



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO
PROGRAMA DE GRADOS ACADEMICOS

**"Presencia de mRNA de canales de sodio activados
por potencial en axones de nervio periférico y
cultivos de DRG embrionario de rata"**

M. JAVIERA FRESNO RIVAS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOMEDICAS
MENCION NEUROCIENCIAS

Director de Tesis: Prof. Dr. Andrés Couve Correa.

2014

1. Índice

| | Página |
|---|---------------|
| 2. Resumen | 4 |
| 3. Abstract | 6 |
| 4. Introducción | 8 |
| 4.1 Las neuronas: células altamente polarizadas..... | 8 |
| 4.2 Transporte de proteínas en axones periféricos (ruta canónica)..... | 9 |
| 4.3 Presencia de síntesis de proteínas a nivel axonal..... | 10 |
| 4.4 La ruta secretoria en axones periféricos..... | 13 |
| 4.5 Canales activados por potencial y la trasmisión del impulso nervioso..... | 14 |
| 4.6 Canales de sodio activados por potencial y la regulación de su expresión axonal durante el desarrollo | 15 |
| 5. Hipótesis | 17 |
| 6. Objetivo General | 17 |
| 6.1. Objetivos Específicos | 17 |
| 6.1. 1 Determinar la presencia de mRNA de NaVs en nervio ciático de rata..... | 17 |
| 6.1.2 Determinar la presencia de mRNA de NaV en axones de cultivo de DRG embrionario de rata..... | 18 |
| 7. Materiales y Métodos | 19 |
| 7.1 Diseño de partidores | 19 |
| 7.2 Extracción de muestras de cerebro de rata..... | 23 |
| 7.3 Extracción de RNA..... | 23 |
| 7.3.1 Extracción de RNA con técnica del Trizol..... | 23 |
| 7.3.2 Extracción de RNA con RNAqueous®-Micro Kit..... | 24 |
| 7.4 Medición de presencia de mRNA en espectrofotómetro..... | 25 |
| 7.5 Tratamiento con Dnasa..... | 25 |
| 7.6 Transcripción Reversa..... | 26 |
| 7.6.1 Kit ImProm-II™ Reverse Transcription System..... | 26 |
| 7.6.2. Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR..... | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 7.7 Reacción de PCR..... | 27 |
| 7.8 Protocolo extracción y cultivo de DRG embrionarios..... | 33 |
| 7.8.1 Colagenización de placas..... | 33 |
| 7.8.2 Extracción DRGs..... | 34 |
| 7.8.3 Adición de medio suplementado..... | 38 |
| 7.9 Técnica de desomatización de los explantes..... | 39 |
| 7.10 Control con Inmunohistoquímica..... | 40 |
| 8. Resultados..... | 41 |
| 8.1 Existe presencia de mRNA de NaV en nervio ciático de rata..... | 41 |
| 8.1.1 Diseño de partidores..... | 41 |
| 8.1.2 Establecimiento de condiciones experimentales en cerebro de rata..... | 42 |
| 8.1.3 Establecimiento de condiciones experimentales en nervio ciático de rata.... | 44 |
| 8.1.4 Determinación y amplificación a través de la técnica RT-PCR de presencia de mRNA de NaV _{1.6} en muestras de nervio ciático de rata..... | 45 |
| 8.2 Existe presencia de mRNA de NaV en axones de cultivo de DRG embrionario.. | 47 |
| 8.2.1 Implementación de la técnica de cultivo de explantes de DRG de embriones de rata de 15 días de gestación (E15)..... | 47 |
| 8.2.2 Implementación la técnica de RT-PCR en explantes de DRG utilizando los partidores diseñados en el objetivo I.I..... | 49 |
| 8.2.3 Implementación de la técnica de desomatización de los explantes de DRG cultivados..... | 51 |
| 8.2.4 Extracción de mRNA a partir explantes de DRG desomatizados a los 6 y 14 días de crecimiento..... | 54 |
| 8.2.5 Determinación y amplificación de la presencia de mRNA de NaV _{1.6} en explantes de DRG desomatizados a los 6 y 14 días de crecimiento..... | 56 |
| 9. Resumen de Resultados..... | 60 |
| 10. Conclusión..... | 61 |
| 11. Discusión..... | 62 |
| 12. Proyección..... | 67 |
| 13. Referencias Bibliográficas..... | 68 |

2. Resumen

Las neuronas son células del sistema nervioso que están altamente diferenciadas y morfológicamente polarizadas en dominios axonales y somatodendríticos, características que sustentan sus funciones. Tanto el establecimiento como la mantención de la polaridad y arquitectura neuronal involucran la coordinación y regulación de su maquinaria de síntesis, secreción y transporte de proteínas.

El transporte axonal lento y rápido han sido postulados como los principales mecanismos para proveer de nuevas proteínas sintetizadas en el soma al axón y sus terminales. Sin embargo, la existencia de síntesis, transporte y procesamiento proteico ha sido ampliamente descrito a nivel dendrítico, y en la última década ha aumentado la evidencia de la maquinaria biosintética en axones mielinizados.

La rápida conducción de los potenciales de acción en axones mielinizados depende de la adecuada formación de los nodos de Ranvier. Estos nodos se caracterizan por una alta densidad de canales de sodio activados por potencial (NaVs), responsables de la generación y propagación del potencial de acción en células excitables. De los nueve tipos de NaVs que han sido identificados en mamíferos, los NaV_{1.2} se expresan en el segmento inicial del axón y en nodos inmaduros, principalmente en axones no mielinizados, mientras que los NaV_{1.6} son los que están presentes ampliamente a nivel del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), específicamente a nivel de nodos maduros lugar donde se encuentran en gran concentración. Dicha expresión axonal es altamente regulada durante el desarrollo. A pesar de su rol fundamental en la transmisión del impulso eléctrico los mecanismos que controlan su tráfico intracelular, inserción en la membrana plasmática y su concentración en los nodos de Ranvier no han sido totalmente esclarecidos.

El objetivo de esta tesis es determinar la presencia de mRNA de NaV_{1.6} *ex vivo* e *in vitro* a nivel axonal en el SNP, pues esto permitirá evidenciar la posibilidad de síntesis local de estos canales como una respuesta más rápida y efectiva ante estímulos locales en nervios de gran longitud.

Como conclusión general se puede afirmar que existe presencia de mRNA de canales de sodio activados por potencial en axones periféricos de nervio de rata. Más aun, dicha presencia axonal está de acuerdo con la expresión regulada durante el desarrollo de NaV_{1.2} y NaV_{1.6} descrita previamente.

3. Abstract

Neurons are the excitable cells from our central nervous system; they are highly differentiated and morphologically polarized in axonal and somatodendritic domains. These domains sustain neural function. The generation and maintenance of neuronal polarity and architecture involve the coordinated regulation of protein synthesis, secretion and transport.

Fast and slow axonal transport has been proposed as the main mechanisms that provide new proteins to the axon and its terminals. However, although the existence of synthesis, transport and processing of proteins have been thoroughly described in dendrites, during the past decade a body of evidence has accumulated regarding the biosynthetic machinery in myelinated axons.

The conduction speed of action potentials along myelinated axons depends on the appropriate formation of the nodes of Ranvier. These have a high density of voltage gated sodium channels (NaVs), responsible for the generation and spreading of action potentials in excitable cells. Nine types of NaVs have been identified in mammals; NaV_{1.2} is present at the axon initial segment and in immature nodes, mainly in unmyelinated axons, whereas NaV_{1.6} is present both in the central and peripheral nervous systems, specifically in mature nodes where they localize in high density. Axonal expression of NaVs is highly regulated during development. Even though NaVs have a fundamental role during the conduction of electrical impulses, the mechanisms controlling their intracellular traffic, insertion at the plasma membrane and concentration at nodes of Ranvier have yet to be completely elucidated.

The aim of this thesis is to determine the presence of NaV_{1.6} mRNA *ex vivo* and *in vitro* in axons of the peripheral nervous system, which will provide additional evidence for the local synthesis of these ion channels, as a means to achieve faster and more effective responses to local stimuli in long nerve.

We conclude that NaV mRNA is present in axons of peripheral nerves in the rat. Furthermore, in our culture system the regulation of mRNA for NaV is in agreement with the reported developmental regulation of NaV_{1.2} and Nav_{1.6}.

4. Introducción

4.1 Las neuronas: células altamente polarizadas

Las neuronas son un tipo de células del sistema nervioso cuya principal característica es la excitabilidad de su membrana plasmática; están especializadas en la recepción de estímulos y la conducción del impulso nervioso (en forma de potencial de acción) entre ellas o con otros tipos celulares, como por ejemplo las fibras musculares. Las neuronas son células altamente diferenciadas y morfológicamente polarizadas en dominios axonales y somatodendríticos, características que sustentan sus funciones. Tanto la mantención como el establecimiento de la polaridad neuronal involucran la coordinación y regulación de la maquinaria de síntesis, secreción y transporte de proteínas¹.

La síntesis de proteínas es un proceso que comienza con el paso de la información genética del ADN al ARN mensajero (mRNA). Tras el proceso de maduración del mRNA, éste abandona el núcleo y en el citoplasma se une a ribosomas libres o unidos al retículo endoplásmico (RE) donde ocurre su traducción para generar proteínas citoplasmáticas o de secreción y membrana respectivamente².

Las proteínas de secreción y de membrana trafican a través del aparato secretor celular, responsable de la síntesis, modificación y distribución de estas proteínas. Lo componen fundamentalmente el RE, los sitios de salida del RE (ERES), el compartimento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi (ERGIC), el aparato de Golgi, vesículas post-Golgi, y una ruta de reciclaje-degradativa constituida por los endosomas y lisosomas¹⁻³. La arquitectura única y el tamaño de las neuronas no implica necesariamente que la relación estructura/función de estos organelos y su contribución al proceso secretor sea diferente que en otros tipos de células. Sin embargo, su disposición espacial y la contribución al procesamiento local puede estar especialmente adaptado a las complejidades de la morfología neuronal con el fin de distribuir adecuadamente las proteínas maduras hacia sus lugares de destino

3-4

4.2 Transporte de proteínas en axones periféricos (ruta canónica)

Durante muchos años los mecanismos de transporte axonal lento y rápido han sido entendidos como las principales estrategias celulares para proveer de nuevas proteínas al axón ⁵.

El transporte de organelos, enzimas, agregados macromoleculares y metabolitos, es una función del axoplasma en la cual intervienen directamente los microtúbulos y ocurre en dos direcciones: anterógrado, desde el soma neuronal hacia el terminal axonal y retrógrado desde los botones terminales hacia el soma neuronal. Estudios de trazas radioactivas han revelado que el desplazamiento de proteínas a través del axón podría ser dividido en dos grandes grupos dependiendo de su velocidad ⁶. El transporte axonal rápido ocurre con proteínas asociadas a vesículas y organelos membranosos a una velocidad de $\sim 1 \mu\text{m}/\text{seg}$ ⁷. En el flujo anterógrado rápido las moléculas de kinesina, desplazan sus cargos desde el extremo (-) del microtúbulo, ubicado en el pericarion, hacia su extremo (+). En el flujo retrógrado rápido son principalmente las moléculas asociadas al complejo molecular de la dineína las que se desplazan interactuando con la tubulina, desde el extremo (+) del microtúbulo, ubicado en el terminal axónico hacia su extremo (-). Por lo tanto, el transporte de proteínas en vesículas post-Golgi es mediado por microtúbulos y motores moleculares ⁸⁻⁹. Las proteínas que no pasan por la ruta secretoria, entre las que se incluyen proteínas citosólicas, citoesqueléticas y otros complejos macromoleculares viajan en lo que se ha denominado tradicionalmente transporte axonal lento a una velocidad de $\sim 0.001-0.1 \mu\text{m}/\text{seg}$ ⁷ y trafican por mecanismos que no están totalmente establecidos. Sin embargo, recientemente se ha propuesto un modelo en el que las proteínas citosólicas son transportadas mediante una asociación dinámica, directamente o indirectamente, a vesículas y motores moleculares sujetos al transporte axonal rápido ¹⁰⁻¹¹

. 4.3 Presencia de síntesis de proteínas a nivel axonal

Existe abundante evidencia que apoya el transporte axonal convencional. La visión general del axón como transmisor pasivo de información puede haber contribuido a consolidar esta visión clásica de transporte ¹². Sin embargo, los reportes de síntesis de proteínas a nivel axonal en neuronas de mamíferos se remonta a varias décadas. Los estudios iniciales sugirieron que la síntesis local de proteínas en neuronas se limitaba a las dendritas, aunque una gran cantidad de datos que describían síntesis de proteínas a nivel axonal en las neuronas de invertebrados, pues se argumentó que su polaridad incompleta permitía al mRNA difundir en estos procesos ¹³. En los pocos casos en los que se identificaron los mRNA a nivel axonal en las neuronas de vertebrados, no fueron observados ribosomas en estudios ultraestructurales, lo que planteó interrogantes sobre su real relevancia ¹⁴. Sin embargo, estudios de la última década han demostrado claramente que los axones de vertebrados, particularmente en crecimiento y los axones lesionados, contienen ribosomas, factores de traducción y mRNAs ¹⁵. Mas aún, estudios recientes han demostrado mecanismos por los cuales los mRNA se transportan y se traducen localmente en dendritas y axones de mamíferos e invertebrados, jugando un papel importante en la función neuronal ¹⁶. Utilizando análisis amplio de expresión (chip de ADN) y cámaras compartimentalizadas para investigar el repertorio completo de los mRNA transportados y localizados en axones de diferentes estados de crecimiento, Gummy y colaboradores mostraron que la regeneración de axones en neuronas de ganglios de raíz dorsal (DRG) embrionarias y adultas contienen diferentes poblaciones de mRNA que codifican a proteínas de diversas funciones, lo que implica que se producen cambios en el transporte axonal y la localización de los mRNA durante el crecimiento y el desarrollo de estos axones ¹⁶. La identificación de mRNA unidos a polisomas han proporcionado pruebas de que algunas de las proteínas detectadas mediante marcaje metabólico fueron efectivamente generadas por los ribosomas en el citoplasma axonal (axoplasma) ¹⁵.

