



“Análisis de expresión de la Proteína Pdcd4 en Sistema Nervioso”

Pasantía de Grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientación Biología Molecular

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Estudiante: Bach. Andrés Di Paolo

Tutor: Dr. José Roberto Sotelo Silveira

Co-Tutor: Dr. Pedro Aguilera

Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos (DPAN)

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Montevideo, Febrero 2013

Agradecimientos

Quisiera aprovechar este espacio para al menos mencionar a personas que han colaborado en que pudiese llegar a este punto en mi vida que si bien lo considero muy importante, también es solo el comienzo de muchas otras cosas que están por venir.

Al Dr. Pablo Torterolo y la Dra. Patricia Lagos por interesarse en leer este trabajo, muchas gracias.

A mis padres y hermanos que siempre me han apoyado durante toda la carrera y sin ellos no tendría nada.

A la incontable cantidad de compañeros y amigos que fui teniendo a lo largo de todos mis años de facultad: Gary, Nacho, Nati, Sergio, Pedro, Guille, Belén, Florencia, Victoria, Juan Imelio, Pablo, Paco, Mathías... todos los compañeros del fútbol de facultad y tantos otros que seguramente me esté olvidando. Pero quiero hacer una mención especial a Gary y Nacho que fueron como hermanos durante toda la carrera y lo seguirán siendo. Con ellos vivimos grandes momentos estudiando para infinidad de prácticos y exámenes... de verdad sin ustedes nunca habría logrado este paso.

A todos mis grandes amigos y compañeros del laboratorio: Charlie, Irene, Ale, Valeria, Joaquina, Nati, Lucia, Marianita, Karina, Lucia, Guille, Victoria, Aldo, Mathi los cuales hacen que cada día de trabajo sea un día más divertido, más ameno y siempre están dispuestos a ayudar y colaborar. Pero me veo en la necesidad de hacer una mención especial a Lucia Canclini, a quien además de mi amiga, la considero mi mentora y un modelo a seguir en el trabajo y en la vida. Gran parte de lo que he aprendido de cómo trabajar en un laboratorio, una parte importante, se lo debo a ella y siempre le estaré agradecido.

Por supuesto agradezco al Dr. Sotelo Silveira "Coya", que más que un orientador fue la persona que me abrió las puertas a la ciencia, a un laboratorio y que se jugó por mí en una etapa muy temprana de mi carrera y eso siempre lo voy a agradecer. Además solo hablando y discutiendo con él aprendo y estoy seguro que aprenderé muchísimo más de cómo ser un mejor científico. Más que un orientador, un gran amigo.

Agradezco a Pedro Aguilera y Ángel Caputi que colaboraron en gran parte del proyecto y pensamos continuar en esta línea en el futuro.

Agradezco al Dr. José Sotelo "Boli", quien permitió y permite que trabaje en su laboratorio y siempre tiene sugerencias y disponibilidad para hablar de todos los temas. Otro gran profesional y gran persona que también considero un ejemplo a seguir.

A todos los que se interesen en leer este trabajo, también muchas gracias.

Indice

1. Resumen	7
2. Introducción	8
2.1. Inicio de la traducción e importancia de su regulación	8
2.1.1. Inicio de la traducción	8
2.1.2. Regulación de la traducción y su importancia	10
2.2. Ejemplos de mecanismos de regulación del inicio de la traducción	11
2.2.1. Regulación del inicio de la traducción por eIF2	12
2.2.2. Regulación del inicio de la traducción por el factor de iniciación eIF4E	12
2.2.3. Regulación del inicio de la traducción por ARNs pequeños o miARNs	12
2.2.4. Regulación del inicio de la traducción por otros mecanismos	12
2.3. Una nueva proteína involucrada en la regulación del inicio de la traducción: Programmed Cell Death 4 (Pdc4)	13
2.4. Motivación por conocer cómo actúa Pdc4 en la regulación del inicio de la traducción	13
2.5. Estructura y Funciones de la proteína Pdc4	14
2.5.1. Estructura de la proteína Pdc4	14
2.5.2. Pdc4 en procesos de apoptosis	15
2.6. Antecedentes que motivaron la realización del proyecto	16
2.6.1. Reportes de Pdc4 en sistema nervioso presentes en la bibliografía	17
2.7. Potenciación a largo plazo tardío o L-LTP, un proceso de plasticidad sináptica producido en hipocampo donde es importante la regulación de la síntesis proteica	18
2.7.1. ¿Dónde podría intervenir Pdc4 en el proceso de regulación de la LTP?	18
2.8. Caracterización de la LTP	18
2.8.1. Concepto de LTP, el circuito neuronal en el hipocampo donde se produce LTP y las etapas del proceso	18
2.8.1.1. Circuitos neuronales en hipocampo	19
2.8.2. Propiedades del LTP, proteínas involucradas en su generación y proteínas sintetizadas <i>de novo</i> durante la L-LTP	19

2.8.2.1. Las tres propiedades básicas de la LTP	19
2.8.2.1.1. Especificidad	19
2.8.2.1.2. Asociatividad	21
2.8.2.1.3. Persistencia	21
2.8.2.2. Proteínas involucradas en la generación de LTP	22
2.8.2.2.1. Short Term Potenciación (STP).....	22
2.8.2.2.2. Early-LTP (E-LTP)	24
2.8.2.2.3. Late LTP (L-LTP)	26
2.9. L-LTP y regulación de la síntesis proteica: papel de la vía mTOR.....	28
2.10. Síntesis proteica axonal en condiciones de injuria del Nervio Ciático	30
3. Hipótesis.....	31
4. Objetivos.....	32
4.1. GENERAL.....	32
4.2. ESPECÍFICOS	32
5. Materiales y Métodos	33
5.1. Fijación.....	33
5.2. Crioprotección	33
5.3. Consideraciones sobre la orientación de los cortes	34
5.4. Inmunohistoquímica Indirecta.....	34
5.5. Electrofisiología.....	35
5.6. Protocolo de lesión en nervio ciático.....	37
5.7. Cuantificación de las señales de Pdc4 y Análisis Estadístico	37
5.7.1. Cuantificación de la señal de Pdc4 en somas y dendritas de las regiones de la neocorteza cerebral, cerebelo e hipocampo.....	37
5.7.2. Cuantificación de la señal de Pdc4 en axones de nervio ciático cortados en sentido transversal	39
5.7.3. Cuantificación de la señal de Pdc4 en los axoplasmas de axones de nervio ciático lesionados cortados en sentido longitudinal	40
6. Resultados.....	42

6.1. Pcd4 se expresa en distintas regiones del SNC	42
6.1.1. La señal de Pcd4 se distribuye en somas y dendritas de las neuronas piramidales de Neocorteza Cerebral	42
6.1.2. La señal de Pcd4 se distribuye en los somas y dendritas de las neuronas de Hipocampo	44
6.1.3. La señal de Pcd4 se distribuye a lo largo de las neuronas de Purkinje del Cerebelo	46
6.1.4. La señal de Pcd4 se distribuye en neuronas de Médula Espinal	48
6.2. Pcd4 se expresa en axones del SNP	49
6.2.1. La señal de Pcd4 se distribuye en el axoplasma de los axones de nervio ciático y en el citoplasma externo e interno de las Células de Schwann	49
6.3. La señal de expresión de Pcd4 disminuye al inducirse procesos de plasticidad sináptica en SNC y de regeneración axonal en SNP	53
6.3.1. En nervio ciático en regeneración, la señal de Pcd4 es menor en axoplasmas cercanos al sitio de lesión respecto a los más alejados	53
6.3.2. La señal de Pcd4 disminuye cuando se induce L-LTP en slices de Hipocampo	55
7. Discusión y Conclusiones	58
7.1. Distribución de la señal de Pcd4 en SNC	58
7.1.1. Expresión de Pcd4 en somas y dendritas de neocortex e hipocampo	58
7.1.2. Expresión de Pcd4 en somas y dendritas del cerebelo	59
7.2. Distribución de la señal de Pcd4 en SNP	59
7.2.1. Expresión de Pcd4 en el axoplasma y en las células de Schwann	59
7.3. Disminución en la expresión de Pcd4 en el axoplasma de los axones de nervio ciático cercanos al sitio de lesión	60
7.4. Disminución en la señal de expresión de Pcd4 cuando se induce L-LTP	60
7.5. Conclusión General	61
8. Perspectivas	63
9. Bibliografía	65
10. Anexo 1. Principios básicos de las técnicas realizadas	77
10.1. Fijación	77
10.1.1. Características del Paraformaldehido	78

10.2. Crioprotección	78
10.3. Inmunohistoquímica Indirecta.....	79
10.3.1. Fluorescencia	79
10.3.1.1. Espectro de emisión	79
10.3.1.2. Rendimiento cuántico	80
10.3.1.3. Quenching	80
10.3.1.4. Vida media de fluorescencia	80
10.3.2. Anticuerpos utilizados.....	81
10.3.2.1. Anticuerpo anti- Neurofilamento 68.....	81
10.3.2.2. Anticuerpo anti-Myelin Associated Glycoprotein (MAG).....	81
10.3.2.3. Anticuerpo anti- proteína ribosomal P.....	82
10.3.2.4. Sondas Faloidina y DAPI	82
10.4. Principios de la Microscopia Confocal	83

1. Resumen

La traducción de proteínas es un proceso importante en el metabolismo celular. Consta de tres etapas: iniciación, elongación y terminación, en donde los procesos de regulación son relevantes en diversas células diferenciadas. En este trabajo se estudia una proteína descrita como represor del inicio de la traducción llamada ***Programmed Cell Death 4 (Pdc4)***. Fue identificada inicialmente como un supresor de tumores y se expresa ubicuamente en diferentes tejidos. Actúa río abajo de la vía mTOR al interferir la capacidad de eIF4G para interactuar con eIF4A, inhibiendo la actividad helicasa de esta última y dificultando la formación del complejo de pre-iniciación de la traducción. Un análisis de blancos de Pdc4 mediante la metodología de *ribosomal footprinting* en células T47D, identificó genes relacionados con el desarrollo y plasticidad sináptica en sistema nervioso central (SNC), sugiriendo que Pdc4 podría estar involucrado en la regulación de estos procesos. Aunque el gen de Pdc4 se expresa en sistema nervioso, aún no se han desarrollado estudios a resolución celular sobre la distribución de la proteína en SNC y sistema nervioso periférico (SNP). En este trabajo planteamos caracterizar la distribución de la proteína Pdc4 en regiones particulares del sistema nervioso mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. A su vez intentamos observar si existen variaciones en procesos de plasticidad como son la lesión axonal o la potenciación a largo plazo (LTP), eventos donde la regulación de la traducción es relevante. Al estudiar su expresión en nervio ciático, médula espinal, cerebelo, neocorteza cerebral e hipocampo en ratas y ratones adultos, observamos que Pdc4 se expresa en el axoplasma de los axones y en las células de Schwann del SNP, así como en somas y dendritas del SNC. En neuronas de neocorteza cerebral e hipocampo se observa una señal cuantitativamente superior en dendritas respecto al soma neuronal, no así en neuronas de Purkinje de cerebelo. Al investigar en eventos de LTP tardío (L-LTP) mediante experimentos *ex vivo* sobre rodajas (*slices*) de hipocampo de rata, observamos una disminución en la expresión de Pdc4 respecto a la condición control, sugiriendo un posible papel de esta proteína en estos procesos plásticos. En el caso de axones lesionados en nervio ciático, los axoplasmas próximos al sitio de lesión presentan menor señal de Pdc4 respecto a los más alejados, sugiriendo la importancia que podría tener esta proteína en la regulación de procesos relacionados con regeneración axonal. Esto nos permite plantear que quizás existirían ARNm regulados por Pdc4 en procesos de regeneración y de plasticidad sináptica. Estos transcritos quizás aumentarían su tasa traduccional al degradarse Pdc4, proceso desencadenado, potencialmente, a través de su fosforilación por S6K1 estimulada por el complejo m-TOR.

2. Introducción

2.1. Inicio de la traducción e importancia de su regulación

2.1.1. Inicio de la traducción

La síntesis proteica o traducción es uno de los procesos básicos de la expresión génica y consta de tres fases fuertemente reguladas: iniciación, elongación y terminación (Alberts *et al.*, 2004). Es claro en la actualidad que su regulación es tan importante en el control de la expresión génica como la regulación de la transcripción. Aunque se han descubierto nuevos elementos reguladores claves de la traducción, como los ARN pequeños o microARNs (miARNs), son escasas las proteínas descritas con funciones regulatorias en la síntesis de proteínas. El contexto general de este trabajo se centra en un esfuerzo por estudiar un regulador de este tipo llamado *Programmed Cell Death 4* (Pcd4), descrito relativamente en forma reciente (Shibahara *et al.*, 1995; Lankat-Buttgereit & Göke, 2009).

Las tres fases de la traducción (**Figura 1**) son regulables a distintos niveles mediante diversos mecanismos (Alberts *et al.*, 2004). La fase de iniciación de la traducción del ARN mensajero (ARNm) en eucariotas, es un proceso que en la mayoría de los transcriptos es CAP dependiente (Alberts *et al.*, 2004). El CAP corresponde a la adición de un grupo metilo al carbono 7 de la guanina en el extremo 5' del ARNm y es necesario para el ensamblaje de la maquinaria traduccional (Alberts *et al.*, 2004). Sin embargo, en algunos ARNm no hay ensamblaje de esta estructura, presentando en su lugar un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) que corresponde a una secuencia nucleotídica ubicada en el extremo 5' no traducido del ARNm (5' UTR). Los IRES son reconocidos por el complejo de pre-iniciación de la traducción (43S) y determina entonces los marcos abiertos de lectura de estos ARNm (ORFs) (Pelletier & Sonenberg, 1988).

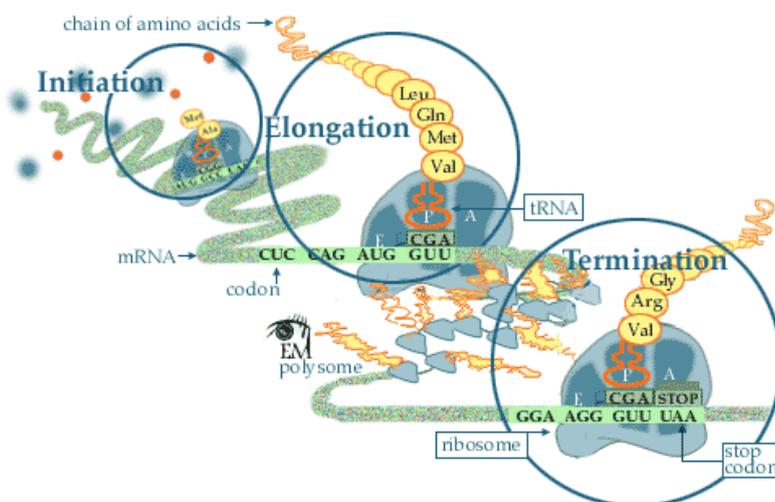


Figura 1. Esquema general de las 3 fases de la traducción: iniciación, elongación y terminación.

La fase de iniciación incluye procesos donde intervienen factores de iniciación de la traducción (eIFs) que permiten el posicionamiento del ribosoma completo en el codón AUG del inicio de la traducción. La fase de elongación comienza cuando el ribosoma recorre el ARNm participando también factores de elongación y los ARN de transferencia (ARNt). En esta etapa se desarrolla la síntesis del polipéptido. Finalmente en la fase de terminación, el ribosoma alcanza un codón STOP separándose del ARNm y el polipéptido es finalmente liberado. [Adaptado de Nobelprize.org, dirección web: <http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/translation/>].

La iniciación de la traducción incluye todos los eventos moleculares que se producen hasta darse el posicionamiento del ribosoma completo (80S) en el codón de inicio del ARNm, continuando luego la fase de elongación de la traducción (Watson *et al.*, 2007). En la fase de iniciación, participan un gran número de proteínas y está fuertemente regulada. Dentro de estas proteínas, algunas se clasifican como factores de iniciación de la traducción (**eIFs**), los cuales interactúan con la subunidad menor del ribosoma (40S) y con una región conservada en la mayoría de los ARNm que se encuentra formando parte de la región 5'UTR. El primer eIF en participar es eIF3, quien se une a la subunidad menor del ribosoma (40S). De esta forma se evita la unión prematura de la subunidad 40S con la subunidad ribosomal mayor (60S). eIF3 también interacciona con el complejo eIF4F el cual está conformado por eIF4E, **eIF4A**, eIF4G1 y eIF4G2. El factor eIF4E es una proteína de unión al CAP del ARNm, el factor eIF4A es una ARN helicasa bidireccional ATP dependiente y los factores eIF4G1 y eIF4G2 conforman eIF4G. Esta última es una proteína de *scaffold* que asociada a los otros dos componentes de eIF4F (eIF4E y eIF4A) sirve de nexo al complejo 40S a través de eIF3. Es de relevancia la actividad de eIF4A. Esta proteína forma parte del complejo de ARN helicasas conocidas como *DEAD-Box* las cuales catalizan el correcto desdoblamiento o reordenamiento del ARN. En el caso particular de eIF4A, es una ARN helicasa ATP dependiente que participa en el inicio de la traducción catalizando el desdoblamiento de la estructura secundaria del ARNm en su región 5'UTR (Parsyan *et al.*, 2011). Su actividad helicasa es aumentada al interactuar con los factores eIF4B y eIF4H.

Otro paso inicial que debe darse en el inicio de la traducción es la formación de un complejo ternario compuesto por eIF2 (conformado por sus subunidades alfa, beta, gamma), una molécula de GTP y el ARN de transferencia inicial portador de un residuo de metionina (Met-ARNt^{Met}) que unidos al sitio P de la subunidad 40S, forman el **complejo de pre-iniciación 43S**. Este último se une a la estructura CAP del ARNm, escanea la región 5'UTR y ubica el codón **AUG** de inicio de la traducción. Para la elección de este sitio, participan eIF1, eIF2 y eIF3, los cuales se unen a la superficie de la subunidad ribosomal menor 40S, siendo importantes para la unión entre esta última y la subunidad mayor del ribosoma (60S). Para que esta unión en el AUG del ARNm se produzca, es necesaria la salida de eIF2 que se encuentra unido a la subunidad 40S. En este paso, participa los factores eIF5 y eIF5B que son GTPasas que hidrolizan el GTP unido al factor eIF2, desplazándolo del complejo del 40S. Finalmente, cuando la subunidad ribosomal mayor 60S se une a la menor 40S, se forma el ribosoma completo 80S, comenzando la fase de elongación donde participan factores de elongación (**Figura 2**).

2.1.2. Regulación de la traducción y su importancia

La traducción en eucariotas es un proceso post-transcripcional (Watson *et al.*, 2007). Los mecanismos de regulación post-transcripcional pueden clasificarse en:

- 1) Mecanismos de procesamiento del ARNm hasta alcanzar su forma madura. Estos incluyen la poli-adenilación, la adición del 5' *capping* (o CAP) y el *splicing* alternativo (Collins & Guthrie, 2000; Proudfoot *et al.*, 2002)
- 2) Mecanismos de exportación del ARNm y la determinación de su localización subcelular (Stewart, 2007)
- 3) Mecanismos de control del decaimiento o degradación del ARNm

4) Mecanismos de control de la traducción del ARNm

- 5) Mecanismos desarrollados posteriormente a que la proteína fue sintetizada, incluyendo modificaciones postraduccionales y degradación vía proteosomal.

Centrándonos en el punto 4, es importante resaltar que la regulación traduccional presenta ciertas ventajas respecto a otros mecanismos de regulación (Lackner & Bähler, 2008). Dentro de estas ventajas, se incluye que la traducción puede ocurrir sin la necesidad de que sucedan los otros eventos de procesamiento y transporte del ARNm. También es un proceso usualmente reversible, especialmente en los casos donde la traducción es activada debido a la fosforilación de eIFs. Además, la traducción es una forma de regular la distribución espacial de los productos finales de la expresión génica (Lackner & Bähler, 2008). Si consideramos el caso específico de las neuronas, la localización específica de las proteínas en cada compartimento es una actividad importante para el mantenimiento celular y el desarrollo neuronal, debido a que la transcripción está limitada solamente al núcleo. Entonces la regulación de la traducción es esencial para permitir el destino correcto de las proteínas formadas (Lackner & Bähler, 2008). Por último, la regulación de la traducción es una forma muy fina de regular la expresión génica, existiendo genes que son finamente regulados tanto a nivel transcripcional como traduccional (Lal *et al.*, 2006).

Se suele diferenciar la regulación traduccional a nivel global de la regulación específica de ARNm blanco. La primera forma de regulación involucra numerosos ARNm y la segunda forma permite un control fino de un set específico de ARNm (Gebauer & Hentze, 2004). En definitiva, regular la traducción permite a las células responder adecuada y rápidamente a diversas situaciones, incluyendo eventos de stress (Holcik & Sonenberg, 2005), de inducción de apoptosis (Morley & Coldwell, 2007), de plasticidad sináptica (Klann & Richter, 2007), entre otros.

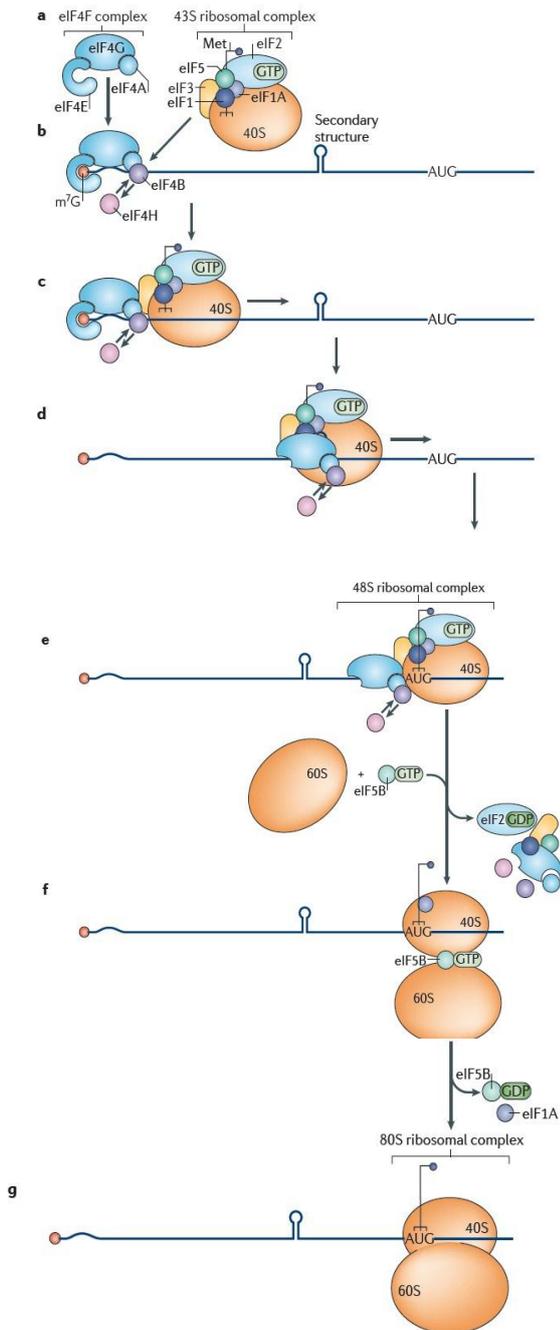


Figura 2. Esquema del Inicio de la Traducción CAP dependiente en eucariotas. Se muestran los pasos principales y los factores de transcripción involucrados.

a) En un primer paso, se forman 2 complejos macromoleculares: por un lado el Factor 4F de iniciación de la traducción (eIF4F), formado por eIF4G, eIF4A y eIF4E. Por otro lado, eIF3, eIF1, eIF1A, el Met-ARNt^{Met} y probablemente eIF5 se unen a la subunidad 40S, formando el complejo de pre-iniciación 43S.

b) El factor eIF4E que forma parte de eIF4F, interacciona directamente con el metilo de la guanina del CAP en el ARNm. Además eIF4G y eIF3 se unen la subunidad ribosomal con el ARNm. Se forma el complejo de pre-iniciación 43S.

c) Se produce el escaneo del complejo 43S en sentido 5' a 3', hasta encontrar la estructura secundaria característica del ARNm que indica el sitio de inicio de la traducción.

d) La helicasa eIF4A, deshuelve la estructura secundaria del ARNm. eIF4B y eIF4H potencian la actividad helicasa de eIF4A. Pasado este paso, el complejo 43S escanea el ARNm hasta encontrar el codón de inicio de la traducción (AUG).

e) Se reconoce el codón de inicio por el complejo 43S, formándose el complejo ribosomal 48S. eIF5 media la hidrólisis del GTP unido a eIF2 separándose este último del complejo 43S junto con los otros factores de iniciación, quedando la subunidad 40S unida al ARNm. Por otro lado, eIF5B-GTP recluta la subunidad 60S, para formar la subunidad ribosomal 80S o ribosoma completo (40S + 60S).

f) eIF5B hidroliza el GTP y junto con eIF1A es liberado del complejo 80S.

g) En la fase de elongación de la traducción, la subunidad 80S madura ya esta formada.

[Adaptado de: "mRNA helicases: the tacticians of translational control", Figura 1, Parsyan *et al*, *Nature Reviews*, 2011].

2.2. Ejemplos de mecanismos de regulación del inicio de la traducción

Respecto a la regulación a nivel del inicio de la traducción, hay un estudio donde se sugiere que la fase de iniciación sería el paso limitante del proceso (Lackner *et al.*, 2007). Además, en el inicio de la traducción participan cerca de 25 proteínas (Pestova *et al.*, 2000) mientras que en el resto de las etapas, el número es sensiblemente menor.

2.2.1. Regulación del inicio de la traducción por eIF2

El factor eIF2 forma un complejo ternario junto con una molécula de GTP y el Met-ARN^{tMet}. Dicho complejo se une a la subunidad menor del ribosoma (40S) formándose el complejo de pre-iniciación de la traducción 43S (Hinnebusch *et al.*, 2007). Sin embargo en condiciones de stress celular, eIF2 es fosforilado en su subunidad alfa, pasando a llamarse **eIF2 α** . Esto produce en eIF2 una inhibición en su actividad de intercambio de GDP por GTP, con lo cual la formación de complejos ternarios se ve reducida y la traducción global a nivel celular es disminuida (Dever *et al.*, 1992).

2.2.2. Regulación del inicio de la traducción por el factor de iniciación eIF4E

Este factor presenta sitios de unión para proteínas llamadas proteínas de unión a eIF4E (**4EBPs**) que inhiben su actividad. Dado que los mencionados sitios de la proteína eIF4E son también los sitios de unión a eIF4G, cuando eIF4E se une a las 4EBPs, se dificulta la interacción entre eIF4E y eIF4G. Esto produce que eIF4G se asocie menos veces con eIF4A lo que culmina en un menor número de complejos de pre-iniciación 43S formados y por tanto una disminución de la traducción (Richter & Sonenberg, 2005). Las proteínas 4EBPs compiten con eIF4G por la unión a eIF4E, y la afinidad de las 4EBPs por eIF4E se regula a través de su fosforilación (Gingras *et al.*, 1999). Las formas hipofosforiladas de las 4EBPs, se unen con alta afinidad a eIF4E y por tanto inhiben la traducción. El caso contrario es con las formas hiperfosforiladas, uniéndose con baja afinidad a eIF4E y por tanto no inhiben la traducción.

2.2.3. Regulación del inicio de la traducción por ARNs pequeños o miARNs

Si bien no está completamente definido si actúan a nivel del inicio de la traducción, existen trabajos que lo sugieren (Humphreys *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2005). Los miARNs son ARNs de entre 21 y 26 nucleótidos, derivados de ARNs precursores de unos 70 nucleótidos y su maduración depende de la actividad de las enzimas Dicer y Argonauta (Jackson & Standart, 2007). Presentan complementariedad perfecta o en algunos casos imperfecta con secuencias específicas de sus ARNm blanco. Los miARN activos disminuyen la síntesis de proteínas de aquellos transcritos que regulan y no disminuyen el número de estos ARNm, por lo cual actuarían solo a nivel de la traducción y no de la transcripción (Jackson & Standart, 2007).

2.2.4. Regulación del inicio de la traducción por otros mecanismos

Otras formas de regular el inicio de la traducción son mediante la fosforilación de los factores de iniciación de la traducción (Dever *et al.*, 1992); regulación a través del mismo ARNm por la presencia de elementos en *cis* (dentro de la secuencia del ARNm) particularmente en el 5'UTR y el 3'UTR que presentan señales para proteínas de unión al ARN (Gebauer & Hentze, 2004) o regulación a través del ribosoma y los elementos que lo integran. Un ejemplo de este último caso es por intermedio de la fosforilación de la proteína

ribosomal S6 (pr6) a través de la proteína S6 Kinasa 1 (S6K1). Esto produce un aumento en la síntesis proteica de aquellos ARNm que presentan una secuencia de oligo-pirimidinas en el tracto 5' terminal, conocidos como TOP-mRNAs (Jefferies *et al.*, 1994).

2.3. Una nueva proteína involucrada en la regulación del inicio de la traducción: *Programmed Cell Death 4 (Pdc4)*

Pdc4 ha sido reportada como un represor del inicio de la traducción que interacciona con eIF4A, inhibiendo su actividad helicasa, no permitiendo su unión con el factor eIF4G dificultando entonces la formación del complejo de pre-iniciación de la traducción 43S (Goke *et al.*, 2002). En la secuencia de la proteína Pdc4 se encuentran 2 dominios conservados **MA-3**, también presentes en factores de iniciación de la traducción (eIFs) como eIF4G. La secuencia consenso de estos dominios representa una región alfa helicoidal formada por unos 120 aminoácidos con un 85% de consenso en su estructura secundaria (Yang *et al.*, 2004). En humanos, eIF4G presenta dominios MA-3 dentro de sus dos sitios de unión con eIF4A. Estos sitios están ubicados en la región central de eIF4G desde el aminoácido 635 a 1039 (eIF4Gm) y en la región carboxilo terminal (eIF4Gc). Esto sugiere un rol importante de los dominios MA-3 en el inicio de la traducción (Aravind & Koonin, 2000; Ponting, 2000). Se ha reportado que la unión de eIF4A al sitio de unión eIF4Gm es suficiente para permitir el inicio de la traducción tanto CAP dependiente (De Gregorio *et al.*, 1999) como para los ARNm con IRES (Marcotrigiano *et al.*, 2001). Sin embargo, para alcanzar niveles robustos de traducción, es necesaria la unión de eIF4A a ambos sitios de unión de eIF4G (Morino *et al.*, 2000).

2.4. Motivación por conocer cómo actúa Pdc4 en la regulación del inicio de la traducción

Considerando que Pdc4 y eIF4G presentan dominios conservados MA-3 y que estas dos proteínas compiten por la unión a eIF4A, interesa investigar cómo actúa Pdc4 en la regulación de la fase inicial de la traducción. Se han realizado estudios que describen la interacción entre eIF4A y Pdc4 (Goke *et al.*, 2002; LaRonde-LeBlanc, 2007), confirmándose una disminución en la actividad helicasa de eIF4A frente a un aumento en las concentraciones de Pdc4, teniendo como consecuencia una represión en los procesos de traducción de ARNm CAP dependientes (Yang *et al.*, 2003). eIF4A presenta los mismos sitios de unión para Pdc4 y para eIF4G. Cuando se realizan mutaciones en los dominios MA-3 de Pdc4 se observa una pérdida parcial o total en su capacidad de interactuar con eIF4A y, por ende, en su rol como inhibidor de la traducción (Yang *et al.*, 2004). Sin embargo si se realizan mutaciones en los sitios de unión de eIF4A con eIF4G/Pdc4 se produce una pérdida total respecto a su capacidad de unión a eIF4G, pero algunas de esas mutaciones aún permiten la

unión con Pdc4 y no con eIF4G. Esto sugiere que existe una mayor afinidad de eIF4A por Pdc4 (Zakowicz *et al.*, 2005). Mediante cristalografía se determinó que la región del dominio MA-3 Carboxilo terminal de Pdc4 (MA-3c) compite con eIF4G por la unión a eIF4A y ello sería suficiente para inhibir la traducción (LaRonde-LeBlanc, 2007; Waters *et al.*, 2007). Sin embargo, la región MA-3 amino terminal de Pdc4 (MA-3m) fue posteriormente obtenida por cristalografía (Suzuki *et al.*, 2008) llegándose a la conclusión de que actúa en forma sinérgica con el dominio MA-3c. Por tanto MA-3m y MA-3c son necesarias para una unión de alta afinidad con eIF4A. Otros estudios consideran que la regulación de la traducción por Pdc4 podría ser incluso más compleja, reportándose que Pdc4 presentaría una actividad de unión al ARN (Böhm *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2002). La **Figura 3** muestra cómo serían las interacciones de Pdc4 a través de sus dominios MA-3.

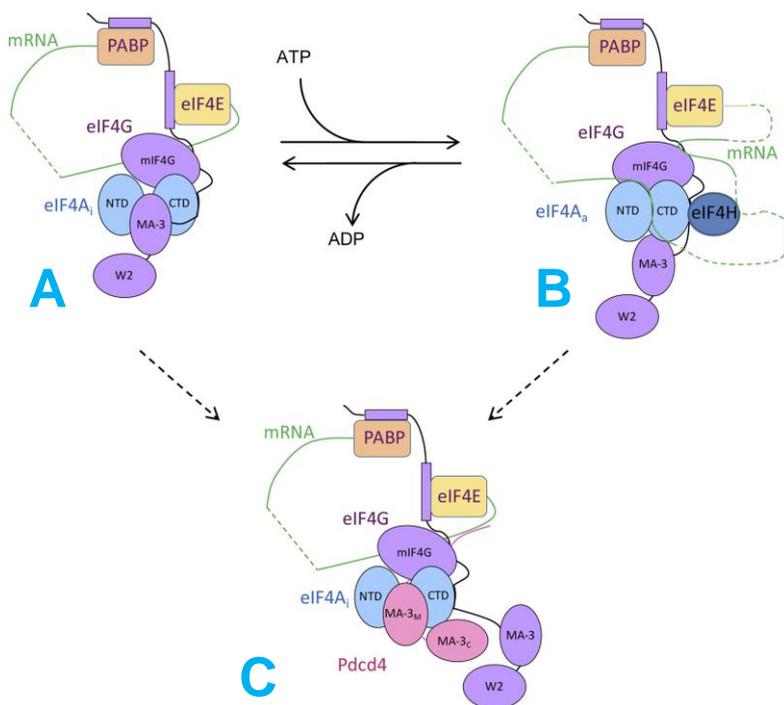


Figura 3. Esquema de las Interacciones de Pdc4 a través de sus dominios MA-3. En ausencia de ATP (esquema A) la interacción entre eIF4A y el dominio MA-3 de eIF4G estabiliza la conformación abierta e inactiva de eIF4A (eIF4Ai), bloqueando parcialmente la secuencia de unión al ARN de eIF4A. Si hay ATP (esquema B), el ARN, el dominio MA-3 medial de eIF4G (eIF4Gm) y el factor eIF4H se unen cooperativamente a eIF4A promoviendo su conformación cerrada y activa (eIF4Aa). Finalmente, el mecanismo por el que actuaría Pdc4 (esquema C) es bloqueando el sitio de unión al ARN de eIF4A no permitiendo el cambio conformacional de eIF4A a su forma activa, permaneciendo como eIF4Ai. Podrían existir interacciones adicionales entre Pdc4 y eIF4G o incluso entre Pdc4 y el ARNm. [Adaptado de: Waters *et al.*, *The Journal of biological chemistry*, 2011, Figura 8]

2.5. Estructura y Funciones de la proteína Pdc4

2.5.1. Estructura de la proteína Pdc4

Pdc4 es una proteína expresada en forma ubicua en varios tejidos analizados (Lankat-Buttgereit & Göke, 2003), aunque no se ha descrito su expresión en sistema nervioso. Presenta un largo de secuencia de 469 aminoácidos, con 2 dominios básicos en los extremos amino terminal y carboxilo terminal y 2 dominios conservados MA-3, uno en la región carboxilo terminal (MA-3c) y otro en la región central de la proteína (MA-3m) (Goke *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002). Se ha reportado que presenta una región amino terminal de unión al

ARN (Böhm *et al.*, 2003; Wedeken *et al.*, 2010). Dentro de la secuencia de aminoácidos, se han identificado 2 sitios de fosforilación en residuos de Serina en los residuos aminoacídicos 67 y 457 (**Figura 4**). La proteína **S6 kinasa-1 (S6K1)** fosforila Pdc4, marcándolo como sustrato de degradación celular a través de su ubiquitinación por la *E3 ubiquitin β transducin contain protein 1* (β-TrCP1) y su posterior degradación por el proteosoma (Dorrello *et al.*, 2006). La vía Akt/ProteínKinasa B también fosforila a Pdc4 en sus sitios Ser67 y Ser457, provocando en este caso su translocación al núcleo (Palamarchuk *et al.*, 2005). Se observó que la redistribución de Pdc4 al núcleo produce un descenso en su actividad como inhibidor de la transcripción de **AP-1**. AP-1 es un factor de transcripción heterodimero compuesto por las proteínas **c- Jun y c- Fos** cuya activación sería inhibida por Pdc4, en este caso a nivel transcripcional, aunque se desconoce cómo sería el mecanismo involucrado (Yang *et al.*, 2001).

