



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

**Papel del miR-124a en la adquisición y establecimiento del fenotipo
neuronal en *Mus musculus***

Memoria para optar al título de Bioquímico

YERKO ANDRÉS FUENTEALBA ESCOBAR

Director de Tesis

Dr. MANUEL KUKULJAN P.
Laboratorio de Neurobiología Celular y
Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante

Dra. DANIELA SELENFREUND.
Laboratorio de Bioquímica
Dpto. De Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Julio 2011

A mis Padres
A Johny, Miriam y Darwin

AGRADECIMIENTOS

Es difícil agradecer a toda la gente que hizo posible que esta memoria viera la luz, al igual que toda mi pasada por la Universidad, así que no se enojen si no los nombro a cada uno, aunque tengan certeza de que son parte de estos agradecimientos.

En primier lugar agradecer al Dr. Manuel Kukuljan por permitirme trabajar en el laboratorio y utilizar (con bastante poco criterio algunas veces) todos sus recursos. Asimismo a la Dra. Jimena Sierralta y al Dr. Andrés Couve, con quienes también convivimos en el lab.

A mis compañeros de laboratorio, amigos a esta altura: Patio, Pía, Claudia, Tito, Andrés, José, Cristobal, Carlos, Kathy, Pablito, el Fabi, Omar, Matías, René, Consu, Nacho, Dani, Vivi. Por la buena onda del laboratorio, los partidos de futbolito, los asados que resultaron y los que no, las cervezas y la discusión científica con todos y cada uno.

A toda mi familia que nunca se cansó de preguntarme cuanto me faltaba para terminar esta tesis y en que iba a trabajar una vez que egresara. A mis primos y tíos, a mis sobrinos y por sobre todo a mis padres y hermanos. Gracias por la paciencia y el apoyo.

Al honorable Núcleo Científico S'eP y cada una de sus reuniones y simposios sin los cuales terminar esta tesis hubiera sido mucho más difícil: Juan (un ejemplo de bioquímico), Ernesto, Javier, Pato, Iván, Ñaño y César. También al grupo de amigas S'eP: Icha, Javi, Coni, Blanca, Pame, con las que amenizamos algunos de los simposios más importantes del núcleo.

Queda harta gente a quien tengo que agradecerle por apoyarme en esta tesis: a mi amigo Iván S. A mis amigos de la facultad con los que trabajamos en el centro de estudiantes: Sergio, Renzo, Oscar, Pancho G., Pame N., y más que se me olvidan ahora. A mis amigos del colegio, indispensables para pasar de una semana a otra: Carlos, Pancho C., Deni, Caro M., Diego y más gente. A mis compañeros del colectivo Autonomista de la U: Perno, Giorgio, Álvaro, Pancho A., Pancho F., Javier y

mucha más gente, con quienes canalicé inquietudes que superaban el estudio de los fenómenos biológico-químicos, y con los que espero seguir relacionándome en el futuro.

Agradezco el financiamiento de esta tesis por proyecto Fondecyt # 1090281 y el financiamiento por Beca de la fundación Guillermo Puelma del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

ÍNDICE DE MATERIAS

| | |
|---|----|
| Índice de materias | 5 |
| Índice de figuras y tablas | 7 |
| Resumen | 8 |
| Abstract | 10 |
| | |
| 1. Introducción | 12 |
| 1.1 Histogénesis cortical | 12 |
| 1.2 Factores moleculares implicados en la neurogénesis | 16 |
| 1.3 Control post-transcripcional mediado por RNAs pequeños: los microRNAs | 17 |
| a. Biogénesis de los miRNA | 19 |
| b. Función de los miRNA | 21 |
| 1.4 Sistema nervioso y miR-124 ^a | 23 |
| | |
| 2. Hipótesis | 28 |
| | |
| 3. Objetivo General | 28 |
| | |
| 4. Objetivos Específicos | 28 |
| | |
| 5. Materiales y métodos | 29 |
| 5.1 Reactivos e insumos | 29 |
| 5.2 Soluciones | 30 |
| 5.3 Cultivo primario | 31 |
| 5.4 Material genético | 32 |
| 5.5 Infección y transfección del DNA | 32 |
| 5.6 Generación de vectores lentivirales | 33 |
| 5.7 Inmunocitoquímica | 33 |
| 5.8 Electroporación <i>in utero</i> | 36 |
| 5.9 Perfusión de los embriones | 36 |

| | |
|--|----|
| 5.10 Inmunohistoquímica | 38 |
| 5.11 Adquisición y análisis de imágenes | 38 |
| a. Análisis de migración neuronal | 39 |
| b. Análisis de co-expresión de marcadores | 39 |
| c. Análisis de morfología celular en la placa cortical | 39 |
| d. Análisis de Sholl | 39 |
| e. Longitud total de dendritas | 40 |
| f. Índice de complejidad dendrítica | 40 |
| g. Largo axonal total | 40 |
| 5.12 Análisis estadístico | 40 |
| 6. Resultados | 42 |
| 6.1 Papel del miR-124a <i>in vitro</i> | 42 |
| 6.2 Papel del miR-124a <i>in vivo</i> | 47 |
| a. Participación en la migración | 49 |
| b. Papel en la diferenciación | 50 |
| c. Papel del miR-124a en el desarrollo morfológico | 51 |
| 7. Discusión | 53 |
| 7.1 Cambios morfológicos de neuronas en cultivo mediados por el miR-124a | 54 |
| a. Pérdida de función | 55 |
| b. Ganancia de función | 55 |
| 7.2 Papel del miR-124a en la histogénesis cortical | 57 |
| a. Efectos sobre la migración | 57 |
| b. Efectos sobre la diferenciación neuronal | 58 |
| c. Efectos sobre la morfología en la placa cortical | 61 |
| 8. Conclusiones | 63 |
| 9. Referencias | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Esquema general del desarrollo embrionario del SNC | 2 |
| Figura 2: Histogénesis cortical. | 3 |
| Figura 3: Biogénesis de los microRNA | 9 |
| Figura 4: Esquema de la temporalidad de los experimentos de neuronas en cultivo. | 24 |
| Figura 5: Esquema del experimento de electroporación <i>in utero</i> | 26 |
| Figura 6: Inmunocitoquímica a neuronas corticales en cultivo infectadas con lentivirus. | 32 |
| Figura 7: Efecto de la variación de los niveles del miR-124a en el Largo Dendrítico Total (TDBL) de neuronas corticales en cultivo. | 33 |
| Figura 8: Efecto de la variación de los niveles del miR-124a en el Índice de Complejidad Dendrítica (DCI) de neuronas corticales en cultivo. | 34 |
| Figura 9: Cambios en la curva de Sholl producto de la variación de los niveles del miR-124a. | 35 |
| Figura 10: Efecto de la variación de los niveles del miR-124a en el largo axonal total de neuronas corticales en cultivo. | 36 |
| Figura 11: La variación de los niveles del miR-124a no altera la migración neuronal en la corteza. | 37 |
| Figura 12: La variación de los niveles del miR-124a no altera la proporción de progenitores basales en la corteza en desarrollo. | 38 |
| Figura 13: La variación de los niveles del miR-124a no altera tiene efecto en el arribo de neuronas post-mitóticas a la corteza. | 39 |
| Figura 14: Morfología de neuronas que arriban a la Placa Cortical en E17.5. | 41 |
| | |
| Tabla 1: Anticuerpos usados en inmunocitoquímica | 24 |
| Tabla 2: Anticuerpos usados en inmunohistoquímica | 27 |

RESUMEN

Las neuronas de la corteza cerebral se generan a partir de los progenitores ubicados en la pared dorsal de las vesículas telencefálicas. Este proceso implica la salida del ciclo proliferativo de los progenitores, un cambio en el patrón de expresión génica y la migración radial desde los centros neurogénicos (zona ventricular-subventricular), hacia la posición final de las neuronas en la placa cortical. Se han definido muchos factores transcripcionales que son responsables de mantener la pluripotencialidad de los progenitores, y otros que comienzan a expresarse cuando la célula adquiere el destino neural.

Se ha visto que además de los reguladores de la transcripción hay otros mecanismos importantes que controlan el desarrollo cortical y que recientemente se están estudiando. Entre ellos se encuentra el posible papel de los microRNAs en el desarrollo cortical.

Los microRNA (miRNA o miR-s) son pequeñas hebras simples de RNA (21-23 nucleótidos) que regulan post-transcripcionalmente la expresión de ciertos RNA mensajeros por complementariedad de bases. Se ha demostrado que un mismo miRNA es capaz de controlar a cientos de mRNA en un contexto altamente definido temporal y espacialmente. El miR-124a es el más abundante en tejido neural de roedores y que su expresión comienza en E12.5, es decir, junto con el comienzo de la neurogénesis en la corteza. Se han descrito varios mRNAs que son controlados por el miR-124a tanto en progenitores como en neuronas, pero su papel en la neurogénesis aún no se ha caracterizado. La presente memoria explora el papel del miR-124a en el desarrollo de la morfología y en la generación de neuronas piramidales corticales.

Se realizaron experimentos de pérdida y ganancia de función tanto en neuronas corticales *in vitro*, como en la corteza en desarrollo mediante electroporación *in utero*. La pérdida de función del miR-124a generó una rápida disminución de las dendritas primarias, que se recuperó a los 5 días *in vitro* (DIV). La sobre-expresión del miR-124a generó un aumento rápido (a los 3 DIV) del largo de las dendritas y de la complejidad del árbol dendrítico, pero este efecto se perdió a los 5 DIV. A la inversa,

el largo axonal aumentó cuando se elevaron los niveles del miR-124a, a los 5 DIV pero no a tiempos más cortos.

La manipulación de los niveles del miR-124a en la corteza en desarrollo, en tanto, no mostró alteración de la dinámica de migración radial en la corteza, ni de la proporción de progenitores basales, ni de la morfología de las neuronas que alcanzan la placa cortical.

Este trabajo indica que el miR-124a contribuye a la elongación de dendritas y axones de neuronas en cultivo, mientras que en la corteza *in vivo*, el miR-124a parece ser una consecuencia propia del sistema y la variación de sus niveles no afecta ninguno de los procesos que determinan la generación de la corteza cerebral.

ABSTRACT

“Role of miR-124a in the acquisition and establishment of neuronal phenotype in *Mus musculus*”

Neurons of the cerebral cortex arise from progenitors located in the dorsal wall of the telencephalic vesicles. This process implies exit of the proliferative cycle by the progenitors, a change in the pattern of gene expression and radial migration from neurogenic centers (ventricular-subventricular zone), to the final position of the neurons in the cortical plate. Many transcriptional factors have been defined as responsible of maintaining the pluripotency of progenitors, and others are expressed when the cell acquires neural fate.

However, in addition to transcriptional regulators, the generation of the cortex is under other relevant mechanisms that are being recently studied. Among them is the possible role of microRNAs in cortical development.

microRNAs (miRNAs, miR-s) are small non-coding single-strand RNAs (of 21-23 nucleotides) that control the expression of some messenger RNAs at a post-transcriptional level by base complementarity. It has been shown that one miRNA is capable to control hundreds of mRNAs in a highly defined spatial and temporal context. miR-124a is the most abundant miRNA in the neural tissue of rodents, and its expression begins in E12.5, namely, with the start of the cortex neurogenesis. It is have been described that several mRNAs that are under control of miR-124a in progenitor cells or neurons, but its role in the neurogenesis has not been fully described. This thesis explores the role of miR-124a in the morphological development and the generation of cortical pyramidal neurons in a murine model.

For this purpose, loss and gain of function experiments were performed both *in vitro* in cortical neurons, and in the developing cortex through *in utero* electroporation. Loss-of-function of miR-124a produced a decrease in primary dendrites, which was recovered after five days *in vitro* (DIV).

The over-expression of miR-124a produced a fast increase (at three DIV) in dendrite length and dendritic tree complexity, but this effect was lost at 5 DIV. Conversely, axonal length increased with miR-124a over-expression at five DIV, but not at shorter times.

Manipulation of miR-124a levels in the developing cortex, did not shown alterations of radial migration dynamics, nor of the population of basal progenitors, or the morphology of neurons that reach the cortical plate.

This work indicates that miR-124a contributes to dendritic and axonal elongation in culture neurons, while experiments in the cortex suggest that changes in miR-124a seem to be a consequence of the cortical development and changes of its levels do not affect any of the processes that determine the generation of the cerebral cortex.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Histogénesis Cortical

La corteza cerebral es el área relacionada con la inteligencia, la percepción, la imaginación y otras funciones cognitivas superiores. Se ha visto que se expande en las especies más complejas, cubriendo el cerebro casi por completo y adoptando una forma girencefálica en primates (con surcos y circunvoluciones), y lisencefálica en roedores (sin surcos, lisa). Esta característica se ha asociado a la evolución de las especies, ya que las capas más profundas contienen funciones conservadas, pero las más superficiales aparecen sólo en aquellas más complejas (Rakic, 2009).

El desarrollo embrionario de la corteza es un evento conservado. La corteza comienza a desarrollarse cuando se cierra la porción anterior del tubo neural y se establecen los principales territorios neurales. Esta territorialización se debe a la expresión coordinada de factores de transcripción y de moléculas de señalización difusibles, que permiten la diferenciación de las células del ectodermo neuronal de aquellas que componen el ectodermo no neural y el mesodermo, encargadas de generar tejido epidermal. Durante la neurulación, el ectodermo se cierra sobre sí mismo y forma el tubo neural, que recorre el embrión en todo su eje rostro-caudal. La porción anterior de este tubo generará el sistema nervioso central (Figura 1). (Levitt, 2000)

Durante la tercera semana de gestación en humanos (9º día de gestación en ratones), se pueden reconocer las tres vesículas primarias: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo. El prosencéfalo se divide luego en dos vesículas secundarias: el telencéfalo y el diencéfalo, que generarán la corteza cerebral, los ganglios basales, el hipocampo y el tálamo. El telencéfalo, se divide a su vez en una porción dorsal (*palium*) que generará la corteza, y una porción ventral (*subpalium*) que generará los ganglios basales. (Levitt, 2000; Mérot y cols., 2009). Cada una de estas porciones aloja los progenitores que serán responsables de la generación de las neuronas de las dos regiones mencionadas (Figura 1).

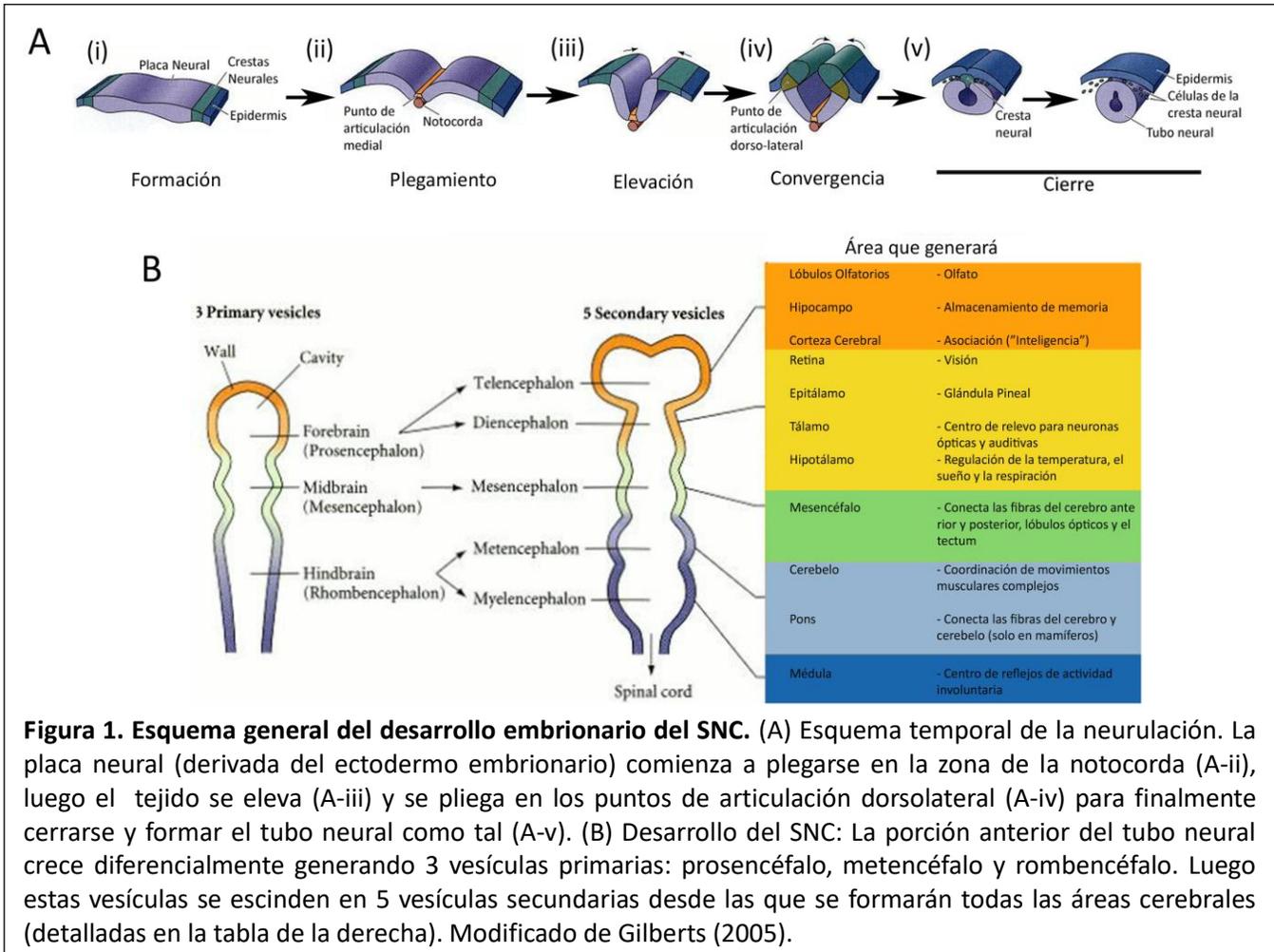


Figura 1. Esquema general del desarrollo embrionario del SNC. (A) Esquema temporal de la neurulación. La placa neural (derivada del ectodermo embrionario) comienza a plegarse en la zona de la notocorda (A-ii), luego el tejido se eleva (A-iii) y se pliega en los puntos de articulación dorsolateral (A-iv) para finalmente cerrarse y formar el tubo neural como tal (A-v). (B) Desarrollo del SNC: La porción anterior del tubo neural crece diferencialmente generando 3 vesículas primarias: prosencéfalo, metencéfalo y rombencéfalo. Luego estas vesículas se escinden en 5 vesículas secundarias desde las que se formarán todas las áreas cerebrales (detalladas en la tabla de la derecha). Modificado de Gilberts (2005).

La corteza cerebral se constituye principalmente de 2 clases de neuronas, las neuronas piramidales de proyección y las interneuronas. Las neuronas de proyección provienen del nicho neurogénico ubicado en la pared dorsal del telencéfalo y alcanzan su posición en la corteza tras migrar radialmente desde dichos sitios. Se caracterizan por ser glutamatérgicas y por su morfología piramidal.