Experimentos *in vitro* en axones mielinizados de DRG de rata demostraron la presencia de ribosomas en el segmento inicial del axón, en el axoplasma y en los nodos de Ranvier agrupados en tétradas o en grandes polisomas, frecuentemente cerca de mitocondrias y entre la red de RE liso (REL) ¹⁷. Posteriormente un estudio de microscopía electrónica utilizando ratas adultas también demostró rosetas ribosomales electrodensas con el aspecto típico ultraestructural de polisomas que se limitaban al segmento inicial del axón y no eran detectables en el eje del axón de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) ¹⁸. Esto condujo a la especulación que la síntesis de proteínas a nivel axonal se producía sólo durante el desarrollo, sin embargo estudios inmunohistológicos posteriores, demostraron que los axones del SNP maduros contenían proteínas y RNA ribosómico, formando placas periaxoplásmicas intermitentes distribuidas de manera desigual en el axoplasma cerca de la membrana plasmática ¹⁹⁻²⁰ lo cual ampliaba la opción de síntesis proteica axonal en SNP una vez terminado su desarrollo . Otros estudios *in vitro* demostraron, que neuronas sensoriales adultas que estaban condicionadas por aplastamiento axonal, podían extender rápidamente neuritas mediante la regulación de la traducción de mRNAs existentes en el axón. Esta regeneración se producía gracias a proteínas axonales, demostrando que axones en regeneración separados de los cuerpos celulares podían sintetizar activamente proteínas y contenían mRNA de β -actina y neurofilamento ligado a ribosomas. Estos hallazgos indicaron que los axones de las neuronas de mamíferos adultos podían sintetizar proteínas y sugirieron que, en algunas circunstancias, la traducción intra-axonal contribuye a la integridad estructural del cono de crecimiento en la regeneración de los axones ²¹. Es importante recalcar que la localización periférica de ribosomas, también está de acuerdo con el reciente hallazgo de una interacción directa entre los receptores de la superficie celular y ribosomas, que espacialmente restringe la traducción del mRNA al sitio en el que se recibe una señal extrínseca, por lo tanto, la morfología especializada y la diversa distribución de ribosomas axonales puede haber hecho difícil su identificación ultraestructural ¹².

Un primer reporte de traducción local en axones *in vivo* evaluada utilizando hibridación *in-situ* en diferentes etapas del desarrollo en neuronas corticales demostró la distribución intracelular de los mRNAs codificantes para actina, tubulina, MAP2 y GAP-43 y se describió la presencia de estos mRNA junto con la de rRNA en los axones en desarrollo y en neuritas maduras ²². También se ha demostrado la presencia de mRNAs codificantes para proteínas de membrana en axones de DRG, las cuales podrían utilizar una ruta de traducción y tráfico exocítico local ²³. Apoyando estos hallazgos, existe evidencia que indica que la maquinaria de síntesis proteica es reclutada y activada en el sistema nervioso central y periférico durante el desarrollo axonal, así como en axones periféricos luego de sufrir daño ¹⁵.

Cabe mencionar que la mayoría de los estudios realizados en traducción axonal han sido realizados en neuronas de cultivo. En este contexto, utilizando inmunofluorescencia fueron detectados factores de traducción, proteínas ribosomales, y rRNA en los axones motores de las raíces espinales ventrales, analizados después de siete días luego de una lesión por aplastamiento axonal periférica *in vivo*. Así, se demostró que las neuronas motoras adultas son también capaces de realizar síntesis de proteínas a nivel axonal *in vivo* después de la lesión en el axón ²¹. Además, varias publicaciones han demostrado que los axones aislados del cuerpo celular contienen ribosomas, factores de traducción, mRNAs, y son capaces de generar proteínas ¹²⁻²⁴.

Clave en la traducción axonal es que, en algunos casos, las proteínas sintetizadas tienen una importante función en el lugar de la traducción. Es el caso de la síntesis local de β -actina en el cono axonal y su rol en la orientación del axón ²⁵. Con herramientas genéticas se ha podido describir el transporte axonal de mRNA *in vivo* y se ha demostrado que la región 3'UTR de β -actina, cuya localización en axones mielinizados en neuronas maduras ha sido reportada ²⁶, es capaz de dirigir la localización axonal del mRNA de GFP en neuronas de DRG de ratón ²⁷.

Publicaciones recientes sobre las neuronas sensoriales, neuronas de hipocampo y axones de células ganglionares de la retina, han demostrado que cientos mRNA se localizan en los axones bajo diferentes condiciones de crecimiento ²³⁻²⁸. Estos hallazgos indican que los axones de las neuronas de mamíferos en desarrollo y adultos pueden sintetizar proteínas y sugieren que, en determinadas circunstancias, la traducción axonal contribuye a la integridad estructural del cono de crecimiento en los axones en regeneración. Sin embargo, estas funciones en las neuronas sensoriales adultas son susceptibles de ser ampliadas en la medida que aprendemos más de las proteínas generadas intra-axonalmente ¹⁴.

4.4 La ruta secretoria en axones periféricos

Lo sorprendente de la revelación de estos mRNA a nivel axonal, es que varios de éstos codifican proteínas de membrana o secretadas que necesitan acceso al RE y aparato de Golgi. Sin embargo, los estudios previos de microscopía electrónica no han podido demostrar la presencia ultraestructural clásica del retículo endoplasmático rugoso (RER) y del aparato de Golgi en los axones, pues de estar estos organelos presentes tendrían una conformación adaptada a las necesidades axonales ¹⁷⁻²¹. En contraste con las dificultades en la detección de la maquinaria de síntesis de proteínas en los axones de vertebrados, varios estudios en preparaciones neuronales en invertebrados realizados en la década de 1970 sugirieron que sus procesos axonales expresaban componentes de la maquinaria sintética de proteínas incluyendo ribosomas y REL ²⁹.

Tsukita e Ishikawa en el año 1976 realizaron una descripción detallada del REL en axones mielinizados de nervios periféricos de rata. Lo describieron como una red tridimensional continua que recorre el axón principalmente de manera adyacente a la membrana plasmática, mientras en los nodos de Ranvier, presenta estructuras tubo-vesiculares libres diferentes a las encontradas en las zonas internodales caracterizadas por la ausencia de éstas ³⁰.

Por otra parte, existe evidencia contradictoria sobre la presencia de aparato de Golgi en axones periféricos. En este sentido, cultivos de DRG de rata poseerían componentes axonales del RE y del complejo de Golgi necesarios para la síntesis y secreción de proteínas ³¹. Recientemente se ha demostrado que axones en desarrollo de células ganglionares de la retina tienen equivalentes funcionales de RER y el aparato de Golgi, como también estudios *in vivo* en axones del SNP con marcadores de señales de reconocimiento de partículas han evidenciado la presencia de RER, ER y aparato de Golgi ¹⁴. Sin embargo, la evidencia proveniente de estudios de microscopía electrónica sólo ha descrito estructuralmente la presencia de REL, ribosomas y mitocondrias en axones periféricos ²⁹⁻³⁰⁻³².

4.5 Canales activados por potencial y la transmisión del impulso nervioso

Los axones mielinizados pueden ser divididos estructuralmente en segmento inicial del axón, nodos de Ranvier, paranodos, juxtapanodos e internodos, cada uno de los cuales presenta un conjunto característico de proteínas ³³. La rápida conducción de los potenciales de acción en axones mielinizados depende de la adecuada formación de los nodos de Ranvier, interrupciones periódicas de la vaina de mielina espaciados a intervalos de aproximadamente 100 veces el diámetro axonal ³⁴. Estos nodos y el segmento inicial del axón presentan una composición molecular similar, pues ambos se caracterizan por tener una alta densidad de canales de sodio activados por potencial (NaVs) ³⁵⁻³⁶. A ambos lados del nodo se encuentra la región paranodal y contiguo a ésta por debajo de la mielina compacta se encuentra el juxtapanodo. Por último, la región intermodal, localizada entre dos juxtapanodos, corresponde a la región más extensa de esta organización y la de mayor interacción entre el axón y la glía ³³. Canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de potencial se agrupan principalmente en la región nodal/juxtapanodal y median las corrientes transmembrana necesarias para una rápida conducción saltatoria ³⁷.

A nivel juxtapanodal se ha descrito una alta concentración de canales de potasio dependientes de potencial (KVs), específicamente $KV_{1.1}$ y $KV_{1.2}$ ³⁸. En contraste con el papel claro de los NaVs en los nodos de Ranvier, la función de estos KVs juxtapanodales ha sido más difícil de aclarar. Dos funciones principales se han propuesto. En primer lugar, los canales KVs actuarían como estabilizador directo de corriente para mantener el potencial de reposo para la totalidad nervio, por lo tanto, $Kv_{1.1}$ y $Kv_{1.2}$ podrían ser importantes proveedores del potencial de reposo internodal. En segundo lugar, estos canales de K podrían actuar como un amortiguador activo de excitación reentrante³⁹⁻⁴⁰.

Los NaVs por su parte, son responsables de la generación y propagación del potencial de acción en células excitables, entre las que se incluyen nervios, músculos y células neuroendocrinas. Algunos de ellos también se expresan en células no excitables cumpliendo un rol hasta ahora desconocido⁶.

4.6 NaVs y la regulación de su expresión axonal durante el desarrollo

Nueve tipos de NaVs han sido identificados en mamíferos según los genes codificantes de la subunidad α formadora del poro permeable a iones ($NaV_{1.1}$ - $NaV_{1.9}$)⁴¹. Las isoformas de los NaVs están diferencialmente distribuidas en los tejidos, en diferentes áreas del SNC, SNP y durante distintos periodos del desarrollo⁴². En este sentido los canales $NaV_{1.1}$ no sólo se expresan en somas y dendritas sino también en el segmento inicial del axón y en los nodos de Ranvier⁴³. $NaV_{1.2}$ se expresa en el segmento inicial del axón y en nodos inmaduros, principalmente en axones no mielinizados, mientras que $NaV_{1.6}$ está presente ampliamente a nivel de SNC y SNP, específicamente a nivel de nodos maduros, lugar donde se encuentran en gran concentración⁴⁴⁻⁴⁵. Boiko et al. confirmaron esta localización diferencial de $Nav_{1.2}$ y $Nav_{1.6}$ en células ganglionares de la retina (CGR), que poseen axones con segmentos amielínicos y mielínicos bien definidos⁴⁴, evidenciando que durante el desarrollo se produce un cambio de expresión entre $Nav_{1.2}$ y $Nav_{1.6}$ en los axones de estas células; $Nav_{1.2}$ se concentra primero en los nodos de Ranvier inmaduros y es

sustituido por Nav_{1.6} cuando los nodos maduran. Sin embargo, en la actualidad la situación parece ser más compleja. De hecho, Nav_{1.6} se expresa en los nodos de Ranvier solo o junto con Nav_{1.1} en SNC y SNP ⁴³. Por otra parte, también se han descrito nodos de Ranvier que pueden expresar Nav_{1.1}, pero no Nav_{1.6} ⁴³. La expresión durante el desarrollo de Nav_{1.1}, Nav_{1.2} y Nav_{1.6} en los nodos de neuronas de la médula espinal indica que estos tres canales pueden incluso coexistir en ciertas etapas de la maduración ganglionar ⁴³.

Entendiendo que la acumulación de Nav_{1.2} precede a la concentración de Nav_{1.6} en la CGR y en células granulares del cerebelo (GC) ⁴⁶⁻⁴⁷, estudios muestran que ratones que carecen Nav_{1.6} presentan una compensación, con la aparición de la expresión de otros tipos NAVs, pero se requieren estudios adicionales para una mejor comprensión de los mecanismos que median dichos complejos cambios y de la respectiva relevancia fisiológica de cada patrón de expresión ⁴⁸.

Como podemos ver, a pesar del rol fundamental que juegan los NaVs en la transmisión del impulso eléctrico, los mecanismos que controlan su tráfico intracelular, inserción en la membrana plasmática y su concentración en los nodos de Ranvier no están totalmente esclarecidos.

5. Hipótesis

Existe presencia de mRNA de canales de sodio activados por potencial en axones de nervios periféricos de rata.

6. Objetivo General

Determinar la presencia de mRNA de canales de sodio activados por potencial en axones de nervios periféricos de rata.

6.1 Objetivos Específicos

6.1.1 Determinar la presencia de mRNA de NaVs en nervio ciático de rata.

6.1.1.1- Diseñar partidores específicamente contra NaV_{1.6} y contra los controles KV_{1.1}, KV_{1.2}, PanNaV, NaV_{1.2}, NFH, β -Actina, P0 y MAP2.

6.1.1.2- Establecer condiciones experimentales en extracto de cerebro total de rata, para desarrollar la técnica RT-PCR con los partidores diseñados en el objetivo anterior.

6.1.1.3.- Establecer condiciones experimentales en nervio ciático de rata, para desarrollar la técnica RT-PCR con los partidores diseñados en el objetivo específico 1.1

6.1.1.4.- Determinar y amplificar a través de la técnica RT-PCR la presencia de mRNA de NaV_{1.6} en muestras de nervio ciático de rata.

6.1.2 Determinar la presencia de mRNA de NaV en axones de cultivo de DRG embrionario de rata.

6.1.2.1.- Implementar la técnica de cultivo de explantes de DRG de embriones de rata de 15 días de gestación (E15).

6.1.2.2.- Implementar la técnica de RT-PCR en explantes de DRG utilizando los partidores diseñados en el objetivo 6.1.1.1.

6.1.2.3.- Implementar la técnica de desomatización de los explantes de DRG cultivados.

6.1.2.4.- Realizar la extracción de mRNA a partir explantes de DRG desomatizados a los 6 y 14 días de crecimiento.

6.1.2.5.- Determinar y amplificar la presencia de mRNA de NaV_{1.6} en explantes de DRG desomatizados a los 6 y 14 días de crecimiento.

7. Materiales y Métodos

7.1 Diseño de partidores.

Para el diseño de partidores se consideró la secuencia nucleotídica del canal NaV_{1.6} y de sus controles publicados en Pubmed. Se utilizó el programa Prime 3 y posteriormente fueron probados en los programas Blast y Primer Blast.

NaV_{1.6}: Se diseñó un par de partidores capaces de unirse específica y exclusivamente a la secuencia publicada en Pubmed de NaV_{1.6} pues se ha demostrado que esta proteína se expresa en el segmento inicial del axón y en nodos de Ranvier maduros de axones mielinizados (Fig. 1.A) ⁴⁴⁻⁴⁵.

NaV_{1.2}: También se diseñó un par de partidores capaces de unirse específica y exclusivamente a la secuencia nucleotídica publicada en pubmed de NaV_{1.2} pues se ha demostrado que esta proteína se expresa en el segmento inicial del axón, en nodos de Ranvier inmaduros y en axones no mielinizados (Fig. 1.B) ⁴⁴⁻⁴⁵.

PanNaVs: Como se ha demostrado que la mayoría de los NaVs se expresan en cerebro y nervio periférico ⁶, diseñamos un par de partidores capaces de amplificar todos los canales NaVs descritos hasta hoy (NaV1.1-1.9). El diseño lo realizamos tomando en cuenta los segmentos conservados en estos nueve canales después de haber hecho un alineamiento nucleotídico de sus secuencias publicadas en Pubmed (Fig. 1.C).