Por otra parte, se ha determinado que la síntesis del **microARN-21 (miR-21)** inhibe la expresión del ARNm de Pdc4, identificándose un potencial sitio conservado en la región 3'UTR del ARNm de Pdc4 que correspondería al sitio de interacción con miR-21 (Davis *et al.*, 2009).

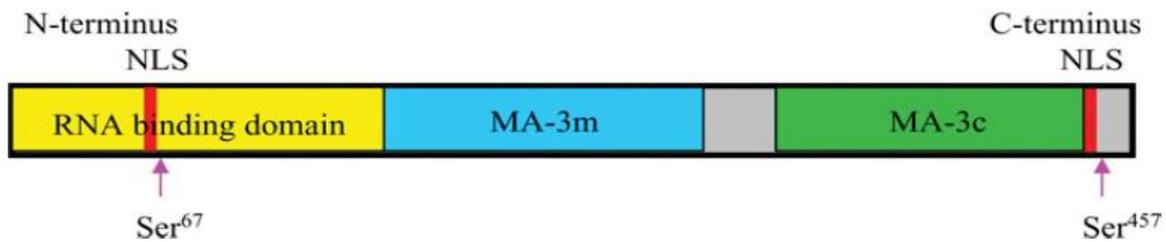


Figura 4. Esquema de la Estructura de Pdc4. Se indican en rojo los sitios putativos de localización nuclear (NLS); con 2 flechas los sitios de fosforilación; la región en amarillo indica el sitio de unión al ARN; la región en celeste corresponde al dominio conservado MA-3m y la región en verde al dominio carboxilo terminal MA-3c. [Adaptado de: Lankat-Buttgereit & Rudiger Goke, *Biology of The Cell*, 2009, Figura 1].

2.5.2. Pdc4 en procesos de apoptosis

En un inicio se identificó el gen PDCD4 vinculado con procesos de apoptosis (Shibahara *et al.*, 1995). Se determinó un aumento en la expresión de Pdc4 *in vitro* cuando se induce la apoptosis en presencia de agentes inductores del proceso como son la ionomicina y el PMA. En otros trabajos, se observó un descenso en la expresión de Pdc4 en células incubadas en presencia de las interleukinas apoptóticas 2 y 15 (Azzoni *et al.*, 1998) y no se observaron cambios al someter células a UV o a inhibidores de topoisomerasas (Onishi & Kizaki, 1996; Onishi *et al.*, 1998). Por otra parte se ha identificado que la vía del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y de S6 kinasa 2 (S6K2) es regulada por Pdc4 en células tumorales. En procesos de proliferación tumoral, la vía de FGF-2/S6K2 es activada aumentando la expresión

de algunos ARNm. Dentro de estos ARNm están los que dan lugar a las proteínas anti-apoptóticas XIAP y Bcl-x(L). Pdc4 se une a los IRES de estos ARNm y disminuye su expresión, por lo cual Pdc4 induciría en este caso un efecto pro-apoptótico (Liwak *et al.*, 2012).

2.6. Antecedentes que motivaron la realización del proyecto

En nuestro grupo de trabajo, existen antecedentes de estudios con esta proteína. Por un lado, está el trabajo realizado por el Dr. Sotelo Silveira, quien ha aplicado y adaptado durante su estadía posdoctoral en el *National Cancer Institute*, NIH USA, un método que permite determinar a escala genómica cuáles son los ARNm que se encuentran traducidos en una determinada etapa de la vida de las células. Este método se conoce como **secuenciado masivo de huellas ribosomales** (del inglés: **Ribosomal Footprinting**), (Ingolia *et al.*, 2009). Por esta metodología, se realizó un análisis a escala genómica a partir de células de la línea T47D contemplando dos condiciones: un grupo con silenciamiento mediante pequeños ARNs interferentes (siRNA) específicos para el gen PDCD4 y un grupo control. Se buscaron posibles blancos sobre los que actuara Pdc4 y dado que esta proteína es reportada como un represor de la traducción, se decidió estudiar los genes con un aumento en sus niveles de expresión respecto a la condición control sin silenciamiento. Con esta lista de genes se realizaron análisis de ontogenia mediante el software Ingenuity (*Ingenuity Systems*[®] Redwood City, California, USA-www.ingenuity.com). Estos análisis permiten clasificar los genes en grupos funcionales según sus roles en el metabolismo. Se encontraron genes sobre-expresados en las categorías funcionales de señalización celular e interacción célula-célula (43 genes); ensamblaje y reorganización celular (37 genes) y en **desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (61 genes)**. En la actualidad, un integrante de nuestro laboratorio, el Lic. Guillermo Eastman, está llevando a cabo un proyecto de maestría que tiene como objetivo determinar blancos potenciales para la proteína Pdc4 en sistema nervioso empleando la metodología de *Ribosomal Footprinting*.

Con esta información, surgió el interés por estudiar la distribución de la proteína Pdc4 en el sistema nervioso, ya que si se considera su papel en la regulación de la traducción, su rol en las células nerviosas debería ser relevante. La síntesis de proteínas en neuronas se encuentra regulada por numerosas vías que aseguran una correcta respuesta frente a los cambios en su entorno, interacción con otras neuronas, con células gliales y una correcta expresión de los productos finales que permitan el buen funcionamiento del sistema nervioso en general (Squire *et al.*, 2008).

2.6.1. Reportes de Pcd4 en sistema nervioso presentes en la bibliografía

Recientemente se realizó un estudio que determinó los cambios en la expresión de Pcd4 en respuesta a distintas concentraciones de etanol en células corticales primarias en fetos de rata (Narasimhan *et al.*, 2012), siendo esto un modelo del **Síndrome Alcohólico Fetal** (Mattson *et al.*, 1996). Concluyen que Pcd4 participa disminuyendo la síntesis proteica inducida por efecto del alcohol, ya que cuando se induce el proceso, aumenta la concentración de Pcd4 disminuyendo la síntesis proteica. Demuestran que es específicamente Pcd4 quien regula el proceso inhibiendo la expresión de Pcd4 por la metodología de siRNA observando la pérdida del efecto de represión en la traducción.

También se conoce la distribución del ARNm de Pcd4 en sistema nervioso central (SNC) mediante hibridaciones *in situ* realizadas en cerebro y médula espinal de ratón por el *Allen Institute for Brain Atlas* (Lein *et al.*, 2007). En la **Figura 5** se puede observar como el ARNm de Pcd4 se expresa en el cerebro de ratón adulto y lo hace en altos niveles en **la región del hipocampo** respecto a otras regiones. Si el ARNm de Pcd4 se expresa en hipocampo, es probable que también lo haga la proteína y posiblemente se encuentre regulando la síntesis proteica de ciertos ARNm importantes en procesos que puedan darse en esta región. Respecto a la médula espinal, en la **Figura 6** se puede observar que el ARNm de Pcd4 se expresa en médula espinal, y lo hace en niveles intensos en ciertas regiones del asta ventral, incluyendo las motoneuronas. Sin embargo, no existen en la bibliografía estudios sobre la distribución de la proteína Pcd4 en sistema nervioso a resolución celular.

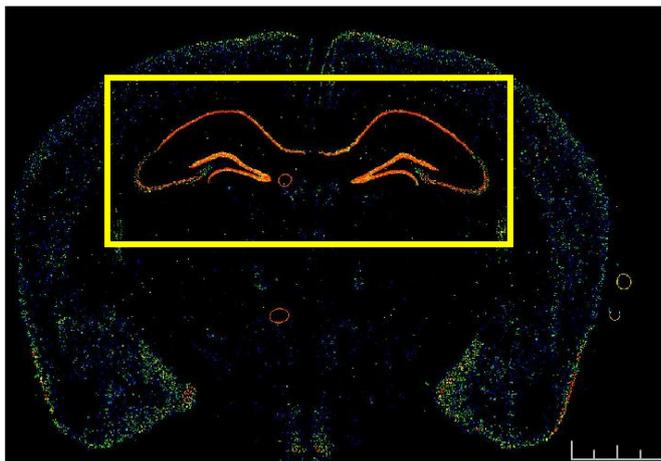


Figura 5. Hibridización *in situ* de Pcd4 en un corte coronal del cerebro de ratón. Los puntos en rojo evidencian mayor expresión del ARNm de Pcd4, siendo muy intenso en el hipocampo. [Adaptado del *Allen Institute for Brain Atlas* (Lein *et al.*, 2007) dirección web de la imagen: <http://mouse.brain-map.org/experiment/siv?id=73931413&imageId=73914601&imageType=expression,ish,nissl&initImage=expression&showSubImage=y&colormap=0.5,1,0,256,4&coordSystem=pixel&x=4936.5&y=3712.5&z=5>]

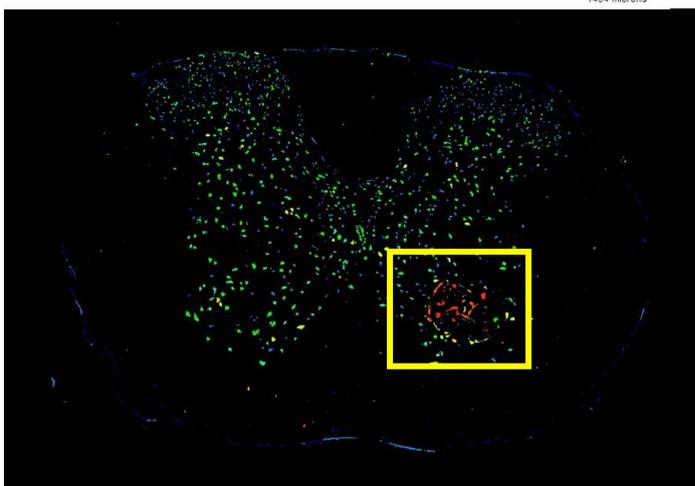


Figura 6. Hibridización *in situ* de Pcd4 en un corte transversal de médula espinal de ratón a la altura de las vértebras cervicales. Los puntos en rojo evidencian mayor expresión del ARNm de Pcd4, siendo intenso en algunas regiones del asta ventral, particularmente en motoneuronas. [Adaptado del *Allen Institute for Brain Atlas* (Lein *et al.*, 2007). Dirección web de la imagen: <http://mousespinal.brain-map.org/siv?imageId=100623912&showSubImage=y&imageType=ish,nissl,expression&initImage=expression&colormap=0.5,0.9899,0,255,4>].

2.7. Potenciación a largo plazo tardío o L-LTP, un proceso de plasticidad sináptica producido en hipocampo donde es importante la regulación de la síntesis proteica

Existen procesos en el sistema nervioso donde la regulación de la síntesis proteica es importante. Tal es el caso de los procesos de plasticidad sináptica (Andersen *et al.*, 2007). Uno de los ejemplos más estudiados de plasticidad en sistema nervioso es la vía de generación de **Potenciación a Largo Plazo o Long Term Potenciatiions (LTP)**, descrita inicialmente en el hipocampo (Bliss & Lømo, 1973) y posteriormente identificada en otras regiones del sistema nervioso central. Es una forma de potenciación de la transmisión sináptica donde se da la despolarización de las neuronas pre y postsináptica (Andersen *et al.*, 2007). Para el mantenimiento en el tiempo de este proceso, es importante el control en el inicio de la traducción (Costa-Mattioli *et al.*, 2009). Respecto a los mecanismos de regulación de la traducción en LTP, se ha reportado la importancia de la **vía mTOR (Mammalian Target of Rapamycin)** en la regulación de la síntesis proteica durante la etapa de consolidación de la LTP, etapa conocida como **LTP tardío o Late LTP (L-LTP)** (Cammalleri *et al.*, 2003; Lenz & Avruch, 2005; Stoica *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2002). Uno de los blancos de fosforilación de mTOR es la proteína S6K1. Se ha observado un aumento en la expresión en dendritas de la forma activa de S6K1 (que corresponde a su forma fosforilada **Thr-389-S6K1**) cuando se induce la L-LTP (Cammalleri *et al.*, 2003). Como S6K1 forma parte de la vía mTOR, esto sugiere la activación de esta vía durante la L-LTP.

2.7.1. ¿Dónde podría intervenir Pdc4 en el proceso de regulación de la LTP?

Si consideramos que Pdc4 es un represor de la traducción que al ser fosforilado por Thr-389-S6K1 es marcado para su ubiquitinación siendo luego degradado por el proteosoma (Dorrello *et al.*, 2006), y que Thr-389-S6K1 aumenta su expresión en dendritas durante la producción de la L-LTP (Cammalleri *et al.*, 2003), es posible que Pdc4 se encuentre regulando algunos de los ARNm importantes para la síntesis proteica necesarios para la generación de L-LTP.

2.8. Caracterización de la LTP

2.8.1. Concepto de LTP, el circuito neuronal en el hipocampo donde se produce LTP y las etapas del proceso

El fenómeno de la **LTP** es un ejemplo típico de plasticidad sináptica reportado por Terje Lømo en 1966 en la región del Giro Dentado en hipocampo de conejo (Andersen & Lømo, 1966). Uno de los principales trabajos de referencia en LTP fue publicado en 1973 por Lømo y Bliss (Bliss & Lømo, 1973). La LTP se define como cualquier forma de potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica tanto en hipocampo como en cualquier otra región del SNC

(Andersen *et al.*, 2007). Una de las formas de inducir el proceso es estimulando a alta frecuencia, procedimiento conocido como tetanización, produciéndose entonces una potenciación del potencial postsináptico excitatorio (Lømo, 2003). Con tiempos e intensidades de estímulo adecuados se alcanza un estado potenciado de un grupo de neuronas que puede perdurar por largos períodos de tiempo. Cuando el proceso se mantiene en el tiempo se le conoce como **Late LTP o LTP tardío (L-LTP)** y se lo ha relacionado con procesos de aprendizaje y memoria, especialmente con memorias a largo plazo o **Long-Term Memories** (Wood *et al.*, 2011). Ambos procesos son rápidos, su consolidación depende de la síntesis de nuevas proteínas (únicamente en la etapa de L-LTP) y su efecto perdura por tiempos prolongados (Cooke & Bliss, 2006; McNaughton & Barnes, 1990). Estudios de L-LTP en hipocampo han demostrado la importancia de la síntesis *de novo* de proteínas en las dendritas como sitios donde se dan procesos de plasticidad sináptica (Steward & Schuman, 2001). En la **Figura 7** se muestran una serie de esquemas que representan algunos de los posibles protocolos de tetanización necesarios para inducir cada una de las etapas del LTP. Estas etapas incluyen la Potenciación a corto plazo o *Short Term Potenciation* (STP), el LTP temprano o *Early LTP* (E-LTP) y la fase de consolidación llamada LTP tardío o *late LTP* (L-LTP). En esta última es donde se da la síntesis *de novo* de proteínas.

2.8.1.1. Circuitos neuronales en hipocampo

Las células que participan en el proceso forman parte de circuitos neuronales que comunican distintas regiones como se muestra en la **Figura 8**. La **Vía Perforante** se forma por axones que provienen desde la **Corteza Entorhinal** (desde fuera del hipocampo) y hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas del **Giro Dentado (*Dentate Gyrus*)**, de **CA3** y de **CA1**. En el giro dentado, las neuronas granulares emiten axones llamados **Fibras Musgosas (*Mossy Fibers*)** que contactan con las dendritas de las neuronas piramidales de CA3. Cerrando el circuito, las neuronas piramidales de CA3, emiten largos y finos axones que conforman las **Colaterales de Schaffer** y realizan sinapsis con dendritas de las neuronas piramidales de CA1 (Andersen *et al.*, 2007).

2.8.2. Propiedades del LTP, proteínas involucradas en su generación y proteínas sintetizadas *de novo* durante la L-LTP

2.8.2.1. Las tres propiedades básicas de la LTP

2.8.2.1.1. Especificidad

El fenómeno de potenciación solo ocurre en sinapsis activadas. Esta propiedad fue demostrada mediante experimentos en la región CA1 del hipocampo donde se colocaron 2 electrodos estimulando dos sets de fibras, siendo que ambas convergen en una misma población neuronal. Se observó que la estimulación en una de las vías con un tren de

estímulos o tetanización suficiente como para inducir LTP produce potenciación de esa vía y no en la otra vía en donde no hubo tetanización. Esto significa que se activa un set no solapante de axones convergiendo en las mismas neuronas blanco (Andersen *et al.*, 1977; Lynch *et al.*, 1977).

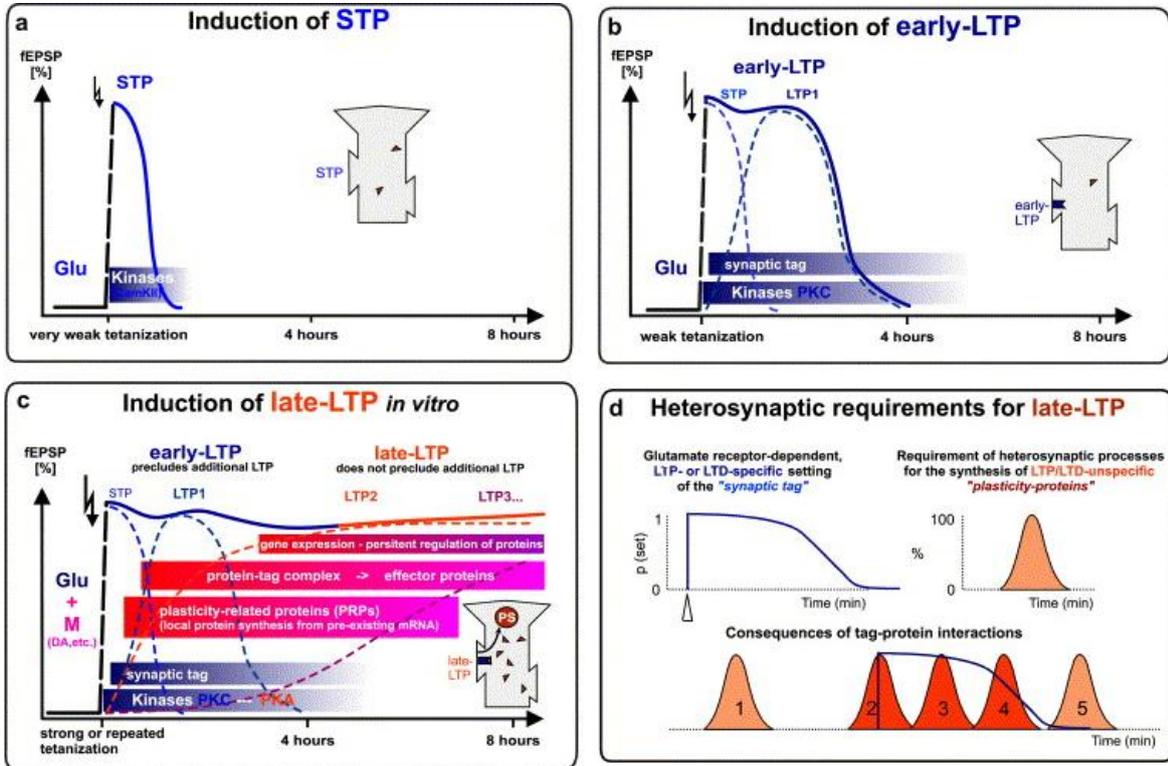


Figura 7. Esquema de las distintas etapas de la LTP graficando la amplitud del potencial post-sináptico excitatorio en función del tiempo e indicando algunos de los mecanismos involucrados. En el esquema (a) se muestra la inducción del STP participando los receptores de Glutamato y la CamKII. Es un estado que se alcanza rápido en el tiempo y con un estímulo de tetanización muy débil. En (b) se muestra la inducción de la E-LTP que involucra la participación de la PKC y otras kinasas, lleva un tiempo mayor que la STP para alcanzar ese estado de potenciación y se mantiene más en el tiempo. Se requiere una estimulación mayor para inducir el estado de E-LTP. En (c) se muestra la inducción de L-LTP in vitro, la cual requiere de la síntesis *de novo* de proteínas, lleva al menos 1 hora de estimulación y el estado de potenciación puede mantenerse por largos períodos de tiempo. Para inducir la L-LTP se requiere estimulación por tetanización fuerte o una estimulación repetida en el tiempo. En (d) se muestran los requerimientos y la dinámica de los "tags" en azul y de las proteínas relacionadas con plasticidad (PRPs) en rojo para la inducción de L-LTP. [Adaptado de Reymann & Frey, *Neuropharmacology*, 2007, Figura 1].

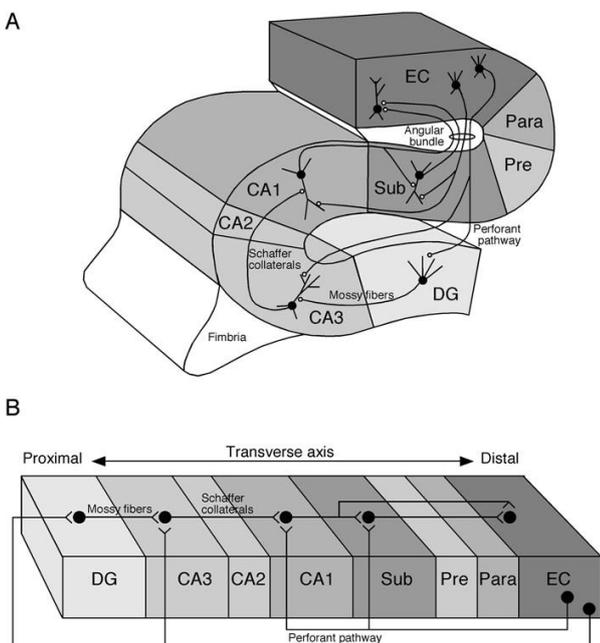


Figura 8. Esquema del Hipocampo con sus regiones y grupos neuronales principales. En A, se muestran la Corteza Entorhinal (EC), en donde la capa II de neuronas envía sus axones hacia las dendritas del giro dentado (DG) y de CA3 a través de la vía perforante (*Perforant pathway*). La capa III de la EC envía axones hacia CA1 y la región subicular (Sub) a través de la vía perforante y alveolar. Las células granulares del giro dentado proyectan hacia el campo de neuronas de CA3 a través de las fibras musgosas (*Mossy Fibers*). Las neuronas piramidales de CA3 proyectan axones a CA1 por intermedio de las Colaterales de Schaffer (*Schaffer Collaterals*). Las neuronas piramidales de CA1 proyectan hacia la región subicular. Finalmente, tanto las fibras de la región subicular como de CA1 proyectan axones hacia las capas profundas de la Corteza Entorhinal. En B, se muestra una proyección a lo largo del eje axial del hipocampo, donde el giro dentado esta hacia la región proximal y la corteza entorhinal hacia la distal. [Adaptado de "The Hippocampus Book", Andersen *et al.*, 2007, página 38, Figura 3-1].

2.8.2.1.2. Asociatividad

Es una propiedad del LTP descrita en forma independiente por McNaughton y colaboradores en 1978 y por Levy & Stewart en 1979 a nivel del giro dentado del hipocampo. Cuando en un protocolo de estimulación se aplica un estímulo débil en una vía, no se induce la LTP. Pero si simultáneamente se estimula otra vía con un estímulo fuerte, entonces se induce la LTP en ambas vías, lo que se conoce como Asociatividad. Se distingue del concepto de **cooperatividad**, el cual hace referencia a cuando se induce la LTP por la sumatoria de varios estímulos débiles en varias vías que convergen en un mismo grupo de neuronas. El experimento de McNaughton consistió en colocar dos electrodos de estimulación en dos regiones diferentes de la vía perforante. Se vio como al estimular simultáneamente dos regiones de esta vía con tétanos débiles únicos, no se inducía la LTP. Pero el efecto sumado o cooperativo de varios de estos estímulos débiles lleva a la inducción de la LTP en ambas vías (McNaughton *et al.*, 1978). El experimento de Levy y Stewart consistió en estudiar las propiedades de la vía perforante cruzada compuesta. Esta se forma solamente por unos pocos axones que van desde la corteza entorhinal hasta la capa molecular del giro dentado. Los autores observaron que estimulando por tetanización esta vía no se induce LTP. Pero si se estimula la región ipsilateral de la vía perforante con un tétanos al mismo tiempo que se estimula con otro tétanos en la vía cruzada débil, se produce LTP tanto en las vías contralateral como en la ipsilateral. Con ello se demostró que la activación en un sitio tiene la potencialidad de inducir plasticidad sináptica en otro sitio activo, por tanto la LTP es asociativa (Levy & Stewart, 1979).

2.8.2.1.3. Persistencia

Esta propiedad refiere a que con los tiempos de estimulación necesarios, el proceso de potenciación puede permanecer durante días e incluso meses, en lo que se conoce como L-LTP. Esto distingue a la LTP de otras formas de plasticidad sináptica y lo relaciona con fenómenos de memoria y aprendizaje (Abraham, 2003).

Los principios de especificidad, asociatividad y/o cooperatividad pueden resumirse en lo que se conoce como el **Postulado de Hebb**, descrito en 1949 y que propone una teoría sobre cómo sería la adaptación de las neuronas en el cerebro durante los procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje (Hebb *et al.*, 1949). Este postulado incluye la **regla de inducción de Hebb** para la potenciación sináptica asociativa en sinapsis excitatorias de las regiones del CA1 y del giro dentado. Expresa que una sinapsis es potenciada si y solo si es activa a un tiempo tal que la espina dendrítica se encuentra lo suficientemente despolarizada.

2.8.2.2. Proteínas involucradas en la generación de LTP

Los estudios que determinaron cuáles son las proteínas que participan en la inducción de la LTP son posteriores a la identificación del proceso (Andersen *et al.*, 2007) y hasta la actualidad no se conoce completamente como actúan cada una de ellas. La LTP se induce por estimulación tetánica y es dependiente de los tiempos de estimulación. Se habla de distintas etapas características del proceso en donde se dan diferentes cambios y participan distintas proteínas (Andersen *et al.*, 2007). Inmediatamente de inducido el proceso se habla de una etapa inicial de **Potenciación a Corto Plazo o Short Term Potenciation (STP)**, que no depende de la síntesis de proteínas, sino que es dependiente de los receptores tipo N-metil-D-Aspártico (NMDA), participaría la proteína quinasa Calmodulina dependiente de Calcio II (CaMKII) (Lisman *et al.*, 2012) y sería un proceso mayormente presináptico (Davies *et al.*, 1989). Posteriormente esta la etapa de **LTP temprano o Early-LTP**, que es un proceso dependiente de las Protein-Kinasas, incluyendo la CaMKII, pero donde aún no hay síntesis *de novo* de proteínas. Finalmente está la etapa de consolidación del proceso que puede perdurar por largos períodos de tiempo y que es dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas conocida como **LTP tardío o Late-LTP**.

2.8.2.2.1. Short Term Potenciation (STP)

Concepto de STP

Es la etapa inmediata a la inducción del LTP y depende de la activación de los receptores NMDA, sin los cuales no hay inducción del LTP. El ligando de los receptores NMDA es el glutamato. Su importancia para la inducción del STP fue demostrada utilizando antagonistas específicos para los receptores NMDA (Davies *et al.*, 1981; Harris *et al.*, 1984; Coan *et al.*, 1987) y utilizando ratones con en el gen NMDAR1 deletado en las neuronas de CA1 y no en las neuronas del giro dentado por el sistema de recombinación *Cre-Lox*. NMDAR1 es una de las subunidades del receptor NMDA sin la cual no puede formarse el receptor. Se observó que estos animales podían desarrollar LTP normalmente en la región del giro dentado pero no en CA1 (Tsien *et al.*, 1996), demostrando la necesidad de receptores NMDA para la inducción del LTP.

Moléculas activadas durante STP

Se requieren dos condiciones para iniciar el proceso de inducción del LTP. Se requiere la activación de las neuronas presinápticas, las cuales liberan glutamato a la hendidura sináptica el cual es captado por los receptores de glutamato (GlutR) en las dendritas postsinápticas, favoreciendo la entrada de iones Na⁺ en las neuronas postsinápticas y aumentando entonces su despolarización (Andersen *et al.*, 2007). Estos receptores son los de tipo AMPA y los de tipo NMDA. Se requiere una fuerte despolarización en las neuronas postsinápticas para

liberar el bloqueo de los iones Mg^{2+} en los receptores NMDA de las dendritas postsinápticas. De esta forma estos pueden captar su ligando (glutamato) y permitir la entrada del Ca^{2+} en la neurona postsináptica (Lynch, 2004). La colaboración de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) en las dendritas postsinápticas es necesaria para inducir LTP debido a que estos receptores están acoplados a proteínas G de señalización intracelular y pueden afectar vías de señalización importantes para la LTP (Eaton *et al.*, 1993).

Además de los receptores NMDA y los mGluR, los receptores GABA también juegan su papel en el proceso (Wigström & Gustafsson, 1983). Cuando se produce un potencial postsináptico excitatorio, los receptores $GABA_A$ de las dendritas postsinápticas ingresan GABA dentro de las neuronas postsinápticas produciendo un potencial postsináptico inhibitorio. Esto hiperpolariza la neurona postsináptica e intensifica el bloqueo de los receptores NMDA por el Mg^{2+} y disminuye la respuesta sináptica (**Figura 9**). Pero por otro lado, los receptores $GABA_B$ presentes en las interneuronas inhibitorias y en las dendritas postsinápticas, producen un efecto que produce una inhibición en la liberación de GABA por parte de la interneurona inhibitoria, lo cual favorece la inducción de la LTP. Incluso si se utilizan antagonistas de los receptores $GABA_B$, y se mantienen funcionales los receptores $GABA_A$, se inhibe la inducción de LTP (Dingledine *et al.*, 1986), demostrando la necesidad de receptores GABA para la inducción de la LTP.

Se ha determinado que la CaMKII es importante para la inducción de STP y también para la inducción de E-LTP, activándose con el aumento en las concentraciones de Ca^{2+} en la postsinapsis (Stevens *et al.*, 1994). En la **Figura 9** se muestra un esquema con los principales eventos que suceden durante el STP.

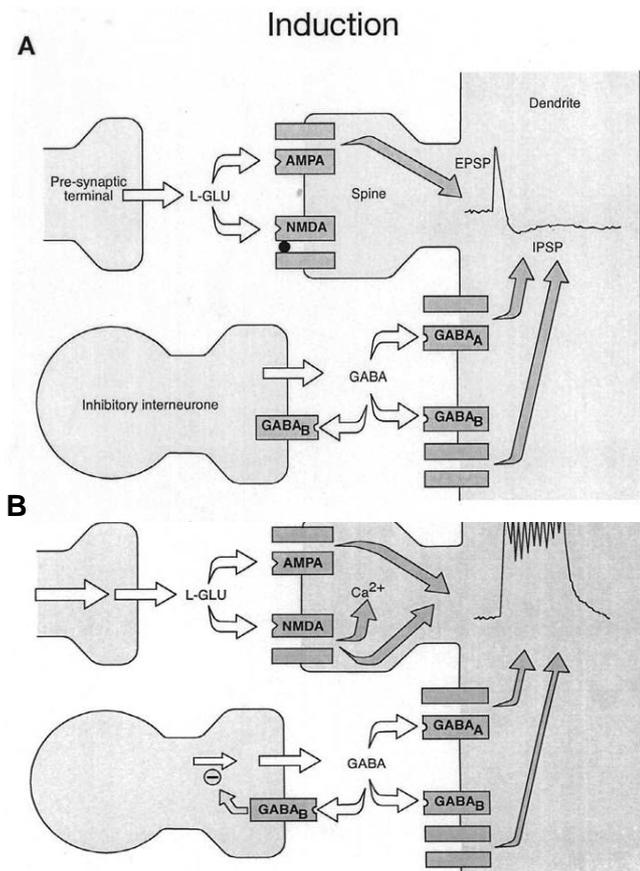


Figura 9. Esquema de cómo se induce STP, participando los receptores NMDA, los receptores AMPA y los receptores $GABA_A$ y $GABA_B$. En el **esquema A** se muestra que sucede cuando se aplica en la presinapsis un estímulo débil. Desde la terminal presináptica se libera glutamato el cual se une a los receptores AMPA, dándose el ingreso de Na^+ en la postsinapsis. Pero como el estímulo es muy débil, los receptores NMDA apenas contribuyen en el proceso ya que permanecen bloqueados por los iones Mg^{2+} y no permiten la entrada de Ca^{2+} a la dendrita postsináptica. Se produce un único potencial postsináptico excitatorio y una débil potenciación de la neurona postsináptica. También se muestra la interneurona inhibitoria liberando GABA que es captado por los receptores GABA en la dendrita y produce un potencial postsináptico inhibitorio que apaga la potenciación. En el **esquema B** se muestra que sucede cuando se estimula en la presinapsis con un tren de estimulación. En este caso los iones Mg^{2+} son desplazados y los canales NMDA permiten la entrada de Ca^{2+} , pudiendo activarse la CaMKII (no se muestra) con lo cual la potenciación y el STP en las neuronas postsinápticas son muy fuertes. Además, se produce la auto-inhibición de las neuronas inhibitorias a partir de los receptores $GABA_B$ que al unirse al GABA inhiben su propia producción de GABA favoreciendo la inducción del STP. [Adaptado de “*The Hippocampus Book*”, Andersen *et al.*, 2007, página 363, figura 10-7].

2.8.2.2.2. Early-LTP (E-LTP)

Concepto de E-LTP

Es una etapa posterior a la STP en el cual participan varias **Proteínas Kinasas** y no hay síntesis *de novo* de proteínas (Andersen *et al.*, 2007). En la **Figura 10** se muestra un esquema con los principales componentes involucrados en la producción de E-LTP.