Las interneuronas inhibitorias GABAérgicas provienen de los nichos ubicados en el telencéfalo ventral (eminencias ganglionares medial y lateral) y alcanzan a la corteza tras una larga migración tangencial (Mérot y cols., 2009; Nadarajah y Parnavelas, 2002; Marín y Rubenstein, 2001). Se ha calculado que la proporción entre neuronas glutamatérgicas/GABAérgicas en la corteza adulta es de aproximadamente 6:1 (Levitt, 2000). Se conoce como histogénesis cortical al proceso de generación

de neuronas piramidales en la corteza dorsal del telencéfalo (Noctor y cols., 2004) (Figura 2).

Previo a la histogénesis cortical, el *pallium* se compone de un epitelio pseudoestratificado de células neuroepiteliales, asentadas en la zona ventricular (VZ), en contacto con el lumen ventricular. Estas células pueden generar más progenitores o las primeras neuronas que ocuparán la corteza (detallado más abajo). Algunos progenitores se ubicarán en la VZ, pero otros se situarán en una capa superior, conocida como la zona subventricular (SVZ), que en conjunto con la VZ son los sitios de nacimiento de las neuronas corticales. Las primeras neuronas en nacer salen de la VZ y forman una estructura sobre ella conocida como la preplaca (PP). A medida que continúa la neurogénesis, las nuevas neuronas se ubican en la placa cortical (CP) que separa la preplaca en una zona marginal superior que está en contacto con la pía (MZ) y la subplaca (Figura 2). Todas las neuronas migrarán

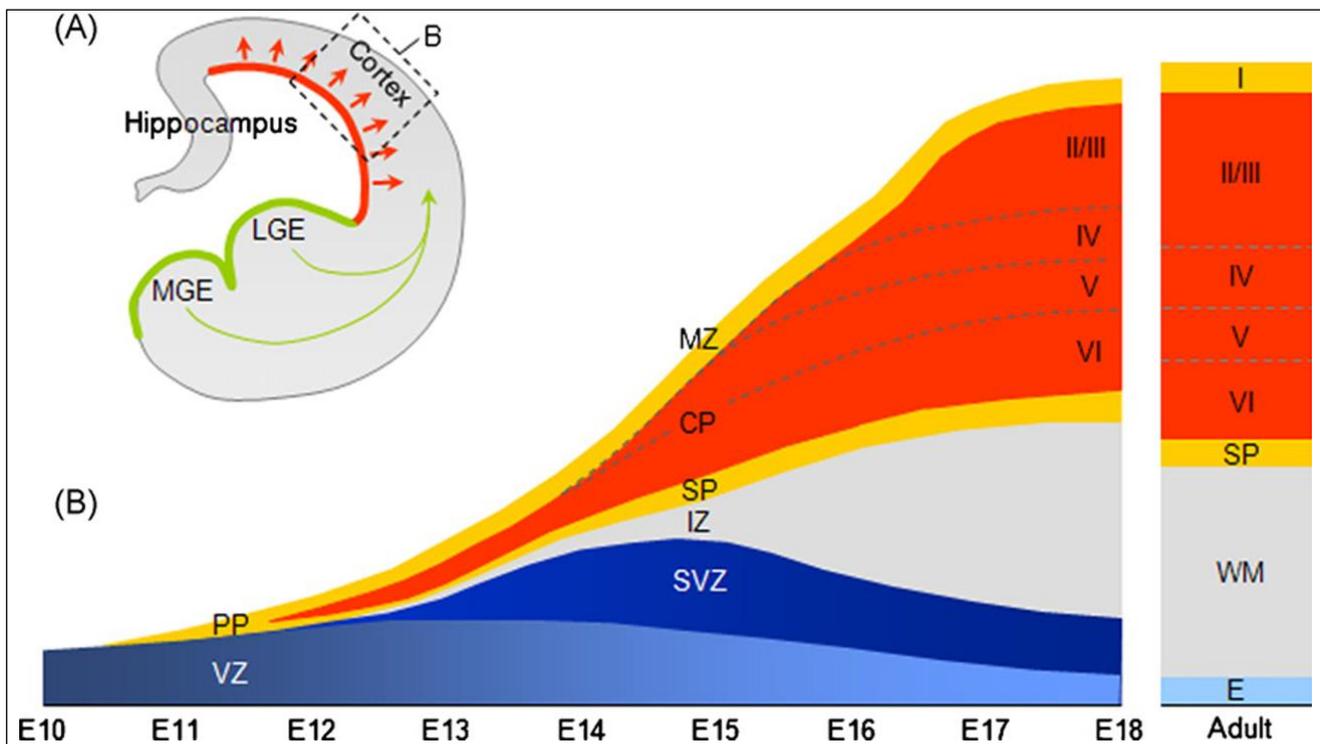


Figura 2. Histogénesis Cortical. (A) Principales sitios neurogénicos del desarrollo cortical. La línea roja muestra el sentido de la migración radial propia de las neuronas de proyección glutamatérgica que provienen de los progenitores ubicados en la pared dorso-lateral del telencéfalo. Las neuronas inhibitorias GABAérgicas en cambio, migran en forma tangencial como indican las flechas verdes, desde las zonas proliferativas ventrales: la eminencia ganglionar lateral (LGE) y medial (MGE) (verde). (B) Esquema que muestra el engrosamiento de la corteza a medida que se generan neuronas desde el ventrículo. VZ: zona ventricular, PP: Preplaca, SVZ: zona subventricular, IZ: zona intermedia, SP: subplaca, CP: placa cortical, MZ: zona marginal, WM: materia blanca, E: zona endimaria. Los números romanos indican la capa respecto a la corteza. En el eje horizontal se indica la progresión del desarrollo embrionario, por días. Tomado de Mérot y cols., 2009.

radialmente desde los nichos proliferativos de la VZ-SVZ hacia la CP, ensanchando esta zona, que en el adulto corresponderá a la materia gris de la corteza cerebral. Entre la CP y la VZ-SVZ las neuronas migran por la zona intermedia (IZ), que en el animal adulto será la materia blanca de la corteza, sitio de paso de los axones hacia las estructuras adyacentes del cerebro (Mérot y cols., 2009). Los últimos progenitores se dividirán terminalmente para generar astrocitos y la VZ quedará sólo como una capa endimaria en contacto con el ventrículo, pero sin capacidad proliferativa (Noctor y cols., 2004).

La laminación en 6 capas queda definida durante la neurogénesis por la edad de nacimiento de las neuronas, las que van posicionándose escaladamente unas sobre otras: las primeras en nacer ocuparán las capas más profundas (capas V-VI), mientras que el resto irá ocupando las capas superiores en orden de nacimiento (Molyneaux y cols., 2007). La capa I (derivada de la MZ) se compone principalmente de células de Cajal-Retzius, que se originan en sitios extracorticales y tienen la capacidad de expresar Reelina, que es un factor difusible indispensable para la correcta laminación y ubicación de las neuronas en la CP (Bystron y cols., 2009). Se cree que las neuronas de las capas más profundas se generan a partir de los progenitores apicales de la VZ y que las neuronas de las capas II-III-IV lo hacen a partir de los progenitores basales ubicados en la SVZ (Rash y Grove, 2006)

La ubicación de las neuronas en la corteza determina la conectividad que establecerán con el resto del cerebro, así las neuronas de la capa VI proyectan sus axones hacia el tálamo (conectividad cortico-talámica), las neuronas de la capa V proyectan hacia blancos del mesencéfalo, el romboencéfalo y la médula espinal (conectividad subtalámica). Las neuronas de las capas II-III cruzan sus axones hacia la corteza del hemisferio contralateral a través del cuerpo calloso (conectividad cortico-cortical). Finalmente, las escasas neuronas ubicadas en las capas I y IV generan conectividad intracortical en el mismo hemisferio (Mérot y cols., 2009).

En la pared dorsal del telencéfalo se encuentran los 2 tipos de progenitores de las neuronas de proyección: los progenitores apicales o glías radiales que se ubican en la VZ, y los progenitores basales o intermedios residentes en la SVZ. Se han descrito tres clases de divisiones de los progenitores:

a) divisiones simétricas: que generan 2 nuevos progenitores apicales y amplían la población de éstos,

- b) divisiones asimétricas: que generan una neurona y un nuevo progenitor,
- c) divisiones simétricas terminales: que generan dos neuronas

Los progenitores apicales contribuyen a la generación de neuronas principalmente por divisiones asimétricas, pero los progenitores basales se dividen de forma simétrica terminal y sólo generan neuronas (Noctor y cols., 2004).

Asimismo, se han caracterizado dos tipos principales de locomoción responsable de la migración desde el ventrículo a la capa pial: por una parte la translocación somal, característica de las primeras neuronas, las cuales extienden un proceso líder que se contacta con la pía (que en esta etapa está cerca del ventrículo), y este mismo proceso tracciona al soma; y la locomoción, ocupada por las neuronas generadas en etapas más tardías, donde la célula se adhiere al proceso líder del progenitor apical (el cual está en contacto con la pía y el ventrículo) y se tracciona a si misma viajando a través de esta fibra (Noctor y cols., 2004; Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009).

1.2 Factores moleculares implicados en la neurogénesis

Molecularmente, el telencéfalo comienza a diferenciarse cuando desde la cresta neural anterior se comienza a expresar el Factor de Crecimiento de Fibroblastos FGF8, que activa la expresión de FoxG1, un factor de transcripción que se expresa en todo lo que será el telencéfalo. La zona dorsal (pial) comienza a expresar el factor de transcripción Gli3 y las Neurogeninas 1/2 (Ngn 1/2). Gli3 es inhibido en la zona ventral del telencéfalo por el factor difusible Shh, el cual controla el correcto posicionamiento del límite dorsoventral. Así, en la zona ventral se comienzan a expresar los factores de transcripción *Mash* y *Hash* y en dorsal se mantiene la expresión de Ngn 1/2 (Hèbert y Fishel, 2008; Monuki y Walsh, 2001).

FoxG1 modula positivamente la expresión de Fgf8, lo que permite mantener las porciones ventral y dorsal del telencéfalo, e incluso, Shh (el factor que controla la expresión ventral de Gli3) parece estimular la expresión de diversos FGFs. Así se forma una retroalimentación entre todos estos factores: FoxG1 estimula la secreción de FGFs que, con la ayuda de Shh que inhibe la acción

dorsalizante de Gli3, desarrollan el telencéfalo ventral (Hèbert y Fishel, 2008). Además, la expresión de Lhx2 define la futura zona ventricular del telencéfalo dorsal (Monuki y Walsh, 2001).

Por su parte, el factor de transcripción Pax6 se expresa desde la zona dorsal y es inhibido hacia ventral concomitantemente con la expresión, de ventral a dorsal, del factor Nkx2.1, justo antes de que comience la neurogénesis. Hacia E9.5, el factor Gsh2 demarca la separación entre la zona palial y subpalial (Hèbert y Fishel, 2008). El tamaño de la corteza dorsal está definido tanto por la gradiente de Pax6 (de anterior a posterior), como por la de Emx2 (de posterior a anterior). Las zonas controladas por Emx2 darán lugar a las estructuras posteriores de la corteza: hipocampo y corteza visual, mientras que la región de mayor expresión de Pax6 corresponderán principalmente a la corteza motora (Monuki y Walsh, 2001).

Como se ve, la generación de la corteza cerebral es un proceso altamente coordinado dependiente de la correcta expresión temporal y espacial de factores de transcripción, proteínas difusibles, cascadas de transducción de señal, etc. Si bien la mayoría de los estudios describen factores transcripcionales implicados en el desarrollo cortical, hay otros procesos que son fundamentales y se han comenzado a estudiar en el último tiempo. Entre ellos está el tiempo de salida del ciclo proloferativo (Caviness y cols., 2009), el ensamblaje de la maquinaria citoesquelética (fundamental para la migración radial) (Caviness y cols., 2008; Creppe y cols., 2009) y la maquinaria de regulación post-transcripcional (Kawase-Koga y cols., 2009). Esta última función ha sido muy poco estudiada en el desarrollo cortical y constituye el eje central de la investigación de esta memoria, y se detalla a continuación.

1.3 Control post-transcripcional mediado por RNAs pequeños: los microRNAs

El descubrimiento de pequeñas secuencias de ácidos ribonucleicos (RNA) que pueden modular la expresión proteica durante el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, fue la primera evidencia de la existencia de un sistema de control de la expresión proteica dependiente de RNAs (Lee y cols., 1993).

No sería hasta 7 años más tarde que el descubrimiento de un segundo RNA pequeño con propiedades similares al anterior, pero además conservado filogenéticamente (lo que descartaba la posibilidad que este mecanismo fuera particular de *C. elegans*), llamó poderosamente la atención de los investigadores, que comenzaron a describir el sistema de regulación post-transcripcional mediado por estos RNAs.

Al día de hoy son cientos los microRNAs (también llamados miRNAs o miR-s) descritos y activamente estudiados en procesos como la diferenciación, proliferación, muerte celular, control metabólico, etc (Siomi y Siomi, 2010; Kim y cols., 2009). Su desregulación se ha relacionado con enfermedades como el cáncer o con el mal funcionamiento celular, por ejemplo, de las sinapsis neuronales (Croce 2009; Schratt, 2009).

En general los RNAs pequeños de la familia de los miRNA se caracterizan por estar codificados en *loci* específicos dentro del genoma de la mayoría de los metazoos, plantas y eucariotas unicelulares, y ser altamente conservados. Su forma madura se compone de una hebra simple de RNA de entre 21 a 23 nucleótidos de extensión, que regula la expresión génica mediante el apareamiento de bases con la región no traducida 3' (3' UTR) de los mRNA blanco. Un mismo miRNA tiene la capacidad de controlar cientos de RNA mensajeros (Siomi y Siomi, 2010; Kim y cols., 2009; Winter y cols., 2009).

Se ha visto que existe una pequeña región del miRNA que es fundamental para que ocurra el apareamiento con el mensajero, llamada secuencia semilla (“seed sequence”), de entre 7 a 8 nucleótidos. A mayor complementariedad de la región 3' UTR del mensajero con la secuencia semilla del miRNA, mayor es la eficiencia de la inhibición y comúnmente esta cursa con desestabilización del mRNA, la cual es mediada por la acción de Argonauta-2 (Ago2), una proteína que ensambla el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, el detalle de la biogénesis y funcionamiento se detalla a continuación). Además, la complementariedad de bases cercanas a la secuencia semilla puede determinar la eficiencia de la inhibición del miRNA. En el caso de que la complementariedad con la secuencia semilla no sea perfecta, el complejo RISC en vez de desestabilizar el mRNA, sólo genera un retraso en la traducción.

Si bien se han realizado numerosos esfuerzos por predecir la capacidad reguladora de los miRNAs mediante programas bioinformáticos que alinean la secuencia del miRNA maduro con las secuencias 3' UTR de los genes de diversos organismos, aún no se ha diseñado un algoritmo capaz de predecir con total éxito el comportamiento de éstos en su contexto biológico (Bartel, 2009; Guo y cols., 2010).

1.3.a. Biogénesis de los miRNA:

Casi todos los miRNA definidos a la fecha comparten una vía de biogénesis altamente definida y regulada. Las secuencias de los miRNA en el genoma pueden provenir desde genes individuales y estar bajo el control de mecanismos de control transcripcional clásicos (*enhancers*, represores), así como de las RNA polimerasas II y III (RNAP). Es común encontrar parálogos de varios miRNAs dentro del genoma de mamíferos, producto de duplicaciones genéticas. Además, cerca de la mitad de los miRNAs se encuentran agrupados en *clusters* que se transcriben como unidades policistrónicas de transcripción. Los transcritos primarios generados por la RNAP (pri-miRNA) comúnmente están poliadenilados y pueden contener estructuras de horquilla a lo largo del transcrito.

Dentro del núcleo, el complejo entre la RNasa tipo III Drosha y su cofactor DGCR8 procesa los pri-miRNAs cortando la base de la estructura de modo de mantener una cola de ~11 bases desde el final de la horquilla, conservando así la estructura secundaria. El producto de este procesamiento se conoce como pre-miRNA (precursor del miRNA), que está listo para ser exportado al citoplasma.

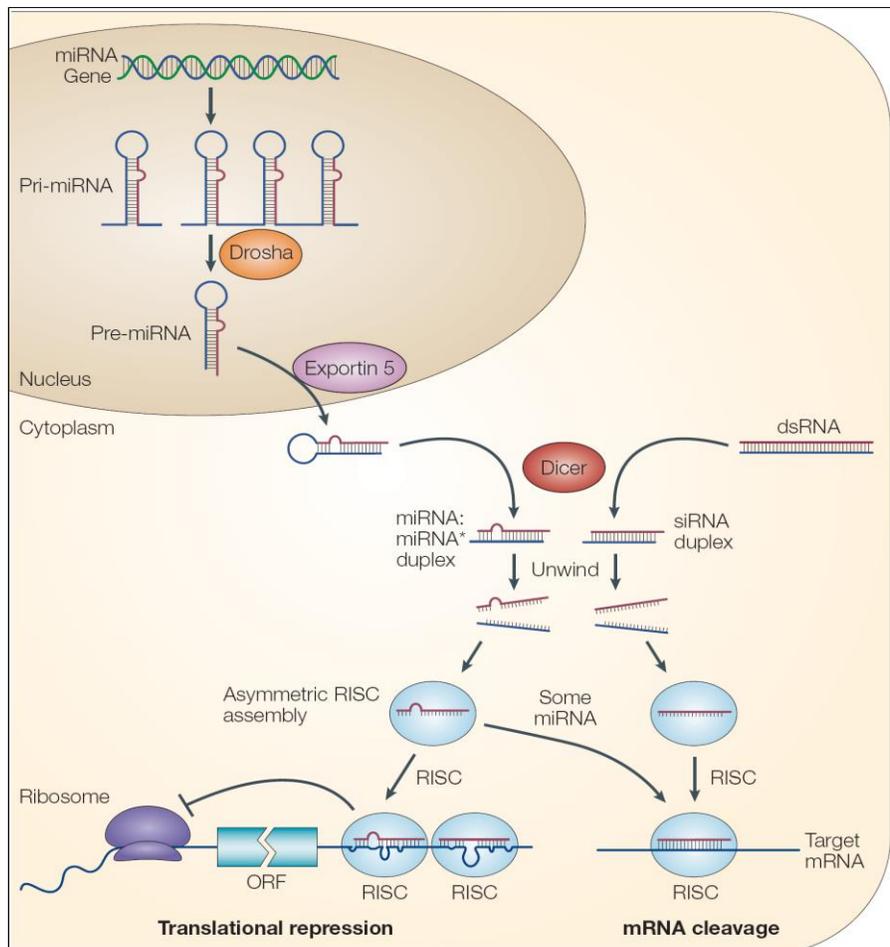


Figura 3. Biogénesis de los miRNA. El gen del miRNA se transcribe como pri-miRNA y luego es procesado por Drosha que produce un pre-miRNA, el cual es exportado hacia el citoplasma. Una vez allí Dicer genera el miRNA maduro el cual es cargado en el complejo RISC donde, según la complementariedad con su mRNA blanco podrá reprimir la traducción o degradar el mensajero. A la derecha la Figura indica además la ruta de procesamiento de un RNA exógeno de doble hebra (un sistema artificial de inhibición de la expresión proteica) conocido como interferente pequeño de RNA (siRNA), el cual utiliza la misma maquinaria de los miRNA para generar la interferencia. Tomado de He y Hannon, 2004.

