



UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN GFRA3 EN NEURONAS DEL  
GANGLIO SUBMANDIBULAR DE RATÓN.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO  
EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: FELIPE ANDRÉS FRANCO CAMPOS

PROFESOR GUÍA: JUAN CARLOS TAPIA AMARO BQ.PhD

TALCA-CHILE

2019

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

## ÍNDICE

	PAG.
RESUMEN .....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
Neurociencia y modelos de estudio.....	7
Sistema nervioso central y periférico.....	8
Ganglios nerviosos y caracterización.....	10
Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF).....	14
HIPÓTESIS E OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIÓN.....	39
PROYECCIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi familia, María y Fidel, mis padres, son mi mayor ejemplo de superación y todo lo que hoy en día soy es gracias a ellos. Sin ellos y el amparo incondicional que me otorgan, esto nunca hubiera sido posible. A mi hermano Joaquín, quien es un pilar fundamental en mi vida así mismo como lo son mi abuelos y familia en general, eternamente agradecido. A mi novia, Vania, que desde que está en mi vida, ha sido una fuente inagotable de amor, ternura, apoyo y motivo constante de felicidad. A mis amigos, con quienes he vivido momentos importantes y que siempre me han entregado risas y momentos especiales, son siempre necesarios en cualquier meta.

En forma especial, a mi director de tesis, Dr Juan Carlos Tapia, mi más amplio agradecimiento por haber confiado en mí, su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino cuyo resultado obtenido durante este proceso es solo el primero de muchos que vendrán. Así mismo a la Dra Mónica Carrasco por su enseñanza y motivación constante que inspiran a la superación.

Al Dr. Alejandro Maureira, por su gran disposición a enseñar y ayudar en todo momento, su paciencia frente a mis errores y apoyo constante. La pasión por la ciencia que transmite constantemente y sus experiencias han sido una importante fuente de motivación y curiosidad durante este proceso.

Finalmente, a todos los integrantes del Centro de Investigación de Células Madres y Neurociencias de la universidad de Talca, donde desde el primer día me hicieron sentir en un grato ambiente de amistad y compañerismo.

## 1. RESUMEN

Desde los análisis en búsqueda de posibles genes candidatos a marcadores de subpoblaciones neuronales para nuestro modelo de estudio parasimpático, correspondiente al ganglio submandibular de ratón, logramos identificar a dos genes que codifican dos receptores de la familia de receptores de GDNF tipo alfa (Gfra2 y Gfra3).

En esta tesis nos centramos en la caracterización del gen Gfra3 y, para ello, analizamos su expresión relativa mediante RT-qPCR en estadios postnatales del ratón (P1, P5 y P10) en el ganglio y en la glándula submandibular. Además, determinamos la expresión de este receptor mediante ensayos de inmunofluorescencia en el tejido completo (*whole mount*) de ratón empleando un anticuerpo monoclonal contra Gfra3.

Nuestros resultados muestran que los niveles del ARNm que codifica para Gfra3 son 6 veces mayores en ganglio que en glándula submandibular en el estadio 1 día postnatal (P1). Sin embargo, estos niveles disminuyen en el ganglio y aumentan en el tejido glandular de forma que en el estadio de 10 días postnatal (P10) sus niveles no difieren de forma estadísticamente significativa. Los niveles de expresión del mensajero se relacionan con la identificación de neuronas colinérgicas inmunoreactivas para Gfra3. De esta forma, nuestros resultados nos permiten afirmar que Gfra3 se expresa en una población de neuronas del ganglio submandibular mientras que los cambios en sus niveles de expresión durante el desarrollo postnatal nos sugieren que juega un papel importante en la maduración del ganglio.

## 2. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso está formado por dos tipos celulares altamente especializados: Las neuronas y la glía, en donde las neuronas son las encargadas de recibir la información tanto interna como externa, procesarla y desencadenar una respuesta mientras que la glía actúa como soporte metabólico y ayuda a modular la actividad neuronal (1).

Estos tipos celulares están ampliamente distribuidos alrededor de nuestro organismo formando así el sistema nervioso, quien es el encargado de regular y coordinar las funciones y actividades tanto vitales como las del día a día. Este importante sistema tiene la capacidad de captar información tanto del medio externo como interno y generar una respuesta propia para los diferentes tipos de estímulos, gracias a las funciones básicas que cumplen las neuronas y que pueden ser de tipo sensorial (aférentes que llevan información al SNC), motora (eferentes que llevan información desde el SNC hacia la periferia) o integradora, comúnmente conocidas como interneuronas (exclusivas del SNC).

Las neuronas pueden estar agrupadas fuera del SNC en estructuras denominadas ganglios nerviosos, los cuales pueden ser del tipo sensoriales o autónomos, Los primeros, también conocidos como ganglios de raíz dorsal o *dorsal root ganglia* (DRG) se encuentran situados en las raíces dorsales de los nervios espinales cumpliendo una función somatosensorial mientras que los segundos se ubican en el trayecto de los nervios pertenecientes al Sistema nervioso periférico (SNP) y se caracterizan por ser los sitios donde las neuronas preganglionares que surgen dentro del tronco cerebral y la medula espinal forman conexiones con las neuronas postganglionares que envían sus axones a dianas viscerales y vasculares. Estos se pueden subdividir en ganglios autónomos simpáticos y parasimpáticos.

El ganglio submandibular, perteneciente al grupo de ganglios autónomos parasimpáticos de la cabeza y cuello, es un plexo que recibe inervación parasimpática desde el núcleo salivatorio superior y reúne los cuerpos neuronales postganglionares a lo largo de los conductos excretores principales y más pequeños de la glándula submandibular. Estudios morfométricos de los cuerpos neuronales mediante microscopía electrónica muestran un patrón bimodal en función del volumen del soma, indicando la existencia de al menos 2 tipos neuronales (2).

En base a la necesidad de clasificar los grupos heterogéneos de neuronas se han identificado marcadores específicos que se basan en aspectos como el contenido de neuropéptidos y neurotransmisores, en la composición de su citoesqueleto, en el tipo de proteínas de unión al calcio, en la expresión de canales iónicos, en la dependencia de algunos factores de crecimiento o factores neurotróficos como los de la familia del GDNF, los cuales son relevantes para el desarrollo y mantenimiento de distintos conjuntos neuronales.

Esta familia de GDNF posee cuatro receptores:  $GFR\alpha 1$ ,  $GFR\alpha 2$ ,  $GFR\alpha 3$  y  $GFR\alpha 4$  los cuales son proteínas transmembrana que cumplen un rol importante en la supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso central y periférico (3). Estudios recientes han asociado la expresión de  $GFR\alpha 3$  a una subpoblación de neuronas dentro del ganglio de raíz dorsal (DRG), un ganglio sensorial (4). Nuestros resultados preliminares han demostrado la expresión de ARNm codificante para  $GFR\alpha 3$  en el ganglio submandibular de ratón. La correcta caracterización del tipo celular que expresa  $GFR\alpha 3$  en este ganglio es esencial para comprender aún más la función de estas neuronas y a la vez la identificación de un marcador para una subpoblación neuronal, y que en la actualidad representa un reto para los investigadores debido a que los diferentes conjuntos neuronales se agrupan en colecciones heterogéneas que a menudo se superponen (5).

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Neurociencia y modelos de estudio.

Con la invención del microscopio y técnicas de fijación o tinción de tejidos, La comprensión del sistema nervioso experimentó un notable avance durante los siglos XIX y XX que culminaron con las investigaciones de Ramón y Cajal (1843-1934) donde se propuso una célula altamente especializada en conducción del impulso nervioso denominada neurona, las cuales se contactan entre si mediante sinapsis transmitiendo información tanto aferente como eferente. En la actualidad se conocen dos principales tipos celulares pertenecientes al sistema nervioso, en donde las neuronas tienen un papel importante ya que reciben, procesan y transmiten información a través de señales químicas y eléctricas, proceso que es favorecido en todo momento por las células gliales ayudando a modular la actividad neuronal.

Para comprender las primeras observaciones que hasta algunos años se hacían es necesario comprender los métodos de estudio que se utilizaron. El análisis de las relaciones detalladas entre los nervios se llevó a cabo en los límites de resolución del microscopio óptico y la introducción del método de Golgi que permite la tinción selectiva de unas pocas neuronas y sus procesos, proporcionaron un método para seguir los procesos neuronales por largas distancias (6).

Actualmente y pese a que las técnicas clásicas que sirvieron como partida para comprender este complejo sistema, son aún utilizadas, el rápido avance de la tecnología aplicada en la ciencia nos permite utilizar técnicas con mayor resolución y capaces de ser aplicada de forma masiva, lo que ha llevado a muchos científicos incluso a trabajar en la generación de un mapa preciso de todas las redes neuronales del sistema nervioso o

conectoma en mamíferos, pese a que la principal dificultad radica en que el cableado de millones de neuronas en el SNC y SNP de los vertebrados es uno de los procesos más complejos de la biología del desarrollo (7).

Para el estudio tanto *in vivo* como *in vitro* de esta compleja estructura, en la actualidad es posible trabajar con variados modelos animales, lo cual ha permitido un acelerado conocimiento no solo dentro de esta área, sino que, en el desarrollo productivo, como son la agroalimentación (identificando genes de interés agronómico), en la biotecnología, en la producción de proteínas, entre otras (8). Sin embargo, la utilización de animales para estudio de diferentes áreas de la ciencia trae consigo la responsabilidad de asegurar el bienestar del animal en cuestión.

Para que toda forma de sufrimiento sea eliminada o disminuida en su máximo se han establecido el principio denominado “las tres erres”. Primero, reemplazo o sustitución de la vida consciente a material insensible. Segundo, reducción del número de animales utilizados para la obtención de información. Finalmente, refinamiento de los modelos experimentales para la disminución en la incidencia de los procedimientos aplicados en aquellos animales que todavía no han sido utilizados (9).

### 3.2 Sistema Nervioso Central y Periférico

El origen y desarrollo del sistema nervioso se inicia en forma secuencial en una serie encadenada de procesos fundamentales que se inician con la inducción primaria, neurulación primaria y secundaria. Estructuralmente, el origen de este complejo sistema en el embrión se inicia a partir de dos estructuras de origen ectodérmico: la placa neural y crestas neurales. Desde la placa neural se genera una estructura denominada tubo neural desde el cual se origina lo que conocemos en el sistema nervioso central (SNC) que lo conforman el encéfalo

y la medula espinal, los cuales debido a su importancia se protegen de estructuras óseas compactas denominadas cráneo y columna vertebral respectivamente. Por otra parte, la cresta neural proporciona células que formaran parte del sistema nervioso periférico (SNP) y Autónomo (SNA).