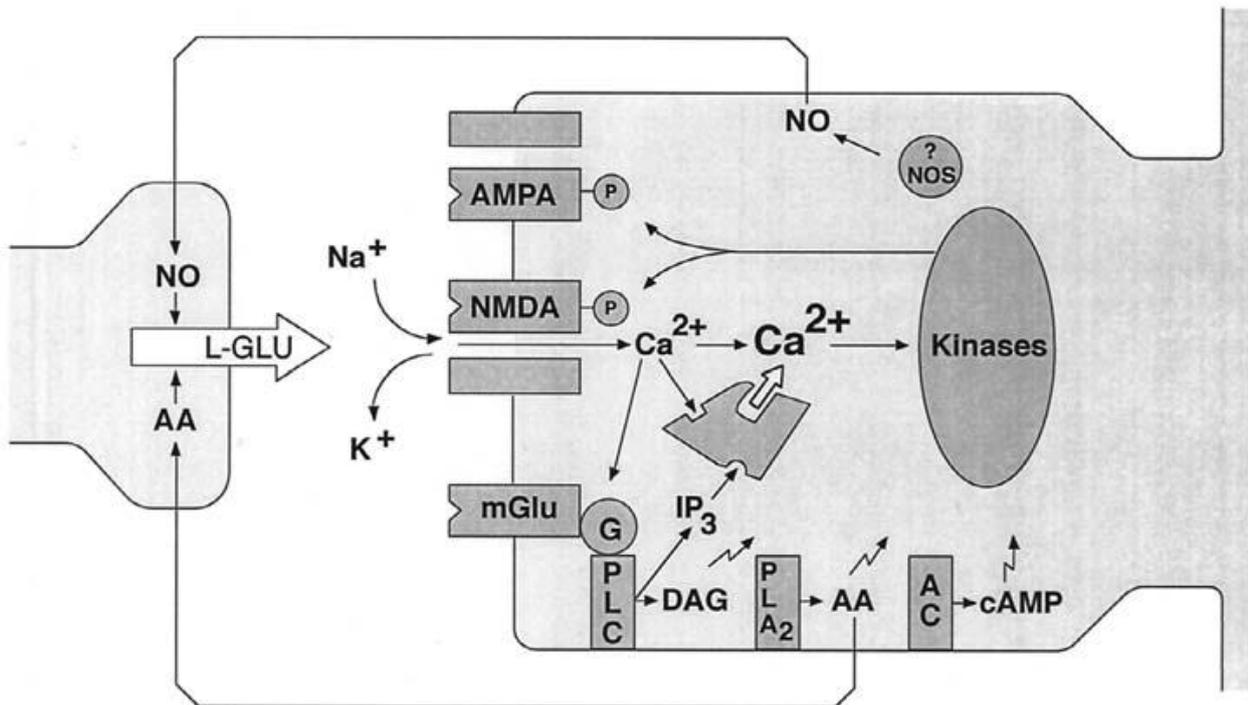


Figura 10. Esquema representando algunos de los elementos que participan en la inducción de E-LTP. Comienza con la estimulación en la presinapsis, la liberación de glutamato captado por los receptores AMPA y NMDA de la postsinapsis y la entrada de Ca^{2+} a través de estos últimos en las dendritas. Las reservas de IP_3 amplifican la señal del Ca^{2+} , fosforilando varios sustratos, incluyendo los receptores AMPA y NMDA, aumentando su actividad. También se muestran otras cascadas de señalización donde participa el AMPc y algunos mensajeros retrógrados como el óxido nítrico y el ácido araquidónico que aumentan la estimulación. [Adaptado de "The Hippocampus Book", Andersen *et al.*, 2007, página 370, figura 10-8].

Moléculas activadas durante E-LTP

Protein-Kinasa C

Fue la primer protein-kinasa en ser implicada en LTP (Lovinger *et al.*, 1987). Presenta varias isoformas, que pueden clasificarse según como son activadas. Se distingue las isoformas activadas por Ca^{2+} y por diacilglicerol (PKC α , β y γ); las isoformas activadas en forma independiente del Ca^{2+} y dependientes del diacilglicerol (PKC δ y ϵ) y las activadas en forma independiente del Ca^{2+} y del diacilglicerol (PKC ζ). Un estudio muestra que la isoforma γ , sería importante en la regulación inhibiéndose la inducción de la LTP cuando es eliminada (Abeliovich *et al.*, 1993). Respecto a la isoforma ζ , un trabajo reciente muestra que no sería necesaria para la inducción y mantenimiento del LTP (Volk *et al.*, 2013).

Se plantea que la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA de las neuronas postsinápticas sería el evento que induce la activación de las PKC (Andersen *et al.*, 2007). Otra posibilidad es que sea por una cascada de señalización que se iniciaría con la unión del glutamato a receptores metabotrópicos de glutamato (mGlutRs), particularmente los mGlutR1 y mGlutR5. Cuando estos receptores se activan producen diacilglicerol y liberan Ca^{2+} al espacio intracelular (Bortolotto & Collingridge, 2000). También se ha descrito que la fosforilación de los receptores AMPA en la posición Ser 831 por parte de PKC aumenta su conductancia favoreciendo la entrada de Na^+ al interior de la dendrita postsináptica e induciendo una potenciación de corta duración o potencial postsináptico excitatorio (Lee *et al.*, 2000).

Calmodulina dependiente del Calcio II (CaMKII)

Es una proteína presente en las neuronas postsinápticas que es activada a través de cambios conformacionales producidos cuando se une al Ca^{2+} (Lisman *et al.*, 2012). Sin embargo, cuando es fosforilada en la Treonina 286, CamKII sufre un nuevo cambio conformacional quedando activa en forma permanente, incluso en ausencia de Ca^{2+} (Miller and Kennedy, 1986). En un estudio utilizando péptidos específicos que inhiben la actividad de la isoforma α -CaMKII (isoforma predominante en la región CA1 del hipocampo) vieron cómo se bloquea la inducción del LTP en las neuronas CA1 (Malinow *et al.*, 1989). Otros estudios complementarios utilizando ratones *knockout* para esta enzima (Silva *et al.*, 1992) o agregando mutaciones en sus sitios de fosforilación (Giese *et al.*, 1998), también llegan a la conclusión de que sin la α -CaMKII activa no se induce LTP en la región del CA1 del hipocampo.

Protein-kinasa dependiente del AMP cíclico (AMPc) o Protein Kinasa A (PKA)

Se ha determinado la importancia de su presencia en las sinapsis activadas, colaborando en la especificidad para la inducción del LTP únicamente en estas sinapsis (Andersen *et al.*, 2007). El anclaje específico de PKA a través de las proteínas AKAPs sería importante para la inducción y mantenimiento del LTP (Sanderson & Dell'Acqua, 2012).

Protein-tirosin-kinasas (PTK)

Un estudio farmacológico revela que son importantes para la inducción del E-LTP debido a que fosforilan los receptores NMDA aumentando su actividad (Rosenblum *et al.*, 1996). Realizando un *knockout* a los genes que dan lugar a las PTK de la familia *fyr*, generan dificultades en la generación de la LTP (O'Dell *et al.*, 1991), particularmente en adultos y no en animales jóvenes o en desarrollo (Kojima *et al.*, 1997).

MAP Kinasa (MAPK)

Son una gran familia de proteínas de señalización celular, siendo las más extensamente estudiadas en LTP las asociadas con las proteínas G Ras y Rap-1 (Andersen *et al.*, 2007). Se observó que la vía de ERK/MAPK es regulada positivamente por PKA (Gerits *et al.*, 2008) activándose una cascada de fosforilaciones que culmina con la fosforilación de la proteína MEK, activándola. Cuando MEK es inhibida, se bloquean tanto el E-LTP como el L-LTP (Andersen *et al.*, 2007).

Fosfoinositol 3 Kinasa (PI3K)

La fosforilación de sus blancos de acción activan las formas independientes del Ca^{2+} de PKC, incluyendo a PKC γ . Inhibidores de PI3K llevan a pérdidas en la capacidad de inducción de E-LTP, no así de STP (Kelly & Lynch, 2000).

2.8.2.2.3. Late LTP (L-LTP)

Concepto de L-LTP y la síntesis *de novo* de proteínas

Es una etapa posterior al E-LTP que permite el mantenimiento de la LTP a lo largo del tiempo. Se requieren la transcripción de genes y la síntesis *de novo* de proteínas (Andersen *et al.*, 2007). Su característica principal es la persistencia en el estado de potenciación de las neuronas activadas, pudiendo permanecer potenciadas durante largos períodos de tiempo (Andersen *et al.*, 2007). Inicialmente se pensaba que todas las proteínas necesarias para su consolidación se sintetizaban en el soma, pero la evidencia de la síntesis local en dendritas ha ido en aumento. La síntesis local en las dendritas explicaría en forma sencilla la especificidad de las sinapsis activas, ya que sería en las dendritas activas donde puede darse la L-LTP. Se han identificado polirribosomas y otros elementos necesarios para la síntesis local de proteínas en dendritas (Steward & Schuman, 2001). Un experimento concluyente para demostrar la síntesis local en dendritas consistió en aislar dendritas de la región CA1 del hipocampo y someterlas a un tratamiento con un factor de crecimiento cerebral llamado BDNF, el cual induce la LTP (Kang & Schuman, 1996; Kelly *et al.*, 2000). A partir de estos experimentos se observó que es posible inducir L-LTP solo por la síntesis local de proteínas en las dendritas separadas del soma neuronal. Dada la importancia de la síntesis local en dendritas, el interés por conocer el papel que cumplen las espinas dendríticas como sitio de síntesis local ha ido creciendo. Hay estudios que determinaron el aumento en el tamaño de las espinas dendríticas en ratas con un día de nacimiento (Ostroff *et al.*, 2002) y que la fase final de crecimiento de la espina es dependiente de síntesis proteica (Tanaka *et al.*, 2008). Ese crecimiento es estimulado por factores de crecimiento cerebrales que inducen la síntesis de proteínas únicamente en las sinapsis donde se indujo L-LTP (Smith *et al.*, 2005). Esto

muestra la importancia de la síntesis local de proteínas en las dendritas para el desarrollo de procesos de plasticidad sináptica.

Además de la síntesis local de proteínas, también son importantes las vías de activación de la síntesis proteica que involucran señales para la activación de genes en el núcleo (Andersen *et al.*, 2007). La vía de CREB es una de las principales (Ahmed & Frey, 2005). Esta vía está formada por una serie de proteínas que cuando se induce L-LTP son importadas al núcleo y se unen a elementos de respuesta al AMP cíclico (AMPC) presentes en secuencias de genes blanco. Esto desencadena un aumento en la transcripción de esos genes. El rol del Ca^{2+} en este proceso es importante (Andersen *et al.*, 2007). El mismo ingresa luego de la activación de los receptores NMDA, pero se discute como es su mecanismo de acción. Algunos estudios proponen que viajaría desde las dendritas activadas al soma, uniéndose a la calmodulina nuclear y activando kinasas blanco (Hardingham *et al.*, 2001). Otra posibilidad es que el Ca^{2+} unido a calmodulina sufra una translocación desde el sitio de la postsinapsis al núcleo (Deisseroth *et al.*, 1998). El problema que se plantea es como los transcritos o proteínas sintetizadas en el soma pueden alcanzar los sitios de sinapsis apropiados. Una posibilidad planteada por Frey y colaboradores en el año 1997 es que los sitios de sinapsis potenciados presentarían un marcador o “**tag**” que los diferencia del resto, el cual sería reconocido por las proteínas o ARNm que deben viajar desde el soma a las dendritas. A continuación, se detallan una serie de características que deberían presentar los *tags* (Frey and Morris, 1997).

- 1) Los *tags* se generan en una sinapsis activa, dependiente de la activación de receptores NMDA pero independiente de la síntesis proteica *de novo*
- 2) Los *tags* presentan una vida media de 1-2 horas para asegurar su transporte desde el soma hasta el sitio de la sinapsis
- 3) Puede haber *tags* de dos tipos: los que son inducidos por activación de E-LTP o L-LTP y los que lo hacen por la inducción de *Long Term Depression* (LTD).
- 4) Los *tags* son específicos de la sinapsis que fue activada
- 5) Los *tags* interaccionan con proteínas que fueron sintetizadas *de novo* a partir de la transcripción nuclear en el pasaje de E-LTP a L-LTP.

La **Figura 11** muestra un esquema indicando los elementos involucrados en la inducción de L-LTP.

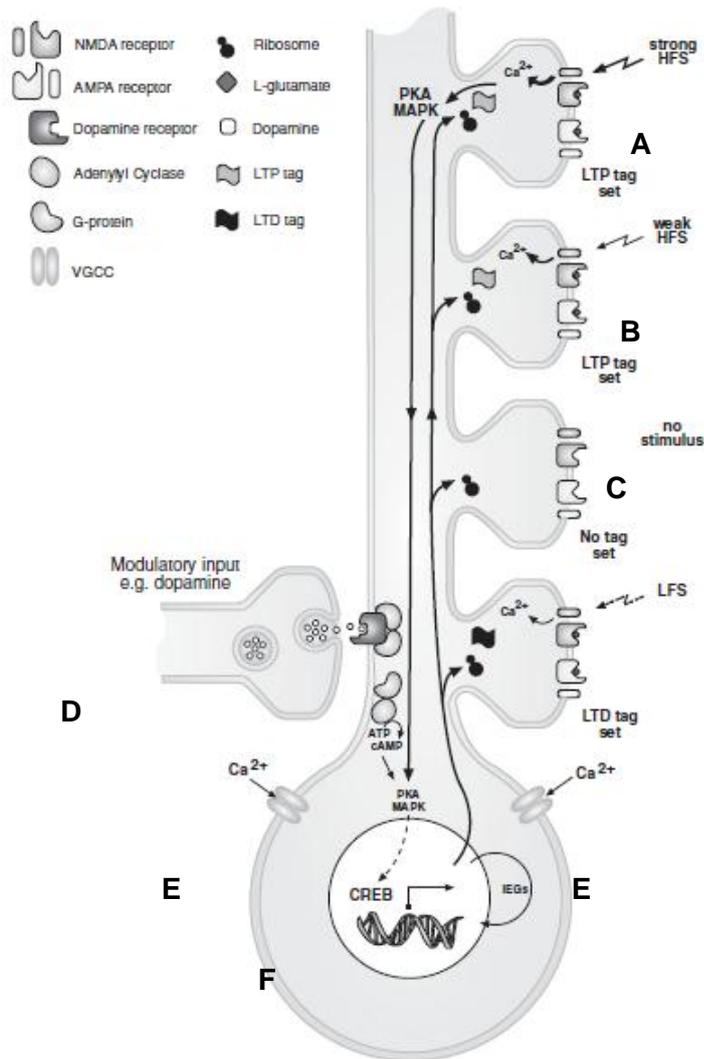


Figura 11. Esquema representando los principales elementos que participan en la inducción y mantenimiento de la L-LTP. Cuando se induce L-LTP por tetanización fuerte (A), la entrada rápida de Ca^{2+} estimula la producción de cambios locales que incluyen la fosforilación de receptores y de otras proteínas. También se activan vías de señalización desde la sinapsis al soma que involucran a PKA y MAPK. Posiblemente, la activación de una proteína *tag*, marque a esta sinapsis como activa. En (B) solo hay estimulación débil, por lo cual solo se induce E-LTP y no hay señalización hacia el soma, pero igual se activaría un *tag*. En (C) donde no hay estimulación, las sinapsis no son activadas y no habría *tag*. Pueden existir también otras señalizaciones desde las dendritas al núcleo y del soma al núcleo a través de inervación dopaminérgica (D) y por entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (E). Los targets de la señalización hacia el soma son factores de transcripción, incluido el factor CREB, el cual al ser fosforilado promueve la transcripción de numerosos genes con señal de respuesta al AMPc en sus secuencias regulatorias (F). [Adaptado de “*The Hippocampus Book*”, Andersen *et al.*, 2007, página 392. figura 10-131.

2.9. L-LTP y regulación de la síntesis proteica: papel de la vía mTOR

La inducción de L-LTP, involucra la transcripción de genes y la síntesis *de novo* de proteínas. Sin embargo, las vías de transducción de señales que regulan estos procesos no son completamente entendidas. Una de las vías que es estimulada por factores de crecimiento y que resulta en la traducción de ARNm específicos es la vía de mTOR (Figura 12). Un estudio identificó por *western blot* varias proteínas importantes de esta vía, incluyendo el complejo mTOR, S6K1, 4EBP1 y 4EBP2 en rodajas (*slices*) de hipocampo y en cultivos neuronales, tanto en dendritas como en neuronas (Tang *et al.*, 2002). En el mismo estudio se observó por inmunofluorescencia la co-localización de estos componentes con PSD-95, un marcador de postsinapsis. Por tanto, los componentes de la vía mTOR se expresarían en la postsinapsis, sitio donde se produce la síntesis *de novo* de proteínas durante la L-LTP. Una vez que se observó la expresión de componentes de la vía mTOR en hipocampo, se realizaron estudios para determinar la importancia de esta vía para la inducción del L-LTP.

Experimentos utilizando la droga rapamicina, un inhibidor del complejo mTOR, produjeron una reducción en la capacidad de inducir L-LTP a partir de estímulos de alta frecuencia, no perjudicando la inducción de E-LTP (Tang *et al.*, 2002). También se observó que el efecto de la rapamicina sobre la producción de L-LTP es únicamente durante la inducción del L-LTP, ya que si se aplica la droga cuando ya se indujo este proceso, no se observan cambios (Cammalleri *et al.*, 2003). También se ha determinado la importancia de mTOR para la consolidación del L-LTP utilizando metodologías farmacogenéticas a partir de ratones heterocigotas para mTOR, confirmando también su importancia en procesos de L-LTP al no poder inducir adecuadamente el proceso en estos animales (Stoica *et al.*, 2011). En otro trabajo, se aislaron dendritas de hipocampo de sus somas, y se las sometió a un tratamiento con rapamicina, también inhibiéndose la inducción de L-LTP (Vickers *et al.*, 2005). Esto muestra cómo puede inducirse el proceso independientemente del soma y con ARNm presentes en las dendritas.

Mediante los estudios utilizando la droga rapamicina se pudo entonces determinar la importancia de mTOR en la inducción del L-LTP, pero solamente con esos estudios no se puede definir si se activan o no los componentes de esta vía cuando se induce L-LTP. Como forma de analizar la actividad de la vía mTOR, se estudió la distribución de la forma activa de uno de sus blancos: la forma fosforilada de S6K1 en la treonina 389 (**Thr-389-S6K1**) (Cammalleri *et al.*, 2003). Mediante la inducción de la activación de los receptores NMDA y de PI3K (importantes en la inducción de L-LTP) se observó una mayor distribución de Thr-389-S6K1 en las dendritas, no así en el soma neuronal (Cammalleri *et al.*, 2003), tanto en *slíces* de hipocampo como en cultivo de neuronas de hipocampo. En neuronas en cultivo pudo observarse una distribución en compartimentos discretos de Thr-389-S6K1, siendo algunos de ellos espinas dendríticas (Cammalleri *et al.*, 2003), mientras que en el caso de cultivos neuronales donde no hubo tratamiento de inducción, la distribución de Thr-389-S6K1 se limitó únicamente al soma neuronal. Este estudio sugiere la importancia del reclutamiento de la vía mTOR-S6K1 para la inducción de la fase de la L-LTP donde se requiere la síntesis *de novo* de proteínas. Otro estudio en neuronas en cultivo extraídas de fetos de ratón mostró que la estimulación por glutamato induce la activación de la vía mTOR-S6K1 y es dependiente de la activación del complejo Ca^{2+} /Calmodulina (Lenz & Avruch, 2005).

Estudios en donde se realizaron experimentos de *knockout* selectivo para las proteínas 4EBPs pertenecientes a la vía de mTOR, sugieren la importancia de las 4EBPs para el mantenimiento del L-LTP (Banko *et al.*, 2005). El complejo mTOR es el principal agente que fosforila las 4EBPs (Hay & Sonenberg, 2004). Un *knockout* a 4EBP-2, la isoforma más abundante en cerebro, produce dificultades para la inducción de L-LTP y problemas en el desarrollo de la memoria espacial (Banko *et al.*, 2005). Sin embargo no se pudo vincular

directamente el accionar de mTOR sobre 4EBP2. Inclusive existe un trabajo en el cual se reporta que no lograron identificar la forma fosforilada de 4EBP2 en cerebro (Bidinosti *et al.*, 2010).

Por otro lado, la realización del *knockout* por separado a S6K1 y S6K2, mostraron pérdidas en las capacidades cognitivas y de memoria en los ratones afectados (Antion *et al.*, 2008).

Considerando nuestra proteína de interés Pdc4, dado que es un componente de la vía mTOR y es fosforilada por Thr-389-S6K1 (**Figura 12**), posiblemente pueda estar participando en estos procesos de plasticidad sináptica.

2.10. Síntesis proteica axonal en condiciones de injuria del Nervio Ciático

Durante el desarrollo de la fase experimental de este trabajo de tesis, el esfuerzo central se realizó intentando obtener evidencias experimentales respecto a la modulación de los niveles de expresión de Pdc4 en las neuronas de hipocampo. Esto se justifica por el contexto antes detallado y el hecho de que, como se observara más adelante, esta proteína era conspicua en las dendritas de dichas neuronas. Sin embargo, nos pareció de utilidad intentar poner en evidencia si estos cambios que logramos detectar en dendritas y somas del hipocampo, ocurrían en otro dominio neuronal como es el **axón**. Dado que la extensión de este trabajo de fin de licenciatura limita el tipo de experimentos a realizarse y además no era sencillo investigar detalladamente axones centrales en condiciones de estimulación fisiológica o no, decidimos estudiarlo en el modelo de axones lesionados en nervio ciático de rata que presenta diversas ventajas. Se buscaba observar si frente a una estimulación clara y caracterizada (en nuestro laboratorio y por otros investigadores) existían cambios en la expresión de Pdc4 en el dominio axonal. Lo que sigue a continuación es una breve introducción a este modelo de trabajo.

Trabajos del Dr. Sotelo Silveira y otros investigadores describen la importancia del transporte del ARN y la síntesis local de proteínas en axones. En casos extremos, el axón abarca el 95% del volumen celular y presentar una longitud medible en metros, con lo cual la actividad biosintética de estas neuronas debe ser muy alta considerando solamente el mantenimiento de la integridad celular. Considerando esto, no sería suficiente la síntesis de proteínas en el soma para asegurar el mantenimiento y funciones neuronales (Sotelo Silveira & Sotelo Sosa, 2011). Actualmente se ha comprobado la existencia de los componentes necesarios para llevar a cabo la síntesis local de proteínas en los axones (Zheng *et al.*, 2001; Sotelo Silveira *et al.*, 2006) y se ha propuesto la transferencia de ARNm desde la célula de Schwann al axón como una fuente potencial de transcriptos para el mantenimiento axonal

(Sotelo Silveira *et al.*, 2006). Con estos hallazgos, se comenzaron a identificar diferentes transcritos que son localizados en el dominio axonal incluyendo los ARNm de neurofilamentos (Sotelo Silveira *et al.*, 2000), de la miosina Va (Calliari *et al.*, 2002) y la beta actina (Sotelo Silveira *et al.*, 2008). En estos y otros trabajos se utilizó como modelo el nervio ciático lesionado en regeneración ya que de este modo se aumenta la síntesis de ARNm y proteínas (Sotelo Silveira *et al.*, 2000; Sotelo Silveira & Sotelo Sosa, 2011). Por tanto si existen variaciones en los niveles de traducción para estos transcritos, debería de existir mecanismos regulatorios de la síntesis proteica local. Se han planteado la regulación por microARNs (Fabian *et al.*, 2010) y por la vía mTOR. Se ha visto que la inhibición de mTOR utilizando la droga rapamicina disminuye la incorporación de aminoácidos marcados radioactivamente en proteínas axonales y reduce la formación del cono de crecimiento en condiciones de axotomía (Verma *et al.*, 2005). Por otra parte, la eliminación de PTEN, que es un regulador negativo de la vía mTOR, tiene un efecto promotor en la regeneración *in vivo* lo cual podría significar que la vía mTOR participa en procesos de regeneración axonal (Park *et al.*, 2009). Estos resultados muestran como mTOR podría estar regulando la síntesis de proteínas axonales y siendo importante en la modulación de los mecanismos de regeneración axonal (Gumy *et al.*, 2010; Sotelo Silveira & Sotelo Sosa, 2011). Considerando que Pdc4 es un componente río abajo (*downstream*) de la vía mTOR y que es un represor de la traducción, nos planteamos estudiar si existen cambios en su expresión en nervios lesionados en regeneración. De esta manera podríamos a su vez confirmar que podemos detectar cambios de esta proteína frente a estímulos que modulan la síntesis proteica, utilizando el tipo de metodologías planteadas en este trabajo en dos sistemas o modelos biológicos diferentes tanto en SNC como en SNP.

3. Hipótesis

Pdc4 se expresa en neuronas del sistema nervioso central y periférico, participando en la regulación de la síntesis proteica importante en procesos de plasticidad ya caracterizados. Proponemos como modelos de estudio la inducción y mantenimiento del L-LTP en SNC y la regeneración axonal en SNP. Pensamos que si Pdc4 regula la tasa traduccional de ciertos ARNm involucrados en estos procesos, su expresión se verá disminuida posiblemente debido a la activación de la vía mTOR que culminaría con la degradación de Pdc4 por el proteosoma, lo que aumentaría la tasa traduccional de los posibles ARNm que Pdc4 estaría regulando.

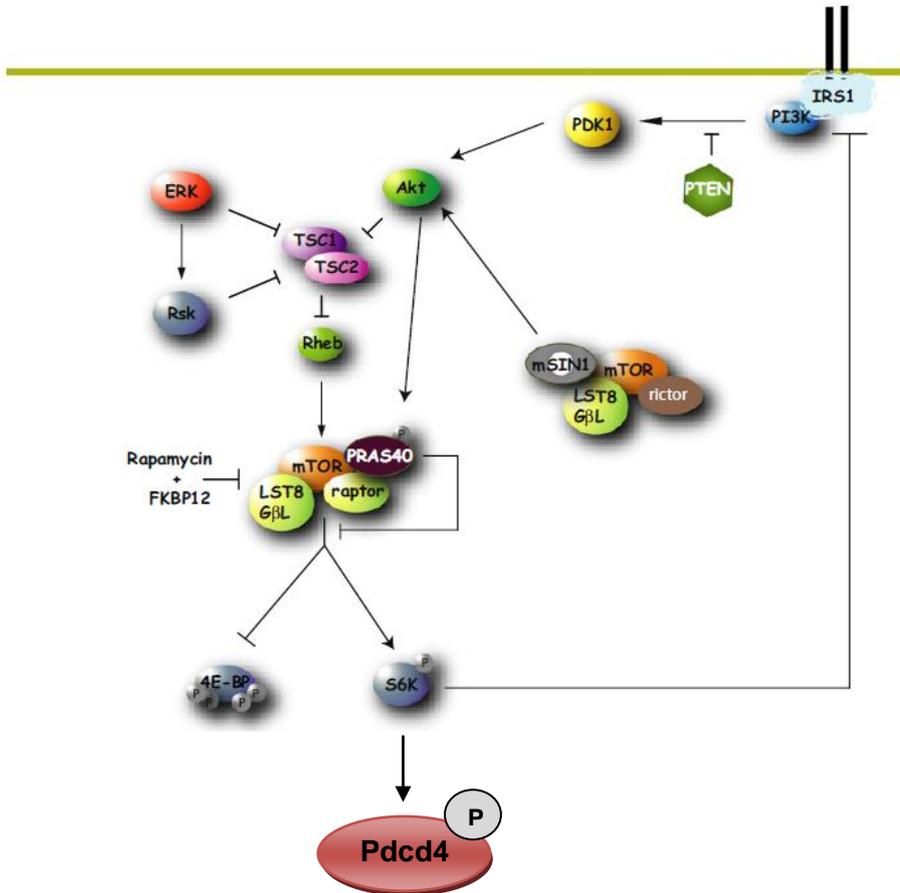


Figura 12. Vía de señalización de mTOR, incluyendo a Pcdcd4. Nótese que Pcdcd4 es fosforilada por S6K1 fosforilada, induciendo la degradación de Pcdcd4 por vía proteosomal. A su vez S6K1 es fosforilada por mTOR, siendo esta cascada de fosforilaciones un mecanismo para promover el inicio de la traducción de proteínas. [Adaptado y modificado de Costa- Mattioli *et al.*, Cell Press, 2009, Figura 2].

4. Objetivos

4.1. GENERAL

Contribuir al entendimiento de la función de la proteína Pcdcd4 como regulador de la traducción en sistema nervioso central y periférico.

4.2. ESPECÍFICOS

- Determinar la expresión de Pcdcd4 en regiones particulares de nervio ciático, médula espinal, cerebelo y cerebro de rata.
- Determinar la expresión de Pcdcd4 en soma, dendritas y axones de neuronas.
- Estudiar si Pcdcd4 varía su expresión en procesos de plasticidad sináptica utilizando como modelo la inducción de L-LTP en *slices* de hipocampo.
- Estudiar si Pcdcd4 varía su expresión cuando se lesiona un nervio ciático y se llevan a cabo procesos de regeneración axonal.

5. Materiales y Métodos

5.1. Fijación

Se realizó un protocolo de perfusión intracardiaca (Sotelo Silveira *et al.*, 2000; Calliari *et al.*, 2002) utilizando el fijador paraformaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato salino (PBS) pH=7.4 (Composición buffer PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄). Se pesa la rata, se la anestesia de acuerdo a su peso con una mezcla de Ketamina/Xilazina por inyección intraperitoneal. Se verifica que el animal se encuentre en una anestesia profunda verificando que no cierra al párpado ni contrae la pierna cuando se la presiona. Luego se inmoviliza al animal y se lo coloca en el vientre hacia arriba. Se abre la cavidad torácica haciendo un corte desde debajo del diafragma hacia el tórax, rompiendo el esternón y dejando expuesto el corazón. Rápidamente se realiza una perforación en la aurícula derecha del corazón y otra en el ventrículo izquierdo. Por esta última perforación se coloca una cánula a través de la cual se hace ingresar por el sistema cardiovascular aproximadamente 100 mL del anticoagulante citrato de sodio en PBS pH=7.4 a presión constante. Luego se hace pasar unos 150 mL del fijador PFA 4% en PBS pH=7.4. Si el fijador penetra en los tejidos, debe observarse espasmos musculares en el animal y palidez creciente en el hígado, lo cual indica que se realizó una adecuada perfusión. Se deja que actúe el fijador entre 1 y 2 horas, para luego extraer los órganos a estudiar. Luego de extraídos los órganos, se los deja dentro de tubos Falcon inmersos en PFA 4% en PBS pH=7.4 ON, 4°C.

El protocolo de fijación cuando se realizan experimentos de electrofisiología consiste en tomar los *slices* de 400 μm (Ver protocolo de Electrofisiología más adelante), se los coloca sobre un portaobjeto con un cubreobjeto por encima en una placa de petri e inmersos en PAF 4 % en PBS pH=7.4 ON, 4°C.

Las bases teóricas de la fijación se describen en el **Anexo 1**.

5.2. Crioprotección

Se lavan los tejidos enteros o los *slices* en PBS 3x5 min; 3x10 min y luego 3x5 minutos en buffer PHEM (Composición del buffer PHEM: 25mM HEPES, 10mM EGTA, 60mM PIPES y 2 mM MgCl₂) a temperatura ambiente y con agitación. Se los coloca en tubos Falcon y se los deja inmersos en Sacarosa 15% en buffer PHEM hasta que sedimenten al fondo del tubo y Sacarosa al 30% en buffer PHEM hasta que sedimenten nuevamente al fondo del tubo. Si no se van a utilizar al corto plazo, se los congela a temperaturas de -80°C hasta el momento de realizar los cortes en el criostato.

Antes de realizar los cortes en el criostato, las muestras se colocan en moldes hechos con papel de aluminio y se las deja inmersos en **Tissuue Tek**. Utilizando el criostato a temperaturas inferiores a -20°C se hacen cortes a 20 µm en las orientaciones que correspondan. Los *slices* obtenidos se fijan en porta-objetos tratados con **Poli-L-Lisina**. Son guardados a -20°C hasta el momento de llevar a cabo la inmunohistoquímica.

Las bases teóricas de la crioprotección se detallan en el **Anexo 1**.

5.3. Consideraciones sobre la orientación de los cortes

a) Para el caso de los cortes de **Cerebro** se realizaron cortes en orientación coronal o transversal, donde se reconocen hipocampo, corteza y otras regiones dependiendo de la altura del corte, además de tener la imagen en espejo de las regiones pares. Se utilizaron las referencias anatómicas descritas en el Atlas de Paxinos Edición 2005 que muestra cortes coronales de cerebro para ratas adultas de la cepa *Wistar* (Paxinos & Watson, 2005).

b) Para el caso de los cortes del **Cerebelo** se realizaron cortes en orientación sagital donde puede visualizarse el árbol dendrítico completo de las células de Purkinje.

c) Para el caso de los cortes de **Médula Espinal** se realizaron cortes en orientación transversal, donde puede reconocerse las astas ventral y dorsal y las motoneuronas de las primeras.

d) Para el caso de los cortes de **Nervio Ciático** se realizaron cortes en orientación transversal y longitudinal, para ver en ambos casos fibras nerviosas y reconocer axones y células de Schwann.

5.4. Inmunohistoquímica Indirecta

Se toman los cortes de 20 µm colocados en los portaobjetos del freezer a -20°C, se los deja tomar temperatura ambiente y luego se marca alrededor de los cortes con el marcador *PAP-Pen*. Se prepara una cámara húmeda en donde se colocaron los portaobjetos en los siguientes pasos. Se realiza un bloqueo con buffer de incubación 30 minutos a 37°C (Composición buffer de incubación: Seroalbúmina bovina (BSA) 1% y Glicina 5% en PHEM). Posteriormente se incuban los anticuerpos específicos ON 4°C en buffer de incubación. En la **Tabla 1** se listan los anticuerpos específicos utilizados. Al otro día, se realizan lavados 3x10 minutos a temperatura ambiente con buffer de incubación y luego se incuban con los anticuerpos secundarios en buffer de bloqueo (Composición buffer de bloqueo: buffer de incubación + 5% Suero Normal de Cabra) 1 hora 37°C. A partir de este paso se evita la exposición a la luz de los preparados. En la **Tabla 2** se listan los anticuerpos secundarios y sondas utilizados. Luego se lava con buffer de incubación 3x10 minutos a temperatura

ambiente y se monta los preparados con un cubreobjeto utilizando el medio de montaje *Pro-Long Antifade* conjugado a la sonda DAPI. Se deja secar los preparados protegidos de la luz y se los sella con esmalte. Finalmente se los guarda preservados de la luz a 4°C hasta su observación por microscopia confocal.

En paralelo se realiza en cada experimento un preparado control que es un preparado donde solo se incuban los anticuerpos secundarios.

Los principios básicos de la inmunohistoquímica indirecta y de la microscopia confocal se detallan en el **Anexo 1**.

Todas las imágenes fueron obtenidas utilizando el **Microscopio Confocal del IIBCE Olympus Fluoview 300** y para el canal correspondiente a Pcd4 se utilizó la misma potencia del láser y el mismo nivel del fotomultiplicador para poder cuantificar y comparar las señales de expresión de Pcd4 posteriormente analizadas.

