

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(Orientación Neurociencias)**

**Efecto de Neurotrofinas de alto peso molecular  
en una línea celular de moto neuronas.**

*Federica Cetra*

*Orientador  
Dr. Luis Barbeito*



*Tribunal  
Dra. Patricia Cassina  
Dr. Francesco Rossi*

*Marzo 2011*

# **Agradecimientos**

---

*A los profesores Alberto Kornblith, Juan Carlos Calvo, Ernesto Marceca y Enrique Lessa por haberme enseñado diferentes aspectos de la ciencia.*

*A Luis, por permitirme realizar la pasantía en su laboratorio y ser parte del mismo.*

*A Andrea Cragolini por enseñarme todo lo que sé y por ayudarme hasta el día de hoy. Perdón por haber sufrido mis errores.*

*A los integrantes del Laboratorio de Neurodegeneración. Nata, Naty, Hugo, Paty, Lucha y Andrés.*

*A mis compañeros de carrera...*

*A la residencia universitaria Del Mar, donde viví dos años maravillosos.*

*A mis amigos de la vida....*

*A mis hermanas, mi sobrina.*

*A mis padres, especialmente a mi mamá que me brindó su apoyo incondicional desde el primer momento que elegí esta carrera.*

# Índice

---

<b>Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>5</b>
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	12
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>13</b>
Cultivo celular.....	13
Ensayos de viabilidad.....	16
Conteo celular directo.....	16
Conteo celular con azul tripano.....	16
Ensayo de MTT.....	17
Inmunocitoquímica.....	17
Análisis de proteínas por <i>SDS-PAGE/Western blot</i> .....	18
Procesamiento y análisis de datos.....	23
<b>Resultados.....</b>	<b>24</b>
Las células NSC-34 se diferencian en motoneuronas cuando están libres de suero.....	24
NGF y NGF nitrado inducen un aumento en el número de células NSC-34 no diferenciadas .....	24
Las células NSC-34 expresan los receptores neurotróficos TrkA y p75 <sup>NTR</sup> en estado no diferenciado.....	28
<b>Discusión.....</b>	<b>29</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>34</b>

## Resumen

---

Las neurotrofinas son pequeñas proteínas que están relacionadas con procesos biológicos esenciales, entre los que se encuentran: desarrollo, diferenciación, mantenimiento y plasticidad del sistema nervioso de los vertebrados. La familia de las neurotrofinas incluye al NGF (del inglés *Nerve Growth Factor*), al factor neurotrófico BDNF (del inglés *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), a la neurotrofina 3 (NT-3), siendo el NGF el prototipo. En 2006 el grupo de Barbeito demostró que la molécula de NGF, *in vitro*, podía sufrir modificaciones postraduccionales como la nitración, oxidación, entre otras. La nitración de tirosinas en la molécula de NGF provoca que dicha proteína forme oligómeros, formando una nueva molécula denominada NGF nitrado, que forma parte de las especies de NGF de alto peso molecular. Dicha modificación podría ocurrir *in vivo*, frente a injurias se genera un ambiente oxidante, propenso para que ocurran las modificaciones postraduccionales en la molécula de NGF. El mismo grupo demostró que el NGF nitrado causa apoptosis en cultivo primario de motoneuronas. En el presente trabajo se estudió qué efecto biológico provocan las neurotrofinas NGF o NGF nitrado en una línea celular de motoneuronas. Para ello, se utilizó como modelo las células NSC-34, la cual es la fusión de neuronas motoras y células de neuroblastoma de ratón. Por otro lado, se estudió qué receptores neurotróficos expresan éstas células. Para llevar a cabo el trabajo se utilizaron técnicas para evaluar la viabilidad celular, como conteo celular directo, conteo celular con azul tripano y ensayo de MTT; Inmunocitoquímica y análisis de proteínas por *SDS-PAGE/Western blot* (del inglés *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*). Los resultados obtenidos demostraron que el agregado de las neurotrofinas NGF o NGF nitrado en las células NSC-34 provoca un aumento en el número de células no diferenciadas, por lo que el modelo celular empleado no se comporta de la misma manera que un cultivo primario de motoneuronas. Este efecto podría explicarse por la presencia del receptor neurotrófico TrKA.

## **Introducción**

---

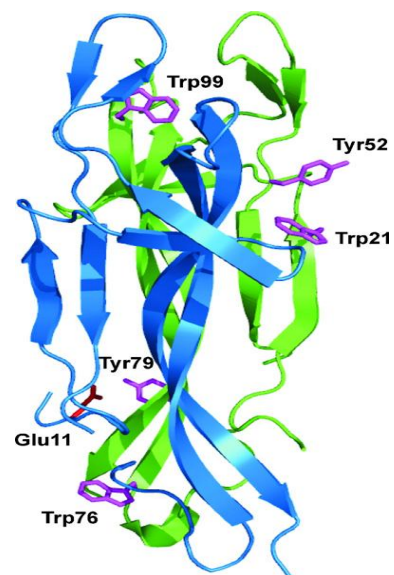
**Neurotrofinas.** La neuróloga Rita Levi-Montalcini fue una de las pioneras en el estudio de las neurotrofinas. En la década del 50 consiguió identificar y aislar la primera de ellas, denominada factor de crecimiento nervioso, NGF (del inglés *Nerve Growth Factor*) como la primera molécula capaz de promover la supervivencia de distintas poblaciones neuronales (Cohen et al., 1956; Purves et al., 1988; Oppenheim, 1991). Las neurotrofinas son pequeñas proteínas (aproximadamente 120 aminoácidos) que están relacionadas con procesos biológicos esenciales entre los que se encuentran: diferenciación celular, mantenimiento, regeneración y plasticidad del sistema nervioso de los vertebrados (Thoenen 1991; Persson et al., 1993). Actualmente la familia de las neurotrofinas incluye al NGF, al factor neurotrófico BDNF (del inglés *Brain-derived Neurotrophic Factor*), a la neurotrofina 3 (NT-3), la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Turner et al., 2004). Con excepción de la NT 4/5, que no se detecta en aves, todos los demás miembros de esta familia se encuentran altamente conservados en vertebrados. También existen las neurotrofinas 6 (NT-6) y 7 (NT-7) pero fueron identificadas únicamente en peces (Gotz et al., 1994; Nilsson et al., 1998).

Las neurotrofinas son inicialmente sintetizadas como pro-neurotrofinas. A grandes rasgos, para convertirse en proteínas maduras, las pro-neurotrofinas sufren glicosilación y posterior rotura proteolítica, entre otros procesos (Mowla et al., 2001). Son las enzimas furinas (serina proteasa dependiente de calcio que corta tras sitios polibásicos) y proconvertasas, las proteasas encargadas de producir dicho corte (Chao, 2003). Ambas enzimas clivan después de un residuo básico (Arg-Arg, Lys-Arg), en una zona altamente conservada, liberando así el extremo carboxi terminal que corresponde a la proteína madura (Lessmann et al., 2003). Se cree que para que haya un correcto plegamiento de la proteína se requiere de la presencia del extremo amino terminal (Chao, 2003). Tanto las neurotrofinas como las pro-neurotrofinas pueden ser liberadas al espacio extracelular (Lee et al., 2001).

Años atrás se creía que las pro-neurotrofinas no tenían funciones biológicas pero estudios recientes señalan que causan muerte celular. Es así que el rol de las neurotrofinas y pro-neurotrofinas parece ser antagónicos: mientras las neurotrofinas mantienen la supervivencia y el crecimiento neuronal durante el desarrollo, las pro-neurotrofinas inducen la apoptosis de ciertas poblaciones neuronales (Teng et al., 2004; Volosin et al., 2006).

Las proteínas maduras contienen regiones invariables y variables que definen las propiedades individuales de cada neurotrofina. A pesar de ser muy diferentes en su secuencia primaria, todos los miembros de esta familia poseen estructuras terciarias semejantes. Todas las neurotrofinas maduras se sintetizan como monómeros capaces de formar dímeros activos, los 2 péptidos se mantienen unidos mediante la formación de puentes disulfuros.

El prototipo de la familia de las neurotrofinas es el NGF, y es el factor empleado en este trabajo. Su peso molecular es de 13 kDa, mientras que las formas pro-NGF son de 27 y 34 kDa (Bierl et al., 2005). NGF cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la supervivencia y desarrollo del sistema nervioso donde, por ejemplo, define el tipo de terminaciones sinápticas así como el conjunto de neurotransmisores que producirá la neurona, pudiendo regular la expresión de uno u otro de los neurotransmisores en un momento dado (Yang et al., 2002). Esta neurotrofina no sólo es secretada por las células del sistema nervioso, sino también por otros tipos celulares como las células del sistema inmunitario, células endoteliales y fibroblastos, entre otras (Frossard et al., 2004). En dichos casos puede contribuir a mediar la inflamación (Levi-Montalcini et al., 1996).



**Fig.1: Esquema de la molécula de NGF.** En azul y verde se muestra cada subunidad del dímero, formando la molécula activa de NGF.

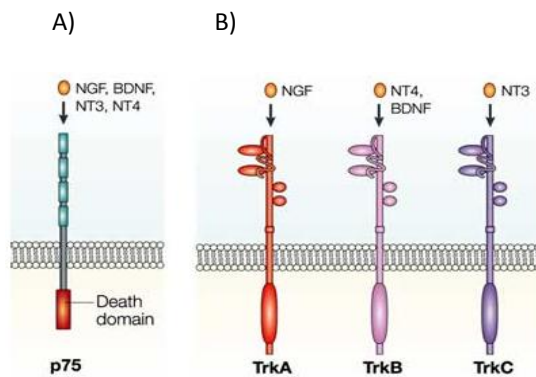
Si bien la secuencia aminoacídica de NGF se conoce hace más de 30 años, la estructura tridimensional fue reportada por McDonald y cols. en 1991. La molécula activa de NGF está

formada por un dímero compuesto por 2 subunidades  $\beta$  (Longo et al., 1989). Si miramos con más detalle al dímero  $\beta$  sabemos que cada polipéptido posee 118 aminoácidos, encontrándose regiones conservadas y variables. En cuanto a la estructura tridimensional cada subunidad del dímero presenta una estructura alargada, con dos pares de láminas  $\beta$  antiparalelas unidas mediante tres pequeños bucles que concentran la mayor parte de las regiones variables (Bradshaw et al., 1994). En el extremo opuesto, se encuentra el motivo más característico de las neurotrofinas, llamado “nudos de cisteína”. Este consta de tres puentes disulfuro que se pliegan sobre sí mismos, formando un nudo. La peculiar conformación de dicho nudo permite la aproximación de las láminas  $\beta$  de ambas subunidades, formando de esta manera el dímero activo de NGF (Fig. 1) (McDonald et al., 1995).

**Receptores de neurotrofinas.** Existen dos principales clases de receptores neurotróficos: El primero que se caracterizó fue el receptor p75 (p75<sup>NTR</sup>) (Fig. 2A). Dicho receptor pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (Schechter et al., 2009). Al igual que los demás receptores de esta familia, p75<sup>NTR</sup> posee un único dominio transmembrana sin actividad enzimática intrínseca, por lo que su señalización ocurre a través de la asociación con proteínas adaptadoras citoplasmáticas. En cuanto a la estructura del receptor p75<sup>NTR</sup>, el dominio extracelular, que constituye el dominio de unión al ligando, consta básicamente de 4 series repetidas ricas en cisteína (Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987), cuyo posicionamiento se encuentra altamente conservado entre los miembros de la superfamilia (Bothwell, 2006). Con respecto al dominio intracelular, este presenta una estructura diferente con respecto a los demás miembros de la familia; se caracteriza por poseer un dominio de muerte celular (Liepinsh et al., 1997). Sorprendentemente éste es el único receptor de la familia que no exhibe una trimerización a la hora de activarse, sino que forma un dímero (Huang et al., 1996). El receptor p75<sup>NTR</sup> se expresa en las neuronas del sistema nervioso central y en células gliales durante el desarrollo. Sin embargo, en el cerebro adulto normal su expresión está reducida (sólo se expresa en el cerebro anterior y en las neuronas colinérgicas) aunque puede ser reanudada frente a injurias (Friedman, 2010). Por lo tanto, la mayoría de las funciones que se han definido para este receptor hasta el momento están asociadas con el desarrollo o con respuestas frente a lesiones (Chen et al., 2009).