Funcionalmente, el SNC puede transmitir o recibir información importante para mantener las funciones biológicas activas. La transmisión de información se da mediante las fibras motoras (eferentes) las cuales llegan a los órganos efectores transmitiendo el impulso nervioso que finalmente genera la contracción o relajación de órganos, músculos, glándulas, etc. Por otro lado, el SNC está constantemente captando estímulos tanto internos como externos los que se pueden transmitir

Básicamente, la función SNC está dividida en la acción propia del cerebro y la médula espinal, en donde finalmente la médula es quien distribuye fibras motoras (eferentes) a los órganos efectores, glándulas y músculos, además de recoger información somatosensorial (aférente) que es recibida en la medula y llevada al cerebro para ser procesada y generar una respuesta. La médula logra esta salida y llegada de información gracias a pequeños haces de fibras que forman dos filas a lo largo de la superficie dorsolateral y ventrolateral. Estas fibras se unen formando los nervios raquídeos, a nivel posterior de estos, se localizan los ganglios espinales o ganglios de raíz dorsal, el cual es un acúmulo de neuronas sensitivas (aférentes), encargadas de recoger y modular la información sensorial y llevarla al SNC (10).

Por su parte, el SNP lo constituyen todas las estructuras nerviosas que se encuentran fuera del SNC, incluyendo a los 12 pares de nervios craneales, 31 pares de nervios espinales, nervios periféricos y las uniones neuromusculares. Estos nervios son cordones de sustancia blanca que se ramifican en axones y/o dendritas (11).

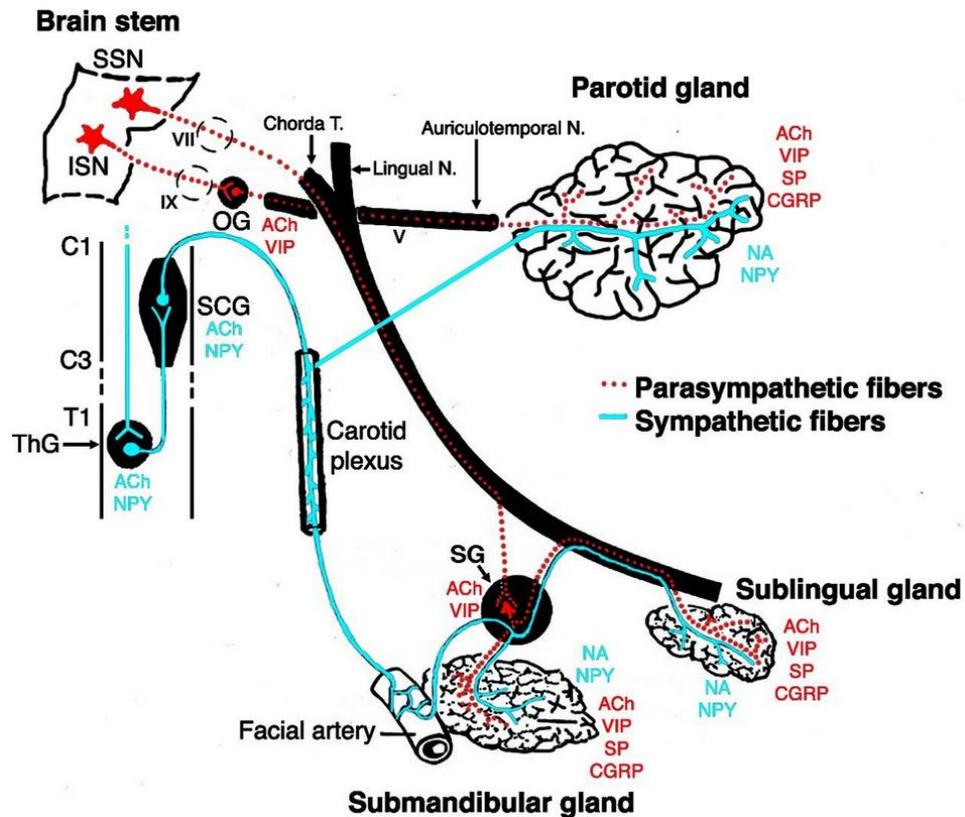
Desde el punto de vista funcional, el SNP se divide en el sistema nervioso somático (SNS) y sistema nervioso autónomo (SNA), el cual a su vez tiene dos divisiones anatómicas y funcionalmente diferentes: El sistema simpático y parasimpático (12). Ambos sistemas son tónicamente activos. En otras palabras, proporcionan un cierto grado de entrada nerviosa a un tejido determinado en todo momento. Por lo tanto, la frecuencia de descarga de neuronas en ambos sistemas puede aumentar o disminuir. Como resultado, la actividad del tejido puede ser mejorada o inhibida. Debido a que el sistema simpático y el parasimpático típicamente tienen efectos opuestos en un tejido dado, al aumentar la actividad de un sistema y al mismo tiempo disminuir la actividad del otro, se obtiene un control muy rápido del tejido en función (13).

El sistema simpático predomina durante las reacciones de emergencia de “lucha o huida” y durante el ejercicio. El efecto general en estas condiciones es preparar al cuerpo para una actividad física extenuante, más específicamente, la actividad nerviosa simpática aumentara el flujo de sangre que está bien oxigenada para los tejidos que la necesitan y esto puede ser regulado por hormonas. Por su parte, el sistema parasimpático predomina en condiciones de descanso y tranquilidad. El efecto general de este sistema en estas condiciones es conservar y almacenar energía y a su vez, regular las funciones básicas del cuerpo como la digestión y la micción (14).

### 3.3 Ganglios nerviosos y caracterización.

Las masas de tejido nervioso que se agrupan fuera del SNC reciben el nombre de ganglios, en este caso un ganglio se define como la aglomeración de somas o cuerpos neuronales que se localizan en el sistema nervioso autónomo y conectan el SNP con el SNC tanto en sentido eferente como aferente. Para comprender aún más su importancia y función, estos pueden dividirse en los ganglios nerviosos sensoriales, compuesto principalmente por los ganglios espinales (DRG) y por los ganglios nerviosos autónomos, dividido a su vez en ganglios simpáticos y parasimpáticos.

Los ganglios parasimpáticos, se encuentran junto a los órganos que inervan. Un ejemplo de ello corresponde al ganglio Submandibular, cuya función es principalmente secretomotora y controlada por el núcleo salivatorio superior (SNN) (15). Las fibras preganglionares provenientes del núcleo salivatorio superior (SNN) son transportadas por el nervio facial llegando así a la glándula donde hacen sinapsis con las neuronas postganglionares parasimpáticas que, desde el ganglio, prolongan sus axones hacia las glándula submandibular y sublingual (16).



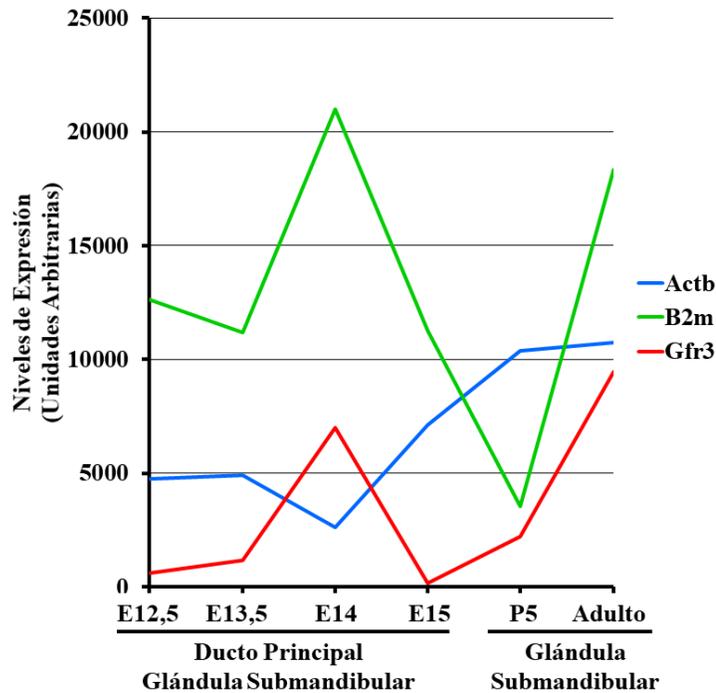
**Figura 1. Esquema de inervación de la glándula submandibular y sublingual.** Modelo de inervación parasimpática y simpática de las glándulas salivales adultas (rojo y azul respectivamente). Se indican los neurotransmisores para las fibras parasimpáticas y simpáticas en los mismos colores utilizados para el tipo de inervación. Neurotransmisores;

ACh: Acetilcolina, NPY: neuropéptido Y, VIP: péptido intestinal vasoactivo, NA: noradrenalina, SP: sustancia P, CGRP: gen relacionado con el péptido calcitonina. Núcleos del tronco encefálico; SNN: núcleo salivatorio superior, ISN: núcleo salivatorio inferior. Ganglios; ThG: ganglio torácico, SCG: ganglio cervical superior, SG: ganglio submandibular. Medula espinal; C: vértebra cervical, T: vertebra torácica. Nervios craneales; VII: nervio fácil, IX: nervio glossofaríngeo. Fuente: Desde Ferreira J, and Hoffman M. P. (17)

Con la tecnología experimental disponible, hoy en día el estudio y caracterización de la función de los diferentes ganglios y el sistema nervioso en general, sigue siendo una interrogante, ya que este perfecto funcionamiento se hace cada vez más complejo de dilucidar a medida que las técnicas actuales nos permiten analizar con mayor resolución y funcionamiento de este complejo sistema. En 1974 y gracias a los experimentos de Jacobowitz, 1974 y Gabella, 1976 se observó mediante tinciones histoquímicas y microscopia electrónica la presencia de más de un tipo de células neuronales en los ganglios simpáticos de varios vertebrados. Cook y Burnstock en 1976 reportaron 9 tipos neuronales en el plexo mientérico (perteneciente al sistema parasimpático), en base a estos resultados, Yamakado en 1977 analizo el ganglio submandibular describiendo 2 tipos principales de neuronas pertenecientes al mismo ganglio (18).

En la actualidad se sabe que existen poblaciones heterogéneas de neuronas pertenecientes a un mismo ganglio. Para analizar estos cambios de expresión se han puesto a disposición herramientas útiles que permiten observar cambios de expresión en nervios durante la organogénesis de las glándulas salivales y el ganglio submandibular. El Proyecto de anatomía Molecular de las glándulas salivales (SGMAP, por sus siglas en inglés) proporciona una base de datos publica de búsqueda de análisis de expresión genética de microarray durante el desarrollo de esta glándula en ratón, así, es posible observar diferentes valores de expresión de diferentes genes y en diferentes estadios de ratón. Estos resultados (figura 2) fueron replicados en ratones C57BL/6J de estadio adultos mediante el análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), la cual aparte de ser precisa y confiable, nos

permite la determinación de las veces de cambio y número de copias debido a su sensibilidad y la detección en condiciones lineales de amplificación (19).