Tabla 1. Anticuerpos Específicos

Anticuerpos Específicos	Compañía	Código
Anticuerpo anti-Pcd4 (policlonal)	Donado por Nancy Colburn* ¹ (NIH)	-
Anticuerpo Monoclonal anti-Neurofilamento 68	SIGMA	N 5139
Anticuerpo monoclonal anti-Myelin Associated Glycoprotein (MAG)	Ab-Cam	ab89780
Anticuerpo policlonal anti-Proteína Ribosomal P	US Biological, Swampscott, MA	R2031-25

*¹ Anticuerpo anti-Pcd4 fue donado por Nancy Colburn del *National Cancer Institute* (NIH). Elaborado a partir de un péptido ácido de 15 aminoácidos correspondiente a la secuencia de Pcd4 que va desde los residuos 455-469. El isotipo es IgG y fueron generados en conejos del laboratorio *Spring Valley*. Se determinó por *Western Blot* su especificidad, obteniéndose una banda del tamaño esperado, 54 KD (Yang *et al.*, 2001). Este anticuerpo ya ha sido utilizado en otros trabajos (Jansen *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2005).

Tabla 2. Anticuerpos Secundarios y Sondas

Anticuerpos Secundarios y Sondas	Compañía	Código
Alexa Fluor Goat Anti Mousse 555 IgG (H+L)	INVITROGEN	A-21422
Alexa Fluor Goat Anti Rabbit 488 IgG (H+L)	INVITROGEN	A-11008
Alexa Fluor Goat Anti Human 647 IgG (H+L)	INVITROGEN	A-21445
Sonda Phalloidin Alexa Fluor 633	INVITROGEN	A22284
ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI 405	INVITROGEN	P-36931

5.5. Electrofisiología

En este proyecto se puso a punto un protocolo de electrofisiología con la colaboración del Laboratorio de Neurociencias Integrativas y Computacionales del IIBCE. Para su puesta a punto, se realizaron experimentos con 6 ratas, procesándose al menos 2 *slices* por cada

experimento, uno correspondiente a la condición control y otro *slice* en donde se induce la L-LTP. Del total de *slices* donde se logró inducir la L-LTP, en 2 *slices* provenientes de un mismo animal fueron los que pudieron ser procesados mediante los protocolos de fijación, crioprotección e inmunohistoquímica. Respecto a los *slices* control, se obtuvieron y procesaron para los 6 animales.

El protocolo comienza anestesiando el animal de acuerdo a su peso con una mezcla de Ketamina/Xilazina por inyección intraperitoneal y se lo sacrifica por decapitación. Se coloca la cabeza en hielo y rápidamente se extrae el cerebro minimizando los daños a la corteza cerebral. Se coloca el cerebro en un vaso de bohemia con una solución de **Fluido Cerebroespinal Artificial (ACSF)** sin NaCl aireado con una mezcla de 95% O₂ 5% CO₂ y frío (Composición ACSF sin NaCl: 2mM KCl, 1.3mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 200mM Sacarosa y 10mM Glucosa). Se dejan pasar un par de minutos, se toma nuevamente el cerebro y se cortan con bisturí las regiones del bulbo olfatorio y del cerebelo. Posteriormente, se pega el cerebro a una superficie con la cara posterior hacia arriba utilizando algún pegamento convencional y se lo deja nuevamente inmerso en ACSF sin NaCl con la solución fría. Se procede a realizar los cortes de 400 µm en un vibrátomo modelo **Leica VT1000**. Los cortes son en orientación coronal. A medida que se van obteniendo los *slices* de 400 µm, se los toma con una pipeta *Pasteur* de vidrio y se los pasa a un vaso de bohemia que contiene una solución de ACSF sin Sacarosa y siempre aireado con 95% O₂, 5% CO₂ (Composición ACSF sin sacarosa: 2mM KCl, 1.3mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, NaCl 124 mM y 10mM Glucosa). Se dejan los *slices* en esta solución al menos 1 hora.

Luego se observan los *slices* a la lupa y se escogen aquellos que presenten el hipocampo completo. Luego de este período de incubación, los cortes son transferidos a una cámara de inmersión para ser registrados. Se induce entonces la L-LTP, colocando un electrodo de estimulación en las *Colaterales de Schaffer* y un electrodo de registro en la capa interna de las dendritas de CA1, como se muestra en la **Figura 13**. Los registros son externos al citoplasma neuronal y abarcan una población de neuronas. El protocolo de estimulación (Stoica *et al.*, 2011) consiste en aplicar un estímulo control de baja intensidad cada 5 segundos durante 20 minutos. Luego se aplican 2 trenes de alta frecuencia (100Hz) separados por 20 segundos cada uno, posteriormente se aplica un estímulo de baja intensidad durante 5 minutos y se vuelve a aplicar los 2 trenes de alta frecuencia, repitiendo el procedimiento un total de 4 veces. Aquí se debe alcanzar la potenciación por L-LTP. Se continúa estimulando con el protocolo control por 20 minutos o 1 hora. Los registros de potenciales de campo fueron obtenidos amplificando la señal 10 veces, filtrados a 3 KHz, adquiridos a una frecuencia de muestreo de 20kHz y almacenados en un computador

personal para su análisis posterior. La amplitud del potencial de campo observada al final del experimento debe ser de al menos 1.5 veces mayor en magnitud que la registrada en el control inicial y sostenida en el tiempo para concluir que en ese *slice* se induce L-LTP.

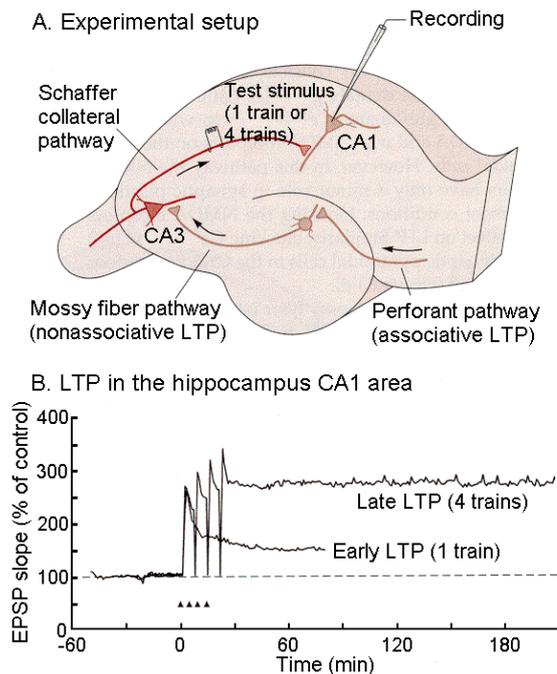


Figura 13. Inducción de LTP en la región CA1 del hipocampo.

En el esquema **A** se muestra una sección del Hipocampo donde se estimulan las Colaterales de Schaffer en rojo con 1 o 4 trenes con un electrodo de estimulación. En las neuronas de CA1 es donde se coloca el electrodo de registro. En el esquema **B** se muestran las curvas de un potencial post-sináptico excitatorio a lo largo del tiempo cuando se induce E-LTP con 1 tren de estimulación o L-LTP con 4 trenes de estimulación [Adaptado de "Principles of Neural Science" Kandel *et al.*, 2000].

5.6. Protocolo de lesión en nervio ciático

Este protocolo, fue realizado en 1 rata adulta utilizando sus dos ciáticos, uno como control sin lesión y el otro lesionado. El protocolo consiste en anestesiar el animal de acuerdo a su peso con una mezcla de Ketamina/Xilazina por inyección intraperitoneal. Luego se realiza un corte en la pierna a la altura del fémur, se ubica el nervio ciático y se realiza una lesión dejando el nervio separado en sus partes proximal que estará en contacto con los somas neuronales y la distal que no está en contacto con los mismos y comienza a sufrir procesos de degeneración Walleriana (Wang *et al.*, 2012). Se vuelve a cerrar la herida con el nervio lesionado y se esperan 18 horas hasta que se sacrifica el animal. Posteriormente se extrae el cabo proximal del nervio ciático lesionado y el nervio ciático de la otra pierna como control.

5.7. Cuantificación de las señales de Pdcd4 y Análisis Estadístico

Se cuantificaron y compararon las señales de Pdcd4 a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal utilizando el programa **IMAGE J**.

5.7.1. Cuantificación de la señal de Pdcd4 en somas y dendritas de las regiones de la neocorteza cerebral, cerebelo e hipocampo

Se utilizó la herramienta **Freehand selections** seleccionando dendritas y somas como se muestra en la **Figura 14**. Se cuantificó la señal correspondiente a Pdcd4 como la sumatoria de la intensidad de fluorescencia para cada pixel del área seleccionada dividido el área cubierta para

cada región seleccionada. Una vez obtenido este cociente que llamamos **Densidad integrada de fluorescencia** para cada soma y dendrita, se realizó el promedio de todos los cocientes obtenidos para cada región. Con ese valor promedio y el desvío estándar asociado, se realizaron gráficos de barras para cada región y se analizaron si existían diferencias entre ambos compartimentos celulares. Las imágenes utilizadas para calcular la señal de expresión de Pdc4 en cada región individual presentaban la misma resolución y formato, indicados en la **Tabla 3**, donde se detallan para cada región el total de imágenes, formato, resolución, número de bits y rango de colores. Posteriormente, se realizó el **Test de Student (Test de T) no pareado a dos colas** para determinar si las diferencias en las señales de expresión de Pdc4 en somas y dendritas son significativas.

Para la cuantificación de la señal de Pdc4 en el neocortex de ratón, se utilizó 1 ratón, seleccionando a partir de las imágenes 7 somas y 6 dendritas. Para la cuantificación en el hipocampo se utilizaron 2 ratones, seleccionado un total de 29 somas y 19 dendritas, y 4 ratas, en este caso seleccionando 52 somas y 52 dendritas. Finalmente para cuantificar la señal de Pdc4 en cerebelo, se utilizó 1 rata y se seleccionaron 8 somas y 10 dendritas.

Para la cuantificación de los cambios en la señal de expresión de Pdc4 en somas y dendritas en la situación control y cuando se induce la L-LTP (a los 20 minutos y 1 hora posterior a la inducción), se utilizaron las mismas herramientas del **IMAGE J** pero empleando un análisis estadístico diferente. Dado que son 3 grupos a comparar (situación control, L-LTP 20 min y L-LTP 1 hora), se realizó el test de **One Way ANOVA** para determinar si existían diferencias significativas en la expresión de Pdc4 cuando se induce la L-LTP en los somas, las dendritas y considerando ambos compartimentos subcelulares. Se cuantificaron un total de 20 somas en la situación control, 48 somas en la condición L-LTP 1 hora y 35 somas en la condición L-LTP 20 minutos. Para las dendritas se analizaron 20 somas en la situación control, 36 somas en la condición L-LTP 1 hora y 28 somas en la condición de L-LTP 20 minutos. El número de imágenes utilizadas se detalla en la **Tabla 3**. Estas imágenes fueron obtenidas a partir de 2 *slices* control, 2 *slices* de la condición L-LTP 20 min y 2 *slices* de la condición L-LTP 1 hora, todos procedentes de 1 Rata.

Tabla 3. Imágenes para cuantificación en neocorteza cerebral, cerebelo e Hipocampo

Región	Número de Imágenes	Formato	Resolución	Numero de Bits	Rango de colores
Neocorteza Cerebral	2	RGB	1024x1024	8 Bits	256
Cerebelo	3	Tiff	1024x1024	8 bits	256
Hipocampo (Rata)	9	Tiff	1024x1024	16 Bits	65536
Hipocampo (Ratón)	4	Tiff	1024x1024	8 bits	256
Hipocampo Rata análisis L-LTP	26	Tiff	1024x1024	16 Bits	65536

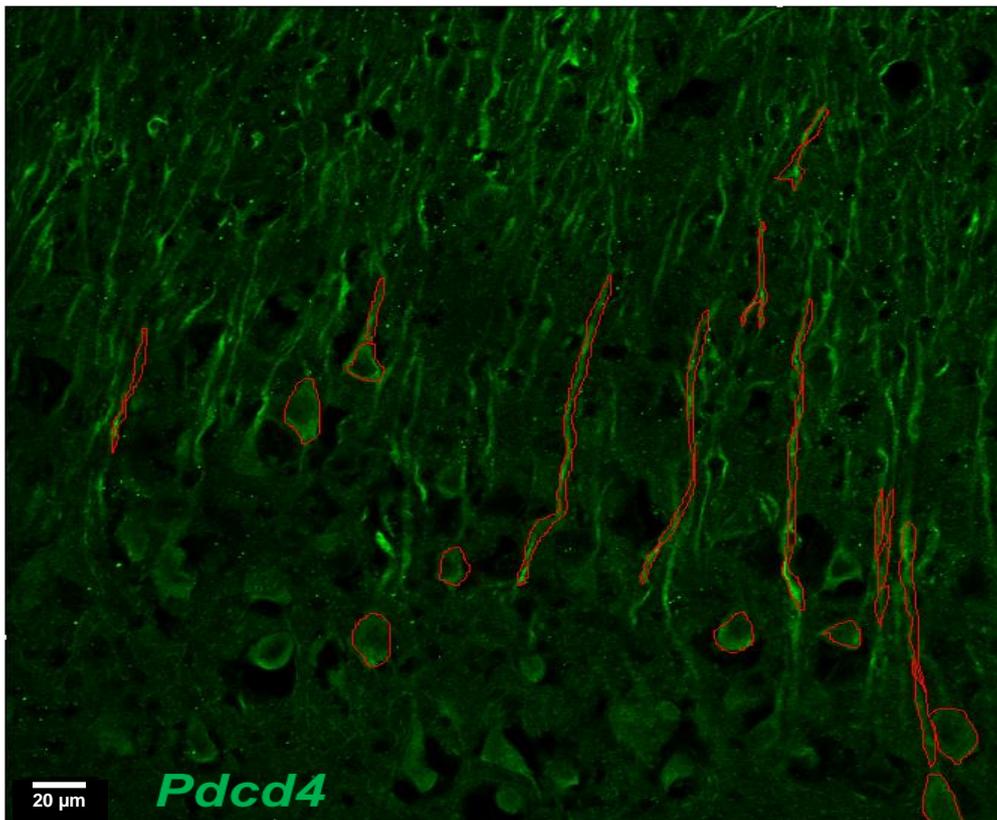


Figura 14. Plano focal único ejemplificando cómo se seleccionan regiones en una imagen de hipocampo de rata. Se indica como se realizó la selección de dendritas y somas neuronales. Se cuantifica la intensidad de todos los píxeles correspondientes a cada área y se normaliza por ésta última. Se hicieron estudios comparativos de las intensidades de fluorescencia, que se extrapolan a mayores o menores niveles de expresión de Pdc4 en cada región analizada.

5.7.2. Cuantificación de la señal de Pdc4 en axones de nervio ciático cortados en sentido transversal

Para la cuantificación de la señal de Pdc4 en el citoplasma externo de la célula de Schwann, la mielina compacta, el citoplasma interno de la célula de Schwann y el axoplasma de axones no lesionados cortados en sentido transversal, se utilizó la herramienta **Freehand selections** seleccionando regiones que abarcaran cada una de las regiones mencionadas como se muestra en la **Figura 15**. La cuantificación de la señal de Pdc4 en cada región fue realizada de la misma forma que para los somas y dendritas calculando el *cociente de Densidad integrada de fluorescencia* para cada región, realizando promedios y graficando. Se utilizó la co-localización de las señales de MAG y de Pdc4 para identificar las regiones de la mielina compacta las cuales no presentan señal para MAG y las regiones del citoplasma externo e interno de la célula de Schwann que si presentan señal para MAG. Las imágenes utilizadas para calcular la señal de expresión de Pdc4 para cada axón presentaban la misma resolución y formato, indicados en la **Tabla 4**, donde se detallan el total de imágenes, formato, resolución, número de bits y rango de colores. Posteriormente, se realizó el **Test de T no pareado a dos colas** para determinar si las diferencias en las señales de expresión de Pdc4 en cada región son significativas. Los datos de cuantificación provienen de criosecciones

obtenidas a partir de los 2 ciáticos sin lesionar de 1 rata. En dicha cuantificación, se asignó arbitrariamente la señal de expresión en axoplasma como el 100%.

5.7.3. Cuantificación de la señal de Pdc4 en los axoplasmas de axones de nervio ciático lesionados cortados en sentido longitudinal

Para cuantificar la señal de Pdc4 dentro de los axones de nervio ciático lesionados en regiones cercanas al sitio de lesión y en regiones más alejadas del mismo se utilizó la herramienta **Freehand selections** seleccionando regiones correspondientes al interior del axón que presentaran señal para Pdc4 como se muestra en la **Figura 16**. La cuantificación de la señal de Pdc4 se realizó de la misma forma que para los dos estudios anteriores. Se utilizó la señal correspondiente a la proteína MAG para facilitar la ubicación del axoplasma. Las imágenes utilizadas para calcular la señal de expresión de Pdc4 en cada región presentaban la misma resolución y formato, indicados en la **Tabla 4**, donde se detallan el total de imágenes, su formato, resolución, número de bits y rango de colores. Posteriormente, se realiza el **Test de T no pareado a dos colas** para determinar si las diferencias en la señal de expresión de Pdc4 en axones cercanos y alejados del sitio de lesión son significativas.

Tabla 4. Imágenes utilizadas para cuantificación en Nervio Ciático con y sin lesión

	Número de Imágenes	Formato	Resolución	Numero de Bits	Rango de colores
Nervios Ciático sin Lesión Axones Transversales	3	Tiff	1024x1024	16 Bits	65536
Nervios Ciáticos con Lesión Axones Longitudinales	9	Tiff	1024x1024	16 Bits	65536

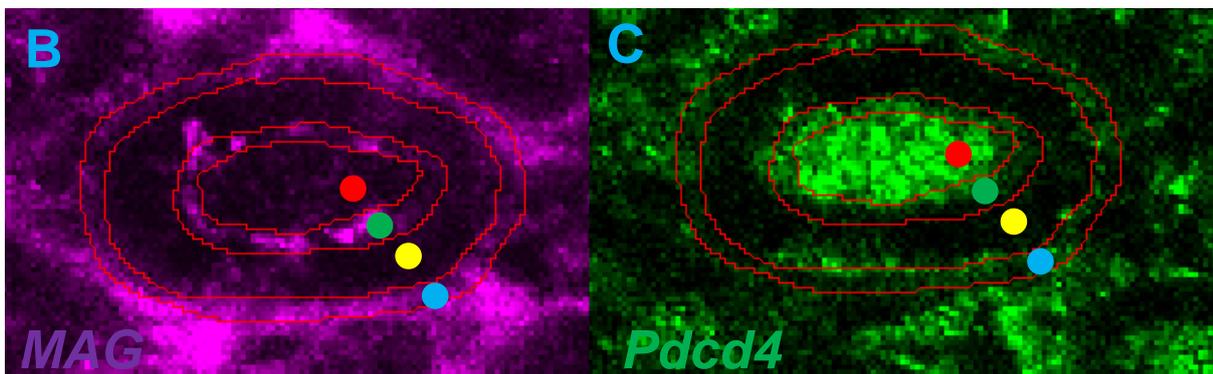
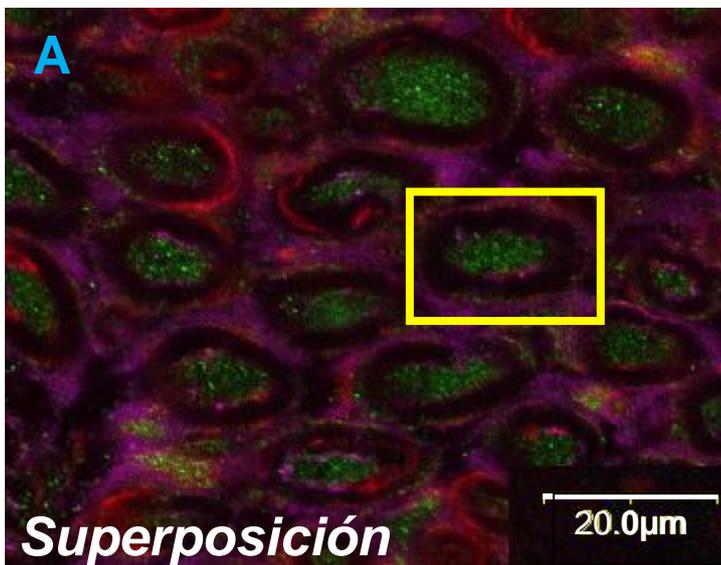


Figura 15. Cuantificación de la señal de Pdc4 en axones no lesionados cortados transversalmente. En **A** se muestra un plano focal único con una panorámica de varios axones donde el verde corresponde a la señal de Pdc4, el magenta a MAG y el rojo a la faloidina. El recuadro amarillo muestra uno de los axones cuya imagen magnificada se muestra en **B** y **C**. En las imágenes **B** y **C** se muestra el axón cortado transversalmente seleccionado en **A** con las señales separadas para MAG y para Pdc4. Los puntos de colores indican cuales son las regiones seleccionadas. El punto rojo muestra la región correspondiente al axoplasma, el verde a parte del citoplasma interno de la célula de Schwann, el amarillo a la mielina compacta y el celeste a parte del citoplasma externo de la célula de Schwann.

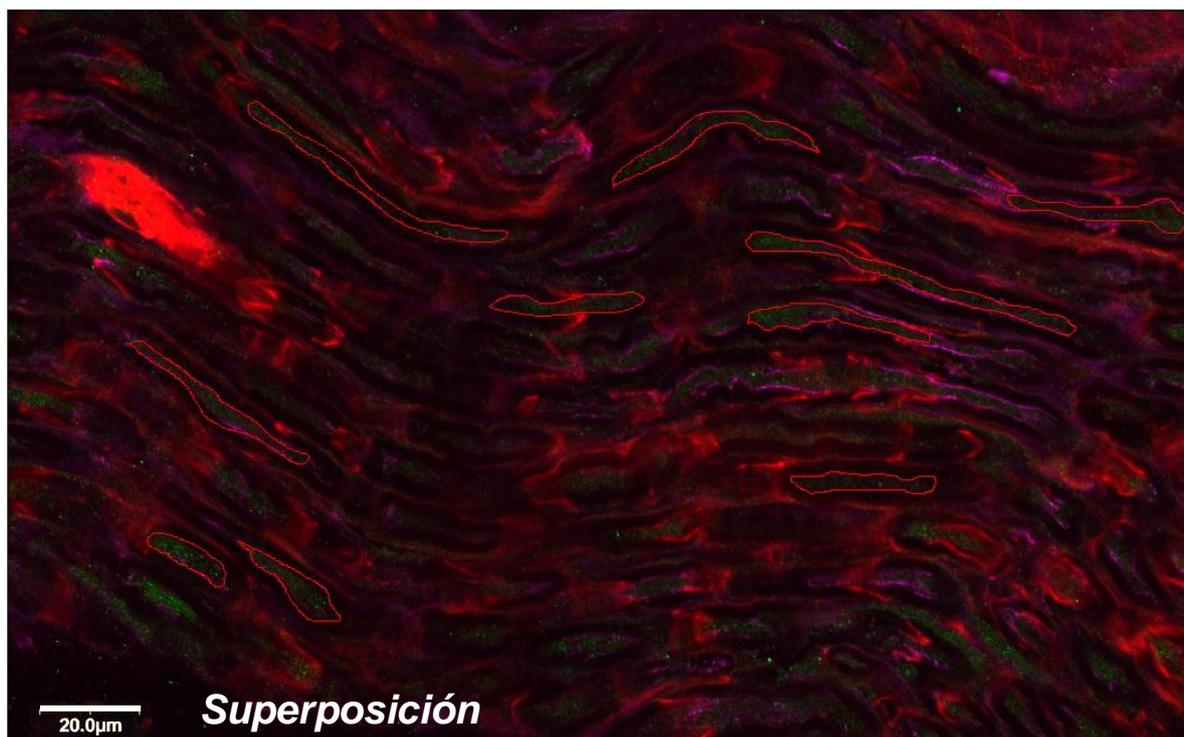


Figura 16. Plano focal único de axones de nervio ciático lesionado. La señal en rojo corresponde a Faloidina, en magenta a MAG y en verde a Pdc4. Las regiones marcadas corresponden a la señal de Pdc4 en el axoplasma. Se calcula la sumatoria de la intensidad de fluorescencia para la señal correspondiente únicamente a Pdc4 para cada área seleccionada y se normaliza por esta última.

6. Resultados

6.1. Pcd4 se expresa en distintas regiones del SNC

6.1.1. La señal de Pcd4 se distribuye en somas y dendritas de las neuronas piramidales de Neocorteza Cerebral

El neocortex cerebral es uno de los sitios del SNC donde nos interesaba analizar la expresión de Pcd4, tanto en los somas como en las dendritas de las neuronas piramidales. Analizando la señal de Pcd4 en neocortex de ratón, puede observarse una notable señal de expresión en las dendritas de neuronas piramidales, como las indicadas en la **Figura 17**. El análisis cuantitativo de la señal de Pcd4 en somas y dendritas, permite inferir una mayor intensidad en la señal de expresión de Pcd4 en las dendritas respecto a los somas. Este análisis se detalla en la **Figura 18**. Estudiando la co-localización entre las señales de Pcd4 y MAG, se observa en la **Figura 19** que existe poca co-localización entre ellas, por lo cual la expresión de Pcd4 en Oligodendrocitos sería menor que en neuronas a nivel del SNC.

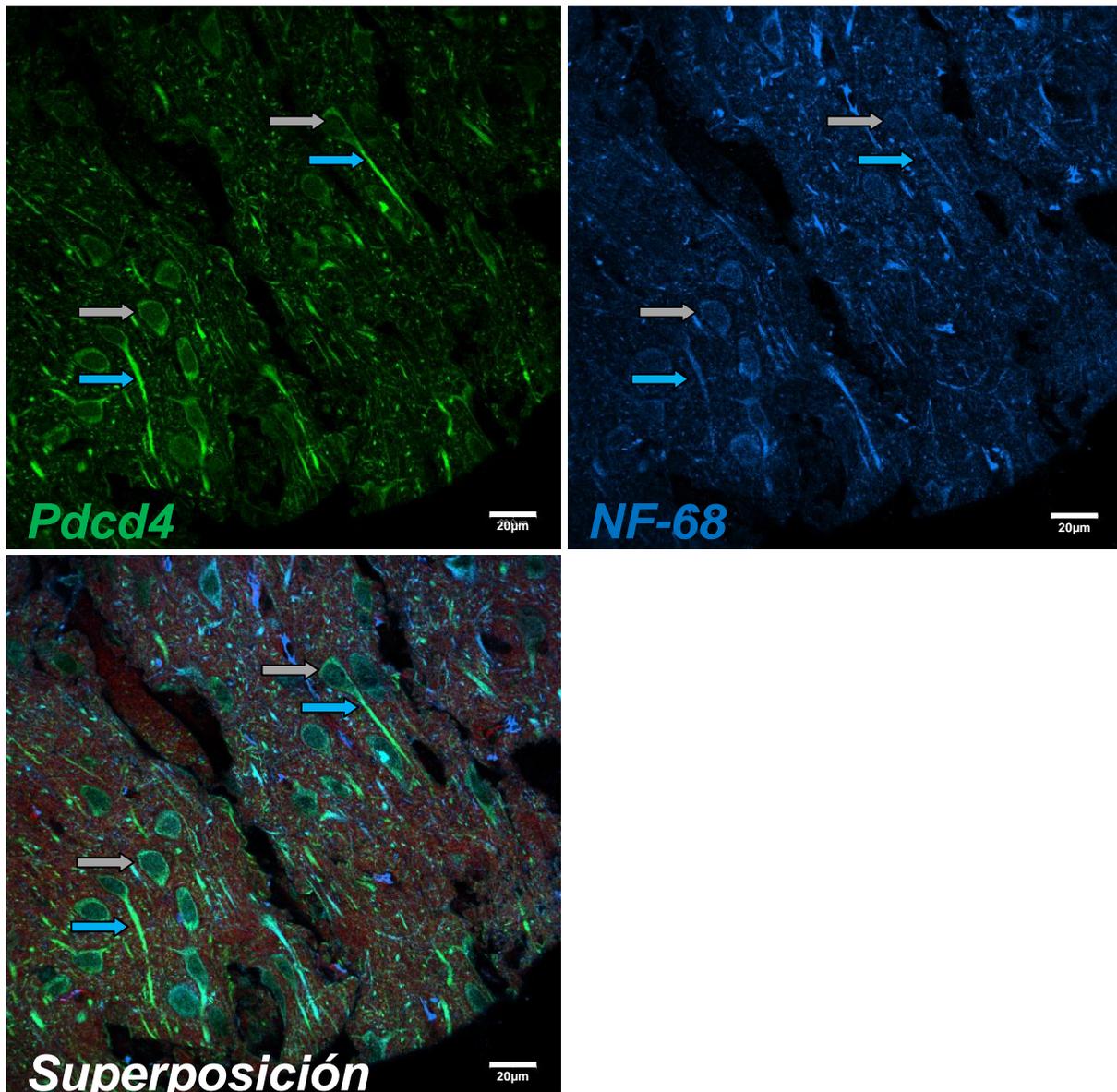


Figura 17. Planos focales únicos del neocortex de ratón, mostrando neuronas piramidales y sus dendritas. La señal en verde corresponde a Pcd4, en azul a Neurofilamento 68 y la superposición de ambas señales. Obsérvese la intensa señal de Pcd4 en dendritas (flechas celestes) y las diferencias en las intensidades de expresión respecto al soma neuronal (flechas grises).

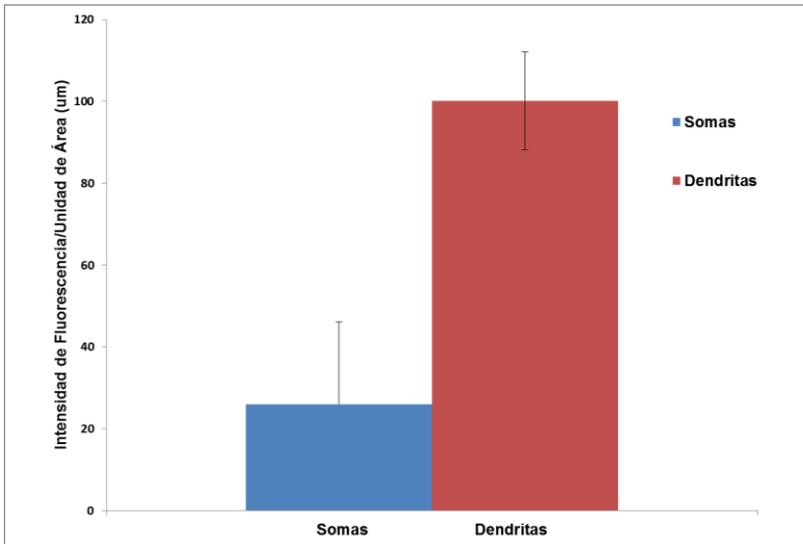


Figura 18. Cuantificación de la señal de Pcd4 en somas y dendritas del neocortex de ratón. Se observa una disminución del 74% en la señal de Pcd4 en los somas respecto a las dendritas (100%). Se realizó el *Test de T* para determinar si las diferencias observadas fueron significativas y si lo fueron. Las barras de error corresponden al desvío estándar. Número de somas analizadas = 7; Número de dendritas analizadas = 6 Dendritas (n=1 ratón). El *p* valor resultado del *Test de T* es $p < 8.902 \times 10^{-5}$.

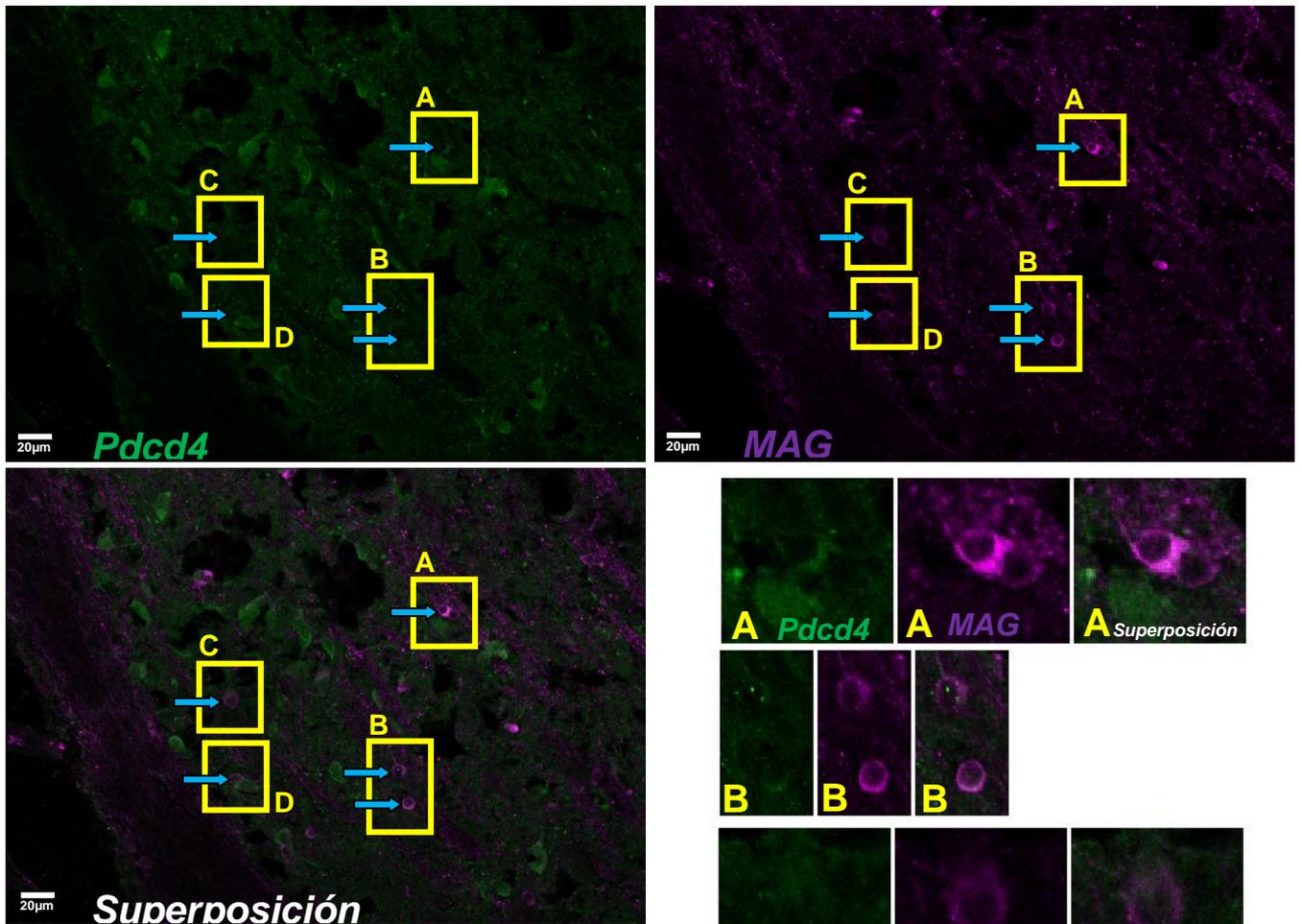


Figura 19. Planos focales únicos mostrando la señal de Pcd4 en verde y de MAG en magenta en la Corteza Cerebral de Rata. Puede observarse que existe poca o nula co-localización entre ambas señales, por lo cual la expresión de Pcd4 sería mayor en neuronas respecto a los Oligodendrocitos en SNC. Las flechas celestes indican oligodendrocitos con señal para MAG y los recuadros A, B, C y D señalan regiones mostradas a mayor aumento en la figura de abajo a la derecha. Nótese la escasa co-localización en las señales de Pcd4 y de MAG.