KV_{1.1} : Como un control positivo se diseñó un par de partidores contra este canal de potasio dependiente de potencial dado que se expresa en regiones yuxtaparanodales e internodales en axones del SNC y SNP (Fig. 1.D) ³⁷⁻⁴⁰.

KV_{1.2}: Como otro control positivo se diseñó un par de partidores contra este canal de potasio dependiente de potencial dado que también se expresa en regiones yuxtaparanodales e internodales en axones del SNC y SNP(Fig. 1.E) ³⁷⁻⁴⁰.

β -Actina: Siendo una de las seis diferentes isoformas de actina que han sido identificadas en los seres humanos y ésta una proteína muy bien conservada y implicada en la motilidad, integridad y estructura celular por lo que se encuentra en gran cantidad a nivel axonal ⁴⁹. Se diseñó un par de partidores contra β -Actina pues se ha descrito que se sintetiza localmente en axones periféricos in vivo ²⁶ por lo que la utilizamos como control positivo en la búsqueda de presencia de mRNA de canales NaVs en axones periféricos y cultivos de DRG embrionarios de rata (Fig. 1.F).

MAP2: Al pertenecer a la familia de proteínas asociada a microtúbulos, las proteínas de esta familia participan en el ensamblaje de los microtúbulos, y su presencia se ha descrito exclusivamente a nivel somatodendrítico ⁵⁰, por lo que se diseñaron un par de partidores contra esta proteína como control negativo a la hora de realizar los experimentos de PCR en axones de nervio ciático y cultivos de DRG embrionarios de rata (Fig. 1.G).

NFH: Esta proteína de neurofilamento de alto peso molecular está presente exclusivamente a nivel de axonal y no en células de Schwann, además se ha descrito su síntesis local en axones periféricos ⁵¹, por lo que se diseñaron un par de partidores contra esta proteína como un control de positivo axonal (Fig. 1.H).

P0: La proteína de mielina 0 es una glicoproteína transmembrana, componente principal de la vaina de mielina a nivel de sistema nervioso periférico ⁵² y por lo tanto se diseñó un par de partidores contra ella como control de pureza para comprobar ausencia de contaminantes gliales (Fig. 1.I).

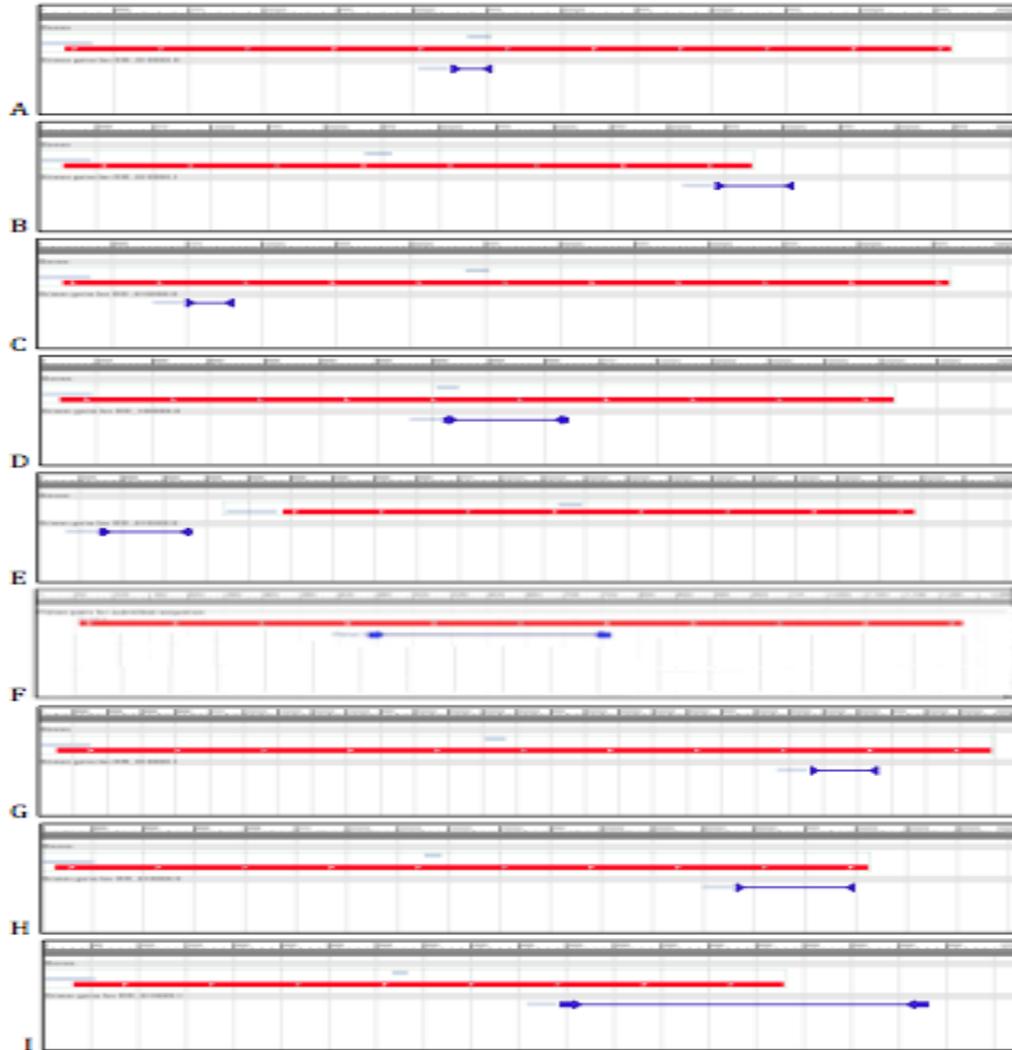


Fig 1: Diseño de partidores.

A: Partidores (línea azul) diseñados para amplificar el canal de sodio activado por potencial 1.6 ($\text{NaV}_{1.6}$). B: Partidores (línea azul) diseñados para amplificar el canal de sodio activado por potencial 1.2 ($\text{NaV}_{1.2}$). C: Partidores (línea azul) diseñados para amplificar cualquiera los canales de sodio activado por potencial (PanNaV_s) descritos hasta el momento. D: Partidores (línea azul) diseñados para amplificar el canal de potasio activado por potencial 1.1 ($\text{KV}_{1.1}$). E: Partidores (línea azul) diseñados para amplificar el canal de potasio activado por potencial 1.2 ($\text{KV}_{1.2}$). F: Partidores (línea azul) diseñados para amplificar β -Actina. G: Partidores (línea azul) diseñados para amplificar la proteína 2 asociada a microtúbulos MAP2. H: Partidores (línea azul) diseñados para amplificar neurofilamento de alto peso molecular (NFH). I: Partidores (línea azul) diseñados para amplificar proteína de mielina 0 (P0).

| Genes | Banco de Genes ID | Tamaño Amplicón (pb) | Tamaño Partidor (pb) | Temperatura Alineación (°C) | Posición de Hibridación | %GC | Secuencia Partidor |
|--------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------|-------|----------------------|
| NaV_{1.6} | L39018.1 | 261 | 20 (f) | 53,75 | 859-878 | 45 | CCCATAAACTTCAACGAGAG |
| | | | 20 (r) | 53,79 | 1119-1100 | 45 | CCAATAGTCCTGGGTCATAA |
| PanNaVs | Sec Cnsv | 213 | 19(f) | 54,82 | 2616-2634 | 63,16 | CAACCTGACCCTGGTGCTG |
| | | | 20(r) | 55,19 | 2828-2809 | 55 | ACCTCCATGCAGTCCCACAT |
| NaV_{1.2} | NM_012647 | 597 | 20(f) | 56,3 | 5957-5976 | 55 | ACAGGCGGTATCTCCTGAAG |
| | | | 20(r) | 56,4 | 6553-6534 | 50 | ACTTTCCTCCCGTTTCCAT |
| KV_{1.1} | NM_173095.3 | 220 | 20(f) | 55,1 | 721-740 | 45 | CATCTGGTTCTCTTTTGAGC |
| | | | 20(r) | 55 | 940-921 | 45 | GATTCTGAACACCCTTACCA |
| KV_{1.2} | NM_012970.3 | 215 | 20(f) | 54,9 | 148-167 | 50 | CTGTGCATCTTACCTCCTTC |
| | | | 20(r) | 55 | 362-343 | 45 | ACACAAATAGGCAGCTCAGT |
| β-Actina | NM_031144.2 | 320 | 20(f) | 54,74 | 441-460 | 45 | CCAGATCATGTTTGAGACCT |
| | | | 20(r) | 56,11 | 760-741 | 50 | TCTCTTGCTCGAAGTCTAGG |
| NF-H | NM_012607.2 | 451 | 20(f) | 55,40 | 2736-2755 | 50 | CAAAGACAGAGGTGAAGGAG |
| | | | 20(r) | 57,69 | 3186-3167 | 50 | TGGTCTGTGCTAGAGGACTT |
| MAP2 | NM_013066.1 | 354 | 20(f) | 56,17 | 4544-4563 | 50 | ACTCTCCTCCAGGAAACTC |
| | | | 20(r) | 57,04 | 4897-4878 | 50 | ATCCAGGGGTAGTAGGTGTT |
| P0 | NM_017027.1 | 835 | 20(f) | 57,24 | 545-564 | 50 | CTGCTGTTGCTCTTCTACCT |
| | | | 20(r) | 56,57 | 929-910 | 50 | TCTTGAGGCTGGTTCTACTG |

Tabla 1: Partidores para RT-PCR.

Partidores diseñados utilizando el programa Prime 3 y posteriormente probados en Blast y Primer Blast.

7.2 Extracción de muestras de cerebro de rata

Se sacrificó una rata macho Sprague-Dawley de 100 gr. por aspiración de isofluorano. Se expuso cuidadosamente su masa encefálica y fue extraída quirúrgicamente una muestra de corteza frontal en forma de cuña de aproximadamente 5mm. Posteriormente esta muestra fue congelada a -80 °C durante 24 hrs. para luego proceder a la extracción del mRNA .

7.3 Extracción de RNA

7.3.1 Extracción de RNA con técnica del Trizol

Se realizó la extracción de RNA según la técnica del Trizol siguiendo el siguiente protocolo.

- 1.- Se tomó la muestra de tejido de cerebro de rata con una espátula pequeña cuidando no dañarlo.
- 2.- Se agregó 1 % de Tritón en PBS 1X (10 ml de PBS + 100 µl Tritón) en alícuotas de 50 µl hasta obtener una muestra homogénea, manteniendo la cadena de frío.
- 3.- Se agregó 750 µl de Trizol. La muestra homogenizada se traspasó a un nuevo tubo Eppendorf.
- 4.- Se Agregó 200 µl cloroformo y se agitó dos veces durante 10 seg en un vortex para luego dejar en hielo por 3 min.
- 5.- Se centrifugó 10 min. a 12000g a 4°C y se colectó la fase acuosa, cuidando no tocar la zona blanca donde se encuentra el ADN genómico ni el pellet donde están los restos y Trizol. Se agregó 500 µl de isopropanol, invirtiendo cuidadosamente el tubo y se dejó a -20°C toda la noche (O.N). Además se agregó 2µl glicógeno (glicoblue) para aumentar precipitación de RNA.
- 6.- Se centrifugó por 20 min. a 12000g a 4°C y retiró todo el líquido sobrenadante (si se tiene una buena cantidad de RNA podía observarse un pellet al fondo del tubo).

7.- Se agregó 1 ml de etanol 70 % cuidadosa y lentamente, para luego invertir el tubo.

8.-Se centrifugó 5 min. a 10000g a 4°C y se retiró nuevamente sobrenadante, eliminando lo más posible de etanol.

9.-Se resuspendió el pellet en 25 µl de H₂O DEPC.

7.3.2 Extracción de RNA con RNAqueous®-Micro Kit

Se utilizó este kit debido a que permite el aislamiento de RNA a partir de tamaños mínimos de muestra y de cultivos menores a 5×10^5 células, según el siguiente protocolo.

1.- El cultivo celular fue lavado con solución salina tamponada con PBS antes de la disrupción. Para lavarlo se aplicó 1 ml de PBS al 1X y luego se eliminó completa y cuidadosamente este líquido.

2.- Luego se añadió al menos 100 µl de solución de lisis a cada placa y fueron selladas y llevadas a - 4°C manteniéndolas en un agitador por 5 min.

3.- Por cada 100 µl de solución de lisado se agregó 50 µl de etanol 100% agitándolo brevemente y a fondo.

4.- Se fue cargando la mezcla de lisado + etanol (hasta 150 µl cada vez) en un tubo con su respectivo microfiltro y se centrifugó a máxima velocidad y a temperatura de ambiente, repitiendo este paso hasta que la totalidad de la mezcla hubiera pasado por el filtro.

5.- Posteriormente se abrió el cartucho del microfiltro y se añadió 180 µl de solución de lavado 1, se centrifugó durante aproximadamente 10 segundos para hacerla pasar completamente a través del filtro.

6.- Se abrió el cartucho del microfiltro y se añadió 180 µl de solución de lavado de 2/3, se centrifugó durante aproximadamente 10 segundos para hacerla pasar nuevamente a través del filtro. Este paso se repitió una vez más.

7.- Se retiró el cartucho de filtro del tubo de colección y se eliminó todo el contenido, luego se cerró la tapa y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto para extraer el líquido residual y secar el filtro.

8.- Se etiquetó un tubo de microelución (tubos de 1,5 ml que también se suministran con el kit) y transfirió el cartucho del microfiltro en ella.

9.- Se aplicó 5-10 μ l de solución de elución, precalentado a 75 ° C, en el centro del filtro se cerró muy bien la tapa y incubó durante 1 min. a temperatura ambiente. Luego se centrifugó el conjunto por 30 segundos para eluir el RNA del filtro.

10.- Se repitió el procedimiento con una segunda alícuota de 5-10 μ L de solución de elución precalentada, recogiendo el RNA eluido en el mismo tubo.

7.4 Medición de presencia de RNA en espectrofotómetro

La medición de RNA de cerebro se realizó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260 en dilución 1/100. Para conocer la concentración de RNA se utilizó la siguiente fórmula: $RNA = A^{260} \cdot 40 \cdot 100$.

7.5 Tratamiento con Dnasa

Cada vez que se realizó extracción de RNA y con el objetivo de eliminar el DNA genómico proveniente de la muestra, realizamos un tratamiento con DNasa (Ambion, cat # 1906) siguiendo el siguiente protocolo.