**Figura 2: Perfiles de expresión durante distintos estadios del desarrollo de la glándula submandibular.**

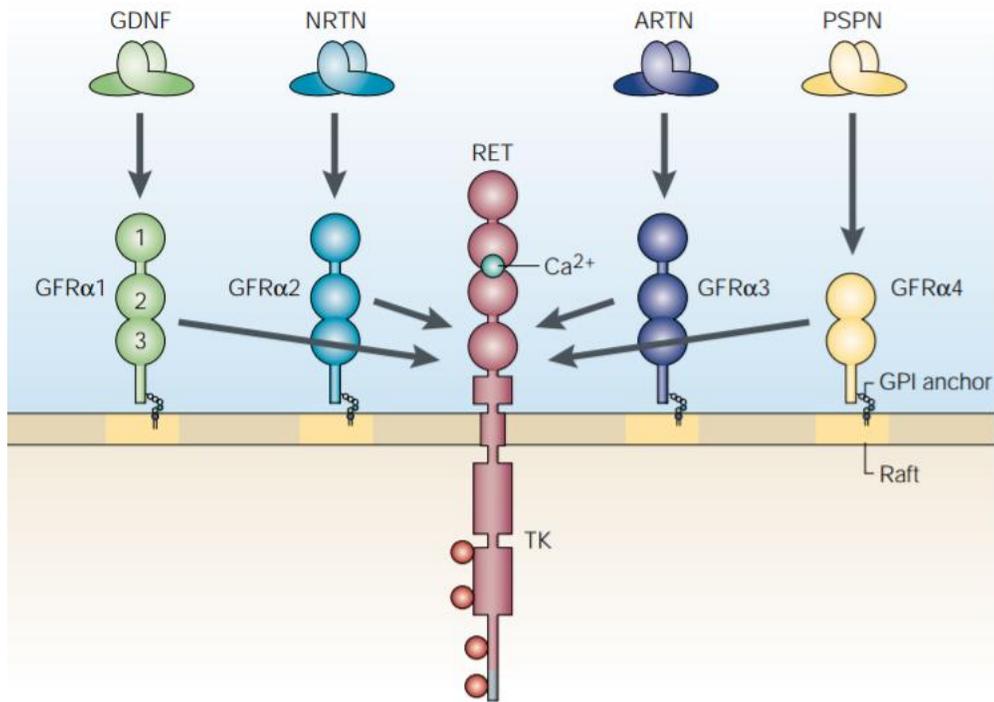
Los valores de expresión fueron obtenidos mediante Microarreglo desde muestras obtenidas por microdissección laser del ducto principal en estadio embrionario y de la glándula submandibular en estadio postnatal y adulto. Fuente: Elaborada a partir de la información disponible desde el buscador del proyecto de anatomía molecular de la glándula salival (*National institute of Dental and Craniofacial Research, NIH*) para cada gen, consultada el día 19 de junio de 2019 (<https://sgmap.nidcr.nih.gov/sgmap/sgexp.html>)

Estos resultados mostraron una alta expresión del gen *Gfra3* en muestras de DRG en donde es conocida su expresión (20) y muy leve en muestras de ganglio submandibular, resultados que se pueden atribuir a un pequeño porcentaje de todas las neuronas pertenecientes a este ganglio que expresan dicho gen (21).

### 3.4 Familia de ligandos (GFL) de factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF).

Los factores neurotróficos derivados de la glía (GDNF) son cruciales para el desarrollo y mantenimiento de conjuntos distintos de neuronas centrales y periféricas. La familia está compuesta de cuatro factores neurotróficos siendo el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) el primer miembro descrito de este grupo, purificado por primera vez en 1993 por Lin y colaboradores (22). Posteriormente se describió Neurturina (NRTN), Artemin (ARTN) y Persefina (PSPN) que actúan como ligandos para sus respectivos receptores:  $GFR\alpha1$ ,  $GFR\alpha2$ ,  $GFR\alpha3$  y  $GFR\alpha4$  respectivamente. Estos receptores corresponden a proteínas ancladas a la cara extracelular de la membrana plasmática mediante una modificación lipídica del tipo GPI y presenta tres dominios ricos en cisteína, salvo  $GFR\alpha4$  que solo tiene 2 dominios (23). La región correspondiente al segundo y tercer dominio rico en cisteína de cada receptor participa en la unión del ligando e interactúa a su vez con el receptor de tirosina quinasa transmembrana (RET), el cual requiere de la presencia de calcio para que se forme el complejo GFL- $GFR\alpha$ -RET.

Estos ligandos pueden interactuar de forma cruzada con más de uno de los receptores, aunque con una afinidad menor. Tras la unión del ligando, se media la dimerización y transfosforilación del receptor RET dimérico y la activación de la vía de transducción de señales río abajo (24).



**Figura 3: Respectivos ligandos para los receptores GFR $\alpha$ .**

Los ligandos de GDNF activan la acción de tirosina quinasa RET (TK) al unirse primero a sus receptores GFR $\alpha$  (1-4) afines. Las flechas indican las interacciones de ligando-receptor preferidas que se sabe, ocurren fisiológicamente *in vivo*. Las proteínas GFR $\alpha$  se unen a la membrana plasmática mediante un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y que tiene tres dominios de cisteína excepto GFR $\alpha$ 4 que solo tiene dos (25).

#### 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

##### Hipótesis

Existen subpoblaciones de neuronas colinérgicas que expresan al receptor  $\alpha 3$  de la familia GDNF (Gfra3) en ganglio submandibular en ratón C57BL/6J.

##### Objetivo general:

Caracterizar el receptor  $\alpha 3$  de la familia GDNF (GFR $\alpha 3$ ) en neuronas del ganglio submandibular de ratón C57BL/6J.

##### Objetivos específicos:

- Cuantificar la expresión relativa de ARNm para el gen Gfra3 en neuronas del ganglio y glándula submandibular de ratón en los estadios postnatales P1, P5 y P10.
- Detectar al receptor  $\alpha 3$  de la familia GDNF (GFR $\alpha 3$ ) en neuronas parasimpáticas del ganglio submandibular de ratón

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Preparación de reactivos

Para la realización de esta tesis, todos los reactivos empleados fueron de grado pro-análisis y las soluciones preparadas en agua libre de nucleasas (AM9930, Ambion).

### 5.2 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la amplificación mediante PCR en tiempo real.

Para el diseño de partidores (Actb, B2m, Gfra3) se empleó el programa AmplifX (Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille), eligiendo aquellos sets de partidores que fueran específicos para cada GOI (Primer Blast), que hibridaran en exones diferentes y cuya curva de disociación teórica mostrase un solo pico ( $\mu$ Melt, University of Utah). Así, normalmente los partidores sintetizados poseían valores de eficiencia de amplificación (obtenido a partir de la pendiente de la curva estándar) superior al 95%.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Macrogen (Seul, Corea del Sur) y fueron resuspendidos en 200  $\mu$ l agua libre de nucleasas en condiciones de esterilidad dentro de una Cabina de Bioseguridad Tipo II (ESCO). Para su cuantificación se realizó una dilución de 1  $\mu$ l de la solución stock en 49  $\mu$ l agua libre de nucleasas. La concentración fue calculada empleando un factor de 33 ng/ $\mu$ l por cada unidad de absorbancia a 260 nm medida en un espectrofotómetro de micro volúmenes (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). La concentración micromolar [ $\mu$ M] fue calculada empleando la siguiente ecuación:

$$[\mu M] = \frac{\left[\frac{ng}{\mu l}\right] \times 10^3 \times f.d.}{PM}$$

Donde [ng/μl] es la concentración obtenida desde la absorbancia de la dilución, *f.d.* el factor de dilución (en este caso 50) y PM el peso molecular teórico del oligonucleótido. En condiciones de esterilidad, se ajustó el volumen de la solución stock hasta obtener una concentración final de 50 μM. Las soluciones stock de oligonucleótidos fueron almacenados a - 20°C.

### 5.3 Disección de ganglios submandibulares y glándula submandibular desde ratones C57BL/6J

Todos los protocolos fueron realizados de acuerdo a las normativas dispuestas por el Comité Institucional de Ética, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CIECUAL) de la Universidad de Talca y por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) para el proyecto FONDECYT 1160888.

En este estudio se usaron ratones postnatales de la cepa C57BL/6J en estadio postnatal P1, P5 y P10. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano bajo campana de extracción de gases. Para la disección de los ganglios y glándulas submandibulares, los ratones fueron sacrificados en condiciones de anestesia profunda mediante dislocación cervical, evitando generar mayores daños en el tejido del cuello del animal. En posición dorsal, se desinfectó el cuello del animal con etanol 70% y luego se realizó un corte con una tijera iris curva-angulada desde la escotadura yugular del esternón hasta la base de la mandíbula, a través de la piel del cuello en dirección rostral, evitando penetrar en el tejido glandular. Luego, se cortó desde la escotadura hacia los hombros, descubriendo el tejido profundo. Se retiró la grasa, glándulas

superficiales y tejido muscular. Se disecó la glándula submandibular completa empleando la tijera Iris, tras lo cual el tejido fue transferido a una placa de Petri rellena en su base con silicona negra (Sylgard) más buffer PBS 1× frío hasta cubrir el tejido, para evitar su descomposición. Bajo un estereoscopio de luz visible, se diseccionó cada uno de los ganglios submandibulares, los que se encuentran adheridos a los ductos principales de las glándulas submandibulares. El pool total de ganglios submandibulares de un ratón fue llevado a un tubo de 1,5 ml y conservados también en hielo.

A todos los tubos obtenidos anteriormente se les agregó 500 µl del reactivo TRIzol (Invitrogen). Con una mano de mortero desechable para tubos de 1,5 ml (pistilo) se molió cada tejido hasta no observar restos de ellos, posterior a esto se procedió a homogeneizar las muestras utilizando una jeringa con aguja de pequeño calibre. Luego, se adicionaron otros 500 µl del reactivo TRIzol y se mezcló con movimiento de vórtice, para finalmente almacenarlos a -20°C.

En el caso de las muestras empleadas para los análisis de inmunofluorescencia, los ganglios espinales de la raíz dorsal (cuya obtención se realizó mediante el método de extracción hidráulica (26)) y los ganglios submandibulares desde el ducto principal de la glándula fueron fijadas y empleadas para los ensayos de inmunofluorescencia.

