

PEDECIBA

Área Biología

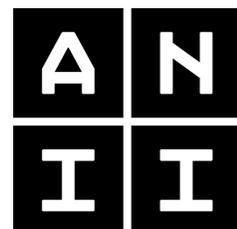
Subárea Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría

***“Estudio sobre los mecanismos de
regulación de la síntesis local de
proteínas en axones periféricos”***

Lic. Andrés Di Paolo Forné

Agosto, 2016



**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas
(PEDECIBA)**

Área Biología

Subárea Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría

***“Estudio sobre los mecanismos de
regulación de la síntesis local de
proteínas en axones periféricos”***

Lic. Andrés Di Paolo Forné

Orientador: Dr. José Sotelo Sosa

Co-orientador: Dr. José Sotelo Silveira

Tribunal

Dra. Ana Celia Silva (Presidente)

Dr. Aldo Calliari (Vocal)

Dr. Miguel Arocena (Vocal)

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Agosto, 2016

Agradecimientos

Aprovecho la ocasión para agradecer en pocas palabras a las personas que a lo largo de estos 3 años me brindaron apoyo para que esta tesis pudiese ser desarrollada.

A los Doctores Ana Celia Silva, Aldo Calliari y Miguel Arocena por las correcciones y las charlas discutiendo la tesis, con lo cual no solo me ayudaron a producir un resultado de mayor calidad, sino también me permitieron ver desde otra óptica los resultados.

A mis tutores Coya y Boli, que mejoraron mi capacidad analítica y de escritura, permitiendo la producción de un texto mejorado respecto a las primeras versiones y dándome herramientas para ser un mejor científico a lo largo de todo este tiempo.

A mis compañeros del DPAN y Genómica en todos los sentidos, desde lo humano hasta en la discusión de experimentos y trabajos científicos, que me recuerdan cada día lo lindo y enriquecedor que es hacer ciencia, sobre todo si se hace en un ambiente amigable.

A mis padres y hermanos que sin ellos nunca podría haber llegado a nada.

A los integrantes del Laboratorio del Dr. Federico Dajas Bailador de la Universidad de Nottingham, Inglaterra, donde me sentí muy a gusto trabajando allí.

A mis más cercanos amigos, especialmente a los “Viejos Valores” que son un apoyo en todos los ámbitos de mi vida. Le hago además una mención especial al Teky, con el cual también he aprendido mucho y me ha apoyado muchas veces a lo largo de estos años.

Y quiero muy especialmente agradecerle a mi novia Florencia con la cual he crecido muchísimo como persona y que siempre, en todo momento, me ha apoyado en los momentos más difíciles, “yendo juntos a la par” en cada etapa.

Índice

I) Resumen	1
II) INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Importancia de la Síntesis Proteica Local en axones.....	2
2.2. Síntesis proteica local en el cono de crecimiento axónico.....	5
2.3. Síntesis proteica local y regeneración axonal.....	6
2.3.1. Pasos básicos para la formación de un cono de crecimiento axonal.....	7
2.3.2. Elementos involucrados en la regeneración axonal	8
2.3.3. Identificación de los elementos necesarios para la síntesis proteica local en el axón	9
2.3.4. Evidencia e implicancias de la síntesis proteica local en axones regenerantes	12
2.4. Regulación por mTOR en la síntesis proteica local axonal	13
2.4.1. Papel de los componentes río abajo de mTOR en la regeneración axonal	16
2.4.2. Posible participación de Pdcd4 en la regulación de la síntesis proteica local y regeneración axonal	17
III) Hipótesis de Trabajo	20
IV) Objetivos.....	20
4.1. Objetivo General	20
4.2. Objetivos Específicos.....	20
V) Materiales y Métodos	21
5.1. Animales y procedimientos quirúrgicos	21
5.2. Estrategia para el análisis de proteínas neo-sintetizadas mediante microscopía confocal.	22
5.2.1. Análisis de proteínas neo-sintetizadas en cultivo celular.....	25
5.2.2. Análisis en piezas de tejido incubadas con el aminoácido HPG.....	26
5.2.2.1. Crio-secciones	26

5.2.2.2. Extruido de axoplasmas y estudio de proteínas neo-sintetizadas	28
5.2.2.3. Protocolo de transparentación de tejidos enteros y estudio de proteínas neo-sintetizadas	30
5.3. Modulación de la vía mTOR en raíces ventrales utilizando las drogas rapamicina y bpV(pic).....	34
5.4. Silenciamiento de la proteína Pdc4 en neuronas <i>DRGs</i> embrionarias de rata <i>in vitro</i>	35
5.4.1. Características principales de los ARNs interferentes empleados	36
5.4.2. Obtención de neuronas <i>DRGs</i> embrionarias de rata en el día 18 de desarrollo (E18).	37
5.5. Cultivo de neuronas corticales embrionarias de ratón en el día 16 de desarrollo (E16) e inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Pdc4	40
5.6. Adquisición de Imágenes mediante microscopía confocal y de epifluorescencia	42
5.6.1. Microscopios y software de adquisición de imágenes utilizadas	42
5.6.2. Softwares utilizados para el procesamiento y análisis de las imágenes	44
5.6.3. Análisis de las imágenes correspondientes al compartimento axonal de las cámaras compartimentalizadas	45
5.7. Protocolo para cuantificación del ARNm de Pdc4 en somas y axones de neuronas <i>DRGs</i> embrionarias de rata <i>in vitro</i>	46
VI) Resultados.....	48
6.1. Incubación con aminoácidos análogos de la metionina para el estudio de la síntesis proteica local en axones.....	48
6.1.1. Puesta a punto del análisis de proteínas neo-sintetizadas en fibroblastos y estudio de la síntesis proteica local en axones de raíces ventrales por criosecciones.....	48
6.1.2. Análisis de la síntesis proteica local axonal en nervio ciático en condición normal y de pre-condicionamiento por una lesión	53
6.1.3. Efecto de las soluciones de acetato de zinc y de pulling sobre la señal de proteínas neo-sintetizadas y su distribución en extruido de axoplasmas aislados de raíces ventrales	54
6.1.4. Observación de proteínas neo-sintetizadas en el axón gigante de Mauthner en médula de pez dorado transparentada	56

6.1.5. Análisis de distribución de proteínas neo-sintetizadas y ribosomas en axones de raíces ventrales enteras transparentadas	58
6.2. Estudios de los cambios en la expresión de componentes de la vía mTOR en modelos de regeneración axonal y mediante el uso de drogas que modulen esta vía.....	60
6.2.1. Expresión de la proteínas Pdc4 y fosfo-p70S6K en axones de nervios ciáticos lesionados y en proceso de regeneración axonal <i>in vivo</i>	60
6.2.2. Distribución de las proteínas Pdc4 y fosfo-p70S6K en axones de raíces ventrales no lesionadas, cambios en su expresión en presencia de moduladores de la vía mTOR y análisis de la síntesis proteica local axonal.	62
6.3. Estudio de Pdc4 como regulador del crecimiento axonal en modelos <i>in vitro</i>	65
6.3.1. Expresión del ARNm de Pdc4 en los somas y axones de neuronas DRGs embrionarias de rata (E18).	65
6.3.2. Silenciamiento del ARN mensajero y la proteína Pdc4 en neuronas DRGs embrionarias y estudio de los cambios en el crecimiento axonal <i>in vitro</i>	66
6.3.3. Distribución de la proteína Pdc4 en el núcleo y cono axónico de neuronas corticales embrionarias de ratón (E16) en distintas etapas de crecimiento <i>in vitro</i>	67
VII) Discusión	69
7.1. Síntesis proteica local en axones periféricos <i>in vivo</i>	69
7.2. Cambios en la expresión de componentes de mTOR y regulación de la síntesis proteica local axonal en modelos de regeneración <i>in vivo</i>	76
7.3. Papel de Pdc4 en crecimiento axonal <i>in vitro</i>	78
7.4. Conclusiones Finales	82
VIII) Perspectivas	84
IX) Bibliografía	86

Abreviaturas

4EBP-1, acrónimo en inglés de Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

ADNc, ADN copia

Akt, V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene

ARNm, ARN mensajero

ARNr, ARN ribosomal

ARNt, ARN transferencia

Axon-TRAP, acrónimo en inglés de Axon- translating ribosome affinity purification

BDNF, Factor neurotrófico derivado del cerebro

bpV(pic), Dipotassium Bisperoxovanadium(pic) dehydrate

BSA, Sero-albúmina Bovina

CEBP-1, acrónimo en inglés de CCAAT-enhancer-binding protein 1

CLARITY, acrónimo en inglés de Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging / Immunostaining / *In situ* hybridization-compatible

CNEA, Acrónimo de Comisión Nacional de Experimentación Animal

CREB, acrónimo en inglés de cAMP response element-binding

CS, Célula de Schwann

DAPI, 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

DMEM, acrónimo en inglés de Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO, Dimetilsulfóxido

DRGs, acrónimo de ganglio de la raíz dorsal

E16 y E18, estadios embrionarios correspondientes a los días 16 y 18 de gestación

eIF4A, acrónimo en inglés de Eukaryotic Initiation Factor 4A

eIF4G, acrónimo en inglés de Eukaryotic Initiation Factor 4G

FUNCAT-PLA, acrónimo en inglés de fluorescent noncanonical amino acid tagging-proximity ligation assay

GAM, acrónimo en inglés de Goat Anti Mouse (de Anticuerpo Secundario)

GAR, acrónimo en inglés de Goat Anti Rabbit (de Anticuerpo Secundario)

GDNF, acrónimo en inglés de Glial cell line-derived neurotrophic factor

HBSS, acrónimo en inglés de Hanks' Balanced Salt Solution

HPG, homopropargilglicina

miARNs, micro ARNs

miR-21, microARN-21

mTOR, acrónimo en inglés de Mammalian Target of Rapamycin

mTORC1, mTOR complex 1

NGF, Factor de crecimiento nervioso

NGS, Suero Normal de Cabra

ON, Toda la Noche

p70S6K, acrónimo en inglés de Ribosomal protein S6 kinase

PARPs, acrónimo de Placas Periaxoplásmicas Ribosomales

PBS, Buffer Fosfato Salino

PFA, Paraformaldehido

PHEM, acrónimo de PIPES, HEPES, EGTA y $MgCl_2$

qPCR, PCR cuantitativo

RA, Regeneración Axonal

SDS, Sodium Dodecyl Sulfato

SILAC, acrónimo en inglés de Stable isotope labeling with amino acids in cell culture

SPL, Síntesis Proteica Local

STAT-3, acrónimo en inglés de signal transducer and activator of transcription 3

TA, Temperatura Ambiente

TSC 1 y 2, acrónimo en inglés de Tuberous sclerosis Complex 1 y 2

UTR, región no traducida (referido a un ARNm)

ZBP-1, acrónimo en inglés de Z-DNA Binding Protein 1

I) Resumen

La síntesis proteica local axonal es importante para el desarrollo de múltiples procesos en las neuronas, siendo regulada por diferentes elementos incluyendo la vía mTOR. En la mayoría de los casos ha sido estudiada en modelos *in vitro* y hasta el momento no se ha desarrollado un sistema *in vivo* que permita identificar y cuantificar las regiones del dominio axonal donde ocurre la síntesis proteica local. Tampoco se conoce aún el papel de algunos componentes regulados por la vía mTOR en la síntesis proteica local axonal. Este es el caso de la proteína *Programmed Cell Death 4* (Pdc4), un represor traduccional cuyo papel en la regulación de la síntesis proteica en axones no ha sido aún estudiado. Resultados preliminares de nuestro grupo sugieren el rol regulador de Pdc4 en procesos de regeneración y crecimiento axonal. Nos planteamos entonces estudiar *in vivo* los sitios donde se sintetizan localmente proteínas en el dominio axonal, analizar *in vivo* la activación de la vía mTOR como regulador en la síntesis proteica local y evaluar el posible papel de Pdc4 en regeneración axonal *in vivo* y en el crecimiento de los axones *in vitro*. Diseñamos un sistema para estudiar la neo-síntesis de proteínas en axones periféricos mediante la utilización de aminoácidos análogos de la metionina detectados por fluorescencia. Cuantificamos un aumento en la síntesis proteica local en axones de nervio ciático pre-condicionados por una lesión *in vivo*. También evidenciamos proteínas neo-sintetizadas en el axón gigante de Mauthner en médula de pez dorado y en axones de raíces ventrales de rata mediante protocolos de transparentación de tejidos enteros. En el caso de las raíces ventrales, identificamos en axones libres de los lípidos de la mielina estructuras con señal de proteínas neo-sintetizadas y ribosomas que podrían corresponder a las Placas Periaxoplásmicas Ribosomales (PARPs), que hasta el momento solo habían sido detectadas mediante extruidos de axoplasmas. Por otro lado, observamos que la señal de proteínas neo-sintetizadas y de Pdc4 en axones *in vivo* cambia en presencia de drogas que activen o inhiben la vía mTOR. Por último, evidenciamos un aumento en el crecimiento axonal *in vitro* cuando la proteína Pdc4 es silenciada mediante ARNs interferentes e identificamos una distribución mayormente nuclear de esta proteína en las etapas activas de crecimiento en neuronas corticales *in vitro*. En suma, estos datos muestran por novedosas metodologías la síntesis local de proteínas en axones *in vivo*, su regulación por la vía mTOR y aportan evidencias sobre el posible papel de Pdc4 como regulador del crecimiento y regeneración axonal.

II) INTRODUCCIÓN

2.1. Importancia de la Síntesis Proteica Local en axones

La síntesis de proteínas es un proceso esencial del metabolismo celular y está finamente regulado (Alberts *et al.*, 2014). La localización sub-celular de cada proteína es importante para asegurar las funciones que deben cumplir en el momento y espacio adecuados (Perry, Rotem y Fainzilber, 2013; Batista y Hengst, 2016), incluso en las células procariotas (Nevo-Dinur *et al.*, 2011). De este concepto surge la importancia de la síntesis local de proteínas (de ahora en adelante, SPL) para el mantenimiento del proteoma en cada sub-compartimento celular (Donnelly *et al.*, 2010; Sotelo-Silveira y Holt, 2014). La SPL es importante en células con alto grado de polarización, como es el caso de las neuronas. Estas células presentan prolongaciones, en algunos casos de gran longitud (especialmente en axones) y en otros casos muy ramificadas (en el caso de las dendritas) (Purves *et al.*, 2012). Para el mantenimiento de dichas estructuras, es necesario la expresión de proteínas específicas (Alberts *et al.*, 2014).

Muchas de las proteínas identificadas en los axones provienen del soma neuronal (Black y Lasek, 1980; Campenot y Eng, 2000). En este contexto y a partir de la década de los sesenta, algunos autores se plantearon el problema de que si todas las proteínas se sintetizaran únicamente en el soma (modelo conocido como “centralista”) su transporte dentro de los axones hacia las zonas distales, sea por transporte lento o rápido, no sería compatible con las necesidades metabólicas del axón (Alvarez y Torres, 1985; Perry and Fainzilber, 2013). Como respuesta a esta interrogante, se desarrollaron 2 propuestas no excluyentes. Una es la transferencia de proteínas desde las células gliales al axón (Lasek *et al.*, 1977; Court *et al.*, 2008, 2011; Bellingham *et al.*, 2012; Frühbeis *et al.*, 2012) así como también de ARNs (Benech *et al.*, 1982; Rapallino *et al.*, 1988; Sotelo *et al.*, 2013,

2014; Canclini et al., 2014). La otra propuesta es la SPL en el axón (Giuditta *et al.*, 1968, 1977; Koenig, 1979; Koenig y Adams, 1982; Koenig y Giuditta, 1999; Campenot y Eng, 2000; Piper y Holt, 2004; Obara *et al.*, 2012; Sotelo-Silveira y Holt, 2014).

Se ha demostrado en estudios *in vitro* la SPL en dendritas, siendo un evento importante para su integridad y correcto funcionamiento (Bodian, 1965; Steward y Levy, 1982; Torre y Steward, 1992; Steward y Schuman, 2001). En el caso de las espinas dendríticas, la SPL está ampliamente aceptada por la comunidad científica debido a la detección de ribosomas y polisomas asociados con procesos de plasticidad sináptica y cognitivos (Steward y Levy, 1982; Cajigas *et al.*, 2012; Kindler y Kreienkamp, 2012). Además de los estudios *in vitro* de SPL en dendritas, se han desarrollado trabajos concluyentes *in vivo* (Miller *et al.*, 2002; An *et al.*, 2008). Actualmente, la SPL en dendritas es considerada un requisito imprescindible para los procesos de plasticidad sináptica (Sutton y Schuman, 2005; Batista y Hengst, 2016).

En el caso de los axones, dado que en un principio no se pudieron detectar ribosomas en el dominio axonal (Weiss y Hiscoe, 1948; Palay y Palade, 1955; Lasek *et al.*, 1973), se pensó que la SPL axonal no existía y que el recambio de las proteínas axonales sólo se desarrollaba mediante el aporte de proteínas sintetizadas en el soma que luego eran transportadas hacia el axón. Sin embargo, otros autores utilizando diferentes metodologías, aportaron evidencias sobre la SPL axonal (Giuditta *et al.*, 1968; Benech *et al.*, 1982; Alvarez y Benech, 1983; Sotelo *et al.*, 1992; Koenig y Giuditta, 1999), aunque aún permanecen interrogantes sobre los mecanismos involucrados. Tras el desarrollo de nuevas tecnologías, se han aportado más evidencias respecto a la SPL axonal *in vitro* (Donnelly *et al.*, 2010). Se ha comprobado que ocurre tanto en los axones en desarrollo como en los ya maduros (Perry, Rotem y Fainzilber, 2013) y está íntimamente asociada

con la capacidad de regeneración (Gumy *et al.*, 2010). A diferencia de la SPL en dendritas, no hay muchos experimentos que hayan concluido sobre la existencia de SPL axonal *in vivo*. Un estudio pionero fue desarrollado en el año 2002, donde los autores identificaron los elementos necesarios para que pueda darse la SPL axonal y la demostraron estudiando ARNs marcados y observando cómo se traducen en diferentes axones *in vivo* (Brittis *et al.*, 2002). Más recientemente se han desarrollado dos experimentos *in vivo* que sugerirían la traducción a nivel axonal. En el primero se utilizaron ratones transgénicos portadores de una proteína GFP fluorescente unida a la secuencia 3'UTR del mensajero de la beta actina (Willis *et al.*, 2011), descrita anteriormente como una secuencia de localización axonal (Sotelo-Silveira *et al.*, 2008). Se demostró la localización de dicho mensajero en axones de neuronas sensoriales y su acumulación en los sitios próximos a una lesión, sugiriendo su SPL axonal (Willis *et al.*, 2011). Estudios posteriores, comprobaron la importancia del mensajero de la beta actina y su proteína de unión ZBP-1 para procesos de regeneración (Donnelly *et al.*, 2011, 2013). El otro modelo *in vivo* es en ratones *knock-out* para la importina beta 1 (Perry *et al.*, 2012). Utilizando como blanco una secuencia ubicada en su 3'UTR, se depletó el ARNm de la importina beta 1 en los axones, pero no en el soma. Se observó entonces una disminución en los niveles de la proteína codificada a nivel axonal pero no en el cuerpo neuronal, sugiriendo la SPL de dicho mensajero (Perry *et al.*, 2012).

En los últimos 15 años, el número de trabajos que estudian la SPL en axones ha ido en aumento, comprobándose su importancia durante el crecimiento del cono axónico (Jung *et al.*, 2011), desarrollo de la sinapsis (Jung *et al.*, 2012), maduración de axones distales (Alvarez *et al.*, 2000) y la respuesta a las señales guía axonales durante su crecimiento (Jung *et al.*, 2011). La SPL axonal permite responder localmente a cambios del entorno más rápidamente que las cascadas de señalización desencadenadas en el soma una vez

que el mensaje llega al mismo (Jung et al., 2012; Perry, Rotem y Fainzilber, 2013). Si los ARNm de proteínas señalizadores ya están presentes en los axones y son traducidos localmente, pueden activarse como respuesta a un estímulo, desencadenar cascadas de señalización en el dominio axonal y finalmente ser transportados hacia el soma para producir cambios en la expresión génica (Jung et al., 2011). Un ejemplo de ello son los factores de transcripción. Al ser sintetizados localmente en los axones, pueden responder a cambios locales, por ejemplo a señales extracelulares en el caso de los conos de crecimiento (Jung et al., 2012). En otros casos pueden estar presentes como mensajeros en estado inactivo en el axón. Una vez que detectan la señal correcta, cambian a un estado activo e inducen su traducción local (Ji y Jaffrey, 2014).

En la última década y tras el surgimiento de nuevas técnicas para la obtención de axones aislados, el número de ARNm que se han descrito están presentes en el axón ha aumentado (Zheng et al., 2001; Gumy et al., 2010; Jung et al., 2011). En línea con lo anterior, es importante mencionar que el desarrollo de las técnicas para la identificación masiva de ARNs, ya sea mediante microarreglos o por secuenciación masiva, sugiere que el transcriptoma axonal sería mucho más complejo de lo que se pensaba inicialmente, identificándose miles de ARNm diferentes (Willis et al., 2005; Taylor et al., 2009; Zivraj et al., 2010; Gumy et al., 2011; Farias, 2014; Minis et al., 2014).

2.2. Síntesis proteica local en el cono de crecimiento axónico

El cono de crecimiento axónico es una estructura dinámica (Dent et al., 2011) que presenta vías de señalización molecular que no se encuentran en otras regiones de un axón maduro, por lo cual es interesante estudiar los cambios que suceden en ese microambiente axonal (Jung et al., 2011; Batista y Hengst, 2016). Durante el desarrollo del axón, esta estructura modifica la expresión de proteínas a nivel local (Jung et al.,

2011). Señales externas como las de Netrina-1, BDNF, NGF y semaforina-3a inducen el crecimiento axonal en neuronas de ganglios de la raíz dorsal (de ahora en más, *DRGs*) y en neuronas ganglionares de la retina en *Xenopus* (Leung *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2011). Como consecuencia de estas señales, se desencadena el crecimiento del cono axónico y la síntesis proteica local (SPL) axonal es importante durante su formación (Jung y Holt, 2013). En el caso de la señal externa de netrina-1, también induce el crecimiento axonal y la SPL en neuronas corticales de ratón, lo que sugiere la existencia de estos procesos tanto en el sistema nervioso periférico como en el central (Angelica y Fong, 2011). Otros estudios identificaron factores de transcripción en los conos de crecimiento que son traducidos localmente al detectar señales extracelulares específicas. Dentro de los transcritos con traducción axonal reportada están: importina beta 1 (Hanz *et al.*, 2003), CREB (Cox *et al.*, 2008), CEBP-1 (Yan *et al.*, 2009), SMAD1,5 y 8 (Ji y Jaffrey, 2014), sintaxina-13 (Cho *et al.*, 2014), y STAT3 (Ben-Yaakov *et al.*, 2012). Respecto a STAT3, es sintetizado localmente en respuesta a una lesión en axones de nervio ciático y en *DRGs* (Ben-Yaakov *et al.*, 2012). Analizando a STAT-3 en un axón lesionado, su forma activa se encuentra fosforilada, interactúa con la dineína y es transportada en forma retrógrada hacia el núcleo, asociado con la importina beta 1 que también es sintetizada localmente. Estudios de este tipo evidencian la activación de distintos mecanismos durante la injuria de axones, asociados a fenómenos de regeneración axonal.

2.3. Síntesis proteica local y regeneración axonal

El sistema nervioso periférico difiere del central en que es capaz de responder a procesos de injuria a través de la regeneración axonal (de ahora en más, RA) (Scheib y Höke, 2013). Una vez producida la lesión, el cabo distal que no está en contacto con el soma sufre procesos de degeneración Walleriana (Gaudet *et al.*, 2011; Conforti *et al.*,

2014), y sólo los axones periféricos a partir de su cabo proximal, pueden crecer y reconectarse con su blanco (Zochodne, 2008). Los procesos que aseguran una reparación del axón dañado pueden analizarse como una recapitulación parcial de los procesos ocurridos durante el desarrollo normal del axón, donde el paso central es la formación de un nuevo cono de crecimiento axonal funcional (Yu *et al.*, 2011). Está descrito que al finalizar las etapas de desarrollo del axón, las cantidades de ARNm y ARNr presentes en el dominio axonal disminuyen (Hengst y Jaffrey, 2007), lo que está asociado con una menor capacidad de sintetizar proteínas y por ende una menor capacidad de respuesta frente a una axotomía (Gumy *et al.*, 2010). Otros estudios demostraron que pre-condicionar axones *in vivo* mediante una lesión, produce un aumento en la capacidad de regeneración y en la síntesis de proteínas cuando son cultivados *in vitro* (Zheng *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2005). De todos modos, el entendimiento fino de los procesos involucrados no es aún claro.

2.3.1. Pasos básicos para la formación de un cono de crecimiento axonal

Inmediatamente después de una lesión axonal, la membrana plasmática se ve dañada y el axoplasma expuesto al medio extracelular, provocando la entrada y salida de componentes cuyas concentraciones cambian respecto a las de un axón intacto (Gumy *et al.*, 2010). Por tanto, el primer paso para alcanzar una correcta regeneración es “sellar” la punta del cabo proximal que fue dañada (Eddleman *et al.*, 2000). Posteriormente se produce la remodelación de ese cabo axonal en un nuevo cono de crecimiento capaz de responder a las señales del entorno (Sahly *et al.*, 2006). Estudios en *Aplysia* muestran que el proceso continúa con una reorganización del citoesqueleto, que involucra la ruptura y polimerización de microtúbulos, neurofilamentos y filamentos de actina. Estos últimos darán lugar al lamelipodio del cono de crecimiento ya maduro (Spira *et al.*, 2003; Sahly *et*

al., 2006). En las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (*DRGs*), reconocidas como modelo *in vitro* de regeneración axonal, se observa un proceso similar al ocurrido en *Aplysia* aunque aún no se conoce con tanto detalle (Verma *et al.*, 2005). Asimismo, las neuronas *DRGs* tienen mayor capacidad de formar un cono de crecimiento en comparación con los axones de las neuronas de la retina, por ser estas últimas parte del sistema nervioso central (Verma *et al.*, 2005). Por tanto, la formación de un cono de crecimiento es un proceso dinámico donde el axón reconstruye una estructura compleja, por lo cual es esperable que dicho proceso esté asociado a cambios en la síntesis y degradación de proteínas (Verma *et al.*, 2005). Este intercambio entre la formación de nuevas proteínas y la desaparición de otras debe estar finamente regulado para permitir los cambios que van desde reparar el sitio dañado hasta la formación de un nuevo cono de crecimiento dinámico y funcional (Gumy *et al.*, 2010). Estos primeros pasos son esenciales para lograr un proceso de regeneración axonal.

2.3.2. Elementos involucrados en la regeneración axonal

La RA es un proceso donde participan diferentes elementos dentro de los que se incluyen: cEBP beta (Nadeau *et al.*, 2005), factores neurotróficos (Gordon, 2009), sox-11 (Jankowski *et al.*, 2009), microARNs (Yu *et al.*, 2011), AMP cíclico (Liu *et al.*, 2011), mTOR (por las siglas en inglés de *mammalian target of rapamycin*) (Verma *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2010), STAT3 (Bareyre *et al.*, 2011), c-Jun (Ruff *et al.*, 2012), y la syntaxina-13 (Cho *et al.*, 2014), por mencionar algunos. Se ha comprobado que el microambiente axonal también juega un rol preponderante en la RA, donde el microambiente de los axones periféricos favorece la regeneración (Brosius Lutz y Barres, 2014). Se pudo constatar que las neuronas periféricas pierden la capacidad de regenerar si son colocadas en el microambiente de axones centrales mientras que éstos últimos adquieren capacidad

regenerativa en microambientes periféricos (Aguayo *et al.*, 1981). La influencia de las células gliales parece ser de gran importancia, aportando un ambiente inhibitorio para la regeneración en el sistema nervioso central (Allen y Barres, 2009). Por otro lado, algunos estudios relacionan los procesos de inflamación local con los de regeneración axonal, siendo uno de los principales modelos las células del ganglio de la retina (Kurimoto *et al.*, 2013). Sus axones no regeneran luego de ser sometidos a una lesión simple, pero sí pueden hacerlo en un contexto ocular inflamatorio (Yin *et al.*, 2003). Otros trabajos demuestran la importancia de la síntesis proteica local (SPL) para la RA, tema desarrollado a continuación.

2.3.3. Identificación de los elementos necesarios para la síntesis proteica local en el axón

Se han desarrollado trabajos que muestran cómo la síntesis proteica local (SPL) es importante durante la regeneración axonal (RA). Estudios en neuronas *DRGs in vitro* muestran que 20 minutos luego de una axotomía comienza a formarse un nuevo cono de crecimiento (Verma *et al.*, 2005). A las 4 horas post-axotomía, al menos el 80% de las neuronas en estadios embrionarios y 70% en neuronas *DRGs* maduras pudieron regenerar un cono de crecimiento funcional *in vitro* (Verma *et al.*, 2005). Eventos tan rápidos sugieren la necesidad de SPL para responder, al menos inicialmente, a los fenómenos de RA, ya que la velocidad de transporte de proteínas desde el soma no sería suficiente para las necesidades de respuesta del axón. Apoyando esta teoría, se ha comprobado que con la aplicación de inhibidores traduccionales en forma local en el axón, disminuye la capacidad de formación de un cono de crecimiento (Verma *et al.*, 2005). Para que la SPL axonal pueda llevarse a cabo, es necesario que la maquinaria necesaria para la traducción esté presente en el axón. Distintos autores identificaron los

componentes necesarios para la SPL axonal en diferentes modelos. Inicialmente, se identificaron en el axón gigante de calamar ARNm (Giuditta *et al.*, 1986) ARNt (Ingoglia *et al.*, 1983), ARNr y factores de elongación (Giuditta *et al.*, 1980). Hallazgos similares se obtuvieron en el axón de Mauthner de pez dorado (Edström y Sjöstrand, 1969; Koenig, 1979). Tanto el axón gigante de calamar como el de Mauthner son sub-compartimentos de gran porte en comparación con los axones de mamíferos, lo que permite aplicar metodologías de purificación y bioquímicas que en otros axones son más difíciles de llevar a cabo (Koenig, 2009). En línea con los estudios de SPL en axones de invertebrados, también se detectaron proteínas sintetizadas en axones de moluscos *in vitro* (Van Minnen *et al.*, 1997). Posteriormente, se identificaron subunidades ribosomales y factores de iniciación de la traducción en axones sensoriales de rata (Zheng *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2005). Con los avances en la microscopía electrónica y de alta resolución, se pudieron observar directamente los ribosomas en el axoplasma tanto en invertebrados como vertebrados (Zelena, 1970; Sotelo *et al.*, 1999; Bleher and Martin, 2001; Li *et al.*, 2005; Kun *et al.*, 2007). Otro estudio identificó los ribosomas *in vivo* en axones de nervio ciático de rata provenientes del soma o de las células de Schwann (de ahora en más, CS) y transportados al axón durante procesos de regeneración axonal (Court *et al.*, 2008, 2011). En relación a este evento de transferencia desde la CS, se ha evidenciado que durante un evento de lesión en nervio ciático de rata, la transferencia de ARN desde la CS al axón *in vivo* aumenta (Canclini *et al.*, 2014; Sotelo *et al.*, 2014). Por otra parte, mediante métodos de extracción de axoplasmas *in vivo* a partir del axón de Mauthner en pez dorado y en axones de mamíferos se han identificado estructuras denominadas Placas Periaxoplásmicas Ribosomales (*PARPs*, por las siglas en inglés) (Koenig y Rainer, 1996; Koenig *et al.*, 2000; Sotelo-Silveira *et al.*, 2004, 2006, 2008; Calliari *et al.*, 2014). Estas estructuras contienen ARNs detectados por la sonda YOYO-1 (colorante

fluorescente que identifica ácidos nucleicos con alta afinidad), ribosomas y polisomas (Koenig y Rainer, 1996). Las *PARPs* fueron identificadas primero en el axón de Mauthner y luego en axones maduros de rata y conejo, tanto motores como sensoriales (Koenig *et al.*, 2000). En estos modelos se confirmó la presencia de las proteínas motoras kinesina II, miosina Va (Sotelo-Silveira *et al.*, 2004) y el ARNm de la beta actina (Sotelo-Silveira *et al.*, 2008). Más recientemente se ha sugerido la presencia de ribonucleopartículas en las *PARPs* (Calliari *et al.*, 2014). En la Figura 1 se muestran imágenes de estas estructuras procedentes de trabajos donde se realizaron extruidos de axoplasmas.