1.- Se agregó 2 μ l de 10x DNase I Buffer + 1 μ l de Dnase I (2 U/ μ l).

2.- Luego incubamos a 37°C por 30 min.

3.- Para detener la reacción se agregó a la mezcla 2 μ l de Dnase I Inactivation Reagent y se incubó por 2 min. a temperatura ambiente con agitación ocasional.

4.- Finalmente se centrifugó a 10.000xg por 2 min. a temperatura de ambiente y se extrajo el sobrenadante con el cual se realizó el proceso de transcripción reversa.

7.6 Transcripción Reversa

7.6.1 Kit ImProm-II™ Reverse Transcription System

En los casos en los cuales se obtuvo una concentración mayor o igual a 0,8 µg/µl de mRNA, el proceso de retrotranscripción o transcripción reversa se realizó según el siguiente protocolo.

- 1.- Se agregó por cada 0,8 µg de mRNA 1µl de oligo primers y agua sin nucleasa necesaria para completar el volumen de 5 µl (Tabla 2).
- 2.- La mezcla se incubó a 70°C por 5 min. y luego a 4°C por 5 min.
- 3.- Luego se agregó 15 µl de mezcla RT (Tabla 3). La mezcla se incubó a 25 °C por 5 min. y a 42°C por 60 min.
- 4.- Para detener la reacción se incubó a 70°C por 15 min.

* De forma paralela se separó una alícuota en la cual se sustituyó la enzima transcriptasa reversa por H₂O sin nucleasa, para verificar que no hubiera contaminación con DNA genómico que pudiera arrojar falsos positivos.

7.6.2. Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR

En los casos en los cuales se obtuvo una concentración menor a 0,8 µg/µl de mRNA, el proceso de retrotranscripción se realizó utilizando un kit que permitiera realizar este proceso a partir de cantidades totales de mRNA que podían variar entre 1pg a 5 µg/µl según el siguiente protocolo.

- 1.- Se agregó por cada 0,2 µg/µl de mRNA 1µl de oligo primers, 1µl de dNTPmix y agua DEPC para completar el volumen de 10 µl (Tabla 4).
- 2.- La mezcla se incubó a 65°C por 5 min. y luego se puso en hielo al menos por 1 min.
- 3.- Luego se agregó 10 µl de mix RT (Tabla 5) y tras una suave mezcla y centrifugación se incubó a 50 °C por 50 min. y a 85°C por 5 min.

* En forma paralela se separó una alícuota en la cual se sustituyó la enzima Super Scrip® III RT por H₂O sin nucleasa, para verificar que no hubiera contaminación con DNA genómico que pudiera arrojar falsos positivos.

4.- Se terminó la reacción dejando a 85°C por 5 minutos y dejando en hielo.

5.- Se reunió la mezcla tras una suave centrifugación a la cual que se agregó 1µl de Rnasa H para luego incubarlo por 20 minutos a 37°C.

El cDNA obtenido fue utilizado inmediatamente para el PCR y/o almacenado a -20 °C.

7.7 Reacción de PCR

La concentración de cDNA utilizada en el PCR fue de 2 µg totales en un volumen final de reacción de 25,5 µl. Esta reacción se realizó utilizando los partidores forward (F) y reverse (R) para NaV_{1.6} y para cada uno de los controles. Los detalles de la reacción se encuentran en la Tabla 6.

Para la realización del PCR se utilizó un termociclador Multigene Optimax (Labnet USA), a una temperatura de denaturación de 95°C por 5 min. y luego 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 50°C por 30 seg y 72°C por 45 seg para el alineamiento, elongación y amplificación respectivamente. Finalmente se mantiene a 72°C por 10 min. con el fin de lograr una extensión final.

| Componentes | Volumen (μl) |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Random primers (5μg/μl) (Promega) | 1 |
| mRNA | Volumen suficiente para 0,8μg |
| H ₂ O sin nucleasa | Variable para volumen final |
| Volumen Total | 5 |

Tabla 2: Componentes de mezcla I para la RT Kit ImProm-II™

En la tabla se observan cada uno de los componentes utilizados para realizar la primera mezcla para llevar a cabo la Transcripción Reversa.

| Componentes del mezcla RT | Volumen x1 (μl) |
|---|-----------------|
| H ₂ O sin nucleasa | 5,75 |
| Buffer 5X RT (Promega) | 4 |
| 25mM MgCl ₂ | 3 |
| 10mM dNTPs | 0,75 |
| RNAasa out (Promega) | 0,5 |
| Transcriptasa Reversa Improm II (Promega) | 1 |
| Volumen Total del Mix | 15 |

Tabla 3: Componentes de la mezcla II para la RT Kit ImProm-II™

En la tabla se observan cada uno de los componentes utilizados para llevar a cabo la Transcripción Reversa.

| Componentes | Volumen (μl) |
|------------------------------|-------------------------------|
| mRNA | Volumen suficiente para 0,2μg |
| 50μM oligo(dT) ₂₀ | 1 |
| 10 mM dNTPmix | 1 |
| Agua DEPC | Volumen suficiente para 10μl |
| Volumen Total | 10 |

Tabla 4: Componentes de mezcla I para la RT Kit SuperScript®

En la tabla se observan cada uno de los componentes utilizados para realizar la primera mezcla para llevar a cabo la Transcripción Reversa.

| Componentes del mezcla RT | Volumen x1 (μ l) |
|--------------------------------------|-----------------------|
| 10X RT Buffer | 2 |
| 25mM MgCl ₂ | 4 |
| 0,1 M DTT | 2 |
| RNAasaOUT™(40 U/ μ l) | 1 |
| Super Scrip® III RT (200 U/ μ l) | 1 |
| Volumen Total del Mix | 10 |

Tabla 5: Componentes de la mezcla II para la RT Kit SuperScript®

En la tabla se observan cada uno de los componentes utilizados para llevar a cabo la Transcripción Reversa.

| Componentes | Volumen (μl) |
|--|--------------|
| H ₂ O sin nucleasa | 14,7 |
| Buffer PCR 10X (Promega) | 3 |
| MgCl ₂ (50 mM) (IPromega) | 0,9 |
| dNTPs (10 mM) (Promega) | 0,6 |
| Partidores: <i>Forward</i> (10 μM) (IDT) <i>Reverse</i> (10 μM) (IDT) | 0,5 0,5 |
| Taq polimerasa (Promega) | 0,3 |

Tabla 6: Componentes de la mezcla de PCR

En la tabla se observan los volúmenes de cada uno de los componentes utilizados para llevar a cabo la reacción de PCR.

7.8 Protocolo extracción y cultivo de DRG embrionarios

7.8.1 Colagenización de placas

- 1.- Todos estos procedimientos se realizan en campanas de bioseguridad.
- 2.- Se pusieron coverslips (previamente autoclavados) en pocillos de placa multiwell de 24.
- 3.- Sobre cada cover se vertió 400 μ l de polilisina 1X (stock polilisina 100X; 4 μ l polilisina 100X + 396 μ l agua, filtrar con trompo) evitando tocar las paredes, de manera de formar una gran gota (en este paso, esta maniobra no es tan importante)
- 4.- Se dejó la polilisina por 30 minutos, con la tapa del multiwell puesta y luego se lavó 2 veces (sin tiempo) con agua bidestilada autoclavada.
- 5.- Posteriormente se secó bien con la bomba de vacío y se esperó 10 minutos a que se terminara de secar con la tapa del multiwell abierta.
- 6.- Se preparó la solución de colágeno (250 μ l/cover) según la siguiente fórmula:
 - a)· Acido acético glacial (1:1000) (0,25 μ l/cover).
 - b)· Colágeno (1:100) (2,5 μ l/cover).
 - c)· Agua bidestilada autoclavada (247,25 μ l/cover).
- 7.- Se vertió 250 μ l de esta solución en cada cover, evitando tocar las paredes de manera de formar una gran gota (en este paso es CRUCIAL esta maniobra).
- 8.- Se dejó evaporar el colágeno O.N. en campana, sin tapa del *multi-well* puesta.
(*Precaución la solución sin filtrar no debe someterse a luz UV).
- 9.- Al día siguiente y una vez que se ha evaporado el colágeno y siempre en campana de bioseguridad, se taparon las placas y se envolvieron en papel Alusa Foil tratado con etanol para protegerlas de la luz y se guardaron a - 4°C.

7.8.2 Extracción DRGs

1.- Previo a la extracción se realizó medio neurobasal completo (100 ml) según la siguiente fórmula:

- a)- 2 ml B27 (stock)
- b)- 0,5 ml glutamina 200 mM.
- c)- 1 ml penicilina/streptomina 100X
- d)- 96,5 ml neurobasal.

2.- La mezcla se hizo en un vaso precipitado, y luego se filtró usando jeringa + trompo en 2 tubos falcon de 50 ml.

3.- Se puso 200 μ l por cover de medio NBS-completo en placas multiwell previamente colagenizadas, cuidando de no tocar las paredes, formando una gota en el centro del cover.

4.- Luego se vertió 4 ml de medio Leibovits (L15) en c/u de las 3 placas petri de 10 cm diámetro y 1 ml en cada una de las placas petri de 3,5 cm (2 placas por embrión).

* En paralelo, preparar campana de precultivo con lupas estereoscópicas y caja con hielo para recibir los embriones. Limpiar lupas con etanol.

5.- Se sacrificó una rata Sprague-Dawley de 15 días de gestación en pro de la ciencia por aspiración de isofluorano.

6.- Se expuso la zona del útero y se extrajeron los embriones dejándolos en 1 placa petri de 10 cm diámetro con medio L15 en hielo.

7.- Se sacaron uno a uno los embriones desde el saco vitelino y se fueron colocando en una nueva placa petri de 10 cm diámetro con medio L15 (la mitad de los embriones en una placa y la otra mitad en la otra placa restante), preocupándose que los embriones no cayeran en la placa de petri número 1.

8.- Se traspasó de a un embrión desde placa petri de 10 cm de diámetro hacia una placa petri de 3,5 cm y bajo lupa se extrajo cuidadosamente la médula espinal con los DRGs y traspasándola a una segunda placa petri de 3,5 cm para cortar los DRGs

unidos a ella. Posteriormente la médula retiró de esa placa petri dejando sólo los DRGs en la segunda placa petri de 3,5 cm (Fig. 2 y 3).

9.- En forma paralela en la 2da lupa, se fueron traspasando 2 DRGs desde la placa petri hacia cada uno de los cover de la placa *multiwell* colagenizada y se dejaron en la gota del medio.

* Estos último dos apartados se repitieron, de acuerdo al número de embriones y a la disponibilidad de cover.

10.- Finalmente se llevaron las placas colagenizadas con DRGs a la estufa a 37° C con cuidado de no mover demasiado los DRGs, y se esperó hasta el día siguiente para observar los DRGs en buen estado que hubieran logrado adherirse a la superficie del cover.

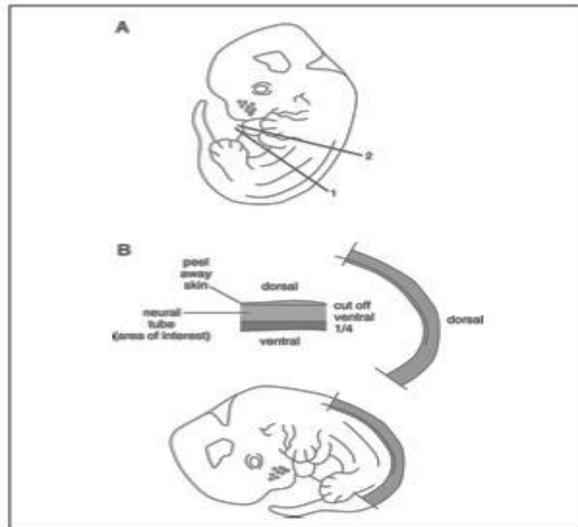


Fig 2: Esquema de técnica de disección de DRG a partir de embrión de rata E15.

El tejido vertebral que es tomado del embrión E15 se muestra en gris en todo el animal (parte inferior), y en el aislamiento (en el centro). Una vez aislado (a la derecha) del resto del embrión (parte superior), el tejido debe ser colocado sobre su lado, como se muestra y con una micro tijera se rompe la columna vertebral cartilaginosa que recubre la médula espinal en esta etapa. Imagen tomada de protocolo de cultivo de neuronas sensoriales utilizado y publicado por Alison K. Hall⁵³.

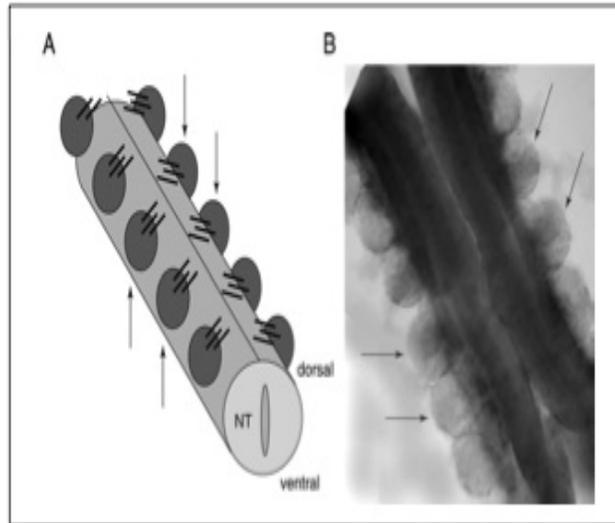


Fig 3: Esquema y visualización de tubo neural y DRGs.

El tejido vertebral se debe colocar de manera dorsal, de modo que la piel y las estructuras vertebrales dorsales, débilmente cartilagosas se puedan reflejar y retirar suavemente. Esto deja un tubo neural con los DRGs asociados como racimo uvas. Los DRGs pueden entonces ser tomados cuidadosamente con pinzas y llevados a placa de cultivo. Imagen tomada de protocolo de cultivo de neuronas sensoriales, utilizado y publicado por Alison K. Hall⁵³.

7.8.3 Adición de medio suplementado

1.- En campana de bioseguridad se preparó mezcla de medio NBS-completo suplementado con Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), 5-fluoro-2-deoxiuridina (FdU) y Afidicolina en tubo falcon según la siguiente fórmula:

a) NBS-completo (400 μ l por cover)

b) NGF (1:4000) (0,2 μ l/cover) \rightarrow concentración final en 400 μ l = 50 ng/ml

c) FdU (8mM) (1 μ l/cover).

d) Afidicolina (3mM) (0,53l/cover).

2.- Se aspiró el medio NBS y se le adicionó a cada cover 400 μ l de medio NBS-completo-suplementado.