Una segunda clase de receptores neurotróficos son los de la familia tirosina quinasa, Trk (del inglés *tropomyosin-related kinase*). Existen diversos tipos, pero los que interactúan con las

neurotrofinas son los receptores TrkA, TrkB, TrkC (Klein et al., 1989; Lamballe et al., 1991) (Fig. 2B). Los tres miembros de la familia comparten una misma estructura proteica, con un peso molecular de aproximadamente 140 KDa. Dicha estructura se encuentra conservada a lo largo de la evolución (Ninkina et al., 1997). Presenta un dominio extracelular rico en leucinas; también posee 2 dominios similares a dominios inmunológicos, que son sitios de unión de las neurotrofinas. Estos receptores presentan un único dominio transmembrana el cual conecta en su cara interna, la parte intracelular del mismo. El dominio intracelular se caracteriza por la presencia del dominio tirosina quinasa. La unión de la neurotrofina al receptor Trk conduce a la dimerización del mismo, provocando una autofosforilación, lo que desencadena la activación de la cascada de señalización (Arévalo et al., 2006). Estos receptores se expresan en el sistema nervioso central y periférico, con algunas excepciones, por ejemplo, las motoneuronas adultas son deficientes en el receptor TrkA, expresando solamente TrkB y TrkC (Nishio et al., 1998).

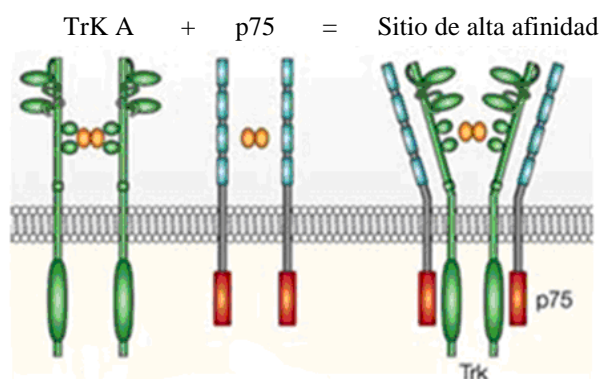


**Fig.2: Modelos de receptores neurotróficos.** A) Corresponde al receptor  $p75^{NTR}$ . El dominio extracelular consta de 4 repeticiones ricas en cisteínas. Mientras que el dominio interno es de muerte celular. Todas las neurotrofinas se unen a dicho receptor. B) Corresponde a los receptores Trk. El dominio extracelular es rico en leucinas y posee dominios inmunológicos, donde se unirá la neurotrofina. El dominio interior es un dominio tirosina quinasa. Las neurotrofinas se unen de forma selectiva a los receptores Trk.

Todas las neurotrofinas se pueden unir al receptor  $p75^{NTR}$ , pero no ocurre lo mismo para los receptores Trk, donde la unión se da en forma preferencial. Se demostró que NGF presenta afinidad por el receptor TrkA, las neurotrofinas BDNF y NT-4 interactúan con TrkB y por último, NT-3 se une preferencialmente al receptor TrkC (Fig.2) (Chao, 2003). Si bien todas estas interacciones son consideradas de alta afinidad, ésta puede ser regulada mediante la dimerización, modificación del receptor y mas aún, también se puede modular a través de la asociación con el receptor  $p75^{NTR}$  (Arévalo et al., 2000; Esposito et al., 2001). El complejo TrkA- $p75^{NTR}$  incrementa aún más la afinidad por el NGF (Fig.3) (Hempstead et al., 1991; Barker 2007; Chao, 2003). La teoría neurotrófica es uno de los conceptos más importantes de la neurobiología del desarrollo. Organiza y modela el sistema nervioso permitiendo, por ejemplo, que el mismo sea flexible frente a cambios durante el desarrollo. Durante el desarrollo hay muerte neuronal masiva, esto es debido, entre otros procesos, al balance que hay entre la expresión de los receptores TrkA y



p75<sup>NTR</sup>. Cuando hay más expresión del receptor TrkA, el NGF mantiene la supervivencia celular. En cambio si hay más expresión de p75<sup>NTR</sup>, NGF causa apoptosis (Oppenheim, 1991; Skaper, 2008). Sorprendentemente el pro-NGF presenta una afinidad mayor por el receptor p75<sup>NTR</sup> que por el TrkA (Lee et al., 2001), causando apoptosis, a través de la formación del complejo de receptores sortilina-p75<sup>NTR</sup> (Nykjaer et al., 2004). Como se dijo anteriormente, las dos familias de receptores neurotróficos no siempre actúan en forma independiente. Si bien el receptor p75<sup>NTR</sup> media señales apoptóticas, se sabe que cuando interacciona con los receptores Trk facilita la diferenciación y la supervivencia de las neuronas en respuesta a las neurotrofinas (Hempstead, 2002).



**Fig.3: Modelo de activación de los receptores Trk y p75.** La unión de la neurotrofina al receptor, conlleva a la dimerización del mismo. La interacción entre los receptores Trk y p75 conduce a un aumento en la afinidad de las neurotrofinas por los sitios en los receptores

**NGF de alto peso molecular.** Aunque han pasado varios años desde que se descubrieron las neurotrofinas, el conocimiento de la complejidad del comportamiento de las mismas ha ido creciendo. Esta complejidad se incrementa aún más cuando incluimos otras especies de NGF, denominadas NGF de alto peso molecular que actualmente no se sabe con certeza qué funciones biológicas desempeñan.

**Modificación del NGF por estrés oxidativo.** En 2006 el grupo de Barbeito demostró, *in vitro*, que en presencia de un ambiente oxidante el NGF puede sufrir cambios conformacionales generando una nueva molécula denominada NGF nitrado, que comprende la agrupación de varios péptidos de NGF. Dicha molécula pertenece a las especies de NGF de alto peso molecular. Existen diferentes estrategias para generar dicha molécula, por ejemplo, nitración con peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), nitración con tetranitrito de metano, oligomerización con glutaraldehído (Pehar et al., 2006; Payne, 1973). En el presente trabajo se utilizó la nitración con ONOO<sup>-</sup>. En dicha estrategia el ONOO<sup>-</sup> oxida y nitra la molécula de NGF siendo las tirosinas (tyr) que se observan en la figura 1

susceptibles a dicha nitración, lo que induce a la agregación de varios péptidos de NGF. Como dichos residuos se encuentran altamente conservados una modificación en los mismos puede traer importantes consecuencias biológicas (Pehar et al., 2006). El mismo grupo de investigadores demostraron que dicha modificación oxidativa induce apoptosis en cultivo primario de motoneuronas.

En presencia de injurias y desórdenes neurodegenerativos se produce estrés oxidativo por lo que se incrementan los niveles de los radicales libres: superóxido y óxido nítrico, entre otros. Éstos, al reaccionar entre si, dan como producto al peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). El  $\text{ONOO}^-$  es un potente agente oxidante que tiene la capacidad de nitrar varios tipos de biomoléculas como proteínas, lípidos, ADN, entre otras (Radi, 1998; Beckman, 1996). Es así que la nitración de tirosina (agregado de un grupo nitro en la tercera posición del anillo aromático) mediada por el  $\text{ONOO}^-$  es considerado una evidencia del daño oxidativo (Beckman, 1996; Radi, 2001). *In vivo* y en presencia de injurias, la molécula de NGF aumenta su expresión por lo que puede ser blanco de modificaciones oxidativas. En 1993 Coyle y cols. reportaron que un ambiente oxidante induce la muerte de motoneuronas.

Por lo dicho anteriormente nos resulta relevante estudiar el comportamiento biológico que presentan las motoneuronas cuando están expuestas a neurotrofinas de alto peso molecular. Nuestro interés en estudiar el comportamiento de las motoneuronas radica en que son blanco de muerte en la Esclerosis lateral amiotrófica, la cual es la línea de investigación con la que cuenta el laboratorio.

El cultivo primario es el modelo de experimentación que mas se asemeja a lo que pasaría *in vivo*. Si bien presenta ciertas ventajas como: las células presentan el 100 % del cariotipo original o está formado por células indiferenciadas que se diferenciarán de forma similar al tejido que le dio origen. Presenta una gran desventaja: sólo dura 7 días aproximadamente. Por ello, a veces es conveniente emplear líneas celulares como modelo de experimentación. Si bien pose desventajas (aneuploides) son de gran utilidad por brindar una fuente ilimitada de células, por lo que se pueden hacer varios experimentos en paralelos (Butler, 2004). Particularmente, en este trabajo se empleó la línea celular de moto neuronas, denominada NSC-34.

**La línea celular de motoneuronas NSC34**, fue obtenida a través de la fusión de neuronas motoras y células de neuroblastoma de ratón, por tanto son células híbridas. Para ello se emplearon neuronas motoras de la médula espinal, provenientes de embriones de 12-14 días, y células neuroblásticas denominadas N18TG2, que confiere a la célula la capacidad replicativa (Cashman et al., 1992). La mayoría de las células NSC difieren morfológicamente de sus células parentales, como por ejemplo las células NSC-34 que acumulan el neurotransmisor acetilcolina. Esta característica no se observa en las células neuroblásticas (Amano et al., 1974). Además, las células NSC-34 expresan varias propiedades similares a las motoneuronas, incluyendo la generación de un potencial de acción, la expresión de proteínas de neurofilamentos, entre otras. Morfológicamente esta línea celular cuando no está diferenciada presenta una población heterogénea, siendo posible distinguir 2 grupos celulares: uno de ellos se denomina N, debido a que presenta una morfología más parental (neuroblastoma), caracterizándose por tener mínimas proyecciones; el otro tipo de morfología, denominada S, se caracteriza por poseer largos procesos (Matusica et al., 2008). Las NSC-34 presentan en su superficie diferentes receptores neurotróficos, entre ellos se encuentran el receptor  $p75^{NTR}$ , los receptores TrkB y TrkC pero no así el receptor TrkA (Chiu et al., 1993). También está presente el receptor sortilina, que actúa como co-receptor de  $p75^{NTR}$  (Matusica et al., 2008).

Para obtener hibridomas hay que fusionar dos células, formando así un heterocarionte, es decir, una célula con dos núcleos separados pero con los contenidos citoplasmáticos compartidos. Para lograr esto, se trata a las células con compuestos que induzcan la fusión de membranas (fusógenos) como por ejemplo, polietilenglicol. Eventualmente un heterocarionte puede entrar en mitosis, produciendo una célula híbrida en la cual las envolturas de ambos núcleos se han disgregado, permitiendo reunir los cromosomas de ambos en un único gran núcleo. Tales células híbridas pueden clonarse estableciendo una línea celular, pero se sabe que en muchos casos la línea resultante es genéticamente inestable, y tiende a perder parte del material genético (ArgenBio, 2005).

**Hipótesis.** Se postula que las especies de NGF pueden inducir muerte neuronal de las células NSC-34 de manera similar a lo que ocurre en los cultivos primarios de motoneuronas espinales. De ser corroborada esta hipótesis, contaríamos con una fuente ilimitada de células con comportamiento similar a su equivalente cultivo primario que permitirá realizar, posteriormente,

estudios de interacción entre neurotrofinas y sus receptores y determinar vías de señalización activadas por éstos.

### **Objetivos**

#### - *Objetivos generales*

Para corroborar la hipótesis planteada se propone determinar si el NGF o el NGF nitrado afectan la supervivencia de las células NSC-34.