#### 5.4 Purificación de ARN total desde las muestras de médula espinal y ganglios espinales.

Los lisados en TRIzol (Invitrogen) fueron descongelados, mezclados por movimiento de vórtice y divididos en 2 tubos cada uno con la mitad del volumen (500  $\mu$ l). Se agregaron 100  $\mu$ L de cloroformo a cada tubo, se agitó con la mano por 20 segundos, y luego se centrifugó a 13,000 $\times$ g por 15 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se separaron cerca de 250  $\mu$ l de fase acuosa desde cada tubo empleando una punta roma de micropipeta con filtro de 200  $\mu$ l evitando perturbar la interfase y de esta forma no contaminar con ADN genómico la preparación del ARN total. Las fases acuosas correspondientes a la misma muestra fueron depositadas en un tubo de 1,5 ml libre de nucleasas (aproximadamente 500  $\mu$ l) y se añadieron 500  $\mu$ l de isopropanol y 1  $\mu$ l de glicógeno, se agitó vigorosamente y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras una centrifugación a 13,000 $\times$ g por 15 minutos a 4°C, se procedió a retirar el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol 75% y se agitó vigorosamente hasta que el *pellet* de ARN se despegó del tubo. El *pellet* fue recuperado mediante centrifugación a 13,000 $\times$ g por 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por inversión y se dejó secar el pellet por 10 minutos a temperatura ambiente, para luego resuspender el *pellet* ARN en 20  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Para aumentar el rendimiento de la resuspensión, se incubó la solución de ARN a 55°C durante 10 minutos, para luego incubarlas rápidamente en hielo por otros 10 minutos. Las preparaciones de ARN total fueron almacenadas a -80°C.

#### 5.5 Electroforesis en gel de agarosa y estimación de la concentración del ARN total.

Se preparó un gel de agarosa al 1 % en *buffer* TAE 0,5 $\times$  teñido con GelRed (Biotium) a una concentración final de 0,125 $\times$ . Las muestras de ARN fueron preparadas para la electroforesis en tubos de 1,5 ml conteniendo 1  $\mu$ l de la muestra de ARN, 3  $\mu$ l de agua libre

de nucleasas y 4  $\mu$ l de buffer de carga denaturante para ARN 2 $\times$  (R0641, Thermo Scientific). Se preparó además un tubo 1,5 ml conteniendo 1  $\mu$ l del RiboRuler Low Range RNA Ladder, ready-to-use (SM1833, Thermo Scientific) diluído 1:8 más 7  $\mu$ l de buffer de carga denaturante para ARN 2 $\times$ . Las preparaciones fueron mezcladas vigorosamente, y tras una centrifugación breve fueron incubados 5 minutos a 55°C, para luego ser incubados en hielo por otros 5 minutos. Tras una centrifugación breve, se cargaron todas las preparaciones en los pocillos del gel y las muestras resueltas en una cámara de electroforesis rellena de *buffer* TAE 0,5 $\times$  a 100 Volts por 40 minutos. El gel fue registrado en una fotodocumentador de luz UV (Enduro GDS, Labnet). La imagen fue analizada mediante densitometría empleando el programa ImageJ (NIH) y la concentración de cada muestra fue estimada como la suma de las intensidades correspondientes a las bandas de los ARN ribosomales 28S, 18S y 5S/5,8S, y el total de intensidad fue transformado a cantidad (nanogramos) de ARN respecto de las intensidades obtenidas para las bandas del estándar de ARN de concentración conocida.

### 5.6 Síntesis de ADN complementario a partir de ARN total.

En un tubo de 0,5 ml libre de nucleasas se mezclaron 200 ng de ARN total, 250 ng de partidores aleatorios hexaméricos (Invitrogen), 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM (Promega) y agua libre nucleasas (Ambion) hasta completar 13  $\mu$ l. Cada una de estas reacciones fueron incubadas a 23°C por 10 minutos, luego a 65°C por 5 minutos y luego rápidamente puestas en hielo, para permitir la hibridación de los partidores a los ARN mensajeros. Tras centrifugar brevemente, a cada tubo se le agregó 1  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa SuperScriptIV (Thermo Scientific), 4  $\mu$ l del buffer de reacción 5 $\times$  para SuperScriptIV y 1  $\mu$ l de DTT 100 mM. Se generó una reacción control de la transcripción reversa (No RT) que corresponde a una réplica del tubo de reacción hecho para la muestra más concentrada, pero a la que no se le añadió la enzima SuperScriptIV. Luego cada tubo fue incubado a 55°C por 40 minutos y la enzima inactivada por incubación a 80°C por 10 minutos. Las preparaciones de ADNc fueron centrifugadas, mezcladas y almacenadas a -20°C.

## 5.7 Amplificación mediante PCR en tiempo real.

Se empleó para la detección relativa de los niveles de expresión de un mRNA de interés con respecto de un gen de referencia. Esto a través de la amplificación de un ADNc representativo de los mensajeros presentes en una muestra de ARN total, obtenida por transcripción reversa (RT-qPCR). En todos los ensayos se empleó el equipo Mx3000P (Stratagene). La sonda fluorescente empleada como agente intercalante de DNA fue “EvaGreen”. El ciclo umbral (Ct) se definió como el ciclo en el que la fluorescencia del ADN amplificado fue mayor a la fluorescencia umbral, calculada mediante el método basado en amplificación (*amplification-based threshold*). La cuantificación relativa de la muestra se realizó por el método de interpolación desde una curva estándar (27). Básicamente, se realizó una curva estándar a partir de diluciones seriadas (1/10) del producto de PCR obtenido para cada set de partidores. Se realizó qPCR para cada dilución, abarcando al menos 5 diluciones cuyo Ct estaban en torno al Ct de las muestras. Se interpolaron los valores del gen de interés (GOI) en las muestras y se dividieron por los valores del gen de referencia en las mismas muestras. Finalmente, los valores se normalizaron como veces respecto de la condición control.

Las reacciones de amplificación (12,5 µl final) fueron realizadas en tubos de 0,2 ml de tapa tipo domo transparentes (Axygen). Se empleó el kit 5× HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus ROX (Solis Biodyne), 500 nM de cada partidore específico (sentido y antisentido para los genes ACTB y B2M de ratón) y 2 µl de cada reacción de ADN copia o del control (No RT) diluido 1:3 en agua libre de nucleasas. Se adicionó una reacción de control negativo de PCR (NTC) a la cual se agregó 2 µl de agua libre de nucleasas como templado. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un termociclador en tiempo real Mx3000P (Stratagene) con el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de 95°C por 12 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos. Al final de la amplificación se realizó un ciclo de análisis de curva de disociación.

A continuación, se indican las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron:

### **Actb**

**#21 Fwd\_mrACTB:** 5'- TGGCTCCTAGCACCATGAAGAT - 3'

**#22 Rev\_mrACTB:** 5'- AAACGCAGCTCAGTAACAGTC - 3'

### **B2m**

**#31 Fwd\_mB2M\_#2:** 5'- TCGGTGACCCTGGTCTTTCT - 3'

**#32 Rev\_mB2M\_#2:** 5'- TCAATGTGAGGCGGGTGGAA - 3'

### **Gfra3**

**#46 Fwd\_GFRA3:** 5'- TTGTGCAACTGAGCAGTCCA - 3'

**#47 Rev\_GFRA3:** 5'- AGAAGGACCTTCCAGCTGT - 3'

La estabilidad de expresión de los genes candidatos a genes de referencia fue determinada previamente (21).

Para determinar los niveles de expresión del gen GFRA3 mediante RT-qPCR el ADN copia fue preparado como se describe a continuación. En un tubo de 0,5 ml libre de nucleasas se mezclaron 200 ng de ARN total, 250 ng de hexámeros de primers (Invitrogen), 1 µl de dNTPs 10 mM (Promega) y agua libre nucleasas (Ambion) hasta completar 13 µl. Cada una de estas reacciones fueron incubadas a 23°C por 10 minutos, luego a 65°C por 5 minutos y luego rápidamente a hielo, para permitir la hibridación de los partidores a los ARN mensajeros. Tras centrifugar brevemente, a cada tubo se le agregó 1 µl de la enzima transcriptasa reversa SuperScriptIV (Thermo Scientific), 4 µl del buffer de reacción 5× para

SuperScriptIV y 1  $\mu$ l de DTT 100 mM. Se generó una reacción control de la transcripción reversa (No RT) que correspondió a una réplica del tubo de reacción hecho para la muestra más concentrada pero a la que no se le añadió la enzima SuperScriptIV. Luego cada tubo fue incubado a 55°C por 40 minutos y la enzima inactivada por incubación a 80°C por 10 minutos. Las preparaciones de ADNc fueron centrifugadas, mezcladas y guardadas a -20°C.

Las reacciones de amplificación (12,5  $\mu$ l final) fueron realizadas en tubos de 0,2 ml de tapa tipo domo transparentes (Axygen). Se empleó el kit 5 $\times$  *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus ROX* (Solis Biodyne), 500 nM de cada par de primers específicos (sentido y antisentido para el GFR $\alpha$ 3 de ratón) y 2  $\mu$ l de cada reacción de ADN copia o del control (No RT) diluido 1:5 en agua libre de nucleasas. Se adicionó una reacción de control negativo de PCR (NTC) a la cual se agregó 2  $\mu$ l de agua libre de nucleasas como templado. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un termociclador en tiempo real Mx3000P (Stratagene) con el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de 95°C por 12 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos. Al final de la amplificación se realizó un ciclo de análisis de curva de disociación. El ciclo umbral (Ct) se definió como el ciclo en el que la fluorescencia del DNA amplificado fue mayor a la fluorescencia umbral, calculada mediante el método basado en amplificación (*amplification-based threshold*). Los valores de amplificación para cada muestra se calcularon por el método de interpolación desde una curva estándar (27).

#### 5.8 Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos en la qPCR

Se preparó un gel de agarosa al 2 % en buffer TAE 0,5 $\times$  teñido con GelRed (Biotium) a una concentración final de 0,125 $\times$ . Las muestras de ADN fueron preparadas para la electroforesis mezclando 1  $\mu$ l de la muestra del producto de PCR, 3  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 4  $\mu$ l de DNA Gel Loading Dye 6 $\times$  (R0611, Thermo Scientific). Se preparó

también 1  $\mu$ l del GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use (SM0243, Thermo Scientific) diluido 1:8 más 7  $\mu$ l de DNA Gel Loading Dye 6 $\times$ . Las muestras fueron cargadas en los pocillos del gel de agarosa y resueltas en una cámara de electroforesis rellena de buffer TAE 0,5 $\times$  a 100 Volts por 40 minutos. El gel fue registrado en un fotodocumentador de luz UV (Enduro GDS, Labnet).