6.1.2. La señal de Pdc4 se distribuye en los somas y dendritas de las neuronas de Hipocampo

El hipocampo es un sitio del cerebro que nos pareció de particular interés ya que es una de las regiones donde se puede inducir la LTP, un proceso donde la regulación de la síntesis proteica es importante y donde pensamos que Pdc4 podría estar cumpliendo algún papel. Dado el interés de analizar los cambios en los niveles de expresión de Pdc4 frente a la inducción de LTP en estas regiones, se realizó un estudio de la distribución de la proteína en CA1, CA3 y el Giro Dentado. Una de las características más notorias respecto a la distribución de la señal de Pdc4 en las neuronas de hipocampo es su intensa expresión en dendritas, siendo muy notorio en las regiones CA3 y CA1. La **Figura 20** muestra una vista panorámica, distinguiéndose las regiones del CA3 y del giro dentado donde se expresa Pdc4. En la **Figura 21** se muestra la región CA1, donde también es intensa la expresión de Pdc4, particularmente en las dendritas. En la **Figura 22** se observan varios puntos de co-localización en la señal de Pdc4 y la de Anti P en dendritas. Dado que la señal de anti-P permite inferir presencia de ribosomas, estos puntos podrían corresponderse con sitios donde se está regulando la síntesis proteica en forma local por parte de Pdc4. Posiblemente pudiese corresponder a espinas dendríticas. La cuantificación de la señal en soma y dendritas se muestra en la **Figura 23**. El análisis cuantitativo de dichas señal indica que Pdc4 se expresa mayormente en dendritas respecto al soma neuronal en neuronas de hipocampo.

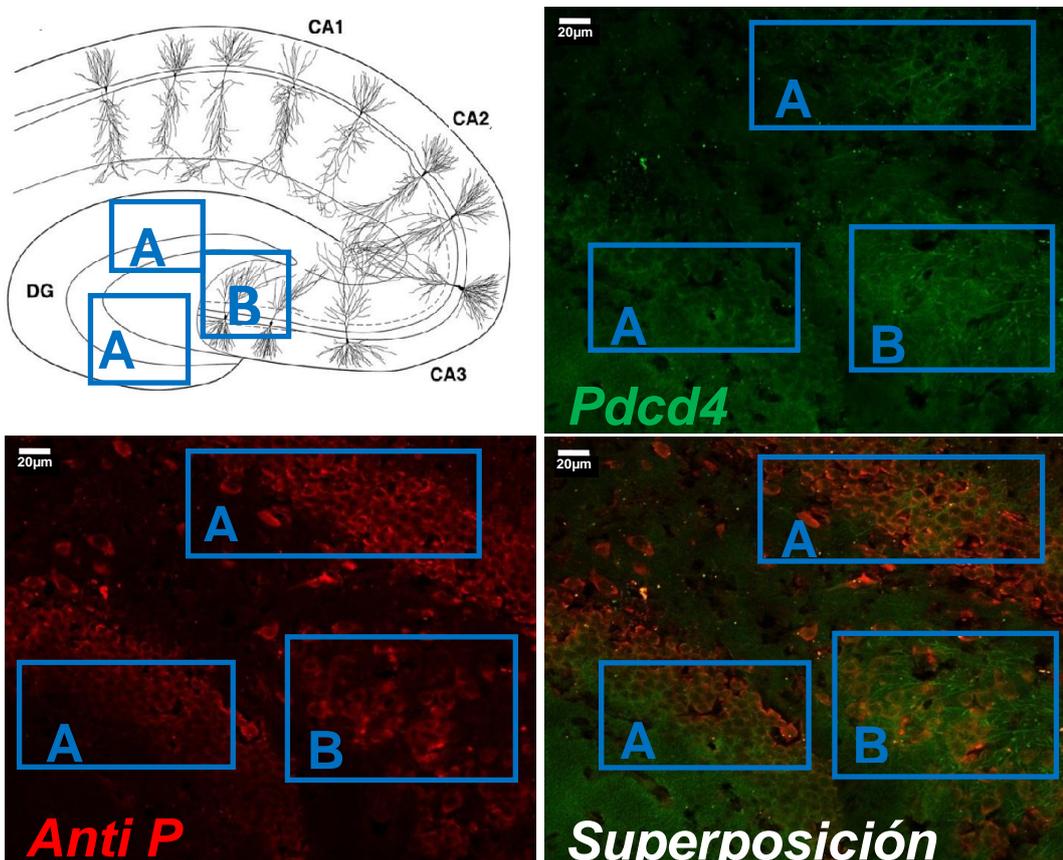


Figura 20. Esquema de las regiones del hipocampo, indicándose las regiones del Giro Dentado (A) y CA3 (B). Las imágenes corresponden a planos focales únicos mostrando la expresión de Pdc4 (en verde), Anti P (rojo) y la superposición de las señales en una vista panorámica.

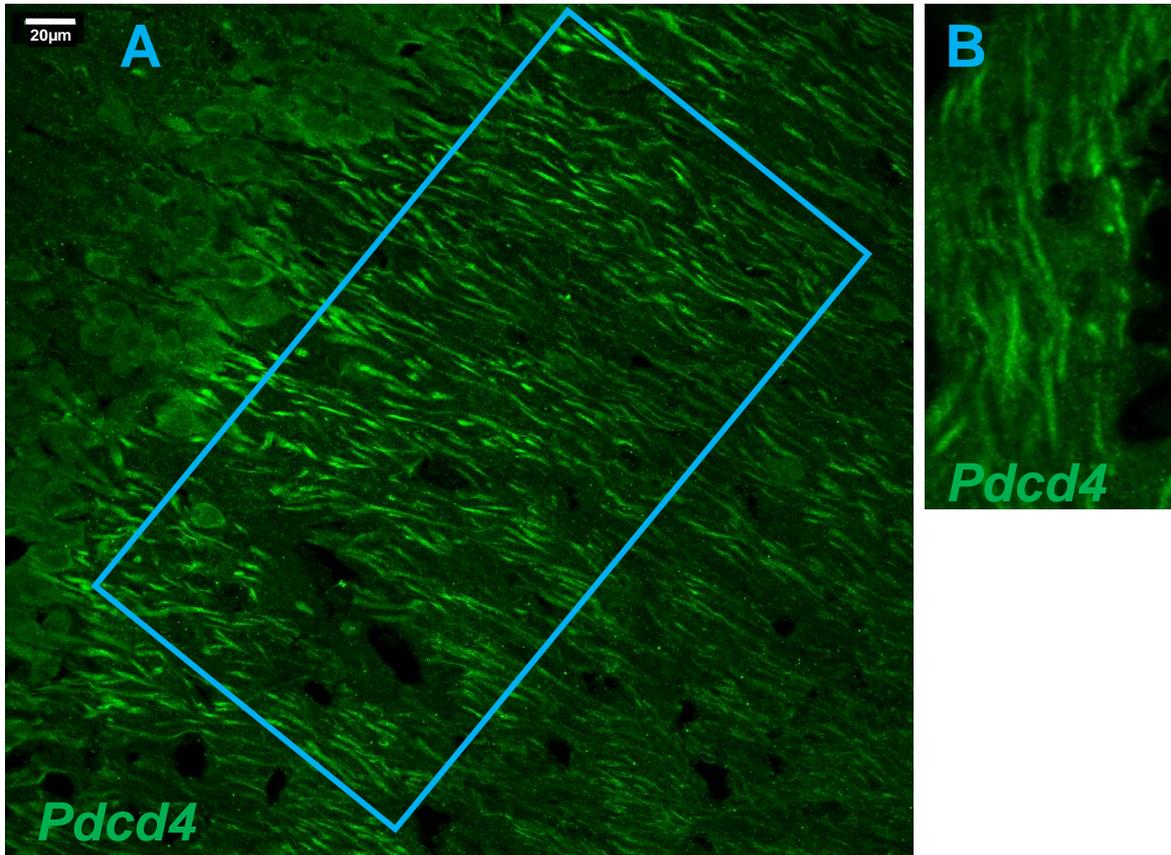


Figura 21. En A, plano focal único mostrando la distribución de la señal de Pdc4 en la región CA1 del Hipocampo. En B, plano focal único mostrando a mayor aumento un conjunto de dendritas de la región CA1. Nótese la distribución de esta proteína a nivel del campo dendrítico (región indicada en A por el cuadrado celeste).

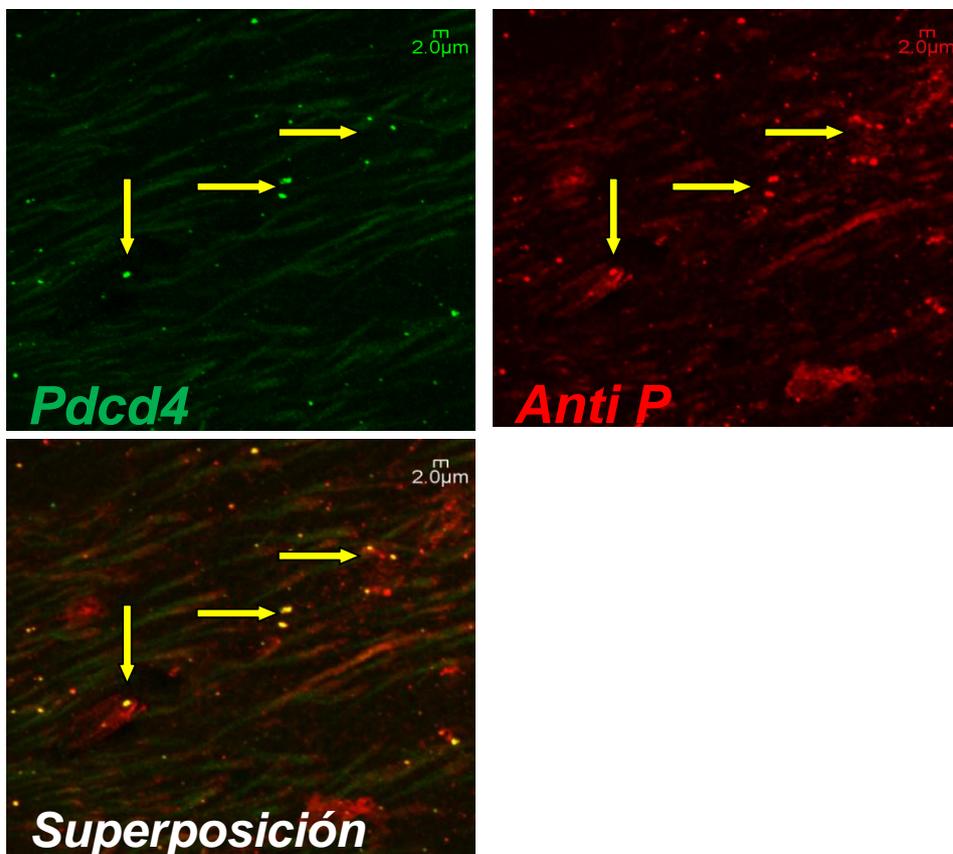


Figura 22. Planos focales únicos de dendritas del hipocampo a gran aumento. Las flechas amarillas indican puntos de co-localización para las señales de Pdc4 (verde) y Anti P (rojo), que podrían corresponder a espinas dendríticas, lo cual significaría que Pdc4 podría estar jugando un papel en procesos de regulación traduccional en dichos sitios.

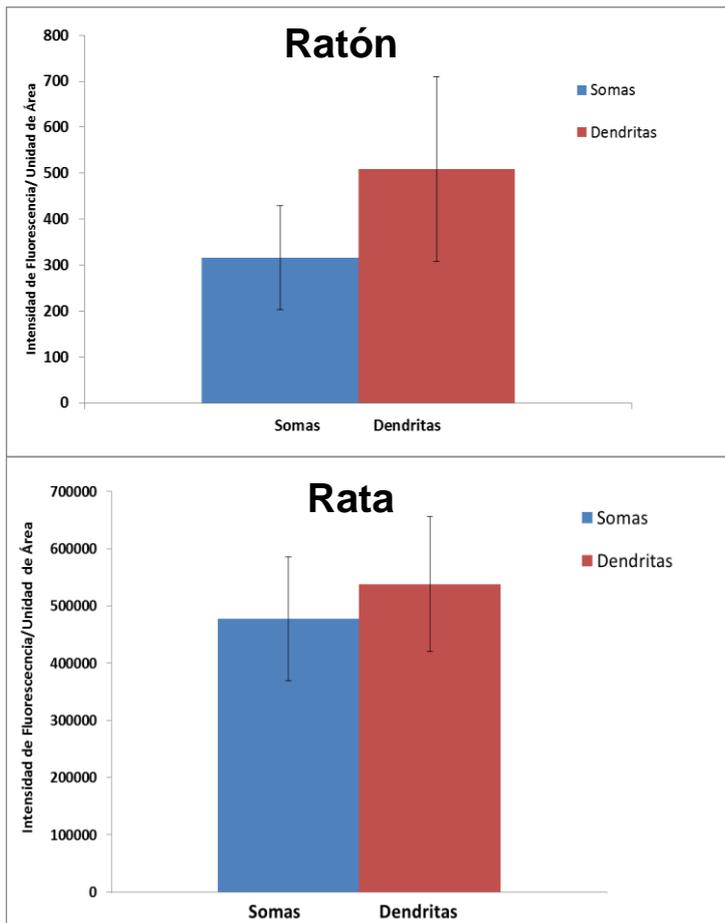


Figura 23. Cuantificación de la señal de Pcd4 en somas y dendritas de la región CA3-CA1 de hipocampo de ratón y rata. Se observa una disminución del 38% en ratón y del 10% en rata en la señal de Pcd4 en los somas respecto a las dendritas (100%). Se realizó el Test de T para determinar si las diferencias observadas fueron significativas y si lo fueron. Las barras de error corresponden al desvío estándar. Número de somas analizadas: en ratón 29 somas; en rata 52 somas. Número de dendritas analizadas: en ratón 19 Dendritas; en rata 52 dendritas (n=4 Ratas y n= 2 Ratones). El *p* valor resultado del *Test de T* es $p < 0.0008$ en ratón y $p < 0.007$ en rata.

6.1.3. La señal de Pcd4 se distribuye a lo largo de las neuronas de Purkinje del Cerebelo

El cerebelo es otro sitio del SNC que nos interesaba analizar la expresión de Pcd4, particularmente en las neuronas de Purkinje en donde puede distinguirse con relativa facilidad los somas y las dendritas. En la **Figura 24** se muestra la señal de Pcd4 en la región correspondiente a la capa de las **Neuronas de Purkinje**. Presentan señal para Pcd4 en toda su extensión, incluyendo los árboles dendríticos. La cuantificación de la señal en somas y dendritas, no revela diferencias significativas entre ambos compartimentos, como indica el análisis cuantitativo de la **Figura 25**.

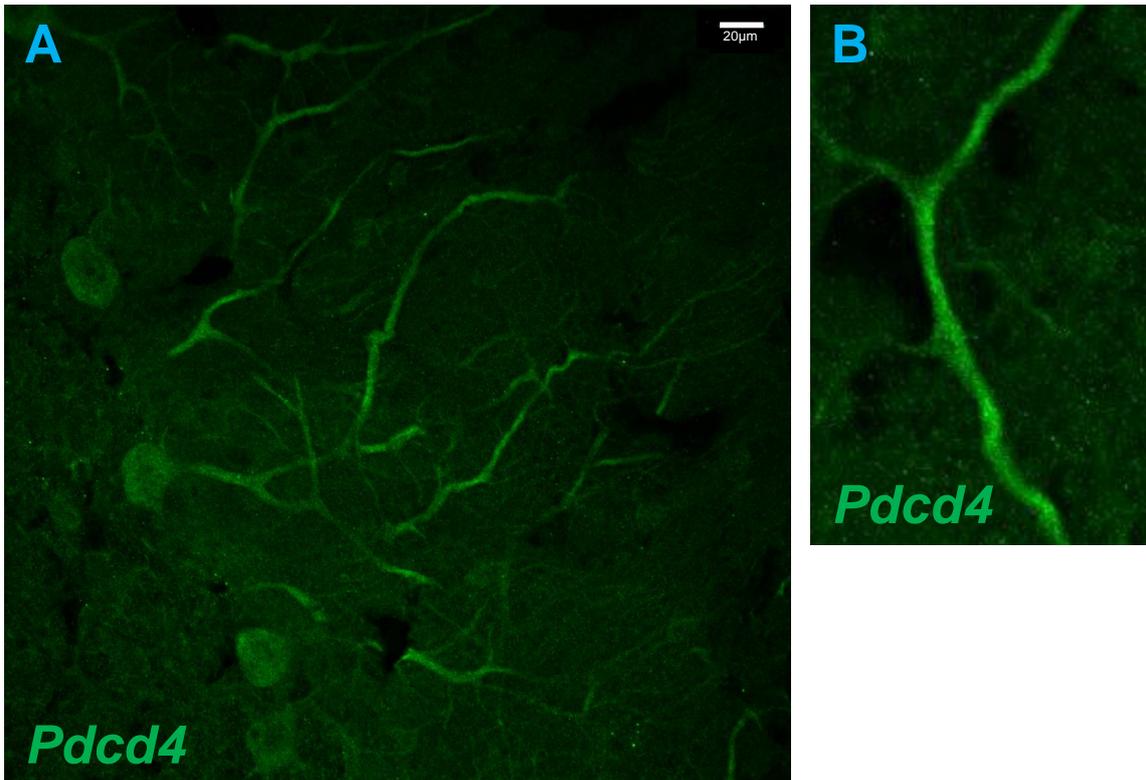


Figura 24. Región de las Neuronas de Purkinje del Cerebelo. En A se muestra un plano focal único donde puede apreciarse la señal de expresión de Pdcd4 a lo largo del soma y el árbol dendrítico de las neuronas de Purkinje. En B se muestra una única dendrita, donde puede observarse la distribución continua de Pdcd4 en toda su extensión.

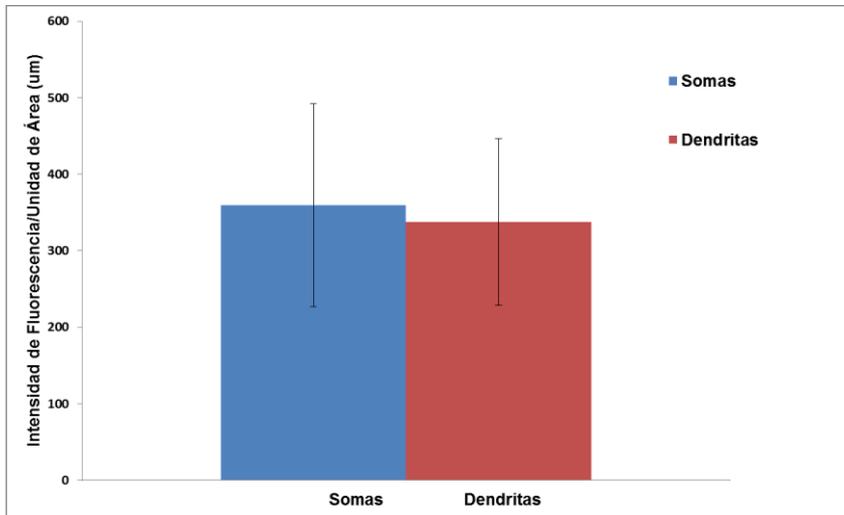


Figura 25. Cuantificación de la señal de Pdcd4 en somas y dendritas de cerebelo de rata. Se realizó el *Test de T* para determinar si las diferencias observadas fueron significativas y no lo fueron. No se observan diferencias en la señal de Pdcd4 en somas y dendritas de cerebelo. Las barras de error corresponden al desvío estándar. Número de somas analizadas =8 Número de dendritas analizadas =10. El p valor obtenido a partir del *Test de T* fue $p < 0.690$.

6.1.4. La señal de Pdc4 se distribuye en neuronas de Médula Espinal

Buscábamos determinar la expresión de Pdc4 en distintas regiones del SNC y una de ellas era en la médula espinal de rata. En la **Figura 26** se muestra la expresión de Pdc4 en diferentes regiones de la médula espinal de rata a la altura de las vértebras dorsales. En la **Figura 27** se observa a mayor aumento la región del asta ventral. Nótese la señal de expresión de Pdc4 en las motoneuronas del asta ventral. También existen otros grupos celulares, posiblemente células gliales, que presentan señal para esta proteína.

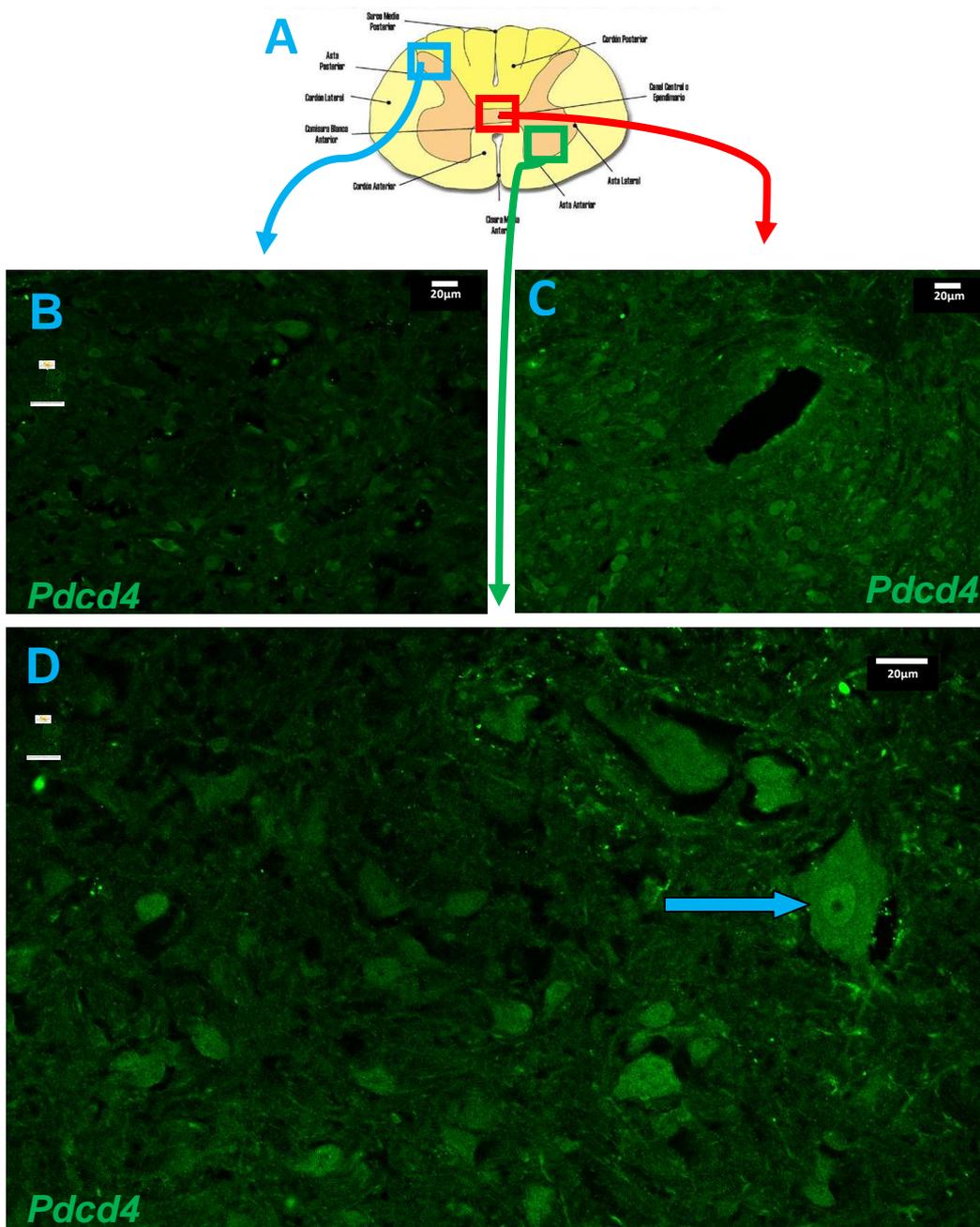


Figura 26. En **A**, Esquema de la médula espinal. En **B**, **C** y **D**, planos focales únicos mostrando la expresión de Pdc4 en el Asta Dorsal, región alrededor del canal del epéndimo y en el Asta Ventral, respectivamente de la Médula Espinal de Rata. La flecha celeste en la imagen D señala el soma de una motoneurona del asta ventral.

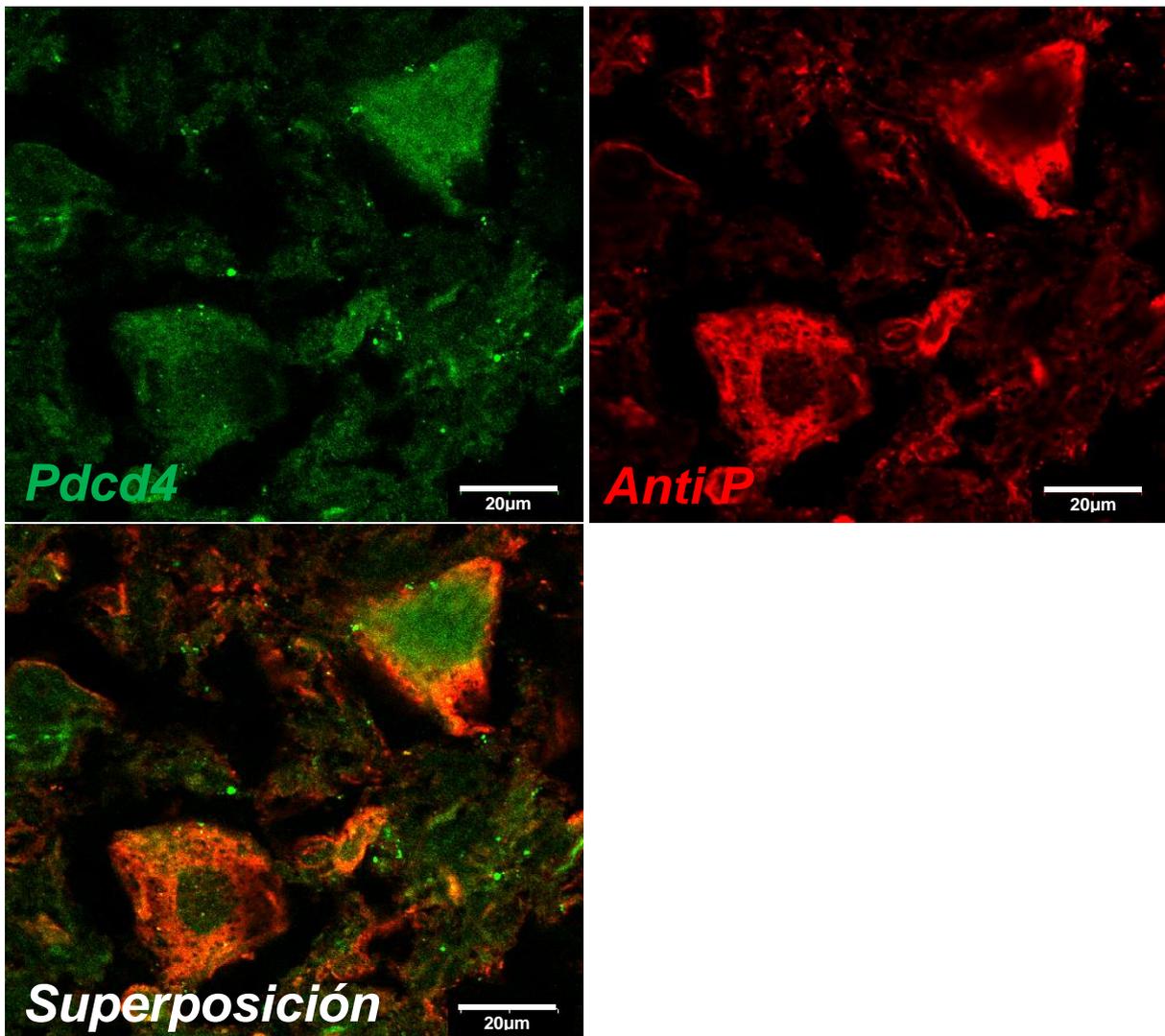


Figura 27. Plano focal único de parte de la región del Asta Ventral, mostrando las motoneuronas. La señal en verde corresponde a Pdc4 y el rojo a la proteína ribosomal P. Puede observarse como la señal de Pdc4 en estas neuronas es uniforme a lo largo del citoplasma y del núcleo neuronal.

6.2. Pdc4 se expresa en axones del SNP

6.2.1. La señal de Pdc4 se distribuye en el axoplasma de los axones de nervio ciático y en el citoplasma externo e interno de las Células de Schwann

Buscábamos determinar cómo es la expresión de Pdc4 en SNP. Para ello utilizamos como modelo el nervio ciático de rata. Determinamos que Pdc4 se expresa en el axoplasma de los axones de nervio ciático y ello puede observarse tanto en los cortes transversales de nervio ciático de ratón de la **Figura 28** como en los de rata de las **Figuras 29 y 30**. Lo mismo se observa en cortes longitudinales como los de la **Figura 31**. La señal correspondiente a la proteína MAG permite distinguir regiones correspondientes a las células de Schwann. La co-localización entre las señales de MAG y de Pdc4 permitió determinar que Pdc4 también se expresa en las células de Schwann en al menos parte del citoplasma externo e interno de estas células.

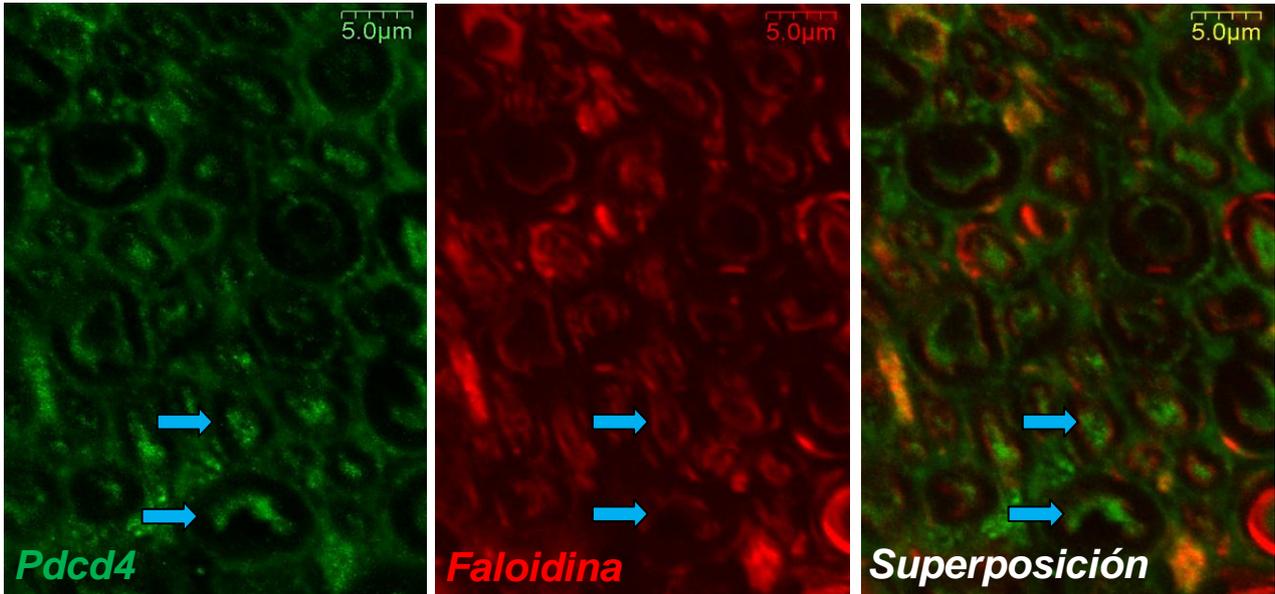


Figura 28. Plano Focal único de cortes transversales de Nervio Ciático de Ratón. En Verde se muestra la señal para Pdc4, en rojo para Faloidina (marcador de filamentos de actina) y la superposición de ambas señales. Puede verse la señal de Pdc4 dentro del axón, como se indica con las flechas celestes.

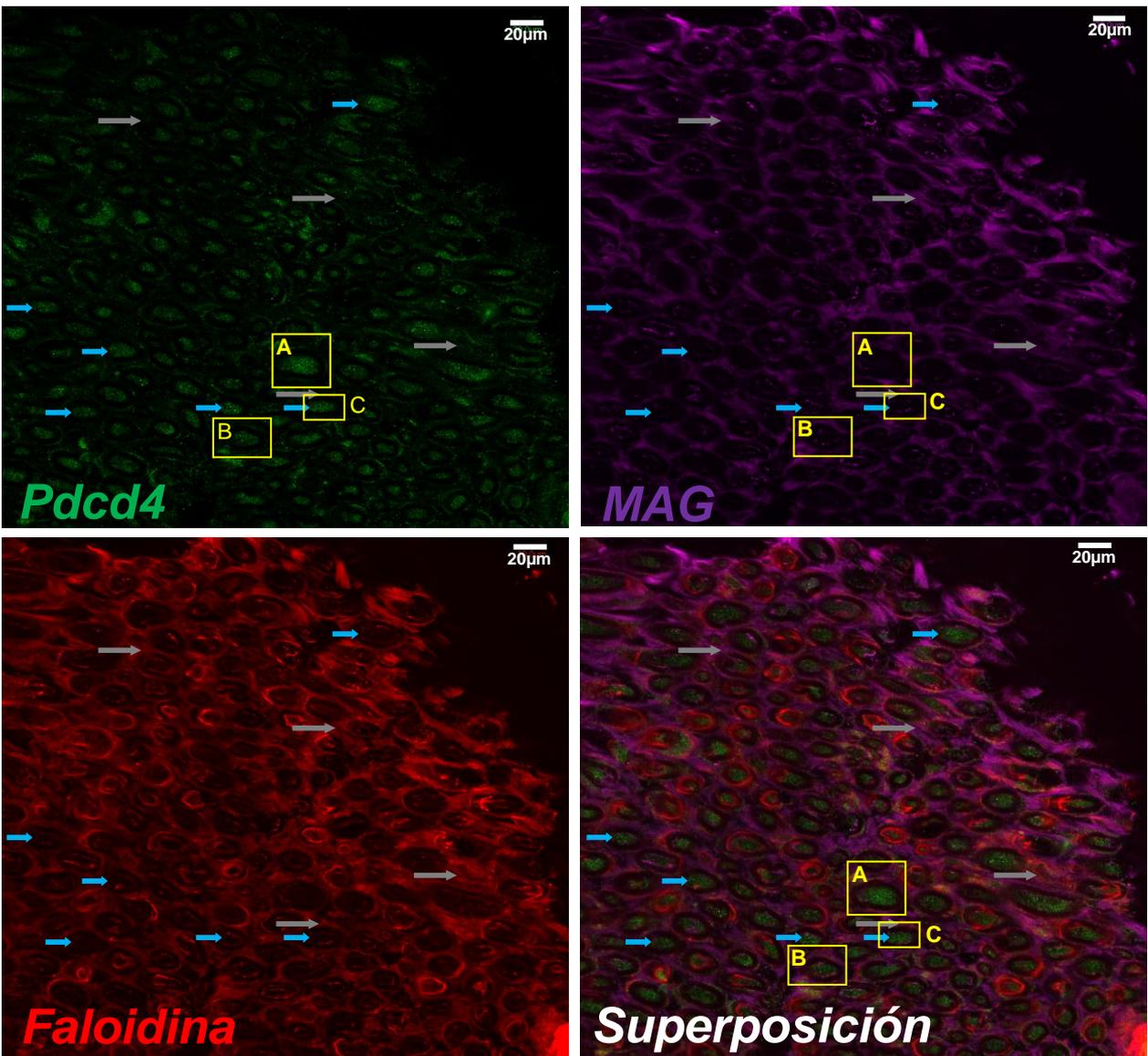


Figura 29. Plano Focal único mostrando cortes transversales de Nervio Ciático de Rata sin lesión. El canal verde corresponde a la señal de Pdc4, en Magenta esta la proteína MAG y en rojo la sonda Faloidina. Pueden observarse numerosos axones cargados de Pdc4 (flechas celestes) y en lugares donde existe co-localización Pdc4-MAG, puede observarse la expresión de Pdc4 en Células de Schwann (flechas grises). Los cuadros amarillos A, B y C indican axones mostrados a mayor aumento en la **Figura 30**.

