera estar afectando la producción de algunas IGFBPs y al no al estar éstas presentes, el IGF-I se libera y entonces se presenta el IGF-I libre sólo estos tejidos.

En el método II C, se aumentó el tiempo de agitación. Este estímulo mecánico puede romper algunos enlaces y permitir que el Mg se una a estos sitios y por lo tanto evitar que se agreguen las proteínas, lo que permitiría una mejor migración para que se presenten las bandas de 15 KDa que es en la que se presenta el estándar.

Para el peso molecular de 90 KDa se presentó el patrón de mayor densidad de IGF-I en el estriado control derecho y menor en el izquierdo, aunque aumentó en el kaínico y en el contralateral. Para el peso de 70 KDa hay mayor densidad en el estriado izquierdo que en el derecho, pero al observar la densidad óptica de los experimentales, disminuye la densidad en el estriado contralateral. Para el caso de 21 KDa la densidad óptica es menor en el estriado control derecho contra el kaínico que aumenta en densidad mientras que en el estriado control izquierdo es menor comparada contra el contralateral. Para el peso molecular de 15 KDa hay un aumento en el estriado tratado con kaínico y se observa que el contralateral también sufre un aumento mostrando que tanto el kaínico y el contralateral presentan esta banda después del daño excitotóxico. Como ya se mencionó con anterioridad, un aumento en la producción de este factor de crecimiento puede estar reflejando un proceso de recuperación después de la lesión excitotóxica. La densidad óptica de la banda de 15 KDa es equivalente a la de rhIGF-I que representa 50 ng (22×10^5 unidades).

La importancia de obtener un método con el cual se pueda extraer el IGF-I, estriba en la posibilidad de cuantificar y detectar otros factores de crecimiento que tengan la misma asociación con proteínas transportadoras.

Con los cambios realizados la detección es óptima, ya que usando la misma cantidad de proteína para todas las muestras, se puede observar diferencias en el patrón de bandas inmunotransferidas, como la banda de 30 KDa, que sólo se presenta en los animales lesionados con el ácido kaínico, mientras que en los demás tejidos no se presenta esta banda y la cual probablemente incluye a un complejo donde podrían estar asociadas IGFBP-5

e IGF-I. De igual manera en los tejidos lesionados no se encuentran bandas que estén presentes en las muestras controles como las de 50 KDa.

Diversos estudios realizados han demostrado la importancia que tiene el IGF-I en el desarrollo y después de un daño cerebral. Rotwein y cols. (1988) observaron los niveles de ARNm del IGF-I en los cerebros de rata por medio de un análisis de Northern Blot encontrando que los niveles son altos durante el desarrollo y que los niveles bajan gradualmente en la etapa adulta. Sara (1992) ha sugerido que el IGF-I puede producirse en neuronas y células gliales y que en el sistema nervioso adulto puede estar relacionado con la reparación de un daño celular. Así lo han demostrado Gluckman y cols (1993) al provocar un daño hipóxico-isquémico en ratas. Después de dos horas del daño, administraron 20 µg de rhIGF-I en el ventrículo lateral cerebral y observaron que hay una reducción significativa de la muerte celular, por lo que sugieren que el IGF-I actúa interrumpiendo algún mecanismo que retrasa la muerte celular. Así también, Guan y cols.,(1999) observaron una reducción en la amplitud del daño cortical y pérdida neuronal del hipocampo y el estriado. En un estudio posterior, Guan y cols., (2000) encuentran nuevamente que el IGF-I tienen un efecto similar en un modelo de isquemia en ovejas. Finalmente Alexi y cols. (1999) han observado que el IGF-I protege a las neuronas estriatales lesionadas tras un daño excitotóxico con ácido quinolínico.

Estos estudios apoyan entonces la hipótesis de que el IGF-I está involucrado en la reparación celular en el sistema nervioso adulto. Además hay evidencias de que la expresión de ARNm del IGF-I aumenta en el cerebro isquémico en particular en los astrocitos reactivos (Lee y Bondy, 1993). Su función en este contexto no se ha dilucidado pero se sugiere que participa ya sea en proveer la actividad de fagocitosis; como se planteó en este estudio podría jugar un papel en la reparación celular.

CONCLUSIONES

Este trabajo cumplió con el objetivo de encontrar un método para la técnica de inmunotransferencia que permitió detectar el IGF-I endógeno. Este método se basa en el descrito por D'Ercole (1984), con cambios sustanciales, los principales cambios fueron: en la extracción, la adición de detergente y cationes divalentes (Mg^{2++}); en la electroforesis el uso de geles SDS-PAGE en gradiente de 10-20% y cambiar la molaridad del amortiguador de la muestra (2M); y para la mejor separación, un mayor tiempo de agitación.