*Cada 3 días a partir del día 4. Cambio de medio suplementado:

En el grupo control: Luego de una semana a 14 días de control con lupa y una vez evaluado el crecimiento de los explantes se procede a la extracción de mRNA a través de la técnica del trizol o utilizando en kit de extracción de RNAqueous-Micro (Cat #1931) para luego proceder a su amplificación a través de la técnica de RT-PCR.

En el grupo estudio: Luego de una semana a catorce días de control con lupa y una vez evaluado el crecimiento de los explantes se procede desomatización con una pipeta P1000 y una lupa esteroscópica con espejo (Nikon SRZ1000), para proceder a la extracción de mRNA de la muestra aislada de explantes a través de la técnica del trizol o utilizando en kit de extracción de RNAqueous-Micro (Cat #1931) para luego proceder a su amplificación a través de la técnica de RT-PCR.

7.9 Técnica de desomatización de los explantes

La desomatización de los explantes de DRG E15 cultivados se llevó a cabo mediante el corte y la aspiración de los somas neuronales con una pipeta P1000, según protocolo proporcionado por F. Court del Laboratorio de Neurociencia y Biología Glial de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica de Chile, el cual consistió en:

- 1.- En campana de bioseguridad y utilizando una lupa estereoscópica con espejo Nikon SMZ1000, se ubicó la zona central de los DRGs, es decir donde se encontraban concentrados todos los somas neuronales.
- 2.- Se tomó una pipeta P1000 y se graduó a 400 μ l. Cuidadosamente y con apoyo se llevó la punta al centro del explante haciendo pequeños movimientos rotatorios cuidando no ejercer excesiva presión y se aspiró de una sola vez.
- 3.- Luego se observó cuidadosamente en la lupa el resultado obtenido, el cual mostró la presencia de los explantes cultivados en cuyo centro se observó la ausencia total de los somas.
- 4.- De inmediato se procedió a realizar la técnica de extracción de mRNA y en el caso de los controles con inmunohistoquímica, se inició el proceso de fijación de la muestra.

7.10 Control con Inmunohistoquímica

Con el fin de lograr confirmar el éxito de la técnica de desomatización se realizó un control con técnica inmunohistoquímica, para esto:

- 1.- Se marcaron los cubreobjetos que contenían explantes completos y desomatizados. Se lavó con PBS el cubreobjeto con los explantes y se incubó durante 10 min. con paraformaldehido (PAF) 1%. Luego se lavó e incubó con NH_4Cl 50mM durante 10 min. para apagar la auto-fluorescencia.
- 2.- Posteriormente se permeabilizaron los explantes, incubándolos con solución de permeabilización (BSA 0,5%, Tritón X100 10% en PBS) por 10 min.
- 3.- A continuación se incubaron con solución de bloqueo (BSA 0,5%, FCS 10% en PBS) por 10 min.
- 4.- Luego se incubó el cubreobjeto con los anticuerpos primarios (Mouse anti MAP2 1:300, Chicken anti Neurofilamento 1:2000) diluidos en solución de inmunofluorescencia (BSA 0,5% en PBS) toda la noche a -4°C en cámara húmeda.
- 5.- Se lavó tres veces el cubreobjeto con solución de inmunofluorescencia por 10min y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (Anti mouse TRITC 1:300, Anti Chicken FITC 1:300) diluido en solución de inmunofluorescencia por 1hr a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- 6.- Se lavó tres veces con solución de inmunofluorescencia por 10min, y se incubó por 10 minutos con un marcador de núcleo (DAPI 1: 1000) diluido a temperatura ambiente.
- 7.- Se procedió a lavar 3 veces con solución de inmunofluorescencia por 10min y luego con PBS 10%, eliminándose el exceso de líquido.
- 8.- Finalmente, se montó sobre un portaobjeto con $7\mu\text{l}$ de medio de montaje FluorSave.

8. Resultados

8.1 Existe presencia de mRNA de NaVs en nervio ciático de rata.

8.1.1. Diseño de partidores específicamente contra NaV_{1.6} y contra los controles KV_{1.1}, KV_{1.2}, PanNaVs, NaV_{1.2}, NFH, β -Actina, P0 y MAP2.

Como se ha demostrado que más de un NaV se expresa en nervio periférico y en diferentes etapas del desarrollo ⁶, diseñamos partidores capaces de amplificar todos los canales NaVs (**PanNaVs**) descritos hasta hoy (NaV1.1-1.9) basándonos en las secuencias conservadas entre estos canales. Además se diseñó un par de partidores capaces de amplificar **NaV_{1.2}** (Gene ID: NM_012647) pues se expresa en el segmento inicial del axón y en nodos inmaduros, principalmente en axones no mielinizados y **NaV_{1.6}** (Gene ID: L39018.1) pues está presente ampliamente a nivel de SNC y SNP, específicamente a nivel de nodos maduros lugar donde se encuentran en gran concentración ⁴⁴⁻⁴⁵.

Diseñamos partidores contra **KV_{1.1}** y **KV_{1.2}** (Gene ID: NM_173095.3 y NM_012970.3 respectivamente) dado que se expresan en gran abundancia en las regiones juxtaranodales e internodales en axones del SNC y SNP ³⁷⁻³⁹⁻⁴⁰.

Como controles positivos adicionales diseñamos partidores contra **β -actina** (Gene ID: NM_031144.2) y **NF-H** (Gene-ID: NM_012607.2) cuyas traducciones se han descrito en axones de cultivo de DRG y en axones periféricos in vivo ²⁶⁻⁵¹.

Como control negativo se diseñaron partidores contra **MAP2**, que pertenece a la familia de proteínas asociada a microtúbulos (Gene ID : NM_013066.1), pues las proteínas de esta familia participan en el ensamblaje de los microtúbulos, y su presencia se ha descrito exclusivamente a nivel somatodendrítico ³¹⁻⁵⁰.

Finalmente también se diseñaron partidores contra **P0** (Gene ID: NM_017027.1), una glicoproteína transmembrana componente principal de la vaina de mielina a nivel de sistema nervioso periférico ⁵², como control de pureza para comprobar ausencia de contaminantes gliales en nuestras muestras de explantes de

cultivo de DRG. El detalle de todos los partidores diseñados se encuentra en la **Tabla 1**.

8.1.2. Establecimiento de condiciones experimentales en extracto de cerebro total de rata, para desarrollar la técnica RT-PCR con los partidores diseñados en el objetivo anterior.

Como se observa en la **Fig. 4**, pudimos amplificar cDNA de NaV_{1.6} en extracto de cerebro de rata, al igual que los controles KV_{1.1}, KV_{1.2}, PanNavs, NaV_{1.2}, β-Actina, NFH, MAP2 y P0. Los amplicones se encuentran en el peso molecular esperado según el detalle de los partidores (**Tabla 1**).

Los controles reemplazando el cDNA (C-) y la enzima retrotranscriptasa reversa (RT-) por agua indican que las muestras están libres de contaminantes que pudieran arrojar falsos positivos. Se realizó un total de cuatro experimentos con muestras independientes los cuales arrojaron resultados similares.

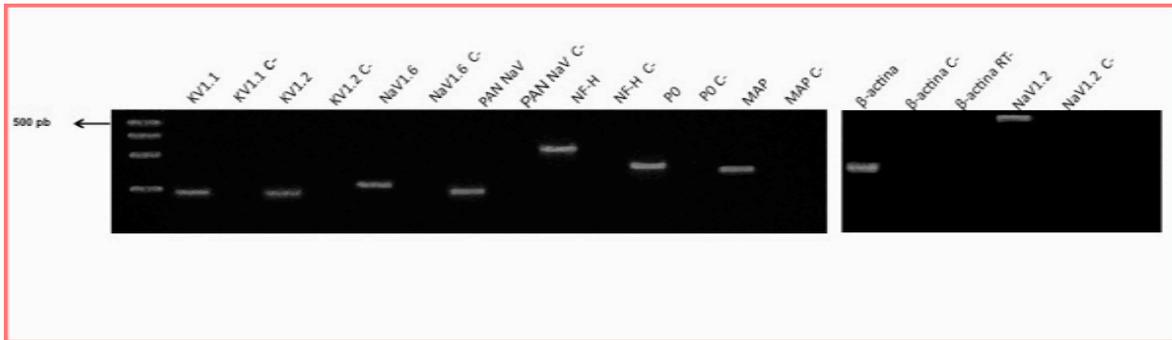


Fig 4: Presencia de mRNA de NaV_{1,6} en muestra de cerebro de rata. Utilizando la técnica RT-PCR se observa la presencia de mRNA de NaV_{1,6}. La banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N = 4). RT- corresponde a PCR de muestras sometidas a retrotranscripción sustituyendo la enzima transcriptasa reversa por H₂O sin nucleasa. C- corresponde a PCR de muestras en las cuales la enzima cDNA fue reemplazado por H₂O sin nucleasa.

8.1.3 Establecimiento de condiciones experimentales en nervio ciático de rata, para desarrollar la técnica RT-PCR con los partidores diseñados en el objetivo específico 6.1.1.1

Una vez establecidas las condiciones experimentales en extracto de cerebro, se procedió a desarrollar la técnica de RT-PCR en muestras de nervio ciático de rata, para lo cual muestras de nervio ciático de ratas Sprague-Dawley macho de 100 grs. fueron extraídas quirúrgicamente y posteriormente congeladas a - 80 °C durante 24 hrs. Luego se realizó la extracción de RNA siguiendo protocolo de la técnica del Trizol.

Como las cantidades de RNA obtenidas a partir de este protocolo eran pequeñas en comparación con las obtenidas en cerebro (2 μ g/ μ l promedio cerebro comparado con 0,4 μ g/ μ l promedio nervio ciático) una vez comprobada la presencia de rRNA (**Fig. 5A**), se realizó la retrotranscripción y utilizando la técnica RT-PCR con el cDNA a tres diferentes concentraciones, se elaboró una curva de β -actina. (**Fig. 5B**). Con este resultado, se estableció la presencia β -actina a nivel de nervio ciático y se decidió utilizar como mínimo 6 μ l de cDNA (aprox. 2,4 μ g/ μ l de mRNA) en cada reacción.

8.1.4 Determinación y amplificación a través de la técnica RT-PCR de la presencia de mRNA de NaV_{1.6} en muestras de nervio ciático de rata.

Como se observa en la **Fig. 5C** , se realizó la extracción de RNA y se estableció mediante la técnica de RT-PCR la presencia de mRNA de NaV_{1.6} en muestras distales de nervio ciático de rata *ex vivo*. Además se detectó la presencia de mRNA para KV_{1.1}, KV_{1.2}, PanNaVs, β -actina, P0 y NFH. Como control negativo de la muestra no se manifestó la presencia de mRNA para MAP2, cuya presencia es esencialmente somatodendrítica ³¹⁻⁵⁰.

La ausencia de cDNA de NaV_{1.2}, confirmó la evidencia publicada, en la cuál se describe su expresión a nivel de SNP en el segmento inicial del axón y en nodos inmaduros, principalmente en axones no mielinizados ⁴⁴⁻⁴⁵. Por otra parte la presencia de cDNA de P0 confirma la presencia de proteínas gliales en nuestras muestras ⁵². Se realizó un total de cuatro experimentos con muestras independientes los cuales arrojaron resultados similares.

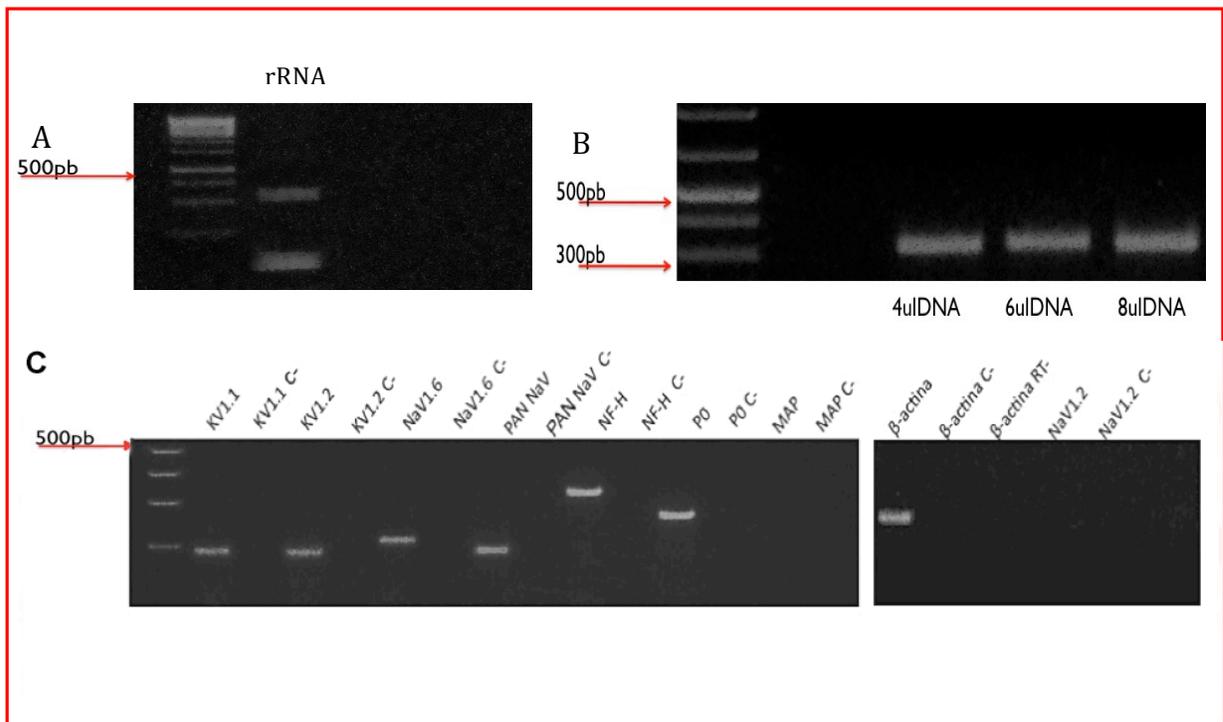


Fig 5: Presencia de rRNA, curva de β -actina y presencia de mRNA de $NaV_{1.6}$ en muestra de axones de nervio ciático de rata. **A:** Utilizando $3\mu l$ de la muestra obtenida a partir de nervio ciático con la técnica de trizol y adicionando $3\mu l$ de vehículo se hizo correr en un gel para comprobar la presencia de rRNA. La banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N=1). **B:** Utilizando la técnica de RT_PCR y tres diferentes concentraciones de cDNA se logró establecer la presencia de mRNA de β -actina en muestras de nervio ciático de rata. Las bandas destacadas corresponde a 300 y 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N=1). **C:** Utilizando la técnica RT-PCR se observa la presencia de mRNA de $NaV_{1.6}$. La banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N = 4). RT- corresponde a PCR de muestras sometidas a retrotranscripción sustituyendo la enzima transcriptasa reversa por H_2O sin nucleasa. C- corresponde a PCR de muestras en las cuales la enzima cDNA fue reemplazado por H_2O sin nucleasa.