Existe un grupo de miRNAs cuya biogénesis no depende del microprocesador Drosha-DGCR8, conocidos como miRtrones, que se encuentran en moscas y mamíferos, y que derivan de intrones de genes codificantes de proteínas que han sido escindidos en el proceso de corte y empalme que ocurre normalmente en los núcleos de estas especies. Estos miRtrones adquieren una estructura secundaria en forma de lazo, y tras un proceso enzimático específico se acoplan a la biogénesis de miRNAs como

pre-miRNAs.

El pre-miRNA se asocia a proteínas de exportación nuclear de la familia exportina-5, que en conjunto con Ran y la hidrólisis de GTP liberan el pre-miRNA al citoplasma, donde es cortado por la proteína Dicer, la cual genera el miRNA maduro de 22 nucleótidos a partir de las hebras de la horquilla generada por Drosha. En general, sólo una hebra es cargada al complejo silenciador inducido por RNA (RISC), que es aquella menos estable en su extremo 5'. En algunos casos, sin embargo este procesamiento mantiene las dos hebras (como en el caso del miR-9/9*), pero en general, es sólo una la que se mantiene, mientras el resto de la estructura es degradada. En este momento el miRNA está maduro y comenzará a ejercer su acción biológica.

Dicer cargada con el microRNA se une luego a la proteína Argonau2 (en mamíferos), y forman el complejo RISC (junto a TRBP y otras proteínas), el cual es el encargado de promover el reconocimiento de los mRNA blanco del sistema y generar la degradación del mensajero o el bloqueo de la traducción (Winter y cols., 2009; Kim y cols., 2009; Siomi y Siomi, 2010; Ghildiyal y Zamore, 2009; Bartel, 2009).

1.3.b. Función de los microRNA:

Si bien los primeros miRNA se encontraron en el contexto del desarrollo de *C. elegans* (Lee y cols., 1993), tras la expansión de su estudio en casi todos los campos de la biología y la fisiología (animal, vegetal y fúngico), se ha visto que se conservan a lo largo de la evolución de las especies e incluso, se ha correlacionado la complejidad de éstas con la cantidad de miRNAs que se expresan en ellas, obteniendo una relación lineal: a mayor complejidad, mayor es la diversidad de miRNAs expresados. Esta correlación es aún estudiada por la biología evolutiva del desarrollo (conocida como "evo-devo"), ya que los miRNA corresponden a un capítulo del desarrollo de las especies que no está explicitado simplemente en la lectura del código genético (Kosik, 2009).

Pero además de ser fuente de estudio para los evolucionistas, los miRNA se han propuesto como un mecanismo evolutivo que permite amortiguar los cambios azarosos del medio mediante el fortalecimiento de los fenotipos celulares. Este efecto se logra observando que los cientos de blancos que un miRNA puede reprimir corresponden a mRNAs de proteínas que deben estar silenciadas en un

contexto celular determinado. Así, por ejemplo, una célula madre tiene un patrón de expresión proteico distinto de una célula diferenciada, el cual debe mantenerse para que esa diferenciación perdure en el tiempo. La capacidad de expresar dicho patrón depende de los factores genéticos y epigenéticos que controlan la transcripción, pero también de estos pequeños RNA que inhiben mensajeros en forma post-transcripcional, introduciendo, con ello, un nuevo elemento regulatorio que permite fortalecer el fenotipo. Esto es especialmente valorable en los casos en que una misma proteína posee isoformas que se expresan en tipos celulares distintos y cuya modificación ocurre a nivel del *splicing* alternativo (corte y empalme, detallado más adelante) (Hornstein y Shomron, 2006; Makeyev y Maniatis, 2008; Kosik, 2009).

La capacidad de las células embrionarias de mantener su potencial pluripotencial también depende, en parte, del aporte en la regulación post-transcripcional de los miRNA, así como de la salida del estado pluripotencial hacia la diferenciación (Krichevsky y cols., 2005, Zhao y cols., 2009). Incluso se ha descrito un enriquecimiento específico del miR-302 en células madre de ratones macho pero no en aquellas provenientes de ratones hembra (Ciaudo y cols., 2009). Con todo, queda de manifiesto que los miRNA participan de la diferenciación celular y que también son parte de la especificación sexual de las especies.

También se ha visto su participación en eventos fisiológicos de las células diferenciadas. Se ha descrito un circuito de retroalimentación negativa entre el miR-133b y el factor de transcripción Pitx3 en neuronas dopaminérgicas, es decir, el miR-133b controla la traducción de Pitx3, el cual a su vez, promueve la transcripción de éste. Además del control sobre la expresión génica, el miR-133b es capaz de regular la liberación de dopamina inducida por la despolarización por potasio (Kim y cols., 2007). Por su parte, el miR-134 es capaz de controlar la dendritogénesis dependiente de actividad, regulada por la proteína Pum2. Esto, porque el factor Mef2 promueve la transcripción del cluster del miR-379-410, en donde se encuentra el gen del miR-134, que regula la traducción de Pum2 y con ello la dendritogénesis dependiente de la actividad neuronal (Fiore y cols., 2009).

El mismo miR-134, en compañía del miR-183 estaría implicado en la regulación de la proteína SC35, que controla el *splicing* alternativo de la acetilcolinesterasa (AChE), que modifica la

neurotransmisión colinérgica en respuesta al estrés en la amígdala cerebral y el hipocampo. Ambos miRNAs aumentan su expresión en ratas sometidas a estrés crónico, lo que a su vez genera (en células en cultivo) una disminución de la expresión de SC35, controlando la respuesta de la AchE, y al estrés (Meerson y cols., 2009).

Una parte importante de los estudios de los miRNA se centran en su papel en patologías como el cáncer. Se ha descrito que el miR-15a y el miR-16-1 muestran una expresión menor a la normal en la leucemia linfocítica crónica. Se ha visto que los miRNAs tienen la capacidad de tanto de regular la expresión de oncogenes, como de promover eventos oncogénicos. En ambos casos la desregulación de las proteínas relacionadas con el control del ciclo celular explicaría esta asociación (Croce, 2009). Así, mientras los niveles normales de expresión de los miRNA permiten el correcto desarrollo y funcionamiento de las células, su alteración puede generar patologías como el cáncer.

1.4 Sistema Nervioso y miR-124a

El desarrollo del SNC ha sido un activo campo de estudio de los miRNA en los últimos años. Las aproximaciones más generales se han hecho con ratones que no expresan la proteína Dicer (*Dicer^{-/-}*), lo que permitió tener una visión global del papel de éstos durante el desarrollo cortical. Los resultados mostraron una diferenciación neuronal anormal que conlleva a una incorrecta laminación de la corteza adulta, y un adelgazamiento de la pared cortical debida a un aumento de la apoptosis de los progenitores y una menor producción de neuronas (De Pietri Tonelli y cols., 2008; Kawase-Koga, 2009).

Se han caracterizado los miRNAs presentes en el cerebro desde el desarrollo a la adultez, siendo el miR-124a el más abundante en modelo murino. Este miRNA comienza a expresarse en E12.5 y luego mantiene una expresión estable durante el resto de la vida del ratón. Además, se ha visto que su expresión se restringe al cerebro (Lagos-Quintana y cols., 2002; Krichevsky y cols., 2003) y solamente a neuronas, manteniéndose ausente en astrocitos (Smirnova y cols., 2005).

Cuando el miR-124a se transfecta en células HeLa se genera un cambio del transcriptoma,

disminuyendo selectivamente la expresión de proteínas no neuronales, promoviendo así un mimetismo con el transcriptoma neuronal (Lim y cols., 2005). Con todo, parece clara la posibilidad que este miRNA participe de alguna etapa de la neurogénesis, al menos *in vitro*.

En vertebrados se ha descrito 3 copias del gen del miR-124a y todas ellas son controladas por el represor transcripcional REST/NRSF. En *D. melanogaster* y en *C. elegans* sólo se encuentra una copia de este gen, que conserva la secuencia semilla, pero tiene algunas modificaciones en el pri-miRNAs (Conaco y cols., 2006). En nuestro laboratorio se ha estudiado el papel neurogénico del complejo REST/NRSF en *Xenopus laevis*, y actualmente se estudia su papel en la histogénesis cortical de ratón. Los resultados en *Xenopus* indican que la pérdida de función de REST (usando dominantes negativos) genera un desarrollo anormal de los embriones, mientras que en ratones, la pérdida de función de CoREST (Corepresor de REST, que participa en el ensamblaje del complejo) genera defectos importantes en la migración radial en la corteza (Olguín y cols., 2006; Fuentes P. y Kukuljan M., comunicación personal).

El miR-124a es incapaz, por sí solo, de generar diferenciación celular. Esto fue medido en células de carcinoma embrionario P19, las cuales comúnmente se diferencian a formas celulares tipo neuronas cuando se estimulan con ácido retinoico o expresan factores de transcripción de la familia bHLH. Esto sugiere que el aumento en la expresión del miR-124a es una consecuencia de la diferenciación y no su causa (Yu y cols., 2008). Sin embargo, en un estudio en progenitores de la SVZ de ratones adultos (un nicho neurogénico en el adulto), la diferenciación celular puede ser estimulada por la sobre-expresión del miR-124a. Aún así, es muy difícil que el miR-124a pueda, por sí solo, controlar la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal, pues todo indica que actúa como un colaborador de este proceso, ayudando a silenciar, por ejemplo, la traducción de Sox9, un factor responsable de mantener las células madre en el SVZ (Cheng y cols., 2009).

En el caso de la pérdida de función del miR-124a en células en cultivo, se ha visto que se genera un retraso en la neurogénesis y que aumentan los niveles de varios blancos conocidos, sin que se pierdan las características neuronales (Yu y cols., 2008; Conaco y cols., 2006). Alternativamente,

cuando se estudian los progenitores de la SVZ, la pérdida de función del miR-124a genera una disminución de neuronas post-mitóticas y un aumento de progenitores que se mantienen en el ciclo celular (Cheng y cols., 2009).

Se ha visto que el miR-132 (otro miRNA presente en el cerebro) es capaz de inducir la morfogénesis neuronal en células en cultivo. Esto se ha asociado a la respuesta celular a neurotrofinas, y en el caso particular del miR-132, se ha definido que el efecto morfológico es responsabilidad de una GTPasa activadora llamada p250GAP (Vo y cols., 2005). Para el miR-124a sin embargo, no se ha definido su papel en la morfogénesis *in vitro*.

En términos funcionales, los estudios en tubo neural de pollo han sido los más completos y descriptivos, pero con resultados confusos. El trabajo de Visvanathan y cols. (2007) indica que la sobre-expresión del miR-124a facilita la neurogénesis a través de la inhibición de SCP1, una proteína del complejo de silenciamiento neuronal REST/NRSF. Sin embargo, en un estudio similar, Cao y cols. (2007) no describen cambios importantes en la neurogénesis al variar los niveles del miR-124a. Por el contrario, indican que los mRNA de Integrina-b1 y Laminina-C1 son blancos del miR-124a y la sobre-expresión de éste genera defectos en la lámina basal, producto de la disminución de la expresión de estas proteínas. Una explicación posible de estos resultados es la herramienta usada para generar la pérdida de función del miR-124a: mientras Visvanathan y cols. utilizaron 2-O-Me RNA, Cao y cols. usaron un ácido nucleico bloqueado (LNA). Ambas herramientas se unen a la secuencia madura del miR-124a y le impiden asociarse al complejo RISC, pero como se ve en estos trabajos, no necesariamente tienen los mismos efectos *in vivo*. Para superar este inconveniente, en el laboratorio se diseñaron pequeños RNAs interferentes en horquilla contra el pre-miR-124a (sh-miR-124a), que al estar codificados en plasmidios, permiten su uso tanto *in vitro* como *in vivo*. El nivel de interferencia de este sh-miR-124a fue de un ~ 50% medido por q-RTPCR sobre cultivos de neuronas corticales transducidas con lentivirus portadores del sh-miR-124a (Berndt A. y Kukuljan M., comunicación personal).

Una de las cosas más interesantes en los estudios del miR-124a es la amplia gama de proteínas

que controla. Desde factores de transcripción como Sox9, hasta ribonucleoproteínas como dFMR1. Esta última es muy interesante porque es una proteína asociada a RNAs, que posiblemente está implicada en la biogénesis del miR-124a y su ausencia genera el síndrome de X-frágil, una patología hereditaria muy frecuente que causa retardo mental (Xu y cols., 2008).

Además, se han descrito proteínas relacionadas con el *splicing* alternativo, que también son reguladas por el miR-124a, como PTBP1, un represor del *splicing* en células no neuronales, que a su vez, evita el correcto empalme del exón 2 de PTBP2, un facilitador del *splicing* en células neuronales. Durante la diferenciación neuronal, el miR-124a regula la traducción de PTBP1 disminuyendo sus niveles y permitiendo el empalme correcto de los exones de PTBP2, y por ende, su acción pro-neuronal (Makeyev y cols., 2007).

Un aspecto que aún no está determinado es si el miR-124a participa del proceso de neurogénesis *in vivo*. Una aproximación fue desarrollada en el nicho neurogénico de la corteza adulta donde se generan las neuronas que migran hacia el bulbo olfatorio. En este estudio se vio que el miR-124a era capaz de promover la generación de neuroblastos a través de la regulación de Sox9 (Cheng y cols., 2009). Sin embargo el estudio de su papel en la histogénesis cortical no ha sido completamente dilucidado. Los datos experimentales mostrados aquí sugieren que el miR-124a podría facilitar el proceso y ser parte activa de él, sin embargo, otra opción es que su expresión sea producto del proceso neurogénico y que el miR-124a colabore a controlar transcritos que dejan de expresarse en la transición entre progenitores y neuronas.

Esta última visión es apoyada por dos trabajos muy recientes: el primero, en el cual se sobre-expresa el miR-124a en cultivos organotípicos de cortes de corteza en desarrollo y donde se identifica la proteína de membrana Ephrin-B1 como un nuevo blanco del miR-124a y donde no se evidencian alteraciones de la migración neuronal (aunque los autores no estudian en detalle este aspecto) (Arvanitis y cols, 2010). El otro trabajo, desarrollado en corteza cerebral, indica que la sobreexpresión del miR-124a es capaz de promover la generación de progenitores basales a partir de progenitores apicales, posiblemente a través del aumento de las divisiones asimétricas (Maiorano y Mallamaci,

2009).

Por los motivos descritos se hace necesaria la descripción del papel del miR-124a en el establecimiento del fenotipo neuronal *in vivo*, y de sus posibles implicancias morfológicas *in vitro*, para caracterizar la función del miRNA más abundante del cerebro

2. HIPÓTESIS

La diferenciación celular y morfológica de las neuronas piramidales de la corteza cerebral requiere de la expresión del miR-124a.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de la manipulación ectópica del miR-124a durante el desarrollo de la corteza *in vivo* y en la morfología de las neuronas en cultivo.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Transducir los vectores de pérdida y ganancia de función mediante lentivirus en neuronas corticales y evaluar los cambios morfológicos asociados a variaciones de los niveles del miR-124a
- Electroporar los vectores de pérdida y ganancia de función en la corteza en desarrollo y analizar los efectos sobre la migración y el establecimiento de las neuronas en la placa cortical.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos e insumos

Las sales NaCl, KCl, Na₂HPO₄, K₂HPO₄, BSA (Albúmina de suero bovino), la agarosa de bajo punto de fusión y el detergente Nonidet-P40 se obtuvieron de Winkler Ltda. Santiago, Chile. El *p*-formaldehído se obtuvo en Merck, Darmstadt, Alemania.

El HBSS, suero de caballo, ácido pirúvico, neurobasal, B27, fungizona, los antibióticos Penicilina/esptreptomicina y la tripsina 1X se obtuvieron de Gibco, Invitrogen, Carlsbad CA, EE.UU. La glucosa 45%, la L-poli-Lisina, las sales de glutamina, NaN₃ y HEPES, el detergente Tritón-X100 se obtuvieron de Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EE.UU. La sacarosa se obtuvo de Fluka Biochemika, Atenas, Grecia. El suero fetal bovino (SFB) se obtuvo de Hyclone, parte de Thermo Scientific, Waltham MA, EE.UU. El suero de burro se obtuvo de Millipore, Billerica MA, EE.UU.

El Vectashield se obtuvo de Vector Labs., Burlingame CA, EE.UU. El isofluorano de Baxter, Deerfield IL, EE.UU. FastGreen fue obtenido de Fisher Biotech, parte de ThermoFischer Scientific, Waltham MA, EE.UU.

El DNA utilizado tanto en las electroporaciones *in utero*, como en las transfecciones para preparar lentivirus se purificó con un sistema comercial Endo-Free Maxi Prep Qiagen, Valencia CA, EE.UU.

Los anticuerpos se obtuvieron de Chemicon, Millipore, Billerica MA, EE.UU., (anti-DCX, anti-Tau-1 y anti-Tuj1), de Abcam, Cambridge, Reino Unido (anti-Tbr2) y de Jackson Immunoresearch, West Grove PA, EE.UU. (anticuerpos secundarios conjugados a Cy3 y Cy5). La tinción nuclear se realizó con Hoechst 33342 (Pierce, Thermo Scientific, Waltham MA, EE.UU.)

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa CF-1 para todos los experimentos.