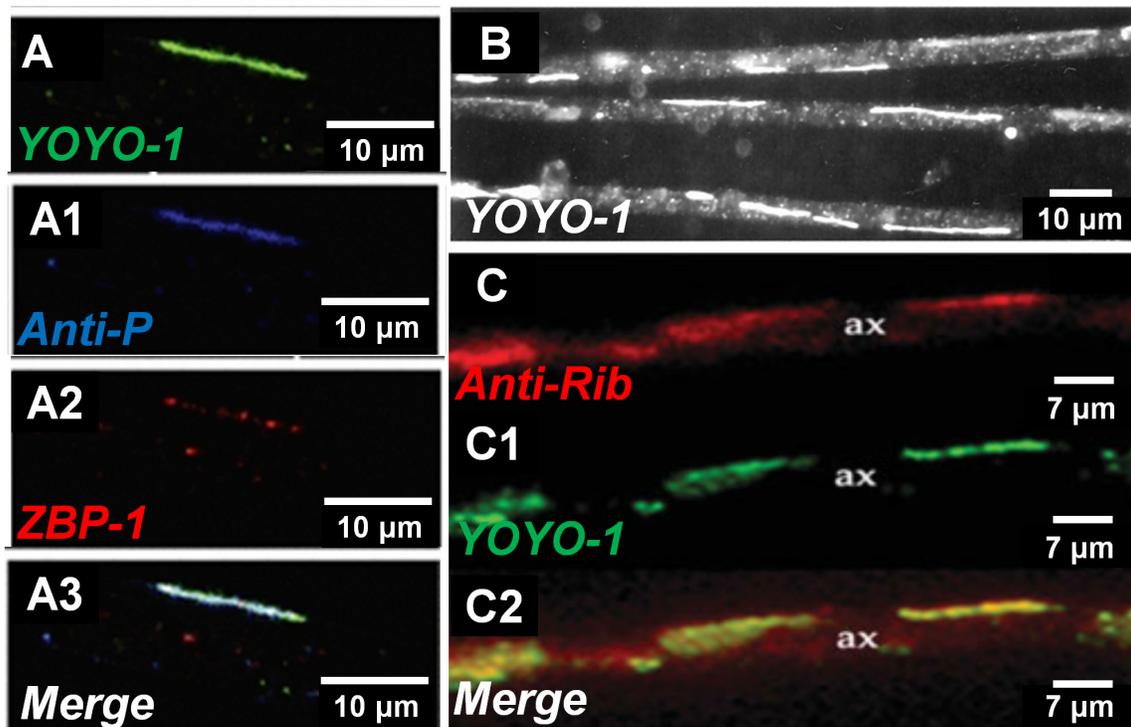


Figura 1. Imágenes de Placas Periaxoplásmicas Ribosomales (*PARPs*) obtenidas a partir de extruidos de axoplasmas seleccionadas de trabajos anteriores. **A-A3.** Planos focales únicos de microscopía confocal mostrando la señal para ARNs (YOYO-1), ribosomas (Anti-P), la proteína ZBP1 y la co-localización de todas las señales identificadas en *PARPs* de axoplasmas extraídos a partir de raíces ventrales de rata. Adaptado de (Sotelo-Silveira *et al.*, 2008). **B.** *PARPs* identificadas dentro de axoplasmas extraídos de raíces ventrales de conejo, teñidas con YOYO-1. Adaptado de (Koenig *et al.*, 2000). **C-C2.** Planos focales únicos mostrando la señal para ribosomas (Anti-rib), ARN (YOYO-1) y la suma de las señales en un axoplasma obtenido a partir de raíces ventrales de rata. Adaptado de (Kun *et al.*, 2007).

2.3.4. Evidencia e implicancias de la síntesis proteica local en axones regenerantes

Los primeros estudios datan de la década del 60 cuando Koenig y colaboradores identificaron un aumento en los niveles de la proteína acetil colinoesterasa en el nervio hipogloso de gato 24 horas después de una neurotomía (Koenig, 1965). Dicho efecto se veía disminuido al aplicar un inhibidor traduccional en forma local en el axón (Koenig, 1965, 1967). En la década del 70 Koenig y colaboradores continuaron con esta línea de trabajo analizando como varía la cantidad de proteína total y de proteínas neo-sintetizadas en la porción proximal del axón en tiempos posteriores a la neurotomía (Tobias y Koenig, 1975a). La cantidad de proteína total aumenta hasta las 21 horas y vuelve a los niveles iniciales a las 96 horas posteriores a la neurotomía. Analizando únicamente las proteínas neo-sintetizadas, se alcanza un máximo de 20 veces más cantidad que al inicio a las 18 horas post neurotomía para luego disminuir los niveles de síntesis proteica. Sin embargo, se mantiene al menos 2 veces más cantidad de proteínas neo-sintetizadas hasta pasadas 96 horas. Además, este efecto se reduce al agregar un inhibidor de la síntesis de proteínas eucariotas en forma local en los axones, pero no cuando se agrega un inhibidor de la síntesis proteica mitocondrial (Tobias y Koenig, 1975a). El efecto se mantiene aun cuando se separan los axones de sus somas, por lo cual las proteínas detectadas en los axones no podrían provenir de este último (Tobias y Koenig, 1975b). Sin embargo, en este modelo existe el efecto inflamatorio producido tras la lesión, que puede estar influyendo sobre la señal de proteínas detectadas. Estudios posteriores mostraron resultados similares evitando este efecto (Sotelo et al., 1992; Sotelo Silveira et al., 2000). Estudios más cercanos en el tiempo desarrollaron ensayos *in vitro* de regeneración axonal en donde se verificó la incorporación de aminoácidos radioactivos en los axones, la cual es inhibible por cicloheximida, en modelos de regeneración en neuronas del ganglio de la retina, nervio ciático y DRGs (Campenot y Eng, 2000; Gummy et

al., 2010). Es de destacar que en el caso de las neuronas *DRGs*, la incorporación de rapamicina, un inhibidor del complejo mTOR, produce la desaparición de estas proteínas (Verma *et al.*, 2005).

Los resultados anteriores, junto con las observaciones de que los axones *in vitro* pueden formar conos de crecimiento incluso en ausencia del soma neuronal (Campbell y Holt, 2001; Ming *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2012), contribuyen a la teoría de que la SPL axonal debería estar ocurriendo durante los procesos de regeneración axonal. Una de las interrogantes que surge es identificar las proteínas involucradas en estos procesos. Las proteínas en las cuales se identificó un aumento en su expresión local y que participan en la regeneración axonal son: la actina (Eng *et al.*, 1999), proteína ribosomal L4 (Twiss *et al.*, 2000), importina beta 1 (Hanz *et al.*, 2003), vimentina (Perlson *et al.*, 2005), CREB (Cox *et al.*, 2008), CEBP-1 (Yan *et al.*, 2009) SMAD1,5 y 8 (Ji y Jaffrey, 2014), STAT3 (Ben-Yaakov *et al.*, 2012) y Sintaxina-13 (Cho *et al.*, 2014). Otro importante campo de estudio en relación a la SPL en la regeneración axonal es entender cómo estos procesos son regulados. Una de las cascadas de señalización celular cuyo rol en la SPL es cada vez más reconocido es la vía de mTOR (Verma *et al.*, 2005).

2.4. Regulación por mTOR en la síntesis proteica local axonal

La SPL es importante para el funcionamiento de los axones en neuronas sensoriales y son numerosos los mensajeros reclutados durante los procesos de regeneración producidos como respuesta a la injuria (Zheng *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2005; Willis *et al.*, 2005; Obara *et al.*, 2012). En fibras sensoriales mielínicas de tipo A en tejidos cutáneos, se ha demostrado por inmuno-histoquímica la expresión de la forma activa del complejo mTOR, un regulador central de la síntesis proteica celular (Laplante y Sabatini, 2012) que integra señales río arriba para luego inducir respuestas que controlan el crecimiento

celular y la proliferación (Cho *et al.*, 2014). La vía de mTOR juega un papel preponderante en el crecimiento, proliferación y supervivencia regulando la síntesis de proteínas a través de la activación de sus componentes inmediatamente río abajo que son p70S6K y 4EBP1 (Wang y Proud, 2006). A su vez, los componentes río arriba de mTOR (Akt y el complejo TSC1 y TSC2), que censan los niveles de factores tróficos y ATP, son los que regulan dicho complejo (Wang y Proud, 2006). La Figura 2 muestra los componentes principales de la vía mTOR.

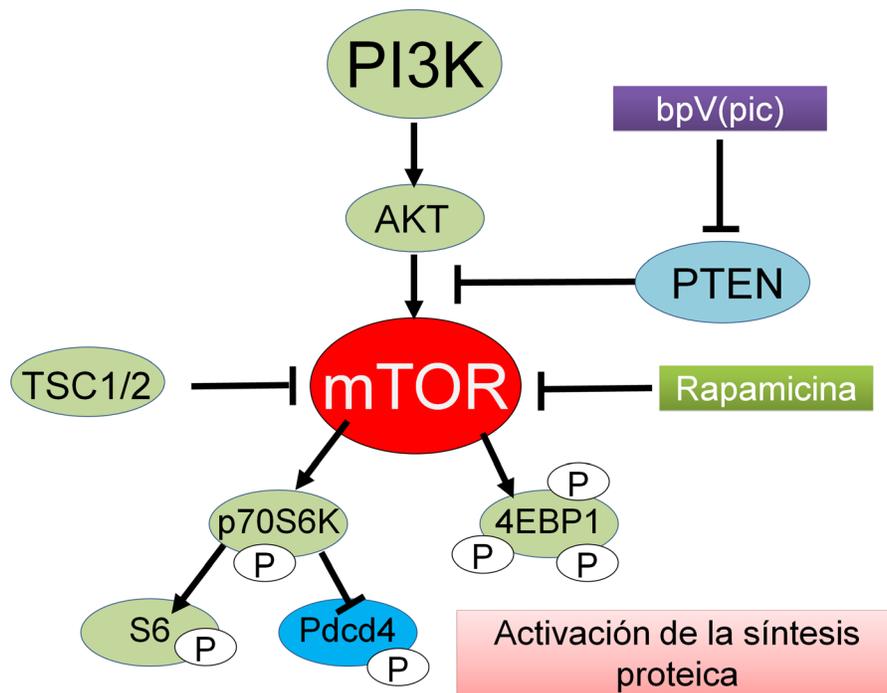


Figura 2. Esquema mostrando los componentes principales de la Vía mTOR. Las flechas indican activación río abajo, mientras que las que terminan en línea indican inhibición. Las formas circulares son proteínas, mientras que los rectángulos son drogas moduladoras de la vía mTOR que utilizaremos en este trabajo. Los círculos con una letra "P" indican fosforilación de la proteína en cuestión. En celeste se resalta la proteína Pdc4.

La proteína mTOR forma al menos dos complejos, de los cuales mTORC1 es un activador de otras proteínas río abajo que conducen al aumento de la síntesis proteica, fenómeno demostrado *in vivo* en somas y dendritas (Costa-Mattioli *et al.*, 2009) e *in vitro* en axones (Verma *et al.*, 2005). Las principales proteínas directamente reguladas por este

complejo y que desencadenan el aumento en la síntesis de proteínas son p70S6K y 4EBP1 (Wang y Proud, 2006), que también fueron identificadas en los receptores sensoriales de las fibras sensoriales de tipo A (Jiménez-Díaz *et al.*, 2008). Estas proteínas desencadenan cascadas de fosforilación involucradas en la regulación de la síntesis de proteínas (Laplante y Sabatini, 2009). En relación con la SPL y los procesos de degradación de proteínas en axones, también se ha estudiado su regulación por mTOR. Se ha comprobado en axones *in vitro* pre-condicionados tras una axotomía, que la inhibición de la vía mTOR mediante la droga rapamicina disminuye la incorporación de aminoácidos marcados radioactivamente en el dominio axonal (Verma *et al.*, 2005). Este efecto se analizó en regiones de los axones alejados del soma neuronal y en tiempos de incubación que no permiten el transporte de proteínas desde el soma hasta la región axonal estudiada, sugiriendo que la vía mTOR regularía la SPL. Sumado a estos resultados, se obtuvo el mismo efecto en axones pre-condicionados por una lesión y separados de sus somas *in vitro*, lo que asegura que la señal observada corresponda a SPL axonal (Verma *et al.*, 2005). Además, la inhibición del complejo mTOR tanto en presencia como en ausencia del soma, disminuye la capacidad de generación de un cono de crecimiento funcional, por tanto afecta la capacidad de regeneración en el axón *in vitro* (Verma *et al.*, 2005). En línea con estos resultados, marcadores de la activación de la síntesis proteica aumentan su expresión en axones lesionados tanto *in vitro* como *in vivo* (Verma *et al.*, 2005).

Estudios posteriores *in vitro* identificaron que la vía mTOR está activa en los somas de neuronas que fueron extraídas y cultivadas 1-4 días posteriores a la lesión de nervios ciáticos de rata (Abe *et al.*, 2010). Además, la aplicación de rapamicina *in vitro* produce una disminución en la capacidad de crecimiento de estos axones previamente lesionados. Por tanto, la activación de mTOR influye en el crecimiento axonal (Abe *et al.*, 2010). Este

mismo estudio muestra que en ratones knock-out para TSC2, una proteína que inhibe mTOR, se produce un aumento en los niveles basales de este último y un mayor crecimiento de los axones cultivados *in vitro*, comparable al observado en situaciones de injuria (Abe *et al.*, 2010). Esto sugiere que la activación de mTOR ya es suficiente para alcanzar fenotipos similares a los observados en una situación de lesión axonal. Por último, la activación de mTOR en regeneración axonal, produce un aumento de la proteína GAP-43 en los axones lesionados tanto *in vitro* como *in vivo* (Abe *et al.*, 2010) siendo esta proteína un reconocido factor de regulación del crecimiento axonal (Abe *et al.*, 2010; Donnelly *et al.*, 2013). Otros estudios que también analizan el papel de mTOR en regeneración muestran que la eliminación de PTEN, que es un regulador negativo indirecto de la vía mTOR (ver Figura 2, página 14) tiene un efecto promotor en la regeneración (Park *et al.*, 2009, 2010; Ohtake *et al.*, 2015).

Los resultados anteriores muestran cómo mTOR podría estar regulando la síntesis de proteínas en los axones, siendo importante en la modulación de los mecanismos de regeneración axonal (Gumy *et al.*, 2010). Sin embargo, el conocimiento fino de qué componentes río abajo de mTOR son activados durante la regeneración axonal no es aún claro.

2.4.1. Papel de los componentes río abajo de mTOR en la regeneración axonal

En axones sensoriales sometidos a injuria tanto *in vitro* como *in vivo* se ha detectado la activación de la proteína S6 ribosomal (Verma *et al.*, 2005). Esta última es activada por p70S6K, quien a su vez es activada por mTOR en una cascada de fosforilación (ver Figura 2, página 14) (Laplante y Sabatini, 2009). Dicha activación es inhibible por rapamicina, lo que indica que esta proteína está siendo regulada por mTOR (Verma *et al.*, 2005). El mismo efecto se observa en axones no injuriados de ratones *knockout* para

TSC2, que presentan la vía mTOR activa en forma constitutiva (Verma *et al.*, 2005). En otro estudio se identificó *in vitro* e *in vivo* en axones el aumento en la expresión de la syntaxina-13 cuando la vía mTOR está activa (Cho *et al.*, 2014). La syntaxina-13 es una proteína que está descrita como potenciador del crecimiento axonal (Hirling *et al.*, 2000). Además se ha evidenciado que el aumento en la expresión de esta proteína es dependiente de la activación de mTOR y que en ausencia de syntaxina-13 disminuye la capacidad de crecimiento y regeneración axonal (Cho *et al.*, 2014).

A pesar de que el conocimiento que se tiene sobre la participación de la vía mTOR en la SPL y regeneración axonal es cada vez mayor, aún existen puntos que no están claros, especialmente estudiando los axones *in vivo*. Así como se estudió el efecto de la syntaxina-13 en la regeneración axonal, es importante identificar el papel de otros componentes regulados por mTOR que puedan participar en la regulación tanto de la SPL como de la regeneración en los axones. Identificando estos blancos, pensamos que podrá entenderse mejor cómo es la regulación de la SPL axonal, ya que mTOR es un regulador central y por tanto modifica muchas proteínas al mismo tiempo, lo que dificulta identificar qué componentes están participando en la modulación fina de estos procesos. En línea con esto es que nos interesa mencionar a un represor traduccional río abajo de la vía mTOR llamado *Programmed Cell death 4* (Pdc4) (Lankat-Buttgereit y Göke, 2009).

2.4.2. Posible participación de Pdc4 en la regulación de la síntesis proteica local y regeneración axonal

La proteína Pdc4 es un represor de la traducción que interacciona con el factor de iniciación de la traducción eIF4A, inhibiendo su actividad helicasa y bloqueando su unión con el factor eIF4G, dificultando entonces la formación del complejo de pre-iniciación de la traducción 43S (Goke *et al.*, 2002). Pdc4 presenta dos dominios de unión a eIF4A y un

tercer dominio de unión al ARN (Loh *et al.*, 2009). Se piensa que este dominio definiría la especificidad de Pdc4 para el reconocimiento de ciertos ARNm con determinadas estructuras secundarias, bloqueando su traducción (Biyanee *et al.*, 2014). No se han identificado aún un gran número de ARNm que sean blanco de regulación de esta proteína (Lankat-Buttgereit y Göke, 2009). Pdc4 está ampliamente descrita por su rol como supresor de tumores y es común que su expresión esté desregulada en diversos tipos de cáncer (Lankat-Buttgereit y Göke, 2009). Esta proteína es regulada por la vía mTOR, siendo uno de los blancos de fosforilación de p70S6K (ver Figura 2, página 14). Cuando p70S6K está activa (y por tanto la vía mTOR está activada), fosforila a Pdc4 siendo una señal para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (Dorrello *et al.*, 2006).

En la literatura no hay mucha información sobre el rol regulatorio de Pdc4 en la traducción en el sistema nervioso. En esta línea, se ha identificado a Pdc4 como regulador del efecto inhibitorio en la síntesis general de proteínas en neuronas corticales embrionarias en presencia de etanol (Narasimhan *et al.*, 2012). El aumento en las concentraciones de etanol en células corticales de ratón produce un aumento en la concentración de Pdc4 junto a una inhibición de la síntesis proteica. El silenciamiento de Pdc4 por ARNs interferentes bloquea este efecto inhibitorio en la síntesis de proteínas (Narasimhan *et al.*, 2012). Posteriormente se identificó en neuroblastos corticales *in vitro*, que el etanol aumenta la expresión de Pdc4 mediante la activación de la vía Wnt-3a/GSK-3 β (Riar *et al.*, 2014). Estos dos trabajos que hemos encontrado son los únicos que relacionan Pdc4 con funciones en el sistema nervioso. Por tanto, no hay datos en la literatura que relacionen el rol de esta proteína con la regulación traduccional en axones periféricos tanto *in vitro* como *in vivo*. Es posible que Pdc4 sea uno de los casos de proteínas que están descritas como reguladores en cáncer, que posteriormente se

describen sus roles compartidos en la regulación de procesos en sistema nervioso (Batista y Hengst, 2016).

Datos preliminares de nuestro grupo analizaron la distribución de Pdc4 en diferentes regiones del sistema nervioso *in vivo* identificando cambios en su expresión relacionados con procesos de plasticidad tanto en sistema nervioso periférico como central (Di Paolo, 2013). En relación con lo anterior, otro estudio de nuestro grupo en células PC12 diferenciadas a neuronas, muestra que un grupo de neuronas que tienen Pdc4 silenciado, presentan un mayor crecimiento en el largo de las neuritas que el grupo control (Eastman, 2016). Este dato, sumado a que Pdc4 es un represor traduccional y a los cambios que observamos en la expresión de esta proteína en procesos plásticos que incluyen la regeneración axonal periférica (Di Paolo, 2013), sugieren que esta proteína podría estar regulando parte del crecimiento axonal.

Dado que la SPL axonal y su regulación están estudiadas en su mayoría en modelos *in vitro* y que no se conoce el rol de Pdc4 en la regeneración axonal, es que planteamos el presente trabajo. Proponemos estudiar *in vivo* los sitios en donde se sintetizan localmente proteínas en el dominio axonal, incluyendo las *PARPs*. Respecto a estas últimas, si bien se ha descrito que presentan componentes necesarios para la síntesis de proteínas, se desconoce si efectivamente son centros activos de SPL axonal. En conjunto con el punto anterior, pretendemos analizar la activación de la vía mTOR como un regulador importante en la SPL axonal, con especial énfasis en el estudio de los cambios de expresión del represor traduccional Pdc4. Respecto a esta proteína, analizaremos en un modelo *in vitro* cómo influye en el crecimiento axonal mediante protocolos de ARN interferentes.

III) Hipótesis de Trabajo

La neo-síntesis proteica local en el dominio axonal es regulada en parte por componentes de la vía mTOR y en particular por Pdc4, cuyo papel como represor traduccional influiría en el crecimiento axonal.

IV) Objetivos

4.1. Objetivo General

Aportar conocimiento sobre los mecanismos de regulación de la traducción axonal.

4.2. Objetivos Específicos

- i) Estudiar la neo-síntesis proteica axonal mediante la detección fluorescente de aminoácidos análogos de la metionina (protocolos Click-IT) en combinación con la identificación inmunohistoquímica de elementos reguladores de la traducción, en criosecciones y tejidos transparentados (protocolos *CLARITY*).
- ii) Investigar los cambios en la expresión axonal de elementos reguladores de la traducción frente a una lesión o tras el uso de drogas que inhiban o activen la vía mTOR.
- iii) Estudiar el posible papel de Pdc4 como regulador traduccional en regeneración y crecimiento axonal.

V) Materiales y Métodos

Antes de describir los procedimientos realizados, nos interesa aclarar a que nos referimos en nuestros análisis con experimentos *in vivo* e *in vitro*. Experimentos *in vivo* son aquellos en donde utilizamos piezas de tejido nervioso de pez dorado o de rata, los incubamos en diversas condiciones y los procesamos por diferentes metodologías. Experimentos *in vitro* son aquellos donde utilizamos líneas celulares o células disociadas en cultivo.

5.1. Animales y procedimientos quirúrgicos

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratas de la cepa *Sprague Dawley* de entre 6 y 10 meses de edad, criadas en el bioterio de roedores del Instituto Clemente Estable siguiendo las normas y protocolos de cuidado aprobados por la CNEA. En todos los casos las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación. En el caso de los peces dorados, éstos fueron adquiridos en un acuario certificado y criados en el bioterio de poiquiloterms del Instituto Clemente Estable. Fueron anestesiados por inmersión en etil-3-aminobenzoato-metano-sulfonato (MS-222) a una concentración de 120 mg/L y luego sacrificados por lesión en los lóbulos cerebrales.

En los casos donde se realizan experimentos de lesión de nervio ciático en ratas, los animales son anestesiados de acuerdo a su peso con ketamina/xilazina (100mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente) por inyección intraperitoneal. Luego se separa la musculatura en la pierna a la altura del fémur hasta ubicar el nervio ciático. En este punto se realiza la axotomía produciendo una lesión en el nervio quedando separadas su parte proximal, que estará en contacto con los somas neuronales y la distal que no está en contacto con los mismos. Se vuelve a cerrar la herida con el nervio ya lesionado y se esperan 18 horas hasta que se sacrifica el animal por decapitación. Posteriormente se extrae el cabo

proximal del nervio ciático lesionado y el nervio ciático no injuriado de la otra pierna como control sin lesión. Tanto el procedimiento quirúrgico como el método para sacrificar los animales fueron aprobados por la CNEA. El número de registro del protocolo aprobado es el 005/01/2014.

Los animales utilizados para los experimentos que involucraron el análisis de expresión de *Pdcd4 in vitro* fueron criados en el *Queens Medical Center* de la Universidad de Nottingham, Inglaterra, de acuerdo a las normativas vigentes de dicha universidad. Los métodos para sacrificar las ratas y ratonas preñadas en los días 18 y 16 de gestación respectivamente, así como los protocolos de extracción de los embriones se hicieron de acuerdo a las normativas vigentes de los comités de ética de la Universidad de Nottingham.

5.2. Estrategia para el análisis de proteínas neo-sintetizadas mediante microscopia confocal

El protocolo para el análisis de proteínas neo-sintetizadas utilizado se conoce con el nombre comercial de "*Click iT*" y se basa en la utilización de aminoácidos análogos de la metionina (Dieterich *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2012; Kim y Jung, 2015). Consiste en la incorporación de aminoácidos modificados de metionina en las proteínas neo-sintetizadas durante un tiempo de incubación definido. El fabricante ofrece 2 opciones de aminoácidos de metionina modificados. En nuestro caso contamos con el aminoácido homopropargilglicina (HPG) que contiene un grupo alcalino asociado (ver Figura 3). Primero se incuban las piezas de tejido en medio DMEM sin metionina durante 1 hora para depletar las reservas endógenas de dicho aminoácido. Posteriormente se incuban en medio DMEM que incluya el aminoácido HPG, siendo éste el que se incorporará en las proteínas neo-sintetizadas. Se procede con la fijación y detección del aminoácido HPG

mediante su reconocimiento específico por un grupo azida conjugado a un fluoróforo, en nuestro caso un Alexa Fluor Azida 594 nm. Dicha detección se hace en presencia de iones de cobre, generando un enlace covalente estable entre el aminoácido HPG y el componente azida-fluorescente (ver Figura 3). Como controles del experimento, se realizan en paralelo otras 3 incubaciones. La primera es en ausencia del aminoácido HPG, de modo que puedan cuantificarse las uniones inespecíficas del componente fluorescente al tejido. La segunda incubación es en presencia del aminoácido HPG, pero la reacción de reconocimiento de dicho aminoácido modificado se hace en ausencia del componente fluorescente, para detectar así la auto-fluorescencia del aminoácido HPG. El tercer control consiste en realizar una incubación en presencia del aminoácido HPG al cual se le agrega un inhibidor de la traducción, en este caso cicloheximida. Si la señal detectada es inhibida por esta droga, corresponde a proteínas neo-sintetizadas. La Figura 3 muestra un esquema con los pasos anteriormente detallados. Finalizado el período de incubación, las piezas de tejido pasan a uno de los protocolos detallados a continuación. El primero de ellos corresponde a la puesta a punto de la técnica utilizando células en cultivo.

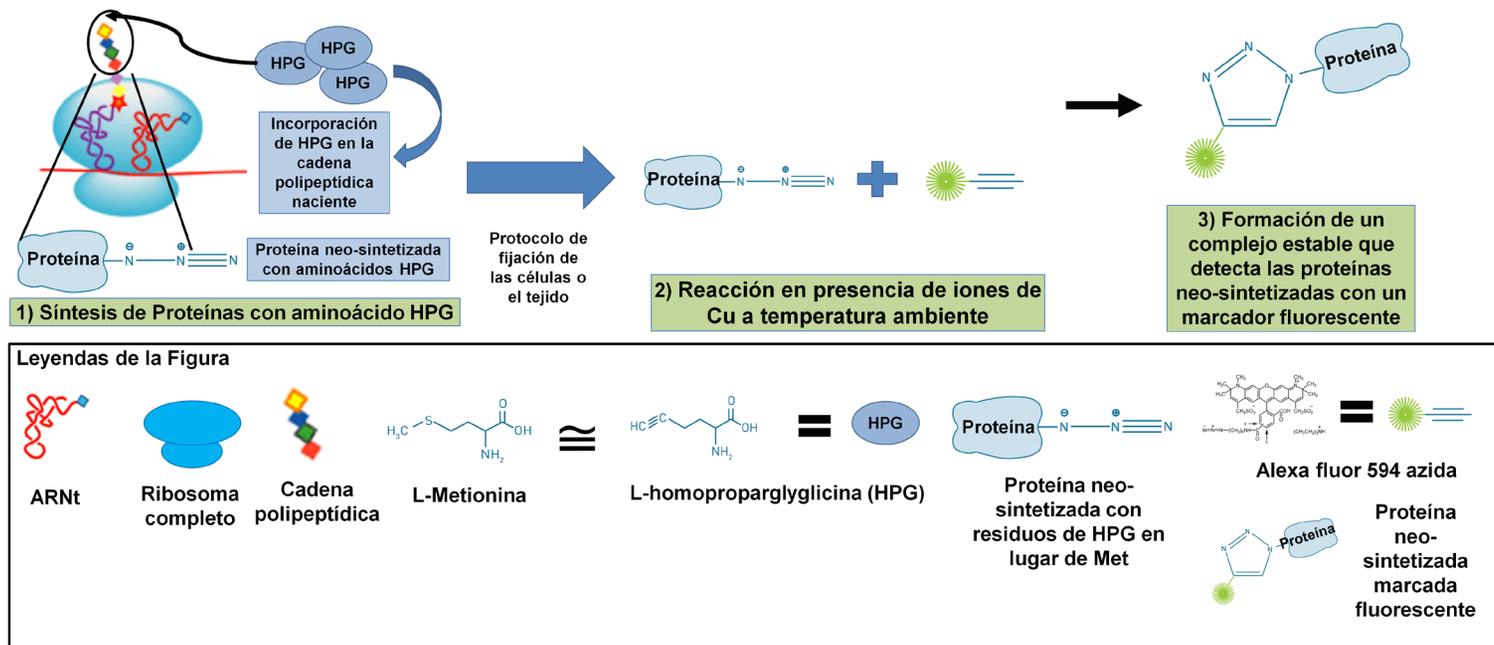


Figura 3. Esquema de los pasos básicos para la detección de las proteínas neo-sintetizadas realizando la reacción del *Click iT*. El paso número 1 involucra la síntesis de proteínas incorporando el aminoácido HPG en lugar de los residuos de Metionina. El paso 2 es la reacción de identificación del aminoácido HPG a través de un marcador fluorescente. El paso 3 es la obtención de proteínas neo-sintetizadas identificadas por fluorescencia. El recuadro en negro muestra las leyendas de cada símbolo utilizado en el esquema y las estructuras químicas del aminoácido HPG (comparándolo con la Metionina) y del Alexa fluor azida 594 nm.