8.2 Existe presencia de mRNA de NaV en axones de cultivo de DRG embrionario de rata.

8.2.1 Implementación de la técnica de cultivo de explantes de DRG de embriones de rata de 15 días de gestación (E15).

El aislamiento y cultivo de neuronas sensoriales son importantes para el estudio del desarrollo y aspectos de neurobiología celular y subcelular. Estas células del sistema nervioso periférico se generan a partir de la cresta neural, una población transitoria de células migratorias en el embrión ⁵³. Hasta la fecha, ha sido un reto convertir eficazmente las células de la cresta neural en neuronas sensoriales *in vitro*, por lo que el aislamiento de los ganglios de embriones es importante ⁵³. Por otra parte, las neuronas sensoriales periféricas embrionarias son exquisitamente sensibles a los factores derivados de tejidos diana, como neurotrofinas (NGF) pues en esta etapa, aproximadamente el 5% de los neuroblastos están aún en fase de mitosis *in vivo* e *in vitro*, y sus axones deben ponerse en contacto con tejidos de la periferia para su posterior diferenciación en subclases específicas de neuronas. A pesar de ser una técnica compleja, permite observar cómo se desarrollan axones a partir de una gran cantidad de somas neuronales reunidos en un ganglio central.

Como una manera de determinar la presencia de mRNA de NaV en muestras purificadas de axones desmielinizados y evitando así la presencia de células gliales, desarrollamos esta técnica de cultivo de DRG en embriones de rata E15. La técnica utilizada se logró implementar a partir de un protocolo utilizado y publicado por A.K. Hall ⁵³ y por el manejo por F. Court en el laboratorio Neurociencia y Biología Glial en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile (ver **Fig. 6**).

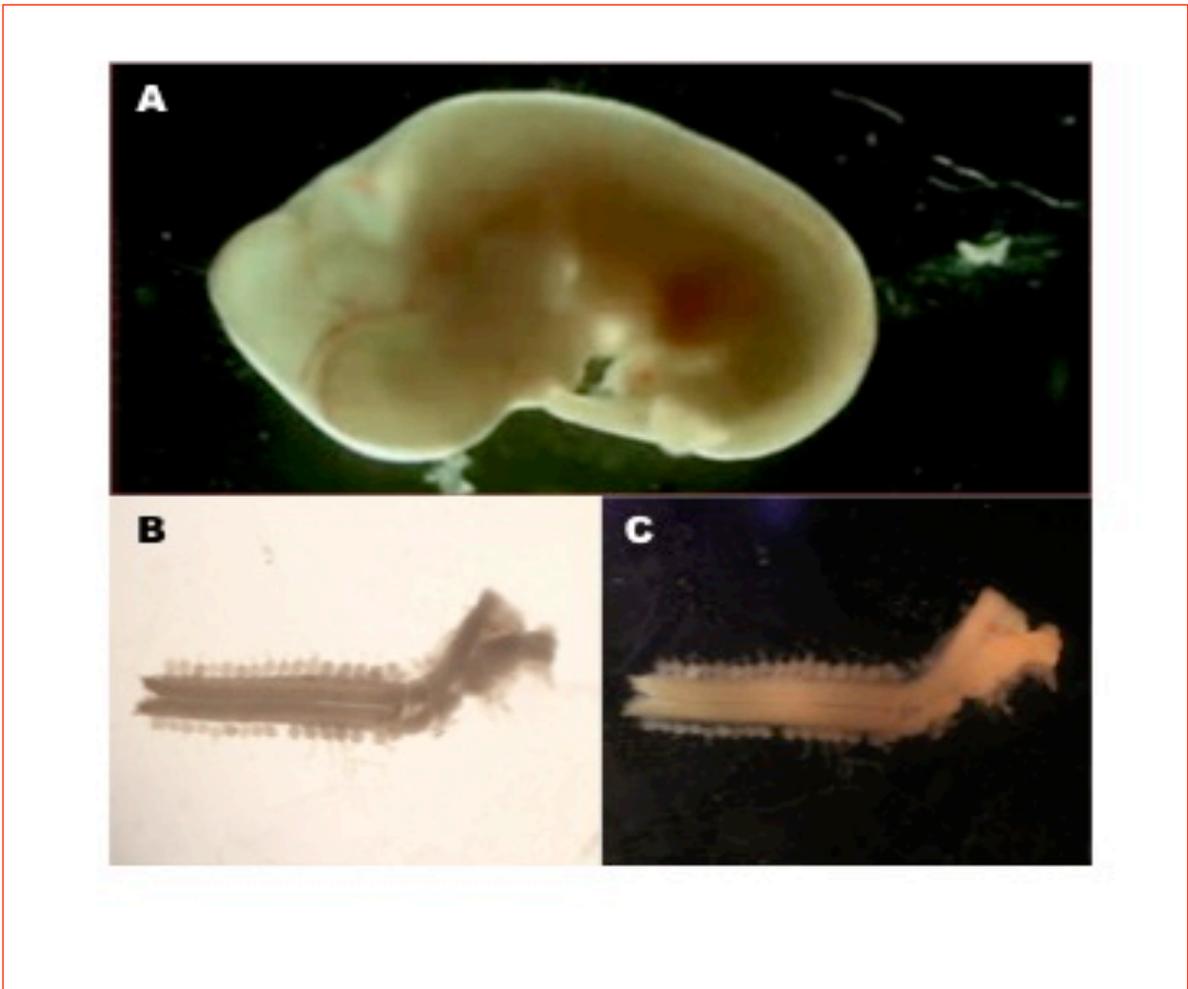


Fig 6: Embrión E15, Tejido vertebral y DRGs asociados a él.

A: Fotografía campo oscuro de embrión de rata de 15 días de gestación **B y C:** Fotografía campo claro/campo oscuro tomada con lupa en la que se puede observar el tejido vertebral extraído y los DRGs unidos a él. Imagen tomada con lupa Nikon SMZ1000.

8.2.2. Implementación de la técnica de RT-PCR en explantes de DRG utilizando los partidores diseñados en el objetivo I.I.

Como se puede observar en la **Fig. 7**, se realizó la extracción de mRNA de cultivos de explantes de DRG desmielinizados y mediante la técnica de RT-PCR se estableció la presencia de mRNA de NaV_{1.6} *in vitro* en muestras de neuronas de DRG no mielinizadas. Además se detectó la presencia de mRNA para KV_{1.1}, PanNaVs, β -Actina, MAP2 y NFH. Como control pureza de la muestra no apareció mRNA de P0 por ser una proteína de origen glial ⁵².

Los amplicones se encuentran en el peso molecular esperado según el detalle de los partidores (Tabla 1). Los controles reemplazando el cDNA (C-) y la enzima retrotranscriptasa reversa (RT-) por agua sin nucleasa, indican que las muestras están libres de contaminantes que pudieran arrojar falsos positivos. Se realizó un total de cuatro experimentos con muestras independientes, los cuales arrojaron resultados similares.

Con estos resultados podemos concluir que utilizando una técnica *in vitro*, hay presencia de mRNA de las proteínas de membrana NaV_{1.6} y KV_{1.1}, y de las proteínas de citoesqueleto β -Actina, MAP2 y NFH en explantes de DRG.

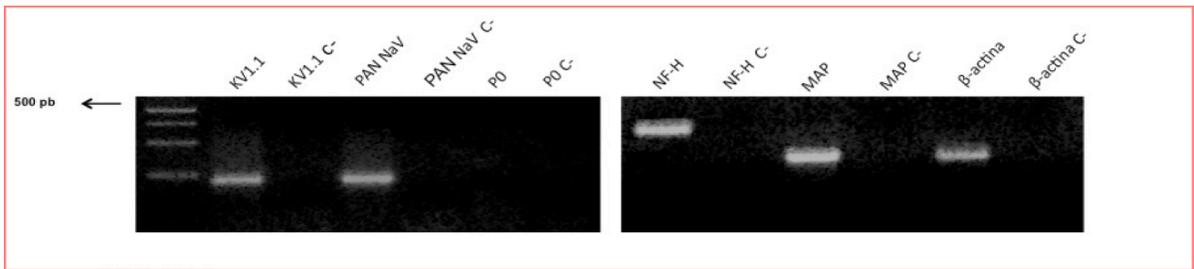


Fig. 7: Presencia de mRNA en muestra de cultivo de explantes de DRG E15. Utilizando la técnica RT-PCR se observa la presencia de mRNA de PanNavs. La banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N = 4). RT- corresponde a PCR de muestras sometidas a retrotranscripción sustituyendo la enzima transcriptasa reversa por H₂O sin nucleasa. C- corresponde a PCR de muestras en las cuales el cDNA fue reemplazado por H₂O sin nucleasa.

8.2.3 Implementación de la técnica de desomatización de los explantes de DRG cultivados.

Para obtener una muestra pura axonal y libre del compartimento somatodendrítico se implementó la técnica de desomatización de los explantes de DRG E15 cultivados, la cual se llevó a cabo mediante el corte y la aspiración de los somas neuronales con una pipeta P1000, según protocolo proporcionado por F. Court del Laboratorio de Neurociencia y Biología Glial de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Como control y para confirmar la correcta ejecución de la técnica, se realizó inmunofluorescencia de las muestras según se puede observar en **Fig. 8 y 9** donde no logramos inmunodetectar el marcador somato-dendrítico MAP2 en explantes desomatizados, lo que corrobora la ausencia de soma en estos explantes.

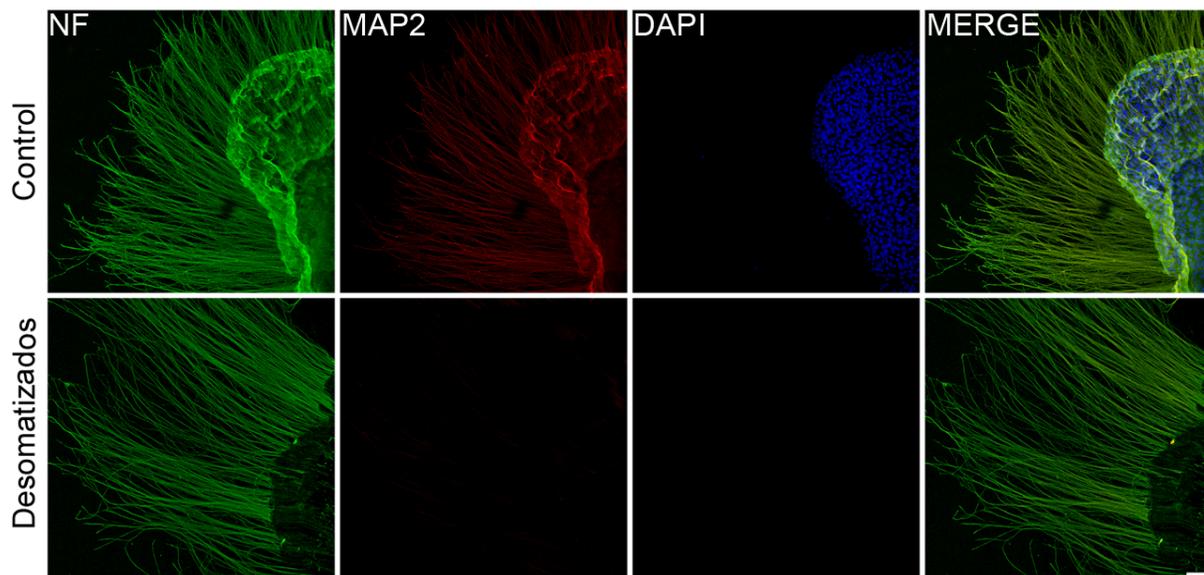


Fig. 8: Explantes de DRG desomatizados presentan marcaje neurofilamento y ausencia de MAP2 y DAPI. Explantes de DRG de 6 días fueron sometidos a inmunocitoquímica. En el control puede evidenciarse la presencia de axones a través del marcaje de neurofilamento (verde) y de somas neuronales a través de marcaje MAP2 (rojo) y núcleos celulares a través del marcaje DAPI. En la muestra desomatizada puede observarse la presencia de neurofilamento (verde) y ausencia de MAP2 y DAPI, lo que demuestra la ausencia de somas neuronales.

Barra de escala 1000 μm .

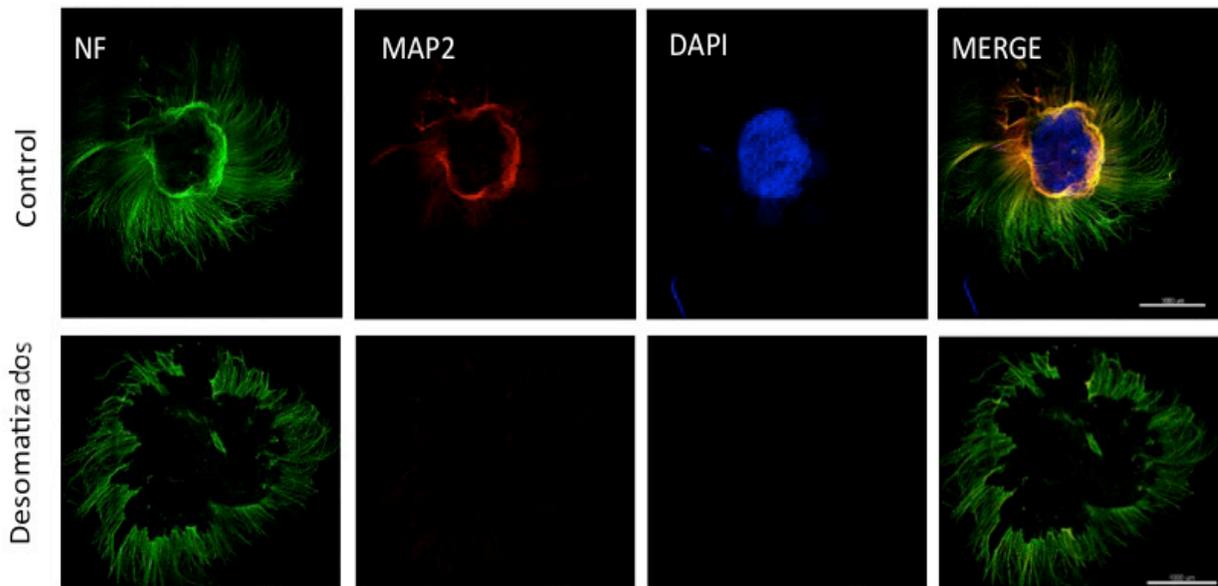


Fig. 9: Explantes de DRG desomatizados presentan marcaje neurofilamento y ausencia de MAP2 y DAPI. Explantes de DRG de 14 días fueron sometidos a inmunocitoquímica. En el control puede evidenciarse la presencia de axones a través del marcaje de neurofilamento (verde) y de somas neuronales a través de marcaje MAP2 (rojo) y núcleos celulares a través del marcaje DAPI. En la muestra desomatizada puede observarse la presencia de neurofilamento (verde) y ausencia de MAP2 y DAPI, lo que demuestra la ausencia de somas neuronales. Barra de escala 1000 μm . Imagen de gran escala lograda a partir de 42 tomas (Leica Application Suite for Advanced Fluorescence), adquirida usando microscopio y sistema de imágenes confocal LeicaTCS LSI. Reconstrucción tridimensional del cultivo de explantes de 14 días de DRG generada usando IMARIS 7,0 (Biplano).