Con este método tanto el rhIGF-I como la proteína endógena se detectaron con un peso aproximado de 15 KDa.

El método de extracción con el que se obtuvieron mejores resultados consistió en el método II C, con el cual se logró separar diferentes bandas inmunoreactivas al anticuerpo del IGF-I. Aunque el peso reportado del IGF-I en la literatura es de 7.5KDa, en este trabajo se encontró en un peso de 15KDa, probablemente esto se deba a la formación de un dímero del IGF-I.

El segundo objetivo del trabajo fue detectar la presencia de IGF-I en el estriado de ratas lesionadas con ácido kaínico ya que hay evidencias preliminares de que el IGF-I se encuentra después de una lesión con esta toxina (Giordano y cols. 1999) y que este factor se incrementa luego de generar un daño isquémico. En algunos de los experimentos llevados a cabo se observó la presencia de IGF-I endógeno en el estriado de ratas lesionadas aunque también en el estriado contralateral. Puede ser que el daño producido por el ácido kaínico afecte no sólo el estriado lesionado sino también el estriado contralateral ya que se conoce que este excitotóxico puede afectar regiones lejanas al punto de administración o bien que en respuesta al daño en la región contralateral se estén llevando a cabo cambios compensatorios.

Con el anticuerpo contra IGF-I se detectaron varias bandas inmunoreactivas de diferentes pesos moleculares, que van desde 120 hasta 15 KDa; ningún peso molecular menor fue detectado. La posible explicación a este

patrón puede deberse a que estas bandas sean generadas por la unión de 2 o más moléculas de IGF-I. Así por ejemplo se podría obtener:

Molécula de IGF-I	
Monómero	7.5 KDa
Dímero	15 KDa
Trímero	21 KDa
Tetrámero	28 KDa

De manera alternativa, puede ser que el IGF-I esté acoplado a algunas de sus 6 proteínas transportadoras o IGFbps. Esto se sugiere con base en los experimentos realizados a lo largo de este trabajo. Por ejemplo, en el caso de la adición de un detergente aniónico como es el Triton X-100 que permitió disgregar proteínas de peso molecular mayor (122 KDa) a proteínas de menor peso de 56 y 36 KDa en el método II.

De esta manera, este estudio muestra que es posible detectar IGF-I en el estriado de las ratas usando el método de inmunotransferencia, pero que dada la estrecha relación entre rhIGF-I y sus proteínas transportadoras el uso de este método se dificulta por lo que se recomienda el uso de métodos adicionales para tener resultados óptimos.

ANEXOS

ANEXO I

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ENSAYO DE PROTEÍNAS *Bio-Rad*

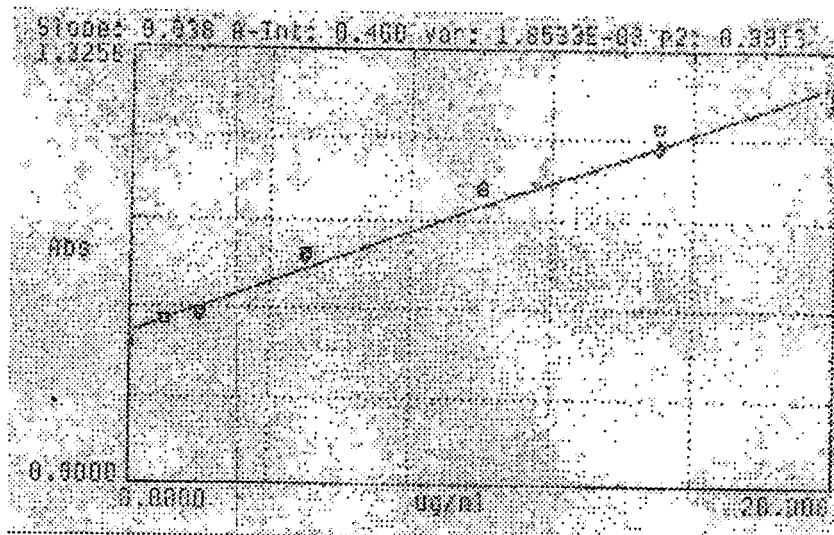
Procedimiento

- 1.- Preparar la solución concentrada de Albúmina Sérica Bovina (BSA) para la curva con una concentración de $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Tomar $107.9\mu\text{l}$ ($150\mu\text{g}$) de la solución comercial de BSA (1.39 mg/ml) y diluir a $1500\mu\text{l}$. Tomar los diferentes volúmenes de las concentraciones requeridas. La curva se hace por duplicado.
- 2.- Medir los diferentes volúmenes de agua desionizada dependiendo de las diluciones requeridas.
- 3.- Se agrega el reactivo de Bradford ($200\mu\text{l}$) a cada tubo.
- 4.- Se incuba a temperatura ambiente por lo menos 5 minutos.