#### - *Objetivos específicos*

- 1- Establecer condiciones de diferenciación de las células NSC-34.
- 2- Comparar los efectos de NGF o NGF nitrado sobre las células NSC-34. Posteriormente se determinará qué concentración de NGF o NGF nitrado es capaz de ejercer un mayor efecto biológico.
- 3- Identificar los receptores de neurotrofinas que expresan las células NSC-34.

**Como estrategia de trabajo**, en primera instancia se puso a punto el proceso de diferenciación de las células. Para ello las variables que consideramos fueron el % de FBS presente en el medio celular y el tiempo de diferenciación. Para llevar a cabo los ensayos de viabilidad celular, se utilizaron diferentes concentraciones de NGF y NGF nitrado. Basándonos en la literatura se decidió emplear concentraciones que van desde 1 a 100 ng/ml. Utilizamos diferentes metodologías como ensayo de MTT, Conteo celular con azul tripano y conteo celular directo. Luego se dedujo para cada neurotrofina cuál es la concentración efectiva, es decir, qué concentración presenta un efecto biológico más pronunciado. Por otro lado se identificaron, mediante la técnica inmunocitoquímica y *SDS-PAGE/Western blot* (del inglés *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*), qué receptores neurotróficos expresan las NSC-34 cuando se encuentran no diferenciadas.

## ***Materiales y métodos***

---

**Producción de NGF recombinante humano y de NGF nitrado.** La producción de ambas moléculas fue llevado a cabo por Andrés de León, IPM, empleando los protocolos reportados por Rattenholl y cols. (2001) y Pehar y cols. (2006). Para producir NGF recombinante humano en *E. coli* se crecieron transformantes de *E. coli* para el plásmido que contiene el gen del pro-NGF humano en medio 2YT a 37 °C hasta una DO<sub>600</sub> de 0,6. La expresión de la proteína fue inducida con la adición al medio de isopropil thio-beta-D-galactosido (IPTG). La fracción insoluble, lugar donde se halló el pro-NGF, se obtuvo mediante lisis celular y posterior centrifugación y conservación del pellet. Dicha fracción fue disuelta y desnaturalizada en cloruro de guanidinio 6M. Para adquirir la estructura nativa y la re-naturalización del pro-NGF se realizaron sucesivas diálisis a pH 9.3 en un buffer que contiene L-arginina y glutatión reducido y oxidado como componentes básicos. Una vez re-naturalizado, el pro-NGF se purificó mediante cromatografía de intercambio catiónico. El NGF puro se obtuvo a partir de la digestión controlada del pro-NGF con tripsina y la subsiguiente cromatografía de intercambio catiónico.

Para la producción de NGF nitrado se preparó una solución que contenía 6 µl de NGF, 10 µl de buffer fosfato (50 mM), 2,25 µl de NaHCO<sub>3</sub> (20 Mm) y 1,75 µl de agua. Paralelamente, se midió la absorbancia ( $\lambda= 302$  nm) del ONOO<sup>-</sup> en una cuba de cuarzo. Para ello se agregó 1 ml de NaHCO<sub>3</sub> 1M y 2 µl de ONOO<sup>-</sup>. Con la ecuación de Lambert-Beer y sabiendo el coeficiente de extinción molar del ONOO<sup>-</sup> ( $\epsilon=1,67$  cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>) se calculó la concentración del mismo. Posteriormente, se calculó qué volumen de NaOH 0,1 M era necesario para obtener una concentración de ONOO<sup>-</sup> de 3 mM. Finalmente, la nitración del NGF, se llevó a cabo agregando 10 bolos de 1µl de ONOO<sup>-</sup> a la solución detallada inicialmente. Se mezcló con *vortex* entre agregado y agregado de ONOO<sup>-</sup>. Con este método se obtuvieron 0,2 µg/µl de NGF nitrado.

### Cultivo celular

Actualmente el laboratorio cuenta con la línea celular NSC-34. La misma fue donada gentilmente por Neil Cashman de la universidad de Toronto (Cashman et al., 1992). Las células

fueron mantenidas con DMEM (Gibco) suplementado con 10% FBS (del inglés *Fetal Bovine Serum*) (Gibco) y 1% L-glutamina (Sigma). Si bien el DMEM contiene dicho aminoácido, éste se degrada rápidamente una vez que se prepara el medio y así las NSC-34 requieren del agregado periódico de L-glutamina. Para poder diferenciar a las células se utilizó el medio celular DMEM/ Ham's F12 (Sigma) en una relación 1:1 suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales, 0,01 M de NaHCO<sub>3</sub>, penicilina (100UI/L) y estreptomycin (100UI/L). Este medio no contiene FBS.

**Plaqueo y pasajes de células NSC-34.** Las células fueron tratadas con tripsina. Previo a ello se aspiró el medio de cultivo de la botella conteniendo las células, y se lavó con PBS, de manera de eliminar posibles restos de medio celular y suero que pudieran inhibir la actividad enzimática de la tripsina. Posteriormente se agregó 1 ml de solución que contiene tripsina 0,05% y EDTA 0,02%. Se incubó a 37°C por 3-5 minutos y la actividad enzimática se detuvo por el agregado de medio de cultivo suplementado con suero. Si pasado dicho tiempo las células permanecían unidas a la superficie, la botella se golpeaba vigorosamente contra la mesada. Las células se colectaron por centrifugación (1000 rpm, 5 minutos), posteriormente se contaron en la cámara de *Neubauer* y se plaquearon en placas de 24 o 96 pocillos, o en placas de 35 mm, según la necesidad. Por otro lado, se plaqueaba en una botella F25 1/3 del número de células contadas para mantener el stock celular. En nuestro laboratorio las células NSC-34 mantuvieron sus características por aproximadamente 20 pasajes, luego de esto el crecimiento de las mismas se vio afectado pues perdieron adhesión al sustrato.

**Los cultivos fueron mantenidos** en una estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. La presión parcial de CO<sub>2</sub> en la atmósfera y la temperatura regulan directamente la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto en el medio de cultivo, regulando de esta manera el pH. También es necesario mantener una alta humedad en la estufa para minimizar la evaporación del medio. Ésta se mantiene colocando un recipiente con agua en el interior de la misma. Para prevenir la contaminación de las células y de los reactivos (con bacterias u hongos), toda la manipulación se realizó en cámara de flujo laminar vertical. Todos los reactivos y materiales de plásticos se compraron estériles o se esterilizaron por filtración, autoclave o por exposición a la ultravioleta durante 15 minutos, de acuerdo el caso. Los medios de cultivo se suplementaron con antibióticos y se mantuvieron, al igual que los reactivos, a 4 °C. Dicha temperatura minimiza la actividad

microbiana. Paralelamente se buscaron señales de contaminación de los cultivos; diariamente se observaron al microscopio los cultivos celulares. Para que no disminuya la viabilidad celular, las células deben estar permanentemente en solución. Cuando las células no están en el medio celular, ya sea porque se está realizando un experimento o porque se están levantando para realizar un *western blot*, se las mantiene en una solución osmóticamente balanceada a pH fisiológico. Comúnmente se utiliza PBS (del inglés *phosphate buffered saline*), que es un buffer fosfato compuesto por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $6,47 \cdot 10^{-3}$  M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1,47 \cdot 10^{-3}$  M, NaCl 0,136 M y KCl  $2,68 \cdot 10^{-3}$  M

**Los medios de cultivo se basan en soluciones salinas balanceadas** suplementadas con aminoácidos, vitaminas y otros nutrientes. El DMEM es una modificación del medio más simple de los empleados, el medio mínimo esencial de Eagle (MEM, del inglés, *minimum essentials medium*), el cual está compuesto por numerosos aminoácidos y varias vitaminas. El DMEM contiene los mismos nutrientes que el MEM pero algunos se encuentran en concentraciones mayores. La glucosa se encuentra 4,5 veces más concentrada, la L-glutamina 5,8. Los compuestos como el ácido fólico, calcio, carbonato y piridoxina HCL están concentrados 1,5 veces, por lo que el DMEM resulta ser un medio más rico en nutrientes. Para proveer los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para la supervivencia y crecimiento de las células en cultivo, el medio basal no es suficiente. Cuando se prepara el DMEM se le agrega 0,0143 M de  $\text{NaHCO}_3$  y 0,015 M de HEPES, ambos compuestos ayudan a mantener el pH entre 7,2 y 7,4; el control de pH es esencial para obtener condiciones óptimas de cultivo. Por otro lado, el medio de cultivo DMEM contiene rojo fenol, que es un colorante indicador de pH. Si el medio se acidifica se torna de color amarillo y frente a una alcalinización vira hacia el violeta. También se añade antibióticos como penicilina (100UI/L) y estreptomycin (100 ug/mL). Todos los medios de cultivo se preparan en agua libre de pirógeno, pues al no poseer endotoxinas, lipopolisacáridos, entre otros pirógenos, optimiza la viabilidad celular y su crecimiento.

Una vez preparado el DMEM se suplementa con suero, que generalmente se emplea FBS. El suero vendido comercialmente se incuba a  $56^\circ\text{C}$  por 30 minutos para destruir las proteínas del complemento (inactivación por calor), pero existen ciertas dudas acerca del beneficio de este proceso, ya que algunos constituyentes deseables también pueden verse afectados por este procedimiento.

### Ensayos de viabilidad celular

Se realizaron 3 ensayos de viabilidad celular con el fin de evaluar el efecto de NGF y NGF nitrado sobre las células NSC-34. Dependiendo del ensayo, se emplearon células no diferenciadas o no diferenciadas. En todos los ensayos como control se empleó células sin tratar.

**Recuento celular directo:** Esta técnica implica el recuento de las células adheridas a las placas de cultivo sin necesidad de tripsinización. La ventaja de esta metodología es que nos permite discriminar las células con respecto a las que no presentan esta característica. Se tomó como criterio que las células que presentaban neuritas de una longitud mayor a la del cuerpo celular se consideraban diferenciadas. Para una mejor identificación de las células, se realizó una tinción nuclear utilizando diamidinofenilindol (DAPI). Éste es un compuesto fluorescente azul que se intercala entre los surcos del ADN de todas las células luego de atravesar las membranas celular y nuclear. En este caso, las células se sembraron en placas de 24 pocillos ( $25 \times 10^3$  células/pocillo), luego de 5 días de diferenciación, se les realizó el tratamiento con 1 o 100 ng/ml de NGF o NGF nitrado por 48 hs. Posteriormente para poder contarlas, se fijaron con paraformaldehído 4% (PFA) en PBS, durante 30 min. Se lavaron con PBS, 3 veces por 10min. Se agregó una solución DAPI (1 mg/ml) diluido 1/2000 en PBS, durante 2 minutos. Luego se lavó con PBS. Finalmente las células fueron visualizadas mediante el microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81), empleando filtros de excitación (360-370 nm) y de emisión (420-460 nm) que captan el color azul.

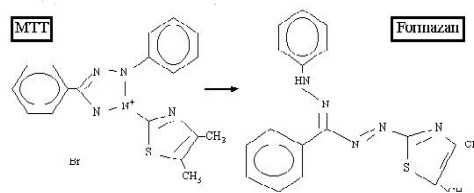
**Conteo celular con azul tripano:** La membrana plasmática de las células vivas excluye a la mayoría de las moléculas hidrofóbicas. Sin embargo, las células que poseen lesiones en dicha membrana, permiten la entrada al citoplasma de moléculas hidrofóbicas, como el colorante azul tripano. Por lo tanto, este ensayo se basa en la exclusión de dicho colorante: si las células se encuentran vivas no permiten el ingreso del mismo, mientras que células moribundas o muertas son permeables al colorante. Las células que toman una coloración azul pueden ser fácilmente observadas al microscopio. Este ensayo se realizó en células no diferenciadas, se sembraron  $25 \times 10^3$  células/pocillo en placas de 24 pocillos. Las células fueron tratadas con 1 o 100 ng/ml de NGF o NGF nitrado por 48 hs. Posteriormente, a cada pocillo se le aspiró el medio celular y se lavó con PBS. Para levantar las células se agregó 100  $\mu$ l de tripsina 0,05%+EDTA 0,02%. La placa se agitó



suavemente durante 2 minutos para permitir una distribución uniforme de la tripsina. Para frenar la reacción se adicionaron 50 µl de DMEM 50% FBS. Finalmente se agregó 20 µl de azul tripano, se mezcló pipeteando suavemente y se realizó el recuento con la ayuda de una cámara de *Neubauer*. Se contó en el microscopio la cantidad de células blancas (vivas) y azules (muertas).