5.2.1. Análisis de proteínas neo-sintetizadas en cultivo celular

Se utilizaron fibroblastos de la línea celular NIH-3T3 en un 70-80% de confluencia. Se incubaron durante 1 hora en medio DMEM sin metionina y posteriormente durante 4 horas en DMEM en presencia del aminoácido HPG. Paralelamente se tienen otras 3 preparaciones en medio DMEM sin metionina para realizar los controles descritos anteriormente (sin aminoácido HPG; con aminoácido HPG pero durante la reacción para su identificación no se utiliza la azida conjugada al fluoróforo; con el aminoácido HPG y cicloheximida). Para el control que incluye el aminoácido HPG y cicloheximida, la concentración de uso de dicha droga fue de 100 µg/ml en DMSO. Se utilizaron dos concentraciones finales del aminoácido HPG: 40 µM (concentración 1x) y 200 µM (concentración 5x). A su vez, la concentración total de DMSO en el cultivo nunca superó el 0.1%. Posteriormente a la incubación, las células son fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer PHEM pH 7.4 (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂) y luego se pasa a la incubación en buffer de bloqueo (2% glicina, 3% BSA en buffer PHEM) 30 minutos, 37°C. Posteriormente se realiza la reacción de detección del aminoácido HPG de acuerdo a las instrucciones del fabricante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se montan en porta-objetos con un medio de montaje comercial, *Pro Long anti fade*. Las imágenes obtenidas mediante este protocolo son planos focales únicos de microscopía confocal. La Figura 4 muestra los pasos de este protocolo.

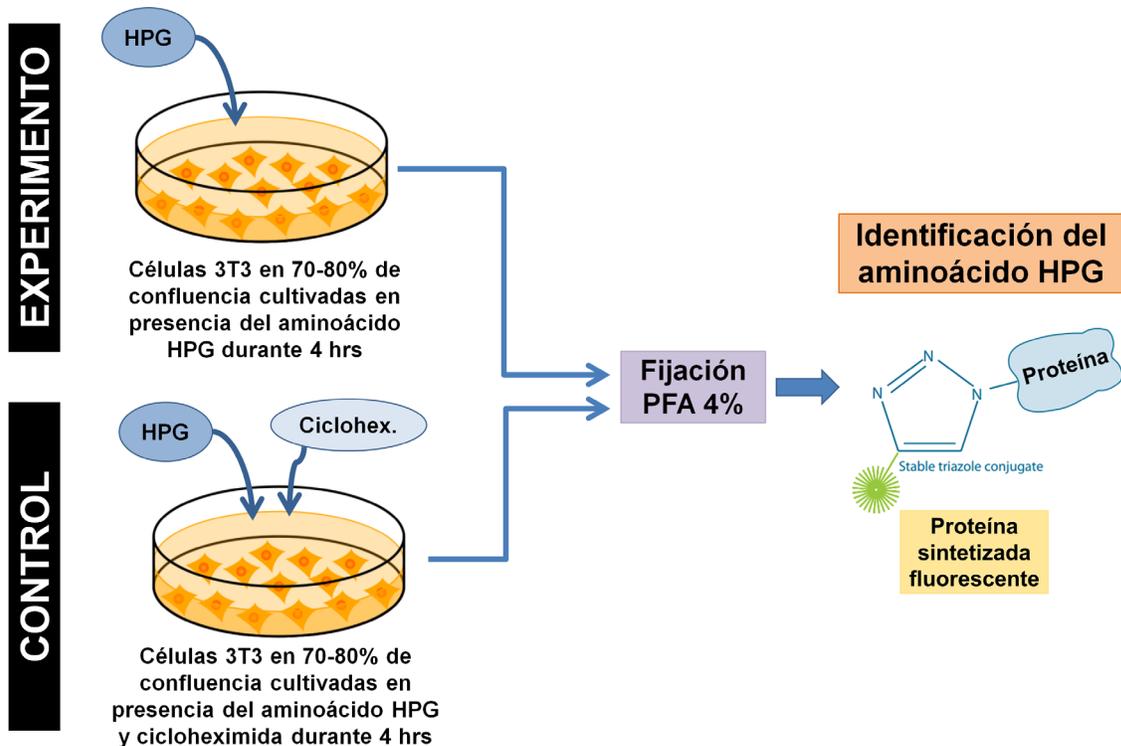


Figura 4. Esquema mostrando los pasos básicos del protocolo de análisis de proteínas neo-sintetizadas en Fibroblastos en cultivo. Se representan dos incubaciones donde en ambas se incluye el aminoácido HPG, pero en un caso se agrega el inhibidor de la síntesis proteica: cicloheximida (condición control).

5.2.2. Análisis en piezas de tejido incubadas con el aminoácido HPG

Desarrollamos tres protocolos para el análisis de proteínas neo-sintetizadas en tejidos

5.2.2.1. Crio-secciones

Se incubaron los nervios enteros (raíces ventrales, nervios ciáticos o médula de pez dorado) 1 hora en medio DMEM sin metionina y posteriormente en DMEM sin metionina sólo en presencia del aminoácido HPG (concentración 5x) o con dicho aminoácido junto con cicloheximida a una concentración final de 100 µg/mL en DMSO. Se tuvo en cuenta que la concentración final de DMSO en el cultivo nunca superara el 0.2%. Los tiempos de incubación utilizados fueron: 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 y 360 minutos. Tras la etapa de incubación, los nervios fueron fijados en paraformaldehído 4% en buffer PHEM pH 7.4,

lavados 3x5 minutos en buffer PHEM y crio-protegidos en sacarosa al 15% por 24 horas y luego al 30% por 48 horas, preparadas también en el mismo buffer. Posteriormente los nervios se incuban en pocillos conteniendo el medio de inclusión comercial "*tissue Tek*" para luego realizar cortes por congelación en rodajas de 20 μm , recogidas en portaobjetos pre-tratados con poly-L-Lisina. Sobre los mismos, se realiza una incubación en buffer de bloqueo (2% glicina, 3% BSA en buffer PHEM pH 7.4), 30 minutos, 37°C. Tras esta etapa se realiza la reacción de detección del aminoácido HPG sobre los cortes de acuerdo a las especificaciones del fabricante durante 45 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se incuba con los anticuerpos primarios ON a 4°C en buffer de bloqueo, se realizan 3x10 minutos de lavado en buffer PHEM y posteriormente se incuban con los anticuerpos secundarios 2 horas a temperatura ambiente con buffer de bloqueo + 5% NGS. Luego se realizan lavados 3x10 minutos en buffer PHEM y montaje en Pro Long Antifade, un medio de montaje comercial. En la Tabla 1 (página 47) se detalla todos los anticuerpos y las diluciones utilizadas en cada caso. Todas las imágenes presentes en esta tesis que fueron obtenidas mediante este protocolo son planos focales únicos de microscopía confocal. La Figura 5 muestra los pasos de este protocolo.

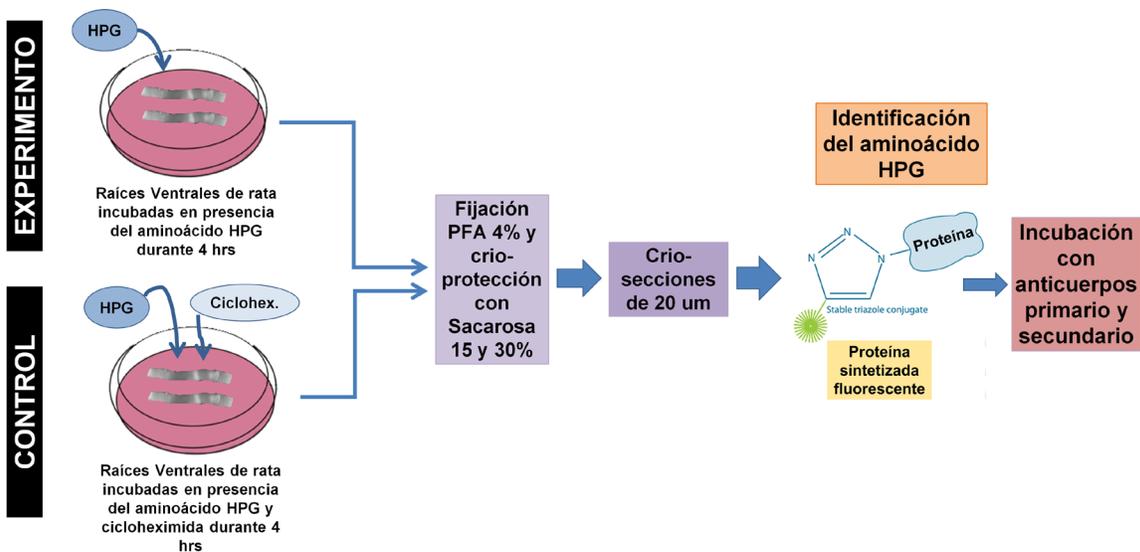


Figura 5. Esquema mostrando los pasos básicos del protocolo para el estudio de proteínas neo-sintetizadas en raíces ventrales sometidas al protocolo de crio-secciones. Se representan las dos incubaciones realizadas donde en ambos casos se incluye el aminoácido HPG, pero en un caso se agrega el inhibidor de la síntesis proteica: cicloheximida (condición control).

5.2.2.2. Extruido de axoplasmas y estudio de proteínas neo-sintetizadas

Se incubaron raíces ventrales 1 hora en medio DMEM sin metionina. Posteriormente se incubaron 4 horas en medio DMEM sin metionina en presencia del aminoácido HPG (concentración 5x) y paralelamente se realizó otra incubación con dicho aminoácido y cicloheximida 100 μ g/mL. Se toman las raíces y se incuban en solución de acetato de zinc 30 mM pH 4.8 durante 10 minutos, pasando luego a la solución de *pulling* con una concentración de ácido aspártico de 40 mM neutralizado por tris base y un pH de 5.5, según el protocolo de extracción de axoplasmas diseñado por Koenig y colaboradores (Koenig *et al.*, 2000). La solución stock de *pulling* contiene 0.2 M de ácido aspártico, 0.22 mM de tris base, 5 mM de azida de sodio, y 0.1% de Tween-20, pH de 5.5. En presencia del acetato de zinc, se produce una fijación del tejido y en la solución de *pulling* es en donde se extraen los axoplasmas mediante utilización de pinzas de disección número 5. Posteriormente, los axoplasmas son extraídos y adheridos en cubre-objetos pre-tratados

con xilano al 1% en etanol absoluto. Luego se realiza el protocolo de fijación en PAF 4%, 15 minutos y posterior revelado del aminoácido HPG durante 30 minutos. Se los incuba 15 minutos a temperatura ambiente con YOYO-1, se montan en porta-objetos y se toman imágenes por microscopía confocal. En la Tabla 1 se incluyen las diluciones de los anticuerpos y sondas utilizadas. La Figura 6 muestra los pasos correspondientes a este protocolo.

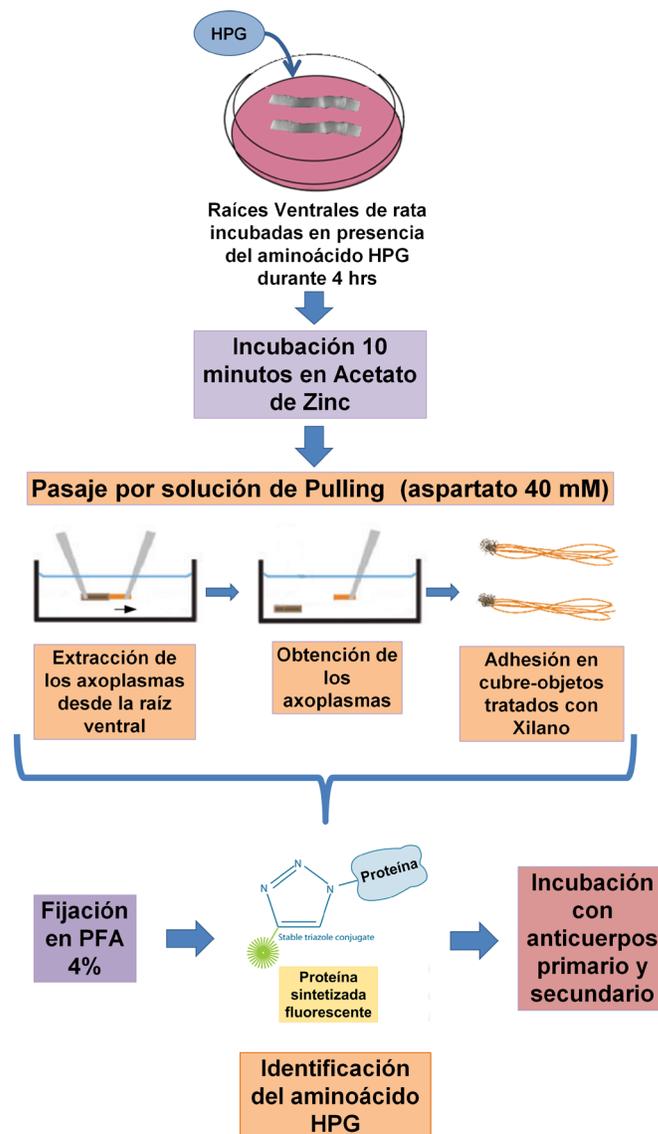


Figura 6. Esquema mostrando los pasos básicos del protocolo de análisis de proteínas neo-sintetizadas en raíces ventrales sometidas al protocolo de extruido de axoplasmas.

5.2.2.3. Protocolo de transparentación de tejidos enteros y estudio de proteínas neo-sintetizadas

Adaptamos para raíces ventrales y médula espinal de pez dorado el protocolo de transparentación de tejidos desarrollado por Deisseroth y colaboradores para cerebro de ratón denominado *CLARITY* (por las siglas en inglés de: “*Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging / Immunostaining / In situ hybridization-compatible*”) (Chung *et al.*, 2013). Su principio es la selectiva delipidación del tejido sin afectar las concentraciones o distribución espacial de las proteínas y ácidos nucleicos presentes en el mismo. Una gran ventaja de este método frente a otras metodologías de transparentación es que la química que hay por detrás de la extracción de los lípidos es a través de la formación de micelas en un detergente iónico y no mediante solventes hidrofóbicos orgánicos como la urea, BABB, entre otros. Éstos últimos se han visto que producen una extinción (“*quenching*”) rápida de la fluorescencia y además no aseguran una conservación en cantidad y distribución espacial de las proteínas (Hama *et al.*, 2011; Yokomizo *et al.*, 2012). La Figura 7 muestra los pasos básicos del protocolo que adaptamos para raíces ventrales de rata y médula espinal de pez dorado.

El protocolo consiste en incubar las piezas de tejido en medio DMEM sin metionina durante 1 hora. Luego se incuban en medio DMEM sin metionina durante 4 horas en presencia del aminoácido HPG (concentración 5x). Una vez terminada la incubación con el aminoácido HPG, se realiza la fijación del tejido en una solución llamada “solución de hidrogel” que contiene 4% acrilamida, 0.05% bis-acrilamida, 4% paraformaldehído (PFA) y 0.25% de un iniciador de la polimerización dependiente de la temperatura llamado VA044, todo en 1x de buffer PBS pH 7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 2mM KH₂PO₄). El componente VA044 cataliza la polimerización de la acrilamida y bis-

acrilamida a temperaturas cercanas a los 37°C. La solución se prepara de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se guarda a -20°C en tubos falcon de 15 ml conteniendo unos 12 ml de solución, de modo que solo quede una pequeña interfaz de aire al cerrar el tubo. Se toma una alícuota y se la deja a temperatura ambiente (TA) hasta que se descongele. Cuando ya está descongelada, se la coloca en hielo para evitar su polimerización prematura. En este paso se incuban las piezas de tejido durante 2 días a 4°C, con agitación, con el objetivo de favorecer la entrada de los monómeros del hidrogel no polimerizados y el PFA al interior de las células del tejido. Durante esta etapa se da el entrecruzamiento del PFA con los componentes del tejido y la unión covalente de los monómeros del hidrogel a las proteínas, glúcidos y ácidos nucleicos, pero no a los lípidos. Pasado este tiempo, se pasa a la polimerización de la solución conteniendo las piezas de interés. Primero se realiza un intercambio de la atmosfera rica en oxígeno presente en el tubo por una con exceso de nitrógeno mediante inyección gaseosa del mismo. Este paso favorece la polimerización de la acrilamida ya que el oxígeno es un inhibidor del proceso. Posteriormente se cierra herméticamente el tubo con las piezas de tejido en su interior y se lo incuba a 37°C durante 3 horas, tiempo suficiente para alcanzar una polimerización completa. En este paso se alcanza un nuevo estado “híbrido” entre las biomoléculas del tejido y el hidrogel polimerizado, a excepción de los lípidos que carecen de un grupo funcional que les permita conjugarse al hidrogel. La eliminación selectiva de los lípidos es el principio básico del protocolo de transparentación (Chung *et al.*, 2013). De esta forma, el tejido adquiere un nuevo estado con aspecto y características de gel, en donde la penetración de marcadores de interés y la visualización de los mismos son más sencillas y la distribución de las estructuras no se ven modificadas (Chung *et al.*, 2013). La desaparición de los lípidos producirá: una rápida y más eficiente entrada de anticuerpos u otras sondas con las que se deseen marcar las piezas previo a su observación y un

cambio en el índice de refracción del tejido lo que aumenta su transparencia y una entrada más uniforme de la luz. Esto último favorece su observación al microscopio hasta regiones profundas, del entorno de los 300 μm . Para llevar a cabo la delipidación, se incubaba el tejido (ya polimerizado en la solución de hidrogel) con SDS 4% pH=8.5 ajustado con NaOH. A este pH, se produce la formación de micelas con carga negativa que se asocian a los lípidos. En nuestro caso lo realizamos durante al menos una semana a 37°C con agitación y cambios por SDS fresco cada 2 días. El punto final del proceso se da cuando el tejido alcanza un estado de transparencia como el de la Figura 7C. En este punto, se realizan lavados con PBS-Triton-X 0.1% (PBST) durante 2 días. En esta etapa el tejido pasa a estar menos transparente debido al cambio en el índice de refracción producido por el PBST. Posteriormente se bloquean las piezas de tejido en buffer de bloqueo (2% glicina, 3% BSA en buffer PBS) durante 1 día a temperatura ambiente con agitación. A partir de este punto, se realizan las incubaciones con sondas, anticuerpos y otros elementos que quieran ser detectados. En nuestro caso realizamos la reacción del revelado del *Click iT* 3 hrs a TA y posteriormente la incubación con sondas y los anticuerpos primario y secundario detallados en la Tabla 1. Los tiempos de incubación son de al menos 2 días a 4°C para el anticuerpo primario y las mismas condiciones para el anticuerpo secundario con 1 día de lavado en PBST tras cada etapa. Finalmente, se incuban las piezas de tejido en glicerol al 80% en PBS, etapa en la cual adquieren el estado de máxima de transparentación (Figura 7F). Se montan los preparados y se toman imágenes por microscopia confocal. Los valores de fotomultiplicador utilizados en el canal de detección de la señal para las proteínas neo-sintetizadas fueron 100 veces mayores que en el caso de la señal detectada en las crio-secciones.

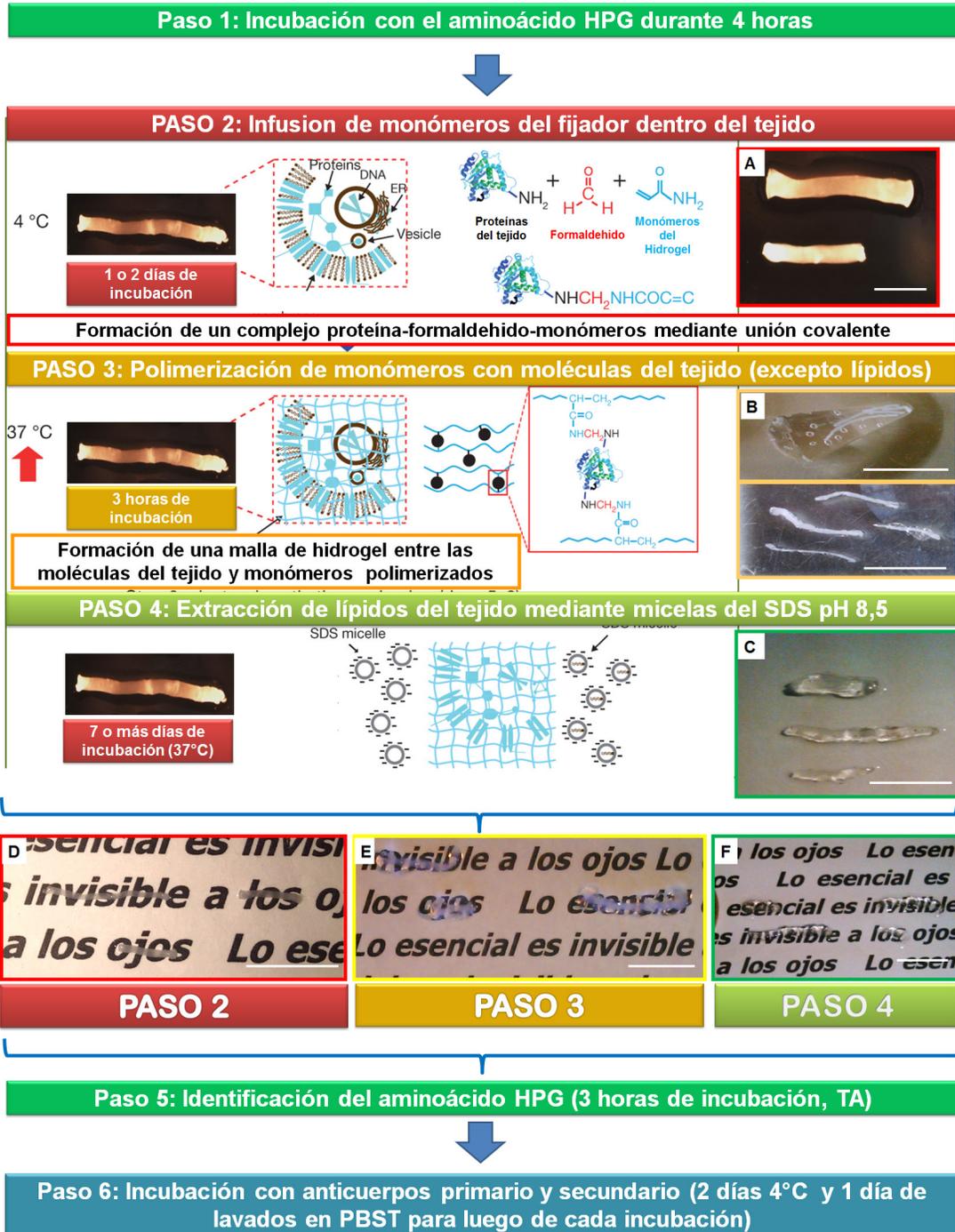


Figura 7. Protocolo de transparentación de tejidos “CLARITY” adaptado para raíces ventrales y médula espinal de pez dorado. La figura fue adaptada de (Chung et al., 2013). Barras de escala: 0.5 mm.

5.3. Modulación de la vía mTOR en raíces ventrales utilizando las drogas rapamicina y bpV(pic)

Se toman raíces ventrales y se incuban 1 hora en medio DMEM sin metionina. Posteriormente se las separa en 4 grupos y se incuban 4 horas en medio DMEM sin metionina junto con: el aminoácido HPG (concentración 5x) y cicloheximida 100 µg/ml, solo el aminoácido HPG (concentración 5x), el aminoácido HPG (concentración 5x) y rapamicina 1 µM y el aminoácido HPG (concentración 5x) y *Dipotassium Bisperoxovanadium(pic) dihydrate* (bpV(pic)) 10 µM. Las alícuotas de los reactivos utilizados están diluidas en DMSO, por lo cual se verificó que la concentración del mismo no fuese mayor al 0.2% y que el volumen de DMSO en cada condición siempre fuera el mismo. Una vez finalizada la etapa de incubación, se procedió con el protocolo de crio-secciones tal cual se detalla en la sección 5.2.2.1. La droga rapamicina produce una inhibición en la activación de la vía mTOR (Wang y Proud, 2006). En cambio la droga bpV(pic) es un inhibidor de PTEN (Chen et al., 2015b) quien a su vez es un inhibidor de la vía mTOR (Christie et al., 2010). Por tanto bpV(pic) es un activador de la vía mTOR. La figura 8 resume los pasos de este experimento.

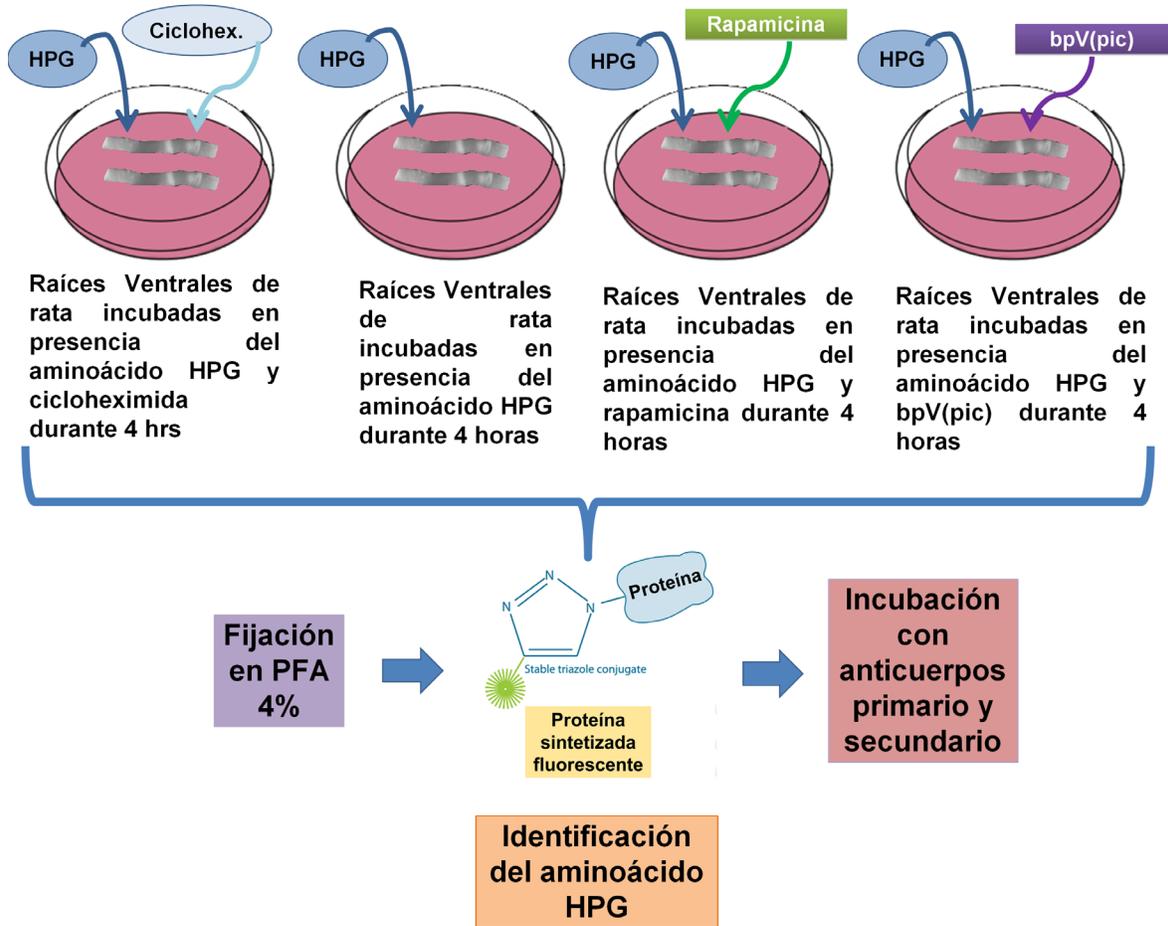


Figura 8. Protocolo de modulación de la vía mTOR mediante el uso de las drogas rapamicina y bpV(pic). Se describen las cuatro condiciones experimentales, todas en presencia del aminoácido HPG. También se incluye el control con cicloheximida y las incubaciones en presencia de rapamicina (inhibe la activación de la vía mTOR) y bpV(pic) (activador de la vía mTOR).

5.4. Silenciamiento de la proteína Pcd4 en neuronas DRGs embrionarias de rata *in vitro*

El protocolo de silenciamiento de Pcd4 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal embrionarias (DRGs) fue desarrollado en cámaras compartimentalizadas de 2 canales utilizando un coctel de ARNs interferentes permeables (Vagnoni *et al.*, 2012) que reconocen distintas regiones de la secuencia del ARNm de Pcd4 (Darbinyan *et al.*, 2013).

5.4.1. Características principales de los ARNs interferentes empleados

La tecnología utilizada es la de *Accel siRNA* de la empresa Dharmacon, en su modalidad *SMART-Pool siRNA*. Consiste en un grupo de 4 secuencias de ARN interferentes de 25 nucleótidos donde cada una reconoce específicamente diferentes regiones del ARNm de *Pdcd4*. Al hibridar con su secuencia blanco, bloquean la traducción del mensajero. A las 24 horas se espera una disminución significativa en los niveles del transcripto y a las 96 horas en los niveles de la proteína. Como control se utiliza un pool de 4 ARNs interferentes cuyas secuencias no tienen ningún blanco en el genoma de rata. La característica principal de estos ARNs interferentes es que son permeables a las membranas celulares sin necesidad de realizar protocolos para que puedan ingresar a las células. Por estas razones son utilizados para transfecciones en neuronas *DRGs* (Vagnoni *et al.*, 2012). La concentración final de uso es 1 μ M. La Figura 9 muestra un esquema de las cámaras compartimentalizadas utilizadas.