Tubo	Concentración de BSA $\mu\text{g/ml}$	Volumen de la sol. BSA μl	Agua desionizada μl	Reactivo de Bradford μl	Absorbencia
1	0	0	800	200	0.4213
2	1	10	790	200	0.4959
3	2	20	780	200	0.5155
4	5	50	750	200	0.6913
5	10	100	700	200	0.8969
6	15	150	650	200	1.0590
7	20	200	600	200	1.1787
8	-----	5 μl de la muestra	795	200	0.9737 = 13.3576 de proteína total

- 5.- Medir absorción a 595 nm. en un espectrofotómetro Beckman Du®640 spectrophotometer.

6.-Graficar los valores de absorbencia (y) para interpolar los valores sobre la curva de las muestra no conocidas (x).



ANEXO II

ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Soluciones

Solución A: Acrilamida (30 % T, 2.67 % C)

30% acrilamida; 0.8% de bis-acrilamida

30g de acrilamida

0.8 g de N´N´-bis-metilen-acrilamida

Aforar a 100 ml con agua desionizada, mezclar y filtrar con papel Whatman No. 1 y conservar a 4°C.

Solución B: Amortiguador para el gel resolvidor

1.5 M Tris- HCl, pH 8.8

18.15 g de Tris – base

Agregar 50 ml de agua desionizada y agitar. Ajustar el pH a 8.8 con HCl y aforar a 100ml con agua desionizada y almacenar a 4°C.

Solución C: Amortiguador del gel concentrador

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

6 g de Tris – base

Agregar 50ml de agua desionizada y agitar. Ajustar el pH a 6.8 con HCl y aforar a 100ml con agua desionizada y almacenar a 4°C.

Solución D: Dodecil Sulfato Sódico (SDS) 10%

10 g de dodecil sulfato sódico

Aforar a 100 ml y conservar a 4°C.

Solución E Amortiguador de la muestra

Tris – HCl 0.5M SDS 10% pH 6.8	0.5 M	2 M*
Agua desionizada	4 ml	4 ml
Solución C	1 ml	1 ml
Solución D	1.6 ml	1.6 ml
Glicerol	0.8 ml	0.8 ml
Azul de bromofenol al 0.05%	0.2 ml	0.2 ml
2- mercaptoetanol	0.4 ml	0.4 ml

Se mezcla todo y se le agrega a la muestra con una relación 1:4, se lleva a punto de ebullición por 5 minutos en baño María.

*Para el amortiguador de la muestra 2M, son las mismas cantidades, pero la solución C cambiará su molaridad a 2M y esto se hace pesando 24 g de Tris- HCl para 100 ml, y ajustando a un pH de 6.8.

Solución F: Amortiguador del electrodo 5X pH 8.3

Tris-base (0.025M)	9g
Glicina (0.19 M)	43.3g
SDS	3g

Ajustar a 600 ml con agua desionizada, mezclar y conservar a 4°C.

Para una electroforesis se diluye 1:5 (70 ml de solución F más 350ml de agua desionizada para cada electroforesis).

PSA: Persulfato de amonio 10 %

Persulfato de amonio	100mg
----------------------	-------

Aforar a 1 ml con agua desionizada y mezclar, preparar en el momento.

Solución para teñir geles

Azul brillante de Coomassie R-250	0.1%
Metanol	40%
Ácido acético	10%

Preparación de geles

Lavar los vidrios con agua y jabón y secarlos. Limpiar los vidrios con solución amoniaca al 10% con la ayuda de una gasa, esto es con el objeto de quitar la grasa, ya que esto no permite polimerizar la acrilamida.

Colocar el ensamblador en la cuneta de la torre con las pestañas hacia arriba, tornillos hacia atrás; empujar con la placa de plástico los separadores hasta que se encuentren en los extremos del ensamblado totalmente verticales. Con el acrílico transparente presionar el ensamblado y apretar los tornillos superiores. Verificar la alineación y apretar los tornillos inferiores.

Acomodar los ensambles en la torre. Presionar el acrílico del ensamble sobre el hule hasta que se inserte el ensamble en la pestaña de la torre.

Pesar el PSA el cual se recomienda fresco. Preparar la solución del gel resolvidor según la concentración requerida (ver tabla).