**Ensayo de MTT:** El bromuro de 3-(4,5-dimetialdiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), permite estimar la actividad mitocondrial mediante un ensayo colorimétrico. Este ensayo se basa en la capacidad de las succinato

deshidrogenasa mitocondriales de células vivas de romper el anillo de tetrazolio del MTT, amarillo soluble, transformándolo en un producto, formazán, de color azul-violáceo (Slater et al., 1963). El desarrollo de color se mide espectrofotométricamente y se ha demostrado que la intensidad depende linealmente de la funcionalidad mitocondrial. Para realizar este ensayo las células se sembraron en placas de 96 pocillos ( $1 \times 10^5$  células/pocillo). Cuando las mismas presentaban un 60 % de confluencia, se les hacía el tratamiento por 48 hs con 1, 10 y 100 ng/ml de NGF o NGF nitrado. Este mismo tratamiento se realizó también en células diferenciadas. Para ello, las células, antes de recibir el tratamiento, fueron diferenciadas durante 5 días. Una vez finalizado el tratamiento se agregó 0,2 mg/ml de MTT (sigma). A los 40 minutos se frenó la reacción para evitar la formación de espículas en el espacio extracelular, ya que las mismas influyen en la lectura de la absorbancia, descartando el medio. Posteriormente se agregó 100 µl de DMSO (Sigma) por pocillo, se agitó para poder disolver el formazán y, finalmente, se leyó la absorbancia a 570nm en un lector de placas.



### Inmunocitoquímica

Esta técnica sirve para detectar y localizar antígenos celulares mediante la reacción antígeno-anticuerpo. Para visualizar el lugar donde se produce la reacción es preciso emplear un trazador o marcador. El marcaje puede realizarse con fluorocromos, técnicas inmunoenzimáticas, entre otros. Este ensayo se realizó con el fin de evaluar la presencia del receptor p75<sup>NTR</sup> y TrKA en células no diferenciadas. Las células se sembraron en placas p35 mm (aprox.  $1 \times 10^4$  células). Una vez que las

células alcanzaron a cubrir alrededor del 60-70% de la placa se fijaron con PFA, como se indicó anteriormente. Con el fin de evitar la unión de los anticuerpos a sitios inespecíficos se bloqueó la placa durante 1 hora, también a temperatura ambiente, con una solución conteniendo 10 % suero de cabra y 0,3% Tritón X100 en PBS. El Tritón X100 es un detergente que permeabiliza la membrana sin alterar las interacciones entre las proteínas. Se emplea para permitir el acceso de anticuerpos a compartimentos celulares y subcelulares de forma tal que puedan unirse a los ligandos contra los cuales fueron diseñados.

Los anticuerpos, tanto el primario como el secundario, se diluyeron en la solución de bloqueo. El cultivo celular se incubó con los anticuerpos primarios anti - TrKA policlonal de conejo (1/200, Millipore) y anti- p75 monoclonal de ratón (1/1000, Chemicon) durante toda la noche, a 4°C. Luego se retiró el anticuerpo no unido mediante 3 lavados de 10 minutos con PBS. A continuación, se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a sondas fluorescentes; anti-conejo conjugado a Indocarbocianina (1/500, Jackson) y anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 488 (1/500 Molecular Probes), durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS. Finalmente se agregó DAPI (1 mg/ml) diluido 1/2000 en PBS durante dos minutos, luego se lavó con PBS. Ambos anticuerpos se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81) con láseres de excitación de 360-370 nm, 470-495 nm y 530-550 nm

#### Análisis de proteínas por SDS-PAGE/Western blot

La técnica *SDS-PAGE/Western Blot* es una técnica de rutina en todos los laboratorios que realizan análisis de proteínas. El primer paso del Western Blot es la separación de las macromoléculas de un extracto celular, mediante geles de electroforesis; después, las macromoléculas ya separadas en función de su diferente peso molecular se transfieren a una matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Posteriormente, se bloquea la membrana para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés. En el siguiente paso, se une a dicha proteína transferida un anticuerpo específico, ligado a una enzima. Finalmente, se añade un sustrato apropiado para dicha enzima con lo que se produce un producto detectable como, por ejemplo,

un precipitado cromogénico o fluorogénico en la membrana. Como resultado se puede visualizar la presencia o no de la proteína de interés.

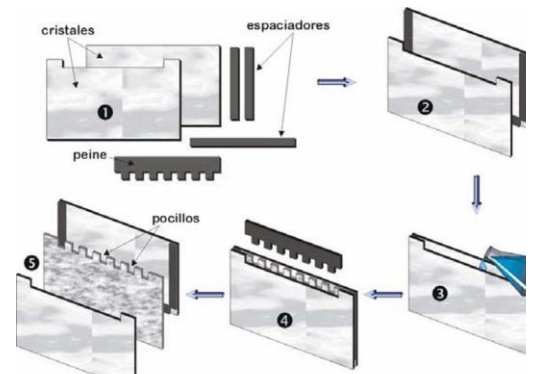
Para evaluar la presencia del receptor p75<sup>NTR</sup> y de TrkA, las células NSC-34 no diferenciadas fueron levantadas, previo lavado con PBS frío, en frío, con un buffer de lisado. El mismo contenía 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 5 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e inhibidor de proteasas (Sigma, p1427). Luego de recoger el extracto celular se lo centrifugó a 4°C, 12000 rpm, durante 15 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se procedió a cuantificar la cantidad de proteína presente en la muestra. Para ello, se empleó el método del ácido bicinconínico (BCA); es un ensayo colorimétrico que involucra la adición de una sustancia química que es capaz de reaccionar con los aminoácidos: Tirosina, Triptofano, Cisteína y Cistina y con los enlaces peptídicos. Inicialmente el BCA forma parte de un complejo con Cu<sup>2+</sup> cuya coloración es verdosa. Cuando entra en contacto con la proteína, dicho ion es reducido a Cu<sup>1+</sup> en un medio alcalino. Como consecuencia hay un cambio de coloración de la solución, adquiriendo una tonalidad violeta, que se cuantifica mediante una medida de absorbancia (562 nm). La cantidad de iones de cobre reducidos es proporcional a la cantidad de proteínas presentes, ya que los causantes de dicha reducción son los aminoácidos cisteína, triptófano y tirosina, los enlaces peptídicos y la estructura macromolecular de las proteínas. Para poder determinar la concentración de proteína se realizó una curva de calibración construida con una proteína estándar, en este caso albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovin seric albumin*) cuya concentración es conocida. Posteriormente se interpolan los resultados obtenidos de la proteína de interés en la curva de calibración. En este caso se empleó un *multiwell* de 96 pocillos. A cada pocillo de la curva estándar se le agregó 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µL de BSA (µg/ml) y 200 µL del reactivo BCA + CuSO<sub>4</sub> (50 partes de BCA por cada parte de CuSO<sub>4</sub>). A los pocillos que tenían las proteínas de interés se le agregó 1 µL de muestra, 4 µL de agua y también 200µL del reactivo BCA + CuSO<sub>4</sub>. Todos los pocillos se realizaron por duplicado. Se incubó por 30 minutos a 37°C y, posteriormente, se midió la absorbancia en un lector de ELISA. Luego de haber cuantificado las proteínas, se agregó a las mismas el buffer de carga (15% SDS, 0,3 M Tris pH 6,8, 25 % Glicerol, 0,01 % *Bromophenol Blue*). Comúnmente los anticuerpos necesitan que las proteínas estén sometidas a un ambiente reductor, esto implica que la muestra esté hervida y en presencia de algún agente desnaturizante. En este trabajo sólo el anticuerpo que reconoce al receptor TrkA necesita dicha condición, pues reconoce a la proteína en su forma desnaturizada, por lo que se agregó 90 % de buffer de carga 5X y 10 % β-mercaptoetanol.

Posteriormente la muestra fue hervida a 95°C durante 5 minutos. El anticuerpo que reconoce al receptor p75<sup>NTR</sup> no requiere de un ambiente reductor, por lo que solamente se agregó buffer de carga 5X y no se hirvió la muestra. Con la curva de BCA, y con el correspondiente agregado de buffer de carga, se obtuvo en cada muestra la misma concentración final de proteína.

A continuación se prepararon los geles concentradores y de separación (Fig.4). El primero se utiliza para que la entrada de las proteínas al gel de separación sea más ordenada y de forma compacta.

El porcentaje de acrilamida del gel separación depende del peso molecular de las proteínas de interés, que en este caso fue del 10 %. Los protocolos para la realización de ambos geles son los siguientes: Gel concentrador 5 % para 5 ml: 3,4 ml de agua, 0,83 ml Acrilamida-bis-acrilamida 30 %, 0,63 ml Tris 1,5 M pH 6,8, 0,05 ml SDS 10%, 0,05 ml APS (persulfato de amonio) 10%, 0,005 ml TEMED (Tetrametiletilenediamina). Gel de separación 10 % para 15 ml: 5,9 ml agua, 5 ml Acrilamida-bis-acrilamida 30%, 3,8 ml Tris 1,5 M pH 8,8, 0,15 ml SDS 10%, 0,15 ml APS 10%, 0,006 ml TEMED. Ambos geles contienen el detergente SDS. Los detergentes no sólo afectan a la estructura nativa de las

proteínas, sino que también afecta las interacciones que tiene la proteína con otras moléculas. El SDS es un potente agente desnaturizante que posee carga negativa. Dichas cargas se intercalan entre los aminoácidos de las proteínas, lo que implica que las cargas propias de las proteínas quedan enmascaradas o anuladas; asimismo, la molécula de SDS proporciona una carga negativa de forma uniforme. Por lo tanto, las proteínas sometidas a un campo eléctrico, migrarán hacia el polo positivo. Dicha movilidad depende del tamaño y de la carga por unidad de masa. Como ésta es constante, la movilidad es solamente función de la masa molecular. Los compuestos APS y TEMED se emplean para acelerar el proceso de polimerización de los geles. La solución conductora, la que baña a los geles, está compuesta por Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M, SDS 0,0034 M, agua destilada y ajustada a pH 8,3. Para realizar la corrida electroforética se usó la fuente *electrophoresis power supply 301 (General Electric)*. En cada carril se sembró 30 ug de proteína. Posteriormente la fuente se fijó a un voltaje de 110 mv. Las muestras fueron corridas hasta que el



**Figura 4.** Esquema donde se muestran los pasos que llevan al armado del gel. Se requiere de espaciadores, que le dan el espesor al gel (1,5 mm) y dos vidrios, los cuales son montados en un soporte. Luego de preparar la solución de acrilamida, esta se vierte en el espacio formado por los vidrios. Se coloca el peine, para que este forme los pocillos y se deja reposar hasta que el gel se encuentra completamente polimerizado.

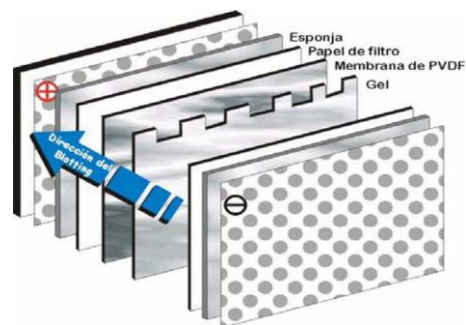
frente de corrida abandonó el gel. Se interrumpió la corrida y se procedió a la realización de la transferencia.