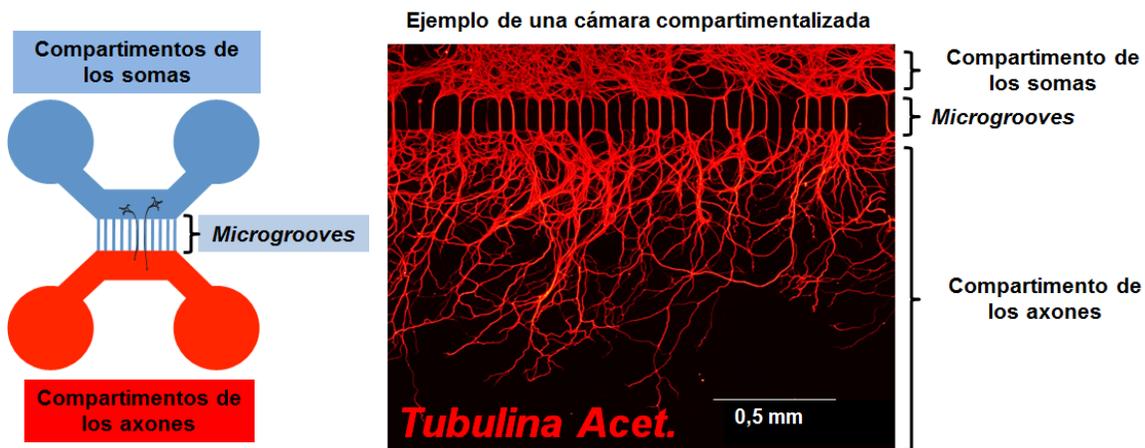


Figura 9. Esquema de las cámaras compartimentalizadas de dos canales y ejemplo de neuronas DRGs mostrando los axones creciendo hacia uno de los compartimentos. El esquema de la izquierda muestra las partes básicas de las cámaras de dos canales, indicando en celeste los compartimentos de los somas y los canales por donde pasarán los axones ("microgrooves"). En rojo se indican los compartimentos hacia donde crecerán los axones. La figura de la derecha es un ejemplo de una cámara compartimentalizada observada al microscopio con neuronas DRGs tras 4 días de cultivo que fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo anti-tubulina acetilada. Barra de Escala 0.5 mm.

5.4.2. Obtención de neuronas *DRGs* embrionarias de rata en el día 18 de desarrollo (E18)

El día previo a la extracción de los ganglios, se toman placas de Petri de 35 mm, se lavan con etanol 70% y se las trata luego con Poly-L-lisina toda la noche (ON) en campana de flujo laminar. Por otro lado, se lavan las cámaras compartimentalizadas en etanol 95% 2x10 minutos y luego en agua destilada. Al día siguiente se quita la Poly-L-lisina de las placas de Petri, se lavan con agua destilada y se dejan secar dentro de la campana de flujo laminar. Luego se colocan las cámaras compartimentalizadas dentro de las placas tratadas y se pipetea 50 μ L de laminina en DMEM (concentración de 20 μ g/mL) en 2 compartimentos que no estén conectados. Se pipetea arriba y abajo para que el exceso de medio con laminina pase también hacia los otros 2 compartimentos conectados. Se conservan las placas tratadas en campana de flujo laminar hasta su uso.

Una vez preparadas las cámaras, se sacrifica la rata preñada en el día 18 de gestación y se extraen los embriones, colocándolos en medio DMEM con alta concentración de glucosa (en una concentración de 4.5 g/L). Bajo lupa, se los expone con la cara dorsal hacia arriba y utilizando pinzas número 5 se extrae la médula espinal, dejando expuestos los ganglios. Éstos se toman con una pinza número 4 y se los coloca en una placa de 35 mm con medio DMEM alto en glucosa. Una vez que se han extraído todos los ganglios de todos los embriones, se tiene un pool de neuronas *DRGs* procedentes de todos los embriones. Se toman 25 ganglios con una pipeta Pasteur y se los incuba 30 min 37°C, 5% CO₂ en un tubo falcon con 2 mL de DMEM alto en glucosa + colagenasa tipo II al 0.1% (previamente filtrada con papel de filtro de 0.2 μ m). Se repite el proceso para otros 25 ganglios, de modo que se obtienen 2 tubos con 25 ganglios cada uno. La incubación en colagenasa tipo II favorece la disociación de los somas de neuronas presentes dentro de

cada ganglio. A partir de este momento se comienza a trabajar en campana de flujo laminar vertical tipo II.

Tras la incubación en colagenasa tipo II, se extrae la mayor cantidad de medio posible en ambos tubos y sobre el pellet de ganglios se agregan 500 μL de medio DMEM al que denominaremos “completo” pre-calentado a 37°C que contiene: B27 2%, glutamato 2 mM, antibióticos PE (penicilina-estreptomicina) 1%, NGF 50 ng/mL, GDNF 50ng/uL y APH 4 μM . En este mismo medio se pipetea arriba y abajo para disociar los ganglios hasta obtener una solución más o menos homogénea, obteniéndose neuronas disociadas. En ese punto se centrifugan 5 minutos a 1000 g y se descarta el sobrenadante. El pellet de células se resuspende en medio DMEM completo en el volumen necesario según el número de cámaras que se van a utilizar. Se utilizan 20 μL del medio con ganglios disociados por cámara, sembrando 10 μL por compartimento no conectado. En nuestro caso utilizamos por cada experimento 6 cámaras compartimentalizadas: 3 réplicas donde se incuba el ARN interferente para *Pdcd4* y otras 3 correspondientes al ARN interferente control. Se necesitan entonces 120 μL de medio completo con las neuronas *DRGs* disociadas para sembrar en las 6 cámaras. Por tanto, se resuspendieron las neuronas *DRGs* disociadas de cada tubo en 60 μL .

Se extrae la laminina previamente incubada en las cámaras compartimentalizadas y se siembran 10 μL del medio completo con los ganglios en cada compartimento no conectado, que son 2 por cada cámara. Se incuban 30 minutos a 37°C , 5% CO_2 . En este lapso se prepara el coctel con los ARNs interferentes para *Pdcd4* y los correspondientes al grupo control. Se siembran 100 μL de volumen final en los compartimentos donde ya se agregaron 10 μL de medio con ganglios. Por tanto hacen falta 90 μL de medio completo en cada compartimento. Se prepara entonces un cóctel con 540 μL de medio completo

con el ARN interferente de Pdc4 a una concentración final de 1 μ M. Se mezcla y se agregan 90 μ L en cada uno de los compartimentos donde ya se sembraron los ganglios en las cámaras para analizar el silenciamiento de Pdc4. Paralelamente se realiza un coctel con 540 μ L de medio completo y el ARN interferente control a una concentración de 1 μ M. Se mezcla y se siembran 90 μ L en los compartimentos de las cámaras control. Por último, en todos los compartimentos donde crecerán los axones, completamos con 150 μ L de medio completo. El mayor volumen presente en el compartimento axonal respecto al de los somas, asegura que el ARN interferente esté presente en el compartimento de los somas y no difunda al compartimento de los axones.

La incubación de los ganglios en presencia del ARN interferente se realiza durante 4 días a 37°C, 5% CO₂. Pasado este tiempo, se retiran las cámaras compartimentalizadas y se fijan las neuronas DRGs en las placas de Petri con paraformaldehido 4% en buffer PBS 30 minutos, TA y 3x5 minutos en PBS. Luego se bloquean en buffer de bloqueo 2% Glicina, 3% BSA en buffer PBS. Posteriormente se incuban los anticuerpos primarios Pdc4 (dilución de uso 1/200) y anti-tubulina acetilada (dilución de uso 1/100) ON, 4°C. Luego se lavan en buffer PBS 3x10 minutos y se incuban con los anticuerpos secundarios GAM 488 (dilución de uso 1/1000) y GAR 555 (dilución de uso 1/1000) 2 horas a TA. Se lavan 3x10 minutos en buffer PBS y finalmente se montan en medio de montaje comercial Vecta-Shield con DAPI y se observan con el microscopio de epifluorescencia invertido Leica DM-IRE2. La Figura 10 describe en forma resumida los pasos desarrollados en este protocolo.

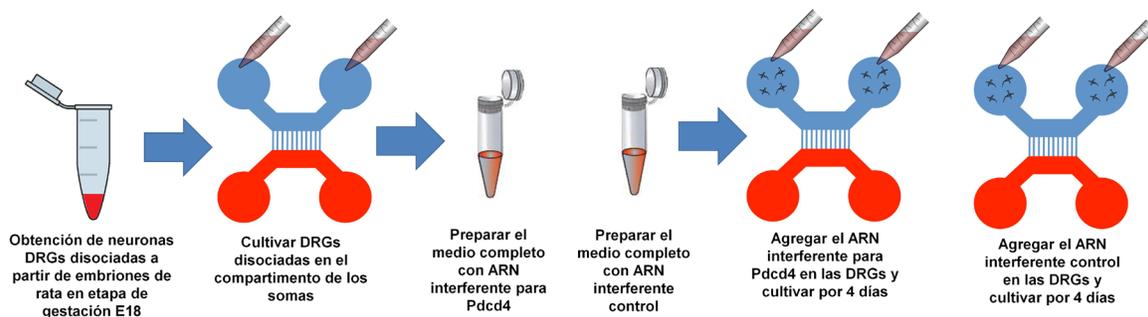


Figura 10. Pasos básicos del protocolo de cultivo de neuronas DRGs en estadio E18 de rata en cámaras compartimentalizadas de 2 canales en presencia del ARN interferente para Pdc4 o el ARN interferente control durante 4 días.

5.5. Cultivo de neuronas corticales embrionarias de ratón en el día 16 de desarrollo (E16) e inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Pdc4

El día previo a la extracción de las neuronas corticales, se toman placas multiwell de 6 pocillos con cubre-objetos y se los trata con Poly-L-Ornitina ON, TA en campana de flujo laminar. Se lavan 2 veces con agua destilada y se las dejan secar. Posteriormente se sacrifica la ratona preñada en el día 16 de gestación y se extraen los embriones, colocándolos en medio DMEM con alta concentración de glucosa (concentración de 4.5 g/L). Bajo lupa, se toma cada embrión, se coloca una pinza entre los ojos y se hace un corte con tijera fina a lo largo de la comisura central y a los costados del cráneo, dejando expuesto el cerebro. Luego se extrae el cerebro con una espátula y se coloca en una placa de Petri con medio HBSS + Ca²⁺. Se extraen las meninges utilizando pinzas, se separan los hemisferios izquierdo y derecho y a cada uno se le extrae el mesencefalo, quedando solamente la corteza del cerebro. Se repite el proceso en 5 cerebros y en el mismo medio se disgregan mecánicamente mediante el uso de pinzas. Luego se los incuba en un tubo que contiene 2 mL de medio HBSS + Ca²⁺ con 1% DNAsa y 10% tripsina durante 30 minutos, 37°C, 5% CO₂. Luego se agregan 100 µL de un inhibidor de tripsina y 6 mL de medio que denominaremos “completo” que contiene: medio neurobasal

+ 2% B27 + Glutamax 1x y se incuban 15 minutos, 37°C, 5% CO₂. Se forma entonces un pellet con las neuronas corticales parcialmente dissociadas. Se quita el sobrenadante y se agrega 2 mL de medio completo con 1% de DNAsa. Se pipetea arriba y abajo varias veces para terminar de dissociar las neuronas corticales. Se debe obtener una solución homogénea, con las neuronas corticales en suspensión. Se agrega a la preparación 8 mL de medio completo y se centrifuga a 250g durante 5 minutos. Posteriormente se resuspende el pellet en 5 mL de medio completo (la proporción es 1 ml de medio completo por cerebro procesado). Esta concentración de neuronas corticales es muy alta para estudios de inmuno-histoquímica, por lo cual se toma 1 mL y se lo diluye en 14 mL de medio completo. Se siembran luego en las placas pre-tratadas con Poly-L-ornithina y se las incuban durante 2, 5 y 12 días, 37°C, 5% CO₂, agregando medio completo cada 3 días. Tras los tiempos de incubación, las células son fijadas en paraformaldehído 4% en buffer PBS durante 30 minutos, TA y 3x5 minutos lavados en PBS. Luego se bloquean en buffer de bloqueo 2% Glicina, 3% BSA en buffer PBS. Posteriormente se incuban los anticuerpos primarios Pdcd4 (dilución de uso 1/200) y anti-tubulina acetilada (dilución de uso 1/100) ON, 4°C. Luego se lavan 3x10 minutos en buffer PBS y se incuban con los anticuerpos secundarios GAM 488 (dilución de uso 1/1000) y GAR 555 (dilución de uso 1/1000) 2 horas a TA. Finalmente se montan en medio de montaje Vecta-Shield con DAPI y se observan con el microscopio de epifluorescencia Leica DM-IRE1. La Figura 11 describe en forma resumida los pasos desarrollados en este protocolo.

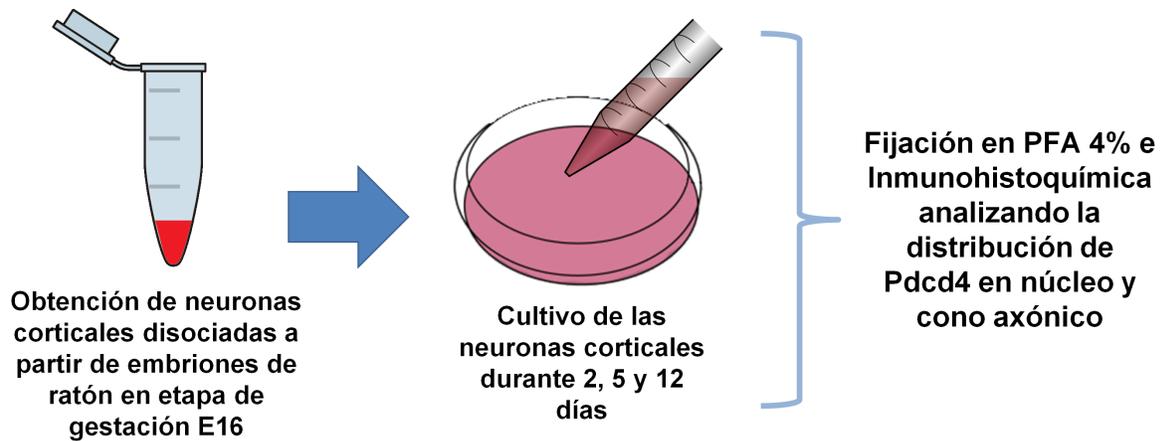


Figura 11. Pasos básicos del protocolo de cultivo de neuronas corticales en estadio E16 de ratón para realizar análisis de expresión de la proteína Pcd4 por inmunohistoquímica en los días 2, 5 y 12 de cultivo.

5.6. Adquisición de Imágenes mediante microscopía confocal y de epifluorescencia

5.6.1. Microscopios y software de adquisición de imágenes utilizadas

El microscopio utilizado para la adquisición de las imágenes de raíces ventrales, ciáticos, médula de pez dorado y los fibroblastos 3T3 es el microscopio confocal *OLYMPUS FV300* del Instituto Clemente Estable, utilizando un objetivo de inmersión en aceite 60x con apertura numérica 1.42. Es un microscopio equipado con 2 fotomultiplicadores para fluorescencia, una unidad de epifluorescencia *OLYMPUS BX61* y 4 láseres: Ar-488, He-Ne 543, He-Ne 633 y Laser Diodo UV 405. Las imágenes fueron tomadas a una resolución de 1024x1024, con valores de fotomultiplicador no superiores a 750v. Además, se trabajó siempre por debajo de los valores de fotomultiplicador establecidos previamente con preparados incubados solamente con anticuerpos secundarios para detectar la auto-fluorescencia de los mismos y las uniones inespecíficas de los fluoróforos. En los casos donde se realizaron cuantificaciones comparando dos o más condiciones (para las cuantificaciones del aminoácido HPG y de las señales de

Pdcd4 y fosfo-p70S6K), se mantuvieron los mismos valores de PMT en cada adquisición, de modo que puedan compararse los niveles de señal de fluorescencia obtenidos. El software de adquisición de imágenes es el *FluoView 5.0e*.

Para la adquisición de las imágenes correspondientes al compartimento axonal de las neuronas *DRGs in vitro* cultivadas en cámaras compartimentalizadas, se utilizó el microscopio de epifluorescencia invertido Leica DM-IRE2 de la Universidad de Nottingham, empleando un objetivo de aire 20x, apertura numérica 0.60. Este microscopio presenta filtros cúbicos para varias longitudes de onda, incluyendo FITC, TRITC y DAPI que fueron las utilizadas en estos análisis. Está equipado con una platina motorizada que permite adquirir imágenes de diferentes regiones en forma automática utilizando el software de adquisición de imágenes *Volocity*. Con este sistema, se selecciona una región de interés que puede ser mucho más grande que el campo que puede captarse en una sola fotografía. Luego, el software solicita al usuario realizar un foco manual en distintas zonas al azar de la región previamente seleccionada. Posteriormente el microscopio toma en forma automática varias imágenes que cubren toda la región de interés, haciendo el foco correcto en cada una de ellas. Finalmente, por un método computacional llamado *stitching*, se unen todas las imágenes en una única fotografía. En nuestro caso, construimos imágenes que incluyen todos los axones de cada compartimento axonal estudiado.

Para la adquisición de las imágenes correspondientes a los somas de las *DRGs* y de las neuronas corticales, se utilizó el microscopio de epifluorescencia directo Leica DM-IRE1 de la Universidad de Nottingham, empleando un objetivo de inmersión en aceite 40x, apertura numérica 1.40. Este microscopio presenta filtros cúbicos para varias longitudes de onda, incluyendo FITC, TRITC y DAPI que fueron las utilizadas en estos análisis. El

software de adquisición de imágenes utilizado es el *Micro-Manager Software* (Edelstein *et al.*, 2014).

5.6.2. Softwares utilizados para el procesamiento y análisis de las imágenes

Una vez adquiridas las imágenes, se analizaron y cuantificaron utilizando el software libre *Fiji* (Schindelin *et al.*, 2012). El método básico de cuantificación utilizado consiste en seleccionar las áreas de interés (axones, citoplasma externo de las células de Schwann o regiones dentro de las células analizadas *in vitro*) en cada plano focal a considerar y cuantificar el valor bruto de intensidad de los píxeles de cada área (valor denominado *RawIntDen* en el software). Ese valor se divide por el área seleccionada a modo de normalización. Luego con cada valor obtenido se realiza un promedio y desvío estándar asociado para cada condición analizada. Para cada grupo de datos a comparar, se analizó si siguen una distribución normal. En caso que los dos sets de datos presenten distribución normal, se realiza un *test de student* para evaluar la significancia estadística de las diferencias observadas. Si uno o ambos sets de datos no siguen una distribución normal, se realiza un test de *Kolmogorov-Smirnov* para analizar la significancia estadística de las diferencias observadas. En los casos donde comparamos más de dos condiciones, realizamos un test de *ANOVA* y un test *post-hoc Tukey* para evidencias si existen diferencias significativas entre los grupos de interés respecto a la condición control. Todos los gráficos mostrados en las figuras de resultados y los test estadísticos mencionados, se realizaron en el software *Prism7*.

Respecto a la selección de las áreas de interés, se utilizaron otros marcadores que nos permitieron diferenciar las células de Schwann y los axones. En el caso de las células de Schwann, en los casos que fue posible, identificamos también los núcleos y seleccionamos el citoplasma externo de dicha célula a continuación de los mismos.

5.6.3. Análisis de las imágenes correspondientes al compartimento axonal de las cámaras compartimentalizadas

Se cuantificó el total del área cubierta por los axones en el software *Fiji*, utilizando un macro diseñado específicamente para ello que comentaremos más adelante. Las imágenes analizadas pertenecen a los compartimentos axonales correspondientes a la condición control (en presencia del ARN interferente control) y a los compartimentos donde se evidenció silenciamiento de la proteína Pdc4. El criterio de selección de las cámaras donde efectivamente hubo silenciamiento para Pdc4 se basó en un análisis previo, cuantificando la señal de fluorescencia de Pdc4 en los somas. Aquellas cámaras tratadas con el ARN interferente para Pdc4 que tuviesen valores de intensidad de fluorescencia en los somas inferiores a su grupo control (tratados con el ARN interferente control) son las que fueron consideradas para el análisis.

Una vez decididas las imágenes a analizar, se seleccionan al menos 5 regiones en donde se puedan detectar 5 *microgrooves* (micro-canales donde pasan los axones, ver Figura 9) con crecimiento axonal visible. Esto se hace para evitar regiones de la imagen donde no se detectaron axones debido al crecimiento azaroso del cultivo y no por el tratamiento con el ARN interferente. A las imágenes obtenidas de cada región, se las procesa con un macro de diseño personal realizado en el software *Fiji*. El mismo convierte la imagen de los axones (detectados mediante inmuno-histoquímica con tubulina acetilada) a escala de grises y luego calcula el porcentaje del área en cada imagen que está cubierta por los axones. Se realiza un promedio y desvío estándar asociado primero para cada cámara, luego para cada experimento y finalmente se resumen en un único valor para la condición de Pdc4 silenciado y otro para la condición control. La Figura 12 resume el protocolo de análisis utilizado.

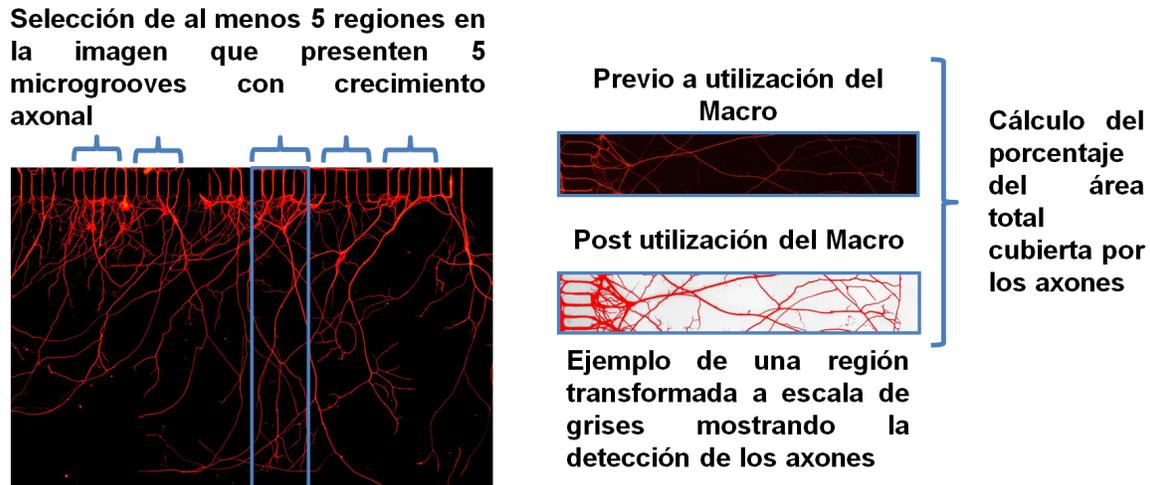


Figura 12. Protocolo de análisis de imágenes desarrollado para la cuantificación del crecimiento axonal en cámaras compartimentalizadas. La imagen de la izquierda muestra un ejemplo de un compartimento axonal donde están creciendo axones. En la misma se seleccionaron 5 regiones con “microgrooves” (canales por donde pasan los axones de un compartimento al otro) con crecimiento axonal y se seleccionan regiones como la encuadrada en azul. Las figuras de la derecha muestran la imagen de la región seleccionada, antes y después del tratamiento con el Macro diseñado en Fiji. Luego el programa calcula el porcentaje del área de la imagen cubierta por los axones, siendo este el parámetro de crecimiento axonal utilizado.

5.7. Protocolo para cuantificación del ARNm de *Pdcd4* en somas y axones de neuronas *DRGs* embrionarias de rata *in vitro*

Se cultivaron en cámaras compartimentalizadas de 2 canales neuronas *DRGs* embrionarias de rata en el estadio E18 y se mantuvieron en cultivo durante 3, 6 y 12 días. Se obtuvieron separadamente ARN total del compartimento axonal y del compartimento de los somas mediante pipeteo y extracción mediante el protocolo del Trizol, siguiendo los pasos del fabricante. Se purificó el ARN total para cada día de cultivo a analizar y se cuantificó su concentración por *Nanodrop*. En el caso de los axones, se cuidó que el material de input para la extracción de ARN fuesen solamente axones, observando previamente cada compartimento axonal bajo lupa y verificando la ausencia de otros tipos celulares. Posteriormente se realizó la retro-transcripción a ADNc mediante el protocolo de la *SuperScript III* siguiendo las instrucciones del fabricante. Utilizamos como material de input para cada día analizado la misma cantidad de ARN total, de modo que los datos

finales respecto a la abundancia del ARNm de *Pdcd4* sean comparables. La cantidad de ARN inicial fue 50 ng totales en todos los casos. Una vez obtenido el ADNc, se realizó el qPCR utilizando el protocolo de *SYBR Green Platinum* como lo indican las instrucciones del fabricante en placas multiwell de 96 pocillos. Se realizaron triplicados para cada día analizado y la máquina de qPCR utilizada fue la *Step-One-Plus (Applied Biosystems)*.

Tabla 1. Anticuerpos y sondas utilizadas en cada protocolo

	Empresa	Dilución de uso	Protocolo en que fue utilizado
Homopropargilglicina (HPG)	<i>Thermo-Scientific</i>	40 μ M (1x) y 200 μ M (5x)	Estudio de proteínas neo-sintetizadas
Anti-KIF1A	<i>Sigma</i>	1/600	Crio-secciones
Anti-fosfo-p70S6K	<i>Cell-Signaling</i>	1/400	Crio-secciones
Anti-Ribosomal	Producido en nuestro laboratorio (DPAN)	1/1000	Transparentación
Anti-Pdcd4	<i>Ab-cam</i>	1/200	Crio-secciones
Anti-tubulina acetilada	<i>Sigma</i>	1/100	Cultivo DRGs y neuronas corticales
Anticuerpo 3A10 (reconoce subunidad neuro-filamento)	<i>Hybridoma Bank</i>	1/50	Transparentación
DAPI	<i>ThermoScientific</i>	1/2000	Crio-secciones – cultivo DRGs y corticales
YOYO-1	<i>ThermoScientific</i>	1/5000	Crio-secciones y extruido de axoplasmas
Faloidina 633 nm	<i>ThermoScientific</i>	1/150	Crio-secciones

VI) Resultados

6.1. Incubación con aminoácidos análogos de la metionina para el estudio de la síntesis proteica local en axones

6.1.1. Puesta a punto del análisis de proteínas neo-sintetizadas en fibroblastos y estudio de la síntesis proteica local en axones de raíces ventrales por criosecciones

El protocolo del *Click iT* utilizando aminoácidos análogos de la metionina sugerido por el fabricante está desarrollado para la identificación de proteínas neo-sintetizadas en células en cultivo. Inicialmente pusimos a punto el protocolo en la línea celular NIH-3T3 de fibroblastos. La señal fluorescente correspondiente al aminoácido HPG se distribuye a lo largo del citoplasma y núcleo celular (ver Figura 13). Dados los tiempos de incubación (4 horas), es esperable que parte de las proteínas que son neo-sintetizadas presenten transporte hacia el núcleo. La falta de uno de los componentes para realizar la reacción del *Click iT* (aminoácido HPG o la molécula de azida conjugada a un fluoróforo) provoca una importante disminución en la señal de fluorescencia (Figura 13-A-A1). La señal es específica de proteínas neo-sintetizadas ya que es inhibible por cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas eucariotas (pero no de las mitocondrias) que actúa a nivel de la elongación (Millis y Suyama, 1972). La señal de fluorescencia que aún permanece en presencia de esta droga puede corresponder en parte a la síntesis proteica mitocondrial. Por último, un aumento de 5 veces en la concentración del aminoácido HPG produce un aumento en la señal de casi 10 veces. Por esa razón en los experimentos posteriores utilizamos el aminoácido HPG en la concentración 5x (200 μ M).

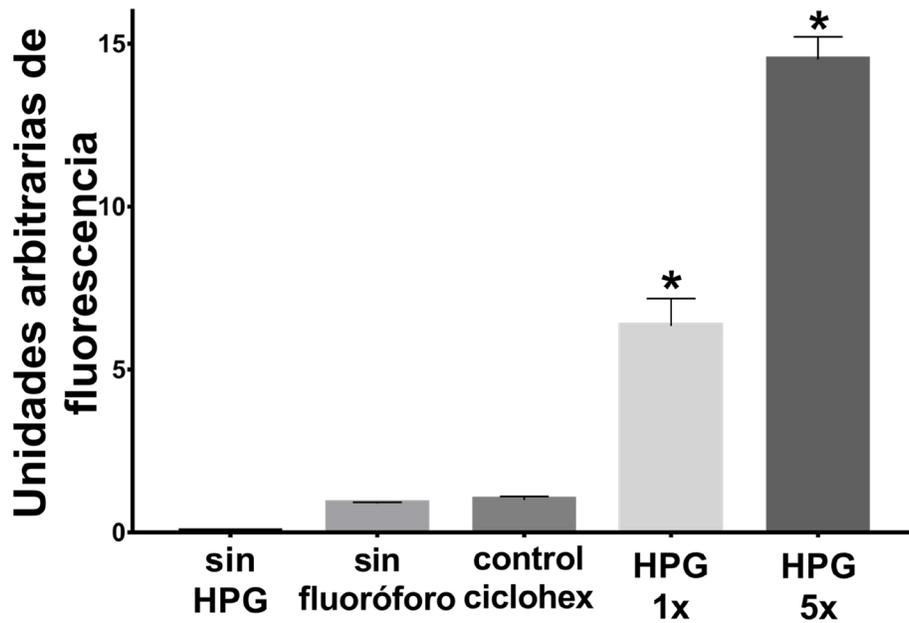
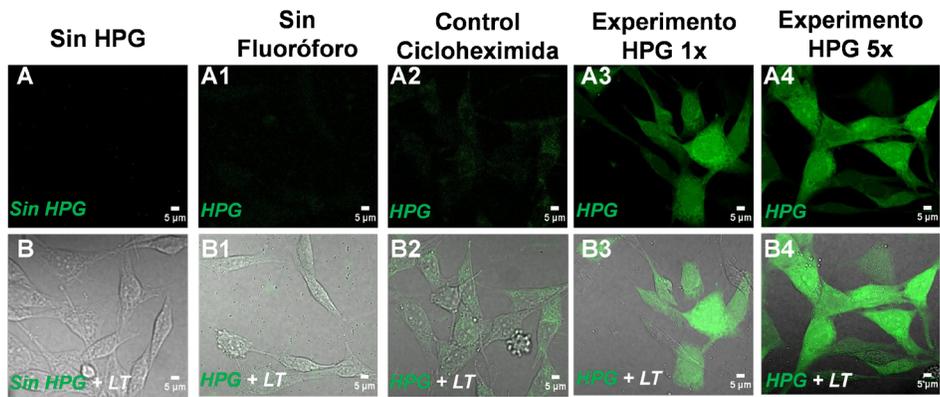


Figura 13. Incubación de Células 3T3 de Fibroblastos en presencia del aminoácido HPG. A-A4. Planos focales únicos de microscopía confocal mostrando ejemplos de células observadas en el canal de detección del fluoróforo con que se identifican las proteínas neo-sintetizadas. En **A** se muestra el control sin el aminoácido HPG, **A1** el control con el aminoácido HPG pero sin el fluoróforo, **A2** el control en presencia de cicloheximida, **A3** en presencia del aminoácido HPG 40 μM (1x) y **A4** el aminoácido HPG 200 μM (5x). **B-B4.** Se muestran los mismos planos focales que en A-A4 co-localizando las señales de HPG y de luz transmitida. El gráfico resume la cuantificación de la señal de fluorescencia del aminoácido HPG en cada condición. Nótese las diferencias respecto al control con cicloheximida y entre las concentraciones 1x y 5x. (p valor < 0.0001 , $n = 40$ células de 2 experimentos independientes. Barras de error: SEM). Barras de Escala 5 μm .