Soluciones	15%	En gradiente de Urea 8M		En gradiente de Sacarosa	
		10%	20%	10%	20%
Agua desionizada (ml)	2.35	2.55	0	0	4.1
Solución B (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Solución A (ml)	5	3	6	6.6	3.3
DESGASIFICAR 5 MINUTOS					
Solución D (µl)	100	100	100	30.45	30.45
TEMED (µl)	10	1	1	1	1
PSA 10% (µl)	50	10	10	10	10
Urea 8 M (ml)	-----	1.8	1.8	-----	-----
Sacarosa (g)	-----	-----	-----	1.5	0

Llenar el espacio de entre los vidrios hasta una altura de 2 cm antes del extremo del vidrio pequeño. Los geles de gradiente se llenan con la ayuda de una bomba peristáltica a 90 rpm. Con una jeringa Hamilton cubrir con agua la

interfase para evitar la formación de meniscos. Esperar que se complete la gelificación, aproximadamente 30 minutos. Cuando haya gelificado se retira el agua con un pedazo de papel filtro.

Se prepara el gel concentrador con las siguientes cantidades

Soluciones	Gel concentrador 4%
Agua desionizada (ml)	3.05
Solución C (ml)	1.25
Solución A (ml)	0.65
DESGASIFICAR 5 MINUTOS	
Solución D (μ l)	50
TEMED (μ l)	10
PSA 10% (μ l)	25

Aplicar la solución sobre el gel separador ya formado hasta el borde. Introducir el peine y aplicar más solución hasta cubrir los dientes del peine.

Electroforesis

Montar la cámara con los geles asegurándose de que el hule selle bien y no se presenten fugas. Quitar el gel polimerizado con papel filtro. Poner la mitad del amortiguador de electroforesis en el tanque y colocar la cámara en su interior. Llenar el centro de la cámara con amortiguador restante.

Preparar las muestras con la concentración requerida y se le agrega la solución E (amortiguador de la muestra), tomando en cuenta que la suma de amortiguador de la muestra y la muestra debe ser de 20 μ l. Después se colocan en baño María durante 5 minutos. Se cargan en los carriles del gel concentrador.

Tapar el tanque con los electrodos teniendo cuidado de conectar los electrodos rojo-rojo y negro- negro y conectarlos a la fuente de poder. Encender la fuente de poder con un voltaje constante de 100 V hasta que el frente de la muestra llegue a pasar al gel resolvidor (los 2 cm marcados). Entonces se aumenta el voltaje a 150 V hasta que el frente esté por salirse del gel.

Desconectar la fuente y sacar la cámara; despegar los vidrios con los separadores haciendo palanca. Despegar el gel y ponerlo a teñir.

Tinción del gel

El gel se coloca en un recipiente que contenga el azul brillante de Coomassie R-250, durante 2 horas aproximadamente. Luego se destiñe para percibir las bandas separadas. Se destiñe con ácido acético 10% y metanol al 40%, hasta que el fondo se aprecie claro.

ANEXO III

ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

Amortiguador de transferencia

Tris 25 mM 9.09g

Glicina 192mM 43.2g

Disolver en un litro de agua desionizada estéril y añadir:

Metanol 20% 600ml

Ajustar el pH a 8.3 y aforar a tres litro con agua desionizada estéril.

Después de la electroforesis, el gel se equilibra en la solución de transferencia durante 15 minutos, al igual que membrana de nitrocelulosa 0.45 μ m de poro (Biorad), que estará cortada en secciones de 7cmx9cm.

Se prepara un paquete para la transferencia: sobre una palangana con solución amortiguadora se coloca la placa de plástico negra abajo y la transparente arriba. Sobre la hoja de plástico negra del cassette se coloca una fibra cuidando de que esté bien impregnada en solución. Sobre la fibra se coloca una hoja de papel filtro (tipo Whatman No. 1) impregnado con solución. Se coloca el gel cuidando de que no queden burbujas entre la fibra y

el gel. Se coloca la membrana, con cuidado se pasa un tubo de ensayo, como rodillo, para sacar todas las burbujas. Se coloca otro papel filtro también previamente saturado de amortiguador de transferencia y por último se coloca otra fibra y se cierra el cassette.

Se coloca el cassette en la cámara con la cara negra orientada hacia lo negro de la cámara (es decir, teniendo cuidado de que el polo positivo dé hacia la membrana y el gel viendo hacia el polo negativo). Se agrega el amortiguador de transferencia a la altura necesaria para cubrir los electrodos.

Se coloca un agitador magnético en la cámara y se mantiene en agitación continua durante toda la electroforesis. Se coloca un recipiente con agua desionizada congelada dentro de la cámara, para evitar que se caliente el sistema.