La transferencia implica la movilidad de las proteínas a una membrana (PVDF o nitrocelulosa), por lo que las proteínas abandonan el gel y quedan adheridas fuertemente a una membrana (Fig.5). La movilidad ocurre porque las proteínas son sometidas a un campo eléctrico que se forma entre el gel y la membrana. El buffer de transferencia está compuesto por 20 % etanol, 0,025 M de tris, 0,192 M de glicina en agua destilada. La transferencia se realizó en frío. En este caso se empleó un voltaje de 350 mv,

durante 2 horas. El material de la membrana es de nitrocelulosa. Después de la transferencia, es aconsejable teñir la membrana reversiblemente para comprobar la eficacia de la transferencia. El rojo *Ponceau* (0,2 % rojo *Ponceau*, 3 % ácido tricloroacético, en H<sub>2</sub>O) es el reactivo más utilizado para dicha tinción. Una vez comprobada la eficiencia de la transferencia se lavaron los restos del colorante, sumergiendo la membrana en agua destilada y posteriormente en TBS-*Tween* (Tris 0,02 M, NaCl 0,15 M, *Tween* 0,1 %, en H<sub>2</sub>O destilada ajustando el pH a 7,6) para que desaparezca la marca de rojo *Ponceau*.

El siguiente paso consiste en bloquear la membrana para reducir las uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana, disminuyendo así el ruido de fondo (*background*). La solución bloqueante depende del antígeno así como de la enzima que está conjugada al anticuerpo secundario. Por ejemplo, aquellos Western Blot en los que se utiliza la enzima fosfatasa alcalina, la solución bloqueante debe ser en TBS ya que el PBS interfiere con dicha enzima. En este trabajo, la solución bloqueante fue 5% leche en polvo descremada en TBS-0,1% *Tween*. Se incubó en agitación por 2 horas, a temperatura ambiente.

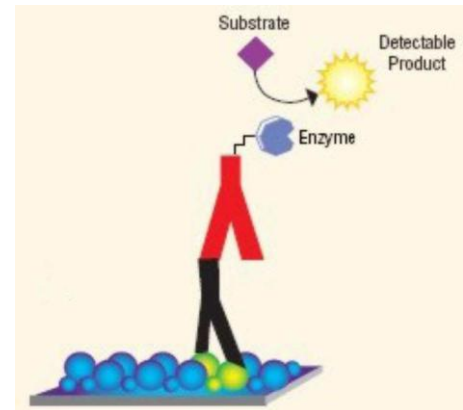
Luego de bloquear la membrana, se incubó la misma con el anticuerpo primario (puede ser mono o policlonal) que se diluye en la solución de bloqueo. Nuestras proteínas de interés son el receptor p-75 y TrkA, por lo que usamos anticuerpos primarios anti-p75 monoclonal de ratón (1/500, Chemicon) y anti TrkA policlonal de conejo (1/2000, Millipore). Ambos anticuerpos se incubaron durante toda la noche en agitación suave a 4°C. Antes de la incubación del anticuerpo



**Figura 5.** Esquema del armado para la transferencia. Se requiere estrecho contacto entre el gel y la membrana. Para esto se colocan ambos juntos, se los encierra en un papel absorbente y dos almohadillas. La cubierta externa es de policarbonato.

secundario, es necesario realizar lavados con el fin de eliminar los anticuerpos primarios que no se unieron. Se realizaron 3 lavados con TBS-*Tween*, de 10 minutos cada uno, en agitación rápida.

La elección del anticuerpo secundario depende de la especie donde se desarrolló el anticuerpo primario, y del tipo de marcaje que se quiere emplear. Anteriormente se utilizaban radioisótopos, pero son caros y poseen una vida media muy corta. Actualmente se emplean marcajes con fluoróforos o enzimas. Las enzimas más utilizadas son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano (HRP); Existe para cada enzima una amplia variedad de sustratos, fluorogénicos, quimioluminiscentes y cromogénicos, siendo este último el más empleado, ya que proporciona un método de detección económico y sencillo. En este caso, los anticuerpos secundarios empleados fueron anti-ratón (1/4000, GE Healthcare) y anti-conejo (1/5000, Millipore). Ambos anti-cuerpos fueron desarrollados en cabra y tienen conjugado la enzima HRP. Se los incubó en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Al igual que antes, finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-*Tween* en agitación rápida para eliminar los anticuerpos que no se unieron.



**Figura 6.** Unión de los anticuerpos conjugados a la membrana. Se muestra como el anticuerpo secundario, conjugado a la enzima, se une al anticuerpo primario que reconoce una proteína en la membrana. Una vez en contacto con el sustrato, se genera un producto luminoso.

La última etapa del Western blot es el revelado de la membrana. Existen diferentes maneras de realizar este procedimiento. En el presente trabajo se usó el método de quimioluminiscencia, es decir, la energía de una reacción química que se emite en forma de luz (Fig.6). Para ello se empleó la enzima HRP que se encuentra conjugada al anticuerpo secundario. Dicha enzima cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrogeno. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol se encuentra en un estado excitado del que pasa a la situación basal, reducida, más estable, emitiendo luz. La luz emitida tiene una longitud de onda de 428 nm, con un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos después de iniciada la reacción. En este caso la membrana fue incubada con los sustratos correspondientes (rpn2106, GE Healthcare) durante 1 minuto. Luego se colocó la membrana junto con una placa radiográfica (Kodak) en el *cassette* de revelado durante 20 minutos. A continuación la placa fue incubada unos minutos en la solución

reveladora (Química mediQ, concentración final 1X). Cuando la señal se hizo presente en la placa radiográfica, ésta se lavó con agua y finalmente se sumergió en la solución fijadora (Química mediQ, concentración final 1X).

#### Procesamiento y análisis de datos

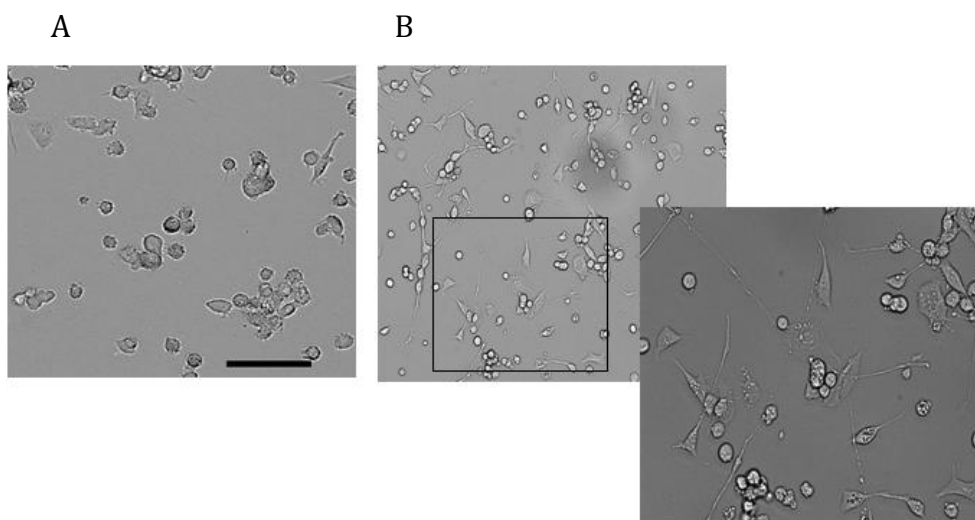
En cuanto a los ensayos de viabilidad celular se realizaron de 1 a 4 experimentos independientemente y en cada uno de ellos las condiciones experimentales se repitieron de 2 a 5 veces. Para la cuantificación del número de células o núcleos, se fotografiaron 3-5 campos, uno central y los restantes periféricos, con el mismo aumento. Las células no diferenciadas y diferenciadas se contaron manualmente con el programa *Image J*<sup>®</sup>. Se emplearon test paramétricos (ANOVA) o no paramétricos (*Tukey's Multiple Comparison Test*) para la comparación entre grupos tratados y controles en función de la naturaleza de los datos que se obtuvieron, los cuales se expresaron en media  $\pm$  SEM (del inglés *Standard Error of the Mean*). Los programas estadísticos utilizados fueron Microsoft Excel<sup>®</sup> y GraphPad Prisma.

## Resultados

---

### Las células NSC-34 se diferencian en motoneuronas cuando están libres de suero.

En cuanto al primer objetivo, que era poner a punto el proceso de diferenciación celular, las células NSC-34 adquieren la morfología de motoneuronas cuando el medio donde crecen está libre de suero. En este trabajo el proceso de diferenciación fue llevado a cabo durante 5 días. Al finalizar dicho período de tiempo, sólo el 50 % de las células se encuentran diferenciadas. Consideramos células diferenciadas cuando las mismas poseen neuritas de una longitud mayor a la del cuerpo celular. Las células que después del proceso de diferenciación siguen teniendo un aspecto esférico las consideramos células no diferenciadas (Fig.7)



**Fig.7. Diferenciación de las células NSC-34.** (A) Células control. Crecieron en DMEM, 10%FBS, 1% L-glutamina. (B) Células sometidas al proceso de diferenciación por 5 días. Posteriormente se fijaron y se tomaron fotos con el microscopio de campo claro. La imagen de la derecha pertenece al recuadro mostrado en la imagen izquierda. Se considera que una célula está diferenciada, cuando la misma emite procesos de una longitud mayor a la del cuerpo celular. Barra de calibración 100  $\mu$ m.

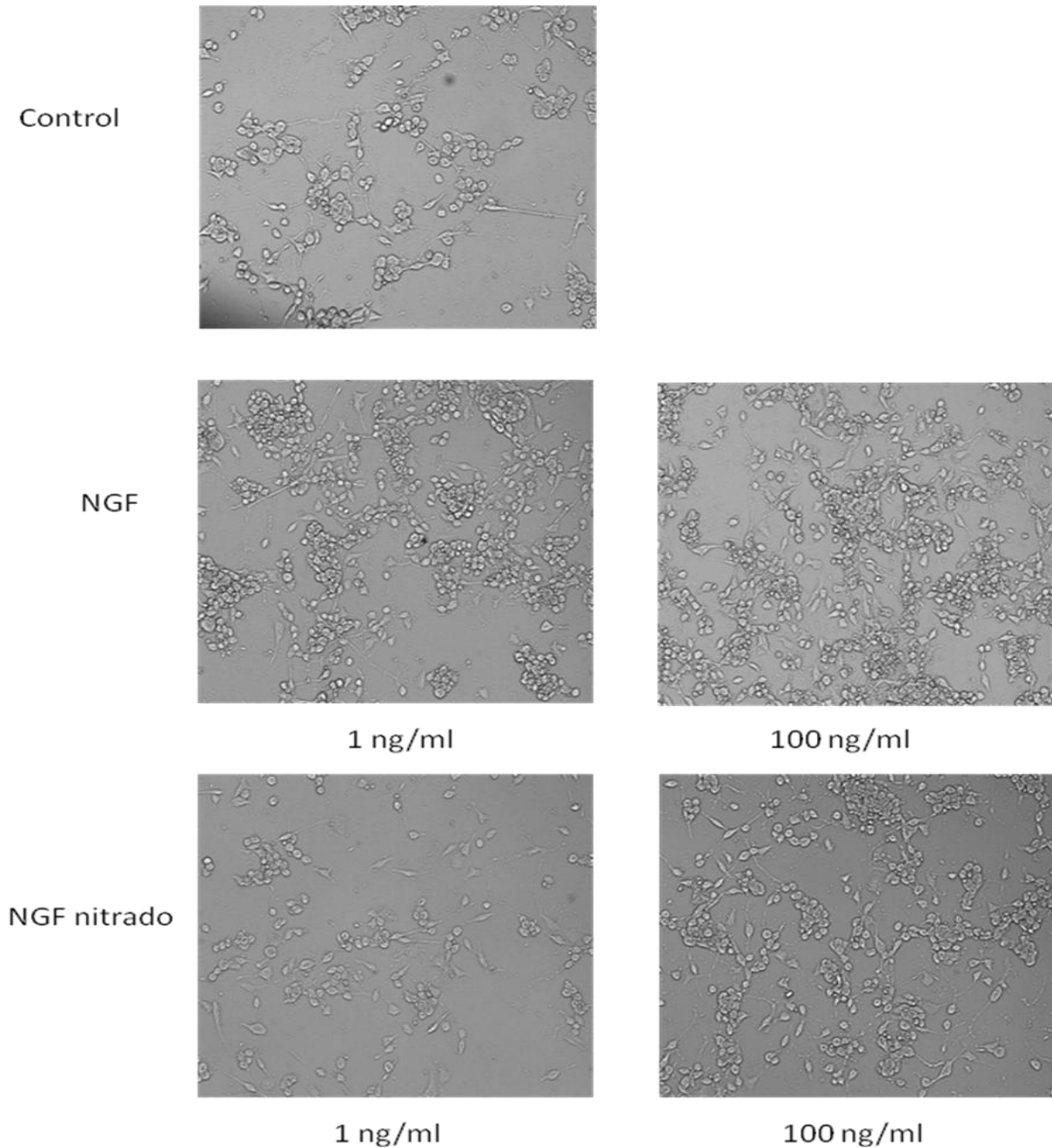
### NGF y NGF nitrado inducen un aumento en el número de células NSC-34 no diferenciadas.