8.2.4 Extracción de mRNA a partir explantes de DRG desomatizados a los 6 y 14 días de crecimiento.

Se realizó la extracción de mRNA a partir de explantes desomatizados en diferentes etapas de desarrollo pues estudios han demostrado que el conjunto de los mRNAs axonales cambia dinámicamente durante el crecimiento y estos datos pueden constituir un recurso importante para los estudios sobre el papel de la síntesis local de proteínas en la regeneración axonal y la nocicepción durante la maduración neuronal ¹⁶.

La cantidad de mRNA obtenido fue en promedio de 0,0300 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ utilizando el Kit *RNAqueous Kit* [®]-*Micro* (**Fig. 10**). Se utilizó este kit especial pues permite el aislamiento mRNA a partir de muestras de baja concentración. Además se utilizó el Kit de RT-PCR "*Super Script III First-Strand System for RT-PCR*" que nos permitió retrotranscribir cantidades de mRNA a partir de un pg. La retrotranscripción resultó en concentraciones de cDNA comparables a las obtenidas a partir de muestras de nervio ciático.



Fig. 10: Presencia de rRNA en muestra de explantes desomatizados de DRGs. Utilizando 3 μ l de la muestra obtenida a partir de axones con el kit *RNAqueous Kit* $\text{\textcircled{R}}$ -*Micro* y adicionando 3 μ l de veh\u00edculo se hizo correr en un gel para comprobar la presencia de rRNA. La banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N=1).

8.2.5. Determinación y amplificación de la presencia de mRNA de NaV_{1.6} en explantes de DRG desomatizados a los 6 y 14 días de crecimiento.

Como se puede observar en la **Fig. 11**, luego de la extracción de mRNA cultivos de explantes de DRG desomatizados y mediante la técnica de RT-PCR se estableció la presencia de mRNA de NaV_{1.2} *in vitro* en axones de 6 días. No se observó la presencia de mRNA de NaV_{1.6}, esto confirma una localización diferencial entre NaV_{1.2} y NaV_{1.6} al igual que la observada Boiko et al., en células ganglionares de retina, donde en un principio se produce una gran concentración de NaV_{1.2} en los nodos de Ravier inmaduros y con posterioridad se produce un cambio y apareciendo la expresión de NaV_{1.6}.⁴⁴ Por lo tanto nos indica que a los 6 días estos axones pueden considerarse aún como inmaduros. Además se detectó la presencia de mRNA para KV_{1.1}, KV_{1.2}, PanNavs, β -Actina, y NFH. Como control negativo de la muestra, no apareció mRNA de MAP2, lo que nuevamente corrobora la ausencia de soma en nuestros explantes³¹⁻⁵⁰.

Como control y para confirmar la correcta ejecución de la técnica, se realizó inmunofluorescencia de las muestras según puede observarse en **Fig. 8**. Aquí observamos la presencia de NF-H en axones que nos indica el buen estado de los axones y la ausencia de MAP2 y DAPI que comprueba la eficiente y completa desomatización, validando los resultados como provenientes de axones puros.

Para ver las posibles diferencias de expresión de mRNA a lo largo del desarrollo neuronal, y considerando la aparición tardía de NaV_{1.6}, extrajimos mRNA de cultivos de explantes de DRG desomatizados de 14 días (**Fig. 12**). Mediante la técnica de RT-PCR se estableció la presencia de mRNA de NaV_{1.6} *in vitro*. Además se detectó la presencia de mRNA para KV_{1.1}, KV_{1.2}, PanNavs, β -actina, y NFH. Como control negativo de la muestra no apareció mRNA de MAP2, cuya presencia es esencialmente somatodendrítica³¹⁻⁵⁰. La ausencia de mRNA de NaV_{1.2}, confirmó la evidencia publicada, en la cuál se describe su expresión a nivel de SNP en el segmento inicial del axón y en nodos inmaduros, donde en un principio se produce una gran concentración de NaV_{1.2} y con posterioridad se genera un cambio

apareciendo la expresión de NaV_{1.6}⁴⁴⁻⁴⁵. Estos resultados nos indican que a los 14 días los explantes presentan expresión de axones maduros aún en ausencia de mielina que controla la formación de los nodos. Es decir, la presencia de distintos NaVs no es debido a la madurez de los nodos sino a la madurez de la neurona en sí. Como control de pureza de la muestra no apareció mRNA de P0 por ser una proteína de origen glial⁵². Los amplicones se encuentran en el peso molecular esperado según el detalle de los partidores (Tabla 1).

Los controles reemplazando el cDNA (C-) y la enzima Super Scrip® III RT (RT-) por agua sin nucleasa indican que las muestras están libres de contaminantes que pudieran arrojar falsos positivos.

Se realizó un total de tres experimentos con muestras independientes, las cuales arrojaron resultados similares.

Como control y para confirmar la correcta ejecución de la técnica, se realizó inmunofluorescencia de las muestras según puede observarse en **Fig.9**. Aquí observamos la presencia de NF-H en axones que nos indica el buen estado de los axones y la ausencia de MAP2 y DAPI que comprueba la eficiencia de la desomatización manual.

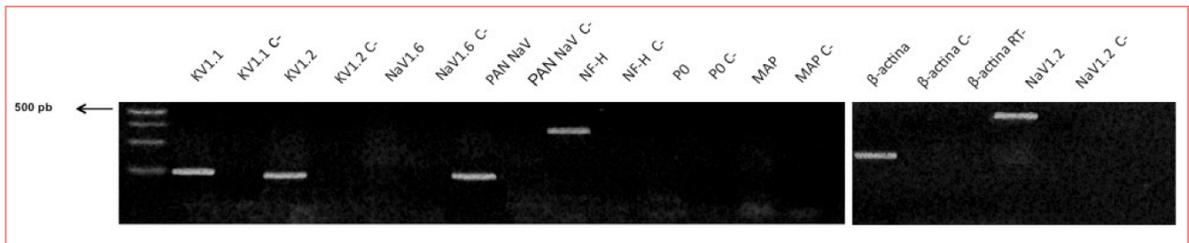


Fig. 13: Presencia de mRNA en axones de 6 días de DRG E15

Utilizando la técnica RT-PCR se observa la presencia de mRNA de PanNavs. La banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N = 4). RT- corresponde a PCR de muestras sometidas a retrotranscripción sustituyendo la enzima Super Scrip® III RT por H₂O sin nucleasa. C- corresponde a PCR de muestras en las cuales el cDNA fue reemplazado por H₂O sin nucleasa.

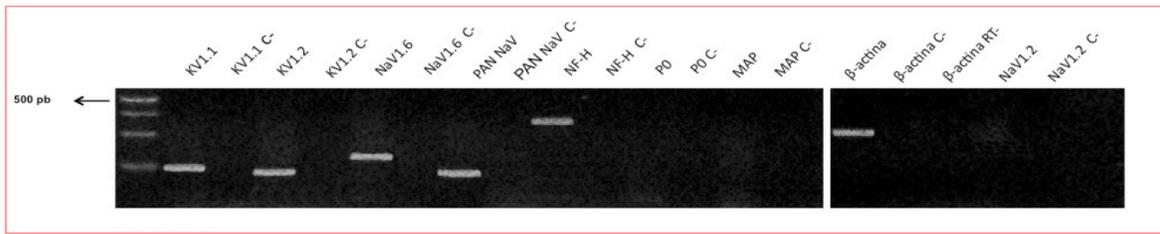


Fig. 14: Presencia de mRNA en axones de 14 días de DRG E15

Utilizando la técnica RT-PCR se observa la presencia de mRNA de PanNavs. La banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N = 4). RT- corresponde a PCR de muestras sometidas a retrotranscripción sustituyendo la enzima Super Scrip® III RT por H₂O sin nucleasa. C- corresponde a PCR de muestras en las cuales el cDNA fue reemplazado por H₂O sin nucleasa.

9. Resumen de Resultados.

- 1.- Se establecieron las condiciones experimentales en extracto de cerebro total de rata, para desarrollar la técnica RT-PCR con partidores diseñados específicamente.
- 2.- Se estableció mediante la técnica de RT-PCR la presencia de mRNA de NaV_{1.6} en muestras distales de nervio ciático.
- 3.- Se implementó la técnica de cultivo de explantes de DRG de embriones de rata de 15 días de gestación.
- 4.- Se estableció mediante la técnica de RT-PCR la presencia de mRNA de NaV_{1.6} en muestras de neuronas de DRG.
- 5.- Se determinó mediante la técnica de RT-PCR la presencia de mRNA de NaV_{1.2} en explantes de DRG desomatizados de 6 días de crecimiento.
- 6.- Se determinó mediante la técnica de RT-PCR la presencia de mRNA de NaV_{1.6} en explantes de DRG desomatizados de 14 días de crecimiento.
- 7.- Nuestros resultados demuestran que los mRNA control (PanNaV, NFH, β -Actina, P0 y MAP2) se expresan de acuerdo a lo predicho y que existe presencia de mRNA de KVs a nivel axonal a pesar de la evidencia existente del traslado de esta proteína vía transporte axonal rápido, por lo que podría comportarse como una proteína de membrana que utiliza una ruta de traducción y tráfico exocítico local.

10. Conclusión

Se puede afirmar que existe presencia de mRNA de canales de sodio activados por potencial en axones periféricos de nervio de rata. Más aun, dicha presencia axonal está de acuerdo con la expresión regulada durante el desarrollo de NaV_{1.2} y NaV_{1.6} descrita previamente.

11. Discusión

Transporte y síntesis de NaVs en axones periféricos

Por décadas, el soma neuronal ha sido considerado como el lugar exclusivo de síntesis de proteínas axonales. Sin embargo, descubrimientos recientes evidencian la existencia de mRNA y de componentes de RE y Golgi, sugiriendo que en axones de DRG en cultivo si ocurre síntesis y tráfico de proteínas¹⁴⁻⁵⁴. Por esta razón, el haber demostrado la presencia de mRNA de NaVs en axones periféricos nos permite especular sobre la existencia de un sistema de regulación local, espacial y temporal de la síntesis y modificación de estas NaVs.

El haber establecido la presencia de mRNA de NaV_{1.6} en nervio ciático y axones de DRG de rata proporciona evidencia adicional para postular que la síntesis axonal de estos canales juega un rol fundamental en la organización funcional del axón. Esta puede tener como resultado respuestas más rápidas y efectivas a estímulos locales en nervios de gran longitud sanos y dañados, especialmente cuando consideramos que los axones periféricos pueden alcanzar un largo mayor a un metro y que deben contar con la capacidad crecer, mantenerse, regenerar y responder rápidamente a daños o estímulos externos. Esto implica que el axón, en su organización, tendría cierto nivel de autonomía para responder a los requerimientos proteicos axonales, al igual que lo descrito por Catterall et al.⁶

Por otra parte, el lograr identificar donde se concentra un determinado mRNA en el axón, hace posible realizar estudios sobre dichos dominios en detalle y si estos dominios forman parte activa de sistemas de transporte y localización de este mRNA en el axón, deberían además poseer elementos de la maquinaria de transporte de los mismos.

Presencia de mRNA de NaVs en axones periféricos *ex vivo* e *in vitro*

Determinar la presencia de mRNA de NaV_{1.6} *ex vivo* en nervio ciático de rata fue de vital importancia, considerando que la mayoría de los estudios realizados respecto a la síntesis local de proteínas en axones se han hecho utilizando modelos *in vitro*. Además el haber establecido la presencia de mRNA de NaV_{1.6} *in vitro* en axones de DRG de rata, proporciona evidencia que permite afirmar que podrían utilizar una ruta de traducción y tráfico exocítico local al igual que otros mRNAs codificantes para proteínas cuya presencia ha sido demostrada en axones de DRG ²³.

A futuro, sería ideal obtener resultados *in vivo*, para lo cual se deberían plantear diferentes estrategias como hibridación *in situ* o utilización de transgenes, las cuales han sido planteadas por Willis et al. ²⁷

Presencia de mRNA de NaV_{1.6} y otros canales en axones periféricos

Los resultados del RT-PCR evidenciaron, además de la presencia mRNA de NaV_{1.6}, la aparición de mRNA de canales de potasio y otros canales de sodio activados por potencial en las muestras *ex vivo* e *in vitro*.

Una característica intrínseca de las neuronas del ganglio sensorial de la raíz dorsal (DRG), es que los axones más pequeños poseen una mayor capacidad para regenerarse después de una lesión que los axones mayores, que también se correlaciona con los niveles más altos de maquinaria de traducción ⁵⁵⁻⁵⁶, mayor cantidad y diferentes grupos de mRNA. La aparición de mRNA de NaV_{1.2} en axones de DRG a los seis días de desarrollo y de NaV_{1.6} en axones de DRG a los 14 días, confirma los estudios de Gumy et al., quienes muestran que la regeneración de los axones de las neuronas DRG embrionarias y adultas contienen diferentes poblaciones de mRNA, el cual codifica proteínas de diversas funciones, lo que implica cambios en el transporte axonal y la localización de los mRNA durante el envejecimiento y el desarrollo hacia la edad adulta ¹⁶. Además, estos hallazgos nos dirigen a proponer que el transcriptoma axonal está altamente regulado y que su

funcionalidad será específica para diferentes grupos de neuronas, dado que los axones derivados de neuronas embrionarias tendrían mayor proporción de mRNA relacionados con funciones de crecimiento, mientras que los adultos están enriquecidos en moléculas relacionadas con la recepción de estímulos sensoriales.