Para analizar la distribución de proteínas neo-sintetizadas en los axones a lo largo del tiempo, se realizó un experimento de “*pulse chase*” en presencia del aminoácido HPG. Incubamos raíces ventrales a distintos tiempos (0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 y 360 minutos) por un lado sólo con el aminoácido HPG y en paralelo una incubación con dicho aminoácido y cicloheximida. Observamos un aumento en la señal de fluorescencia en los axones incubados sólo con el aminoácido HPG hasta los 240 minutos (4 horas) de incubación. Los valores de intensidad de fluorescencia son significativamente mayores a los de la condición en presencia de cicloheximida en todos los puntos hasta los 240 minutos (Gráfico Figura 14). Las diferencias entre ambas condiciones ya no son tan claras a los 360 minutos (6 horas) de incubación. Estos cambios también pueden observarse en los planos focales únicos mostrados para cada tiempo analizado (Figura 14-A-A7 y 14-B-B7). A partir de este estudio es que decidimos realizar todos los experimentos siguientes con tiempos de incubación de 240 minutos (4 horas) ya que es donde observamos mayor acumulación de señal de fluorescencia en los axones siendo distinguible del control con cicloheximida. También observamos que con tiempos bajos de incubación (30 minutos), pueden identificarse “*spots*” de fluorescencia (Figura 14-B2). Dado el breve tiempo de incubación, es esperable que los mismos correspondan a proteínas que solamente pudieron ser neo-sintetizadas en los axones y no transportadas desde la célula de Schwann.

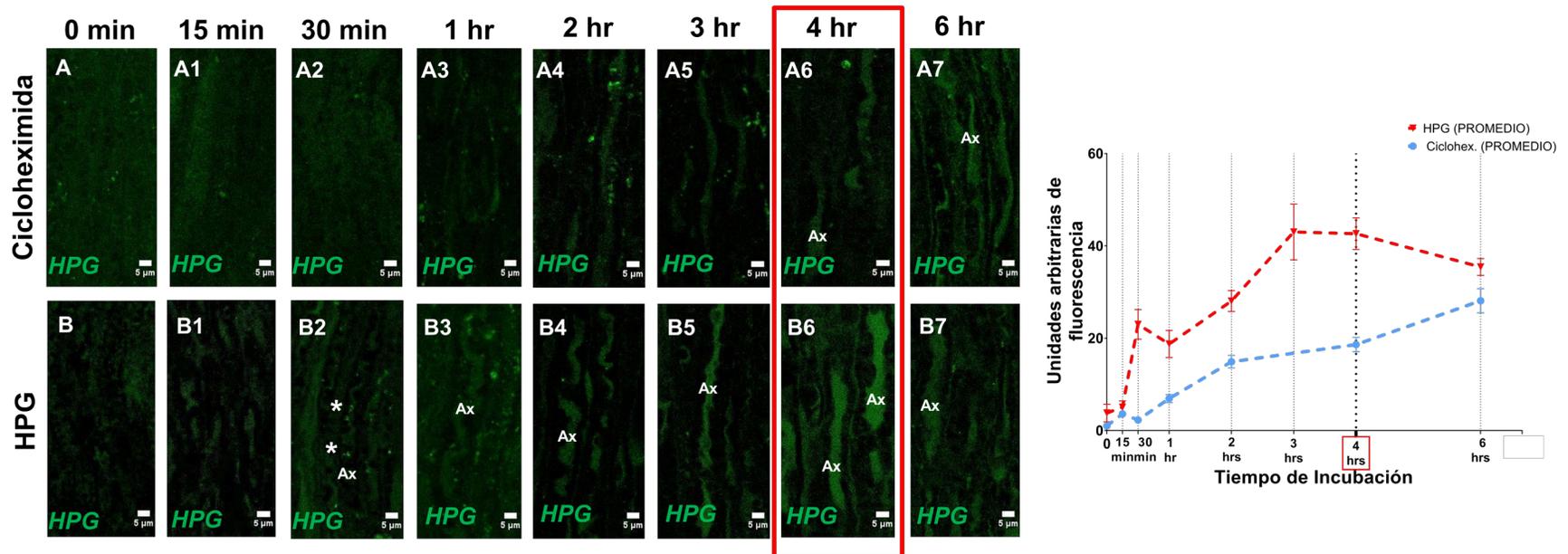


Figura 14. Experimento de “pulse chase” analizando la distribución de proteínas neo-sintetizadas en el axón en distintos tiempos de incubación en crio-secciones de raíces ventrales de rata. Se muestran planos focales únicos de microscopía confocal de axones observados a distintos tiempos de incubación en presencia (A-A7) o ausencia (B-B7) de cicloheximida, detectados con el canal correspondiente al fluoróforo con que se identifican las proteínas neo-sintetizadas. El gráfico de la derecha resume los valores de intensidad de fluorescencia para cada tiempo analizado en presencia (línea azul) o ausencia (línea roja) de cicloheximida. Nótese los valores de fluorescencia mayores en la condición sin cicloheximida y la intensidad de fluorescencia analizada en las 4 horas de incubación (A6 y B6, recuadro rojo). Los asteriscos en B2 muestran señal puntillada de proteínas neo-sintetizadas a los 30 minutos de incubación. Las concentraciones del aminoácido HPG son de 200 μM (5x) en todos los casos. (p valor < 0.0001 n = 40 axones de 2 experimentos independientes. Barra de Error: SEM, Barras de Escala: 5 μm).

Analizando la distribución de la señal de las proteínas neo-sintetizadas tras 4 horas de incubación con el aminoácido HPG, se observa una acumulación de señal tanto en las células de Schwann como en los axones y es inhibible por cicloheximida (Figura 15).

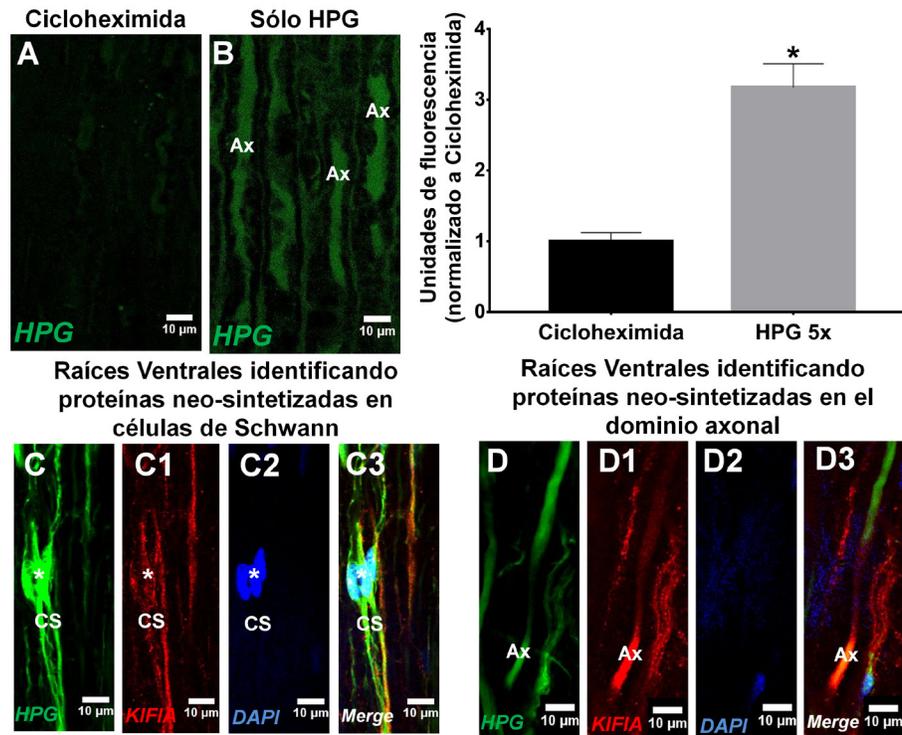


Figura 15. Proteínas neo-sintetizadas en axones y células de Schwann en crio-secciones de raíces ventrales de rata. **A-B.** Planos focales únicos de microscopía confocal mostrando la señal para proteínas neo-sintetizadas en presencia y ausencia de cicloheximida tras 4 horas de incubación. El gráfico de la derecha resume los valores de intensidad de fluorescencia para ambas condiciones. Nótese los valores de fluorescencia mayores en la condición sin cicloheximida. **C-C3.** Planos focales únicos indicando regiones con señal de proteínas neo-sintetizadas en el citoplasma externo de las células de Schwann. Se utilizó el anticuerpo anti-KIFIA (que reconoce una kinesina que transporta cargas a lo largo de los microtúbulos) para identificar las células de Schwann y los axones. **D-D3.** Plano focal único mostrando la señal de proteínas neo-sintetizadas dentro de un axón. Las concentraciones del aminoácido HPG son de 200 μ M (5x) en todos los casos. (p valor < 0.0001, n=4 experimentos independientes, 50 axones cuantificados. Barra de Error: SEM). Barras de Escala 10 μ m.

6.1.2. Análisis de la síntesis proteica local axonal en nervio ciático en condición normal y de pre-condicionamiento por una lesión

En la bibliografía está reportado que los axones sometidos a un pre-condicionamiento por una lesión desarrollan procesos de regeneración axonal presentando un aumento de la síntesis proteica local *in vitro* (Verma *et al.*, 2005). Por ello analizamos si estos cambios también se observan *in vivo*. Observamos un aumento del 50% en la señal de proteínas neo-sintetizadas en los axones de nervio ciático sometidos a injuria respecto a los que no la presentan (Figura 16). Además, la proteína fosfo-p70S6K parece presentar un aumento en su expresión en axones sometidos a injuria, lo cual sugiere la activación de la vía mTOR.

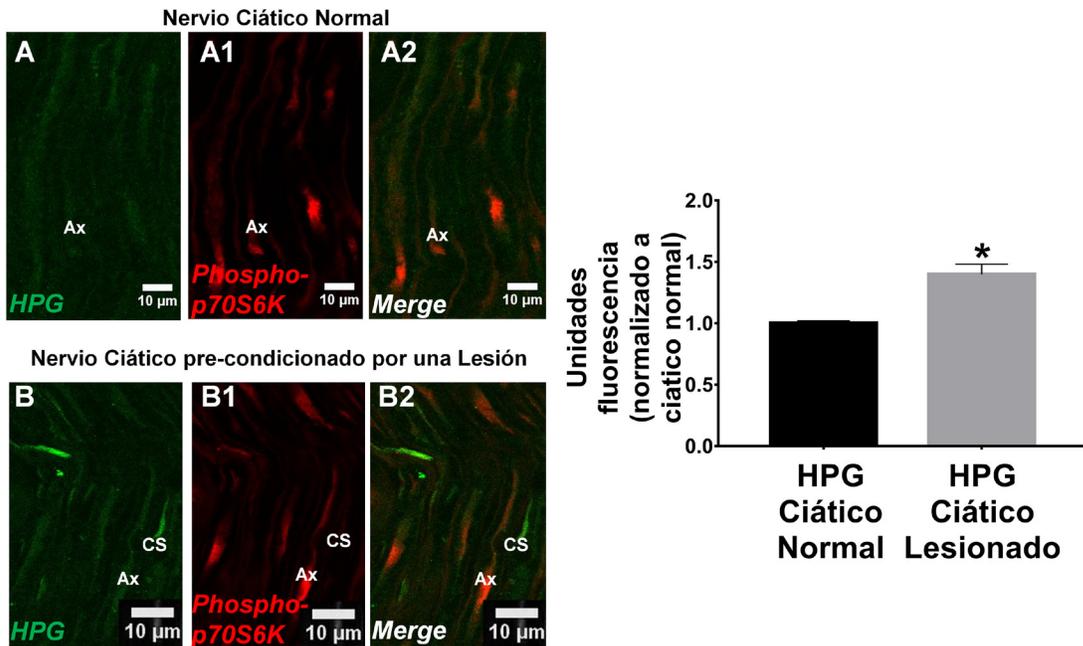
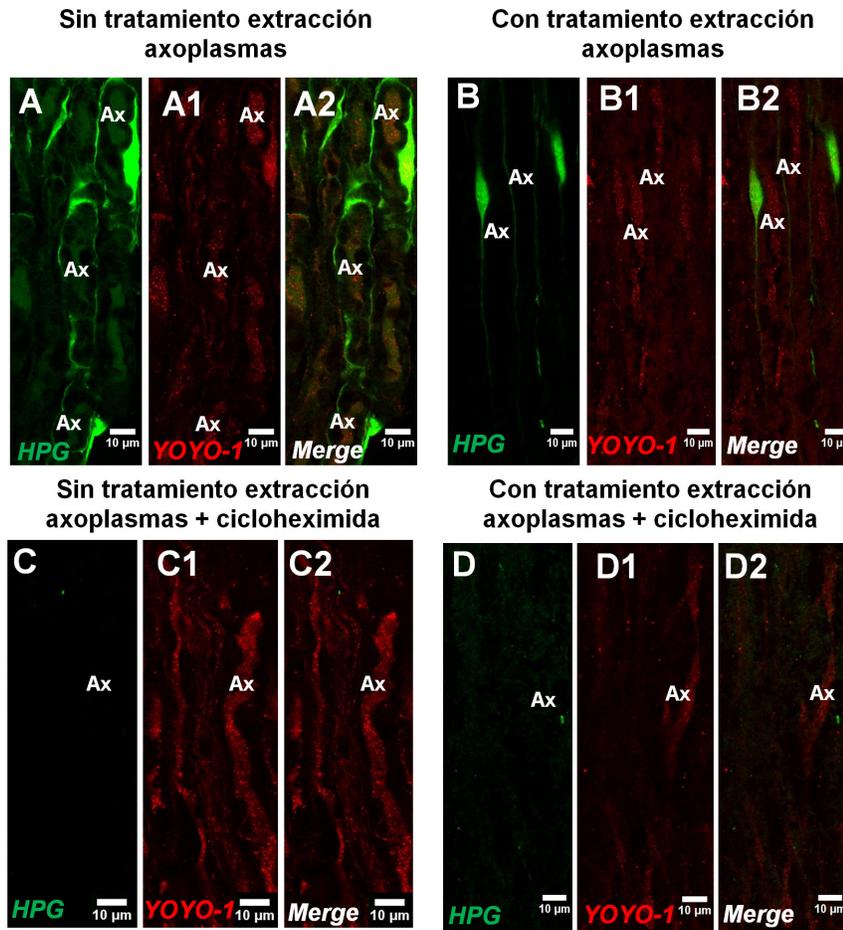


Figura 16. Proteínas neo-sintetizadas en axones y células de Schwann en crio-secciones de nervio ciático de rata con y sin pre-condicionamiento por lesión. A-A2. Planos focales únicos de microscopía confocal mostrando la señal para proteínas neo-sintetizadas (Imagen A) y fosfo-p70S6K (Imagen A1) tras 4 horas de incubación en un nervio ciático no pre-condicionado. **B-B2.** Planos focales únicos de microscopía confocal mostrando la señal para proteínas neo-sintetizadas (Imagen B) y fosfo-p70S6K (Imagen B2) tras 4 horas de incubación en un nervio ciático pre-condicionado por una lesión. El gráfico de la derecha resume los valores de intensidad de fluorescencia de proteínas neo-sintetizadas identificadas en los axones en ambas condiciones. Nótese los valores de fluorescencia mayores en la condición del ciático pre-condicionado por la lesión. Las concentraciones del aminoácido HPG son de 200 μ M (5x) en todos los casos. (p valor < 0.005, n=20 axones por condición de 2 experimentos independientes. Barra de Error: SEM). Barras de Escala: 10 μ m.

6.1.3. Efecto de las soluciones de acetato de zinc y de *pulling* sobre la señal de proteínas neo-sintetizadas y su distribución en extruido de axoplasmas aislados de raíces ventrales

Con el objetivo de analizar la distribución de las proteínas neo-sintetizadas en extruidos de axoplasmas, inicialmente evaluamos por crio-secciones el efecto de las soluciones de extracción de axoplasmas sobre la señal detectada mediante el aminoácido HPG. Para ello incubamos raíces ventrales en las soluciones de acetato de zinc y *pulling* 40 mM. Al comparar las intensidades de fluorescencia obtenidas en raíces ventrales incubadas en estas soluciones respecto a un grupo control que no pasó por este tratamiento, se observa una disminución en la señal de proteínas neo-sintetizadas en el grupo que fue incubado en acetato de zinc y *pulling* 40 mM (Figura 17-B). Esta señal corresponde a proteínas neo-sintetizadas porque es inhibible por cicloheximida en las condiciones con y sin tratamiento con las soluciones de extracción de axoplasmas. La interferencia de estos tratamientos con la señal del aminoácido HPG es parcial, por lo cual igualmente realizamos los experimentos de extracción de axoplasmas con posterior revelado del aminoácido HPG sobre los mismos. Como se observa en las Figura 17-D y 17-E, existe señal de proteínas neo-sintetizadas dentro de los axones. En algunos casos co-localizando con la señal del YOYO-1 (Figura 17-E), que es una sonda que se asocia a ácidos nucleicos con alta afinidad, incluido los ARNs.



Proteínas neo-sintetizadas identificadas en extruidos de axoplasmas

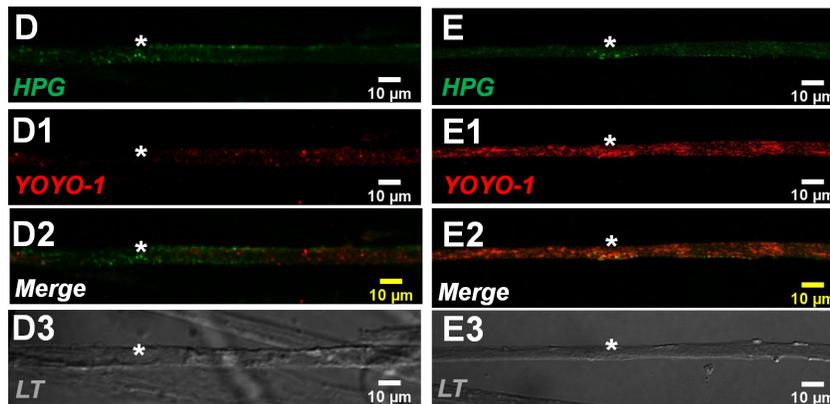
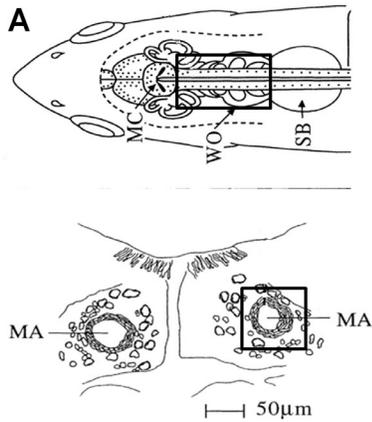


Figura 17. Análisis del efecto de las soluciones de extracción de axoplasmas en la detección de señal de proteínas neo-sintetizadas y su distribución en extruido de axoplasmas. A-A2. Planos focales únicos mostrando la señal para proteínas neo-sintetizadas en criosecciones de raíces ventrales sin tratamiento de axoplasmas, en **B-B2** con el tratamiento de axoplasmas, **C-C2** sin el tratamiento de extracción de axoplasmas y con cicloheximida y en **D-D2** con el tratamiento de extracción de axoplasmas y cicloheximida. Nótese la disminución en la señal de fluorescencia al utilizar las soluciones de extracción de axoplasmas (**A vs B**). **D-D3** y **E-E3.** Planos focales únicos mostrando extruidos de axoplasmas con señal de proteínas neo-sintetizadas y YOYO-1. Los asteriscos indican señal de HPG dentro del axón (n= 1 experimento con 2 réplicas de tejido analizadas). Barra de Escala 10 μm.

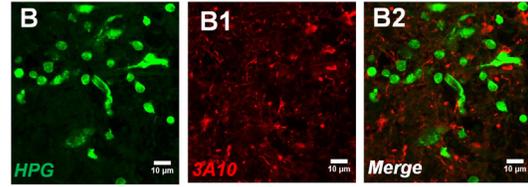
6.1.4. Observación de proteínas neo-sintetizadas en el axón gigante de Mauthner en médula de pez dorado transparentada

El axón gigante de Mauthner es un modelo tradicionalmente utilizado para el análisis de la síntesis proteica local axonal (Koenig, 2009). Por ello nos interesa evaluar la distribución de la señal de proteínas neo-sintetizadas en el axón de Mauthner dentro de la médula espinal de pez dorado transparentada. Primero testeamos por crio-secciones que el protocolo de *Click iT* es compatible con este tejido, observando señal del aminoácido HPG en células de la médula espinal y corroborando que dicha señal es inhibible por cicloheximida (Figura 18-B-C). Tras el protocolo de transparentación combinado con el protocolo de *Click iT* se pudo visualizar el axón de Mauthner dentro de la médula de pez dorado en su porción cervical, sin realizar ningún método de aislamiento del mismo. Observamos sitios dentro del dominio axonal con señal de proteínas neo-sintetizadas (Figura 18-D-D3). La reconstrucción por planos ortogonales sumando todos los planos focales, muestra como esos “spots” se encuentran dentro del dominio axonal en distintas regiones del axón (Figura 18-E). También observamos señal de proteínas neo-sintetizadas en la periferia axonal. En otra preparación de médula espinal transparentada observamos señal de ribosomas dentro del axón por inmunohistoquímica (Figura 18-F).

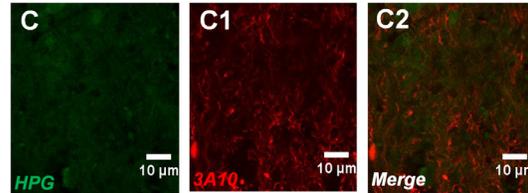
Esquema de la región de la Médula de Pez Dorado analizada



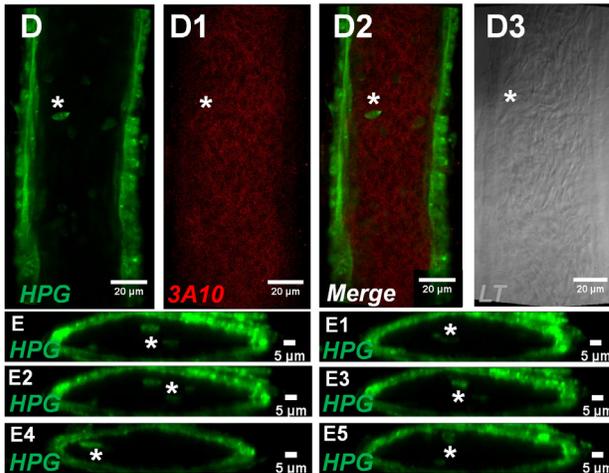
Crio-secciones de Médula Pez Dorado con HPG



Crio-secciones de Médula Pez Dorado con HPG + Cicloheximida



Axón de Mauthner en médula transparentada e incubada con aminoácido HPG



Axón de Mauthner en médula transparentada incubada con anticuerpo Anti-Ribosomal

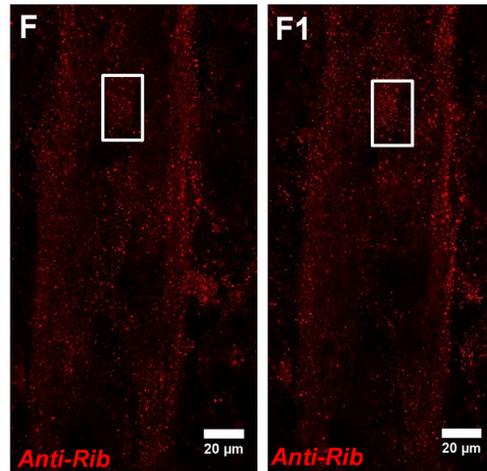


Figura 18. Proteínas neo-sintetizadas en el Axón gigante de Mauthner en médula de pez dorado transparentada. **A.** Esquema de la región de la médula de pez dorado que vamos a analizar, junto con un dibujo de donde se ubican los axones de Mauthner (Adaptado de (Casagrand *et al.*, 1999)). **B-B2.** Planos focales únicos de crio-secciones longitudinales de la médula de pez dorado incubada en presencia del aminoácido HPG y en **C-C2** el control con cicloheximida. Nótese la señal de fluorescencia mayor en el caso de la incubación solo con el aminoácido HPG, posiblemente correspondiente a somas u otros tipos celulares. Barras de Escala 10 µm. **D-D3.** Planos focales únicos del axón de Mauthner identificando proteínas neo-sintetizadas en una médula transparentada e incubada con el aminoácido HPG y el anticuerpo 3A10 (para identificar el citoplasma axonal). Nótese la señal de proteínas neo-sintetizadas dentro del axoplasma (asteriscos) y en su periferia. También se muestra el mismo plano focal con luz transmitida (**D3**). Barras de Escala 20 µm. **E-E5.** Reconstrucciones ortogonales mostrando distintas regiones del axón en las cuales se observa señal de proteínas neo-sintetizadas dentro del dominio axonal (asteriscos). Barras de Escala 5 µm. **F-F1.** Planos focales únicos mostrando la señal para ribosomas en el axón de Mauthner dentro de la médula espinal transparentada e incubada con el anticuerpo anti-ribosomal. Nótese la señal de ribosomas dentro del axón (recuadros blancos). Barras de Escala: 20 µm (n=2 experimentos independientes).

6.1.5. Análisis de distribución de proteínas neo-sintetizadas y ribosomas en axones de raíces ventrales enteras transparentadas

Es de nuestro interés identificar regiones axonales con señal de proteínas neo-sintetizadas, por eso analizamos los axones en raíces ventrales transparentadas sin cortes o procedimientos que los extraigan de su estructura nativa. Identificamos en regiones donde la delipidación del tejido es completa dominios axonales con señal para proteínas neo-sintetizadas y ribosomas (Figura 19). Estos dominios definen estructuras similares en tamaño y distribución a las *PARPs* identificadas en trabajos anteriores mediante extruidos de axoplasmas (Figura 1, página 11). Hasta el momento las *PARPs* sólo fueron visualizadas en extruidos de axoplasmas, no en el tejido nativo y se desconoce si presentan síntesis de proteínas activa. Aquí visualizamos estructuras con apariencia similar, que presentan señal para ribosomas y proteínas neo-sintetizadas.

Estructuras tipo PARPs observadas en raíces ventrales de rata transparentadas

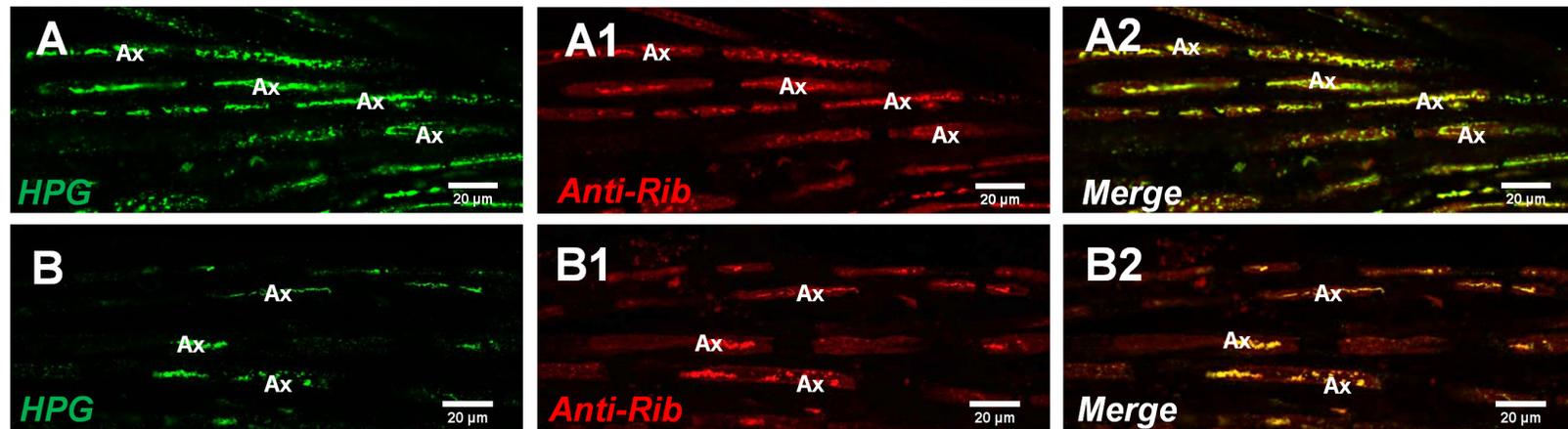


Figura 19. Proteínas neo-sintetizadas en raíces ventrales de rata transparentadas: identificación de estructuras tipo PARPs. Planos focales únicos de microscopía confocal de raíces ventrales transparentadas donde se identificaron proteínas neo-sintetizadas (**A y B**) y ribosomas (**A1 y B1**) en estructuras tipo *PARPs* ubicadas en axones sin los lípidos de la mielina. Nótese la co-localización entre ambos marcadores (**A2 y B2**). Los espacios en negro (sin señal en ambos canales) corresponderían a los sitios donde estaban los lípidos de la mielina. El anticuerpo anti-ribosomal ya fue utilizado en otros trabajos donde evidencian las *PARPs* en extruidos de axoplasmas, lo cual apoya nuestra hipótesis de que estos dominios serían las *PARPs* (Kun et al., 2007). Barras de Escala: 20 µm.