Se tapa la cámara, se conecta a la fuente de poder para transferencia y se aplica a 200mA durante una hora. Después de la hora de electroforesis se desconecta la fuente de poder y se saca la cámara para desmontar el paquete hasta obtener la membrana, todo con cuidado y con guantes para no manchar la membrana.

ANEXO IV

INMUNOTRANSFERENCIA

Amortiguador salino de Tris (TBS) 10X

Tris 200mM 24.22g

NaCl 5M 292.2g

Agregar 900 ml de agua desionizada estéril, mezclar, ajustar el pH 7.5 y aforar a un litro. Guardar a 4°C.

Solución bloqueadora

Leche descremada al 5% 5g

TBS 1X 100ml

Mezclar hasta que se disuelva.

Solución de lavado (TTBS)

TBS 1X 500ml

Tween 20 250µl

Mezclar hasta quede incorporado el Tween.

Solución del primer anticuerpo

Leche descremada 1% 2g

TTBS 200ml

Disolver el primer anticuerpo monoclonal 1:1000 10µl en 10ml

Policlonal 1:500 1µl en 10ml

Solución del segundo anticuerpo

Leche descremada 1% con TTBS

Disolver el segundo anticuerpo 1:2000 10µl en 20µl

Tinción

Se saca la membrana y se coloca en un recipiente para lavar con amortiguador de TBS 1X pH 7.5 durante 5 minutos y se cambia la solución tres veces.

La membrana se bloquea con la solución bloqueadora con 20 ml, por dos horas en agitación constante. Después del bloqueo, las membranas se lavan con TTBS por 5 minutos tres veces (20 ml cada vez).

Se incuba con la solución del primer anticuerpo toda la noche con agitación constante. Lavar las membranas con 20ml de TTBS durante 15 minutos por 3 veces.

Se incuban con la solución del segundo en agitación constante durante dos horas. Enjuagar con 20ml de TTBS durante 15 minutos por 3 veces. Cambiar la solución a TBS 1X durante 15 minutos para eliminar el Tween -20.

ANEXO V

QUIMIOLUMINISCENCIA

Revelado

Se prepara el sustrato según las indicaciones del proveedor. Se le agrega a la membrana durante 5 minutos, teniendo cuidado de que no esté expuesto a la luz. Pasando el tiempo la membrana se escurre y se coloca en bolsas de plástico, sacando las burbujas, con la ayuda de pinzas y guantes.

Autorradiografía

En un cassette para este propósito se coloca las membranas y sobre ellas una película fotográfica (Kodak x-omat-ars de 8-10"). Se cierra y se expone de 10 segundos a 5 minutos como máximo. Se toma la película con unas pinzas y se sumerge en la solución de revelado por un minuto. Se lava con agua durante un minuto. Se sumerge en la solución fijadora por un minuto. Se lava con agua durante un minuto. El proceso se realiza en cuarto oscuro y frío.

ANEXO VI

INMUNOTINCION EN PUNTO

Prehumedecer la membrana de nitrocelulosa con TBS 1X. Vaciar y llenar con la muestra de IGF-I con un volumen no mayor de 500µl por pozo. Dejar que se filtre por flujo de gravedad por 40 minutos. Lavar 3 veces con TBS 1X. Poner solución bloqueadora de leche descremada al 5% en TBS 1X, 200 µl por pozo. Dejarlo que se filtre por gravedad 60 minutos y retirarlo por arriba del pozo. Lavar con 200-400µl de TTBS 1X 3 veces. Agregar el primer anticuerpo durante una hora por gravedad y después retirarlo al vacío. Lavar con 200-400µl TTBS durante 3 veces. Poner el segundo anticuerpo. Retirarlo y enjuagar con TTBS por tres veces. Poner TBS para eliminar el Tween-20.