Por otra parte, a nivel juxtapanodal se ha descrito una alta concentración de canales de potasio activados por potencial (KVs), específicamente KV_{1.1} y KV_{1.2}³⁸ y en contraste con el papel claro de los NaVs en los nodos de Ranvier, la función de estos KVs juxtapanodales ha sido más difícil de aclarar por lo que también sería interesante seguir estudiando la aparición de su mRNA a nivel local y las implicancias funcionales que esto conlleva para la autonomía axonal.

Otra manera de enriquecer este trabajo podría consistir en realizar la cuantificación en el tiempo del mRNA de NaV_{1.6} y NaV_{1.2} encontrado en las muestras utilizando la técnica de qPCR. Esto permitiría evaluar el grado de actividad y/o posibilidad de transducción del mRNA encontrado y por ende de síntesis de estas proteínas.

Pureza de la muestra, un aspecto metodológico muy importante

Debido que la presencia de NaV_{1.6} en muestras de nervio ciático de rata podría ser de origen glial, decidimos utilizar axones de cultivo de DRG como una estrategia no ambigua de la expresión de los mRNA de los canales en axones carentes de células de Schwann y sin mielina.

Es importante tomar en cuenta que la aparición de mRNA de P0 en las muestras de nervio ciático implicarán la presencia de proteínas gliales, las cuales podrían estar abasteciendo de nuevos canales NaVs al axón mediante vías no convencionales como el traspaso de exosomas desde células de Schwann hacia el axón⁵⁷⁻⁵⁸, de ahí la importancia de realizar el experimento *in vitro* utilizando la técnica de cultivo de explantes de DRG desomatizados y con un protocolo utilizado en el campo, que permitiera la eliminación total de células de origen glial. Con esto se consiguió aislar los axones de los cuerpos celulares y impedir la presencia de proteínas gliales y

somáticas, lo cual se vio reflejado en la ausencia de P0 y MAP2 en nuestra amplificación de mRNA y en los controles con inmunohistoquímica.

A futuro podrían realizarse experimentos incluyendo nuevos marcadores gliales y somatodendríticos, como también cámaras compartimentalizadas lo cual permitiría un mayor control de la presencia de axones puros. También sería de gran utilidad diseñar pares de partidores que incluyeran secuencias intrónicas y exónicas para asegurar la amplificación de cDNA a partir de la presencia de mRNA de NaV_{1.6}, lo cual serviría como una herramienta más de control de pureza de la muestra.

Transporte y síntesis de otras proteínas en axones periféricos

La gran variedad de modelos y aproximaciones experimentales empleadas en distintas especies y diferentes neuronas indican que los procesos de transporte de mRNA y la síntesis local de proteínas en los axones, probablemente estén ocurriendo en diferentes tipos neuronales y en sus prolongaciones axónicas. Aunque los modelos *in vitro* han sido de gran utilidad, sería ventajoso estudiar estos fenómenos *in vivo* y frente a esto todavía quedan múltiples interrogantes por responder. Por ejemplo ¿existe síntesis local de proteínas en axones cortos? ¿Existen diferencias entre los mecanismos de regeneración *in vitro* e *in vivo*? ¿Cuáles son las diferencias entre los transcriptomas axonales normales y patológicos o entre los distintos tipos neuronales? ¿Qué tipo de funciones exactas cumplen estos mRNAs axonales?.

Finalmente, si llegara a existir una ruta de síntesis y tráfico local de NaVs en axones periféricos, podríamos pensar que quizás otras proteínas de membrana, nodales o internodales, también puedan seguir esta ruta, lo que indicaría la presencia de un sistema de regulación local, espacial y temporal de vital importancia, permitiendo al axón responder con cierto nivel de autonomía frente a diferentes requerimientos de desarrollo, respuesta al daño y/o a estímulos externos. Esto tiene implicaciones importantes en la comprensión de la fisiología neuronal, ya que es diferente analizar el mantenimiento axonal y su capacidad de respuesta frente a situaciones

patológicas o de daño si es que se dispone o no de mecanismos rápidos y locales de renovación de proteínas.

12. Proyección

No existe por el momento ninguna publicación relacionada con la presente tesis de magíster, aunque está en preparación un artículo en el cual este proyecto está incluido como un objetivo importante dentro de una línea de investigación mayor, la cual consiste en evaluar una ruta local de tráfico intracelular de canales de sodio activados por potencial en nodos de Ranvier de axones periféricos.

Los resultados obtenidos con los experimentos de esta tesis ya fueron presentados a nivel nacional como parte de un póster en el “Segundo Congreso Ciencia Joven 2012” (Santiago - 06-Sept-2012) y en el “XXVII Annual Meeting of the Sociedad de Biología Celular de Chile” (Puerto Varas – 23 a 27 –Oct- 2013). También fueron presentados a nivel internacional en “Growing to Extremes: Cell Biology and Pathology of Axons” (10 – 15 March 15, 2013) Granlibakken Resort, Tahoe City, California.

13. Referencias Bibliográficas.

1. **Horton, A.C. and Ehlers, M.D.** *Neuronal polarity and trafficking.* Neuron, 2003. 40(2): p. 277--95.
2. **Alberts, B.** *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Science, 2008. 5e : p. 329 --399.
3. **Valdés, V et al.** *Endoplasmic Reticulum Sorting and Kinesin-1 Command the Targeting of Axonal GABA (B) Receptors.* PLoS One. 2012;7(8):e44168.
4. **Farhan, H. and C. Rabouille,** *Signalling to and from the secretory pathway.* J Cell Sci, 2011. 124(Pt 2): p. 171--80.
5. **Sherman, D.L., et al.** *Neurofascins are required to establish axonal domains for salutatory conduction.* Neuron, 2005. 48(5): p. 737--742.
6. **Catterall, W.A., A.L. Goldin, and S.G. Waxman,** *International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure--function relationships of voltage--gated sodium channels.* Pharmacol Rev, 2005. 57(4): p. 397-409.
7. **Piper, M. and C. Holt,** *RNA translation in axons.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. 20: p. 505--523.
8. **Vuppalanchi D, Willis D.E, Twiss JL.** *Regulation of mRNA transport and translation in axons.* Results Probl Cell Differ. 2009. 48: p. 193--224.
9. **Ramirez, O., Couve A.** *The endoplasmic reticulum and proteína trafficking in dendrites and axons.* Trends Cell Biol. 2011. 21(4): p. 219--227.
10. **Scott, D.A., Das, U., Roy, S.** *Mechanistic logic underlying the axonal transport of cytosolic proteins.* Neuron. 2011. 70(10): p. 441--454.
11. **Tang Y, et al.** *Fast Vesicle Transport Is Required for the Slow Axonal Transport of Synapsin.* J Neurosci 2013, 33(39): p. 15362--15375
12. **Jung, H., Yoon, B.C., Holt, C.E.** *Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair.* Nat. Rev. Neurosci. 2012. 13(5): p. 308--324.
13. **Twiss, J.L., and Van Minnen J.** *New insights into neuronal regeneration: the role of axonal protein synthesis in pathfinding and axonal extensión.* J Neurotrauma 2006, 23: p. 295--308.

14. **Merianda, T., and Twiss, J.**, *Peripheral nerve axons contain machinery for co-translational secretion of axonally-generated proteins.* *Neurosci* 2013. 29(4): p. 493--500.
15. **Twiss, J.L. and Fainzilber, M.** *Ribosomes in axons--scrounging from the neighbors?* *Trends Cell Biol*, 2009. 19(5): p. 236--243.
16. **Gumy, L.F., et al.**, *Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization.* *RNA*. 2011 Jan;17(1): p. 85--98.
17. **Zelena, J.** *Ribosomes in myelinated axons of dorsal root ganglia.* *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 1972. 124(2): p. 217--229.
18. **Steward, O. and Ribak, C.E.** *Polyribosomes associated with synaptic specializations on axon initial segments: localization of protein-synthetic machinery at inhibitory synapses.* *J. Neurosci.* 1986. 6: p. 3079--3085.
19. **Koenig, E. and Martin, R.** *Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon.* *J. Neurosci.* 1996. 16: p. 1400--1411.
20. **Li, Y.C. et al.** *Subsurface cisterna-lined axonal invaginations and double-walled vesicles at the axonal-myelin sheath interface.* *Neurosci. Res.* 2005. 53: p. 298--303.
21. **Zheng, J.Q and Twiss J.A** *Functional Role for Intra-Axonal Protein Synthesis during Axonal Regeneration from Adult Sensory Neurons.* *J Neurosci*, 2001, 21(23): p. 9291--9303.
22. **Kleiman, R., Banker, G., and Steward, O.** *Development of subcellular mRNA compartmentation in hippocampal neurons in culture.* *J Neurosci*, 1994. 14(3 Pt 1): p. 1130--1140.
23. **Willis, D.E., et al.** *Extracellular stimuli specifically regulate localized levels of individual neuronal mRNAs.* *J Cell Biol*, 2007. 178(6): p. 965--980.
24. **Pacheco, A., and Twiss, J.L.** *Localized IRES-Dependent Translation of ER Chaperone Protein mRNA in Sensory Axons.* *PLoS ONE* 2012.7(7): e40788.
25. **Lin, A.C., and Holt, C.E.** *Function and regulation of local axonal translation.* *Curr Opin Neurobiol*, 2008. 18(1): p. 60--68.
26. **Sotelo-Silveira, J., et al.**, *Myelinated axons contain beta-actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation.* *J Neurochem*, 2008. 104(2): p. 545--557.

27. **Willis, D.E., et al.,** *Axonal Localization of Transgene mRNA in Mature PNS and CNS Neurons.* J Neurosci, 2011. 31(41): p. 14481--14487.
28. **Taylor AM., et al.,** *Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons.* J Neurosci 2009, 29: p. 4697--4707.
29. **Droz, B., Rambourg, A., and Koenig, H.L.** *The smooth endoplasmic reticulum: structure and role in the renewal of axonal membrane and synaptic vesicles by fast axonal transport.* Brain Res, 1975. 93(1): p. 1--13.
30. **Tsukita, S. and H. Ishikawa,** *Three---dimensional distribution of smooth endoplasmic reticulum in myelinated axons.* J Electron Microsc (Tokyo), 1976. 25(3): p. 141--149.
31. **Merianda, T.T., et al.,** *A functional equivalent of endoplasmic reticulum and Golgi in axons for secretion of locally synthesized proteins.* Mol Cell Neurosci, 2009. 40(2): p. 128--142.
32. **Broadwell, R.D., and Cataldo, A.M.** *The neuronal endoplasmic reticulum: its cytochemistry and contribution to the endomembrane system. II. Axons and terminals.* J Comp Neurol, 1984. **230**(2): p. 231--248
33. **Salzer, J.L.,** *Polarized domains of myelinated axons.* Neuron, 2003. **40**(2): p. 297--318.
34. **Poliak, S. and E. Peles,** *The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier.* Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(12): p. 968--980.
35. **Catterall, W.A.,** *Localization of sodium channels in cultured neural cells.* J Neurosci, 1981. **1**(7): p. 777--783.
36. **Waxman, S.G. and J.M. Ritchie,** *Organization of ion channels in the myelinated nerve fiber.* Science, 1985. **228**(4707): p. 1502--1507.
37. **Schafer, D.P., and Rasband, M.N.,** *Glial regulation of the axonal membrane at nodes of Ranvier.* Curr. Opin. of Neurosc 2006. 16: p. 508--514.
38. **Gutman, G.A., et al.,** *International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels.* Pharmacol Rev 2005. 57: p. 473--508.
39. **Poliak, S., et al.,** *Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1.* J. Cell Biol 2003. 162 (6): p. 1149--1160.
40. **Arroyo. E.J., and Scherer. S.S.,** *On the molecular architecture of myelinated fibers.* Histochem Cell Biol 2000. 113: p. 1--18.

41. **Qu, Y., et al.,** *Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits.* Mol Cell Neurosci, 2001. 18(5): p. 570--580.
42. **Shealler, K.L., et al.,** *SA Novel , Abundant Sodium Channel Expressed in Neurons and Glia.* J Neurosci, 1995. 15(5): p. 3231--3242.
43. **Duflocq, A., et al.,** *Nav1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments.* Mol Cell Neurosci, 2008. 39(2): p. 180--192.
44. **Boiko, T., et al.,** *Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon.* Neuron, 2001. 30(1): p. 91--104.
45. **Caldwell, J.H., et al.,** *Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(10): p. 5616--20.
46. **Boiko, T., et al.,** *Functional specialization of the axon inicial segment by isoform-specific sodium channel targeting.* J. Neurosci. 2003. 23: p. 2306-13.
47. **Osorio, N., et al.,** *Persistent NaV1.6 current at axon inicial segments tunes Spike timing of cerebellar granulle cells.* J. Physiol. 2010. 588: p. 651-70.
48. **Leterrier, C., et al.,** *Voltage---gated sodium channel organization in neurons: protein interactions and trafficking pathways.* Neurosci Lett. 2010 486(2): p. 92---100.
49. **Leavitt, J et al.,** *Expression of Transfected Mutant-Actin Genes: Alterations of Cell Morphology and Evidence for Autoregulation in Actin Pool.* Mol and Cell Biol, 1987. 7(7): p.2457-2466.
50. **Geisert, E et al.,** *Expression of microtubule-associated proteína 2 by reactive astrocytes.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990. 87: p. 3967-3971.
51. **Sotelo--Silveira, J.R., et al.,** *Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve.* J Neurosci Res, 2000. 62(1): p. 65--74.
52. **Snipes, G.J., et al.,** *Characterization of a Novel Peripheral Nervous System Myelin Protein.* The Journal of Cell Biology, 1992. 117(1): p. 225--238.
53. **Hall, A.K.,** *Rodent Sensory Neuron Culture and Analysis.* Current Protocols in Neuroscience 2006. Supplement 36 (Unit 3.19): p. 1--15.
54. **Perry, R.T., et al.,** *Subcellular Knockout of Importin β 1 Perturbs Axonal Retrograde Signaling.* Neuron. 2012. July 26; 75(2): p. 294--305.

55. **Chierz, S., et al.**, *The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK.* Eur J Neurosci 2005. 21: p. 2051–2062.
56. **Verma. P., et al.**, *Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration.* J Neurosci 2005. 25: p. 331–342.
57. **Court, F.A., et al.**, *Schwann Cell to axon Transfer of Ribosomes: Toward a Novel Understanding of the Role of glia in the Nervous System.* J Neurosc . 2008. 28(43): p. 11024--11029.
58. **Lopez-Verrilli, M. A., and Court F.A.** *Transfer of vesicles from Schwann cells to axons:a novel mechanism of Communications in the peripheral nervous system.* Frontiers in Physiology. 2012. 3: p. 1--7.