### 5.9 Detección de GFR $\alpha$ 3 mediante inmunofluorescencia.

Los tejidos de ganglio submandibular y ganglios de la raíz dorsal de ratón fueron fijados en solución fijadora de formaldehído 4% (Winkler) en PBS 1 $\times$  por 1 hora a temperatura ambiente y 1 hora adicional en hielo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la solución y se realizaron 3 lavados de 1 ml con buffer PBS 1 $\times$  con agitación a temperatura ambiente (Nutating mixer, LabNet International). Tras este paso las muestras fueron almacenadas a 4 °C. Al día siguiente, se permeabilizó el tejido en 1 ml de Triton X-100 0,1% en PBS 1 $\times$  por 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró la solución de Triton X-100 (Winkler) y se realizaron tres lavados con PBS 1 $\times$ . Las muestras fueron luego bloqueadas en una solución que contenía 20% suero de caballo y 2% BSA en PBS 1 $\times$ . Se agregaron 450  $\mu$ l de esta solución a cada tubo de muestra y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente en constante agitación. Se retiró el exceso de solución y se agregaron 500  $\mu$ l de la mezcla de anticuerpos primarios anti-GFR $\alpha$ 3 en dilución 1:100 (GFR $\alpha$ -3, monoclonal de ratón IgG2b, sc-398618, Santa Cruz Biotechnology) y anti-VACHT en dilución 1:1000 (VACHT, policlonal de conejo, #139 103, Synaptic System) a cada tubo en solución de bloqueo. Las muestras se dejaron en incubación toda la noche a 4° C en oscuridad. Al día siguiente, se retiró la mezcla de anticuerpos primarios y se realizaron 3 lavados con PBS 1 $\times$ . Tras esto, se incubó en 500  $\mu$ l de una solución de anticuerpos secundarios en diluciones 1:400 (anti-ratón de burro conjugado a Alexa-488 (verde) y anti-conejo de burro conjugado a Alexa-594 (rojo), Jackson Immunoresearch) y Hoechst 33342 10 mg/ml en dilución 1:1000 en PBS 1 $\times$  durante 2 horas con agitación y en oscuridad. Se retiró el exceso de anticuerpos secundarios mediante 3 lavados con PBS 1 $\times$  en oscuridad.

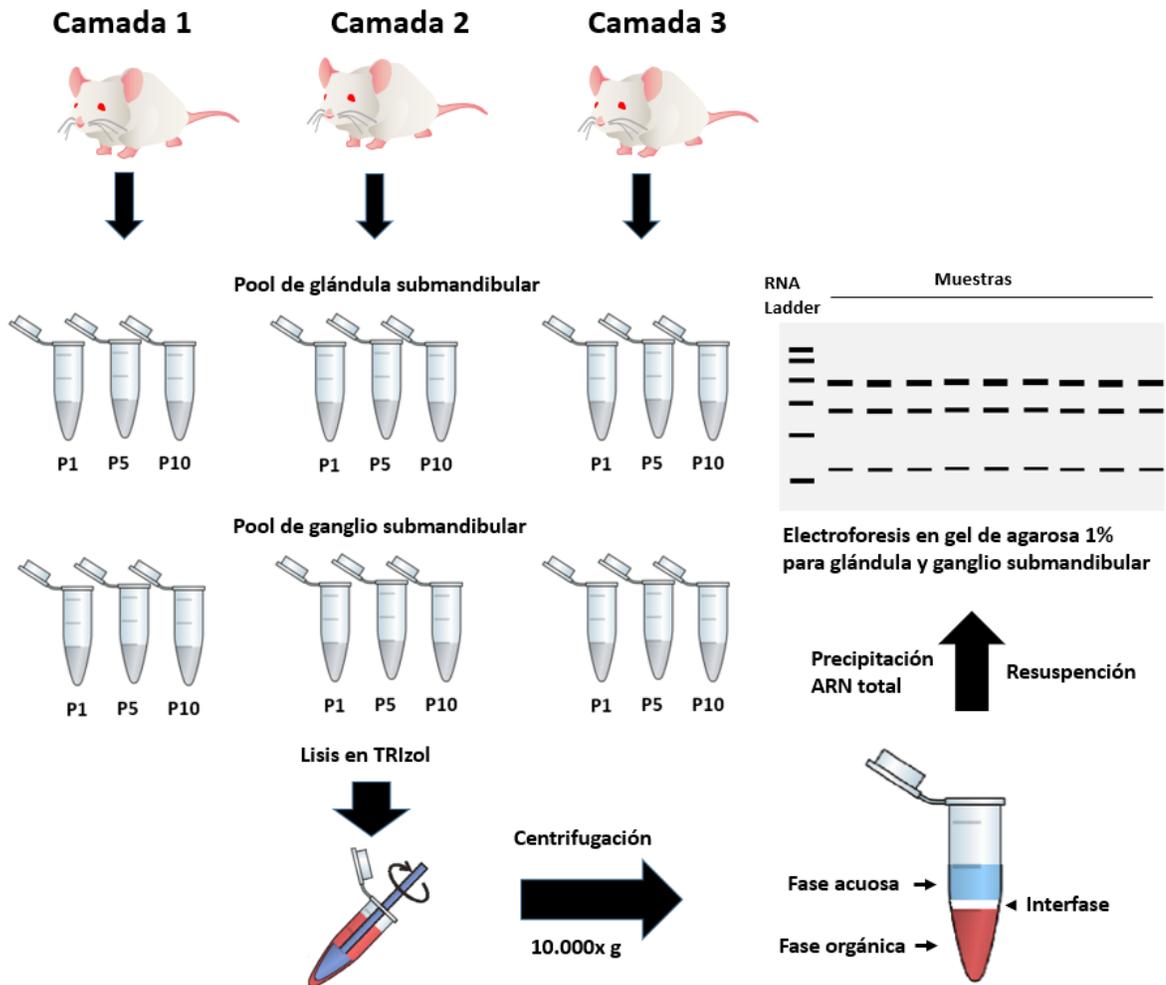
Finalmente, el montaje de las muestras se realizó entre un portaobjeto y un cubreobjeto con calidad para microscopía de fluorescencia sobre una gota de 10  $\mu$ l de medio de montaje (Vectashield, H-1000, Vector Laboratories). Posterior a una incubación toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C, se retiró el exceso de medio de montaje y se selló la muestra entre los vidrios usando como adhesivo esmalte de uñas translúcido (WETnWILD).

Las muestras teñidas fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX53, Olympus) acoplado a una cámara digital CCD y las imágenes fueron capturadas empleando el programa Q-Capture Pro7 software (QImagine) del laboratorio del Dr. Nelson Brown (Facultad de Medicina, Universidad de Talca).

## 6. RESULTADOS

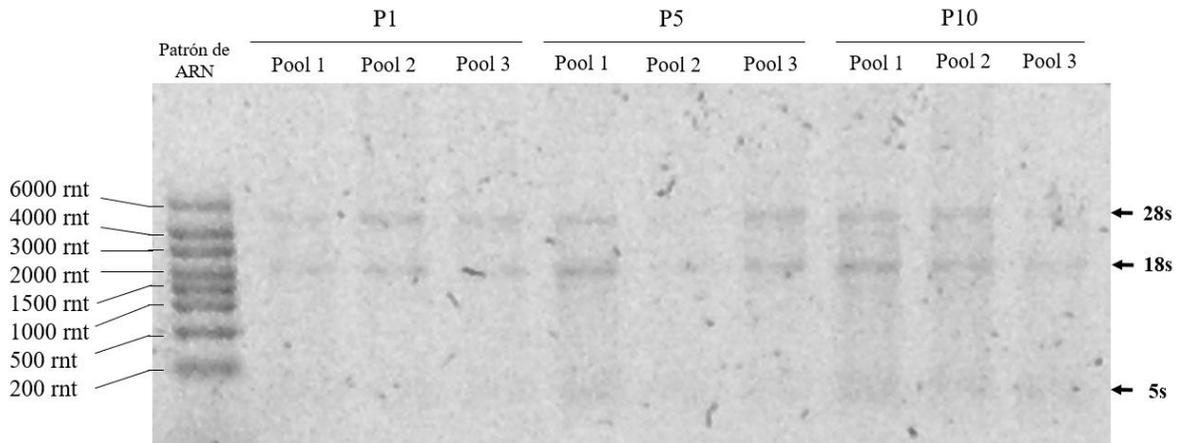
### 5.8 Análisis del ARN total purificado desde muestras de ganglio y glándulas submandibulares de ratón.

Para este estudio se diseccionaron los ganglios submandibulares desde 3 pool de ratones mezclando ratones desde 3 camadas diferentes cuyas crías fueron procesadas en uno de 3 estadios postnatales diferentes (P1, P5, P10, 3 ratones por pool), tal como se muestra en la figura 4. Los RNA totales obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa nativo, aunque las muestras fueron denaturadas previo a la carga en buffer de carga con formamida y calor (figuras 5 y 6). Se observan las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28S, 28S y 5S-5,8, en los tamaños en los que deberían migrar (4.800 rnt, 1900 rnt y 120-160 rnt, respectivamente) lo que indica que no existe degradación evidente en las muestras purificadas. La concentración de las muestras fue estimada mediante densitometría de la imagen de la electroforesis respectiva, lo que tiene dos ventajas: la primera, su sensibilidad (2ng de ARN por banda en un gel teñido con GelRed, 5 veces más sensible que el bromuro de etidio) lo que permite cuantificar muestras con bajo rendimiento, considerando que el ganglio por si solo es un tejido muy pequeño, y la segunda es que no es susceptible a interferentes como si ocurre con la cuantificación por absorbancia (compuestos fenólicos, alcoholes y azúcares) que comúnmente co-purifican con el ARN proveniente de tejidos ricos en ellos (musculo, hígado y tejido nervioso). La concentración de cada RNA se estima a partir de la suma de intensidades de las tres bandas de ARN visibles en el gel. El rendimiento en esta tanda fue bajo en el caso de las muestras de ganglio submandibular y alto para las muestras de glándula submandibular, lo cual se puede atribuir a la diferencia de tamaño del tejido que se obtuvo lo que nos obligó a realizar una sola reacción de ADN copia con las muestras de ganglio y reduciendo el número de ensayos posibles a realizar por RT-qPCR.