Se revela con diaminobencidina. Se pesa 7.5 mg de diaminobencidina que se resuspende en 1 ml de TBS y se disuelve, después se le agrega 29 ml de TBS y se agrega 6 µl de peróxido de hidrógeno. Se le agrega a la membrana de 20 a 45 minutos con agitación constante, hasta que aparezcan las bandas, se lava con agua desionizada durante 20 minutos por 2 veces. Se seca a temperatura ambiente.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, y J. Watson. 1996. "Tecnología del DNA recombinante". pp 313-358. En: "Biología molecular de la célula". Tercera edición. Editorial Omega S.A. Barcelona.
- Albin, R., A. Young y J. Penney. 1989. "The functional anatomy of basal ganglia disorders". Trends in Neuroscience 12: 366-375.
- Alexi, T., P. E. Hughes, W. M. C. van Roon-Mom, R. L. M. Faull, C. E. Williams, R. G. Clark y P. D. Gluckman. 1999. "The IGF-I amino-terminal tripeptide Glycine-Proline- Glutamate (GPE) is neuroprotective to striatum in the quinolinic acid lesion animal model of Huntington's disease". Exp. Neurol. 189: 84-97.
- Alonso-Onofre, F. 1999. "Diferenciación funcional entre la región dorsal y ventral del estriado en el aprendizaje visuoespacial". Tesis de Maestría en Ciencias, CNB. UNAM. México.
- Barde Y., D. Edgón, y R. Thoenen. 1982. "Purification of a new nerotrophic factor from mammalian brain". The EMBO Journal 1: 549-553
- Beck, K., L. Powell-Braxton, R. Hans, J. Valverde y H. Fran. 1995. "IGF-I gene disruption results in reduced brain size CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and stratial Parvabumin-Concontaning neurons". Neuron 14: 717-730.
- Berlove, D. J. y S. P. Finklestein. 1993. "Growth factors and brain injury". pp 137-146. En: Growth factors, peptides and receptors. Editado por T. W. Moody. Plenum Press, New York.
- Bollag, D. M., M. D. Rozycki, y S. J. Edelstein. 1996a. "Protein concentration determination". pp 57-82. En: "Protein methods". Segunda edición. Wiley-Liss, Inc.. NewYork.
- Bollag, D. M., M. D. Rozycki, y S. J. Edelstein. 1996b. "Gel electrophoresis under denaturing conditions". pp 107-154. En: "Protein methods". Segunda edición. Wiley-Liss, Inc.. NewYork.
- Bollag, D. M., M. D. Rozycki, y S. J. Edelstein. 1996a. "Immunoblotting". pp 195-230. En: "Protein methods". Segunda edición. Wiley-Liss, Inc.. NewYork.
- Bondy, C., H. Werner, Jr. C. Roberts, y Leroith. 1990. "Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early

- organogenesis: comparison with IGF-II gene expression". *Molecular Endocrinology*. 4: 1386-1398.
- Bondy, C. 1991. "Transient IGF-I expresión during the maturation of functionally related central projection neurons". *J Neuroscience* 11:3442-3455
- Bondy, C. y W. Lee. 1993. "Correlation between insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins and IGF-I gene expresión during brain development". *J Neurosci*. 13:5092-5104
- Bradford, M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254
- Brailowski, S., D. Stein y B. Will. 1998a. "Regeneración, reparación y reorganización". pp 83-105. En: "El cerebro averiado, plasticidad cerebral y recuperación funcional". 2da edición. CONACYT y fondo de cultura económica. México.
- Brailowski, S., D. Stein y B. Will. 1998b. "Factores endógenos de crecimiento y de reparación". pp 106-119. En: "El cerebro averiado, plasticidad cerebral y recuperación funcional". 2da edición. CONACYT y fondo de cultura económica. México.
- Brailowski, S., D. Stein y B. Will. 1998c. "Edad, tiempo y plasticidad". pp 120-139. En: "El cerebro averiado, plasticidad cerebral y recuperación funcional". 2da edición. CONACYT y fondo de cultura económica. México.
- Callard, R. y A. Greaning. 1994. "Organization of the data". pp 7-11. En: "The cytokine facts book". Academic Press. San Diego USA.
- Cardinali D. 1992. "Fisiología del cerebelo y de los ganglios basales". pp 227-247. En: "Manual de Neurofisiología". Ed. Díaz de Santos S.A. España Madrid.
- Collett-Solberg, P. y P. Cohen. 2000. "Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system". *Endocrine*. 12:121-136
- Connor, B. 1998. "The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain". *Brain Res. Rev.* 27: 1-39
- Copeland, R. A. 1994. "Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols". Chapman & Hall. New York. USA.
- Darnell, J., H. Lodish y D. Baltimore. 1993. "Manipulando macromoléculas". pp 201-242. En: "Biología celular y molecular". Segunda edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España.