6.2. Estudios de los cambios en la expresión de componentes de la vía mTOR en modelos de regeneración axonal y mediante el uso de drogas que modulen esta vía

6.2.1. Expresión de las proteínas Pdcd4 y fosfo-p70S6K en axones de nervios ciáticos lesionados y en proceso de regeneración axonal *in vivo*

Estudios preliminares de nuestro grupo mostraron que la proteína Pdcd4 presenta altos niveles de expresión en axones de diferentes regiones del sistema nervioso central y periférico de ratas adultas y que posiblemente cumpla un rol regulador en procesos de plasticidad, incluida la regeneración axonal (Di Paolo, 2013). Por ello realizamos experimentos analizando la distribución de Pdcd4 en axones de nervios ciáticos en ausencia del soma neuronal que fueron pre-condicionados por una lesión *in vivo* (Figura 20). Observamos que los niveles de expresión de Pdcd4 se ven disminuidos un 30% en los sitios próximos a la lesión en relación a los más alejados (Región Proximal) analizando el mismo nervio ciático (Figura 20-A-A1). Este gradiente de expresión de Pdcd4 no se observa en los axones de nervios no pre-condicionados por una lesión, no existiendo diferencias significativas a lo largo de un nervio normal (analizando regiones del nervio ciático análogas al nervio lesionado) (Figura 20-C1). La proteína Pdcd4 es un componente río abajo de la vía mTOR, siendo regulada negativamente por la fosforilación de p70S6K (Ver Figura 2 en la introducción, página 14). Esta kinasa fosforila a Pdcd4, siendo esto una señal para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma. En nuestro modelo *in vivo* de regeneración axonal periférica, fosfo-p70S6K presenta un mayor nivel de expresión que en axones no pre-condicionados por una lesión, observándose un aumento del 60% (Figura 20-B-B1).

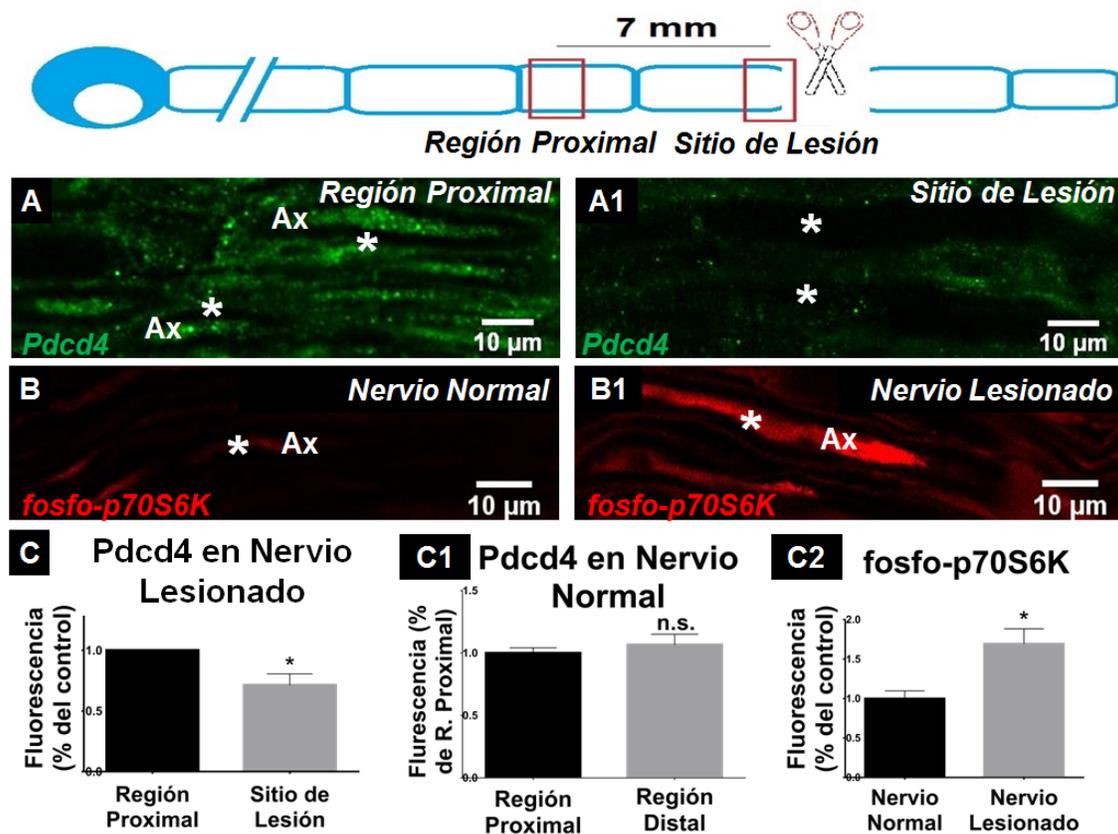


Figura 20. Cambios en la expresión de Pdc4 y fosfo-p70S6K en axones de nervios ciáticos pre-condicionados por una lesión. **A-A1.** Planos focales únicos mostrando la expresión de Pdc4 en la región proximal (7mm de la lesión, Imagen **A**) y en el sitio de la lesión (Imagen **A1**) del mismo nervio ciático. Nótese la menor expresión de Pdc4 en los axones cercanos al sitio de lesión. **B-B1.** Planos focales únicos mostrando la expresión de fosfo-p70S6K en axones de nervios ciáticos normales (Imagen **B**) y en axones de ciáticos pre-condicionados por una lesión (Imagen **B1**). Nótese el incremento en la expresión de fosfo-p70S6K en los axones donde se realizó una injuria previa. Los asteriscos en las imágenes muestran axones que ejemplifican los cambios observados. **C-C2.** Gráficos cuantificando los cambios en la expresión de Pdc4 en los axones de nervios ciáticos pre-condicionados por una lesión (**C**), no lesionados (**C1**) y los cambios en fosfo-p70S6K en un nervio ciático normal respecto a uno pre-condicionado (**C2**). Nótese que en un nervio no lesionado no hay cambios en la distribución de Pdc4 a lo largo de los axones. El esquema de arriba indica los sitios del axón analizados en el modelo de lesión utilizado. (Gráfico C: p valor < 0.03 n=4 experimentos independientes analizando 50 axones en cada condición. Gráfico C1: p valor < 0.25 n=4 experimentos independientes analizando 50 axones en cada condición. Gráfico C2: p valor < 0.006 n= 30 axones de 2 experimentos independientes. Barras de Error: SEM, Barras de Escala 20 μ m).

6.2.2. Distribución de las proteínas Pdc4 y fosfo-p70S6K en axones de raíces ventrales no lesionadas, cambios en su expresión en presencia de moduladores de la vía mTOR y análisis de la síntesis proteica local axonal

Como forma de evaluar si la vía mTOR está regulando al menos parte de la expresión de Pdc4 en axones periféricos, decidimos analizar el efecto que producen drogas que activen (bpV(pic)) o inhiban (rapamicina) dicha vía en raíces ventrales *in vivo* en ausencia de los somas. En condiciones basales (en ausencia de las drogas), observamos axones con co-localización entre las señales de fosfo-p70S6K y Pdc4 (asteriscos en Figura 21). En presencia de rapamicina se observa una disminución del 40% en la señal de fluorescencia de fosfo-p70S6K, lo que indica que la vía mTOR está siendo inhibida por esta droga (Figura 22-A). En relación a la expresión de Pdc4, existe un aumento del 20% en presencia de rapamicina y una disminución del 40% en presencia de bpV(pic) (Figuras 22B). El análisis de las proteínas neo-sintetizadas a nivel axonal muestra un aumento del 60% en presencia de la droga bpV(pic), que corresponde a cuando la vía mTOR se encuentra activa (Figura 22-C3). No se observan diferencias significativas en la señal de proteínas neo-sintetizadas entre la situación control y en presencia de la droga rapamicina (Figura 22-C1-C2). En el caso de las células de Schwann se observa un aumento del 30% en la síntesis proteica en presencia de bpV(pic) y una disminución del 70% en presencia de rapamicina (Figura 22-D3 y 22-D2).

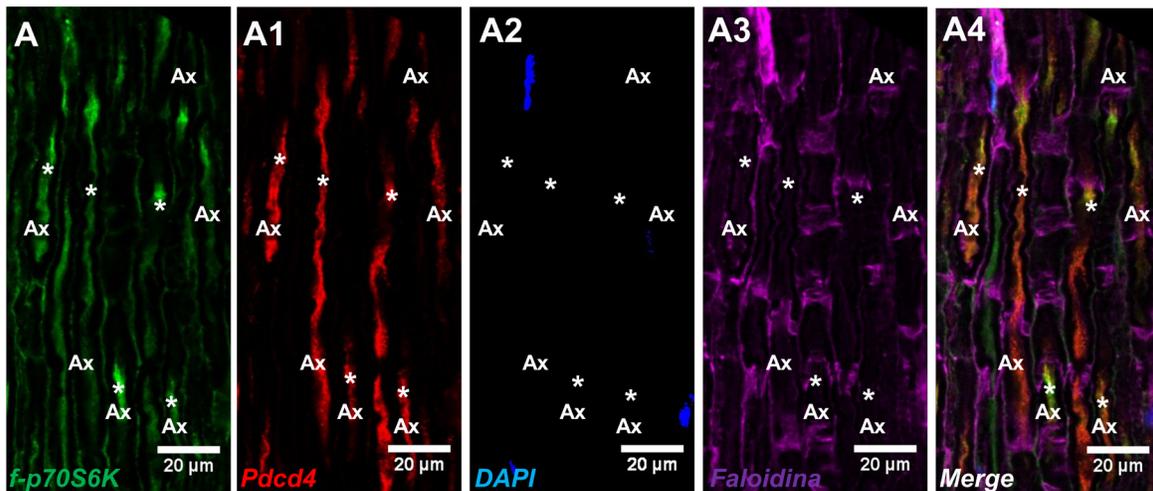


Figura 21. Distribución de la señal de Pdc4 y fosfo-p70S6K en axones de raíces ventrales. A-A4. Planos focales únicos mostrando la expresión de Pdc4 (Imagen **A**) y fosfo-p70S6K (Imagen **A1**) en axones de raíces ventrales de rata. Se utilizaron además las sondas DAPI (Imagen **A2**) y la faloidina (Imagen **A3**) para identificar los núcleos y el citoesqueleto de actina, respectivamente. Nótese las regiones dentro del dominio axonal con co-localización de Pdc4 y fosfo-p70S6K (asteriscos). Barras de Escala: 20 μm .

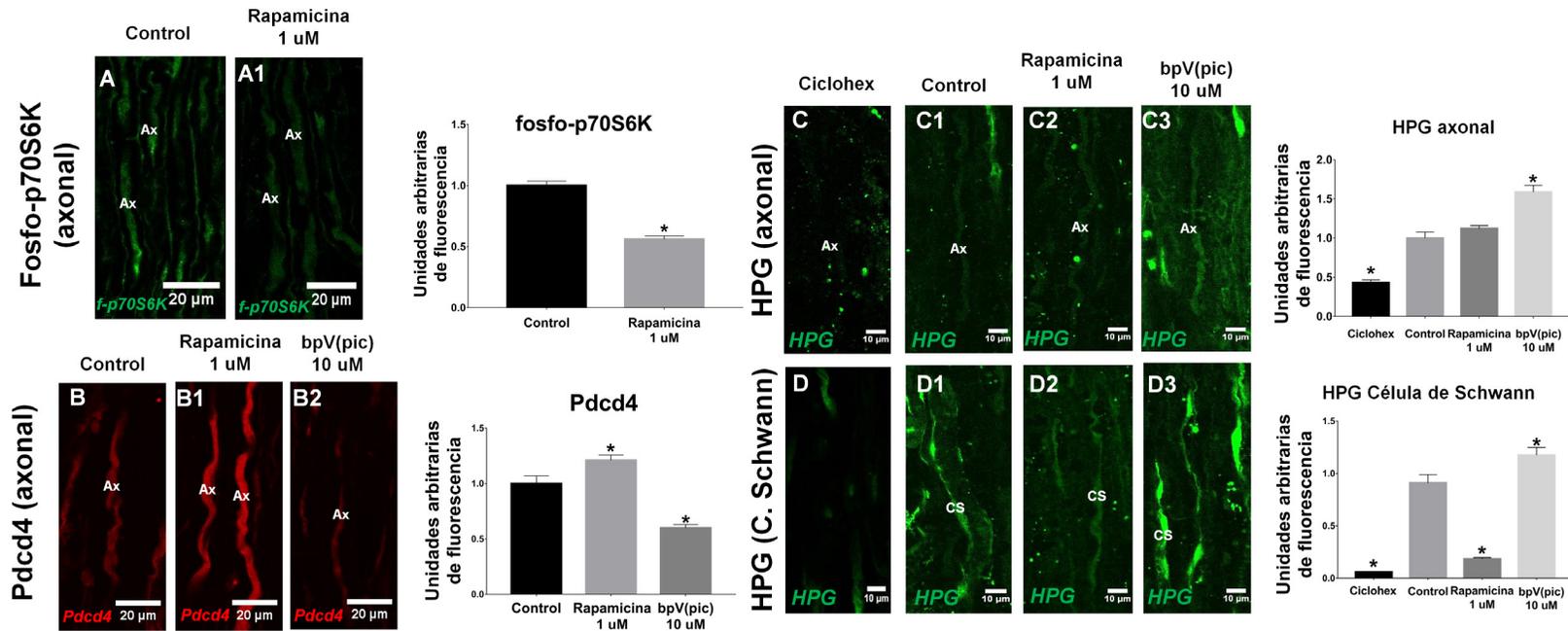


Figura 22. Efecto de las drogas rapamicina y bpV(pic) sobre la expresión de fosfo-p70S6K, Pdc4 y en los niveles de proteínas neo-sintetizadas en axones y células de Schwann de raíces ventrales incubadas con el aminoácido HPG A-A1. Planos focales únicos mostrando la expresión de fosfo-p70S6K en axones en ausencia (Imagen **A**) y presencia (Imagen **A1**) de rapamicina. Nótese la disminución en la expresión de esta proteína en los axones en presencia de esta droga (ver Ax. en las imágenes y gráfico de fosfo-p70S6K). Barras de Escala 20 μ m. **B-B2.** Planos focales únicos mostrando los cambios en la expresión de Pdc4 en presencia de rapamicina (Imagen **B1**), de bpV(pic) (Imagen **B2**) respecto al control sin drogas (Imagen **B**). Nótese el aumento en la expresión de Pdc4 en presencia de rapamicina y su disminución en presencia de bpV(pic) (ver Ax. en las imágenes y gráfico de Pdc4). Barras de Escala 20 μ m. **C-C3.** Planos focales únicos mostrando los cambios en los niveles de proteínas neo-sintetizadas en los axones en presencia de las drogas rapamicina (Imagen **C2**) y bpV(pic) (Imagen **C3**) respecto al control sin drogas (**C1**). También se incluye el control con cicloheximida (Imagen **C**). Nótese el aumento en la señal de las proteínas neo-sintetizadas detectadas en los axones en presencia de bpV(pic) respecto al control (ver Ax. en las imágenes y gráfico de HPG axonal). Barras de Escala 10 μ m. **D-D3.** Planos focales únicos mostrando los cambios en los niveles de proteínas neo-sintetizadas en el citoplasma externo de las células de Schwann en presencia de las drogas rapamicina (Imagen **D2**) y bpV(pic) (Imagen **D3**) respecto al control sin drogas (**D1**). También se incluye el control con cicloheximida (Imagen **D**). Nótese el aumento en la señal de las proteínas neo-sintetizadas detectadas en el citoplasma externo de las células de Schwann en presencia de bpV(pic) y su disminución en presencia de rapamicina respecto al control (ver CS. en las imágenes y gráfico de HPG en Célula de Schwann. Barras de Escala 10 μ m). (Gráfico fosfo-p70S6K: n=45 axones para cada condición de un único experimento, p valor < 0.0001. Gráfico Pdc4: n= 25 axones por condición de un único experimento, Test ANOVA p valor < 0.0001, post hoc respecto a control p valor < 0.01 vs rapamicina y p valor < 0.001 vs bpV(pic). Gráfico HPG axonal: n= 25 axones por condición de un único experimento, Test ANOVA p valor < 0.0001, post hoc respecto a control p valor < 0.001 vs cicloheximida, p valor < 0.49 vs rapamicina y p valor < 0.001 vs bpV(pic). Gráfico HPG Células de Schwann: n=15 regiones por condición de un único experimento, Test ANOVA p valor < 0.0001, post hoc respecto a control p valor < 0.001 vs cicloheximida, p valor < 0.001 vs rapamicina y p valor < 0.009 vs bpV(pic). Barras de error: SEM).

6.3. Estudio de Pdc4 como regulador del crecimiento axonal en modelos *in vitro*

6.3.1. Expresión del ARNm de Pdc4 en los somas y axones de neuronas DRG embrionarias de rata (E18)

Previo a los estudios sobre el efecto del silenciamiento de Pdc4 en neuronas de DRGs, decidimos analizar por qPCR si el ARNm de Pdc4 se encuentra expresado en los axones y somas en distintos días en cultivo, asociados a tiempos de crecimiento y maduración diferentes. Como se ilustra en la Figura 23, el mensajero de Pdc4 se encuentra presente en los axones y aumenta su expresión en este compartimento con el número de días de crecimiento en cultivo, con un aumento de casi 4 veces en el Día 6 respecto al Día 3. En el soma neuronal se observa un descenso en los niveles de expresión de Pdc4 en el Día 6 de crecimiento en cultivo y en el Día 12 alcanza valores de expresión similares a los del Día 3. La expresión de Pdc4 siempre es mayor en el soma neuronal respecto al axón en todos los días analizados.

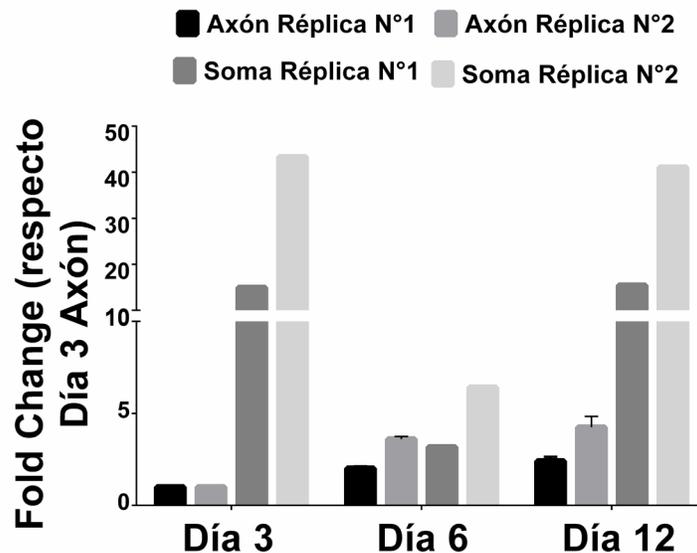


Figura 23. Niveles de expresión del ARNm de Pdc4 en axones y somas de neuronas DRGs E18 *in vitro* en los Días 3, 6 y 12 de crecimiento en cultivo. El gráfico muestra que la expresión de Pdc4 es siempre mayor en los somas respecto a los axones en ambas réplicas. Respecto al análisis solo de los somas, existe una disminución en los niveles del ARNm de Pdc4 a los 6 días de crecimiento, para luego volver a los niveles basales en el Día 12. El análisis en los axones muestra un aumento en los niveles del ARNm de Pdc4 en los distintos días, existiendo un aumento importante en el día 6 respecto al día 3 de crecimiento *in vitro* (n=2 experimentos independientes con triplicados en réplica 1 y duplicados en réplica N°2. Barra de error SEM).

6.3.2. Silenciamiento del ARN mensajero y la proteína Pdc4 en neuronas DRGs embrionarias y estudio de los cambios en el crecimiento axonal *in vitro*

Como forma de analizar el posible papel de Pdc4 en la regulación del crecimiento axonal, decidimos realizar un experimento de silenciamiento del mismo en cámaras compartimentalizadas (Ver Figuras 9 y 10 de materiales y métodos páginas 36 y 40, respectivamente). Tras 4 días de crecimiento de las neuronas DRGs en cultivo, el silenciamiento de Pdc4 alcanza un efecto a nivel proteico, con una disminución en la señal de fluorescencia del 35% (Figura 24-B) respecto al control, que es utilizando un mix de ARNs interferentes que no tienen blanco de secuencia en el genoma de rata (Figura 24-A). Analizando el crecimiento de los axones, observamos un aumento del 15% en el crecimiento axonal cuando Pdc4 esta silenciado respecto al control.

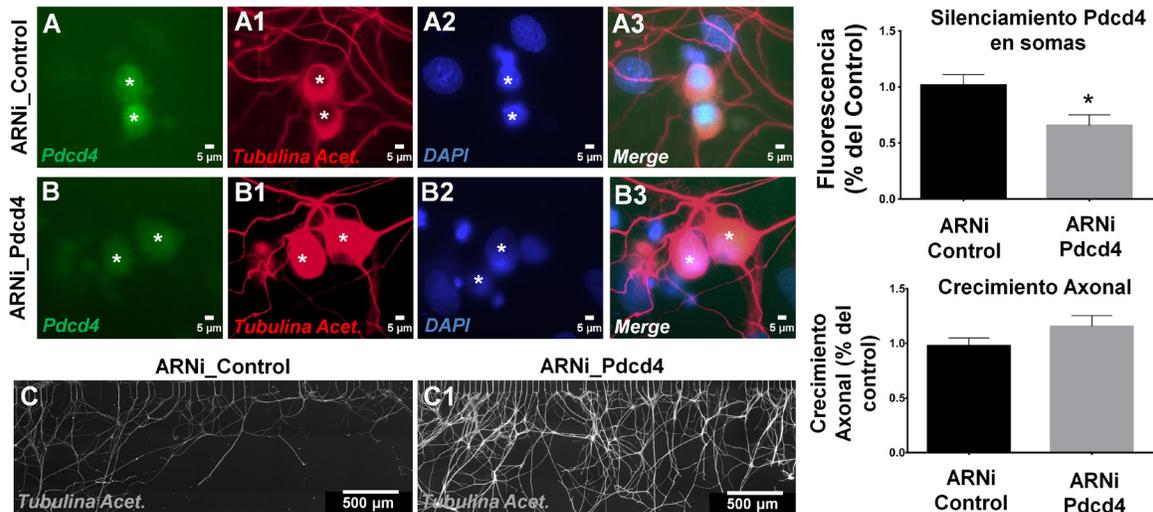


Figura 24. Disminución en la expresión de la proteína Pdc4 mediante ARN interferente y análisis del crecimiento axonal en neuronas DRGs *in vitro*. A-A4. Se muestra la expresión de Pdc4 en la condición control (Imagen A) junto con marcadores del citoplasma celular (tubulina acetilada, A1) y del núcleo (DAPI, A2) y su co-localización (A3). B-B4 Se muestra la expresión de Pdc4 (Imagen B) en la condición donde se incubaba con el ARN interferente para Pdc4 junto con marcadores del citoplasma celular (tubulina acetilada, B1) y del núcleo (DAPI, B2) y la co-localización de dichas señales (B3) (Ver Asteriscos y Gráfico silenciamiento Pdc4 en somas). Barras de Escala: 5 μ m. C-C1. Cámaras compartimentalizadas ejemplificando el crecimiento axonal en la condición control (C) y en presencia del ARN interferente para Pdc4 (C1). Barra de Escala: 500 μ m. Nótese el mayor crecimiento de los axones en presencia del ARN interferente (Gráfico del Crecimiento Axonal). (Gráfico silenciamiento Pdc4 en somas: n=9 cámaras compartimentalizadas de 3 experimentos independientes, con 120 somas cuantificados por condición p valor < 0.014. Gráfico Crecimiento axonal n=9 cámaras compartimentalizadas de 3 experimentos independientes, p valor < 0.16. Barra de error SEM).

6.3.3. Distribución de la proteína Pdcd4 en el núcleo y cono axónico de neuronas corticales embrionarias de ratón (E16) en distintas etapas de crecimiento *in vitro*

Analizamos la expresión de Pdcd4 en un modelo *in vitro* de neuronas del sistema nervioso central, estudiando la distribución de esta proteína en diferentes regiones de las células en distintas etapas del crecimiento. Observamos que Pdcd4 presenta muy bajos niveles de expresión tanto en el núcleo como en el citoplasma a los 2 días de ser incubadas *in vitro* (Figura 25-A). A los 5 días de incubación (etapa de crecimiento activo), se observa un aumento de 4 veces en la expresión de la proteína a nivel nuclear respecto al día 2 (Figura 25-B). En relación al cono axónico, región reportada como de activa síntesis proteica durante el crecimiento axonal, la expresión de Pdcd4 es baja hasta el día 12, donde se observa un aumento de 3 veces respecto a los días 2 y 5 de incubación (Figura 25-C-D-E).

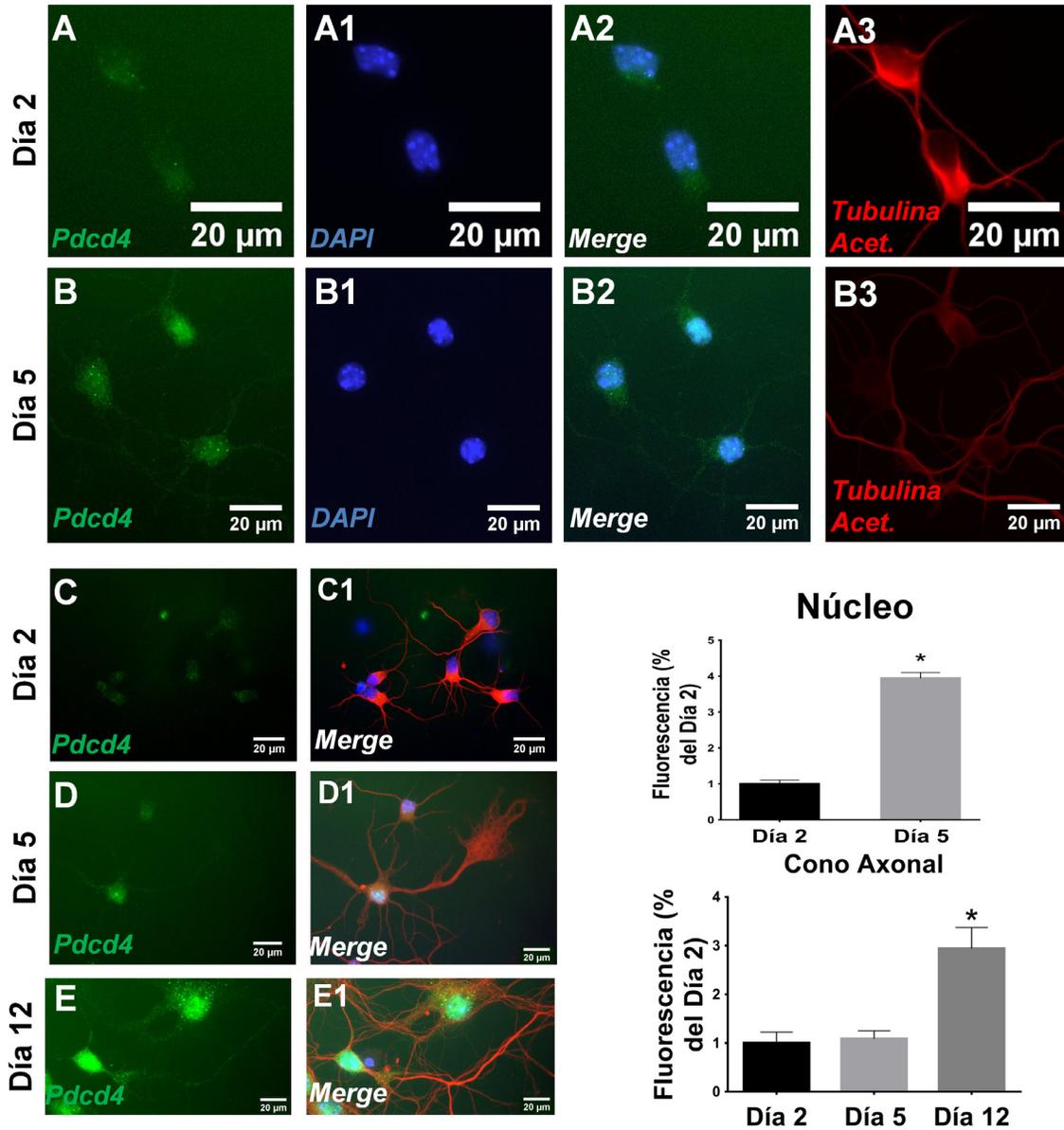


Figura 25. Distribución de la proteína Pdc4 en neuronas corticales E16 de ratón cultivadas *in vitro* en los Días 2, 5 y 12 de crecimiento. A-A3. Se muestra la expresión de Pdc4 (Imagen A) en el núcleo celular en el Día 2 de crecimiento en cultivo, así como los marcadores DAPI (Imagen A1), Tubulina acetilada (A3) y la co-localización entre Pdc4 y DAPI (A2). **B-B3.** Se muestra la expresión de Pdc4 (Imagen B) en el núcleo celular en el Día 5 de crecimiento en cultivo, así como los marcadores DAPI (Imagen B1), Tubulina acetilada (B3) y la co-localización entre Pdc4 y DAPI (B3). Nótese el aumento en los niveles de Pdc4 en el núcleo en el Día 5 de cultivo (Gráfico de Núcleo). **C-C1.** Se muestra la expresión de Pdc4 en el citoplasma neuronal en el Día 2 (Imagen C) de cultivo y su co-localización con tubulina acetilada y DAPI (Imagen C1). **D-D1.** Se muestra la expresión de Pdc4 en el citoplasma neuronal en el Día 5 (Imagen D) de cultivo y su co-localización con tubulina acetilada y DAPI (Imagen D1). **E-E1.** Se muestra la expresión de Pdc4 en el citoplasma neuronal en el Día 12 (Imagen E) de cultivo y su co-localización con tubulina acetilada y DAPI (Imagen E1). Nótese el aumento en la expresión de Pdc4 en el cono de crecimiento axonal en el Día 12 de cultivo. (Gráfico Núcleo: n= 130 núcleos por condición de 3 experimentos independientes, p valor < 0.0001. Gráfico Cono Axonal: n= 30 conos axonales por condición de 2 experimentos independientes, p valor < 0.007. Barra de Error: SEM). Barras de Escala: 20 μ m.