Con respecto al segundo objetivo, que era estudiar el efecto biológico provocado por las neurotrofinas NGF y NGF nitrado en las células NSC-34, se observó que ambas neurotrofinas



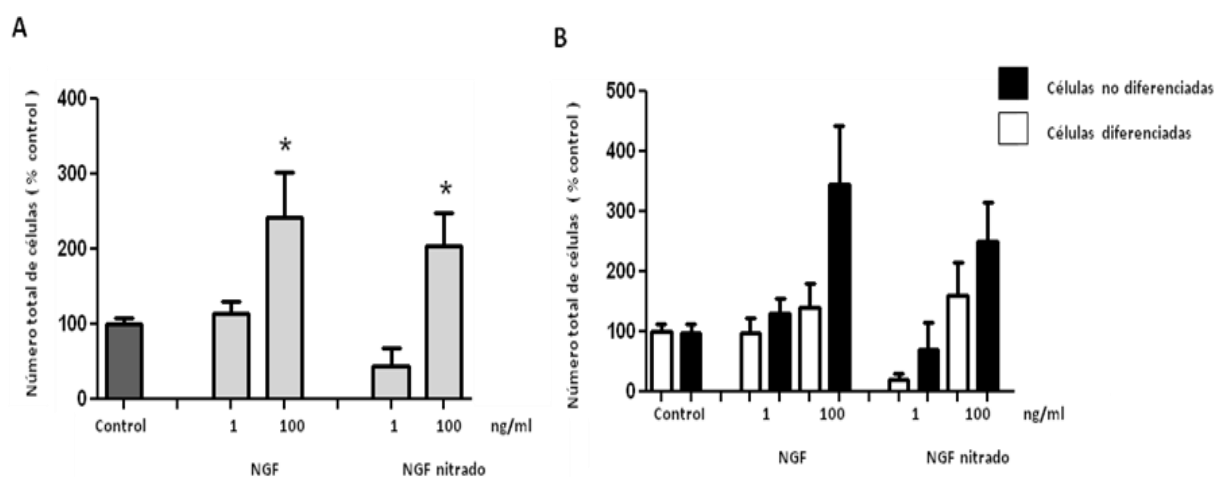
inducen proliferación celular cuando las células se encuentran no diferenciadas. Este efecto biológico se manifestó en los diferentes ensayos de viabilidad celular.

Para realizar el recuento celular directo se tomaron fotos donde las células NSC-34 fueron diferenciadas por 5 días y, posteriormente, fueron tratadas con NGF o NGF nitrado (1 o 100 ng/ml). Luego de 48 hs, se fijaron y se tomaron fotos con el microscopio de campo claro (se puede observar que hay 50% de células no diferenciadas y 50% de células diferenciadas). Las fotos se ven reflejadas de manera ilustrativa en la figura 8.



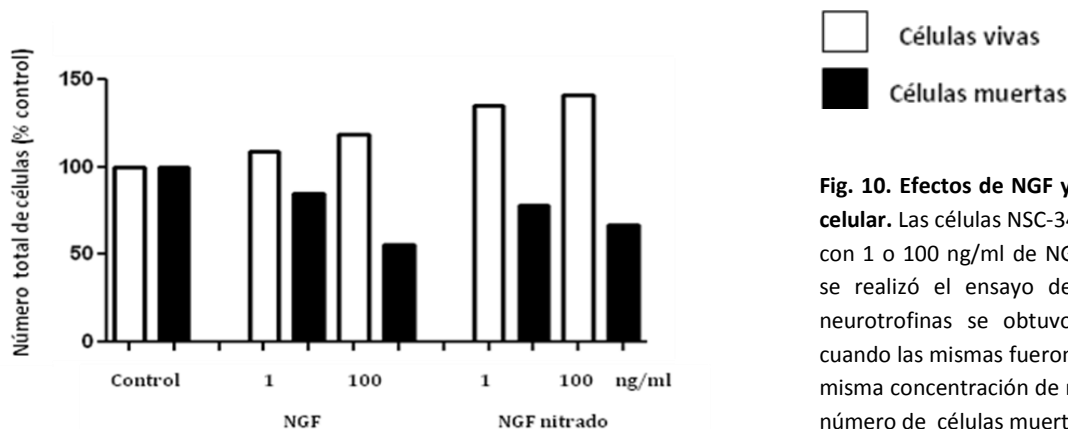
**Fig.8. NGF y NGF nitrado producen un incremento en las subpoblaciones de células no diferenciadas de NSC-34.** Las células NSC-34 fueron plaqueadas y cuando se alcanzó una confluencia de aproximadamente el 60% se sometieron a un proceso de diferenciación utilizando medio de cultivo sin suero durante 5 días. Las células NSC-34 fueron tratadas con NGF o NGF nitrado con 1 ng/ml o 100ng/ml; 48 hs después se tomaron fotos.

Con respecto al conteo celular directo, la cantidad de células totales se incrementa el doble, comparado con el control, cuando las células fueron tratadas con 100 ng/ml de NGF o NGF nitrado (Fig. 9A). Como se dijo anteriormente, sólo el 50 % de las células logran diferenciarse, por lo tanto hay que considerar ambas subpoblaciones. El recuento celular directo sugiere que, dentro de la subpoblación de células no diferenciadas, hubo proliferación celular cuando las mismas fueron tratadas con concentraciones elevadas de neurotrofinas. Por otro lado, la subpoblación de células diferenciadas se observa una importante reducción del número de células, cuando las mismas fueron tratadas con 1 ng/ml de NGF nitrado (Fig. 9B).

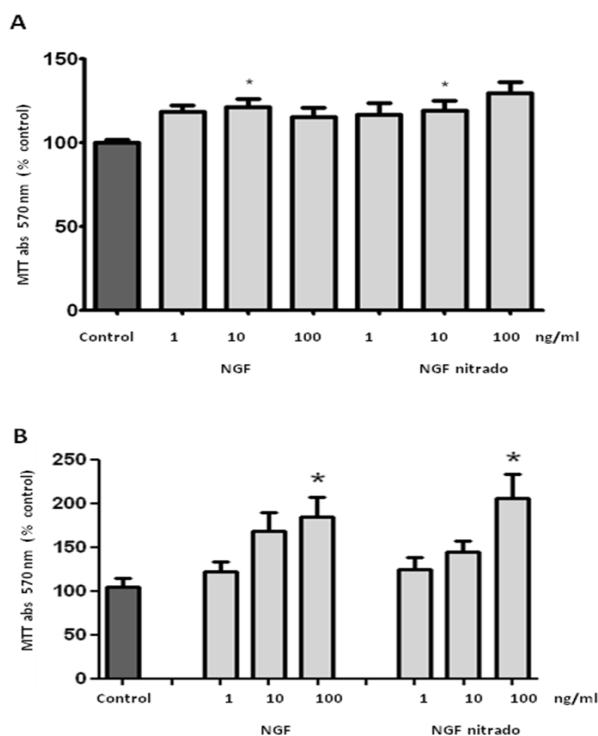


**Fig. 9. Efectos de NGF y NGF nitrado sobre las subpoblaciones de células NSC-34.** Las células fueron diferenciadas por 5 días, posteriormente se las trató con NGF o NGF nitrado 1 o 100 ng/ml. Luego de fijaron y se contaron al microscopio. (A) conteo de células totales. Se observa mayor cantidad de células cuando las mismas fueron tratadas con 100 ng/ml de NGF o NGF nitrado. (B) Dentro de la subpoblación de células no diferenciadas se puede observar un incremento de células, cuando las mismas fueron tratadas con 100 ng/ml de NGF ó NGF nitrado. Mientras que en las células diferenciadas hubo una notoria reducción de células cuando fueron tratadas con 1 ng/ml de NGF nitrado. Todos los valores se expresan como % control  $\pm$  SEM. (\*) indica significación estadística respecto al control ( $p < 0.05$ ). N=2.

En otro ensayo, utilizando azul tripano (Fig.10) se obtuvieron resultados preliminares (N=1) que demuestran que el tratamiento con NGF durante 48 hs no produjo cambios estadísticamente significativos en el número de células viables. Sin embargo, el número de células muertas se vio significativamente reducido. Por otro lado, ambas concentraciones (1 y 100 ng/ml) de NGF nitrado mostraron una tendencia hacia la proliferación, mayor que la observada con NGF, incrementando el número total de células. Al igual que con NGF disminuyeron las células muertas, lo cual evidenciaría un efecto protector sobre la supervivencia de las células NSC-34.

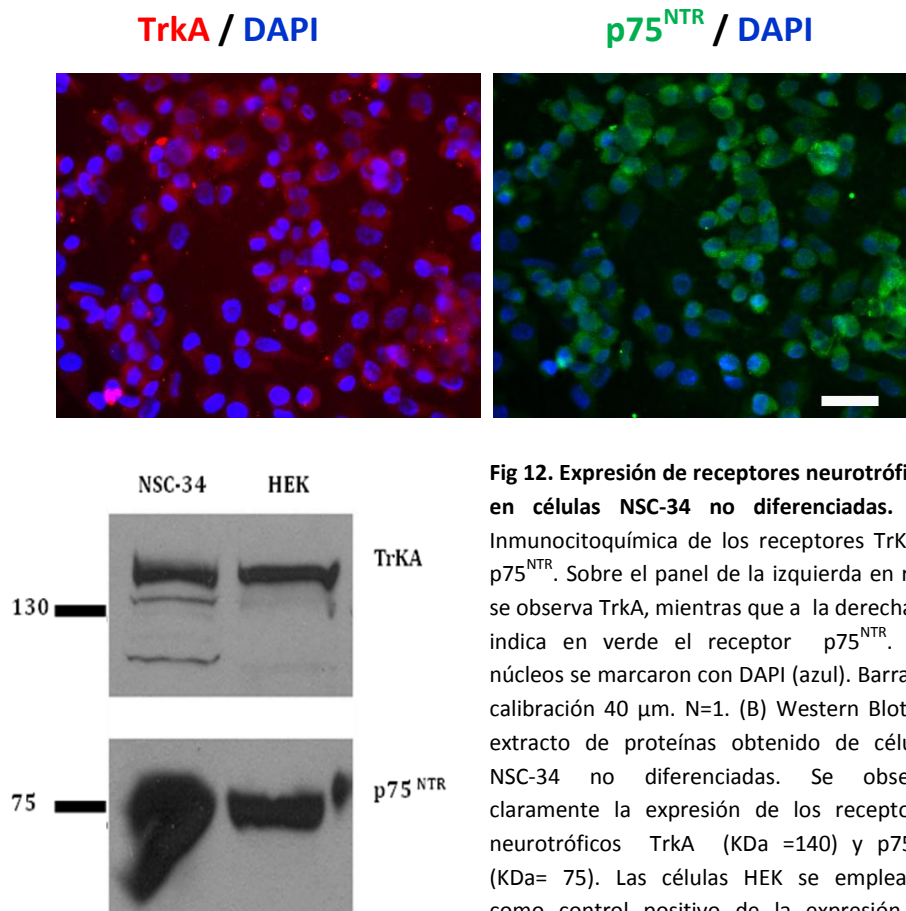


Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante el ensayo de MTT, observamos que en las células no diferenciadas (Fig. 11A) hubo un aumento significativo en la actividad mitocondrial, lo que sugiere un incremento en el número de células, cuando las mismas fueron tratadas con 10 ng/ml de NGF o NGF nitrado. Sin embargo, en las células diferenciadas (Fig. 11B), se observa que a medida que va aumentando la concentración de ambas neurotrofinas, aumenta el número de células, señalando una curva dosis respuesta, siendo la dosis de 100 ng/ml capaz de producir un incremento significativo en la proliferación celular.