- Daughaday, W., K. Parker, S. Borowsky, B. Trivedi y M. Kapadia. 1982. "Measurement of somatomedin related peptides in fetal neonatal and maternal rat serum by insulin-like growth factor (IGF)I radioimmunoassay, IGF-II radio-receptor assay (RRA) and multiplication stimulation activity RRA after acid-ethanol extraction". *Endocrinology*. 110(2): 575-581
- Daughaday, W. y O. Rotwein. 1989. "Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations". *Endocr_ Rev.* 10: 68-91
- D'Ercole, A., A. Stile L. Underwood. 1984. "Tissue concentration of somatomedin C: further evidence for multiple site of syntesis and paracrine or autocrine mechanism of action". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 935-939
- D'Ercole, A., Y. Peng y G. Gutiérrez-Ospina. 1996a. "Use of transgenic mice for understanding the physiology of insulin-like growth factors (IGFs). *Horm. Res.* (supl.1) :5-7
- D'Ercole, A., P. Ye, A. Calikoglu y G. Gutiérrez-Ospina. 1996b. "The role of the insulin-like growth factor in the central nervous system". *Mol Neurobiology*. 13: 227-255
- Diéguez, C., F. Domínguez, y F. Casanueva. 1992. "Factores de crecimiento y oncogenes". pp 939-946. En: "Fisiología Humana". J. A. F. Tresguerres. Editorial Interamericana - Mc Graw Hill. Madrid, España.
- Fanjul, L. F. y G. Ruiz. 1999. "Mecanismos de accion hormonal". pp 869-886. En: "Fisiología Humana" . J. A. F. Tresguerres. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. Madrid, España.
- Giordano, M., C. Mejía-Viggiano, F. Alonso y J. Mena. 1999. "The effects of post-lesion internal on behavioral and histological changes after excitotoxic striatal lesions". pp 120. *Restauración neurológica* 99. La Habana, Cuba. Febrero 23-25.
- Gluckman, P. D., J. Guan, E. J. Beilharz, N. D. Klempt, M. Klempt, O. Miller, E. Sirimanne, M. Dragunow y C. Williams. 1993. "The role of the insulin-like growth factor system in neuronal rescue". pp 138-148. En: *Growth factors, peptides and receptors*. Eds. Raizada, M. K. Y LeRoith, D. *Annals of the NY Academy of Sciences* Vol. 692.
- Guan, J., L. Bennet, S. George, H Walduogel, R Faull, P Gluckman, H Keunen y A Gunn. 2000. "Selective neuroprotective effects with insulin-like growth factor-I in

- phenotypic striatal neurons following ischemic brain injury in fetal sheep". Neuroscience 95(3):, 831-839
- Guan J, H Waldrogel, R Faull, P Gluckman y C Williams. 1999. "The effects of the N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-I, Glicine-Proline-Glutamate in differents regions following hypoxic-ischemic brain injury in adult rats". Neuroscience 89(3): 649-659
- Gutiérrez de la B A. 2001. "Efectos del factor de crecimiento I tipo insulina en la muerte celular normal durante el desarrollo retinario en roedores". Centro de Neurobiología. UNAM. México. p54
- Gutiérrez-Ospina G. 1997. "Efecto del factor de crecimiento tipo insulinico I (IGF-I) sobre el crecimiento cerebral y el desarrollo del sistema somático sensorial: estudios anatómicos en la corteza somatosensorial primaria (S1) de ratones transgénicos". UNAM. México. p 63
- Hansson H, L Dahalin, N Danielsen, L Fryklund, A Nagemson y P Polleryd.1986. "Evidence indicating trophic importance of IGF-I in regenerating peripheral nerves. Acta Physiol Sacnd. 126: 609-614.
- Heath J. 1993, " Growth Factors ". En: Growth factors, D. Rickwood (IRL PRESS) at oxford University Press, New York,USA pp 15-35.
- Heidenreich K. 1993. "Insulin and IGF-I receptor signaly in cultured neurons" En: "Role of insulin- like growth factors in the nervous system". Annals of the New York Academy of Sciénces 692: 72-88
- Heimer L, Zahm D. S. y Alheid G.F. 1995. "Basal ganglia". En: "The rat nervous system". Paxinos G. Second edition. Academic Press. Pp 579-628.
- Hiriart M. 1997. "Mensajeros químicos y comunicación neuroendocrina". En: Curso internacional precongreso. Actualización de fisiología. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. UNAM
- Ihle, JN (1991) en: peptide Growth factors and their receptors I, Sporn, MB and Roberts, AB, eds Springer-Verlag, New York, pp 541-575
- Jones J y Clemmons D. 1995. "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological action. Endocr Rev. 16:3-34
- Kar S. R., Quirion R, Baccichet A y Poirier J. 1993. "[¹²⁵I] IGF-I, [¹²⁵I] IGF-II and [¹²⁵I] Insulin receptor binding sites in the rat hippocampal formation: topographic distribution and response to entorhinal ablation". En : "Growth factors, peptides and receptors. Moody T. W. Plenum Press. USA. Pp265-278.