5.2 Soluciones:

| | | |
|---------|----------------------------------|--------|
| PBS 1X. | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 10 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 2 mM |
| | pH = 7,3 | |

| | | |
|---------------------|-------------------|-------|
| Medio de disección. | HBSS 10X | 10 mL |
| | HEPES 1M | 1 mL |
| | dH ₂ O | 89 mL |

| | | |
|--------------------|-----------------------|---------|
| Medio de adhesión. | MEM | 100 mL |
| | Suero de caballo | 10 mL |
| | Glucosa 45% | 1,32 mL |
| | Ácido pirúvico 100 mM | 1 mL |

| | | |
|-------------------------|---------------------------|---------|
| Medio de mantenimiento. | Neurobasal | 48 mL |
| | Glucosa 45% | 0,66 mL |
| | Penicilina/estreptomicina | 0,5 mL |
| | Fungizona | 0,5 mL |
| | B27 | 1 mL |
| Glutamina 200 mM | 0,5 mL | |

| | | |
|----------|----------------------------------|--------|
| HeBS 2X. | NaCl | 280 mM |
| | HEPES | 50 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 1,5 mM |
| | pH = 7,00 | |

| | | |
|-----------------|--------|-------------|
| Solución de IF. | BSA | 0,1 gr |
| | PBS 1X | c.s.p 20 mL |

| | | |
|----------------------|--------------------|------|
| Solución de bloqueo. | Suero fetal bovino | 10% |
| | Solución IF | c.s. |

| | | |
|-------------------------------|-----------------|--------------|
| Solución de permeabilización. | Nonidet-P40 10% | 0,5 mL |
| | Solución IF | c.s.p. 10 mL |

| | | |
|--|----------------|-------|
| Solución de Bloqueo/Permeabilización IHQ (solución B/P). | Tritón X-100 | 0,3 % |
| | Suero de burro | 2,5% |
| | PBS 1X | c.s. |

5.3 Cultivo primario

Para generar el cultivo primario de neuronas corticales se decapitaron embriones de 15 días de gestación (E15.5), los cuales fueron retirados directamente del saco embrionario una vez que la madre fue sacrificada por sobredosis de anestésico (Isoflorano). Durante todo el procedimiento de extracción del tejido las cortezas se mantuvieron en medio de disección frío, para evitar el deterioro de las células. Una vez obtenidas las cortezas, éstas se digirieron enzimáticamente con tripsina 1X, 15 minutos a 37°C.

Luego el tejido fue disgregado mecánicamente con pipetas pasteur de vidrio. Las células se contaron en una cámara de Neubauer teñidas con azul de tripán 0,025% y se sembraron en placas de 60 mm con 6 a 8 cubreobjetos previamente cubiertos con L-poli-lisina, en una placa con medio de adhesión. Las células se mantuvieron durante 2-4 horas en dicho medio y luego los cubreobjetos se depositaron en una placa de 24 pocillos, cubriéndolos con 500 µL de medio de mantenimiento (Figura 4).

Se sembraron 1 millón de células por placa de 60 mm (así hay unas 200.000 células por cubreobjetos) y cada cubreobjetos se depositó en un pocillo de una placa de 24 pocillos, sumergido en 500 μ L de medio de mantenimiento. Se considera que con este volumen de medio la duración del cultivo se hace casi exclusivamente dependiente de la densidad de células sembradas. Dado que la intención del estudio es abordar las características morfológicas de las neuronas, éstas se sembraron en una baja densidad, que permitiese apreciarlas en forma discreta, evitando que los procesos de una neurona se cruzaran o conectaran con la de la neurona vecina.

Así, el cultivo nunca sobrepasó los 7 días y los estudios se hicieron a los 3 y 5 días *in vitro* post-tratamiento lentiviral (esquema experimental en Figura 4).

Todos los procedimientos para la generación del cultivo primario contaron con la aprobación del comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

5.4 Material genético

El material genético usado para generar tanto la pérdida como ganancia de función fue clonado en el laboratorio como producto de la memoria de título de A. Berndt. El vector de pérdida de función es un sh-miR-124a dirigido contra el pre-miR-124a insertado en un vector de expresión pFUX-H1 que posee un promotor H1 de polimerasa III y una secuencia IRES entre la zona de inserción y la secuencia de eGFP.

La secuencia del shRNA es:

5' – GGCACGCGGUGAAUGCCAAUUCAAGAGA**UUGGCAUUCACCGGUGCCUU** – 3'.

Las bases en negrita indican la secuencia del interferente mismo y las subrayadas indican la horquilla. Este vector fue diseñado para reprimir a las tres copias del miR-124a.

El vector de sobre-expresión se clonó a partir del miR-124a-3 de *Mus musculus*, y también se

insertó en pFUX-H1 lo que permitió desarrollar los lentivirus. En este caso, se clonó utilizando los siguientes partidores:

Forward: 5' – GAAGCTGGAGCATTCGCGC – 3'

Reverse: 5' – AAAAAACCTTCTCGTGACGTCCTAGG – 3'

Con ellos se amplificó una secuencia de 400 pares de bases en el cromosoma 2 correspondiente al locus del miR-124a.

El control corresponde a un sh-RNA con secuencia aleatoria, con un tamaño idéntico al usado para el sh-miR-124a.

En todos los casos el DNA se purificó desde colonias bacterianas transformadas con el método del cloruro de calcio y golpe térmico (“heat shock”) que permite la apertura transiente de la pared bacetriana y la entrada del plasmidio.

5.5 Infección y transfección del DNA

Dado que las neuronas corticales son muy difíciles de transfectar con los sistemas tradicionales (fosfato de calcio, lipofectamina), se acudió a la transducción con agentes lentivirales portadores de las secuencias de interés (sección 5.3), que son capaces de transducir células que no están en división (a diferencia de otros retrovirus). Tienen como desventaja el hecho de que demoran al menos 2 días en retrotranscribir la información codificada y comenzar a expresar las secuencias de interés, por lo que las neuronas corticales se infectaron inmediatamente después que se sembraron. La multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) fue de 3-4 partículas virales/célula. A los dos días se comprobó la eficiencia de la infección mediante visualización de células GFP⁺ en microscopio invertido de fluorescencia.

5.6 Generación de vectores lentivirales

Los lentivirus usados para infectar cultivo primario se desarrollaron en el laboratorio siguiendo el protocolo descrito por Sena-Esteves (2004).

El plasmidio que porta el gen de interés, el plasmidio de la envoltura VSV-G (derivado del virus de la estomatitis vesicular), y el plasmidio de empaquetamiento pCMV Δ 8.9 se cotransfectaron en células HEK293T utilizando el método del fosfato de calcio.

Las células HEK293T se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino manteniendo la fase logarítmica de crecimiento.

Una vez transfectadas las células se mantuvieron en cultivo durante tres días, haciendo cambios sucesivos de medio cada día. El último cambio de medio se mantuvo durante 16 horas, tras lo cual se recolectó el medio, se filtró (en filtro con poro de 0,45 μ m) y se concentró por ultracentrifugación a 27.000 rpm en rotor TFF-5038 (Sorvall, Thermo Scientific, Waltham MA, USA) 90 minutos a 4^o C. El precipitado se resuspendió en 100 μ L y se alicuotó para mantener a -80 °C (Sena-Esteves y cols., 2004).

Todos los procedimientos desde primer día post transfección se realizaron en campana de bioseguridad nivel 2.

5.7 Inmunocitoquímica

Tras el tiempo indicado de cultivo cada cubreobjetos con neuronas se fijó con *p*-formaldehído 4% + sacarosa 4%, incubando 10 minutos. Las células se incubaron 10 minutos con solución de permeabilización, y luego 10 minutos más con solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios diluidos en solución IF se incubaron 2 horas y luego de tres lavados de 10 minutos con solución IF, se incubaron los anticuerpos secundarios durante 1 hora. Desde este paso, los cubreobjetos se protegieron de la

luz, para evitar el apagado de los secundarios. Se realizaron otros tres lavados de 10 minutos y se lavó la solución IF con PBS 1X y PBS 0,1X. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjeto con solución de montaje (Vectashield). Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

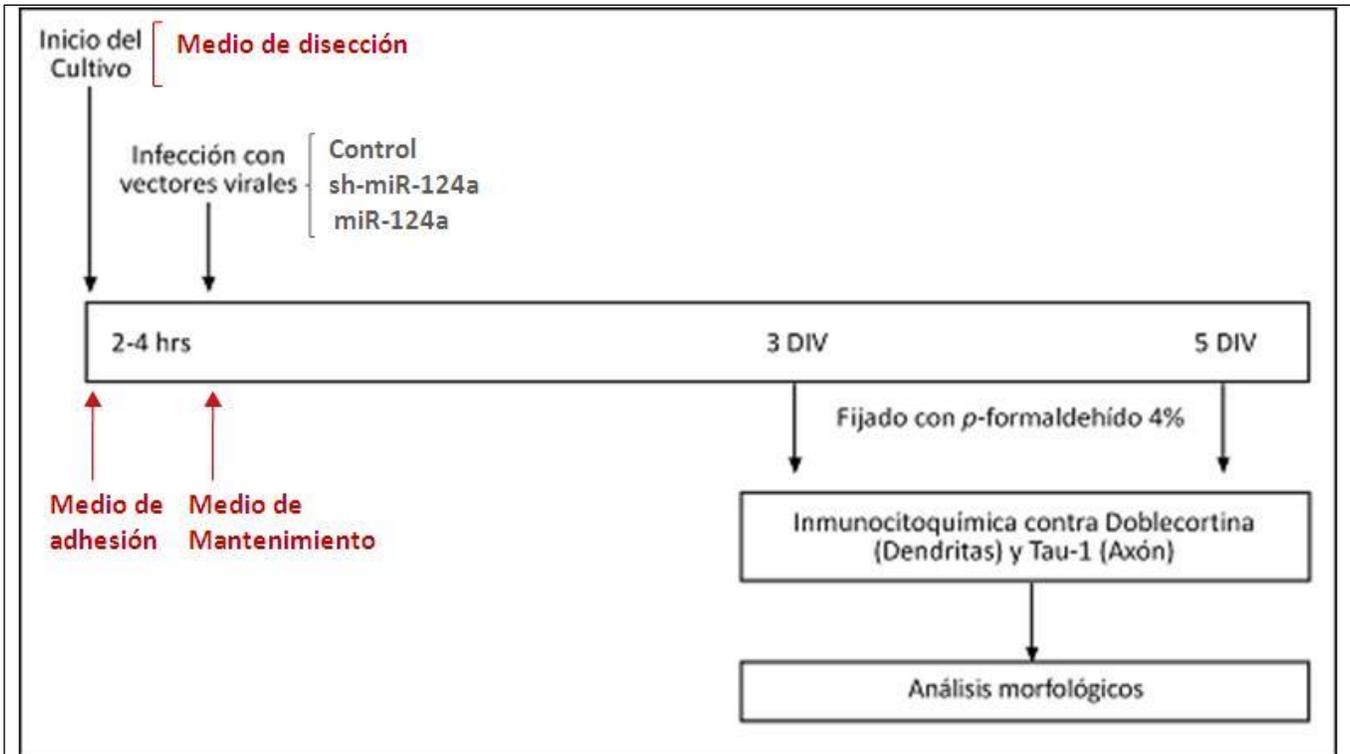


Figura 4. Esquema de la temporalidad de los experimentos de neuronas en cultivo. A las 2-4 horas post inicio del cultivo las células fueron expuestas a los lentivirus portadores de las secuencias Control, sh-miR-124a o miR-124a. A los 3 y 5 DIV (días *in vitro*) las neuronas se fijan en *p*-formaldehído y se realiza inmunocitoquímica contra Doblecortina y Tau-1 y posteriormente los análisis morfológicos indicados en el texto. En rojo se indican los cambios de medio realizados para desarrollar el cultivo.

Tabla 1. Anticuerpos usados en inmunocitoquímica

| | Antígeno | Especie | Tipo | Origen | Conjugado con | Dilución |
|-------------|----------|------------|------------|--------|---------------|----------|
| Primarios | DCX | Ratón/Rata | Monoclonal | Conejo | | 1/500 |
| | Tau-1 | Rata | Monoclonal | Ratón | | 1/250 |
| Secundarios | IgG | Conejo | Policlonal | Burro | Cy3 | 1/500 |
| | IgG | Ratón | Policlonal | Burro | Cy5 | 1/500 |

La inmunocitoquímica doble practicada a las neuronas en cultivo se realizó en forma directa

usando anticuerpos contra doblecortina (DCX), una proteína que participa de la estabilización de los microtúbulos y que se expresa sólo en neuronas (mayormente en dendritas), y Tau-1, proteína asociada al crecimiento axonal. Esto fue posible dado que los anticuerpos primarios provenían de especies distintas (Tabla 1) (esquema experimental en Figura 4).

5.8 Electroporación *in utero*

Para las electroporaciones *in vivo*, se siguió el protocolo de Saito (2008), con pequeñas modificaciones propias del laboratorio.

La ratona se mantuvo con anestesia inhalatoria durante todo el procedimiento (Isoflurano 2,5% + O₂ 2%). Se expusieron los cuernos uterinos y a cada embrión se inyectó 2 µL del DNA teñido con FastGreen 0,01%. Cuando se inyectaron todos, se electroporó el material genético con microelectrodos en forma de pinzas, dirigiendo el DNA hacia la corteza dorsolateral del hemisferio pinchado. Se aplicaron 5 pulsos cuadráticos de 45 volts y 50 ms de duración, con intervalos de 1 segundo entre cada pulso, utilizando un electroporador BioRad GenePulser Xcell™ (Bio-Rad, Hercules CA, EE.UU) (Figura 5).

Finalizada la cirugía, se suturó la cavidad abdominal y la ratona se mantuvo en cámara de recuperación a 37 °C hasta que despertó sin mostrar signos físicos de problemas post operatorios.

Este procedimiento experimental contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

5.9 Perfusión de los embriones

Los embriones en E17.5 se perfundieron con *p*-formaldehído 4% fresco (PFA). Para ello se extrajeron uno a uno y se anestesiaron en hielo durante 10 a 15 minutos. Se exanguinaron con 7 mL de PBS 1X frío usando para ello la circulación mayor del mismo embrión. Luego se perfundió con el

mismo volumen de PFA frío, lentamente. Finalmente el embrión se decapitó y la cabeza se mantuvo toda la noche en PFA 4%.

Al día siguiente se obtuvo el cerebro y se mantuvo en PBS 1X. Se seleccionaron aquellos cerebros con fluorescencia en la corteza dorsolateral, manteniéndolos en PBS 1X + NaN₃ 0,02%.

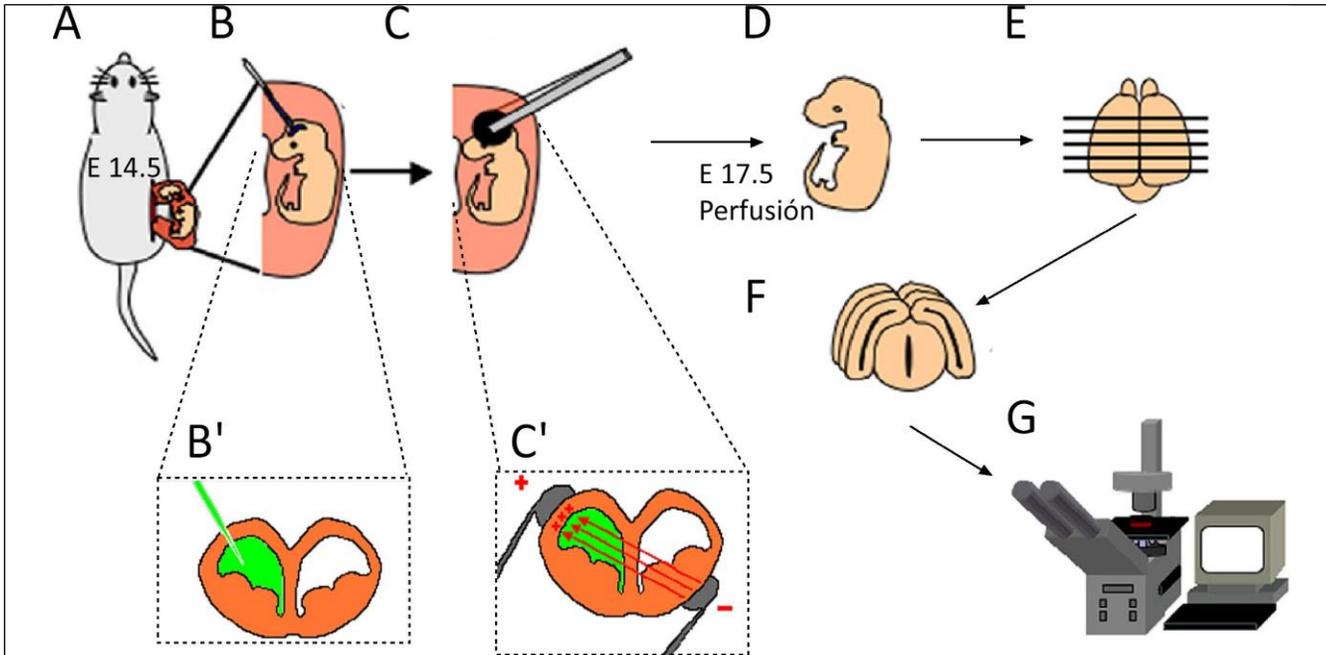


Figura 5. Esquema del experimento de electroporación *in utero*. A Se expone el útero de la madre en el día 14 de gestación. B Cada embrión es pinchado en la corteza, accediendo con el capilar al segundo ventrículo, donde se aplica el DNA (verde en B'). C Luego, cada embrión es electroporado según el protocolo descrito en el texto, y las pinzas-electrodos se orientan de modo de guiar al DNA hacia los progenitores de la pared dorsal del telencéfalo (flechas rojas en C'). D Los embriones se mantienen creciendo hasta E17.5, cuando son sacrificados y perfundidos para el posterior procesamiento de la corteza (E). F Los cerebros se cortan coronalmente (60 μ m) y son visualizados bajo el microscopio con o sin inmunohistoquímica (G).

Para procesar los cerebros éstos se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión al 2% y se cortaron en vibratomo (VT1000S, Leyka Microsystems, Wetzlar, Alemania) con orientación coronal y un espesor de 60 μ m, recolectando los cortes en PBS 1X.

5.10 Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica a aquellos cortes que presentaron fluorescencia dorsolateral para evaluar identidad celular. Dichos cortes se permeabilizaron y bloquearon con solución B/P durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 2) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron 3 veces con solución B/P 5 minutos y se incubaron con los anticuerpos secundarios (Tabla 2) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron 2 veces con solución B/P, se tiñeron los núcleos con Hoechst 1:1000 y se montaron en cubreobjetos con Vectashield (Esquema experimental en Figura 5).

Tabla 2. Anticuerpos usados en inmunocitoquímica

| | Antígeno | Especie | Tipo | Origen | Conjugado con | Dilución |
|-------------|----------|------------|------------|--------|---------------|----------|
| Primarios | Tbr2 | Ratón/Rata | Monoclonal | Conejo | | 1/1000 |
| | Tuj1 | Ratón/Rata | Monoclonal | Ratón | | 1/500 |
| Secundarios | IgG | Conejo | Policlonal | Burro | Cy3 | 1/500 |
| | IgG | Ratón | Policlonal | Burro | Cy5 | 1/500 |

Las imágenes de los cortes se tomaron en un Microscopio Olympus BX61WI Spinning Disc (Olympus, Center Valley PA, EE.UU.), utilizando lentes objetivos de 4X para el análisis de migración neuronal, 40X para el análisis de identidad celular y 60X para el análisis morfológico de las neuronas en cultivo y en la placa cortical. Se usaron los filtros GFP, RFP y Cy5, además del filtro para DAPI (Hoechst), seudocoloreando automáticamente las imágenes con el programa CellR® integrado al microscopio.