## Las células NSC-34 no diferenciadas expresan los receptores neurotróficos TrkA y p75<sup>NTR</sup>

El último objetivo de este trabajo era identificar los receptores neurotróficos en las células NSC-34. En las condiciones utilizadas en éste estudio para cultivar las células NSC-34 no diferenciadas detectamos, mediante la técnica inmunocitoquímica, la presencia de los receptores neurotróficos TrkA y p75<sup>NTR</sup> (Fig.12 A), ambos localizados en la membrana plasmática y en el interior celular. Para corroborar dicho resultado se realizó la técnica *PAGE/Western Blot* (Fig.12 B) donde, a partir del extracto celular de las NSC-34, se pudo confirmar la presencia de ambos receptores. Como control positivo se emplearon las células HEK, ya que expresan ambos receptores neurotróficos.



**Fig 12. Expresión de receptores neurotróficos en células NSC-34 no diferenciadas.** (A) Inmunocitoquímica de los receptores TrkA y p75<sup>NTR</sup>. Sobre el panel de la izquierda en rojo se observa TrkA, mientras que a la derecha se indica en verde el receptor p75<sup>NTR</sup>. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Barra de calibración 40  $\mu$ m. N=1. (B) Western Blot de extracto de proteínas obtenido de células NSC-34 no diferenciadas. Se observa claramente la expresión de los receptores neurotróficos TrkA (KDa =140) y p75<sup>NTR</sup> (KDa= 75). Las células HEK se emplearon como control positivo de la expresión de ambos receptores neurotróficos.

## **Discusión**

---

La neurotrofina NGF es producida por varios tipos celulares y en diferentes circunstancias fisiopatológicas, teniendo múltiples funciones biológicas, especialmente en el sistema nervioso. Por otro lado, el grupo de investigación de Barbeito y cols demostró, *in vitro*, que la molécula de NGF cuando está expuesta en un ambiente oxidante puede nitrarse y consecuentemente formar oligómeros (varias subunidades de NGF agrupadas). Esta “nueva” neurotrofina es conocida como NGF nitrado que pertenece a especies de alto peso molecular. En el presente trabajo se estudió el efecto biológico causado por las neurotrofinas NGF y NGF nitrado sobre la línea celular de motoneuronas NSC-34. Dicha línea expresa los receptores de neurotrofinas por lo que es un modelo de gran utilidad para testear los efectos de neurotrofinas y sus mecanismos de acción en motoneuronas sin necesidad de utilizar cultivos primarios. De manera interesante nuestros resultados demostraron que, a diferencia de lo que ocurre en cultivos primarios de motoneuronas donde NGF nitrado provoca apoptosis, en las células NSC-34 estas neurotrofinas incrementan el número de células, cuando las mismas no están diferenciadas. A su vez, nuestro estudio permitió determinar las concentraciones de NGF y NGF nitrado que provocan dicho efecto biológico. Por último, se identificó qué receptores neurotróficos expresan las células NSC-34 no diferenciadas. En su conjunto, el presente estudio representa la primera aproximación experimental describiendo los efectos del NGF nitrado en las células NSC-34.

El primer desafío que encontramos para llevar a cabo este proyecto fue establecer una metodología que permitiera diferenciar las células NSC-34, es decir, que la población adquiriera un fenotipo similar a los cultivos primarios de motoneuronas. En estudios previos realizados por otros autores se utilizaron medios de cultivo con bajos porcentajes para lograr la diferenciación. Así, por ejemplo, Matusica logró un 50 % de células diferenciadas cuando las trató con 3 % de FBS, mientras que Vandell las diferenció con un 1 % (Matusica et al., 2008; Vandell et al., 2008). A diferencia de estos autores, en este trabajo no se logró obtener un alto porcentaje de células diferenciadas cuando se utilizó medio con suero, aún con porcentajes tan bajos como 1 o 3%. El máximo nivel de diferenciación fue del 50% que se obtuvo utilizando el medio libre de suero.

Al igual de lo reportado por Eggett, cuando las células empezaban el proceso de diferenciación, había muerte celular masiva, disminuyendo notoriamente la cantidad de células viables (Eggett et al., 2002). Por otro lado, en concordancia con los autores Hunter, Cashman y Durham, experimentamos dificultades en cuanto a la adhesión celular cuando las células estaban sometidas al proceso de diferenciación (Hunter et al., 1991; Cashman et al., 1992; Durham et al., 1993). Es por ello que sólo las sometimos a dicho proceso durante 5 días, ya que en tiempos más prolongados las células diferenciadas presentan neuritas con una morfología similar a un collar de perlas. Dicha morfología está asociada a una disfunción neuronal, que conduce a la muerte celular (Takeuchi et al., 2005). Por todo lo explicado anteriormente sugerimos que en el presente trabajo se empleó un clon de células que difiere fenotípicamente del clon empleado por los autores mencionados.

En relación a la hipótesis planteada, se esperaba que el NGF nitrado cause apoptosis en las células NSC-34. Mediante los ensayos de viabilidad celular se obtuvo que ambas neurotrofinas fueron capaces de inducir un aumento en la cantidad de células NSC-34 no diferenciadas. Con respecto al ensayo conteo celular directo, observamos que hay un aumento en la cantidad de células cuando las mismas fueron tratadas con 100 ng/ml de NGF o NGF nitrado. Si analizamos más detalladamente las subpoblaciones no diferenciadas y diferenciadas, observamos que: dentro de la subpoblación de células no diferenciadas, hay una mayor cantidad de células cuando las mismas fueron tratadas con elevadas concentraciones de neurotrofinas. Este resultado sugiere que en las células no diferenciadas el equilibrio entre la expresión de los receptores TrKA y p75<sup>NTR</sup>, esté a favor del receptor TrKA (habría mayor cantidad). Por lo que a mayor concentración de neurotrofinas, mas cantidad de células. En cambio, en la subpoblación de células diferenciadas se observa una reducción importante de células cuando las mismas fueron tratadas con 1 ng/ml de NGF nitrado y un aumento de células cuando fueron tratadas con 100 ng/ml de la misma neurotrofina. Esta discordancia en el comportamiento biológico puede radicar que cuando se nitra al NGF, éste no resulte del todo nitrado, por lo que el NGF restante tenga actividad trófica. Por otro lado, el aumento en el número de células puede deberse a que no todas las células se diferencian, y son éstas, las no diferenciadas las que proliferan.

Si observamos el resultado, preliminar, obtenido con el ensayo azul tripano se puede inferir que, a medida que incrementamos las concentraciones de ambas neurotrofinas, hay un aumento de células vivas y, paralelamente, hay una disminución de células muertas. Este comportamiento sugiere que las neurotrofinas podrían actuar como protectoras de la apoptosis. Si bien a las células no se les provocó ningún daño, puede ser que éste clon celular requiera, para su supervivencia, de más factores tróficos presentes en el suero. Recientemente se reportó que el tratamiento sobre cultivo primario de motoneuronas provenientes de una injuria, con 50 ng/ml de NGF, produce un incremento significativo de la supervivencia. Los autores postularon que el NGF cumplió, al igual que nosotros, un rol protector (Chen et al., 2010).

Finalmente el ensayo de MTT abre un abanico de preguntas. El resultado señala una discordancia entre las células no diferenciadas y diferenciadas. Cuando las células no diferenciadas fueron tratadas con 10 ng/ml de NGF o NGF nitrado se observaba el máximo efecto biológico, sin embargo, para las células diferenciadas, se necesitó de 100 ng/ml de NGF o NGF. ¿A qué se debe dicha discordancia? ¿Las células diferenciadas proliferan?. Una posible explicación de la primera pregunta podría deberse a que, cuando las células fueron sometidas al proceso de diferenciación, cambian la cantidad de receptores neurotróficos, cuya función está relacionada con el efecto biológico observado. También puede ocurrir que los receptores varíen su sensibilidad frente a las neurotrofinas. Por otro lado, Matusica (2008) reportó que esta línea celular, cuando se diferencia, no cambia el perfil de expresión de los receptores neurotróficos, por lo que descartamos que las células hayan variado la expresión de receptores que están mediando el efecto biológico. Con respecto a la segunda pregunta, puede pasar que son las células no diferenciadas las que están proliferando y no las diferenciadas. Para sacar dicha incertidumbre se podría realizar una inmunocitoquímica con células diferenciadas, y tratarlas con la sonda Brdu (este compuesto es análogo a la timidina, por lo que se incorpora en células que hayan pasado por la fase S del ciclo celular). Estas dos técnicas nos permiten visualizar dos cosas: primero, discriminar entre células no diferenciadas y diferenciadas; y segundo, podemos ver qué núcleos han incorporado dicha sonda. Por otro lado, este ensayo mide actividad mitocondrial, por lo que no podemos afirmar que con esta técnica las células hayan aumentado su número al considerar más actividad mitocondrial, más cantidad de células. Gatenby y Gillies (2004) reportaron que las células cuando no se están dividiendo, poseen una baja tasa metabólica. Eso es comparable con nuestros resultados; las

células no diferenciadas mostraron un mínimo incremento de actividad mitocondrial cuando fueron tratadas con 1, 10, 100 ng/ml de NGF y NGF nitrado.

En cuanto a los receptores de NGF que expresan las células NSC-34 no diferenciadas se detectó, por inmunocitoquímica y por *PAGE/Western blot*, la presencia de TrkA y p75<sup>NTR</sup>. Al igual que lo reportado por Zweifel y cols. (2005) ambos receptores se localizan en la membrana plasmática y en el interior celular. Matusica demostró mediante *western Blot* y citometría de flujo que las células NSC-34 carecen del receptor TrkA (Matusica et al., 2008). Este resultado difiere a lo encontrado en la bibliografía ya que se reportó hace tiempo que las motoneuronas no expresan el receptor neurotrófico TrkA (Yan et al., 1993). Podemos sugerir, entonces, que el fenotipo de las células NSC-34 empleadas en este trabajo tiene diferencias con aquellas empleadas por otros autores.