VII) Discusión

7.1. Síntesis proteica local en axones periféricos *in vivo*

La síntesis proteica local (SPL) axonal es un proceso importante para la respuesta del axón a los cambios que suceden en su entorno y ha sido descrita tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. La mayoría de los trabajos evalúan la SPL axonal de una proteína en específico, analizando si es sintetizada localmente (Sotelo *et al.*, 1992; Sotelo Silveira *et al.*, 2000; Twiss *et al.*, 2000; Calliari *et al.*, 2002; Hanz *et al.*, 2003; Perlson *et al.*, 2005; Cox *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009; Ben-Yaakov *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014; Ji y Jaffrey, 2014). Otros estudios evalúan la SPL axonal analizando la síntesis general de proteínas en modelos *in vitro* (Verma *et al.*, 2005; Roche *et al.*, 2009) y en otros casos *in vivo* (Koenig, 1965; Edström y Sjöstrand, 1969; Benech *et al.*, 1982; Alvarez y Benech, 1983; Sotelo *et al.*, 1992). Los trabajos que estudian SPL axonal *in vivo* en nervios periféricos emplean como métodos principales para el estudio de las proteínas neo-sintetizadas la radioactividad y más recientemente la técnica de axón-TRAP. Esta última permite evidenciar el translatoma axonal mediante secuenciación masiva, aislando los ARNm unidos al ribosoma en los axones (Yoon *et al.*, 2012; Kim y Jung, 2015; Shigeoka *et al.*, 2016). La mayoría de los estudios *in vivo* han utilizado aminoácidos radioactivos como forma de evidenciar las proteínas neo-sintetizadas. Esta metodología no es tan precisa para el estudio de la distribución espacial de las proteínas neo-sintetizadas a excepción de que se realicen sobre sobre cortes ultra-finos, provocando una pérdida en la capacidad de analizar tridimensionalmente la distribución de las proteínas en los axones. Tomando esto en consideración es que resulta novedoso el sistema de detección por fluorescencia de las proteínas neo-sintetizadas en axones *in vivo* presentado en nuestro trabajo, que puede combinarse también con protocolos de

inmunohistoquímica que ayudan a evidenciar las regiones dentro del tejido. Mediante radioautografía este tipo de protocolos son difíciles de implementar. Desarrollamos el sistema de detección de proteínas neo-sintetizadas por fluorescencia tanto en crio-secciones como en tejidos enteros transparentados. Pudimos estudiar la síntesis de proteínas en el axón, analizando el mismo como una estructura tridimensional. Comenzamos estudiando la SPL axonal en crio-secciones de raíces ventrales. Pensamos que esta forma de estudiar la SPL axonal es un paso adelante respecto a la visualización por radioactividad ya que son 20 μm de tejido donde pueden analizarse gran número de axones a distintas profundidades mediante microscopía confocal. La señal detectada corresponde a proteínas neo-sintetizadas ya que es inhibible por cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas eucariotas que actúa a nivel de la elongación (Millis y Suyama, 1972). Observamos un aumento gradual en la cantidad de proteínas neo-sintetizadas hasta los 240 minutos (4 horas) de incubación (Figura 14-B6) siendo una señal significativamente mayor que en presencia de cicloheximida a los mismos tiempos. La señal de proteínas neo-sintetizadas en presencia de esta droga podría en parte corresponder a la síntesis proteica mitocondrial ya que está reportado en la literatura que los axones presentan gran concentración de mitocondrias (Schwarz, 2013). El descenso observado en la cantidad de proteínas neo-sintetizadas a los 360 minutos (6 horas) de incubación en presencia del aminoácido HPG podría explicarse por pérdidas en la viabilidad del tejido (y por tanto en su capacidad biosintética) tras 7 horas en ausencia del soma neuronal (son 6 horas en presencia del aminoácido HPG y 1 hora en medio sin metionina) o a procesos de degradación de proteínas. Estudios previos demuestran la presencia de componentes del proteosoma en axones y la importancia de la degradación de proteínas para el funcionamiento del axón (Verma *et al.*, 2005). Es importante recordar que nuestros experimentos son realizados en ausencia del soma neuronal y que, en

tiempos de incubación de 4 horas, la señal detectada en el axón puede corresponder a proteínas sintetizadas en el dominio axonal o también sintetizadas en la célula de Schwann (CS) y transportadas al axón. Trabajos previos describen ejemplos de este último caso (Lasek *et al.*, 1977; Court *et al.*, 2008, 2011). Es interesante mencionar que, con tiempos de incubación de solo 30 minutos (ver asteriscos en la Figura 14-B2), también se observa señal de proteínas neo-sintetizadas dentro del axón. Tiempos cortos sugieren que tales proteínas fueron sintetizadas dentro del axón y no transportadas desde la CS al dominio axonal. Un mayor número de estudios de SPL axonal en tiempos cortos sería interesante para analizar los sitios dentro del axón en donde se inicia la traducción local.

Los experimentos discutidos anteriormente fueron desarrollados en axones de raíces ventrales sin ningún pre-condicionamiento previo, a excepción de la lesión producida durante su extracción. Por ello nos pareció interesante analizar si existen cambios *in vivo* en los niveles de SPL en axones de nervio ciático pre-condicionados por una lesión en las 18 horas previas a su incubación con el aminoácido HPG. Trabajos previos mostraron un aumento en la SPL en axones de neuronas *DRGs* pre-condicionadas por una lesión *in vitro* y en estudios *in vivo* solo identificaron la fosforilación de componentes que evidencian traducción activa en axones de nervio ciático lesionados (Verma *et al.*, 2005). Nosotros demostramos el aumento de la SPL axonal *in vivo* en axones de nervio ciático lesionados (ver Figura 16). Este aumento en la síntesis de proteínas, puede entenderse como una respuesta local a la lesión, posiblemente relacionado con la formación de nuevos conos de crecimiento, uno de los pasos iniciales en la regeneración axonal. El aumento en la neo-síntesis de proteínas observado en axones pre-condicionados por una lesión se correlaciona con resultados de trabajos previos donde se describen aumentos en la cantidad de ARNs neo-sintetizados *in vivo* (Sotelo *et al.*, 2013; Canclini *et al.*, 2014)

y también de proteínas en nervios lesionados *in vivo* (Tobias y Koenig, 1975a; Benech *et al.*, 1982; Court *et al.*, 2011).

Los experimentos realizados en crio-secciones permiten visualizar las proteínas neo-sintetizadas en el axón con una distribución espacial mejorada en relación a los protocolos utilizando aminoácidos radioactivos, pero también presentan sus limitaciones. Una de ellas es que no es posible el seguimiento de la señal detectada para un único axón por largas extensiones. En este sentido, pensamos que el análisis de axones mediante la metodología de extruido de axoplasmas (Koenig *et al.*, 2000) podría ser un avance en el estudio de la SPL axonal. Observamos en los axoplasmas señal de proteínas neo-sintetizadas co-localizando en forma parcial con YOYO-1, una sonda con afinidad por los ácidos nucleicos que en este caso evidencia ARN (ver asteriscos en la Figura 17-D-17E). Este puntillado en donde co-localizan ambas señales podría entenderse como centros en los cuales están siendo traducidos ARNm dentro del axón. La observación de proteínas neo-sintetizadas en extruidos de axoplasmas de rata es un hallazgo novedoso de este trabajo. Dado que las soluciones de extracción de axoplasmas afectan parcialmente la señal detectada (ver Figura 17), posiblemente por interferir en la reactividad del grupo alcalino del aminoácido HPG, la señal en los axoplasmas es comparativamente menor a la observada por crio-secciones. Una aproximación que podría llevarse a cabo para visualizar proteínas neo-sintetizadas a lo largo de una extensión considerable de un axón, sin que se vea disminuida su señal, es procesar nervios periféricos por la metodología de peinado de fibras o “*teasing*”. Con esta técnica se obtiene una preparación donde pueden analizarse fibras individuales (célula de Schwann y axón) por largas extensiones.

El análisis de la SPL axonal mediante extruido de axoplasmas presenta la ventaja de poder analizar la distribución de las proteínas neo-sintetizadas en largas extensiones del axón, pero a su vez significa aislarlos de las células que lo rodean. Por esta razón es que llevamos a cabo estudios de SPL axonal en tejidos transparentados enteros por la metodología de *CLARITY* (Chung *et al.*, 2013). Mediante este protocolo se obtiene un tejido ópticamente transparente, permeable a las macromoléculas de interés (sondas, anticuerpos, etc) y que conserva la información y estructura molecular originales, por lo cual pensamos es ideal para visualizar la SPL axonal en un contexto tridimensional. Este protocolo de transparentación se basa en la eliminación selectiva de los lípidos, por lo cual y en forma similar al protocolo de extruido de axoplasmas (en donde se obtiene el axoplasma libre de mielina) los axones que observamos tampoco presentarán los lípidos de la mielina. Esta característica nos hizo pensar que este método podría ser útil para visualizar por primera vez las Placas Periaxoplásmicas Ribosomales (*PARPs*) en axones intactos libres de lípidos de la mielina, sin necesidad de realizar el protocolo de extruido de axoplasmas. Por esa razón, analizamos la SPL axonal en el axón gigante de Mauthner dentro de la médula espinal de pez dorado y en raíces ventrales de rata transparentadas, que son los modelos más caracterizados en donde ya se han evidenciado las *PARPs*, hasta el momento únicamente mediante extruido de axoplasmas a partir de estos tejidos.

En el caso del axón de Mauthner en la médula espinal transparentada, identificamos señal de ribosomas dentro del axón (Figura 18-F) así como también de proteínas neo-sintetizadas en el dominio axonal y en su región periférica (Figura 18-D), donde previo al protocolo de transparentación estaban los lípidos de la mielina. En relación a la señal detectada en el dominio axonal, pueden observarse estructuras con proteínas neo-sintetizadas en distintas regiones del axón, como muestra la reconstrucción por planos ortogonales de la Figura 18-E. La forma no circular del axón en estas reconstrucciones se

debe a que, dado el grosor del tejido y la distancia focal del objetivo utilizado, el axón es levemente presionado por el objetivo durante la adquisición de las imágenes. Si analizamos las proteínas neo-sintetizadas en la periferia del axón, detectamos una importante intensidad de señal en estas regiones. Estudios previos revelan que la actividad biosintética de proteínas dentro de la mielina es menor que dentro del axón (Koenig, 1991), por lo cual nos es difícil explicar qué origen tiene la señal aquí detectada. Estudios de ultra-estructura del axón de Mauthner por microscopía electrónica revelan la presencia de axones colaterales intercalados en la mielina del axón de Mauthner (Celio *et al.*, 1979) y también regiones nodales activas (Funch *et al.*, 1984), por lo cual podemos hipotetizar que al menos parte de la señal detectada podría corresponder a tales estructuras. Posiblemente tras quitar los lípidos de la mielina, el citoplasma de los oligodendrocitos y las estructuras anteriormente mencionadas puedan estar más accesibles para el fluoróforo que identifica los aminoácidos HPG. Por tanto, la señal detectada podría corresponder a las proteínas neo-sintetizadas por estas células. Sin embargo, hacen falta un mayor número de estudios para hacer afirmaciones concretas. La dificultad de estos protocolos, así como su duración, no nos permitieron realizar un mayor número de experimentos en médula de pez dorado, pero pensamos desarrollarlos en el futuro. De todas formas, y hasta lo que hemos explorado en la literatura, es la primera vez que se logra visualizar el axón de Mauthner de pez dorado dentro de la médula espinal sin realizar cortes o un extruido del mismo.

En el caso del axón de Mauthner en tejido transparentado, no pudimos interpretar claramente la distribución de la señal de proteínas neo-sintetizadas en la periferia del axón y creemos que ello influyó negativamente en la posibilidad de identificar las *PARPs*. Sin embargo, al analizar las raíces ventrales de rata transparentadas, pudimos identificar dominios axonales con proteínas neo-sintetizadas en regiones específicas del tejido

donde la delipidación fue completa. En estas zonas co-localizan las señales para proteínas neo-sintetizadas y ribosomas (Figura 19). Nosotros interpretamos que estos dominios podrían ser las *PARPs*, que hasta el momento solo habían sido observadas en extruido de axoplasmas. Esta interpretación se basa en que el resultado de la transparentación de las raíces ventrales es obtener axones libres de los lípidos de la mielina, lo cual es similar a lo sucedido en los protocolos de extruido de axoplasmas, donde se obtienen axones libres de mielina. Posiblemente esta sea la razón por la cual pudimos identificar estas estructuras al transparentar las raíces ventrales. Otro dato a resaltar es que el anticuerpo para identificar ribosomas es el mismo que ya utilizaron en otros trabajos donde evidencian las *PARPs* en extruidos de axoplasmas, lo cual apoya nuestra hipótesis de que estos dominios serían las *PARPs* (ver la Figura 1C de la introducción, página 11) (Sotelo-Silveira *et al.*, 2006, 2008). Consideramos que será necesario realizar experimentos con otros elementos ya identificados en las *PARPs*, como el ARNm de la beta actina y las proteínas ZBP-1 y miosina Va, para identificar si estos dominios son efectivamente los mismos que se observan al realizar extruido de axoplasmas. Si efectivamente lo son, sería la primera vez que se identifican por una metodología diferente, sin necesidad de aislar los axoplasmas de sus células circundantes, incluidas las células gliales. Además, estos son los primeros datos que identifican estas estructuras con neo-síntesis de proteínas activa, apoyando la teoría de las *PARPs* como centros de traducción axonales (Sotelo-Silveira *et al.*, 2006).

Por otra parte, desde la publicación del protocolo *CLARITY* para transparentación de tejidos en el año 2013, han ido en aumento el número de trabajos que estudian el sistema nervioso empleando esta metodología, en la mayoría de los casos analizando regiones del cerebro (Kim *et al.*, 2013; Susaki *et al.*, 2014; Costantini *et al.*, 2015; Lerner *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Tomer *et al.*, 2015; Zheng y Rinaman, 2015; Sylwestrak *et al.*, 2016;

Ye *et al.*, 2016) y en otros la médula espinal (Spence *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Menegas *et al.*, 2015). A pesar de este desarrollo en la temática, la adaptación que nosotros realizamos del protocolo para piezas de tejido correspondientes al sistema nervioso periférico (raíces ventrales de rata) y médula espinal en pez dorado es algo novedoso. Asimismo, la combinación de este protocolo de transparentado con el estudio de las proteínas neo-sintetizadas es algo que tampoco se había desarrollado hasta el momento.

7.2. Cambios en la expresión de componentes de mTOR y regulación de la síntesis proteica local axonal en modelos de regeneración *in vivo*

Analizando axones de nervios ciáticos pre-condicionados por una lesión *in vivo* confirmamos el aumento de la síntesis proteica local (SPL) axonal y un incremento en los niveles de la proteína fosfo-p70S6K (Figura 20-B) lo que sugiere la activación de la vía mTOR (Wang y Proud, 2006). Trabajos previos también identificaron otros componentes de esta vía activados en axones de nervios lesionados (Verma *et al.*, 2005). Posiblemente la activación de esta vía explique la disminución en los niveles de expresión de Pdc4 en axones próximos al sitio de lesión (Figura 20-A) ya que en líneas celulares está reportado que Pdc4 es regulado por la vía mTOR (Dennis *et al.*, 2012).

Estos datos sugieren que en axones lesionados *in vivo* la vía mTOR se encuentra activa. Pensamos que modulando esta vía en axones no lesionados se debería poder regular los niveles de proteínas neo-sintetizadas y la expresión de Pdc4. Efectivamente, cuando utilizamos un activador de la vía llamado bpV(pic), detectamos un aumento en la neo-síntesis de proteínas en el axón (Figura 22-C3) y una disminución en la expresión de Pdc4 en axones *in vivo* (Figura 22-B2). En cambio, al utilizar un inhibidor de la vía mTOR llamado rapamicina, aumentan los niveles de expresión de Pdc4 en el axón (Figura 22-

B1) pero no observamos cambios significativos en la señal de proteínas neo-sintetizadas en el axón (Figura 22-C2). Posiblemente los niveles de proteínas neo-sintetizadas en axones no pre-condicionados por una lesión son bajos y no son suficientes para detectar una disminución con solo 4 horas de incubación en presencia de rapamicina. Esto explicaría porque si en las células de Schwann detectamos una disminución en la señal de proteínas neo-sintetizadas en presencia de rapamicina (Figura 22-D2), ya que estas células producen más proteínas que los axones. Otros autores detectaron una disminución en la cantidad de proteínas neo-sintetizadas en presencia de rapamicina solo en axones de neuronas *DRGs in vitro* pre-condicionadas por una lesión (Verma *et al.*, 2005). La lesión aumenta la cantidad de proteínas y explicaría la disminución que detectaron en presencia de rapamicina.

Los cambios en la expresión de Pdc4 en axones lesionados y tras modular la vía mTOR *in vivo*, sugieren que Pdc4, que es un represor traduccional, podría estar regulando la traducción de ARNm importantes para la regeneración axonal. En base a esta hipótesis, planteamos el siguiente modelo: tras un evento de lesión, disminuiría localmente en el sitio de injuria la expresión de Pdc4 debido a la activación de la vía mTOR, lo que produciría la degradación de Pdc4 por el proteosoma en los axones. Esto tendría como resultado un aumento en la traducción de los transcritos regulados por Pdc4 (Ver Modelo en Figura 26, página 81). Para que Pdc4 disminuya su expresión localmente, es necesaria la presencia del proteosoma activo en el axón. Trabajos previos detectaron componentes del proteosoma en el axón y estudiaron la importancia de la degradación de proteínas para la formación de conos de crecimiento (Verma *et al.*, 2005). En nuestro modelo, la degradación local de Pdc4 en axones de nervios lesionados sería importante para la regeneración axonal. El modelo que sugerimos se resume en la Figura 26 (página 81).

7.3. Papel de Pdc4 en el crecimiento axonal *in vitro*

La disminución en la expresión de Pdc4 en axones pre-condicionados por una lesión *in vivo*, y la capacidad de modular los niveles de esta proteína *in vivo* mediante drogas que activan o inhiben la vía mTOR, nos impulsó a investigar que sucede en los axones cuando modulamos específicamente la expresión de Pdc4. En los experimentos anteriores analizamos indirectamente los cambios en la expresión axonal de Pdc4 *in vivo*, lesionando nervios ciáticos o modulando la vía mTOR. Lo que buscamos ahora es modular únicamente la expresión de Pdc4 sin afectar directamente la vía mTOR y analizar como esto repercute en el crecimiento axonal. Una forma de hacerlo es silenciando la expresión de Pdc4 mediante ARNs interferentes. Dada la dificultad de estos experimentos para ser realizados *in vivo*, decidimos comenzar con experimentos *in vitro* en neuronas DRGs embrionarias, evaluando los cambios en el crecimiento axonal utilizando cámaras compartimentalizadas de 2 canales. Observamos que existe un mayor crecimiento de los axones en ausencia de Pdc4 (ver Figura 24). Estos datos van en línea con resultados obtenidos por nuestro grupo en células PC12 diferenciadas a neuronas en donde, tras silenciar Pdc4 por shARN, se observó un aumento en el largo de las neuritas respecto al control (Eastman, 2016). Esperábamos que las diferencias en el crecimiento axonal fueran mayores. Pensamos que ello se debe a que las neuronas DRGs cultivadas son de estadios embrionarios, por tanto su tasa de crecimiento ya es muy rápida. Posiblemente en neuronas DRGs adultas o en días posteriores de crecimiento en cultivo, etapas donde la tasa de crecimiento disminuye, el aumento en el crecimiento al silenciar Pdc4 podría ser mayor.

Estos datos, sumados a los ya observados *in vivo* en axones de nervios pre-condicionados por una lesión, sugieren que Pdc4 tiene un rol regulador en el crecimiento

y regeneración axonal. Considerando que Pdc4 cambia su expresión en forma local en el sitio próximo a la lesión, pensamos que esta proteína podría ser transportada hasta dicho sitio o también ser sintetizada localmente en los axones. Para que ello suceda, es necesario que el ARNm de Pdc4 esté presente en el dominio axonal. Por ello fuimos a estudiar si el ARNm de Pdc4 se expresa en los axones de neuronas *DRGs in vitro* obtenidas del compartimento axonal en cámaras compartimentalizadas. Observamos que el mensajero de Pdc4 está presente y que aumenta su expresión en el axón con los días de cultivo (Figura 23). Este dato apoya la idea de que Pdc4 podría ser sintetizado localmente y aumentaría su expresión cuando el axón aumenta su longitud y la tasa de crecimiento es menor. También es interesante destacar que los niveles del ARNm de Pdc4 en el soma neuronal disminuyen significativamente en el Día 6 de cultivo respecto al Día 3, alcanzando los valores de expresión iniciales en el Día 12. Posiblemente esta disminución en los niveles del ARNm de Pdc4 durante las etapas de crecimiento activo se deba a algún tipo de sistema de regulación a nivel transcripcional. Dicho sistema permitiría disminuir los niveles del ARNm de Pdc4, lo que repercutiría posteriormente a nivel proteico en los momentos donde se requiere un aumento en la tasa traduccional de los ARNm regulados por la proteína Pdc4 en el soma neuronal.

Con los experimentos anteriores observamos que la vía mTOR regularía la expresión de Pdc4 en el axón a nivel proteico, pero sería interesante identificar si existe alguna forma de regular Pdc4 a nivel del mensajero, previo a que la proteína sea traducida, tanto en el axón como en el soma neuronal. Una posibilidad es que sea regulado por microARNs (miARNs). Esta descrito que miR-21 tiene como blanco al ARNm de Pdc4, generando un efecto represor en su traducción, y dicha interacción esta reportada en distintos modelos celulares de cáncer (Zhu *et al.*, 2008). Si bien no está descrita en la literatura la regulación de Pdc4 por microARNs en sistema nervioso, sí existen datos que

relacionan el crecimiento de neuronas *DRGs* con el aumento de la expresión de miR-21 (Strickland *et al.*, 2011). Los autores obtuvieron los ganglios pertenecientes a las ramas L5 y L6 de ratas adultas 7 días después de una lesión del nervio ciático y cultivaron sus neuronas *DRGs in vitro*. Observaron un aumento de 7 veces en la expresión miR-21 en las neuronas *DRGs* provenientes de las ratas lesionadas respecto al control sin lesión y evidenciaron que la sobre-expresión de miR-21 *in vitro* desencadena un aumento en el crecimiento de las neuritas (Strickland *et al.*, 2011). Nosotros pensamos que un aumento de miR-21 durante la regeneración axonal promovería el crecimiento de los axones debido a un descenso en los niveles de la proteína Pdc4. Esto podría suceder en el soma neuronal y también en el axón en el caso que miR-21 sea transportado hacia el sitio de lesión desde el soma o incluso desde la célula de Schwann (Ver modelo propuesto en Figura 26). Nosotros observamos una disminución local en la expresión de Pdc4 en regeneración axonal *in vivo* y un mayor crecimiento de los axones al silenciar su expresión *in vitro* en neuronas *DRGs*. Estas células son el mismo modelo que utilizan los autores que describen a miR-21 como regulador en el crecimiento axonal, por lo cual es posible que en nuestro modelo Pdc4 sea también regulado por miR-21.

En conclusión, podemos hipotetizar que la expresión de Pdc4 podría no solo estar siendo regulada a nivel proteico por la activación de la vía mTOR, sino también por miR-21 a nivel de la traducción del ARNm de Pdc4 durante procesos de regeneración axonal.

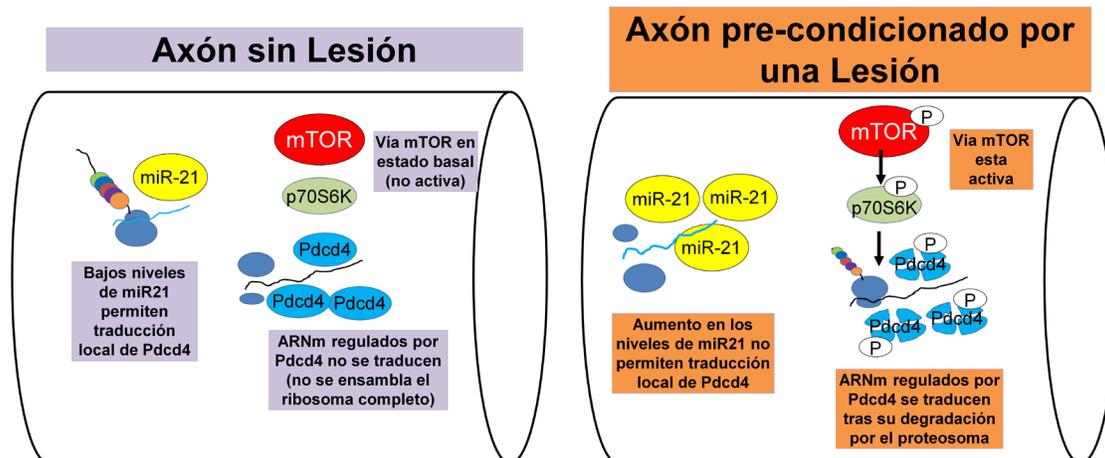


Figura 26. Modelo que proponemos sobre la regulación de Pdc4 en los axones sin lesión y los pre-condicionados por una injuria. El esquema de la izquierda (en violeta) muestra un axón sin lesión, en donde la vía mTOR no se encuentra activada, por lo cual Pdc4 se expresa en el dominio axonal y bloquea la traducción de ARNm relacionados con la regeneración y crecimiento axonal. Además, los bajos niveles de miR-21 permitirían la traducción local de Pdc4. El esquema de la derecha (en naranja) muestra un axón pre-condicionado por una lesión, por lo cual la vía mTOR está activa, provocando la fosforilación de Pdc4 y su posterior degradación por el proteosoma. Esto permitiría la traducción de ARNm regulados por Pdc4 importantes en el crecimiento y regeneración axonal. Además, los niveles de miR-21 aumentarían, con lo cual el ARNm de Pdc4 no se traduciría localmente.

Los estudios anteriores sobre la expresión de Pdc4 los realizamos en modelos pertenecientes al sistema nervioso periférico, por lo cual pensamos que sería interesante saber qué sucede con Pdc4 en el sistema nervioso central. Datos previos de nuestro grupo evidenciaron que la proteína Pdc4 presenta altos niveles de expresión en dendritas de neuronas del hipocampo y algunos datos preliminares desarrollados en nuestro laboratorio sugerirían su papel regulador en procesos de plasticidad sináptica (Di Paolo, 2013). Por ello nos pareció interesante evaluar los cambios de expresión de Pdc4 en neuronas corticales de ratón *in vitro* con distintos días de crecimiento en cultivo. Si Pdc4 estuviese regulando el crecimiento de estas neuronas, entonces es esperable que, en las etapas de crecimiento activo, la expresión de Pdc4 sea menor. Efectivamente, observamos que la señal de Pdc4 en el día 2 de cultivo es muy baja y que en el día 5 de

incubación *in vitro* la señal de Pdc4 aumenta en el núcleo respecto al citoplasma (Figura 25B). Esto puede entenderse como un transporte activo de Pdc4 hacia el núcleo, posiblemente como forma de reducir su actividad de represión traduccional de ciertos ARNm importantes para el crecimiento neuronal traducidos en el citosol durante las etapas de crecimiento activo. En la literatura hay trabajos que describen el transporte de Pdc4 hacia el núcleo en otros modelos celulares (Böhm *et al.*, 2003). Por tanto, este cambio en su distribución podría entenderse como una forma de disminuir su actividad durante las etapas de crecimiento activo, en donde aumenta la síntesis proteica neuronal. Apoyando esta idea están las observaciones respecto a la expresión de Pdc4 en el cono axónico de estas neuronas (Figura 25-C-D-E). Su expresión es muy baja en los primeros días de incubación, donde las neuronas están en crecimiento activo. La expresión de Pdc4 solo aumenta significativamente en el día 12 de incubación, cuando las neuronas ya maduraron y sus axones y dendritas encontraron sus blancos. En la literatura se reconoce al cono axónico como un centro activo de síntesis proteica fundamental para el crecimiento axonal (Jung *et al.*, 2012), por lo cual es esperable que Pdc4, un represor traduccional, presente bajos niveles de expresión durante las etapas activas de crecimiento en el cono axonal.

7.4. Conclusiones Finales

En suma, y a partir de todos los datos obtenidos, pudimos evaluar los cambios en la síntesis proteica local (SPL) en los axones *in vivo* pre-condicionados por una lesión respecto a los que no lo están, sugerimos la activación de la vía mTOR en los axones sometidos a injuria *in vivo* y agregamos un posible nuevo regulador de la SPL axonal que es la proteína Pdc4. No solo observamos que Pdc4 cambia su expresión en los axones próximos a un sitio de lesión *in vivo*, sino que además logramos modular su expresión en

axones no lesionados al activar o inhibir la vía mTOR *in vivo*. Por último, sugerimos su rol en el crecimiento axonal al silenciar su expresión en un modelo *in vitro*. Nuevos experimentos en esta línea permitirán entender de mejor forma cómo este nuevo actor participa en la regulación de la síntesis proteica local en axones.

VIII) Perspectivas

A partir de este trabajo, surgen nuevas preguntas que nos interesa responder.

a) ¿Cuáles son los dominios dentro del axón donde ocurre la síntesis de proteínas? Utilizaremos como base experimentos de “*pulse chase*” centrados en tiempos cortos de incubación junto con drogas que limiten el transporte de las proteínas neo-sintetizadas.

b) ¿Cuál es la identidad de las proteínas neo-sintetizadas en condiciones normales y de pre-condicionamiento por lesión? Utilizaremos aminoácidos análogos de la metionina compatibles con técnicas de electroforesis y espectrometría de masas tanto en extruidos de axoplasmas como en cámaras compartimentalizadas. En la literatura existen trabajos que han empleado estos protocolos en estudios *in vivo* (Floral. Hinz, 2012; Ullrich *et al.*, 2014) e *in vitro* (Roche *et al.*, 2009). Otra posibilidad para la identificación por espectrometría de masas de las proteínas neo-sintetizadas es la utilización de los protocolos SILAC (Chen *et al.*, 2015a), que también pueden ser combinados con protocolos de aminoácidos análogos de la metionina (Bagert *et al.*, 2014).

c) ¿Las estructuras que identificamos en raíces ventrales transparentadas son las *PARPs*? Analizaremos su composición proteica por inmunohistoquímica, comparándola con la descrita en trabajos anteriores realizados en extruidos de axoplasmas. Evaluaremos si estas proteínas son neo-sintetizadas en las *PARPs* utilizando la técnica de FUNCAT-PLA (tom Dieck *et al.*, 2015).

d) ¿Cuál es el efecto de modular la expresión de *Pdcd4* únicamente a nivel axonal sobre el crecimiento de los axones? Silenciaremos *Pdcd4* utilizando cámaras compartimentalizadas e incubando el ARN interferente para esta proteína solamente en el compartimento axonal. Sobre-expresaremos *Pdcd4* en los axones durante su crecimiento

utilizando un plásmido que porta la secuencia de Pdcd4 cedido amablemente por el Dr. Hsin Sheng de la Universidad de Kentucky, EEUU.