Todas las imágenes se analizaron usando el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), utilizando además los *plug-in* existentes en el mismo. El análisis de cada parámetro se detalla a continuación:

5.11.a. Análisis de migración neuronal

Se escogió una región de interés (ROI, por sus siglas en inglés) que abarcara desde el epitelio del ventrículo hasta la zona superior de la pía. El ancho del ROI fue variable de modo de mantener la

misma área, independiente del largo radial del corte. Se mantuvo como criterio para determinar el ancho del ROI, que éste abarcara la mayor cantidad de células GFP⁺. Se identificaron mediante la tinción de núcleos con Hoechst las zonas anatómicas más importantes en este estadio: la VZ-SVZ que es de alta densidad nuclear en el extremo ventricular; la IZ, zona de baja densidad nuclear; y la CP, zona de alta densidad nuclear hacia dorsal. Se contaron las células GFP⁺ en cada zona, usando el *plugin* “Cell Counter”, y se graficó el porcentaje de células GFP⁺ de cada zona sobre el total de células GFP⁺ del ROI. Se compararon los resultados de al menos tres cerebros por cada condición.

5.11.b. Análisis de co-expresión de marcadores

Se adquirieron imágenes con aumento 40X en la VZ-SVZ y en la CP, realizando un barrido en todo el plano Z, con cortes ópticos de 2 μm de espesor, para captar todas las células del corte. Las imágenes se pseudocolorean y se superponen en ImageJ. Se buscaron manualmente células que coexpresaran GFP y el marcador correspondiente, y se graficó el porcentaje de coexpresión sobre el total de células GFP⁺, por zona.

5.11.c. Análisis de morfología celular en la placa cortical

Se buscaron células GFP⁺ en la CP, cuyo cuerpo celular completo no se sobrepusiera al de células vecinas. Se adquirieron las imágenes con alto aumento (60X) y se hizo un barrido por el plano Z de modo de cubrir todo el espesor celular, realizando cortes ópticos de 0,5 μm. Se compararon en forma cualitativa la morfología de al menos tres cerebros distintos por cada condición.

5.11.d. Análisis de Sholl

Se determinó un ROI circular equivalente al perímetro de una neurona patrón. Tomando esta primera región como distancia 0, se trazaron circunferencias a distancias de 10, 15 y 20 micrones de radio concéntricas a la primera, y una quinta circunferencia del doble del área del primera (equivalente a una distancia de 23 μm desde la distancia 0). Usando ImageJ, se situaron todas las circunferencias en el centro de la neurona a analizar y se contó la cantidad de intersecciones provenientes de procesos neuronales por circunferencia. Estos datos se expresaron como intersecciones/distancia, y no se diferenciaron procesos dendríticos de axonales (Sholl, 1953).

5.11.e. Longitud total de dendritas

Para medir la longitud de los procesos dendríticos de las neuronas en cultivo, se utilizó el *plugin* “NeuronJ” de ImageJ que permite trazar semi-automáticamente los procesos y luego medir la longitud de cada trazado (definiendo previamente la relación entre distancia real y pixel de la imagen) y además catalogar los tipos de dendritas trazadas (primarias, secundarias) para facilitar el análisis. La longitud total de dendritas (TDBL, por sus siglas en inglés) corresponde a la suma algebraica de todos los procesos dendríticos, reconocidos por su intensa marca con DCX y débil con Tau1. No se tomaron en cuenta los procesos primarios de longitud menor a 10 μm .

5.11.f. Índice de complejidad dendrítica

Definido por Lom y Cohen-Cory (1999) como:

$$DCI = \left(\frac{\sum \text{Órdenes de ramificación} + \# \text{ Puntas de ramificación}}{\# \text{ Dendritas primarias}} \right) \bullet TDBL$$

Donde los órdenes de ramificación corresponden a la sumatoria de puntos de ramificación que pasan por un proceso y las puntas de ramificación corresponden a todas las dendritas generadas por la célula.

5.11.g. Largo axonal total

De modo similar a lo anterior, el largo axonal total (TAL) se calculó sumando el largo de los trazos etiquetados como axones y que se diferencian en la célula por su alta inmunoreactividad para Tau1 y baja para DCX.

5.12 Análisis estadísticos

La mayoría de las comparaciones estudiadas se hicieron mediante ANOVA de una vía utilizando la prueba de Diferencia Honestamente Significativa de Tukey (HSD-Tukey), utilizando el algoritmo disponible gratuitamente en <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>. Esta prueba se usó para las comparaciones de TDBL, DCI, TAL y la migración en la corteza en desarrollo.

Para comparar los resultados de la curva de Sholl en cambio, se utilizó la prueba T de student, ya que el análisis simultáneo de las curvas control, sh-miR-124a y miR-124a resultaba más complejo que si se comparaba cada tratamiento contra la condición control. También se usó el algoritmo de <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html> para la comparación de estos datos.

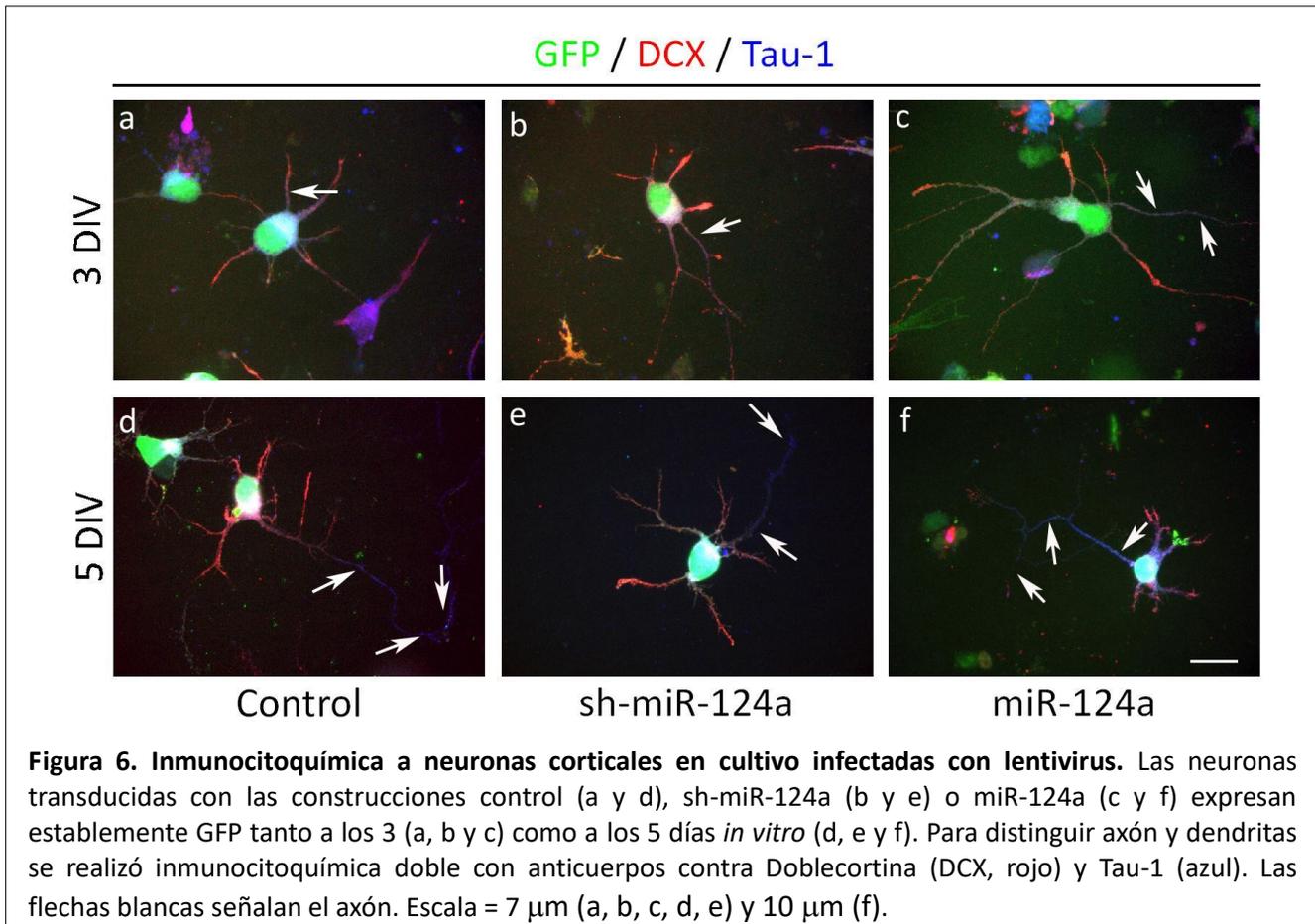
6. RESULTADOS

6.1 Papel del miR-124a *in vitro*:

Para estudiar el efecto morfológico de la variación del nivel del miR-124a en las neuronas se produjeron cultivos primarios que se infectaron con los lentivirus portadores de los plasmidios Control, sh-miR-124a y miR-124a y se mantuvieron durante 3 y 5 días *in vitro* (DIV). Posterior a ello, se realizó la inmunohistoquímica doble contra DCX y Tau-1 para distinguir dendritas de axones. Las neuronas se observaron luego bajo el microscopio y se fotografiaron neuronas discretas que expresan GFP⁺ cuyos procesos abarcaran toda el área de observación, con lentes de aumento 40X (células de 5 DIV mayormente) o 60X (células de 3 DIV y algunas de 5 DIV). Como se ve en la Figura 6, las neuronas expresan estable e intensamente eGFP proveniente de los vectores lentivirales y la marca de la inmunocitoquímica está razonablemente circunscrita a las estructuras esperadas. Las flechas blancas en la Figura 6 indican la proyección axonal donde la marca de Tau-1 es más intensa que la de DCX.

Se midió la longitud de dendritas y axones, la complejidad del árbol dendrítico, y se realizó el análisis de Sholl para determinar el efecto de las variaciones de los niveles del miR-124a sobre la morfología. La Figura 7 muestra los resultados de la medición del largo dendrítico total (TDBL, por las siglas de *Total Dendritic Branch Length*). El gráfico mostrado en la Figura 7A corresponde a neuronas cultivadas 3 DIV y el de la Figura 7B a neuronas cultivadas 5 DIV. Las neuronas infectadas con el lentivirus de sobre-expresión del miR-124a (miR-124a, barra negra) mostraron un aumento en el largo dendrítico a los 3 DIV de un 45% ($218 \pm 8,7 \mu\text{m}$ para la sobre-expresión *versus* $150 \pm 6,7 \mu\text{m}$ para el control. $P < 0,01$. Fig 7A). Aquellas infectadas con el interferente del miR-124a (sh-miR-124a, barra gris) no cambiaron significativamente su longitud ni a los 3 ni a los 5 días respecto al control.

El aumento observado con la infección del vector de sobre-expresión en el TDBL a los 3 DIV no se mantuvo a los 5 DIV, igualándose con los niveles del control (Figura 7B). Asimismo, el grupo infectado con el sh-miR-124a tuvo un alza del TDBL en concordancia con el control.

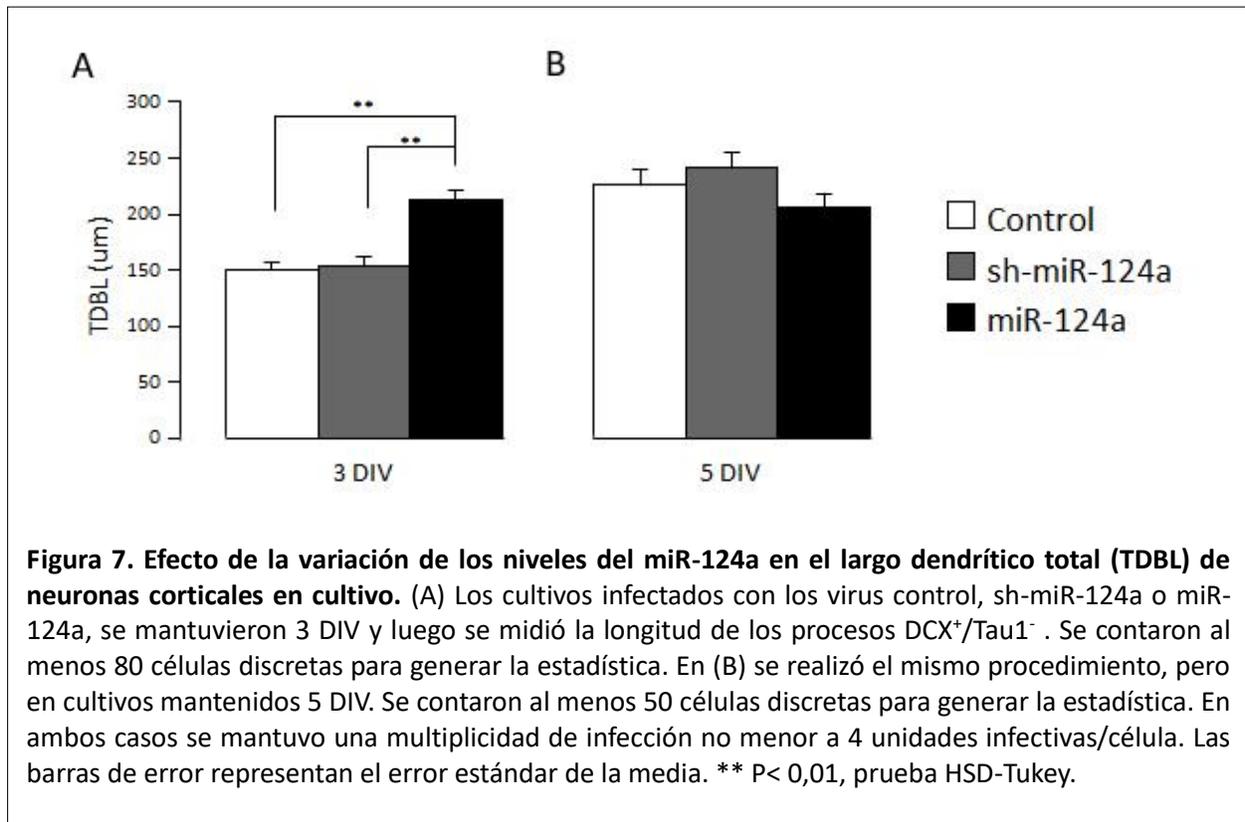


Para profundizar en los efectos de la variación de los niveles del miR-124a sobre el árbol dendrítico, se midió el índice de complejidad dendrítica (DCI, por las siglas de *Dendritic Complexity Index*), el cual incorpora la variable del TDBL, pero introduce en una misma ecuación los puntos de ramificación y las dendritas primarias, secundarias y terciarias, para entregar un valor descriptivo de la complejidad del árbol (Ver sección 5.11.f).

Los resultados de esta medición se muestran en la Figura 8, y se observa que se homologan los resultados del TDBL tanto a los 3 como 5 DIV (Figura 8): La construcción de sobre-expresión genera un aumento de los valores de DCI respecto al control a los 3 DIV (758 ± 71 versus 412 ± 37 . $P < 0,01$. Fig 8A), pero no así el vector de interferencia.

A los 5 días *in vitro*, los valores de DCI se igualan en las 3 condiciones, a pesar de un ligero aumento no significativo de las neuronas tratadas con el interferente (Figura 8B).

El análisis de Sholl fue usado como un segundo criterio de complejidad dendrítica. A diferencia del DCI, describe los cambios en el árbol dendrítico en función de la distancia del soma. La Figura 9 muestra los resultados del análisis de Sholl, en donde la distancia 0 corresponde a las dendritas primarias, es decir, a todas las proyecciones que emanan del soma celular de un largo mayor a 10 μm .

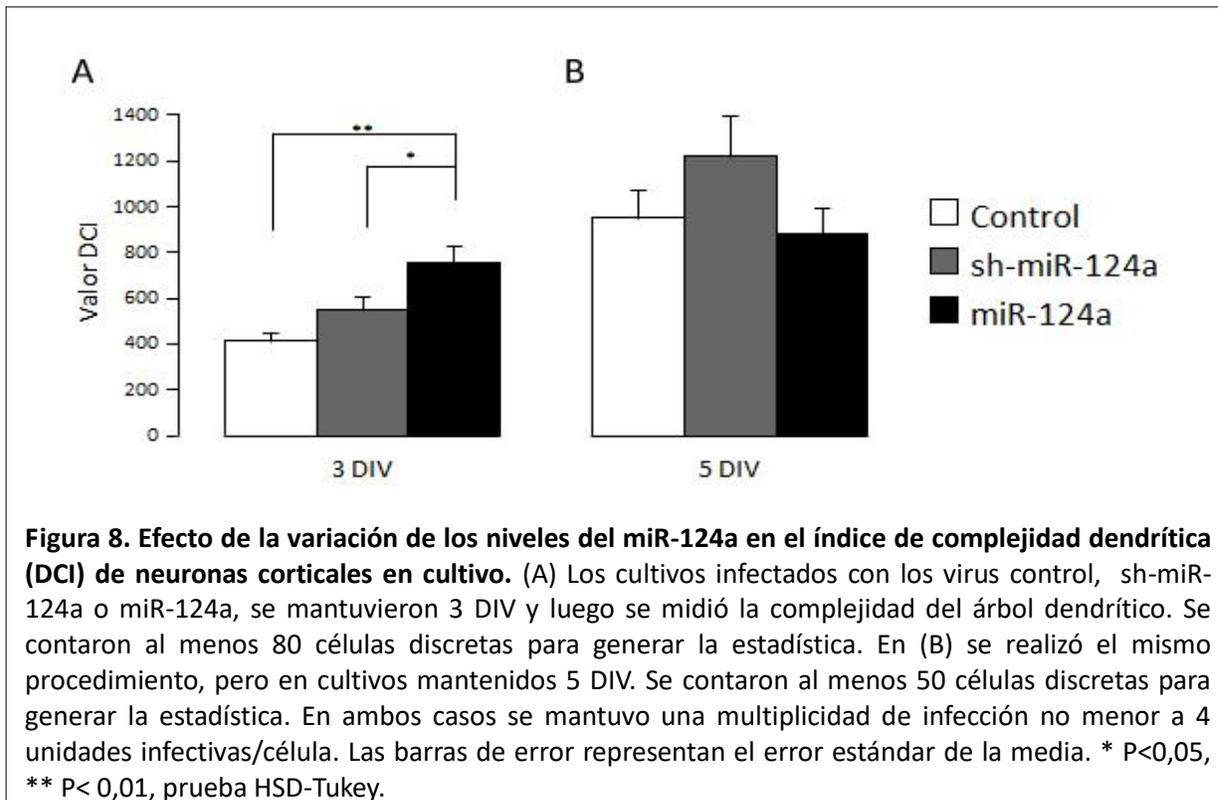


En primer lugar, se compararon las curvas obtenidas al tratar las neuronas con el sh-miR-124a y el control por 3 DIV y 5 DIV (Figura 9A-B). En la Figura 9A se observa que hay una cantidad significativamente menor de dendritas primarias en la condición interferida comparado con el control ($5,8 \pm 0,13$ versus $6,4 \pm 0,15$. $P < 0,05$). El resto de la curva no muestra variación entre las dos condiciones.