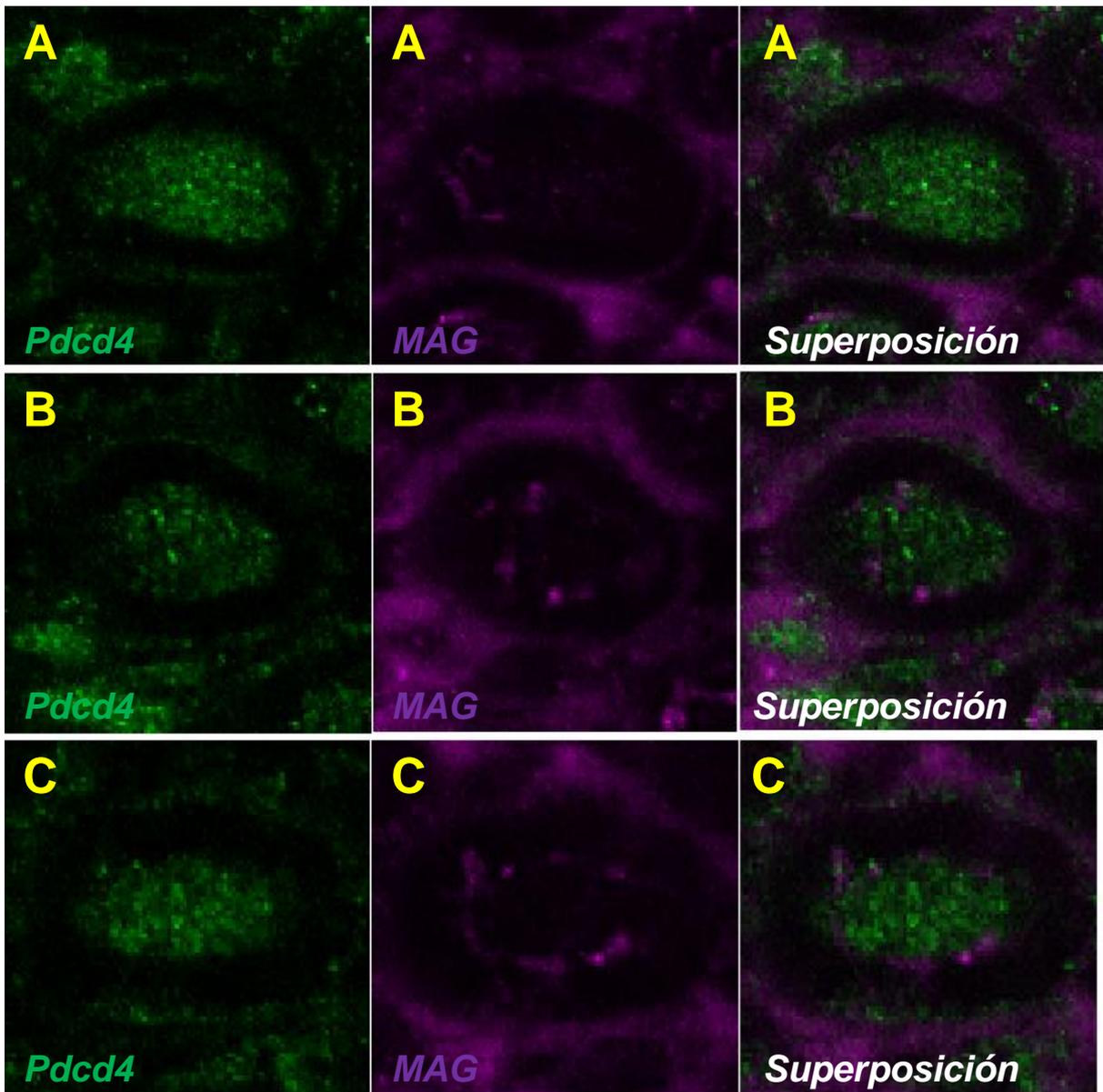


Figura 30. Planos focales únicos mostrando 3 axones cortados en sentido transversal a mayor aumento. Los axones A, B y C corresponden a los seleccionados en la **Figura 29**. Puede observarse la señal de Pdc44 dentro del axoplasma y su distribución en parte del citoplasma externo e interno de la célula de Schwann colocalizando con MAG.

La cuantificación de la señal de Pdc44 en un total de 15 axones sin lesionar cortados en sentido transversal diferenciando las regiones del axoplasma, parte del citoplasma interno de la célula de Schwann, la mielina compacta y parte del citoplasma externo de la célula de Schwann, revela que existiría una mayor distribución de la proteína en los axoplasma respecto a las regiones cuantificadas de citoplasma externo e interno de las Células de Schwann y de la mielina compacta que lo rodean. La distribución de Pdc44 sería mayor en el citoplasma interno de la célula de Schwann que en el externo. Dicha cuantificación se resume en la **Figura 32**.

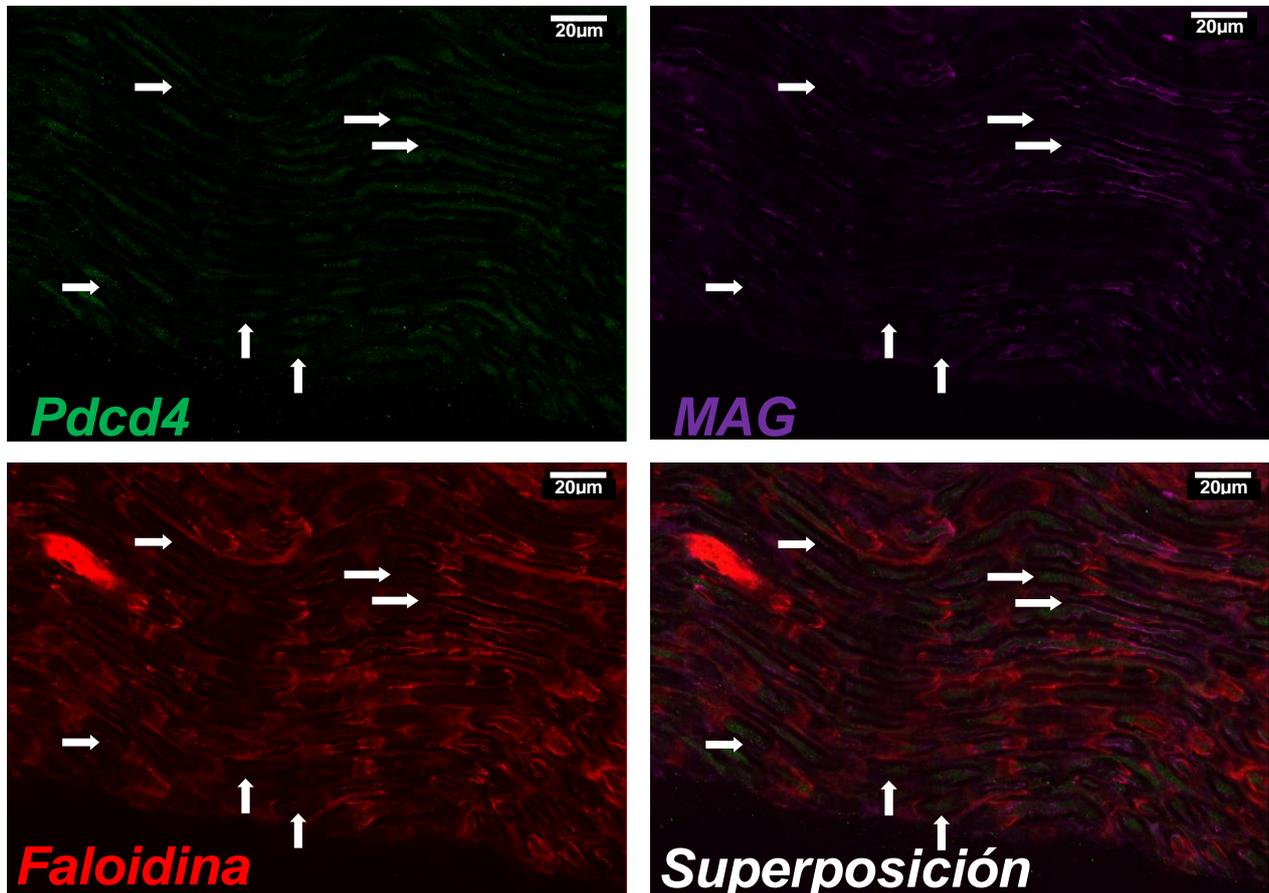


Figura 31. Plano focal único mostrando cortes longitudinales de Nervio Ciático de Rata. En verde esta la señal de Pdc4, en magenta la señal de MAG y en rojo la de Faloidina. Las flechas indican axones en cuyo interior se encuentra señal para Pdc4.

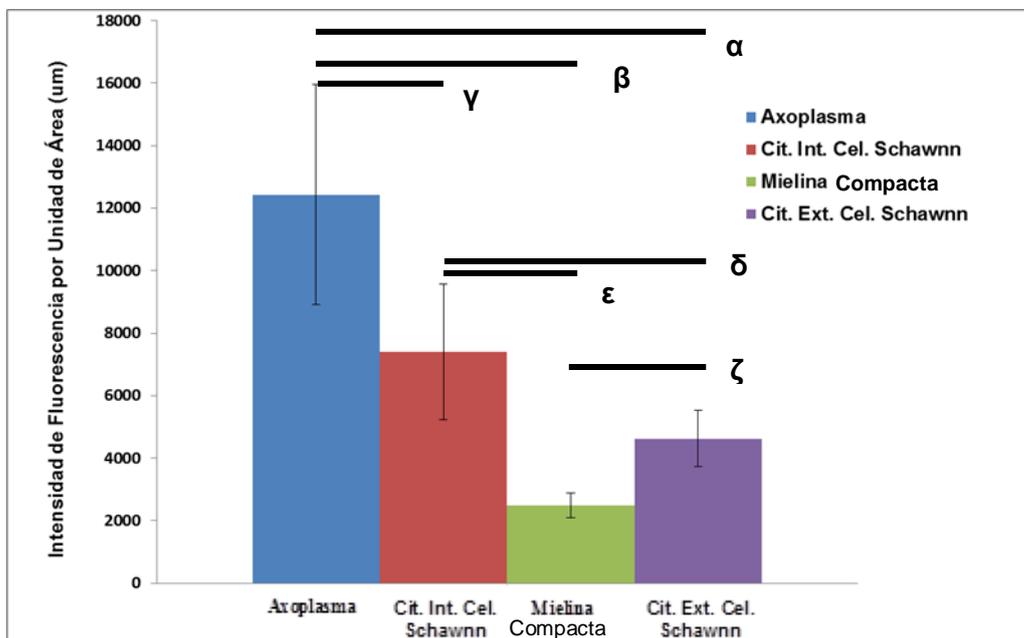


Figura 32. Cuantificación de la señal de Pdc4 en cortes transversales de axones sin lesión. Los gráficos de barras de izquierda a derecha indican las regiones del axoplasma, parte del citoplasma interno de la célula de Schwann, mielina compacta y parte del citoplasma externo de la célula de Schwann. Se observa un 40% menos de señal de Pdc4 en el citoplasma interno de la célula de Schwann, un 63% menos en el citoplasma externo de la célula de Schwann y un 80% menos en la mielina compacta, siempre respecto a la señal de Pdc4 en el axoplasma que asignamos arbitrariamente como el 100%. Se realizó el test de T para determinar si las diferencias observadas fueron significativas, siendo significativas en todos los casos marcados con *. Las barras corresponden al desvío estándar. Número de axones cortados transversalmente analizados 15 (n= 1 Rata). Los p valor resultado del Test de T son: $\alpha=3.70 \times 10^{-7}$, $\beta=2.69 \times 10^{-8}$, $\gamma=9.65 \times 10^{-5}$, $\delta=0.00020$, $\epsilon=3.50 \times 10^{-7}$, $\zeta=8.16 \times 10^{-8}$.

6.3. La señal de expresión de Pdc4 disminuye al inducirse procesos de plasticidad sináptica en SNC y de regeneración axonal en SNP

6.3.1. En nervio ciático en regeneración, la señal de Pdc4 es menor en axoplasmas cercanos al sitio de lesión respecto a los más alejados

Cuando se realiza una injuria en el nervio ciático, el cabo proximal a los somas neuronales comienza a sufrir procesos de regeneración en donde la síntesis proteica es importante. Por ello nos interesó analizar si la expresión de Pdc4 cambia en los sitios cercanos a la lesión en un proceso desarrollado a nivel axonal.

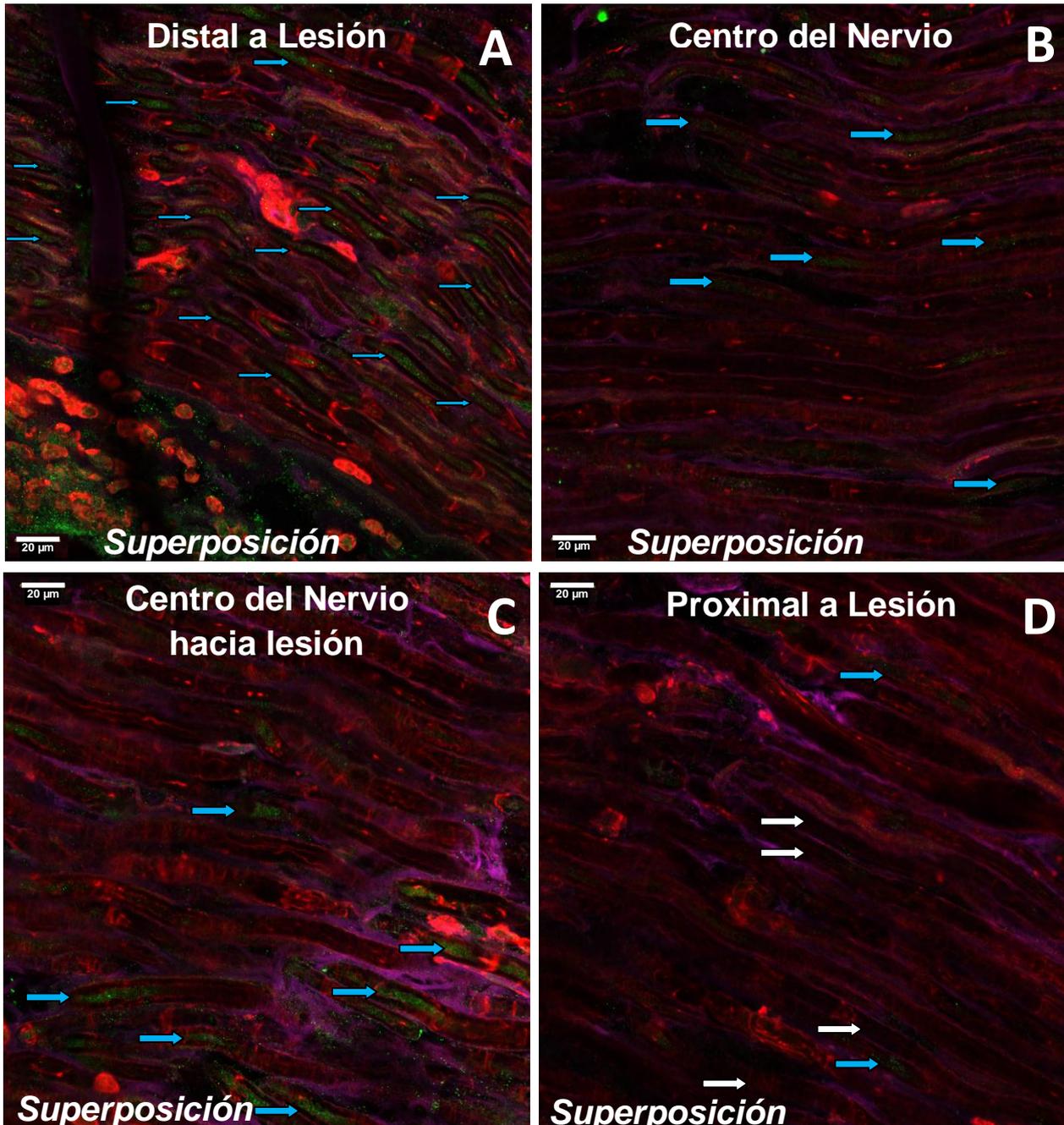


Figura 33. Planos focales únicos de distintas regiones de un mismo nervio ciático al que se le produjo una lesión y se dejó en regeneración durante 18 horas. Se muestra la superposición de las distintas señales, donde el verde corresponde a la señal de Pdc4, el magenta a MAG y el rojo a la Faloidina. **En A**, corresponde a la región distal o más alejada al sitio de lesión; **En B** es la región correspondiente al centro del nervio; **En C** es la región que va desde centro del nervio hacia la lesión y en **D** es la región próxima al sitio de lesión. Las flechas blancas en D indican axoplasmas sin señal de Pdc4, posiblemente porque la proteína se está expresando menos en dicha región. Las flechas celestes en A, B, C y D indican axoplasmas donde observa señal de Pdc4. Nótese la gran cantidad de axones cargados con Pdc4 presentes en la región distal al sitio de lesión (A) respecto a la región proximal al sitio de lesión (D).

Se observa una disminución en la expresión de Pcd4 dentro de los axones que se encuentran más cercanos al sitio de injuria respecto a los que están más alejados en el mismo nervio sometido a dicha lesión. En el nervio ciático control (sin injuria), no existen variaciones en la señal de expresión de Pcd4, presentando un patrón de expresión similar a la región distal. En la **Figura 33** puede observarse como en la región distal al sitio de lesión hay una gran cantidad de axones cargados con señal para Pcd4 (**A**), mientras que en la región más cercana al sitio de lesión son pocos los axones cargados con señal para Pcd4 (**D**). La cuantificación de la señal de los axones cargados con Pcd4 en regiones distales y proximales al sitio de lesión se detalla en la **Figura 34**, en donde existen diferencias significativas en la señal de intensidad de fluorescencia de Pcd4 en el sitio proximal a la lesión respecto a las otras regiones analizadas alejadas del sitio de lesión.

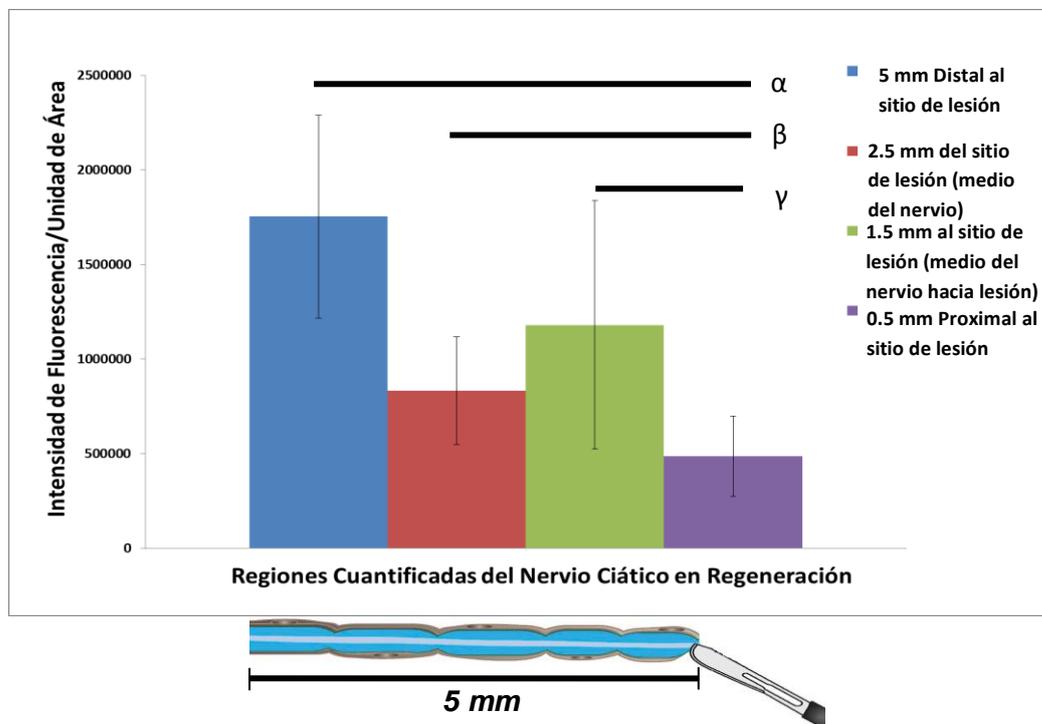


Figura 34. Cuantificación de la señal de Pcd4 en axones de distintas regiones de nervio ciático en regeneración. Los gráficos de barras leídos de izquierda a derecha indican regiones cada vez más próximas al sitio de lesión. En azul son axones distales al sitio de lesión, en rojo es desde el medio del nervio hacia el sitio de lesión, en verde es el medio del nervio y en violeta es la región más proximal al sitio de lesión y por tanto más alejada de los somas neuronales en la situación previa a la extracción del nervio. El esquema debajo del gráfico muestra los sitios analizados. Se observó una disminución del 72% en la señal de Pcd4 en la región próxima a la lesión respecto a la región distal (100%). Se realizó el *Test de T* para determinar si las diferencias observadas fueron significativas, siendo significativas en todos los casos marcados con *. Las barras corresponden al desvío estándar. Número de axones analizados: Región Próxima a Lesión = 6 axones; Región media hacia sitio de lesión = 7 axones; Región Media = 8 axones; Región distal al sitio de lesión = 21 axones (n= 1 Rata). Los *p* valor resultado del *Test de T* son: $\alpha = 1.513 \times 10^{-8}$ $\beta = 0.022$ $\gamma = 0.032$.

6.3.2. La señal de Pdc4 disminuye cuando se induce L-LTP en slices de Hipocampo

La **Figura 35** muestra las comparaciones entre la señal de Pdc4 en 3 condiciones diferentes:

- 1) *Slice* control donde no se induce L-LTP
- 2) *Slice* donde se induce L-LTP y se mantiene en dicho estado durante 20 minutos previo a la fijación
- 3) *Slice* donde se induce L-LTP y se lo mantiene en dicho estado durante 1 hora previo a la fijación

En la **Figura 36** se muestran los gráficos del registro de los potenciales de membrana a nivel del campo dendrítico de la región CA3-CA1, obtenido a partir de los protocolos de electrofisiología. Incluye el protocolo de estimulación control (curva A, en azul) y el protocolo de estimulación por tetanización, donde posteriormente se induce la L-LTP (curva B, en rojo). Estos gráficos indican que se pudo inducir la L-LTP a los 60 minutos de que comienzan los registros, observándose un aumento en la amplitud del potencial de membrana registrado luego de la tetanización respecto a la situación control. Con el protocolo control, solo se observa una leve despolarización que se pierde rápidamente (* en la **Figura 36**), mientras que luego de la tetanización se alcanza una despolarización pronunciada (+ en la **Figura 36**), donde el potencial de membrana registrado pasa de 1.5 mV a 3.5 mV y permanece en ese estado potenciado durante todo el tiempo de registro. Nuestros registros son de poblaciones de neuronas de la región CA3-CA1 y no de neuronas individuales. Los estados potenciados son despolarizaciones que en nuestros registros electrofisiológicos se representan como una hiperpolarización (ver las curvas A y B de la **Figura 36**). Esto se debe a que se está realizando un registro electrofisiológico externo y el potencial está invertido respecto a las despolarizaciones que suceden en el lado interno de la membrana neuronal.

Las imágenes mostradas corresponden a la región CA3-CA1, que es donde se ubica el electrodo de registro en las condiciones experimentales. Puede observarse como la señal de Pdc4 es cuantitativamente menor en las condiciones experimentales respecto a la señal observada en la condición control. Por tanto existiría menos expresión de Pdc4 cuando se induce L-LTP. La cuantificación se detalla en la **Figura 37**, en donde se observa que la señal de Pdc4 decrece cuando se induce L-LTP y en forma tiempo dependiente, siendo menor la señal tanto en los somas como en las dendritas cuando pasa 1 hora de inducido el L-LTP respecto a cuándo solo pasan 20 minutos.

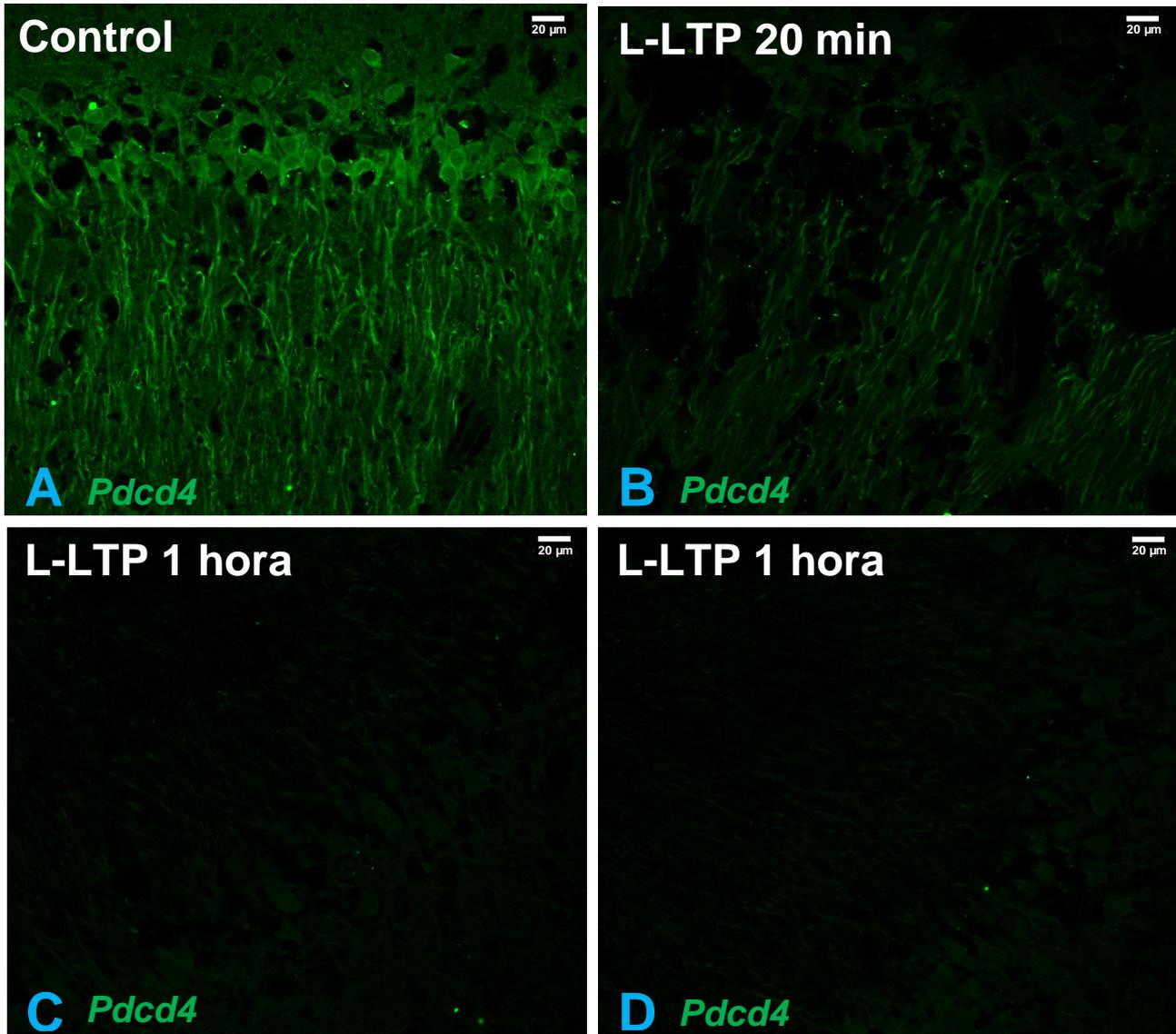


Figura 35. Imágenes de las regiones CA3-CA1 de los *Slices* Control (sin inducir L-LTP) en A; inducción de L-LTP y su mantenimiento por 20 minutos en B e inducción de L-LTP y su mantenimiento durante 1 Hora en C y D. Puede observarse una disminución en la señal de Pdc44 en las situaciones experimentales respecto al control, tanto en los somas como las dendritas. La disminución parece ser mayor cuando pasa 1 hora de inducido el L-LTP, respecto a cuándo solo han pasado 20 minutos.

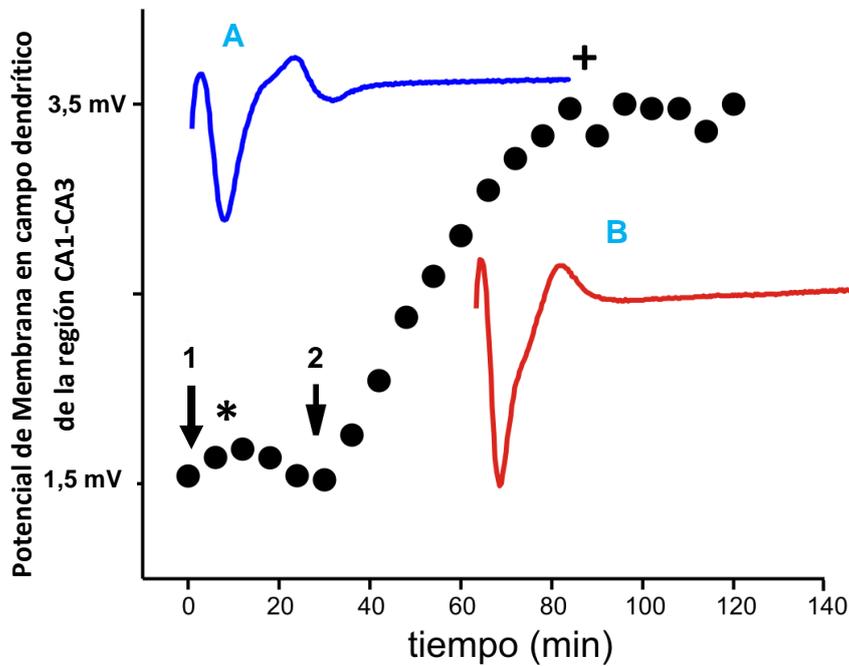


Figura 36. Gráficos mostrando resultados de los protocolos de electrofisiología. Los puntos negros indican los valores del potencial de membrana registrados a lo largo del tiempo, indicando con la **Flecha 1** el momento en que se induce el estímulo control (desde 0 min y durante 20 min) y con la **Flecha 2** cuando se induce el protocolo de tetanización (a los 30 min). Con el protocolo control solo se observa una leve despolarización que se pierde rápidamente (*), mientras que luego de la tetanización se alcanza una despolarización pronunciada que se mantiene en el tiempo. La **curva A** corresponde a los registros de estimulación con el protocolo control y la **curva B** a los registros de estimulación posteriores al protocolo de tetanización. La hiperpolarización en ambas curvas, se corresponde con la despolarización marcada con el (*) para el caso de la curva A y con el (+) para el caso de la curva B. Se registran como hiperpolarizaciones porque realizamos un registro electrofisiológico externo. Dado que el potencial de membrana registrado post-tetanización cambia de 1.5 mV a 3.5 mV y se mantiene en el tiempo, podemos decir que se indujo la L-LTP.

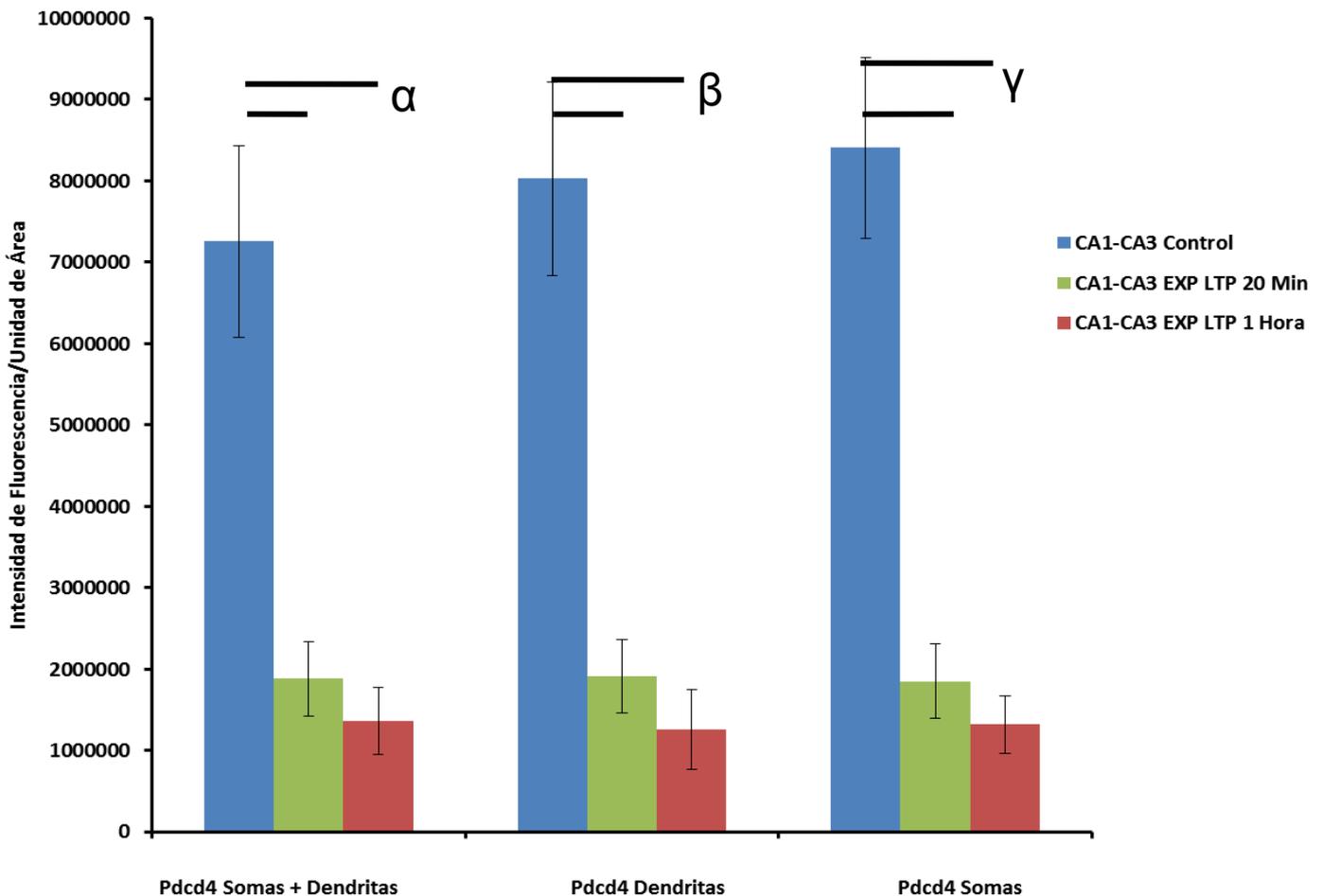


Figura 37. Cuantificación para la señal de Pdc4 en las condiciones control (Azul), Inducción de L-LTP durante 20 Minutos (Verde) e Inducción de L-LTP durante 1 Hora (Rojo), considerando somas y dendritas en conjunto y cada sub compartimento celular por separado. Se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia del 82% para el caso del L-LTP y su mantenimiento durante 1 Hora y una disminución del 75% para el caso del L-LTP y su mantenimiento durante 20 minutos, respecto al Control (100%). Se realizó el *Test de One way ANOVA* para determinar si existían diferencias significativas entre en somas, dendritas y somas + dendritas en las condiciones control, L-LTP 20 min y L-LTP 1 hora, siendo significativas en los 3 grupos. Las barras corresponden al desvío estándar. Número de somas analizados: Control 20 somas; LTP 1 Hora 48 somas; LTP 20 Min 35 somas. Número de Dendritas analizados: Control 20 somas; LTP 1 Hora 36 somas; LTP 20 Min 28 somas. ($n=1$ Rata con 2 *slices* control, 2 *slices* L-LTP 20 min; 2 *slices* L-LTP 1 hora). Los *p* valor resultado del *Test One Way ANOVA* fueron: $\alpha = 1.68 \times 10^{-68}$; $\beta = 1.32 \times 10^{-21}$; $\gamma = 6.02 \times 10^{-67}$.