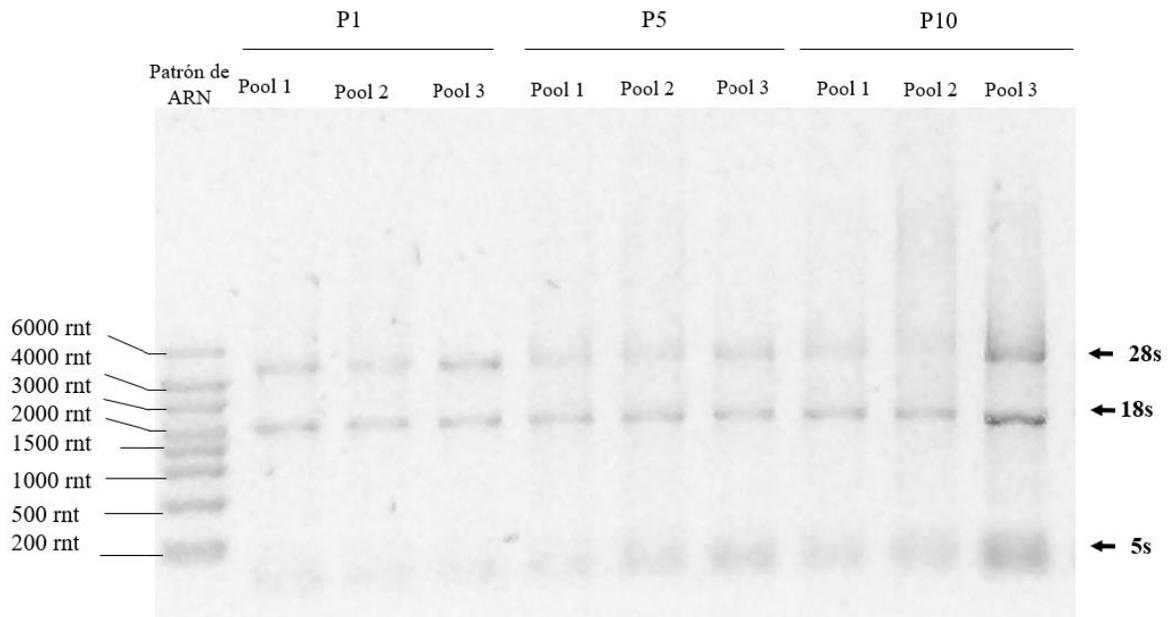
**Figura 4: Esquema secuencial de las etapas de obtención y procesamiento de las muestras de ganglio submandibular y glándula submandibular.**

Los tejidos fueron obtenidos mediante disección y el procesamiento de extracción de ARN fue por medio del método TRIzol. La adición de cloroformo seguida de centrifugación promueve la separación en dos fases, una acuosa superior y otra inferior orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, mientras que el ADN se encuentra en la interfase. Las proteínas permanecen en la fase orgánica. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa del ARN total obtenido desde el pool de muestras de ganglio submandibular pertenecientes a los estadios P1, P5 y P10.**

Se indican los ARN totales purificados desde las muestras de ganglio submandibular de los diferentes estadios postnatales 1 (P1) Postnatal 5 (P5) y Postnatal 10 (P10) pertenecientes al pool de ratones obtenidos desde la mezcla de individuos desde 3 camadas (Pool 1, Pool 2, Pool 3 respectivamente). Se cargó además un estándar de ARN (*RiboRuler High Range RNA Ladder*, Thermo Scientific) de concentración conocida, el que fue empleado para el análisis densitométrico para la estimación de la concentración de las muestras de ARN total. La electroforesis fue realizada en un gel de agarosa nativo al 1% en buffer TAE 0,5× teñido previo a la corrida con 0,125× *GelRed* (Biotium). La corrida electroforética se realizó a 100 volts por 40 minutos. Se indican las bandas correspondientes a los ARN ribosomales de las subunidades mayor (28S), menor (18S) del ribosoma y 5S-5,8S-tRNAs. rnt: ribonucleótidos. Fuente: Elaboración propia.



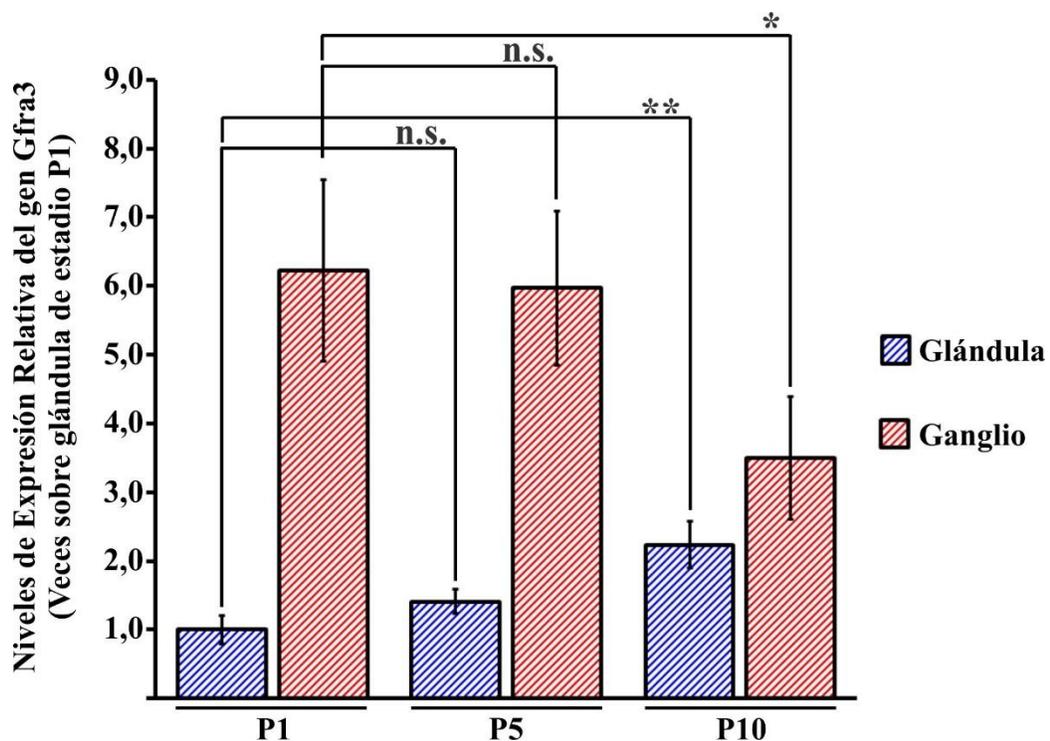
**Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa del ARN total del pool de las muestras de glándula submandibular de ratones pertenecientes a los estadios P1, P5 y P10.**

Se indican los ARN totales purificados desde las muestras de glándula submandibular de los diferentes estadios postnatales 1 (P1) Postnatal 5 (P5) y Postnatal 10 (P10) pertenecientes al pool de ratones obtenidos desde la mezcla de individuos desde 3 camadas (Pool 1, Pool 2, Pool 3 respectivamente). Se cargó además un estándar de ARN (*RiboRuler High Range RNA Ladder*, Thermo Scientific) de concentración conocida, el que fue empleado para el análisis densitométrico para la estimación de la concentración de las muestras de ARN total. La electroforesis fue realizada en un gel de agarosa nativo al 1% en buffer TAE 0,5× teñido previo a la corrida con 0,125× *GelRed* (Biotium). La corrida electroforética se realizó a 100 volts por 40 minutos. Se indican las bandas correspondientes a los ARN ribosomales de las subunidades mayor (28S), menor (18S) del ribosoma y 5S-5,8S-tRNAs . rnt: ribonucleótidos. Fuente: Elaboración propia.

## 6.2 Amplificación relativa de la expresión mediante RT-PCR en tiempo real para el gen GFRA3 en muestras de ADN copia generadas a partir del ARN total desde muestras de ganglio y glándula submandibular.

En resultados previos bajo las mismas condiciones de trabajo, al analizar el valor de variación por pares para este set de genes en muestras de ganglio submandibular, se determinó que el mejor factor de normalización es la media geométrica entre los valores linealizados de Actb y B2m los cuales se utilizaron para este ensayo (21).

El análisis de expresión relativa para el gen Gfra3 de estudio en las muestras de ganglio y glándula submandibular normalizados respecto del factor de normalización (NF Actb, B2m) y expresado como veces sobre el valor de expresión normalizado para la muestra de glándula submandibular de ratones en estadio de 1 día postnatal (P1) y que se presentan en la figura 7, muestran una que los niveles del ARNm que codifica para Gfra3 son 6 veces mayores en ganglio que en glándula submandibular en el estadio 1 día postnatal (P1). Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ , test de Student no apareada de dos colas). Sin embargo, estos niveles disminuyen en el ganglio y aumentan en el tejido glandular de forma que en el estadio de 10 días postnatal (P10) sus niveles no difieren de forma estadísticamente significativa ( $p > 0.05$  entre P10 de ganglio y glándula). El perfil de expresión en aumento para Gfra3 observado en las muestras de glándula submandibular muestran directa relación con los disponibles desde el análisis de microarreglo de RNA disponible desde el buscador del proyecto de anatomía molecular de la glándula salival del National institute of Dental and Craniofacial Research, NIH (<https://sgmap.nidcr.nih.gov/sgmap/sgexp.html>).

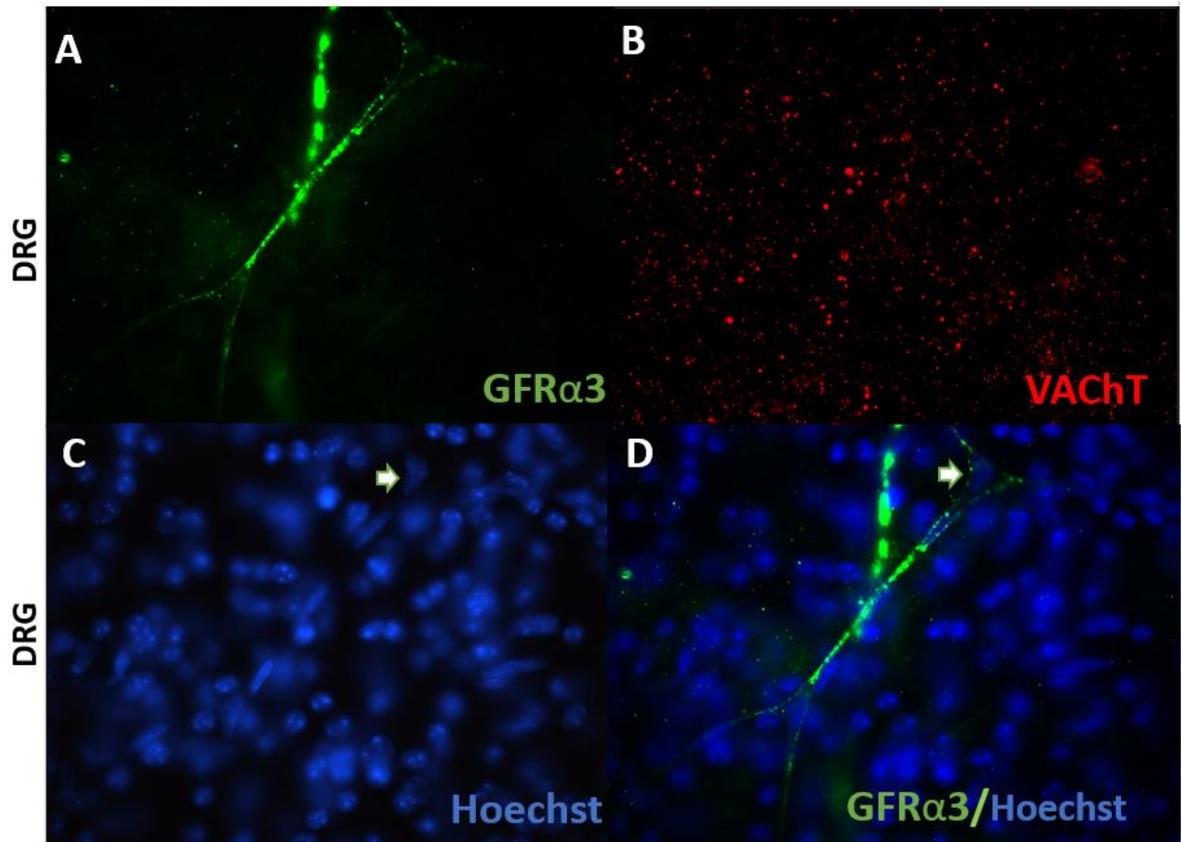


**Figura 7: Expresión relativa de los ARNm de GFRa3 en muestras del ganglio y glándula submandibulares de ratón pertenecientes a los estadios P1, P5 y P10.**

Gráfico de barras indicando el promedio de los valores de expresión del gen GFRa3 en muestras de ganglio submandibular para los estadios postnatales P1, P5 y P10 analizados mediante RT-qPCR y normalizados respecto al factor de normalización NF (media geométrica de Actb y B2m) y expresados como veces sobre el valor de expresión normalizado de Gfra3 desde la muestra de glándula submandibular del estadio P1. Las barras de error indican la desviación estándar. Se realizó una comparación sobre los promedios de los valores para cada gen entre los tejidos mediante un test de Student no apareada de dos colas, que se indica como corchetes. (n.s.: no significativo; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01). Fuente: Elaboración propia.