A los 5 DIV, la curva del interferente se homologa casi por completo con la del control, como se puede ver en la Figura 9B.

En la Figura 9C-D se comparan las curvas obtenidas al tratar las neuronas con el vector de

sobreexpresión y el control. No hay diferencias en los tres primeros puntos de la curva de 3 DIV, pero sí en los últimos dos (distancias 20 y 23 μm), donde las neuronas tratadas con el vector de sobreexpresión muestran un mayor número de cruces respecto al control (Figura 9C).

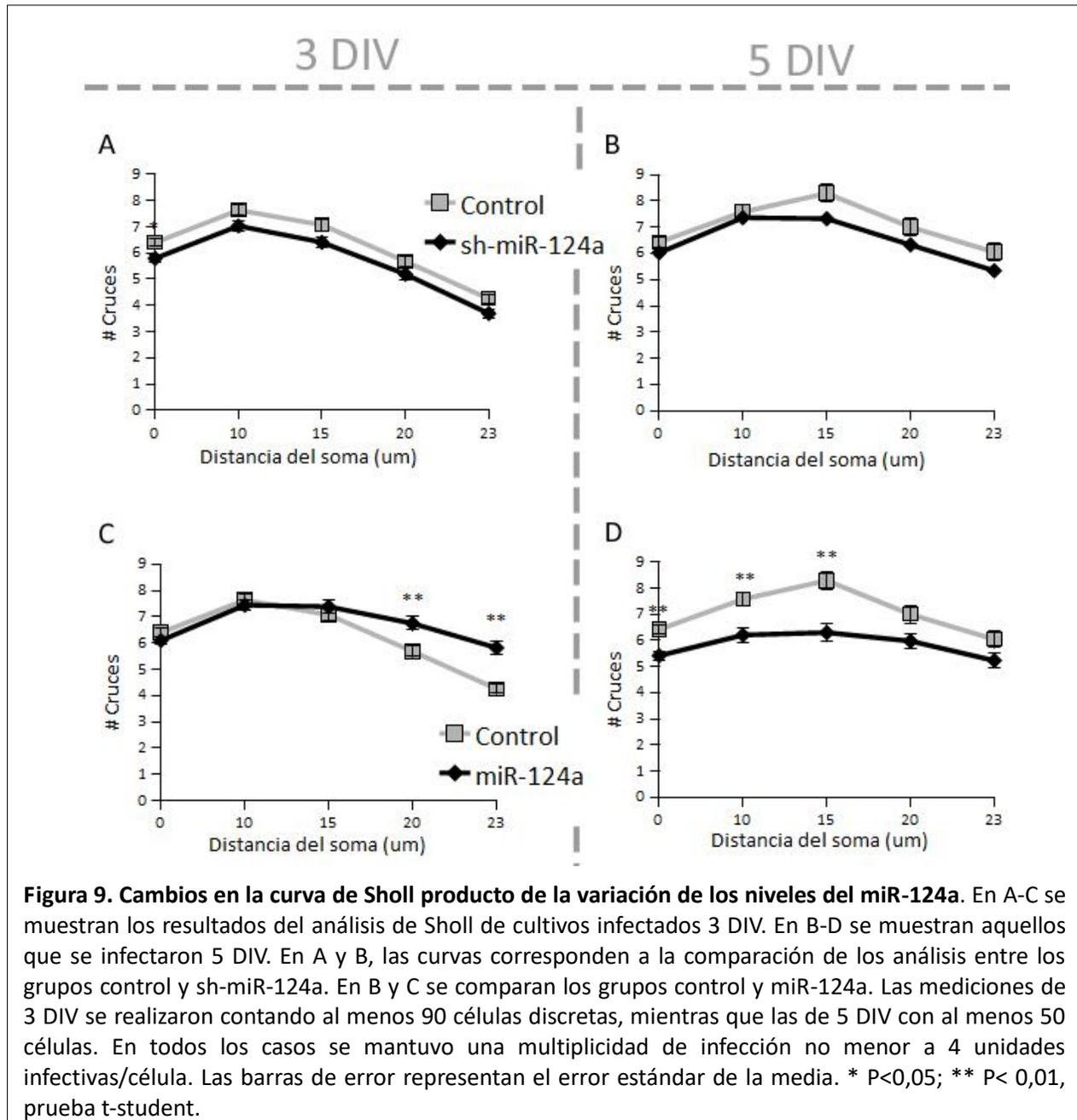


En el caso de las neuronas cultivadas 5 DIV (Figura 9D), llama la atención que la curva de las neuronas transducidas con el vector de sobre-expresión muestre menos cruces que la curva control. Esto se agudiza en los tres primeros puntos (distancias 0, 10 y 15 μm), en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Luego de este análisis detallado de la dendritogénesis se analizó el efecto de la variación del miR-124a sobre el crecimiento axonal, evento que depende tanto de los microfilamentos de actina como de los microtúbulos. El análisis del crecimiento axonal es necesario para completar el estudio del papel del miR-124a sobre la morfología de las neuronas corticales en cultivo.

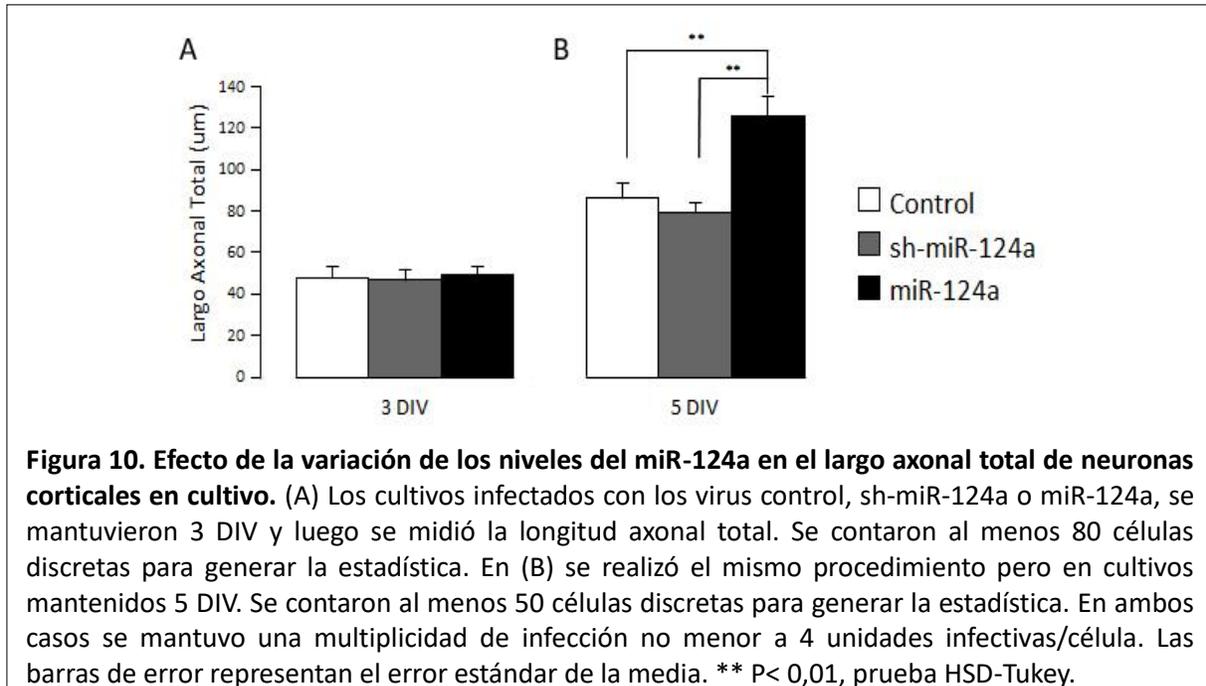
El axón se identificó por ser el proceso DCX⁻/Tau-1⁺. En los ensayos de inmunocitoquímica mostrados en la Figura 6 se puede observar que corresponde a un proceso único que no se bifurca en

las cercanías del soma y que es notablemente más largo en las células de 5 DIV que las cultivadas durante 3 días (flechas blancas en la Figura 6).



Se cuantificó la extensión axonal incluyendo las ramificaciones derivadas del único axón, en caso de haberlas, y se comparó para las 3 condiciones en las dos temporalidades del cultivo (Figura 10). No se observan diferencias en las neuronas mantenidas durante 3 DIV (Figura 10A), pero a los 5

días la población tratada con el vector de sobre-expresión muestra un aumento de 46,5% en el largo axonal (126 ± 8,8 µm de la condición miR-124a *versus* 86 ± 7,1 µm de la condición control. P<0,01. Figura 10B). La población tratada con el sh-miR-124a no muestra diferencias en el control ni a los 3 ni 5 DIV.



6.2 Papel del miR-124a *in vivo*:

Para corroborar si las alteraciones del desarrollo morfológico de las neuronas en cultivo son replicables en un modelo *in vivo* y si es que estas alteraciones (probablemente citoesqueléticas (Yu y cols., 2009)), son capaces de tener efectos masivos a niveles supracelulares como la migración y la diferenciación cortical, se electroporaron *in utero* los 3 vectores en la corteza dorso-lateral de embriones de E14.5, los cuales se desarrollaron normalmente en el útero materno durante 3 días, hasta E17.5. Los cortes coronales de la corteza electroporada con éxito se muestran en la Figura 10, en donde las células GFP⁺ son aquellas en que el plasmidio ingresó a los progenitores ventriculares de la corteza y la construcción se está expresando en la célula (Figura 5). Este experimento permite abordar simultáneamente tres preguntas:

a) La participación del miR-124a en la regulación de la migración en la corteza

b) El eventual papel del miR-124a en la diferenciación de los progenitores

c) La necesidad del miR-124a para el correcto desarrollo morfológico de las neuronas en la corteza.

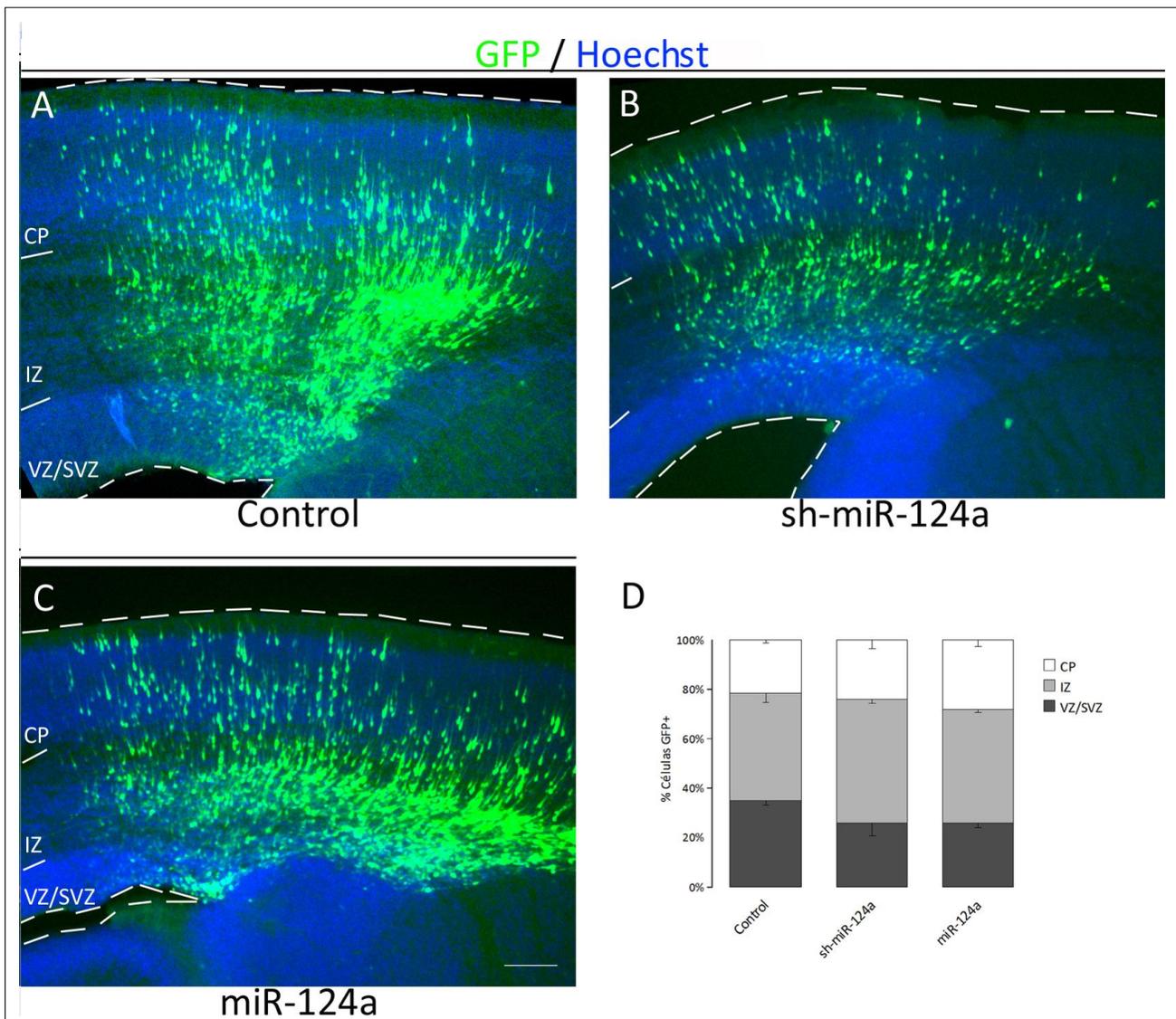


Figura 11. La variación de los niveles del miR-124a no altera la migración neuronal en la corteza. Se electroporaron *in utero* las distintas construcciones para evaluar el papel del miR-124a sobre el proceso migratorio: control (A), sh-miR-124a (B) y miR-124a (C). La inyección se realizó en E14.5 y se permitió el desarrollo del embrión hasta E17.5. En D se muestra la cuantificación de la proporción de células en cada capa anatómica, para cada condición experimental. ZV = Zona ventricular; ZSV = zona subventricular; ZI = zona intermedia; PC= Placa cortical. Escala = 50 μm. * P < 0,05. Prueba HSD-Tukey.

6.2.a. Participación en la migración:

Para evaluar cambios en la dinámica migratoria se cuantificó la proporción de células GFP⁺ en cada zona anatómica de la corteza (Fig 11, detalle del procedimiento de cuantificación en Materiales y Métodos). Tanto las cortezas electroporadas con la construcción de interferencia como de sobre-expresión muestran una disminución relativa de ~10% ($25,82 \pm 0,03\%$ del interferente y $25,86 \pm 0,03\%$ de la sobre-expresión *versus* $35,31 \pm 0,01\%$ del control), la cual no resultó ser estadísticamente significativa. El vector de interferencia aumentó en ~ 7% la proporción de células GFP⁺ en la IZ ($50,14 \pm 0,01\%$ de la interferencia *versus* $43,99 \pm 0,04\%$ del control), mientras que el de sobre-expresión mostró un aumento similar en las células que alcanzaron la CP ($28,17 \pm 0,02\%$ *versus* $21,54 \pm 0,02\%$). En ninguno de estos casos se encontraron diferencias significativas.

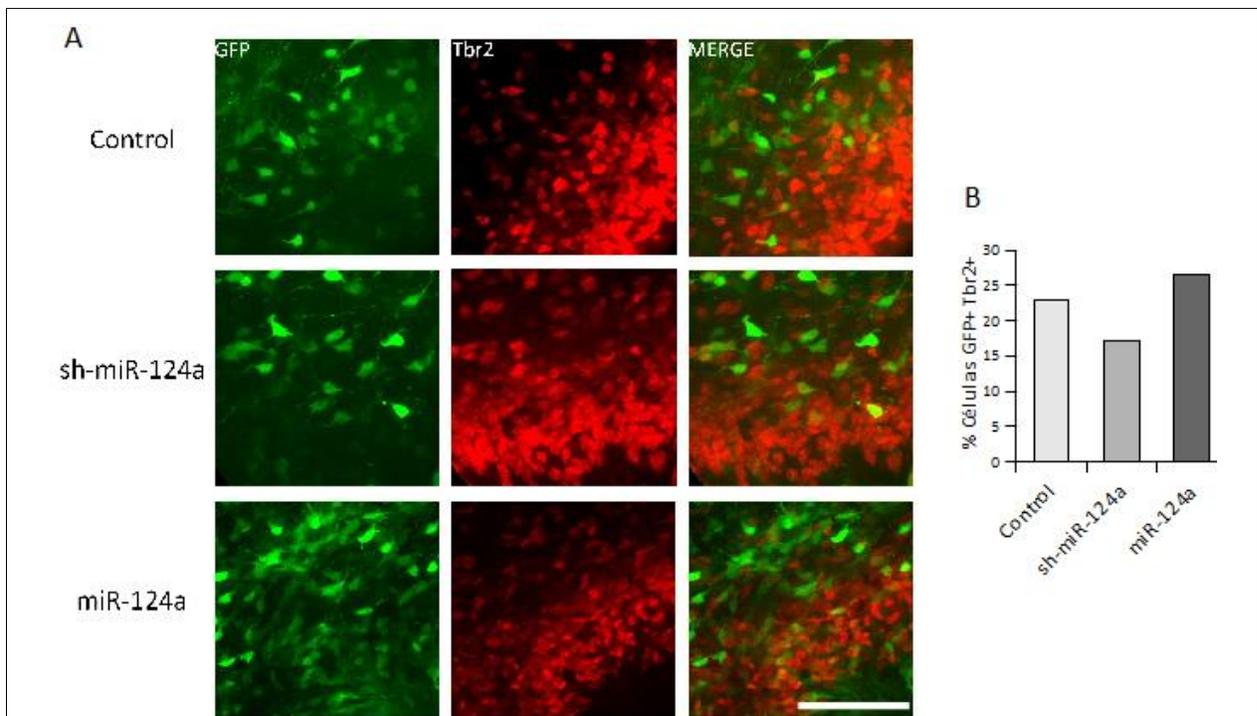
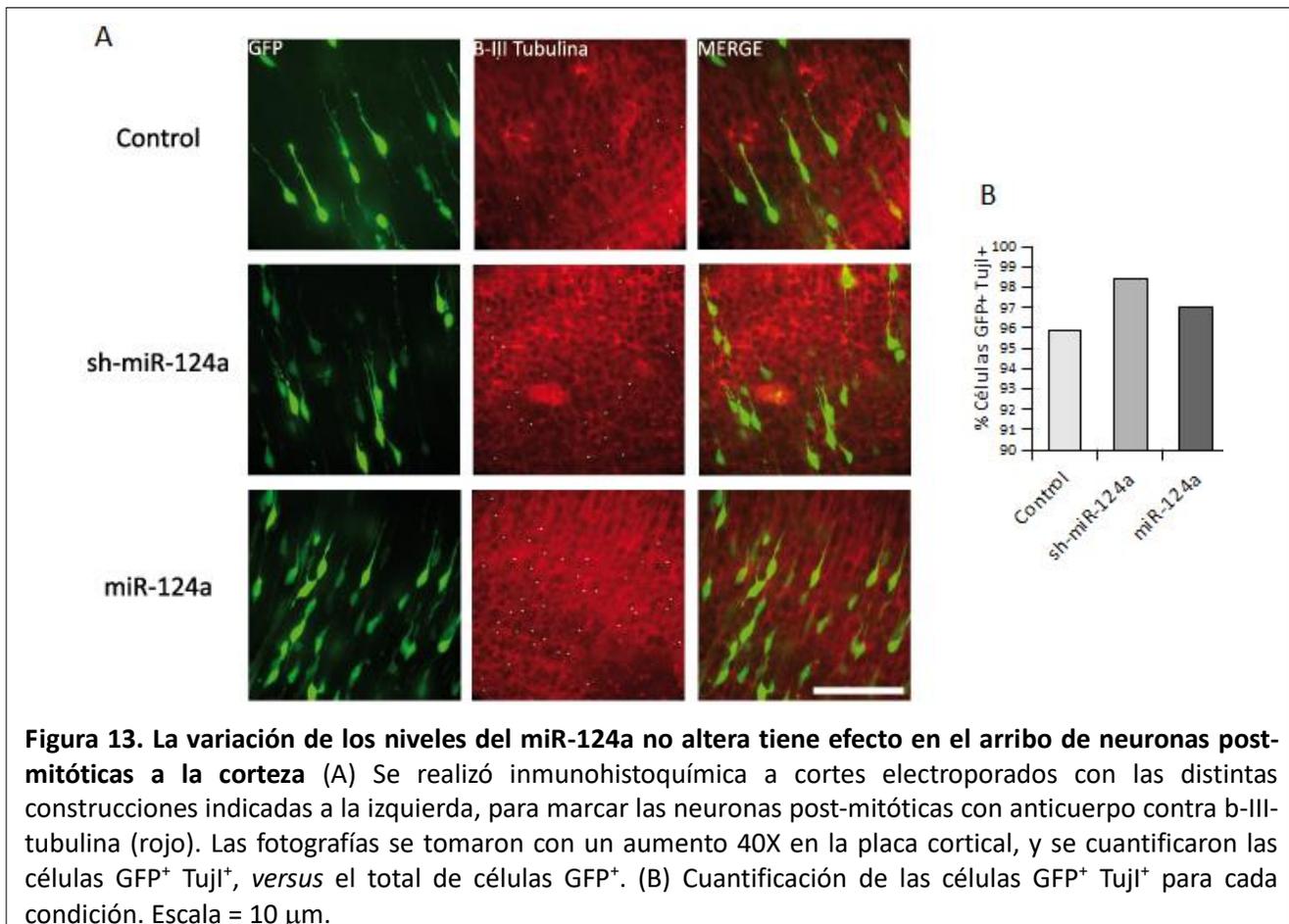