7. Discusión y Conclusiones

En este trabajo se estudió la distribución de Pdc4 en diversas regiones del sistema nervioso y se tuvo una primera aproximación sobre su posible papel en la regulación de procesos de plasticidad, utilizando como modelos la inducción de L-LTP en SNC y la regeneración axonal en SNP.

7.1. Distribución de la señal de Pdc4 en SNC

Pdc4 se expresa en somas y dendritas de neuronas del SNC, incluyendo motoneuronas de la médula espinal, neuronas piramidales del neocortex cerebral, neuronas de Purkinje del cerebelo y neuronas del hipocampo de rata.

7.1.1. Expresión de Pdc4 en somas y dendritas de neocortex e hipocampo

En el neocortex e hipocampo la cuantificación de la señal de Pdc4 es mayor en dendritas respecto a los somas neuronales en ratón y rata (**Figuras 18 y 23**). Si la señal de expresión es mayor en las dendritas, significa que deben existir mecanismos que permitan el transporte dirigido de Pdc4 desde el soma neuronal hacia las dendritas. Podría ser el transporte del ARNm para su posterior síntesis a nivel local en dendritas o de la proteína. De todas formas, sea el transcripto de Pdc4 o la proteína ya formada, puede plantearse la posibilidad de que exista alguna señal que guíe ese transporte. Además, si la expresión es alta en dendritas, debe estar cumpliendo algún rol en estos sitios, posiblemente como represor de la traducción. Esto puede tener implicancias en procesos de plasticidad sináptica, donde la regulación de la síntesis proteica es importante. Como ya se comentó en la introducción, la síntesis local de proteínas en dendritas es un fenómeno ya descrito e importante para la inducción y mantenimiento del L-LTP en neuronas de hipocampo (Tsokas *et al.*, 2005). La co-localización observada en la **Figura 22** entre Pdc4 y anti P, podría corresponderse a espinas dendríticas, ya que el tamaño de dichas partículas y su distribución coinciden con las esperadas para estas estructuras (Fedulov *et al.*, 2007). Si esto fuese cierto, podría significar nuevas evidencias de que Pdc4 está regulando la síntesis proteica en forma local en dendritas, donde la formación de espinas dendríticas y su importancia en relación a la consolidación del L-LTP ya ha sido reportada (Tanaka *et al.*, 2008). De todas formas, es necesario realizar nuevos estudios que verifiquen estas hipótesis. Una posibilidad es utilizar un anticuerpo anti-cofilina fosforilada como marcador específico de la presinapsis de espinas dendríticas y un anticuerpo anti-PSD-95 como marcador de las post-sinapsis (Fedulov *et al.*, 2007) y verificar si existe co-localización con la señal de Pdc4 en las espinas dendríticas marcadas.

Utilizando la proteína MAG como marcador de los oligodendrocitos, se observó poca co-localización entre la señal de Pdc4 y la de MAG, por lo cual la expresión de Pdc4 sería

menor en oligodendrocitos respecto a las neuronas (**Figura 19**). Para confirmarlo, sería necesario realizar otros estudios, por ejemplo, utilizando otros marcadores de células gliales.

7.1.2. Expresión de Pdc4 en somas y dendritas del cerebelo

En las neuronas de Purkinje del cerebelo no se observaron diferencias significativas en la señal de expresión de Pdc4 en los somas respecto a las dendritas (**Figura 25**). En el cerebelo también existen procesos de plasticidad sináptica bien caracterizados, como es el caso de la **Depresión a Largo Plazo o Long Term Depression (LTD)**, en donde al contrario que en el LTP, se produce una disminución en la eficacia de las sinapsis neuronales que se mantiene en el tiempo, pero donde también es importante la síntesis *de novo* de proteínas para su consolidación, siendo otro modelo de plasticidad sináptica en mamíferos (Andersen *et al.*, 2007). Existen estudios que han determinado la necesidad de síntesis local de proteínas en dendritas para el mantenimiento del LTD (Pfeiffer & Huber, 2006). Por tanto, es posible que Pdc4 pudiese también jugar un rol en tales procesos.

7.2. Distribución de la señal de Pdc4 en SNP

7.2.1. Expresión de Pdc4 en el axoplasma y en las células de Schwann

Pdc4 se expresa en el axoplasma y en el citoplasma externo e interno de las células de Schwann del SNP. Nuestro modelo fue el nervio ciático y se pudo determinar que Pdc4 se expresa en el axoplasma (**Figura 30**). El hecho de que esta proteína se encuentre presente en axones periféricos, revela que deberían de existir mecanismos que aseguren el transporte dirigido de Pdc4 desde el soma neuronal, en este caso desde los somas de los DRG. Este transporte podría ser de la proteína ya sintetizada o posiblemente del transcrito, el cual debería de portar alguna señal que guíe su transporte hacia el axón, como sucede con muchos otros ARNm (Sotelo Silveira & Sotelo Sosa, 2011). También es posible que exista algún tipo de señal en la proteína que medie su transporte hacia el axón.

En este estudio, también se realizó una primera aproximación para analizar la expresión de Pdc4 en células de Schwann al cuantificar en regiones correspondientes a parte del citoplasma externo e interno de estas células (**Figura 32**). En principio, la expresión de Pdc4 sería mayor en el axoplasma que en el citoplasma externo e interno de la célula de Schwann. Si bien Pdc4 se describe como una proteína de expresión ubicua (Lankat-Buttgereit & Göke, 2003), estas diferencias apoyarían la idea de que existen mecanismos de transporte dirigidos de Pdc4 en las neuronas periféricas.

Dentro de la célula de Schwann, la señal de Pdc4 parece ser más intensa en el citoplasma interno que en el externo. En este contexto puede plantearse que existiría una expresión diferencial de Pdc4 entre ambas regiones de la célula de Schwann. Podría ser

interesante explorar la posibilidad de que exista un tráfico de Pdc4 entre la célula de Schwann y el axoplasma. De todas formas, es necesario realizar nuevos estudios para explicar a qué se puede deber estas diferencias en la distribución de Pdc4. Por otra parte, se pudo cuantificar señal de Pdc4 en la mielina compacta, que si bien es débil, está por encima del ruido de fondo.

7.3. Disminución en la expresión de Pdc4 en el axoplasma de los axones de nervio ciático cercanos al sitio de lesión

Se estudiaron los cambios en la expresión de Pdc4 en distintas regiones del nervio ciático sometido a una lesión, analizándose únicamente la porción del nervio que estuvo en contacto con los somas neuronales durante 18 horas post-lesión. Se observó que existe una menor expresión de Pdc4 en axones próximos al sitio de lesión respecto a aquellos axones que se encuentran alejados del mismo y por tanto más cerca de los somas neuronales (**Figuras 33 y 34**) Esto puede tener implicancias interesantes, ya que en el sitio cercano a la lesión, es donde se lleva a cabo el proceso de regeneración axonal, que involucra un aumento importante en la síntesis de proteínas a nivel local (Gumy *et al.*, 2010). Dado que Pdc4 es un represor de la traducción, es posible que una disminución en su expresión signifique que ciertos ARNm implicados en la regeneración axonal, estén siendo regulados por Pdc4. Si Pdc4 se expresa menos, aumentaría la traducción de dichos ARNm, permitiendo que se lleve a cabo el proceso de regeneración. De ser así, entonces existirían ARNm involucrados en estos procesos regulados por Pdc4. La menor expresión de Pdc4 podría deberse a que esta proteína está siendo degradada por la vía proteosomal y/o también a que está siendo interferida por microRNAs, posiblemente **miR-21**, donde ya ha sido reportado que uno de sus blancos es Pdc4 (Bhatti *et al.*, 2011; Frankel *et al.*, 2008). Incluso se ha identificado a miR-21 en procesos de regeneración axonal, aumentando su expresión en los somas de neuronas del ganglio de la raíz dorsal como efecto de una lesión producida en el nervio ciático (Strickland *et al.*, 2011). Sería interesante también analizar que sucede con la expresión de Pdc4 en el cabo distal, donde se dan procesos de degeneración Walleriana (Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, es necesario realizar nuevos experimentos para verificar las nuevas hipótesis planteadas y ver si es posible continuar investigando en esta línea.

7.4. Disminución en la señal de expresión de Pdc4 cuando se induce L-LTP

En este trabajo se realizó un estudio inicial sobre el posible papel de Pdc4 en la regulación del proceso del L-LTP como ejemplo de plasticidad sináptica. Se observó un descenso en la expresión de Pdc4 cuando se induce L-LTP en forma dependiente del tiempo en el cual se mantenga el proceso (**Figuras 35 y 37**). De todas formas, es necesario repetir el experimento y

sería pertinente cubrir escalas de tiempo mayores (4 y 8 horas), de forma tal de seguir la cinética de los cambios en la expresión de Pdc4 a medida que se van dando la síntesis *de novo* de proteínas en el progreso del L-LTP.

Basándonos en los resultados obtenidos, podemos hipotetizar sobre el posible papel de Pdc4 en la regulación de la síntesis proteica en L-LTP. Como ya se mencionó en la introducción, Pdc4 es una proteína reportada como represora de la traducción que forma parte de la vía de mTOR (**Figura 12**). Cuando el complejo mTOR es activado, fosforila la proteína S6K1, pasando a su forma activa llamada Thr-389-S6K1. Esta última fosforila a Pdc4 marcándolo para la ubiquitinación por β -TrCP1 y su posterior degradación por el proteosoma (Dorrello et al., 2006).

La vía mTOR es importante para la inducción y mantenimiento de L-LTP y se han identificado varios de los componentes de la vía en dendritas y somas de hipocampo, sitio donde puede inducirse L-LTP (Tang *et al.*, 2002). En la bibliografía se ha reportado la importancia de m-TOR y su activación durante la inducción del L-LTP (Costa-Mattioli *et al.*, 2009). Se ha reportado que la distribución de Thr-389-S6K1 aumenta en las dendritas de CA1 cuando se induce L-LTP (Tsokas *et al.*, 2005).

Esto nos lleva a pensar sobre el posible papel de Pdc4 en L-LTP, donde podría estar inhibiendo la traducción de ciertos ARNm involucrados en el proceso. Planteamos que para la inducción y mantenimiento del L-LTP donde debe darse la síntesis *de novo* de proteínas, la activación de mTOR induce la fosforilación de S6K1, quien fosforilaría a Pdc4, siendo entonces degradado por el proteosoma. Esto aumentaría la tasa traduccional de los posibles ARNm que estarían siendo regulados por Pdc4. Si fuese así, Pdc4 cumpliría un rol en la regulación del L-LTP inhibiendo la traducción específica de ciertos ARNm hasta el momento que sea necesaria su traducción. La posible degradación por el proteosoma de Pdc4, explicaría el marcado descenso en la señal de expresión de Pdc4 observada en la inmunohistoquímica de la **Figura 33**, donde existe un descenso tanto en los somas como en las dendritas.

7.5. Conclusión General

Mediante estos estudios, determinamos que la proteína Pdc4 se expresa en células del SNC y SNP, particularmente en somas y dendritas de neuronas del hipocampo y neocorteza cerebral, neuronas de Purkinje del cerebelo, motoneuronas de la médula espinal, axones de nervio ciático y citoplasma externo e interno de las células de Schwann. También observamos que la distribución de Pdc4 es cuantitativamente superior en dendritas de hipocampo y corteza respecto a los somas y es cuantitativamente mayor en el axoplasma de los axones de

nervio ciático respecto a las regiones analizadas del citoplasma externo e interno de las células de Schwann.

Mediante la inducción de procesos de plasticidad, contribuimos al entendimiento de la función de la proteína Pdc4 como regulador de la traducción en SNC y SNP.

En SNC, determinamos que disminuye la señal de expresión de esta proteína cuando se induce L-LTP en neuronas de la región CA3-CA1 de hipocampo, disminuyendo la expresión de Pdc4 en somas y dendritas en forma dependiente del tiempo que se mantiene la L-LTP (20 minutos y 1 hora después de inducido el proceso de L-LTP).

En SNP, observamos que la señal de expresión de Pdc4 es menor en axones cercanos al sitio de lesión del nervio ciático, en donde se están llevando a cabo procesos de regeneración, respecto a la región distal al sitio de lesión.

Con estos resultados, se abre la posibilidad de que la proteína Pdc4 se encontraría regulando la traducción de ARNm específicos involucrados en procesos de plasticidad sináptica en SNC y de regeneración axonal en SNP, siendo que estos aumentarían su tasa traduccional cuando disminuye la expresión de Pdc4, posiblemente por su degradación vía la activación de m-TOR, activándose Thr-389-S6K1, que fosforilaría Pdc4 y lo marcaría para la vía de ubiquitinación y degradación por el proteosoma. Futuros experimentos permitirán responder a estas nuevas preguntas.

8. Perspectivas

Los resultados obtenidos donde se observa una disminución en la señal de expresión de Pdc4 en L-LTP en SNC concuerdan con los obtenidos en los procesos de regeneración en SNP. Se ha descrito que tanto en la regeneración axonal como en la inducción de la L-LTP la síntesis proteica aumenta. Dado que Pdc4 disminuye su expresión, posiblemente esté cumpliendo un rol similar en ambos procesos. Podría estar inhibiendo la traducción de ARNm blanco los cuales aumentarían su tasa de traducción al degradarse Pdc4.

De todos modos, se requieren de otros experimentos para verificar estas nuevas hipótesis. Una posibilidad es silenciar Pdc4 en *slices* de hipocampo con un **siRNA específico para Pdc4** y ver cómo ello repercute en el desarrollo y mantenimiento del L-LTP, por ejemplo analizando si cambian la intensidad mínima de estímulo o los tiempos mínimos necesarios para inducir la L-LTP. Otro experimento complementario al anterior sería estudiar el proceso de L-LTP y el de regeneración axonal, pero ahora estabilizando a Pdc4, no permitiendo que se degrade. Una posibilidad es utilizando una droga específica recientemente descrita llamada **Erioflorina**. Esta última no permite la degradación de Pdc4 por la vía de ubiquitinación al interferir específicamente en la interacción entre β -TrCP1 y Pdc4 (Blees *et al.*, 2012). Con estos y otros experimentos, se puede verificar la hipótesis de que Pdc4 regula la traducción de ciertos ARNm específicos involucrados en fenómenos de plasticidad sináptica (usando como modelo la inducción y mantenimiento del L-LTP en hipocampo) y de regeneración axonal (usando como modelo axones de nervio ciático lesionados), los cuales pueden aumentar su capacidad de traducirse cuando Pdc4 es degradado por vía proteosomal. El esquema de la hipótesis planteada se describe en la **Figura 38**.

Otro estudio interesante sería identificar cuáles son esos posibles ARNm blancos de Pdc4. Experimentos de *Ribosomal Footprinting* a partir de *slices* de hipocampo donde se indujo L-LTP o a partir de nervios ciáticos lesionados y posterior análisis de las secuencias de los ARNm que se encuentran sobre-expresados podrían ser herramientas útiles.

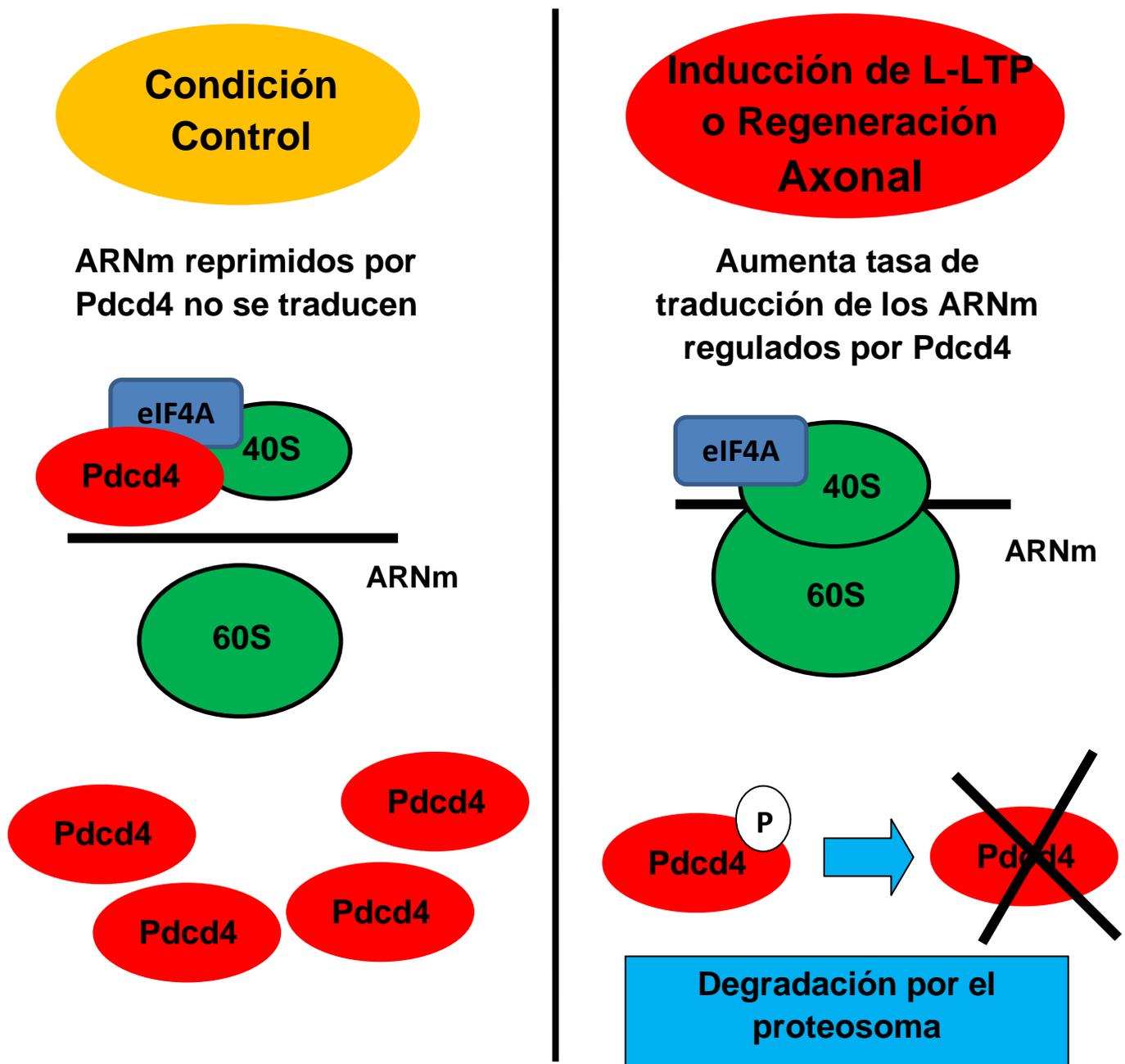


Figura 38. Esquema resumiendo la hipótesis de cómo sería la regulación de Pdc4 en L-LTP y regeneración axonal. En la condición control (esquema de la izquierda) los ARNm que posiblemente están regulados por Pdc4 presentarían una baja tasa de traducción debido a que Pdc4 se expresa en altos niveles. En la condición experimental donde se induce L-LTP en hipocampo o se dan procesos de regeneración axonal en nervio ciático (esquema de la derecha), aumentaría la tasa de traducción de estos ARNm regulados por Pdc4 ya que se daría la activación de la vía mTOR y con ello la fosforilación de Pdc4 marcándolo para su ubiquitinación por β -TrCP1 siendo posteriormente degradado por el complejo del proteosoma, disminuyendo los niveles de expresión de Pdc4.

9. Bibliografía

Abeliovich A, Chen C, Goda Y, Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S (1993) Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice. *Cell* 75(7):1253–1262. doi:10.1016/0092-8674(93)90613-U

Abraham, W. C. (2003). How long will long-term potentiation last? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 358(1432), 735–44. doi:10.1098/rstb.2002.1222

Ahmed, T., & Frey, J. U. (2005). Plasticity-specific phosphorylation of CaMKII, MAP-kinases and CREB during late-LTP in rat hippocampal slices in vitro. *Neuropharmacology*, 49(4), 477–492. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.04.018

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et al. (2004). *Molecular Biology of the Cell*. (S. Cwi, L. Facorro, J. L. Ferrán, J. Oxemberg, U. Patrone, K. Tzal, & M. Vaccarezza, Eds.) (Second Edi., pp. 248–258). New York: Garland Science.

Andersen & Lømo (1966). "Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation". 68 (Suppl 277): 128 *Acta Physiologica Scandinavica*.

Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). *The Hippocampus Book*. (P. Andresen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, & J. O'Keefe, Eds.) (Oxford Uni., p. 832). Oxford, New York.

Antion, M. D., Merhav, M., Hoeffler, C. a, Reis, G., Kozma, S. C., Thomas, G., Schuman, E. M., et al. (2008). Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 15(1), 29-38. doi:10.1101/lm.661908

Aravind, L., & Koonin, E. V. (2000). Eukaryote-specific domains in translation initiation factors: implications for translation regulation and evolution of the translation system. *Genome research*, 10(8), 1172-84.

Azzoni, L., Zatsepina, O., Abebe, B., Bennett, I. M., Kanakaraj, P., & Perussia, B. (1998). Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(7), 3493-500.

Bacallao, R., Sohrab, S., & Phillips, C. (2006). *Guiding Principles of Specimen Preservation for Confocal Fluorescence Microscopy*. In J. B. Pawley (Ed.), *Handbook of Biological Confocal Microscopy (Third Edit., pp. 368–380)*. New York: Springer Science Bussiness Media.

Banko, J. L., Poulin, F., Hou, L., DeMaria, C. T., Sonenberg, N., & Klann, E. (2005). The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(42), 9581-90. doi:10.1523/JNEUROSCI.2423-05.2005

Berod, a., Hartman, B. K., & Pujol, J. F. (1981). Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29(7), 844–850. doi:10.1177/29.7.6167611

Bhatti, I., Lee, A., James, V., Hall, R. I., Lund, J. N., Tufarelli, C., Lobo, D. N., et al. (2011). Knockdown of microRNA-21 inhibits proliferation and increases cell death by targeting programmed cell death 4 (PDCD4) in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 15(1), 199–208. doi:10.1007/s11605-010-1381-x

Bidinosti, M., Ran, I., Sanchez-carbente, M. R., Martineau, Y., Gingras, C., Gkogkas, C., Raught, B., et al. (2010). Postnatal deamidation of 4E-BP2 in brain enhances its association with raptor and alters kinetics of excitatory synaptic transmission. *Molecular Cell*, 37(6), 797-808. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.022.Postnatal

Blees, J. S., Bokesch, H. R., Rübsamen, D., Schulz, K., Milke, L., Bajer, M. M., Gustafson, K. R., et al. (2012). Erioflorin Stabilizes the Tumor Suppressor Pcd4 by Inhibiting Its Interaction with the E3-ligase β -TrCP1. *PLoS one*, 7(10), e46567. doi:10.1371/journal.pone.0046567

Bliss, TVP, & Lomo, T. (1973). Long-Lasting Potenciation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Anaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path *Journal of Physiol.*, 232, 331-356.

Böhm, Maret, Sawicka, K., Siebrasse, J. P., Brehmer-Fastnacht, A., Peters, R., & Klempnauer, K.-H. (2003). The transformation suppressor protein Pcd4 shuttles between nucleus and cytoplasm and binds RNA. *Oncogene*, 22(31), 4905-10. doi:10.1038/sj.onc.1206710

Bortolotto ZA, Collingridge GL (2000) A role for protein kinase C in a form of metaplasticity that regulates the induction of long- term potentiation at CA1 synapses of the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 12(11):4055–4062. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00291.x

Calliari, a, Sotelo-Silveira, J., Costa, M. C., Nogueira, J., Cameron, L. C., Kun, a, Benech, J., et al. (2002). Myosin Va is locally synthesized following nerve injury. *Cell motility and the cytoskeleton*, 51(4), 169–76. doi:10.1002/cm.10017

Cammalleri, M., Lütjens, R., Berton, F., King, A. R., Simpson, C., Francesconi, W., & Sanna, P. P. (2003). Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14368–73. doi:10.1073/pnas.2336098100

Cmarik, J L, Min, H., Hegamyer, G., Zhan, S., Kulesz-Martin, M., Yoshinaga, H., Matsushashi, S., et al. (1999). Differentially expressed protein Pcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 14037-42.

Coan EJ, Saywood W, Collingridge GL (1987) Mk-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 80(1):111–114. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90505-2](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(87)90505-2)

Collins, C. A., & Guthrie, C. (2000). The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat Struct Biol.*, 10(7), 850–854.

Cooke, S. F., & Bliss, T. V. P. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain a journal of neurology*, 129(Pt 7), 1659-73. doi:10.1093/brain/awl082

Costa-Mattioli, M., Sossin, W. S., Klann, E., & Sonenberg, N. (2009). Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*, 61(1), 10-26. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.055

Davies J, Francis AA, Jones AW, Watkins JC (1981) 2-Amino-5-phosphonovalerate (2AP5), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neurosci Lett* 21(1):77–81. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(81\)90061-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(81)90061-6)

Davies SN, Lester RA, Reymann KG, Collingridge GL (1989) Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Letters to Nature* 338:500–503. doi:10.1038/338500a0

Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G., & Hata, A. (2009). NIH Public Access. *Cardiology*, 454(7200), 56-61. doi:10.1038/nature07086.SMAD

De Gregorio, E., Preiss, T., & Hentze, M. W. (1999). Translation driven by an eIF4G core domain in vivo. *The EMBO journal*, 18(17), 4865-74. doi:10.1093/emboj/18.17.4865

Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW (1998) Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392:198–202.

Dever, T. E., Feng, L., Wek, R. C., Cigan, A. M., Donahue, T. F., & Hinnebusch, A. G. (1992). Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell*, 68(3), 585–596. doi:10.1016/0092-8674(92)90193-G

Dingledine, B. Y. R., Hynes, M. A., & King, G. L. (1986). Involvement of n-methyl-D-aspartate receptors in epileptiform bursting in the rat hippocampal slice. *J. Physiol*, 380, 175–189.

Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N. H., Sherman, N. E., & Pagano, M. (2006). S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5798), 467-71. doi:10.1126/science.1130276

Eaton SA, Jane DE, Jones PL, Porter RH, Pook PC, Sunter DC, Udvarhelyi PM, Roberts PJ, Salt TE, Watkins JC (1993) Competitive antagonism at metabotropic glutamate receptors by (S)-4-carboxyphenylglycine and (RS)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine. *Eur J Pharmacol* 244(2):195–197. [http://dx.doi.org/10.1016/0922-4106\(93\)90028-8](http://dx.doi.org/10.1016/0922-4106(93)90028-8)

Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 351–379. doi:10.1146/annurev-biochem-060308-103103

Fedulov, V., Rex, C. S., Simmons, D. a, Palmer, L., Gall, C. M., & Lynch, G. (2007). Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(30), 8031–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.2003-07.2007

Frankel, L. B., Christoffersen, N. R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A., & Lund, A. H. (2008). Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 283(2), 1026–33. doi:10.1074/jbc.M707224200

- Frey U, Morris RGM (1997) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385(6616):533–536. doi:10.1038/385533a0
- Gebauer, F., & Hentze, M. W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 827–835. Retrieved from doi:10.1038/nrm1488
- Gerits, N., Kostenko, S., Shiryayev, A., Johannessen, M., & Moens, U. (2008). Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cellular signalling*, 20(9), 1592–607. doi:10.1016/j.cellsig.2008.02.022
- Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ (1998) Autophosphorylation at Thr(286) of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279(5352):870–873. DOI:10.1126/science.279.5352.870
- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913–963.
- Goke, A., Goke, R., Knolle, A., Trusheim, H., Schmidt, H., Wilmen, A., Carmody, R., et al. (2002). DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochemical and biophysical research communications*, 297(1), 78-82.
- Gumy, L. F., Tan, C. L., & Fawcett, J. W. (2010). The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Experimental neurology*, 223(1), 28–37. doi:10.1016/j.expneurol.2009.06.004
- Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H (2001) Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 4:261–267.
- Harris EW, Ganong AH, Cotman CW (1984) Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res* 323(1):132–137. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90275-0](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(84)90275-0)
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*, 18(16), 1926-45. doi:10.1101/gad.1212704
- Hebb, D. O. (1950). *Organization of behavior*. New York: Wiley. *Journal of Clinical Psychology*, 6(3), 307. doi:10.1002/1097-4679(195007)6:3<307::AID-JCLP2270060338>3.0.CO;2-K
- Hinnebusch, A. G., Dever, T. E., and Asano, K. (2007). Mechanism of translation initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In “*Translational Control in Biology and Medicine*.” (M. B. Mathews, N. Sonenberg, and J. W. B. Hershey, Eds.), pp. 225–268. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Holcik, M., & Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 318–327. Retrieved from doi:10.1038/nrm1618
- Hüber KM, Kayser MS, Bear MF (2000) Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* 288(5469):1254–1257. DOI: 10.1126/science.288.5469.1254

Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K., & Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 16961–6. doi:10.1073/pnas.0506482102

Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S., & Weissman, J. S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5924), 218-23. doi:10.1126/science.1168978

Jackson, R. J., & Standart, N. (2007). How Do MicroRNAs Regulate Gene Expression? *Sci. STKE*, (367). doi: 10.1126/stke.3672007re1

Jansen, A., Camalier, C., Stark, C., & Colburn, N. (2004). Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity. *Mol Cancer Ther.*, 3(2), 103–110.

Jansen, A. P., Camalier, C. E., & Colburn, N. H. (2005). Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis. *Cancer research*, 65(14), 6034–41. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2119

Jefferies, H. B., Reinhard, C., Kozma, S. C., & Thomas, G. (1994). Rapamycin selectively represses translation of the “polypyrimidine tract” mRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4441–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=43801&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Kandel, ER, JH Schwartz and TM Jessell (2000) *Principles of Neural Science*. New York: McGraw-Hill

Kang H, Schuman EM (1996) A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273 (5280):1402–1406. DOI:10.1126/science.273.5280.1402

Kang, M.-J., Ahn, H.-S., Lee, J.-Y., Matsushashi, S., & Park, W.-Y. (2002). Up-regulation of PDCD4 in senescent human diploid fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(1), 617-21. doi:10.1016/S0006-291X(02)00264-4

Kelly A, Lynch MA (2000) Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology* 39:643–651.

Klann, E., & Richter, J. D. (2007). *Translational Control of Synaptic Plasticity and Learning and Memory. Translational Control in Biology and Medicine* (pp. 489–510). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kojima N, Wang J, Mansuy IM, Grant SG, Mayford M, Kandel ER (1997) Rescuing impairment of long-term potentiation in fyn- deficient mice by introducing Fyn transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4761–4765.

Lackner, D. H., Beilharz, Traude H. Marguerat, S., Mata, J., Stephen, W., Schubert, F., Preiss, T., & Bähler, J. (2007). A Network of Multiple Regulatory Layers Shapes Gene Expression in Fission Yeast. *Mol Cell.*, 26(1), 145–155. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.002

Lackner, D. H., & Bähler, J. (2008). Translational control of gene expression from transcripts to transcriptomes. *International review of cell and molecular biology*, 271(08), 199–251. doi:10.1016/S1937-6448(08)01205-7

Lal, A., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Kawai, T., Galban, S., Yang, X., Brewer, G., et al. (2006). Posttranscriptional derepression of GADD45alpha by genotoxic stress. *Molecular cell*, 22(1), 117–28. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.016

Lankat-Buttgereit, B., & Göke, R. (2003). Programmed cell death protein 4 (pdc4): A novel target for antineoplastic therapy? *Biology of the Cell*, 95(8), 515-519. doi:10.1016/j.biocel.2003.09.003

Lankat-Buttgereit, B., & Göke, R. (2009). The tumour suppressor Pdc4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 101(6), 309–17. doi:10.1042/BC20080191

LaRonde-LeBlanc, N., Santhanam, A. N., Baker, A. R., Wlodawer, A., & Colburn, N. H. (2007). Structural basis for inhibition of translation by the tumor suppressor Pdc4. *Molecular and cellular biology*, 27(1), 147-56. doi:10.1128/MCB.00867-06

Lee, H. K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M. F., & Huganir, R. L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*, 405(6789), 955-9. doi:10.1038/35016089

Lee, K.-M., Yu, C. W.-H., Chan, D. S.-B., Chiu, T. Y.-H., Zhu, G., Sze, K.-H., Shaw, P.-C., et al. (2010). Solution structure of the dimerization domain of ribosomal protein P2 provides insights for the structural organization of eukaryotic stalk. *Journal of Molecular Biology*, 38(15 *Journal of Molecular Biology*), 5206–16. doi:10.1093/nar/gkq231

Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168-76. doi:10.1038/nature05453

Lenz, G., & Avruch, J. (2005). Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons. *The Journal of biological chemistry*, 280(46), 38121–4. doi:10.1074/jbc.C500363200

Levy WB, Steward O (1979) Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. *Brain Res* 175:233–245. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)91003-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(79)91003-5)

Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(February), 169-182. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrn3192

Liwak, U., Thakor, N., Jordan, L. E., Roy, R., Lewis, S. M., Pardo, O. E., Seckl, M., et al. (2012). Tumor suppressor PDCD4 represses internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic proteins and is regulated by S6 kinase 2. *Molecular and cellular biology*, 32(10), 1818–29. doi:10.1128/MCB.06317-11

Lømo, T. (2003). The discovery of long-term potentiation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 358(1432), 617–20. doi:10.1098/rstb.2002.1226 DOI 10.1098/rstb.2002.1226

Lovinger, D.M., Wong, K.L., Murakami, K., Routtenberg, A. (1987) Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 436:177–183.

Lynch, G. S., Dunwiddie, T., & Gribkoff, V. (1977). Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Letters to Nature*, 266, 737–739. doi:10.1038/266737a0

Lynch, M. A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*, 84, 87–136.

Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245(4920):862–866. doi:10.1126/science.2549638

Marcotrigiano, J., Lomakin, I. B., Sonenberg, N., Pestova, T. V., Hellen, C. U. T., & Burley, S. K. (2001). A Conserved HEAT Domain within eIF4G Directs Assembly of the Translation Initiation Machinery. *Molecular Cell*, 7(January 2001), 193-203.