Con este resultado, y con lo obtenido en los diferentes ensayos de viabilidad celular, dejamos planteada las siguientes preguntas: ¿Es el receptor TrkA el que está mediando la proliferación celular cuando se tratan las células con NGF y NGF nitrado? ¿El receptor p75<sup>NTR</sup> tiene algún rol en el efecto biológico obtenido? En el trabajo de Pehar y cols. (2006) NGF nitrado causó apoptosis en cultivos primarios de motoneuronas que expresan p75<sup>NTR</sup> pero carecen de TrkA. Esta diferencia en el perfil de receptores expresados podría explicar la discrepancia con los resultados obtenidos en las células NSC-34. El receptor TrkA está involucrado en la supervivencia y proliferación de otros tipos celulares. Ya en 1998 Yoon y cols. reportaron que, cuando a un cultivo de oligodendrocitos que expresan los receptores p75<sup>NTR</sup> y TrkA se lo trata con 100 ng/ml de NGF, obtenían una reducción de muerte celular si lo comparaban con un cultivo de oligodendrocitos que sólo expresaban p75<sup>NTR</sup>; por lo que este grupo postuló que la presencia de TrkA modula la funcionalidad de p75<sup>NTR</sup> mediante la inhibición de la vía JNK, y no afecta la activación de la vía NFkB que conduce a una supervivencia celular. Recientemente Moscatelli y cols. (2009) reportaron que, en células madres de ratón, el NGF está implicado en la proliferación celular, y para que dicho efecto ocurra se requiere de la combinación de los receptores TrkA y p75<sup>NTR</sup>.

Para responder la primer pregunta podríamos evaluar por *Western Blot* si el receptor TrkA de las células NSC-34 no diferenciadas es funcional y capaz de fosforilarse y activarse a sí mismo luego



de unir NGF o NGF nitrado. Además, se podría determinar si estas neurotrofinas pueden activar vías de señalización tales como Erk y Akt, que son conocidos mediadores de los efectos de este receptor y, además, son intermediarios de las señalizaciones pro-mitóticas.

En cuanto a la segunda pregunta planteada, tendríamos que tratar primero a las células con diferentes inhibidores: uno que impida la activación del receptor p75<sup>NTR</sup> y otro que impida la activación de TrkA. Posteriormente, tratarlas con NGF o NGF nitrado para luego realizar ensayos de viabilidad celular, por ejemplo el MT. Dependiendo los resultados obtenidos podríamos estudiar si el receptor p75<sup>NTR</sup> está o no involucrando, si actúa como co-receptor de TrkA o si actúa de forma independiente.

Como conclusión, se pudo establecer un proceso de diferenciación de las células NSC-34. En el mismo se empleó un medio celular libre de suero, que mediante observación al microscopio se determinó que el proceso de diferenciación sea por 5 días. Con respecto a los ensayos de viabilidad celular en las células NCS-34, el agregado de elevadas concentraciones de neurotrofinas (100 ng/ml de NGF o NGF nitrado) causan proliferación celular cuando no se encuentran diferenciadas. No se logró elucidar cual es el comportamiento de las células cuando fueron tratadas con NGF nitrado. Contrariamente a la bibliografía consultada, esta línea de motoneurona expresaría el receptor neurotrófico TrkA. Con respecto al modelo celular empleado, las células NSC-34 no mostraron el mismo comportamiento que un cultivo primario de motoneuronas. A pesar de esta discrepancia, la línea celular se puede utilizar como modelo de experimentación en estudios que relacionen: neurotrofinas, receptores y cascada de señalización de los mismos.

## ***Bibliografía***

---

- Amano T, Hamprecht B, Kemper W. High activity of choline acetyltransferase induced in neuroblastoma x glia hybrid cells. *Exp. Cell Res.* 1974; 85:399-408.
- Arévalo, JC. TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 5908–5916
- Arévalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises!. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; 63: 1523–1537.
- ArgenBio. Guía de cultivo celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales).INGEBI-CONICET.2005.
- Barker PA. High affinity not in he vicinity?. *Neuron.*2007; 53 (1):1-4.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: he good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 1996; 271:1424–1437.
- Bierl M A, Jonesa EE, Crutcherb KA, Isaacsona LG. ‘Mature’ nerve growth factor is a minor species in most peripheral tissues. *Neuroscience Letters.* 2005; 380: 133–137
- Bothwell M. Evolution of the neurotrophin signalling system in invertebrates. *Brain Behav Evol.* 2006; 68:124–132.
- Bradshaw RA, Murray-rust J, Ibañez CF, McDonald NQ, Lapatto R, Blundell TL. Nerve growth factor: Structure/function relationships. *Protein Science.* 1994; 3:1901-1913.
- Butler M. *Animal Cell Culture and technology.* Ediciones The Basics, 200;, Cap. 2 y 5, p.11-26 y p.47- 66.
- Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP. Neuroblastoma 3 spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn.*1992;194:209–221.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience.* 2003; 4:299-309.
- Chen Y, Zeng J, Cen L, Chen Y, Wang X, Yao G, Wang W, Qi W, Kong K. Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. *J Int Med.* 2009; 37(3):974.
- Chiu AY, Chen EW, Loera S. A motor neuron-specific epitope and the low-affinity nerve growth factor receptor display reciprocal patterns of expression during development, axotomy, and regeneration. *J Comp Neurol* 1993; 328:351–363.

- Cohen S, Levi-Montalcini R. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1956; 42:571–74.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.*1993; 262:689–695.
- Durham HD, Dahrouge S, Cashman NR. Evaluation of the spinal cord neuron 3 neuroblastoma hybrid cell line NSC-34 as a model for neurotoxicity testing. *Neurotoxicology.*1993; 14:387–395.
- Eggett CJ, Crosier S, Manning P, Cookson MR, Menzies FM, McNeil CJ, Shaw PJ. Development and characterization of a glutamate-sensitive motor neurone cell line. *J Neurochem.* 2000; 74:1895–1902.
- Esposito, D. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and TrkA receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 32687–95.
- Friedman WJ. Proneurotrophins, Seizures, and Neuronal Apoptosis. *Neuroscientist.* 2010 ; 16(3): 244–252.
- Frossard N, Freunda V, Advenier C. Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation. *European Journal of Pharmacology.* 2004; 500: 453– 465.
- Gatenby RA y Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nature Reviews.*2004; 4: 891-899.
- Gotz R, Koster R, Winkler R, Raulf F, Lottspeich F, Scharf M, Thoenen H. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature.* 1994;372: 266-269.
- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature.* 1991; 350:678–683
- Hempstead, BL. The many faces of p75<sup>NTR</sup>. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002; 12: 260–267.
- Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik, SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature.*1996; 384: 638–641.
- Hunter DD, Cashman N, Morris-Valero R, Bullock JW, Adams SP, Sanes JR. An LRE (leucine-arginine-glutamate)-dependent mechanism for adhesion of neurons to S-laminin. *J Neurosci.*1991; 11:3960–3971.
- Ischiropoulos, H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*2003; 305:776–783.
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M. Expression and structure of the human NGF receptor . *Cell.*1986; 47:545–554.

- Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *Embo J.* 1989; 8:3701-3709.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein nervous system kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell.* 1991; 66:967-979.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. & Hempstead, B. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001; 294: 1945–1948.
- Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology.* 2003; 69: 341–374
- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, León A. Nerve Growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci.*1996; 19:514-520.
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibáñez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor .*The EMBO Journal.*1997; 16 (16); 4999–5005.
- Longo FM, Wood JE, Mobley WC. Purification of nerve growth factor. In *nerve growth factors.* 1989; 370 (12).
- Matusica D, Fenech MP, Rogers ML, Rush RA. Characterization and use of the NSC-34 cell line for study of Neurotrophin receptor trafficking. *Journal of Neuroscience Research.* 2008; 86:553–565.
- McDonald NQ, Chao MV. Structural determinants of neurotrophin action. *The Journal of Biological Chemistry.* 1995; 270 (34); 19669-72.
- McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL. New protein fold revealed by a 2-3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature.* 1991; 354:411-414.
- Moscatelli I, Pierantozzi E, Camaioni A, Siracusa G, Luisa Campagnolo L. p75 neurotrophin receptor is involved in proliferation of undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Experimental cell research.* 2009; 315: 3220 – 3232.
- Mowla SJ. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 12660–12666.
- Muyderman H, Hutson PG, Matusica D, Rogers ML, Rush RA. The human G93A-Superoxide dismutase-1 mutation, mitochondrial glutathione and apoptotic cell death. *Neurochem Res.* 2009; 34:1847–1856.
- Nilsson AS, Fainzilber M, Falck P, Ibáñez CF. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *Febs letter.*1998; 424: 285-290.

- Ninkina N, Grashchuck M, Buchman VL, Davies AM. TrkB variants with deletions in the Leucine-rich motifs of the extracellular domain. *the journal of biological chemistry*.1997; 272 (20):13019–13025.
- Nishio T, Sunohara N, Furukawa S. Neurotrophin switching in spinal motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*.1998; 9:1661– 1665.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004;427(6977):843-8.
- Oppenheim RW. The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci*. 1991, 12: 252-255.
- Payne WJ. Polymerization of Proteins with Glutaraldehyde: Soluble molecular-weight markers. *Biochem. J*. 1973; 135: 867-873.
- Pehar M, Vargas MR, Robinson KM, Cassina P, England P, Beckman JS, Alzari PM, Barbeito L. Peroxynitrite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motor neurons. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006; 41: 1632-1644.
- Persson H, Ibañez CF. Role and expression of neurotrophins and the trk family of tyrosine kinase receptors in neural growth and rescue after injury. *Curr Opin Neurol Neurosurg*. 1993; 6(1):11-8
- Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* .1988; 336:123-128.
- Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*. 1987; 325:593–597.
- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med*. 2001; 30:463–488.
- Radi R. Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem. Res. Toxicol*. 1998;11: 720 –721.
- Rattenholl A, Ruoppolo M, Flagiello A, Monti M, Vinci F, Marino G, Schwarz H, Rudolph R. Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *Journal Molecular Biology*.2001; 305: 523-533.
- Schechterson LC, Bothwell M. Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Wiley Periodicals, Inc. Develop Neurobiol*. 2010; 70: 332–338.
- Schor NF. The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Progress in Neurobiology*. 2005; 77: 201–214.

- Skaper SD. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008; 7(1): 46-62.
- Slater T.F, Sawyer, B, Straeuli, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta* 1963; 77:383- 393.
- Takeuchi H, Mizuno T, Zhang G, Wang J, Kawanokuchi J, Kuno, Suzumura. Neuritic beading induced by activated microglia is an early feature of neuronal dysfunction toward neuronal death by inhibition of mitochondrial respiration and axonal transport. *The Journal of Biological Chemistry*.2005; 280 (11): 10444-10454.
- Teng KK, Hempstead BL. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell. Mol. Life Sci*.2004; 61: 35–48.
- Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci*. 1991;14 (5):165-70.
- Turner BJ, Murray SS, Piccenna LG, Lopes EC, Kilpatrick TJ, Cheema SS.Effect of p75 neurotrophin receptor antagonist on disease progression in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neuroscience Research*. 2004; 78:193–199.
- Vandell AG, Larson N, Laxmikanthan G, Panos M, Blaber SI, Blaber M, Scarisbrick IA . Protease-activated receptor dependent and independent signaling by kallikreins 1 and 6 in CNS neuron and astroglial cellines. *J Neurochem*.2008; 107(3): 855–870.
- Volosin M, Song W, Almeida RD, Kaplan DR, Hempstead BL, Friedman WJ. Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci* 2006; 26 (29):7756–66.
- Yan Q, Elliott JL, Mathson C, Sun J, Zhang L, Mu X, Rex KL, Snider WD. Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo. *J Neurobiol*. 1993; 24 (12):1555-77.
- Yang B, Slonimsky JD, Birren SJ. A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nat Neurosci*. 2002; 5: 539-545.
- Yoon S, Casaccia P, Carter B, Chao M. Competitive signalling between TrKA and p75 nerv growth factor receptors determines cell survival. *The Journal of Neuroscience*. 1998; 18(9):3273-3281.
- Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci*.2005; 6:615-625.