Figura 12. La variación de los niveles del miR-124a no altera la proporción de progenitores basales en la corteza en desarrollo. (A) Se realizó inmunohistoquímica a cortes electroporados con las distintas construcciones indicadas a la izquierda, para marcar los progenitores basales Tbr2⁺ (rojo). Las fotografías se tomaron con un aumento 40X en la zona venticular/subventricular y se cuantificó las células GFP⁺ Tbr2⁺ en esta zona, *versus* el total de células GFP⁺. (B) Cuantificación de las células GFP⁺ Tbr2⁺ para cada condición. Escala = 10 μ m.

6.2.b. Papel en la diferenciación:

Mediante inmunohistoquímica en corte con marcadores moleculares se identificaron las poblaciones de progenitores basales (anti-Tbr2) y de neuronas post-mitóticas (anti- β -III-tubulina también conocido como Tuji), para indagar efectos de las alteraciones del miR-124a en la diferenciación neuronal. No se marcó la población de progenitores apicales, aún cuando se puede inferir su presencia como las células dispuestas justo en la VZ-SVZ bajo la marca de Tbr2 y adyacentes al ventrículo (Figuras 12 y 13).



Este experimento sirvió sólo como indagación respecto a la identidad de las células electroporadas, ya que la condición control tiene un $n = 1$, y por tanto, no se hicieron comparaciones estadísticas de los resultados.

Maiorano y Mallamaci (2009), describen 2 fases en la expresión del miR-124a en la corteza: un nivel bajo de expresión cuando la célula pasa de progenitor apical a progenitor basal y un aumento considerable y sostenido de la expresión cuando la célula sale del ciclo celular y se define como neurona. Por esto, es razonable estudiar los efectos de las variaciones en los niveles del miR-124a precisamente en las células que sabemos que se está expresando, teniendo en consideración que sus niveles de expresión (y eventualmente, actividad biológica) van a la par de la diferenciación en la corteza.

La cuantificación de la coexpresión de GFP y Tbr2 se muestra en la Figura 12B, donde se ve una sutil disminución de la coexpresión al electroporar el sh-miR-124a (17,2% *versus* 22,94% del control). El vector de sobre-expresión, en tanto, muestra un porcentaje de co-expresión bastante similar al control.

En el caso del estudio de la co-expresión de GFP y Tuji1, se cuantificaron las células en la CP (donde se asientan las neuronas post-mitóticas, Figura 13) y, como es esperable, se obtuvieron altos porcentajes de co-expresión en todas las condiciones.

6.2.c. Papel del miR-124a en el desarrollo morfológico:

Se comparó cualitativamente la morfología de las células GFP⁺ presentes en la CP con especial atención en tres características notorias en la condición control:

- a) la adopción de la morfología bipolar,
- b) la presencia, en algunos casos, de un bulbo citosólico ubicado justo sobre el soma siguiendo la dirección radial de la migración,
- c) la extensión, en algunos casos, y siempre en dirección a la pía, de las primeras dendritas apicales.

En la Figura 14 se muestran fotografías representativas de cada condición. Las flechas blancas indican la presencia del bulbo citosólico en, al menos, una neurona del grupo, y siempre orientado en dirección de la migración. no se visualizaron diferencias en ninguna de las condiciones, independientemente de la cantidad de neuronas presentes en la CP, lo que es dependiente del éxito

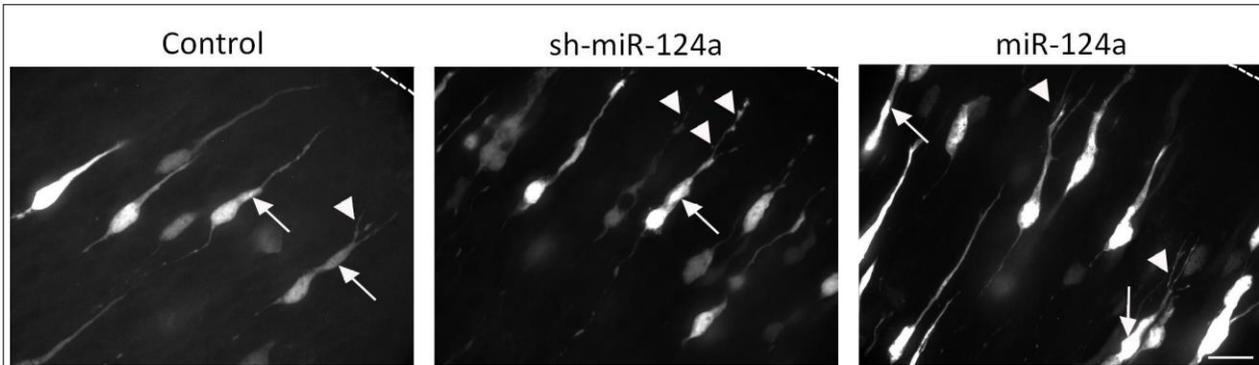


Figura 14. Morfología de neuronas que arriban a la Placa Cortical en E17.5. Se fotografiaron grupos de neuronas arribando a la placa cortical en la condición control (A), sh-miR-124a (B), y miR-124a (C). Las flechas blancas indican los bulbos del citoplasma, remanentes de la nucleoquinesis, y las puntas de flechas indican los primeros procesos y bifurcaciones del árbol dendrítico hacia apical. La línea discontinua superior indica el borde pial, que es hacia donde se dirige la migración neuronal. Escala = 8 μ m.

de la electroporación. La cantidad de neuronas con bulbo citosólico depende también del tejido mismo y de la etapa de la migración en que se perfundió el animal, por lo que no se estimó una proporción de neuronas con bulbo citosólico, sino que se puso atención en su presencia en cada condición.

Las cabezas de flecha indican las primeras ramificaciones de dendritas apicales, que también se encuentran en todas las condiciones. Tampoco se pudo correlacionar la aparición de estas dendritas a una condición morfológica determinada. En la fotografía correspondiente a la condición de interferencia de la Figura 14 se puede ver que la neurona que presenta un bulbo citosólico muestra también la extensión de dendritas apicales, pero en la fotografía correspondiente a la condición de sobre-expresión, las neuronas que proyectan estas dendritas no muestran el bulbo citosólico.

Salvo muy raras excepciones, nunca se encontraron células sin la orientación radial de la migración en la CP.

7. DISCUSIÓN

El desarrollo de la corteza cerebral es un proceso altamente controlado, en el cual se combinan procesos celulares de proliferación y muerte celular, migración y maduración de las neuronas, así como posicionamiento y conectividad (Levitt, 2000), y son todos fundamentales para el correcto funcionamiento del órgano adulto. La complejidad del proceso queda en evidencia al revisar la alta cantidad de genes que se expresan y silencian de forma orquestada y coordinada, montando un sistema que aún no se ha descrito por completo. No existe probablemente, otro ámbito de las ciencias en donde converjan de modo tan complejo y regulado las funciones y capacidades de las células para desarrollarse, comunicarse y generar el órgano más importante de los mamíferos superiores.

En este escenario se han investigado factores de transcripción, proteínas quinasas, proteínas andamio, moléculas de señalización, receptores y en los últimos años han aparecido con fuerza los RNA pequeños como nuevos participantes del control del desarrollo cerebral. Entre estos RNA pequeños los más importantes parecen ser los miR-9 y miR-124a (Conaco y cols., 2006), aunque recientemente también se ha reportado que el miR-134 participa en la generación de dendritogénesis (Fiore y cols., 2009).

La capacidad de los miRNA de regular múltiples mRNA blanco con distinta eficiencia (Bartel 2009) hacen de éstos una herramienta celular muy útil en el control de transcritos “suelos” que no deben expresarse, con lo que ayudan a “limpiar” la célula de mRNAs y proteínas innecesarias. Pero, a la vez, la alta cantidad de puntos de control a los que pueden estar sometidos durante su biogénesis (Winter y cols., 2009) y la dificultad técnica de trabajar con ellos (recordemos que se han masificado sólo en los últimos diez años) hacen que los estudios se realicen de forma lenta y su manejo siga siendo complicado.

Los estudios previos a esta memoria indicaban que el miR-124a promovía la transición de los progenitores neurales a neuronas post-mitóticas (Cheng y cols., 2009), que muchos de sus blancos eran proteínas de regulación de la maquinaria citoesquelética (Yu y cols., 2009), proteínas de adhesión

(Cao y cols., 2007), miembros del complejo REST/NRSF (Visvanathan y cols., 2007), proteínas responsables del *splicing* alternativo asociado a isoformas neuronales (Makeyev y cols., 2007), o incluso proteínas que forman parte de complejos ribonucleoproteicos (Xu y cols., 2008). Estos estudios se desarrollaron tanto en líneas celulares como modelos animales (*Drosophila*, pollo y ratón), pero ninguno de ellos abordó el desarrollo embrionario de la corteza cerebral en forma directa.

Por todo lo anterior, tenía sentido hipotetizar que el miR-124a participaba de la histogénesis cortical promoviendo la neurogénesis en la corteza y la adquisición de la morfología neuronal. A la luz de los resultados expuestos, no es posible validar la hipótesis de trabajo, al menos con las herramientas moleculares utilizadas. A pesar de esto, y con los nuevos antecedentes que surgieron durante el desarrollo de esta tesis, es posible afirmar que aunque el miR-124a muestra cierto control sobre la maquinaria citoesquelética *in vitro*, este control no afecta la dinámica de migración radial, ni a las neuronas que alcanzan la placa cortical.

Estos resultados coinciden, en parte, con el trabajo de Maiorano y Mallamaci (2009), quienes sobre-expresaron el miR-124 en la corteza de embriones de ratón desde E12.5 a E14.5, y mostraron que esto promovía la transición de los progenitores apicales a progenitores basales. No reportaron variaciones en la migración y confirmaron que Integrina-b1, un blanco del miR-124a en el tubo neural de pollo, no sufre regulación durante el desarrollo de la corteza en el ratón. Esto último coincide con lo reportado en esta tesis acerca del nulo efecto morfológico de la sobre-expresión del miR-124a sobre los procesos dendríticos apicales de las neuronas que alcanzan la CP, en la ventana temporal de E14.5 a E17.5 (Figura 14).

7.1 Cambios morfológicos de neuronas en cultivo mediados por el miR-124a

Considerando que los estudios *in vitro* se pueden dividir en efectos rápidos y tardíos, según se hayan mantenido los cultivos por 3 ó 5 DIV respectivamente, se pueden extraer valiosas conclusiones a partir del desarrollo morfológico de las células sometidas a los tratamientos de pérdida y ganancia de función.

7.1.a. Pérdida de Función:

Los experimentos de pérdida de función del miR-124a generaron una rápida disminución de las dendritas primarias (Figura 9A-B), pero sin que esto causara una disminución de la longitud total (Figura 7A), ni de la complejidad del árbol dendrítico (Figura 8A), lo que sugiere que los procesos secundarios y terciarios son capaces de compensar la falta de dendritas primarias y mantener un árbol dendrítico con el mismo potencial de conectividad que la neurona control. En el caso de las neuronas en cultivo, el desarrollo de conectividad con las células vecinas es un evento fundamental para aumentar la sobrevivencia del cultivo. Estos resultados coinciden con las observaciones de Yu y cols. (2008) que reportaron un desplazamiento hacia valores negativos de la curva de distribución de las dendritas primarias en neuronas tratadas con 2'-O-Me como método de bloqueo del miR-124. En ningún caso la pérdida de función generó cambios morfológicos estables ni tardíos sobre el árbol dendrítico.

En el caso del desarrollo axonal, este no mostró variaciones del largo total (Figura 10) ni a los 3 ni 5 DIV, por lo que se concluye que la presencia del miR-124a no es necesaria para el desarrollo y la elongación axonal en estas células.

7.1.b. Ganancia de Función:

La sobre-expresión del miR-124 en las neuronas corticales en cultivo generó dos efectos sobre la morfología dendrítica:

a) Efectos rápidos: caracterizados por el aumento del largo total (Figura 7A) y de la complejidad dendrítica (Figura 8A). La alteración de estos valores se explica por un aumento de los procesos distantes al soma (Figura 9C).

b) Efectos tardíos: caracterizados por el retorno a niveles normales tanto del largo total (Figura 7B) como de la complejidad dendrítica (Figura 8B). La compensación de estos niveles viene dada por una disminución de los procesos cercanos al soma (Figura 9D).

En ambos tratamientos (pérdida y ganancia de función) se ve una tendencia a la normalización morfológica ya que no hay alteración estable del fenotipo dendrítico, no obstante la sobre-expresión del miR-124a altera de manera importante al árbol dendrítico y ambos vectores se expresan en forma estable, a los 5 DIV los valores de DCI y TDBL se encuentran en niveles similares al control.

Por el lado del axón los resultados muestran un comportamiento antagónico (Figura 10): la sobre-expresión del miR-124a es capaz de inducir un lento aumento de la longitud axonal, que se vuelve significativo recién a los 5 DIV. Esto da cuenta de que a pesar de que los miRNA son capaces de regular cientos de mRNA, el ambiente celular y las condiciones experimentales pueden modificar los blancos que efectivamente son regulados. Esto porque si bien se sabe que el miR-124a tiene la capacidad de regular más de 100 mRNA relacionados al citoesqueleto (Yu y cols., 2009), parece no tener la misma sensibilidad y eficiencia de regulación para los mRNA que van a generar proteínas dendríticas o axonales, lo que sugiere que hay otros factores de la regulación citoesquelética actuando a la vez, estos factores pueden ser de naturaleza difusible, relacionados con cascadas de transducción, expresión de factores de transcripción, etc.

Otra opción es que como el desarrollo dendrítico de la célula en cultivo es previo al crecimiento axonal (da Silva y Dotti, 2002), la selectividad de la regulación por el miR-124a sea debido a la disponibilidad de mensajeros susceptibles de ser regulados, lo cual a su vez depende de la maquinaria transcripcional de la célula que responde a la temporalidad propia del desarrollo de las extensiones dendríticas y axonales en el cultivo. Esto apoya la idea de que el miR-124a colabora indistintamente con el crecimiento de ambos procesos, pero dado que el crecimiento dendrítico ya está maduro cuando se comienza a expresar el vector transducido con el lentivirus y, en cambio, el crecimiento axonal recién está comenzando, no es posible evidenciar un efecto en el desarrollo del árbol dendrítico y sí en el axón. Esta hipótesis no responde, eso sí, al efecto rápido de la disminución de las dendritas primarias tras la pérdida de función del miR-124a.

Yu y cols. (2009) demostraron que la expresión del miR-124a afecta los niveles de Cdc42 y la localización de Rac1, sugiriendo que el control de la maquinaria citoesquelética ocurre a nivel de

proteínas de la familia Rho GTPasas. Además, demostraron que la interferencia del miR-124a disminuye los niveles de α -tubulina acetilada, que es fundamental para mantener la estabilización de los microtúbulos. Con todo, se fortalece la idea de que el miR-124a sería un colaborador del establecimiento del fenotipo neuronal *in vitro*, pero este fenotipo no es dependiente de él.

7.2 Papel del miR-124a en la Histogénesis cortical

Los resultados obtenidos del estudio *in vitro* indican que el miR-124a colabora con el desarrollo de los procesos dendríticos y axonal, probablemente a través del control de la maquinaria citoesquelética que también es necesaria para el desarrollo de la corteza *in vivo*. Para explorar la función del miR-124a durante la diferenciación neuronal, se electroporaron los vectores de pérdida y ganancia de función en la corteza en desarrollo en E14.5 (Figuras 6 y 11).