Mattson, S. N., Dean C. Delis, E. P. R., & Kenneth, Catherine Stern Jones, L. (1996). Verbal Learning and Memory in Children with Fetal Alcohol Syndrome. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20(5), 810–816. doi:DOI: 10.1111/j.1530-0277.1996.tb05256.x

McCluskey, A. J., Poon, G. M. K., Bolewska-Pedyczak, E., Srikumar, T., Jeram, S. M., Raught, B., & Gariépy, J. (2008). The Catalytic Subunit of Shiga-like Toxin 1 Interacts with Ribosomal Stalk Proteins and is Inhibited by Their Conserved C-Terminal Domain. *Journal of Molecular Biology*, 378(2), 375–386. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283608001848>

McNaughton BL, Douglas RM, Goddard GV (1978). Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents. *Brain Res* 157:277–293. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90030-6](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(78)90030-6)

McNaughton, B. L., & Barnes, C. A. (1990). from cooperative synaptic enhancement to associative memory: bridging the abyss. *Seminars in The Neurosciences*, 403-416.

Miller SG, Kennedy MB (1986) Regulation of brain type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca²⁺-triggered molecular switch. *Cell* 44(6):861–870. doi:10.1016/0092-8674(86)90008-5

Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Pestova, V., Sonenberg, N., & Pestova, T. V. (2000). Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) Binding Site and the Middle One-Third of eIF4GI Constitute the Core Domain for Cap-Dependent Translation , and the C-Terminal One-Third Functions as a Modulatory Region Eukaryotic Translation Initiation. *Society*, 20(2), 468-477. doi:10.1128/MCB.20.2.468-477.2000.Updated

Morley, Simon J and Coldwell, Mark J (2007). *Matters of Life and Death: Translation Initiation during Apoptosis*. In: *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 433-458. ISBN 9780879697679

Narasimhan, M., Rathinam, M., Riar, A., Patel, D., Mummidi, S., Yang, H.-S., Colburn, N. H., et al. (2012). Programmed Cell Death 4 (PDCD4): A Novel Player in Ethanol-Mediated Suppression of Protein Translation in Primary Cortical Neurons and Developing Cerebral Cortex. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 4, 1–14. doi:10.1111/j.1530-0277.2012.01850.x

O'Dell TJ, Kandel ER, Grant SG (1991) Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature* 353:558–560. doi:10.1038/353558a0

Onishi, Yoshiaki, & Kizaki, H. (1996). Molecular Cloning of the Genes Suppressed in RVC Lymphoma Cells by Topoisomerase Inhibitors structure , DNA replication , transcription and mitosis in eukaryotes . Topoisomerases have been divided into at least two classes based on their mechanism of acti. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 13, 7-13.

Onishi, Y, Hashimoto, S., & Kizaki, H. (1998). Cloning of the TIS gene suppressed by topoisomerase inhibitors. *Gene*, 215(2), 453-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714845>

Ostroff, L. E., Fiala, J. C., Allwardt, B., & Harris, K. M. (2002). Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron*, 35(3), 535-45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165474>

Palamarchuk, A., Efanov, A., Maximov, V., Aqeilan, R. I., Croce, C. M., & Pekarsky, Y. (2005). Akt phosphorylates and regulates Pdc4 tumor suppressor protein. *Cancer research*, 65(24), 11282-6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3469

Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P. D., Wang, C., & Cai, B. (2009). Promoting Axon Regeneration in the Adult CNS by Modulation of the PTEN/mTOR Pathway. *Science*, 322(5903), 963–966. doi:10.1126/science.1161566.Promoting

Parsyan, A., Svitkin, Y., Shahbazian, D., Gkogkas, C., Lasko, P., Merrick, W. C., & Sonenberg, N. (2011). mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(4), 235-45. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrm3083

Pause, A., Belsham, G. J., Claude, G. A.-, Donzé, O., Lin, T.-A., Lawrence Jr, J. C., & Sonenberg, N. (1994). Insulin- dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'cap function. *Nature*, 371, 762-767.

Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*. (G. Paxinos & C. Watson, Eds.)Technology (5th ed., p. 367). Elsevier Academic Press.

Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334, 320–325. Retrieved from doi:10.1038/334320a0

Periasamy, A., & Day, R. N. (Eds.). (2005). *Molecular Imaging (2005 First., pp. 21–56)*. New York: Oxford University Press.

Pestova, T. V., Lomakin, I. B., Lee, J. H., Choi, S. K., Dever, T. E., & Hellen, C. U. T. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature*, 403, 332–335. doi:doi:10.1038/35002118

Pfeiffer, B. E., & Huber, K. M. (2006). Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(27), 7147–50. doi:10.1523/JNEUROSCI.1797-06.2006

Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573–1576.

Ponting, C. P. (2000). Novel eIF4G Domain homologues linking mRNA translation with nonsense-mediates mRNA decay. *Science*, 0004(September), 423-426.

Proudfoot, N. J., Furger, A., & Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, 108(4), 501–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909521>

Reymann, K. G., & Frey, J. U. (2007). The late maintenance of hippocampal LTP: Requirements, phases, “synaptic tagging”, “late-associativity” and implications. *Neuropharmacology*, 52(1), 24–40. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.026>

Richter, J. D., & Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 433, 477–480. Retrieved from doi:10.1038/nature03205

Rosenblum K, Dudai Y, Richter-Levin G (1996) Long-term potentiation increases tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in rat dentate gyrus in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10457–10460.

Rosene, D. L., & Mesulam, M. M. (1978). Fixation variables in horseradish peroxidase neurohistochemistry. I. The effect of fixation time and perfusion procedures upon enzyme activity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 26(1), 28–39. doi:10.1177/26.1.413864

Rosene, D. L., Roy, N. J., & Davis, B. J. (1986). A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 34(10), 1301–1315. doi:10.1177/34.10.3745909

Sanderson, J. L., & Dell’Acqua, and M. L. (2012). AKAP Signaling Complexes in Regulation of Excitatory Synaptic Plasticity. *Neuroscientis*, 17(3), 321–336. doi:10.1177/1073858410384740.AKAP

Shibahara, K, Asano, M., Ishida, Y., Aoki, T., Koike, T., & Honjo, T. (1995). Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death. *Gene*, 166(2), 297-301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8543179>

Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257(5067):201–206. doi:10.1126/science.1378648

Smith, W. B., Starck, S. R., Roberts, R. W., & Schuman, E. M. (2005). Dopaminergic stimulation of local protein synthesis enhances surface expression of GluR1 and synaptic transmission in hippocampal neurons. *Neuron*, 45(5), 765-79. doi:10.1016/j.neuron.2005.01.015

Sotelo Silveira, J. R., Sotelo, J. R., Chalar, C., Sanguinetti, C., Benech, J. C., Kun, A., & Calliari, A. (2000). Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve. *Journal of Neuroscience Research*, 62(1), 65–74.

Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Kun, A., Koenig, E., & Sotelo, J. R. (2006). RNA trafficking in axons. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7(5), 508–15. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00405.x

Sotelo-Silveira, J., Crispino, M., Puppò, A., Sotelo, J. R., & Koenig, E. (2008). 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. *Journal of neurochemistry*, 104(2), 545–57. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04999.x

Sotelo Silveira, J. R., & Sotelo Sosa, J. R. (2011). Transporte de ARN en Neuronas: el transcriptoma axonal, origen y función. *Mensaje Bioquímico*, 35, 115–130. Retrieved from http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq11v35p115-130_Sotelo-Silveira.pdf

Squire, L., Darwin, B., Floyd, B., Du Lac, S., Ghosh, A., & Spitzer, N. (2008). *Fundamental Neuroscience (Third Edit., p. 1277)*. London, UK: Academic Press, Elsevier.

Steward O, Schuman E (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 24:299–235. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.299

Stewart, M. (2007). Ratcheting mRNA out of the nucleus. *Molecular cell*, 25(3), 327–30. doi:10.1016/j.molcel.2007.01.016

Stevens, C. F., Tonegawa, S., & Wang, Y. (1994). The role of calcium–calmodulin kinase II in three forms of synaptic plasticity. *Current Biology, Cell Press*, 4(8), 687–693. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00153-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00153-6)

Stoica, L., Zhu, P. J., Huang, W., Zhou, H., Kozma, S. C., & Costa-Mattioli, M. (2011). Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), 3791-6. doi:10.1073/pnas.1014715108

Strickland, I. T., Richards, L., Holmes, F. E., Wynick, D., Uney, J. B., & Wong, L.-F. (2011). Axotomy-induced miR-21 promotes axon growth in adult dorsal root ganglion neurons. *PloS one*, 6(8), e23423. doi:10.1371/journal.pone.0023423

Suter, U., Welcher, A., & Snipes, G. (1993). Progress in the molecular understanding of hereditary peripheral neuropathies reveals new insights into the biology of the peripheral nervous system. *Trends Neurosci.*, 2(16), 50–56.

Suzuki, C., Garces, R. G., Edmonds, K. a, Hiller, S., Hyberts, S. G., Marintchev, A., & Wagner, G. (2008). PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3274-9. doi:10.1073/pnas.0712235105

Tanaka, J.-I., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2008). Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5870), 1683-7. doi:10.1126/science.1152864

Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the

hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 467–72. doi:10.1073/pnas.012605299

Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., Anderson, D. J., Mayford, M., et al. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*, 87(7), 1317–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9885822> doi:10.1016/S0092-8674(00)81826-7

Tsokas, P., Grace, E. a, Chan, P., Ma, T., Sealfon, S. C., Iyengar, R., Landau, E. M., et al. (2005). Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(24), 5833–43. doi:10.1523/JNEUROSCI.0599-05.2005

Verma, P., Chierzi, S., Codd, A. M., Campbell, D. S., Meyer, R. L., Holt, C. E., & Fawcett, J. W. (2005). Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(2), 331–42. doi:10.1523/JNEUROSCI.3073-04.2005

Vickers, C. a, Dickson, K. S., & Wyllie, D. J. a. (2005). Induction and maintenance of late-phase long-term potentiation in isolated dendrites of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *The Journal of physiology*, 568(Pt 3), 803–13. doi:10.1113/jphysiol.2005.092924

Volk, L., Bachman, J., Johnson, R., Yu, Y., & Huganir, R. L. (2013). PKM- ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature*, Epub ahead of print. doi:doi:10.1038/nature11802.

Wang, J. T., Medress, Z. a, & Barres, B. a. (2012). Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *The Journal of cell biology*, 196(1), 7–18. doi:10.1083/jcb.201108111

Waters, L. C., Veverka, V., Böhm, M., Schmedt, T., Choong, P. T., Muskett, F. W., Klempnauer, K.-H., et al. (2007). Structure of the C-terminal MA-3 domain of the tumour suppressor protein Pcd4 and characterization of its interaction with eIF4A. *Oncogene*, 26(34), 4941-50. doi:10.1038/sj.onc.1210305

Waters, L. C., Strong, S. L., Ferlemann, E., Oka, O., Muskett, F. W., Veverka, V., Banerjee, S., et al. (2011). Structure of the tandem MA-3 region of Pcd4 protein and characterization of its interactions with eIF4A and eIF4G: molecular mechanisms of a tumor suppressor. *The Journal of biological chemistry*, 286(19), 17270–80. doi:10.1074/jbc.M110.166157

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R., & Inglis, C. (2007). *Molecular Biology of the Gene (Sixth Edit.)*. Harvard, England: Benjamin Cummings.

Wedeken, L., Ohnheiser, J., Hirschi, B., Wethkamp, N., & Klempnauer, K.-H. (2010). Association of Tumor Suppressor Protein Pcd4 With Ribosomes Is Mediated by Protein-Protein and Protein-RNA Interactions. *Genes & cancer*, 1(3), 293–301. doi:10.1177/1947601910364227

Wigström H, Gustafsson B (1983) Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition. *Letters to Nature* 301(17):603–604. doi:10.1038/301603a0

Wood, R., Baxter, P., & Belpaeme, T. (2011). A review of long-term memory in natural and synthetic systems. *Adaptive Behavior*, 20(2), 81–103. doi:10.1177/1059712311421219

Yang, H.-sheng, Jansen, A. P., Nair, R., Shibahara, K., Verma, A. K., Cmarik, J. L., & Colburn, N. H. (2001). A novel transformation suppressor, Pdc4, inhibits AP-1 transactivation but not NF- κ B or ODC transactivation. *Oncogene*, 0-7.

Yang, H.-sheng, Jansen, A. P., Komar, A. A., Zheng, X., Merrick, W. C., Costes, S., Lockett, S. J., et al. (2003). The Transformation Suppressor Pdc4 Is a Novel Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A Binding Protein That Inhibits Translation. *Society*, 23(1), 26-37. doi:10.1128/MCB.23.1.26

Yang, H.-sheng, Cho, M.-haing, Zakowicz, H., Hegamyer, G., Sonenberg, N., & Colburn, N. H. (2004). A Novel Function of the MA-3 Domains in Transformation and Translation Suppressor Pdc4 Is Essential for Its Binding to Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A. *Society*, 24(9), 3894-3906. doi:10.1128/MCB.24.9.3894

Yiu, G., & He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci*, 7(8), 617–627. doi:10.1038/nrn1956.Glial

Zakowicz, H., Yang, H.-sheng, Stark, C., Wlodawer, A., Laronde-leblanc, N., & Colburn, N. H. (2005). Mutational analysis of the DEAD-box RNA helicase eIF4All characterizes its interaction with transformation suppressor Pdc4 and eIF4GI. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 11, 261-274. doi:10.1261/rna.7191905.UTR

Zheng, J. Q., Kelly, T. K., Chang, B., Ryazantsev, S., Rajasekaran, a K., Martin, K. C., & Twiss, J. L. (2001). A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(23), 9291–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717363>

10. Anexo 1. Principios básicos de las técnicas realizadas

10.1. Fijación

Una adecuada fijación es un paso importante para el análisis de las estructuras celulares y una buena ubicación de los antígenos en un protocolo de inmunohistoquímica (Berod *et al.*, 1981). Se consideran 4 variables principales

- a) preservar la morfología nativa del tejido
- b) inmovilización del antígeno
- c) preservación de la inmunoreactividad del antígeno
- d) adecuada penetración de los reactivos de la inmunohistoquímica.

El óptimo para las dos primeras condiciones se alcanzaría con una fijación completa, mientras que para la tercer y cuarta condición sería con el mínimo de fijación posible. Se busca un compromiso entre estas 4 variables. El fijador ideal debería penetrar y actuar rápido en los tejidos y preservar la estructura celular lo más parecida posible a la nativa (Bacallao *et al.*, 2006).

Se distinguen 3 protocolos principales de fijación para muestras biológicas:

- a) fijadores químicos por coagulación o entrecruzamiento (***crosslinking***)
- b) sustitución en frío
- c) sustitución por microondas.

Los más comunes son los fijadores químicos (Bacallao *et al.*, 2006). En el caso de coagulantes como etanol y metanol, producen una rápida deshidratación del tejido y las proteínas son coaguladas o extraídas. Son populares por ser rápidos y fácilmente reproducibles, pero su gran problema es que generan una contracción del tejido que puede ser de hasta el 50% del tamaño original de las células, por lo cual no son buenos si se busca estudiar la muestra mediante microscopía confocal.

El método de fijación por entrecruzamiento o ***crosslinking***, es uno de los métodos más utilizado en estudios por inmunofluorescencia. Se utilizan reactivos que en general presentan grupos aldehído, como el glutaraldehído o **paraformaldehído (PFA)**, cada uno con sus ventajas y desventajas. El paraformaldehído penetra en las células de los tejidos, formando entrecruzamientos covalentes entre los componentes intracelulares, además de aumentar la

permeabilidad de las células, favoreciendo la penetración de los anticuerpos. Los enlaces son intra e inter moleculares (Bacallao *et al.*, 2006).

10.1.1. Características del Paraformaldehido

Es el más usado en la mayoría de las muestras biológicas. Presenta un único grupo aldehído por molécula. A temperatura ambiente es un gas y sus moléculas se disuelven fácilmente en solventes polares. La hidrólisis de los polímeros de PFA es catalizada por los iones hidróxido presentes en una solución levemente salina, por ejemplo a pH fisiológico. Es preciso el calor para disolverlo completamente.

Su pequeño tamaño molecular les permite penetrar a los tejidos fácilmente, siendo muy útiles para fijar tejidos finos. Se prepara poco tiempo antes de su uso. Su tasa de reversión es del orden de las semanas, por lo cual una vez que el tejido fue fijado, es recomendable en ese tiempo realizar la tinción. Su habilidad para entrecruzar grupos amino es dependiente del pH, ocurriendo 100 veces más rápido cuando los grupos amino se encuentran protonados. A pHs más básicos, se alcanzará un entrecruzamiento mayor, pero esto puede influir negativamente en la penetración del fijador al tejido disminuyendo su permeabilidad e incluso no permitiendo una correcta penetración del anticuerpo en pasos posteriores. Este problema puede solucionarse encontrando el pH adecuado de trabajo o en otros casos, realizando una doble fijación con PFA a pH= 6.5 y luego una nueva fijación con pH más básico (Berod *et al.*, 1981).

El PFA no es tan efectivo en producir entrecruzamiento entre las moléculas como el glutaraldehido y por esta razón es que este último se utiliza para microscopía electrónica y muy pocas veces se usa el paraformaldehido en estas técnicas.

10.2. Crioprotección

Una vez fijado un tejido, existen distintos métodos para realizar los cortes de los mismos. Una posibilidad es realizar cortes en frío o criosecciones. Sin embargo, si los tejidos no son adecuadamente tratados, la morfología de los mismos se pierde. Esto se explica por la presencia de agua en el interior de las células que al congelarse forma cristales destruyendo la morfología nativa del tejido. Existen varios métodos de crioprotección que buscan solucionar esos problemas. Una posibilidad es la infiltración del tejido utilizando Sacarosa al 30% en buffer a pH fisiológico (Rosene & Mesulam, 1978). Es considerada una de las metodologías que con un buen protocolo de fijación, puede aportar buenos resultados, incluso en tejidos complejos como lo es el sistema nervioso (Rosene *et al.*, 1986). Se busca entonces la deshidratación del tejido, evitando la formación de cristales a causa del agua, lo cual lleva a pérdidas en la constitución nativa del tejido.

10.3. Inmunohistoquímica Indirecta

10.3.1. Fluorescencia

La inmunohistoquímica involucra utilizar anticuerpos específicos que reconozcan una molécula de interés para luego evidenciar la presencia del anticuerpo por algún método de revelado. En el caso de las indirectas, el anticuerpo específico o primario, es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo, que reconoce específicamente al primero y con alta especificidad (Periasamy & Day, 2005).

Esta técnica se basa en la espectroscopia de fluorescencia, donde los conceptos de luminiscencia y fotoluminiscencia son importantes. Luminiscencia es la emisión de luz de una sustancia a partir de estados electrónicos excitados. Fotoluminiscencia es la emisión de luz desde un estado electrónico excitado que fue estimulado por la absorción de luz. Este último caso es el que interesa en estos procesos. A su vez, la fotoluminiscencia puede dividirse en 2 categorías: fluorescencia y fosforescencia. La fluorescencia es la emisión de luz desde un estado singulete excitado, en lo que se conoce como una transición permitida dentro de los orbitales moleculares, siendo procesos muy rápidos, del orden de los 10^{-18} s. En contraste, la fosforescencia se da desde el estado de triplete excitado e involucra una transición prohibida resultando en procesos mucho más lentos, del orden de los 10^0 y 10^{-3} s. La excitación de las moléculas por la luz ocurre por la interacción entre dipolos moleculares transitorios y el campo eléctrico de la luz (Periasamy & Day, 2005).

La fluorescencia es una forma de emisión de luz que se caracteriza por el **espectro de emisión, rendimiento cuántico, vida media de fluorescencia** y la **polarización**.

10.3.1.1. Espectro de emisión

El diagrama de *Jablonski* (Figura 39), permite analizar un proceso importante: la energía del fotón emitido es menor que la del fotón absorbido. Por ende la fluorescencia ocurre a menor energía y mayor longitud de onda que el proceso de absorción. Este fenómeno se le conoce como **Corrimiento de Stokes** y se explica por la rápida transición hacia el estado vibracional energéticamente más bajo de los estados excitados (S_1 o primer singulete) y el decaimiento del fluoróforo a niveles vibracionales superiores (S_0). El exceso de energía es convertido en calor. Debido al rápido relajamiento resultado de la disipación de energía por procesos internos como son los choques entre las moléculas del fluoróforo y con las del solvente, etc) siempre se emite desde el estado menor de excitación. Por ende la forma del espectro de emisión es usualmente independiente de la longitud de onda de excitación (Periasamy & Day, 2005).

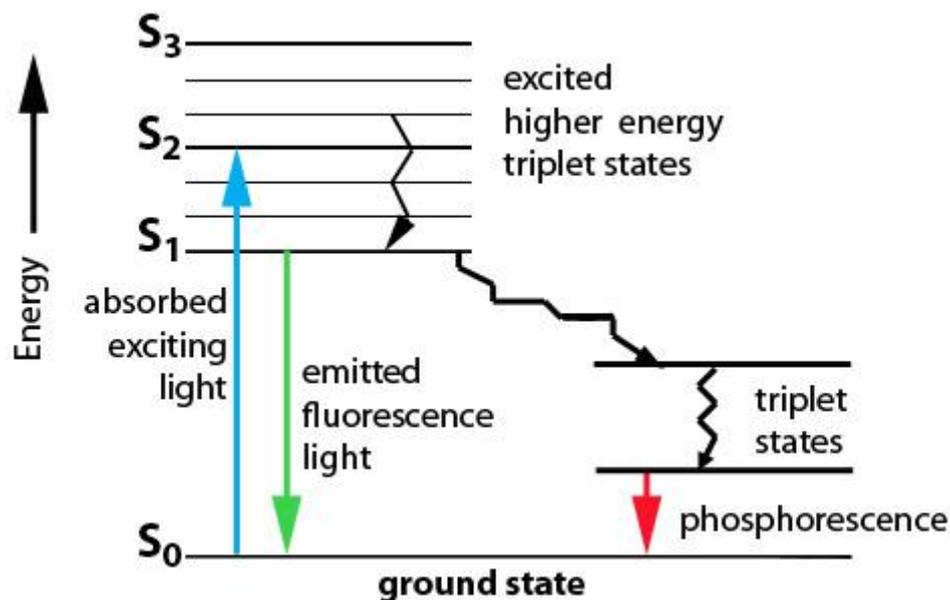


Figura 39. Diagrama de Jablonski. Muestra los principios generales sobre los estados excitados y en que condiciones se emite fluorescencia.

[Adaptado del libro "Molecular Imaging", Periasamy & Day, 2005].

10.3.1.2. Rendimiento cuántico

Es el número de fotones emitidos relativo al número de fotones absorbidos. Este fenómeno está dominado por las constantes de velocidad (tasa de emisión del fluoróforo) y la constante de decaimiento no radiativo (k_{nr}) que despueblan el estado excitado. La fracción de los fluoróforos que decaen a través de una tasa de emisión τ , contribuye directamente al rendimiento cuántico (Periasamy & Day, 2005).

10.3.1.3. Quenching

Muchos procesos pueden disminuir la intensidad de fluorescencia. Esto se conoce bajo el nombre de **quenching**, siendo las moléculas que producen el efecto los "**quenchers**". Existen diferentes métodos por los cuales puede ocurrir este proceso, siendo los más comunes el *quenching* colisional, el *quenching* estático y la transferencia electrónica. El quenching colisional es la desactivación de fluoróforos excitados por el contacto con otras moléculas en solución que aumentan la constante de decaimiento no radiativo, con lo cual el fluoróforo retorna a su estado basal perdiendo energía mediante coaliciones con el *quencher*, sin sufrir alteraciones estructurales y emitiendo menos fluorescencia. *Quenchers* comunes son la acrilamida y el oxígeno (Periasamy & Day, 2005).

10.3.1.4. Vida media de fluorescencia

La vida media del estado excitado y por tanto el tiempo de la fluorescencia, es el promedio del tiempo que la molécula pasa en el estado excitado antes de decaer al estado basal. Luego de la excitación, comienzan a actuar los procesos de desactivación. Para la mayoría de los fluoróforos, la vida media está en el orden de los 1 a 10 ns (Periasamy & Day, 2005).

10.3.2. Anticuerpos utilizados

En este trabajo se utilizó en todos los casos un **anticuerpo anti-Pdcd4** y según las regiones celulares a identificar, se seleccionaron los otros anticuerpos o sondas.

10.3.2.1. Anticuerpo anti- Neurofilamento 68

Permite distinguir la morfología neuronal, expresándose en el interior de los axones y dendritas. Corresponde a la subunidad liviana de una de las formas de filamentos intermedios (o de 10 nm) expresados únicamente en neuronas. Son fundamentales en el crecimiento axonal y son determinantes para definir el diámetro de axones y dendritas durante el desarrollo (Alberts *et al.*, 2004).

10.3.2.2. Anticuerpo anti-Myelin Associated Glycoprotein (MAG)

Es utilizado como marcador de células de Schwann en SNP (**Figura 40**) u oligodendrocitos en SNC (**Figura 41**). Permite identificar a la proteína de membrana MAG que participa en el proceso de mielinización neuronal. También es importante para las interacciones entre la mielina y los axones, siendo una proteína de adhesión. Se expresa en la membrana periaxonal e interacciona con numerosos receptores axonales. En sistema nervioso periférico se expresa a nivel de los internodos e incluso también en regiones de mielina laxa como las incisuras de Schmidt-Lanterman y las regiones paranodales (**Figura 40**).

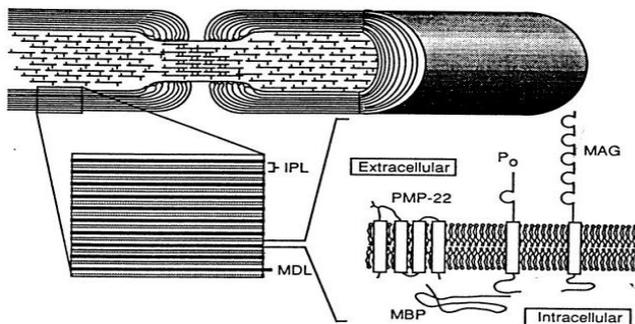


Figura 40. Esquema de un axón y la vaina de mielina, centralizado en la región intermodal. A mayor aumento se muestra donde se ubica la proteína de membrana MAG en SNP. [Adaptado de: Suter *et al.*, *Trends in Neurosciences*, 1993].

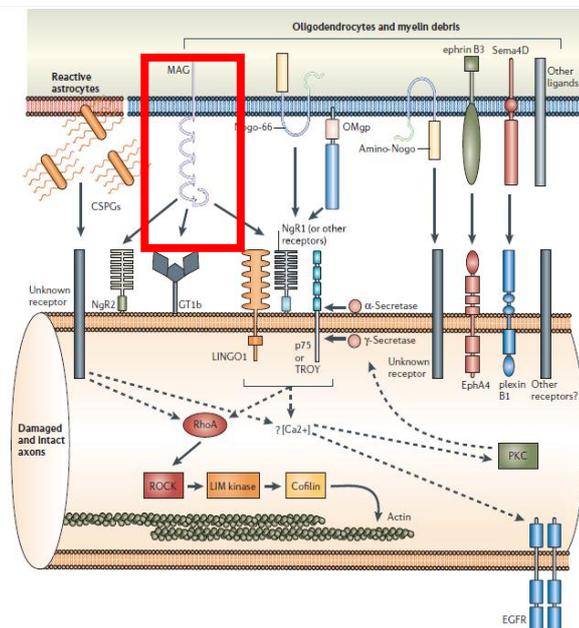


Figura 41. Esquema con las diferentes moléculas de membrana y vías de señalización que se suceden cuando se produce una injuria en el SNC. Se señala en rojo la ubicación de la proteína MAG en los Oligodendrocitos. [Adaptado de: Yiu & He, *Nature Reviews*, 2006, Figura 2].

10.3.2.3. Anticuerpo *anti-proteína ribosomal P*

Es usado para identificar ribosomas, lo que puede corresponderse con sitios en donde se esté llevando a cabo la síntesis de proteínas. Este anticuerpo reconoce específicamente 3 proteínas de la subunidad mayor del ribosoma eucariota (60S). Estas proteínas se conocen como **P0**, **P1** y **P2**. Los epítopes de esta proteína presentan actividad GTPasa (**Figura 42**).

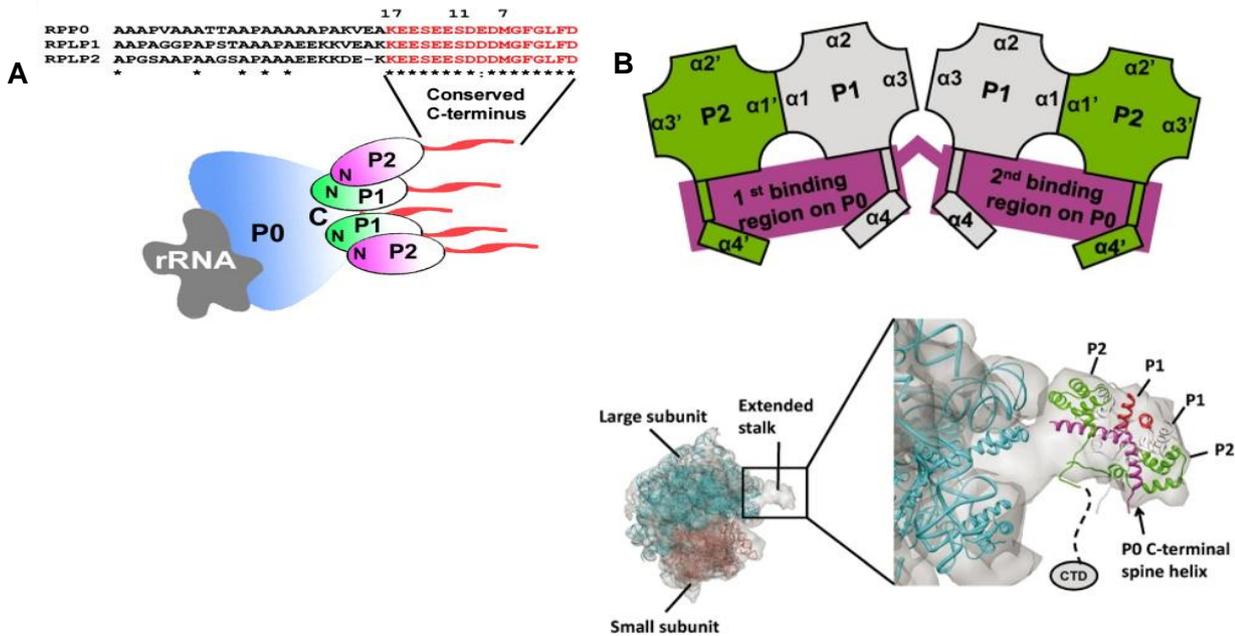


Figura 42. En **A**, se muestra las secuencias alineadas de la región Carboxilo terminal para las proteínas P0, P1 y P2 y un modelo de sus posibles interacciones. Los residuos indicados en rojo están altamente conservados en las 3 proteínas. En **B**, se muestra con mayor detalle como serían las interacciones y en que región de la subunidad 60S del ribosoma se encuentran estas proteínas. [Esquema **A** Adaptado de: McCluskey *et al.*, *Journal of Molecular Biology* 2008, Fig. 5. Esquema **B** adaptado de: Lee *et al.*, *Journal of Molecular Biology* 2010, Figura 6].

10.3.2.4. Sondas *Faloidina* y *DAPI*

La faloidina permite identificar **filamentos de actina**. Los mismos son un componente fundamental del citoesqueleto de todas las células, incluidas las neuronas (Alberts *et al.*, 2004). Se expresa dentro del axón y permite el reconocimiento de ciertas estructuras, como los nodos de *Ranvier* y las incisuras de *Schmidt Lanterman*. La sonda **DAPI** marca el ADN y por ende permite la identificación de los núcleos celulares.

10.4. Principios de la Microscopia Confocal

La microscopia confocal permite producir imágenes libres de información “fuera de foco”. En un microscopio de epifluorescencia convencional, la muestra entera está expuesta a la luz de excitación y la emisión es colectada por objetivos con una apertura numérica muy alta, con información de fluorescencia proveniente del espécimen entero, tanto por encima como por debajo del plano focal. Esto reduce el contraste y el brillo de las imágenes, además de dificultar la determinación del sitio celular del cual proviene la señal observada, dado que se observa la fluorescencia presente en todo el volumen del tejido. Mediante la microscopía confocal, la información fuera de foco es removida, lo que significa un importante avance en mejorar la resolución lateral y en la capacidad de realizar un escaneo plano por plano en forma óptica y directa, sin necesidad de llevar a cabo procesos invasivos sobre las muestras, siempre y cuando estas sean lo suficientemente finas. Desde la invención de los láseres, esta metodología ha comenzado a utilizarse a gran escala (Periasamy & Day, 2005).

Se impacta sobre la muestra un único punto de luz utilizando objetivos con gran apertura numérica. La luz reflejada o fluorescente es colectada por un objetivo y centrada a una apertura confocal con un *pinhole* de diámetro regulable, pero siempre muy pequeño, donde la señal es captada por un tubo fotomultiplicador (PMT). La luz que provenga por encima o por debajo del plano, golpea las paredes del *pinhole* y no es transmitida al detector. Para generar una imagen bidimensional, el haz de luz del láser impacta sobre la muestra y escanea pixel por pixel en forma bidimensional, regular y con una respuesta instantánea del fotomultiplicador (**Figura 43**). Si lo que se quiere es una reconstrucción tridimensional, entonces se deben tomar una serie de imágenes, recorridas por el láser en las direcciones xy, en diferentes planos del eje z (Periasamy & Day, 2005).

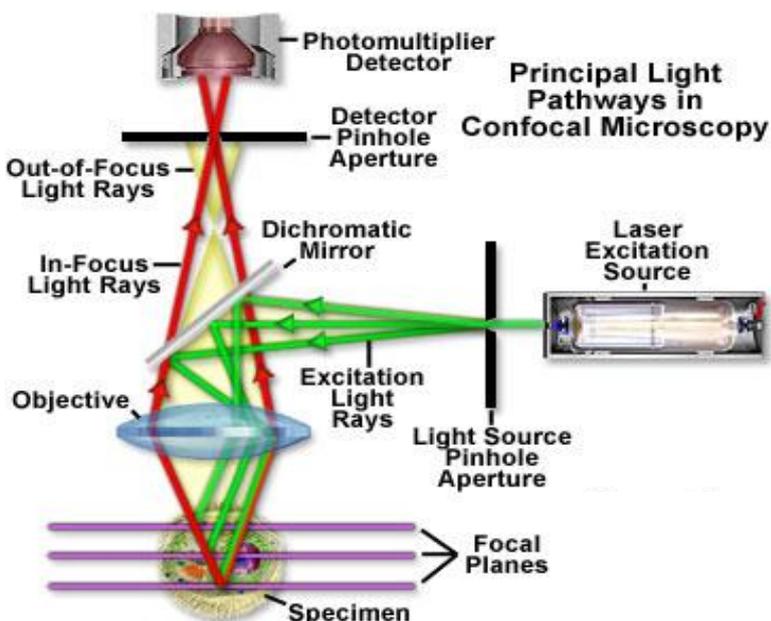


Figura 43. Esquema General del recorrido de la luz de los láseres en un microscopio confocal genérico. [Adaptado de Nikon Microscopy®].