Pensamos que en el futuro cercano el estudio de diversas patologías, especialmente las del sistema nervioso periférico, buscarán comprender los cambios en las proteínas no solo a nivel del soma neuronal, sino también en el dominio axonal, donde posiblemente este sistema genere respuestas metabólicas más rápidas a los cambios que suceden en el entorno.

IX) Bibliografía

- Abe N, Borson SH, Gambello MJ, Wang F, Cavalli V (2010) Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) activation increases axonal growth capacity of injured peripheral nerves. *J Biol Chem* 285:28034–28043.
- Aguayo a J, David S, Bray GM (1981) Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 95:231–240.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2014) *Molecular Biology of the Cell*, sixth edit. New York: Garland Science.
- Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457:675–677.
- Alvarez J, Benech CR (1983) Axoplasmic incorporation of amino acids in a myelinated fiber exceeds that of its soma: a radioautographic study. *Exp Neurol* 82:25–42.
- Alvarez J, Giuditta A, Koenig E (2000) Protein synthesis in axons and terminals: significance for maintenance, plasticity and regulation of phenotype. With a critique of slow transport theory. *Prog Neurobiol* 62:1–62.
- Alvarez J, Torres JC (1985) Slow axoplasmic transport: a fiction? *J Theor Biol* 112:627–651.
- An JJ, Gharami K, Liao G-Y, Woo NH, Lau AG, Vanevski F, Torre ER, Jones KR, Feng Y, Lu B, Xu B (2008) Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 134:175–187.
- Angelica MD, Fong Y (2011) Making and breaking synapses through local mRNA regulation. *Curr Opin Genet Dev* 21:414–421.
- Bagert JD, Xie YJ, Sweredoski MJ, Qi Y, Hess S, Schuman EM, Tirrell DA (2014) Quantitative, Time-Resolved Proteomic Analysis by Combining Bioorthogonal Noncanonical Amino Acid Tagging and Pulsed Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture. *Mol Cell Proteomics* 13:1352–1358.
- Bareyre FM, Garzorz N, Lang C, Misgeld T, Büning H, Kerschensteiner M (2011) In vivo imaging reveals a phase-specific role of STAT3 during central and peripheral nervous system axon regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:6282–6287.
- Batista AFR, Hengst U (2016) Intra-axonal protein synthesis in development and beyond. *Int J Dev Neurosci*.
- Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, Hill AF (2012) Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 3:124.
- Benech C, Sotelo JR, Menéndez J, Correa-Luna R (1982) Autoradiographic study of RNA and protein synthesis in sectioned peripheral nerves. *Exp Neurol* 76:72–82.

- Ben-Yaakov K, Dagan SY, Segal-Ruder Y, Shalem O, Vuppalanchi D, Willis DE, Yudin D, Rishal I, Rother F, Bader M, Blesch A, Pilpel Y, Twiss JL, Fainzilber M (2012) Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J* 31:1350–1363.
- Biyanee A, Ohnheiser J, Singh P, Klempnauer K-H (2014) A novel mechanism for the control of translation of specific mRNAs by tumor suppressor protein Pdc4: inhibition of translation elongation. *Oncogene* 34:1–9.
- Black MM, Lasek RJ (1980) Slow Components of Axonal Transport: Two Cytoskeletal Networks Labeling Axonally Transported Proteins in Determining the Distribution of Labeled Polypeptides in the Optic Axons. *J Cell Biol* 86:616–623.
- Bleher R, Martin R (2001) Ribosomes in the squid giant axon. *Neuroscience* 107:527–534.
- Bodian D (1965) A Suggestive Relationship of Nerve Cell RNA With Specific Synaptic Sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 53:418–425.
- Böhm M, Sawicka K, Siebrasse JP, Brehmer-Fastnacht A, Peters R, Klempnauer K-H (2003) The transformation suppressor protein Pdc4 shuttles between nucleus and cytoplasm and binds RNA. *Oncogene* 22:4905–4910.
- Brittis PA, Lu Q, Flanagan JG (2002) Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target. *Cell* 110:223–235.
- BrosiusLutz A, Barres BA (2014) Contrasting the Glial Response to Axon Injury in the Central and Peripheral Nervous Systems. *Dev Cell* 28:7–17.
- Cajigas IJ, Tushev G, Will TJ, tom Dieck S, Fuerst N, Schuman EM (2012) The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron* 74:453–466.
- Calliari a, Sotelo-Silveira J, Costa MC, Nogueira J, Cameron LC, Kun a, Benech J, Sotelo JR (2002) Myosin Va is locally synthesized following nerve injury. *Cell Motil Cytoskeleton* 51:169–176.
- Calliari A, Farias J, Puppo A, Canclini L, Mercer JA, Munroe D, Sotelo JR, Sotelo-Silveira JR (2014) Myosin Va associates with mRNA in ribonucleoprotein particles present in myelinated peripheral axons and in the central nervous system. *Dev Neurobiol* 74:382–396.
- Campbell DS, Holt CE (2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32:1013–1026.
- Campenot RB, Eng H (2000) Protein synthesis in axons and its possible functions. *J Neurocytol* 29:793–798.
- Canclini L, Wallrabe H, Di Paolo A, Kun A, Calliari A, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR (2014) Association of Myosin Va and Schwann cells-derived RNA in mammal myelinated axons, analyzed by immunocytochemistry and confocal FRET microscopy. *Methods* 66:153–161.
- Casagrand JL, Guzik AL, Eaton RC (1999) Mauthner and reticulospinal responses to the

- onset of acoustic pressure and acceleration stimuli. *J Neurophysiol* 82:1422–1437.
- Celio MR, Gray EG, Yasargil GM (1979) Ultrastructure of the Mauthner axon collateral and its synapses in the goldfish spinal cord. *J Neurocytol* 8:19–29.
- Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F (2015a) Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics* 15:3175–3192.
- Chen Y, Luo C, Zhao M, Li Q, Hu R, Zhang JH, Liu Z, Feng H (2015b) Administration of a PTEN inhibitor BPV(pic) attenuates early brain injury via modulating AMPA receptor subunits after subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurosci Lett* 588:131–136.
- Cho Y, Di Liberto V, Carlin D, Abe N, Li KH, Burlingame AL, Guan S, Michaelevski I, Cavalli V (2014) Syntaxin13 expression is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR) in injured neurons to promote axon regeneration. *J Biol Chem* 289:15820–15832.
- Christie KJ, Webber C a, Martinez J a, Singh B, Zochodne DW (2010) PTEN inhibition to facilitate intrinsic regenerative outgrowth of adult peripheral axons. *J Neurosci* 30:9306–9315.
- Chung K, Wallace J, Kim S-Y, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K (2013) Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497:332–337.
- Conforti L, Gilley J, Coleman MP (2014) Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nat Rev Neurosci* 15:394–409.
- Costa-Mattioli M, Sossin WS, Klann E, Sonenberg N (2009) Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron* 61:10–26.
- Costantini I, Ghobril J-P, Di Giovanna AP, Mascaro ALA, Silvestri L, Müllenbroich MC, Onofri L, Conti V, Vanzi F, Sacconi L, Guerrini R, Markram H, Iannello G, Pavone FS (2015) A versatile clearing agent for multi-modal brain imaging. *Sci Rep* 5:9808.
- Court FA, Hendriks WTJ, MacGillavry HD, Alvarez J, van Minnen J (2008) Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *J Neurosci* 28:11024–11029.
- Court FA, Midha R, Cisterna BA, Grochmal J, Shakhbazau A, Hendriks WT, Van Minnen J (2011) Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons. *Glia* 59:1529–1539.
- Cox LJ, Hengst U, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Jaffrey SR (2008) Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat Cell Biol* 10:149–159.
- Darbinyan A, Pozniak P, Darbinian N, White MK, Khalili K (2013) Compartmentalized neuronal cultures. *Methods Mol Biol* 1078:147–152.
- Dennis MD, Jefferson LS, Kimball SR (2012) Role of p70S6K1-mediated phosphorylation of eIF4B and PDCD4 proteins in the regulation of protein synthesis. *J Biol Chem*

287:42890–42899.

Dent EW, Gupton SL, Gertler FB (2011) The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:39.

Di Paolo A (2013) Análisis de expresión de la Proteína Pcd4 en Sistema Nervioso.

Dieterich DC, Link AJ, Graumann J, Tirrell DA, Schuman EM (2006) Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9482–9487.

Donnelly CJ, Fainzilber M, Twiss JL (2010) Subcellular communication through RNA transport and localized protein synthesis. *Traffic* 11:1498–1505.

Donnelly CJ, Park M, Spillane M, Yoo S, Pacheco A, Gomes C, Vuppalanchi D, McDonald M, Kim HH, Kim HK, Merianda TT, Gallo G, Twiss JL (2013) Axonally synthesized β -actin and GAP-43 proteins support distinct modes of axonal growth. *J Neurosci* 33:3311–3322.

Donnelly CJ, Willis DE, Xu M, Tep C, Jiang C, Yoo S, Schanen NC, Kirn-Safran CB, van Minnen J, English A, Yoon SO, Bassell GJ, Twiss JL (2011) Limited availability of ZBP1 restricts axonal mRNA localization and nerve regeneration capacity. *EMBO J* 30:4665–4677.

Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M (2006) S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 314:467–471.

Eastman G (2016) Análisis del efecto traduccional de Pcd4 en células neuronales mediante secuenciación masiva de huellas polisomales.

Eddleman CS, Bittner GD, Fishman HM (2000) Barrier permeability at cut axonal ends progressively decreases until an ionic seal is formed. *Biophys J* 79:1883–1890.

Edelstein AD, Tsuchida MA, Amodaj N, Pinkard H, Vale RD, Stuurman N (2014) Advanced methods of microscope control using μ Manager software. *J Biol Methods* 1:1–10.

Edström A, Sjöstrand J (1969) Protein synthesis in the isolated Mauthner nerve fibre of Goldfish. *J Neurochem* 16:67–81.

Eng H, Lund K, Campenot RB (1999) Synthesis of beta-tubulin, actin, and other proteins in axons of sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Neurosci* 19:1–9.

Farias J (2014) Análisis del transcriptoma de axones mielínicos mediante secuenciación masiva.

Frühbeis C, Fröhlich D, Krämer-Albers E-M (2012) Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Front Physiol* 3.

Funch PG, Wood MR, Faber DS (1984) Localization of active sites along the myelinated goldfish Mauthner axon: morphological and pharmacological evidence for saltatory conduction. *J Neurosci* 4:2397–2409.

- Gaudet AD et al. (2011) Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* 8:110.
- Giuditta A, Cupellot A, Lazzarini G (1980) Ribosomal RNA in the Axoplasm of the Squid Giant Axon. *J Neurochem* 34:1757–1760.
- Giuditta A, Dettbarn WD, Brzin M (1968) Protein synthesis in the isolated giant axon of the squid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59:1284–1287.
- Giuditta A, Hunt T, Santella L (1986) Rapid important paper. Messenger RNA in squid axoplasm. *Neurochem Int* 8:435–442.
- Giuditta A, Metafora S, Felsani A, Del Rio A (1977) Factors for protein synthesis in the axoplasm of squid giant axons. *J Neurochem* 28:1393–1395.
- Gordon T (2009) The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus* 26:E3.
- Gumy LF, Tan CL, Fawcett JW (2010) The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Exp Neurol* 223:28–37.
- Gumy LF, Yeo GSH, Tung Y-CL, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, Lam BYH, Twiss JL, Holt CE, Fawcett JW (2011) Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA* 17:85–98.
- Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A (2011) Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci* 14:1481–1488.
- Hanz S, Perlson E, Willis D, Zheng J, Massarwa R, Huerta JJ, Koltzenburg M, Kohler M, Twiss JL, Fainzilber M (2003) Retrograde Injury Signaling in Lesioned Nerve. *Neuron* 40:1095–1104.
- Hengst U, Jaffrey SR (2007) Function and translational regulation of mRNA in developing axons. *Semin Cell Dev Biol* 18:209–215.
- Hinz F, Dieterich DC, Tirrell DA, Schuman EM (2012) Noncanonical Amino Acid Labeling in Vivo to Visualize and Affinity Purify Newly Synthesized Proteins in Larval Zebrafish. *ACS Chem Neurosci* 3:40.
- Hirling H, Steiner P, Chaperon C, Marsault R, Regazzi R, Catsicas S (2000) Syntaxin 13 is a developmentally regulated SNARE involved in neurite outgrowth and endosomal trafficking. *Eur J Neurosci* 12:1913–1923.
- Ingoglia NA, Giuditta A, Zanakis MF, Babigian A, Tasaki I, Chakraborty G, Sturman JA (1983) Incorporation of 3H-amino acids into proteins in a partially purified fraction of axoplasm: evidence for transfer RNA-mediated, post-translational protein modification in squid giant axons. *J Neurosci* 3:2463–2473.
- Jankowski MP, McIlwrath SL, Jing X, Cornuet PK, Salerno KM, Koerber HR, Albers KM (2009) Sox11 transcription factor modulates peripheral nerve regeneration in adult mice. *Brain Res* 1256:43–54.

- Ji SJ, Jaffrey SR (2014) Axonal transcription factors: Novel regulators of growth cone-to-nucleus signaling. *Dev Neurobiol* 74:245–258.
- Jiménez-Díaz L, Géranton SM, Passmore GM, Leith JL, Fisher AS, Berliocchi L, Sivasubramaniam AK, Sheasby A, Lumb BM, Hunt SP (2008) Local translation in primary afferent fibers regulates nociception. *PLoS One* 3:e1961.
- Jung H, Holt CE (2013) Local translation of mRNAs in neural development. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:153–165.
- Jung H, O'Hare CM, Holt CE (2011) Translational regulation in growth cones. *Curr Opin Genet Dev* 21:458–464.
- Jung H, Yoon BC, Holt CE (2012) Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci* 13:308–324.
- Kim E, Jung H (2015) Local protein synthesis in neuronal axons: Why and how we study. *BMB Rep* 48:139–146.
- Kim SY, Chung K, Deisseroth K (2013) Light microscopy mapping of connections in the intact brain. *Trends Cogn Sci* 17:596–599.
- Kindler S, Kreienkamp H-J (2012) Dendritic mRNA targeting and translation. *Adv Exp Med Biol* 970:285–305.
- Koenig E (1965) Synthetic mechanisms in the axon- II RNA in myelin free axons of the cat. *J Neurochem* 12:357–361.
- Koenig E (1967) Synthetic mechanisms in the axon-IV. In vitro incorporation of [H3 precursors into axonal protein and RNA. *J Neurochem* 14:437–446.
- Koenig E (1979) Ribosomal RNA in Mauthner axon: implications for a protein synthesizing machinery in the myelinated axon. *Brain Res* 174:95–107.
- Koenig E (1991) Evaluation of local synthesis of axonal proteins in the goldfish Mauthner cell axon and axons of dorsal and ventral roots of the rat in vitro. *Mol Cell Neurosci* 2:384–394.
- Koenig E (2009) *Cell Biology of the Axon*, 2009th ed. New York: Springer.
- Koenig E, Adams P (1982) Local protein synthesizing activity in axonal fields regenerating in vitro. *J Neurochem* 39:386–400.
- Koenig E, Giuditta A (1999) Protein-synthesizing machinery in the axon compartment. *Neuroscience* 89:5–15.
- Koenig E, Martin R, Titmus M, Sotelo-Silveira JR (2000) Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J Neurosci* 20:390–400.
- Koenig E, Rainer M (1996) Cortical Plaque-Like Structures Identify Domains in the Mauthner Cell Axon Ribosome-Containing Domains in the Mauthner Cell Axon. *J Neurosci* 16:1400–1411.

- Kun A, Otero L, Sotelo Silveira JR, Sotelo JR (2007) Ribosomal distributions in axons of mammalian myelinated fibers. *J Neurosci Res* 85:2087–2098.
- Kurimoto T, Yin Y, Habboub G, Gilbert H-Y, Li Y, Nakao S, Hafezi-Moghadam A, Benowitz LI (2013) Neutrophils Express Oncomodulin and Promote Optic Nerve Regeneration. *J Neurosci* 33:14816–14824.
- Lankat-Buttgereit B, Göke R (2009) The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol Cell* 101:309–317.
- Laplante M, Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 122:3589–3594.
- Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274–293.
- Lasek RJ, Dabrowski C, Nordlander R (1973) Analysis of axoplasmic RNA from invertebrate giant axons. *Nat New Biol* 244:162–165.
- Lasek RJ, Gainer H, Barker JL (1977) Cell-to-cell transfer of glial proteins to the squid giant axon. The glia-neuron protein transfer hypothesis. *J Cell Biol* 74:501–523.
- Lerner TN, Shilyansky C, Davidson TJ, Evans KE, Beier KT, Zalocusky KA, Crow AK, Malenka RC, Luo L, Tomer R, Deisseroth K (2015) Intact-Brain Analyses Reveal Distinct Information Carried by SNc Dopamine Subcircuits. *Cell* 162:635–647.
- Leung K-M, van Horck FP, Lin AC, Allison R, Standart N, Holt CE (2006) Asymmetrical β -actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nat Neurosci* 9:1247–1256.
- Li J, Czajkowsky DM, Li X, Shao Z (2015) Fast immuno-labeling by electrophoretically driven infiltration for intact tissue imaging. *Sci Rep* 5:10640.
- Li YC, Li YN, Cheng CX, Sakamoto H, Kawate T, Shimada O, Atsumi S (2005) Subsurface cisterna-lined axonal invaginations and double-walled vesicles at the axonal-myelin sheath interface. *Neurosci Res* 53:298–303.
- Liu K, Tedeschi A, Park KK, He Z (2011) Neuronal Intrinsic Mechanisms of Axon Regeneration.
- Loh PG, Yang H-S, Walsh M a, Wang Q, Wang X, Cheng Z, Liu D, Song H (2009) Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor Pcd4. *EMBO J* 28:274–285.
- Menegas W, Bergan JF, Ogawa SK, Isogai Y, Venkataraju KU, Osten P, Uchida N, Watabe-Uchida M (2015) Dopamine neurons projecting to the posterior striatum form an anatomically distinct subclass. *Elife* 4.
- Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M (2002) Disruption of dendritic translation of CaMKII α impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36:507–519.
- Millis AJ, Suyama Y (1972) Effects of chloramphenicol and cycloheximide on the biosynthesis of mitochondrial ribosomes in Tetrahymena. *J Biol Chem* 247:4063–

4073.

- Ming G, Wong ST, Henley J, Yuan X, Song H, Spitzer NC, Poo M (2002) Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* 417:411–418.
- Minis A, Dahary D, Manor O, Leshkowitz D, Pilpel Y, Yaron A (2014) Subcellular transcriptomics-dissection of the mRNA composition in the axonal compartment of sensory neurons. *Dev Neurobiol* 74:365–381.
- Nadeau S, Hein P, Fernandes KJL, Peterson AC, Miller FD (2005) A transcriptional role for C/EBP β in the neuronal response to axonal injury. *Mol Cell Neurosci* 29:525–535.
- Narasimhan M, Rathinam M, Riar A, Patel D, Mummidi S, Yang H-S, Colburn NH, Henderson GI, Mahimainathan L (2012) Programmed Cell Death 4 (PDCD4): A Novel Player in Ethanol-Mediated Suppression of Protein Translation in Primary Cortical Neurons and Developing Cerebral Cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 4:1–14.
- Nevo-Dinur K, Nussbaum-Shochat A, Ben-Yehuda S, Amster-Choder O (2011) Translation-Independent Localization of mRNA in *E. coli*. *Sci (New York, NY)* 331:1081–1084.
- Obara I, Géronton SM, Hunt SP (2012) Axonal protein synthesis: a potential target for pain relief? *Curr Opin Pharmacol* 12:42–48.
- Ohtake Y, Hayat U, Li S (2015) PTEN inhibition and axon regeneration and neural repair. *Neural Regen Res* 10:1363–1368.
- Palay SL, Palade GE (1955) The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol* 1:69–88.
- Park KK, Liu K, Hu Y, Kanter JL, He Z (2010) PTEN/mTOR and axon regeneration. *Exp Neurol* 223:45–50.
- Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B (2009) Promoting Axon Regeneration in the Adult CNS by Modulation of the PTEN/mTOR Pathway. *Science (80-)* 322:963–966.
- Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Seger R, Fainzilber M (2005) Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 45:715–726.
- Perry RB, Fainzilber M (2013) Local translation in neuronal processes in vivo tests of a heretical hypothesis. *Dev Neurobiol* 74:210–217.
- Perry RB-T, Doron-Mandel E, Iavnilovitch E, Rishal I, Dagan SY, Tsoory M, Coppola G, McDonald MK, Gomes C, Geschwind DH, Twiss JL, Yaron A, Fainzilber M (2012) Subcellular knockout of importin β 1 perturbs axonal retrograde signaling. *Neuron* 75:294–305.
- Piper M, Holt C (2004) RNA translation in axons. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:505–523.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE (2012) *Neuroscience*, 5th ed. Sinauer Associates.

- Rapallino M V., Cupello A, Giuditta A (1988) Axoplasmic RNA species synthesized in the isolated squid giant axon. *Neurochem Res* 13:625–631.
- Riar AK, Narasimhan M, Rathinam ML, Vedpathak D, Mummidi S, Henderson GI, Mahimainathan L (2014) Ethanol-induced transcriptional activation of Programmed Cell Death 4 (Pdc4) is mediated by GSK-3 β signaling in rat cortical neuroblasts. *PLoS One* 9:1–14.
- Roche FK, Marsick BM, Letourneau PC (2009) Protein synthesis in distal axons is not required for growth cone responses to guidance cues. *J Neurosci* 29:638–652.
- Ruff CA, Staak N, Patodia S, Kaswich M, Rocha-Ferreira E, Da Costa C, Brecht S, Makwana M, Fontana X, Hristova M, Rumajogee P, Galiano M, Bohatschek M, Herdegen T, Behrens A, Raivich G (2012) Neuronal c-Jun is required for successful axonal regeneration, but the effects of phosphorylation of its N-terminus are moderate. *J Neurochem* 121:607–618.
- Sahly I, Khoutorsky A, Erez H, Prager-Khoutorsky M, Spira ME (2006) On-line confocal imaging of the events leading to structural dedifferentiation of an axonal segment into a growth cone after axotomy. *J Comp Neurol* 494:705–720.
- Scheib J, Höke A (2013) Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol* 9:668–676.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682.
- Schwarz TL (2013) Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:1–15.
- Shigeoka T et al. (2016) Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits. *Cell* 166:489–502.
- Sotelo Silveira JR, Sotelo JR, Chalar C, Sanguinetti C, Benech JC, Kun A, Calliari A (2000) Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve. *J Neurosci Res* 62:65–74.
- Sotelo JR, Benech CR, Kun A (1992) Local radiolabeling of the 68 kDa neurofilament protein in rat sciatic nerves. *Neurosci Lett* 1-2:174–176.
- Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cal K, Bresque M, Dipaolo A, Farias J, Mercer JA (2014) Glia to axon RNA transfer. *Dev Neurobiol* 74:292–302.
- Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Xu L, Wallrabe H, Calliari A, Rosso G, Cal K, Mercer J a (2013) Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from Schwann cells to axons. *PLoS One* 8:e61905.
- Sotelo JR, Kun A, Benech JC, Giuditta A, Morillas J, Benech CR (1999) Ribosomes and polyribosomes are present in the squid giant axon: An immunocytochemical study. *Neuroscience* 90:705–715.

- Sotelo-Silveira J, Crispino M, Puppo A, Sotelo JR, 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. *J Neurochem* 104:545–557.
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cárdenas M, Koenig E, Sotelo JR (2004) Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (periaxoplasmic ribosomal plaques) of myelinated axons. *J Neurobiol* 60:187–196.
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Koenig E, Sotelo JR (2006) RNA trafficking in axons. *Traffic* 7:508–515.
- Sotelo-Silveira JR, Holt CE (2014) Introduction to the special issue on local protein synthesis in axons. *Dev Neurobiol* 74:207–209.
- Spence RD, Kurth F, Itoh N, Mongerson CRL, Wailes SH, Peng MS, MacKenzie-Graham AJ (2014) Bringing CLARITY to gray matter atrophy. *Neuroimage* 101:625–632.
- Spira ME, Oren R, Dormann A, Gitler D (2003) Critical calpain-dependent ultrastructural alterations underlie the transformation of an axonal segment into a growth cone after axotomy of cultured *Aplysia* neurons. *J Comp Neurol* 457:293–312.
- Steward O, Levy WB (1982) Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* 2:284–291.
- Steward O, Schuman EM (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 24:299–325.
- Strickland IT, Richards L, Holmes FE, Wynick D, Uney JB, Wong L-F (2011) Axotomy-induced miR-21 promotes axon growth in adult dorsal root ganglion neurons. *PLoS One* 6:e23423.
- Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H, Ueda HR (2014) Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157:726–739.
- Sutton MA, Schuman EM (2005) Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J Neurobiol* 64:116–131.
- Sylwestrak EL, Rajasethupathy P, Wright MA, Jaffe A, Deisseroth K (2016) Multiplexed Intact-Tissue Transcriptional Analysis at Cellular Resolution. *Cell* 164:792–804.
- Taylor AM, Berchtold NC, Perreau VM, Tu CH, Li Jeon N, Cotman CW (2009) Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. *J Neurosci* 29:4697–4707.
- Tobias GS, Koenig E (1975a) Axonal protein synthesizing activity during the early outgrowth period following neurotomy. *Exp Neurol* 49:221–234.
- Tobias GS, Koenig E (1975b) Influence of nerve cell body and neurolemma cell on local axonal protein synthesis following neurotomy. *Exp Neurol* 49:235–245.

- tom Dieck S, Kochen L, Hanus C, Heumüller M, Bartnik I, Nassim-Assir B, Merk K, Mosler T, Garg S, Bunse S, Tirrell DA, Schuman EM (2015) Direct visualization of newly synthesized target proteins in situ. *Nat Methods* 12:411–414.
- Tomer R, Lovett-Barron M, Kauvar I, Andalman A, Burns VM, Sankaran S, Grosenick L, Broxton M, Yang S, Deisseroth K (2015) SPED Light Sheet Microscopy: Fast Mapping of Biological System Structure and Function. *Cell* 163:1796–1806.
- Torre ER, Steward O (1992) Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. *J Neurosci* 12:762–772.
- Twiss JL, Smith DS, Chang B, Shooter EM (2000) Translational control of ribosomal protein L4 mRNA is required for rapid neurite regeneration. *Neurobiol Dis* 7:416–428.
- Ullrich M, Liang V, Chew YL, Banister S, Song X, Zaw T, Lam H, Berber S, Kassiou M, Nicholas HR, Götz J (2014) Bio-orthogonal labeling as a tool to visualize and identify newly synthesized proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Protoc* 9:2237–2255.
- Vagnoni A, Perkinton MS, Gray EH, Francis PT, Noble W, Miller CCJ (2012) Calsyntenin-1 mediates axonal transport of the amyloid precursor protein and regulates $\alpha\beta$ production. *Hum Mol Genet* 21:2845–2854.
- Van Minnen J, Bergman JJ, Van Kesteren ER, Smit AB, Geraerts WPM, Lukowiak K, Hasan SU, Syed NI (1997) De novo protein synthesis in isolated axons of identified neurons. *Neuroscience* 80:1–7.
- Verma P, Chierzi S, Codd AM, Campbell DS, Meyer RL, Holt CE, Fawcett JW (2005) Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J Neurosci* 25:331–342.
- Wang X, Proud CG (2006) The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology* 21:362–369.
- Weiss P, Hiscoe HB (1948) Experiments on the mechanism of nerve growth. *J Exp Zool* 107:315–395.
- Willis D, Li KW, Zheng J-Q, Chang JH, Smit AB, Smit A, Kelly T, Merianda TT, Sylvester J, van Minnen J, Twiss JL (2005) Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J Neurosci* 25:778–791.
- Willis DE, Xu M, Donnelly CJ, Tep C, Kendall M, Erenstheyn M, English AW, Schanen NC, Kirn-Safran CB, Yoon SO, Bassell GJ, Twiss JL (2011) Axonal Localization of transgene mRNA in mature PNS and CNS neurons. *J Neurosci* 31:14481–14487.
- Yan D, Wu Z, Chisholm AD, Jin Y (2009) The DLK-1 Kinase Promotes mRNA Stability and Local Translation in *C. elegans* Synapses and Axon Regeneration. *Cell* 138:1005–1018.
- Ye L, Allen WE, Kimberly R, Luo L, Jennifer A, Deisseroth K (2016) Wiring and Molecular Features of Prefrontal Article Wiring and Molecular Features of Prefrontal Ensembles

- Representing Distinct Experiences. *Cell* 165:1–13.
- Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 23:2284–2293.
- Yokomizo T, Yamada-Inagawa T, Yzaguirre AD, Chen MJ, Speck NA, Dzierzak E (2012) Whole-mount three-dimensional imaging of internally localized immunostained cells within mouse embryos. *NatProtoc* 7:421–431.
- Yoon BC, Jung H, Dwivedy A, O'Hare CM, Zivraj KH, Holt CE (2012) Local translation of extranuclear lamin B promotes axon maintenance. *Cell* 148:752–764.
- Yu B, Zhou S, Qian T, Wang Y, Ding F, Gu X (2011) Altered microRNA expression following sciatic nerve resection in dorsal root ganglia of rats. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43:909–915.
- Zelena J (1970) Ribosome-like particles in myelinated axons of the rat. *Brain Res* 24:359–363.
- Zhang M-D, Tortoriello G, Hsueh B, Tomer R, Ye L, Mitsios N, Borgius L, Grant G, Kiehn O, Watanabe M, Uhlén M, Mulder J, Deisseroth K, Harkany T, Hökfelt TGM (2014) Neuronal calcium-binding proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E1149–E1158.
- Zheng H, Rinaman L (2015) Simplified CLARITY for visualizing immunofluorescence labeling in the developing rat brain. *Brain Struct Funct*.
- Zheng JQ, Kelly TK, Chang B, Ryazantsev S, Rajasekaran a K, Martin KC, Twiss JL (2001) A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. *J Neurosci* 21:9291–9303.
- Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo Y-Y (2008) MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 18:350–359.
- Zivraj KH, Tung YCL, Piper M, Gumy L, Fawcett JW, Yeo GSH, Holt CE (2010) Subcellular profiling reveals distinct and developmentally regulated repertoire of growth cone mRNAs. *J Neurosci* 30:15464–15478.
- Zochodne D (2008) Neurobiology of peripheral nerve regeneration - Chapter 5 - Early Regenerative Events. Cambridge: Cambridge University Press.