7.2.a. Efectos sobre la migración

La migración neuronal no se vio afectada por la variación de los niveles del miR-124a (Figura 11), pero tanto la pérdida como la ganancia de función generaron una aparente disminución de las células GFP⁺ en la VZ/SVZ. El hecho de no encontrar diferencias significativas podría deberse a tres motivos:

- i. Efectivamente el miR-124a no es capaz de generar grandes cambios a nivel de la histogénesis cortical y su manipulación no altera los mecanismos moleculares que controlan el proceso, es decir, no es fundamental para la migración, situándose como un actor secundario, que contribuye levemente al proceso (esto se sustenta en el hecho de que actúa regulando mRNAs que no tienen que expresarse durante la neurogénesis y que, por lo tanto, están en bajos niveles en la célula), pero que en ningún caso es fundamental.
- ii. Las herramientas moleculares utilizadas no fueron capaces de modificar en forma importante los niveles del miR-124a dentro de las células. Esto es particularmente válido para el estudio de pérdida

de función, que sólo es capaz de disminuir a la mitad los niveles del miR-124a (Berndt A. y Kukuljan M. comunicación personal). Sin embargo, esto no es esperable para los estudios de sobreexpresión, que podrían ser más rotundos si es que el vector se electroporara en una edad embrionaria más temprana, previo a la expresión endógena del miR-124a (por ejemplo E12.5). Maiorano y Mallamaci (2009) sobre-expresaron el miR-124a en dicha edad, pero utilizaron un promotor pCMV que tiene menores niveles de expresión en la corteza *in vivo* (datos del laboratorio, no publicados), lo que puede explicar que en su trabajo no indiquen cambios a nivel de migración en la corteza en E14.5.

lii. Muchos estudios de migración repiten el experimento hasta 7 veces, y cuando se trata de efectos sutiles, como este caso, quizá la falta de repeticiones del experimento no permitió que la estadística fuera más expresiva de los cambios. Si bien es necesario repetir los experimentos para confirmar la veracidad de los datos, hay que ser consciente también de que se trabaja con animales de experimentación y por lo tanto se debe maximizar el uso de cada uno de ellos, por lo que si se mejora la eficiencia de la electroporación se pueden obtener más cerebros con fluorescencia dorso-lateral a partir de una misma camada, lo que fue una de las principales dificultades del trabajo.

La disminución aparente de células GFP⁺ en la VZ-SVZ tras la pérdida de función del miR-124a resulta más enigmática por cuanto la hipótesis planteaba precisamente lo contrario: un aumento de células en la región proliferativa. Si bien los datos obtenidos no muestran diferencias significativas, resulta extraño que la disminución del miR-124a promueva la salida de las células de la VZ-SVZ (lo que es más esperable con la sobre-expresión), sino que se esperaría que estas no cambiaran su comportamiento o que se mantuvieran en un estado proliferativo por un tiempo mayor.

7.2.b. Efectos sobre la diferenciación neuronal:

El estudio de co-expresión de marcadores de progenitores basales y neuronas post-mitóticas no mostró diferencias atribuibles a la alteración de los niveles del miR-124a. Si bien está bastante claro que la salida del ciclo celular y la generación de neuronas no depende del miR-124a (Figura 13), es interesante ver que tampoco hay diferencias en los progenitores basales (Figura 12). Esto último es

distinto a lo publicado por Maiorano y Mallamaci (2009), quienes describen un aumento de los progenitores basales por la sobre-expresión del miR-124a. Describen además, una disminución de los progenitores apicales Pax6⁺ con lo que concluyen que el miR-124a promueve la transición de progenitores apicales a progenitores basales (lo que implica una división asimétrica del progenitor y la generación de una neurona post-mitótica extra (Noctor y cols, 2004)).

Hay algunas consideraciones que pueden explicar los resultados distintos observados entre esta tesis y dicha publicación:

i. Material Genético: existen diferencias en los vectores de expresión utilizados en ambos estudios, mientras Maiorano y Mallamaci (2009) usan un vector BLOCK-iTTM, donde el pre-miR-124a utiliza un promotor pCMV, este estudio usa un vector pFUX-H1 con un promotor H1. Los autores indican que su vector de expresión no tuvo un procesamiento óptimo en la corteza e hipotetizan que ello puede deberse a que las células indiferenciadas no procesan el miR-124a. Por otra parte, estudios no publicados del laboratorio indican que los promotores pCMV no funcionan bien en la corteza *in vivo*, por razones desconocidas, por lo mismo se ha decidido usar un promotor fuerte que genera una alta señal GFP+ en las células transfectadas *in vivo*. Si este fuera el caso, resulta intrigante ver que un nivel de sobre-expresión menor puede generar un efecto biológico más acentuado.

ii. Edad Gestacional del Estudio: Maiorano y Mallamaci (2009), mediante hibridación *in situ* demuestran la temporalidad de expresión del miR-124a en la corteza en desarrollo, donde las primeras marcas importantes comienzan a aparecer desde E14, con una marca intermedia en la zona subventricular. En E12.5 la señal es difusa en la VZ-SVZ y fuerte en la pre-placa. Los autores deciden entonces electroporar el miR-124a en E12.5, es decir, introducirlo cuando aún se expresa a niveles bajos, y la medición se hace en E14.5. En el caso de esta tesis, el miR-124a se inserta en E14.5 y la medición se hace en E17.5, por lo que la diferencia de los resultados podría deberse también a que la promoción que podría generar el miR-124a solo resulta efectiva en las etapas más tempranas de la neurogénesis.

Considerando que las primeras etapas de la diferenciación y migración dependen de la

translocación somal (y no tanto de la locomoción guiada por la glía radial), y que el miR-124a ha mostrado (en los estudios *in vitro*) ejercer cierto control sobre el citoesqueleto, podría hipotetizarse que el miR-124a contribuye a la promoción de la neurogénesis al estimular la generación de progenitores basales y la translocación somal, a través del ensamblaje citoesquelético necesario para ello.

Maiorano y Mallamaci (2009) indican que no hay pérdida de conectividad del proceso líder en la placa pial y que *Lamc1*, un blanco del miR-124a en pollo (Cao y cols., 2007), no es regulado por éste, sin embargo, no indican nada acerca de variaciones en la migración en la temporalidad de su estudio y, probablemente, sea necesario hacer un seguimiento de tipo *time-lapse* realizando pérdida y ganancia de función del miR-124a para ver si es que la translocación somal se ve afectada por los niveles del miR-124a, o si es que, al contrario, se promueve la migración a través de la locomoción guiada por la glía radial.

Así, tomando los antecedentes de Maiorano y Mallamaci (2009) y los nuevos antecedentes aportados por esta tesis, se puede concluir que el miR-124a puede ser parte del mecanismo molecular que gatilla la transición de los progenitores apicales a progenitores basales, pero que una vez gatillado ese proceso, no es capaz de controlarlo ni tiene injerencia en su correcta continuación. Es intrigante que el miR-124a se continúe expresando en la corteza durante la adultez del animal si es que esta hipótesis fuese cierta, pues no tendría función aparente en la corteza adulta. Muy poco se ha explorado sobre la función de este miRNA para la correcta actividad neuronal. En este sentido, uno de los pocos trabajos publicados al respecto es del grupo de Eric Kandel (Rajasehupathy y cols., 2009), quienes usando el modelo del caracol *Aplysia*, estudiaron el papel del miR-124a en la activación de la neuronas sensoriales y su papel en la potenciación a largo plazo (LTP). Vieron que la estimulación por serotonina (5HT), de dichas neuronas genera una disminución de los niveles del miR-124a maduro (no de los niveles del pre-miR-124a). Esta regulación de la biogénesis y disponibilidad del miR-124a es importante para mantener niveles estables de la respuesta de LTP a 5HT, y su alteración provoca cambios en la respuesta a la hormona. Este estudio es el único que entrega al miR-124a una función en la actividad neuronal, lo que abre un campo nuevo de exploración de este y otros miRNAs que se expresan en la corteza adulta (entre ellos, por ejemplo, el miR-9/9*).

Una forma de comenzar este estudio sería, por ejemplo, revisar si es que ante alteraciones de la conectividad neuronal se generan cambios en la expresión del miR-124a tanto en animales jóvenes como adultos, pudiendo estudiar enfermedades neurodegenerativas, genéticas y otras que no alteran el desarrollo neuronal, pero que se desencadenan por ciertos estímulos ambientales o la edad. En este sentido, el miR-124a es un buen candidato para estudiar estados patológicos en cerebro adulto, ya que se expresa ampliamente en el sistema nervioso central, pero su función en ese contexto se desconoce.

7.2.c. Efectos sobre la morfología en la CP

En el caso de la morfología de las neuronas que alcanzan la CP, este estudio coincide con las observaciones de Maiorano y Mallamaci (2009) respecto a que no existen diferencias en la conectividad con la placa pial al sobre-expresar el miR-124a, ni tampoco al inhibirlo. Las Figuras 13 y 14 muestran claramente que no hay alteraciones en la cantidad de células GFP⁺ en la CP, por una parte, y que dichas células no muestran defectos morfológicos en las dendritas apicales que se extienden hacia la placa pial, indicando que el miR-124a no participa de la regulación de la extensión de estos procesos, o al menos, no es fundamental para ello. Esto podría cambiar si se desarrollan sistemas de pérdida total de función de los miRNA, como por ejemplo, con animales transgénicos.

La controversia y poca claridad acerca del papel fisiológico del miR-124a durante el desarrollo cortical ha obligado a los investigadores a enfrentar esta pregunta desde una óptica más reduccionista y centrada en la capacidad del miR-124a de regular a una proteína en particular. Así, durante el desarrollo de esta tesis, se publicaron varios estudios donde se analiza en profundidad la relación del miR-124a con una única proteína (Hes1, Sox9, Ephrin-B1, CREB, BAF53b), los que aportaron valiosa evidencia respecto a la capacidad de control del miR-124a sobre proteínas involucradas en la histogénesis cortical, pero sin una búsqueda de su control sobre el proceso completo.

Al contrario, el presente estudio no buscó describir un nuevo blanco del miR-124a que además estuviera implicado en la neurogénesis o la diferenciación morfológica *in vivo*, pues entendemos que la naturaleza biológica de este tipo de moléculas se basa, precisamente, en su capacidad para regular simultáneamente varios mRNA.

8. CONCLUSIONES

- 1.- La pérdida de función del miR-124a mediante un interferente de RNA genera una disminución de las dendritas primarias a los tres, pero no a los cinco días en neuronas corticales *in vitro*.
- 2.- La sobre-expresión del miR-124a en neuronas corticales en cultivo genera un aumento del largo dendrítico total y de la complejidad dendrítica a los tres, pero no a los cinco días *in vitro*.
- 3.- La sobre-expresión del miR-124a en neuronas corticales en cultivo aumenta la cantidad de procesos a 20 y 23 μm de distancia del soma a los 3 DIV y disminuye la cantidad de dendritas primarias y de procesos a 10 y 15 μm de distancia del soma a los 5 DIV.
- 4.- El largo axonal aumenta significativamente tras cinco días de sobre-expresión del miR-124a en neuronas corticales *in vitro*.
- 5.- La variación de los niveles del miR-124a no provoca cambios en la dinámica migratoria ni en la proporción de progenitores basales o neuronas post-mitóticas en la corteza *in vivo*, entre E14.5 a E17.5.
- 6.- La morfología de las neuronas electroporadas en E14.5 y que alcanzan la placa cortical en E17.5 no cambia ante variaciones de los niveles del miR-124a.

9. REFERENCIAS

- Arvanitis D. N., Jungas T., Behar A., Davy A. 2010. Ephrin-B1 reverse signaling controls a posttranscriptional feedback mechanism by miR-124. *Mol Cell Biol.* **30**(10): 2508-2517.
- Ballas N., Grunseich C., Lu D., Speh J.C., Mandel G. 2005. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell.* **121**:645-657.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell.* **116**:281-297.
- Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* **136**: 215-223.
- Bystron I., Blakemore C., Rakic P. 2008. Developmental of the human cerebral cortex: Boulder Commite revisited. *Nat Rev Neurosci.* **9**(2): 110-22.
- Cao X., Pfaff S.L., Gage F.H. 2007. A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes Dev.* **21**:531-536.
- Caviness V. S. Bhide P. G. Nowakowski R. S. 2008. Histogenic processes leading to the neocortex: migration is only a part of the story. *Dev Neurosci.* **30**(1-3): 82-95.
- Caviness V. S., Nowakowski R. S., Bhide P. G. 2009. Neocortical neurogenesis: morphogenetic gradients and beyond. *Trends Neurosci.* **32**(8): 443-50.
- Cheng L-Ch., Pastrana E., Tavazoie M., Doetsch F. 2009. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci.* **12**(4):399-408.

Ciaudo C., Servant N., Cognat V., Sarazin A., Kieffer E., Viville S., Colot V., Barillot E., Heard E., Voinnet O. 2009. Highly dynamic and sex-specific expression of microRNAs during early ES cell differentiation. *PLoS Genet.* **5**(8): e1000620.

Conaco C., Otto S., Han J-J., Mandel G. 2006. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**(7): 2422-2427.

Creppe C., Malinyaouska L., Volvert M-L., Gillard M., Close P., Malaise O., Laguesse S., Cornez I., Rahmouni S., Ormenese S., Belachew S., Melgrange B., Chapelle J-P., Siebenlist U., Moonen G., Chariot A., Nguyen L. 2009. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of α -Tubulin. *Cell* **136**: 551-564.

Croce C. M. 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* **10**(10): 704-714.

Da Silva J. S. Dotti C. G. 2002. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci.* **3**(9): 694-704.

De Pietri Tonelli D., Pulvers J. N., Haffner C., Murchison E. P., Hannon G. J., Huttner W. B. 2008. miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. *Development.* **135**: 3911-3921.

Fiore R., Khudayberdiev S., Christensen M., Siegel G., Flavell S. W., Kim T-K., Greenberg M.E., Schratt G. 2009. Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio-2 protein levels. *EMBO J.* **28**: 697-710.

Gao F-B. 2010. Context dependent functions of specific microRNAs in neuronal development. *Neural Dev.* **5**:25.

Ghildiyal M., Zamore P. D. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* **10**(2): 94-108.

Gilbert S. F. 2005. Biología del Desarrollo. Buenos Aires. *Editorial Médica Panamericana*. 7ª Edición.

Guo H., Ingolia N. T., Weissman J. S., Bartel D. P. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* **466** (7308): 835-40.

He L., Hannon G. J. 2004. microRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* **5**(7): 522-531.

Hébert J. M., Fishell G. 2008. The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci.* **9**(9): 678-685.

Hornstein E., Shomron N. 2006. Canalization of development by microRNAs. *Nat Genet.* **38** Suppl: S20-S24 (2006).

Kawase-Koga Y., Otaegi G., Sun T. 2009. Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system. *Dev Dyn.* **238**: 2800-2812.

Kim J., Inoue K., Ishii J., Vanti W. B., Voronov S. V., Murchison E., Hannon G., Abelovich A. 2007. A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science.* **317**: 1220-1224 (2007).

Kim V. N., Han J., Siomi M. C. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Cell Biol.* **10**(2): 126-139.

Kosik K. S. 2009. microRNAs tell an evo-devo story. *Nat Rev Neurosci.* **10**(10): 754-759.

Krichevsky A.M., King K. S., Donahue C. P., Khrapko K., Kosik K. 2003. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*. **9**:1274-1281.

Krichevsky A. M., Sonntag K. C., Isacson O., Kosik K. S. 2006. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*. **24**(4): 857-864.

Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. **32**: 149-184.

Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., Tuschl T. 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. **12**: 735-739.

Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes a small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. **75**(5): 843-854.

Levitt P. Molecular determinants of regionalization of the forebrain and cerebral cortex. En: Gazzaniga M. S. 2000. The new cognitive neurosciences. USA. Editorial del *Massachusetts Institute of Technology*. 2a edición.

Lom B., Cohen-Cory S. 1999. Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates retinal ganglion cell dendritic and axonal arborization *in vivo*. *J Neurosci*. **19**(22): 9928-9938.

Maiorano N. A., Mallamaci A. 2009. Promotion of embryonic cortico-cerebral neurogenesis by miR-124. *Neural Dev*. **4**: 40.

Makeyev E.V., Zhang J., Carrasco M.A., Maniatis T. 2007. The microRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*. **27**: 435-448.

- Makeyev E.V., Maniatis T. 2008. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs. *Science*. **319**: 1789-1790.
- Meerson A., Cacheaux L., Goosens K. A., Sapolsky R. M., Soreq H., Kaufer D. 2010. Changes in brain microRNAs contribute to cholinergic stress reactions. *J Mol Neurosci*. **40**(1-2): 47-55.
- Mérot Y., Rétaux S., Hneg J. I-T. 2009. Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex. *Semin Cell Dev Biol*. **20**: 726-734.
- Molyneaux B. J., Arlotta P., Menezes J. R. L., Macklis J. D. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. **8**(6):427-437.
- Monuki E. S., Walsh C. A. 2001. Mechanisms of cerebral cortical patterning in mice and humans. *Nat Neurosci*. **4** Suppl: 1199-1206.
- Nadarajah B., Parnavelas J. G. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. **3**(6): 423-432.
- Olguin P., Oteíza P., Gamboa E., Gómez-Skármeta J.L., Kukuljan M. 2006. RE-1 silencer of transcription/Neural restrictive silencer factor modulates ectodermal patterning during *Xenopus* development. *J Neurosci*. **26**(10): 2820-2829.
- Rajasehupathy P., Fiumara F., Sheridan R., Betel D., Puthanveetil S. V., Russo J. J., Sander C., Tuschl T., Kandel E. 2009. Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron*. **63**: 803-817.
- Rakic P. 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci*. **10**(10):724-735.

Rash B. G., Frove E. A. 2006. Area and layer patterning in the developing cerebral cortex. *Curr Opin Neurol.* **16**: 25-42.

Saito T. 2006. *In vivo* electroporation in the embryonic mouse central system. *Nat Prot.* **1**(3): 1552-1558.

Schratt G. 2009. microRNAs at the synapse. *Nat Rev Neurosci.* **10** (**12**):842-849.

Sena-Estevez M., Tebbets J. C., Steffens S., Crombleholme T., Flake A. W. 2002. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. *J Virol Methods.* **122**:131-139.

Sholl D. A. 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat.* **87**(4): 387-406.

Siomi H., Siomi M. C. 2010. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell.* **38**(3): 323-332.

Smirnova L., Grafe A., Seiler A., Schumacher S., Nitsch R., Wulczyn G. 2005. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J of Neurosc.* **21**:1469-1477.

Visvanathan J., Lee S., Lee B., Lee J.W., Lee S-K. 2007. The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev.* **21**:744-749.

Vo N., Klein M. E., Varlamova O., Keller D. M., Yamamoto T., Goodman R. H., Impey S. 2005. A cAMP response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**(45): 16426-16431.

Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R.I., Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* **11**(3):228-234.

Xu X-L., Li Y., Wang F., Gao F-B. 2008. The steady-state level of the nervous-system-specific microRNA-124a is regulated by dFMR1 in *Drosophila*. *J Neurosci.* **28**(46): 11883-11889.

Yu J-Y., Chung K-H., Deo M., Thompson R.C., Turner D.L. 2008. microRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Exp Cell Res.* **314**: 2618-2633.

Zhao Y., Srivastava D. 2007. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci.* **32** (4): 189-197.