- Karp G. 1996. "Biología celular y molecular ". McGraw-Hill Interamericana. DF, México. 746
- Kolb. B., 1995. "Some basis concepts, examples, and biases". En: Brain plasticity and behavior. Bryan Kolb Editor. Laurence Erlbaum associates. Publishers. USA. Pp 3-15.
- Lapchak, P. A.; Araujo, D. M.; Denton, T. L.; Dugich-Djordjevic, M. M. y Hefti, F. 1993. "Neurotrophins in the adult brain: effects on hippocampal cholinergic function following deafferentation, and regulation of their expression by pharmacological agents and lesions". En: Growth factors, peptides and receptors. Moody T. Plenum Press. USA. p 241-253
- Lapchak P, Araujo D O y Hefti F. 1992. "Neurotrophins in central nervous system". Reviews in the neurosciences. 3: 1-10
- Lee W-H y Bondy C. 1993. "Insulin-like growth factors and cerebral ischemia". Annals New York Academy of Sciences 679: 418-422.
- Lee W-H, Javedan S y Bondy C. 1992. "Coordinate expression of insulin-like growth factor system components by neuron and neuroglia during retinal and cerebellar development". J Neurosci. 12: 4737-4744
- Leibrock J, F Lottspeich, A. Hohn, M., Hofer Hengerer B., Masiakowski P., Thoenen H. y Barde A., 1989. "Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. Nature. 341:149-152
- LeRoith D., Werner H., Farias N, Hisanokato, Adamo M. y Roberts Jr. C. 1993. "Insulin-like growth factors receptors, implication for nervous system function". En: Annals of the New York Academy of Sciences. 692: 23-32
- Levi-Montalcine, R. 1993. "NGF. Hacia una nueva frontera en la neurobiología" Alianza Editorial S.A. Madrid. p78.
- Maciás-Islas M, García-Estrada J, Luquín- deAnda S, Gómez-Pinedo V y Torres-Alemán I. 2000. "Regeneración inducida por el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I) en el nervio ciático de rata en un modelo de axonotmesis y antagonismo por dexametasona". Arch Neurocienc. 5(4): 184-192
- Maio A. 1994. "Protein blotting and immunoblotting using nitrocellulose membrane". En "Protein blotting a practical approach". Dunbar B. PAS. N. Y. USA. p11-32
- Maisonpierre P, Bellusci L, Friedman B, Alderson R, Wiegand S, Furth M, Lindsay R y Yancopoulos G. 1990. "NT-3, BDNF and NGF in the developing rat nervous

system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. Neuron. 5:501-509

- Michels K, Lee W-H, Bach M, Seltzer A, Saavedra J y Bondy C. 1993. "Estrogen regulation of the pituitary insulin-like growth factor system. En: Growth factors, peptides and receptors. Moody T. Plenum Press. USA. p467
- Nieto M y Verdú E. 1998. "Lesiones del sistema nervioso: respuesta neuronal y reparación", En: Manual de neurociencias. Delgado J, Ferrús A, Mora F y Rubias F. Síntesis. España. p 1015
- Parent A. y Hazrati L-N. 1995. "Functional anatomy of the basal ganglia I. The cortico-basal ganglia-thalamus-cortical loop". Brain research reviews. 20 91-127
- Paxinos G y Watson C. 1986. "The rat brain in stereotaxic coordinates". Second edition. Academic Press. USA.
- Pimentel E. 1994a. "Handbook of growth factor. Volumen II: Peptide growth factors. CRC press. EUA. p392
- Pimentel E. 1994b. "Handbook of growth factor. Volumen III: hematopoietic growth factors and cytokines. CRC press. EUA. p370
- Rubia F. 1998. "Control cortical y de los ganglios basales del movimiento". En: Manual de neurociencias. Delgado J, Ferrús A, Mora F y Rubias F. Síntesis. España. p1015
- Sara, V. 1992. "The role of the insulin-like growth factors in the nervous system. En: The insulin-like growth factor structure and biological function. Schofield P. Oxford University Press. p258-279
- Shimasaki S. y Ling N. 1991. "Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, 2, 3, 4, 5 and 6)". Progress in Growth Factor Research 3. 243-366
- Talamás, R. P. . 1999. En: "Fisiología Humana" Tresguerres F.J.A. Internacional-McGraw Hill. Madrid España. 1216
- Vassilopoulou-Sellin R y Phillips L. 1982. "Extraction of somatomedin activity from rat liver". Endocrinology. 110(2): 582-589
- Xu, Z. C., W. Chwang, X. Li, X. Chen y P. He. 1999. "Gender difference in dopamine concentration and postischemic neuronal damage in neostriatum after unilateral dopamine depletion". Exp. Neurol. 158: 182-191
- Zarranz J. 1998. "Neurología". Harcourt Brace. España. p 886