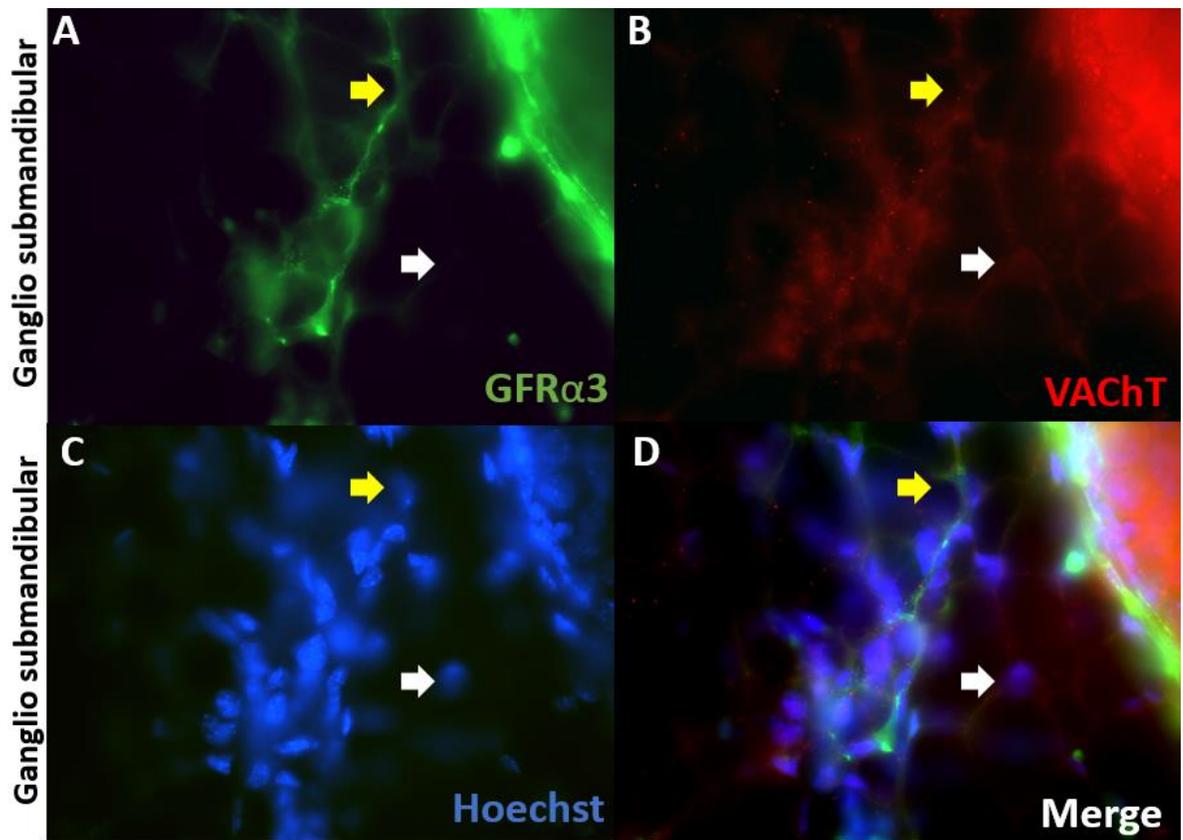
### 6.3 Análisis de la expresión de la proteína GFR $\alpha$ 3 mediante inmunofluorescencia.

Debido a que en algunos casos los niveles de expresión del mensajero que codifica para un gen no se corresponden con los niveles de expresión de la proteína y de forma de confirmar si los niveles de expresión del ARNm provienen de un grupo de neuronas desde el ganglio submandibular y no corresponde al promedio de expresión de Gfra3 de todas las neuronas u otros tipos celulares desde el ganglio, procedimos a determinar la expresión del receptor GFR $\alpha$ 3 mediante inmunofluorescencia en tejido completo (*whole mount*). A modo de control positivo, en la figura 8 se muestra la inmunodetección de GFR $\alpha$ 3 en una neurona representativa desde un ganglio de la raíz dorsal (DRG), un ganglio sensorial donde se conoce y está ampliamente descrita la expresión de esta proteína. La inmunoreactividad se observa en la membrana plasmática en torno al soma y al proceso que correspondería al axón. De igual forma, nuestros resultados obtenidos para el mayor ganglio submandibular adosado al inicio del ducto principal de la glándula mostraron inmunoreactividad positiva en todo el citoplasma y membrana plasmática en un pequeño grupo de células (del total de ellas indicadas como núcleos teñidos con Hoechst), tal como se muestra en la figura 9. Además, se realizó la inmunodetección del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), que es un marcador específico de neuronas colinérgicas y que no se expresa en las neuronas sensoriales del DRG (figura 8, panel B). Todas las células positivas para GFR $\alpha$ 3 fueron positivas para VACHT confirmando su expresión en estas neuronas (figura 9, flecha amarilla). Por el contrario, en la figura 9 se aprecia otra neurona colinérgica (+VACHT) y que fue negativa para GFR $\alpha$ 3 (figura 9, flecha blanca) apoyando la idea de que GFR $\alpha$ 3 se expresa en una subpoblación de las neuronas del ganglio submandibular.



**Figura 8: GFR $\alpha$ 3 se expresa en neuronas pertenecientes al ganglio de raíz dorsal (DRG).**

Inmunodetección mediante inmunofluorescencia del receptor GFR $\alpha$ 3. A) inmunodetección contra GFR $\alpha$ 3 en un campo del ganglio de la raíz dorsal espinal (DRG). B) Inmunodetección contra VAcHT (marcador de neuronas colinérgicas), el cual no es expresado en DRG. C) Tinción nuclear con Hoechst. D) *Merge* de las señales para GFR $\alpha$ 3 y Hoechst en la muestra de ganglio de raíz dorsal. La flecha blanca indica el núcleo perteneciente a la neurona GFR $\alpha$ 3 positiva. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 9: GFR $\alpha$ 3 se expresa en neuronas colinérgicas pertenecientes al ganglio submandibular de ratón.**

Inmunodetección mediante inmunofluorescencia del receptor GFR $\alpha$ 3. A) inmunodetección contra GFR $\alpha$ 3 en un campo del ganglio submandibular. B) Inmunodetección contra VACHT, marcador de neuronas colinérgicas. C) Tinción nuclear con Hoechst. D) *Merge* de las señales para GFR $\alpha$ 3, VACHT y Hoechst en la muestra de ganglio submandibular. Las flechas amarillas indican una neurona GFR $\alpha$ 3<sup>+</sup>/VACHT<sup>+</sup>/Hoechst<sup>+</sup>. Las flechas blancas muestran una neurona GFR $\alpha$ 3<sup>-</sup>/VACHT<sup>+</sup>/Hoechst<sup>+</sup>. Fuente: Elaboración propia.

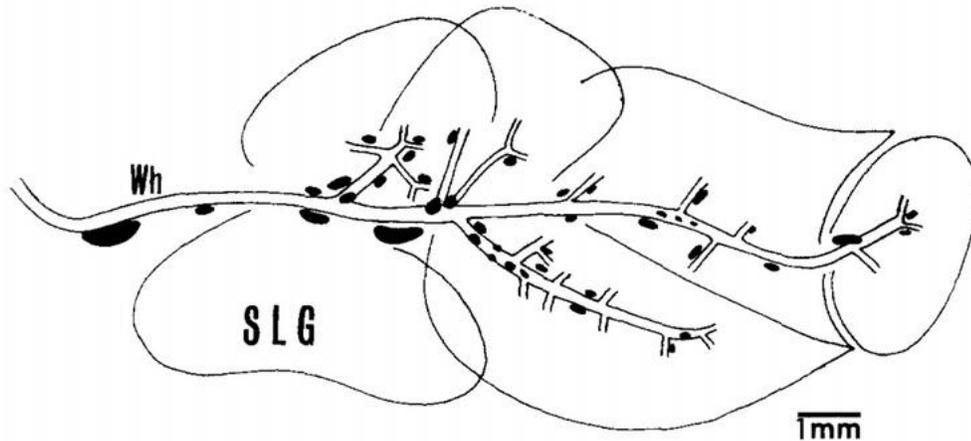
## 7. DISCUSIÓN

La expresión observada en ganglio submandibular para nuestro gen de interés *Gfra3* mediante RT-qPCR sobre muestras de ganglios parasimpáticos que inervan las glándulas submandibulares en estadios postnatales de ratón (P1, P5 y P10) muestran una tendencia a disminuir desde P1 a P10 en el ganglio asociado al ducto principal. En la base de datos de microarreglo de RNA se analizó la expresión en el ducto principal (donde están adosados los ganglios) en estadios embrionarios desde E12,5 hasta E15, observándose un máximo de expresión de *Gfra3* en E14, y que disminuye fuertemente en E15. Nuestros datos postnatales confirman esta tendencia de disminución de la expresión en el ducto principal, pero ya que nuestras disecciones contienen esencialmente ganglios, podemos decir que esta disminución es en este tejido parasimpático. Ahora bien, los niveles de *Gfra3* postnatales en la base de datos de microarreglo de RNA se realizaron sobre microdisecciones de glándula y una porción del ducto principal, y muestran un aumento de su expresión desde P5 hasta adulto, misma tendencia que observamos en nuestros análisis mediante RT-qPCR sobre las disecciones de glándula aumentando al doble en estadio P10 respecto de P1. De todas formas, en estadio P1 los niveles de *Gfra3* en ganglio son 6 veces mayores que en glándula, mientras que en que P10 disminuyen en ganglio hasta hacerse similares a los niveles de glándula. Estos cambios observados en la expresión de *Gfra3* se puede asociar a la función descrita para estos GDNF, relacionadas con el desarrollo y mantenimiento de conjuntos neuronales y sus sinapsis en SNC y SNP (28).

Es importante destacar el método de obtención del tejido a analizar, ya que, en el caso de la base de datos utilizada, ellos solo están interesados en estudiar cambios de expresión a nivel de la glándula submandibular, por ende, la obtención de tejidos que realizan mediante micro disección por láser es del ducto principal (nosotros sabemos que los ganglios submandibulares están adosados al ducto principal) y además glándula. En nuestro caso la

muestra se obtuvo mediante disección y si bien, mientras más cercano a P1 es más difícil la obtención del tejido, fuimos rigurosos en aislar solo el ganglio submandibular sin considerar (o en la menor cantidad posible) el ducto principal al cual están adosados.

Yamakado y Yohro describieron que los ganglios submandibulares en ratón se encuentran al comienzo del ducto principal donde tiene un tamaño bastante considerable, pero siguiendo a través de los ductos secundarios se encuentran pequeños ganglios submandibulares recibiendo inervación parasimpática y llevando neuronas postganglionares al resto de células de la glándula (18). Debido a esto, el aumento de Gfra3 que observamos en la glándula podría deberse a cambios en los niveles de Gfra3 en las neuronas de estos ganglios de menor tamaño dentro de la glándula, como se muestran en la figura 10.



**Figura 10. Diagrama de la glándula submandibular derecha de ratón.**

Se puede ver la clara distribución de ganglios submandibulares adosado al ducto principal y a los ductos secundarios. Los ganglios intralobulares de la glándula se muestran de un tamaño mayor al real (Wh: ducto principal, SLG: glándula sublingual). Fuente: Desde Yamakado, M., and Yohro, T., 1997 (18).

De forma de corroborar parcialmente que la expresión de Gfra3 se asocia a tipos neuronales en las muestras de ganglio y glándula submandibular, proponemos analizar los niveles de marcadores neuronales específicos como Tubb3 (beta tubulina neuronal, Tuj1) y Rbfox3 (NeuN) así como de marcadores de otros tipos celulares como Gfap (marcador glial) y Aqp5 (marcador de célula acinar) y así discriminar otros tipos celulares que pueden estar presentes en el ganglio y en la glándula (29).

De todas formas, nuestras inmunofluorescencias contra GFR $\alpha$ 3 mostraron que se expresa en neuronas colinérgicas dentro del ganglio en muestras de individuos adultos. A este respecto, se sabe por estudios electrofisiológicos realizados en el siglo pasado que la inervación de las células ganglionares submandibulares experimenta una profunda reorganización durante el desarrollo postnatal, lo que finalmente se refleja en menos axones de los que había al momento de nacer en el adulto (30). Ahora bien, el papel previamente descrito para GFR $\alpha$ 3 en procesos de innervación (31) nos podría indicar que este gen pudiera estar implicado en procesos de crecimiento axonal de estas neuronas del ganglio submandibular, donde las proyecciones citoplasmáticas avanzan hasta el lugar que deben inervar, que en el caso de las neuronas preganglionares, corresponde al ganglio submandibular. Así, en primera instancia podemos relacionar el alza de Gfra3 a nivel embrionaria con este proceso. Sin embargo, su disminución en estadios postnatales podría dar cuenta de su rol en la reorganización sináptica durante el desarrollo postnatal, en procesos tales como la poda sináptica, que consiste en la eliminación de un gran número de sinapsis establecidas durante el desarrollo embrionario (32)(33) y la preservación de las sinapsis necesarias para la correcta inervación del tejido blanco.

## 8. CONCLUSIÓN

Desde el análisis de los niveles de expresión del gen *Gfra3* en los diferentes estadios del desarrollo postnatal de la glándula y el ganglio submandibular de ratón identificamos una clara disminución en la expresión relativa del ARNm en los estadios postnatales P1, P5 y P10 para el ganglio submandibular, mientras que en glándula submandibular observamos un aumento en la expresión de este gen al estadio P10.

Los niveles de expresión de *Gfra3* en el ganglio submandibular adosado al ducto principal son 6 veces mayores que los presentes en la glándula en estadio P1 postnatal.

Los resultados de inmunofluorescencia contra  $GFR\alpha3$  en el ganglio submandibular mostraron una clara expresión en un subconjunto de neuronas colinérgicas, sugiriendo que existe una función de esta proteína que es necesario caracterizar.

## 9. PROYECCIONES

En nuestros próximos estudios de RT-qPCR analizaremos la expresión de marcadores neuronales específicos como *Tubb3* (beta tubulina neuronal, *Tuj1*) y *Rbfox3* (*NeuN*) así como de marcadores de otros tipos celulares como *Gfap* (marcador glial) y *Aqp5* (marcador de célula acinar).

Para la caracterización de la función de *Gfra3* proponemos el uso de un ratón transgénico que controla la expresión de la enzima Cre recombinasa bajo el control de promotor del gen *Gfra3* (*Gfra3-Cre*, Jackson Laboratories) y el uso de vectores adenoasociados recombinante (AAVr) que permitan la expresión de un shRNA contra *Gfra3* o la sobreexpresión de *GFR $\alpha$ 3* específicamente en las neuronas *Gfra3* positivas del ganglio. Este ratón puede ser cruzado con el ratón transgénico *Rosa-tdTomato*, que ya disponemos, y así identificar las neuronas *Gfra3* positivas mediante inmunofluorescencia.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Bustamante Zuleta E. El sistema nervioso : desde las neuronas hasta el cerebro humano. Editorial Universidad de Antioquia; 2007.
2. Jacobowitz DM. The Peripheral Autonomic System. In: The Peripheral Nervous System. Boston, MA: Springer US; 1974. p. 87–110.
3. Ramos-Quiroga JA, Sánchez-Mora C, Corominas M, Martínez I, Barrau V, Prats L, et al. [Neurotrophic factors and their importance in attention deficit hyperactivity disorder]. *Rev Neurol*. 2014 Feb 24;58 Suppl 1:S19-24.
4. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*. 2009 Oct 16;139(2):267–84.
5. Chen R, Wu X, Jiang L, Zhang Y. Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity. *Cell Rep*. 2017 Mar 28;18(13):3227–41.
6. Torres-Fernández O. La técnica de impregnación argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del premio nobel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. *Biomédica*. 2006 Dec 1;26(4):498.
7. Guillery RW. Observations of synaptic structures: origins of the neuron doctrine and its current status. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Jun 29;360(1458):1281–307.
8. Boada Saña M, Colom Comí A, Castelló Echeverría N. La experimentación animal. 2011.
9. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983 Jun;16(2):109–10.
10. Cowan WM, Südhof TC, Stevens CF, Howard Hughes Medical Institute. Synapses. Baltimore : Johns Hopkins University Press; 2001. 767 p.
11. Kandel ER, Schwartz JH. Principles of neural science. McGraw-Hill; New York: 2000. p. xli.p. 1414.
12. Navarro Acebes X. Fisiología del sistema nervioso autónomo. *Rev Neurol*. 2002;35(06):553.
13. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience : exploring the brain. Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 857 p.
14. Moore KL, Agur AMR. Fundamentos de anatomía con orientación clínica. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2009. 694 p.
15. Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci* . 2007 Apr 30;133(1):3–18.
16. Ishizuka K, Oskutyte D, Satoh Y, Murakami T. Multi-source inputs converge on the superior salivatory nucleus neurons in anaesthetized rats. *Auton Neurosci*. 2010 Aug

25;156(1–2):104–10.

17. Ferreira JN, Hoffman MP. Interactions between developing nerves and salivary glands. *Organogenesis*. 2013;9(3):199–205.
18. Yamakado M, Yohro T. Population and structure of nerve cells in mouse submandibular ganglion. *Anat Embryol (Berl)*. 1977;150(3):301–12.
19. Thomas KC, Zheng XF, Garces Suarez F, Raftery JM, Quinlan KGR, Yang N, et al. Evidence Based Selection of Commonly Used RT-qPCR Reference Genes for the Analysis of Mouse Skeletal Muscle. Dettman R, editor. *PLoS One*. 2014 Feb 11;9(2):e88653.
20. Orozco OE, Walus L, Sah DW, Pepinsky RB, Sanicola M. GFRalpha3 is expressed predominantly in nociceptive sensory neurons. *Eur J Neurosci*. 2001 Jun;13(11):2177–82.
21. Villegas Valdebenito, Marianela. Caracterización molecular de subpoblaciones neuronales presentes en médula espinal, ganglio espinal de la raíz dorsal y ganglio submandibular de ratón. Memoria para optar al grado de licenciado en Tecnología Médica. Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca. 2018.
22. Lin L, Doherty D, Lile J, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 1993 May 21;260(5111):1130–2.
23. VIRTANEN H, YANG J, BESPALOV MM, HILTUNEN JO, LEPPÄNEN V-M, KALKKINEN N, et al. The first cysteine-rich domain of the receptor GFR $\alpha$ 1 stabilizes the binding of GDNF. *Biochem J*. 2005 May 1;387(3):817–24.
24. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*. 2002 May;3(5):383–94.
25. Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, et al. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* [Internet]. 1998 Dec;21(6):1291–302.
26. Richner M, Jager SB, Siupka P, Vaegter CB. Hydraulic Extrusion of the Spinal Cord and Isolation of Dorsal Root Ganglia in Rodents. *J Vis Exp*. 2017 Jan 22;(119).
27. Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF. High-Throughput Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol*. 2006 Jan;73(1):15.8.1-15.8.28.
28. Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol*. 2000 Feb;10(1):103–10.
29. Ferreira A, Caceres A. Expression of the Class III  $\beta$ -tubulin isotype in developing neurons in culture. *J Neurosci Res*. 1992 Aug;32(4):516–29.
30. Lichtman JW. The reorganization of synaptic connexions in the rat submandibular

ganglion during post-natal development. *J Physiol.* 1977 Dec;273(1):155–77.

31. Bohórquez D V., Samsa LA, Roholt A, Medicetty S, Chandra R, Liddle RA. An Enteroendocrine Cell – Enteric Glia Connection Revealed by 3D Electron Microscopy. Klymkowsky M, editor. *PLoS One.* 2014 Feb 26;9(2):e89881.
32. Tapia JC, Lichtman JW. Synapse Elimination. In: *Fundamental Neuroscience.* Elsevier; 2013. p. 437–55.
33. Lichtman JW. On the predominantly single innervation of submandibular ganglion cells in the rat. *J Physiol.* 1980 May;302:121–30.