



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

TESINA DE GRADO

**Estudio de la localización y caracterización de canales
CLIC en el músculo esquelético de ratón.**

María Magdalena Guarino Alvez

Tutor: Prof. Gustavo Brum

Orientación: Licenciatura en Bioquímica

2018

Agradecimientos

A mi tutor de tesis Gustavo, por su dedicación y apoyo durante todo este tiempo.

A mi compañera de laboratorio Mariana por su compañía y por brindarme su ayuda.

A mi familia y amigos por su apoyo y por creer en mí.

Gracias!

INDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN	5
HIPÓTESIS	14
Objetivos generales y específicos	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Disección de músculos de ratón.	15
Fijación con formol.....	15
Técnicas histológicas	16
Inclusión en parafina.....	16
Armado de bloque.....	16
Cortes del preparado	17
Tinción hematoxilina-eosina	18
Criostato	19
Dot blot.....	21
Inmunohistoquímica	22
RESULTADOS	24
Identificación y localización de los isotipos CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6 (CLIC-16) mediante inmunohistoquímica en células HELA.	24
Detección de expresión de isotipos CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6 (Kit CLIC-16) mediante Dot Blot de fibras musculares y células HELA.	25
Identificación y localización de isotipos CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6 (Kit CLIC-16) mediante inmunohistoquímica en fibras musculares.....	27
Detección de expresión de isotipo CLIC-5 mediante Dot Blot de fibra muscular y células HELA.....	28
Identificación y localización de isotipo CLIC-5 mediante inmunohistoquímica en fibras musculares.	29
Detección de la expresión de isotipo CLIC-1 mediante Dot Blot de fibra muscular y células HELA.	30
Identificación y localización de isotipo CLIC-1 mediante inmunohistoquímica en fibra muscular.	31
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	33
BIBLIOGRAFÍA	35

RESUMEN

Los canales CLIC (de Chloride Intracellular Channel) se encuentran en múltiples tejidos y son permeables a los aniones, fundamentalmente a cloruro. Están constituidos por proteínas de aproximadamente 26 kilodaltons (kDa), de estructura similar a la glutatión transferasa (GST) encontrándose en forma soluble en el citoplasma. Dependiendo del estado redox del medio se agrupan formando canales aniónicos, sin embargo se sabe poco sobre cómo la forma CLIC soluble puede cambiar a una forma integral de membrana (Goodchild et al., 2009). Se ha sugerido que el ambiente ácido encontrado por CLICs en la superficie de la membrana modifica la región transmembrana del dominio N-terminal, lo que le permitiría interactuar e insertarse en la membrana (Fanucchi et al., 2008).

Se sabe que la región de la molécula con actividad glutatión transferasa está integrada por 240 residuos (Littler et al., 2010).

Hasta la fecha se conocen 6 isoformas, CLIC-1, CLIC-2, CLIC-3, CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6. Se ha demostrado que CLIC-2 modula el canal de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS), conocido como receptor de rianodina (RyR) (Board et al., 2004). Este se localiza a nivel de la triada formando un gran complejo en la membrana del retículo sarcoplásmico, enfrentando los receptores de dihidropiridinas en el túbulo T (Ríos & Brum, 1987).

El RyR se expresa en distintos tejidos y especies, presentando tres isoformas (Lanner y col., 2010), siendo la isoforma 1 (RyR1) la que se encuentra en el músculo esquelético de vertebrados. El RyR es parte central de un complejo macromolecular responsable de la liberación de calcio, en músculo cardíaco y esquelético e interactúa a nivel de la región citoplasmática con otras proteínas cuyo papel es probablemente regulatorio. Entre estas proteínas se incluye a CLIC-2 que se ha postulado se asocia indirectamente con el RyR (Steele et al., 2014).

Se ha propuesto que los canales CLIC podrían actuar directamente modulando la liberación de calcio interactuando con los RyR (Steele et al., 2014) o indirectamente generando una vía de entrada o salida de iones hacia el RS, compensando las diferencias de carga en el RS, durante la liberación de Ca^{2+} (Kourie et al., 1997; Sukhareva et al., 1994; Ikemoto et al., 1994).

Las proteínas que forman dichos canales, presentan un solo segmento transmembrana (TM) y forman canales en bicapas artificiales uniéndose de 6 a 7 unidades (Edwards & Kapadia., 2000; Littler et al., 2010).

La información sobre los canales de Cl⁻ intracelulares en el músculo esquelético, fundamentalmente en relación al tipo de canal que se expresa y a su localización, es muy escasa (Kourie, 1997).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de estos canales en fibras de músculo esquelético de ratón e identificar las posibles isoformas presentes en el mismo. Mediante inmunohistoquímica y dot blot logramos identificar la expresión de isoformas, CLIC-1 y CLIC-5, obteniendo información sobre su distribución en el músculo. No se pudo descartar la expresión de otras isoformas.

INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético está compuesto por fibras musculares, por tejido conectivo y vasos sanguíneos. La membrana que recubre las fibras se denomina sarcolema y justo debajo de ella se encuentran los núcleos en el citoplasma, el hecho de que los núcleos se encuentren superficialmente, permite tener un mayor espacio para la maquinaria contráctil. En el interior de las fibras se encuentran mayoritariamente actina y miosina II, éstas proteínas forman haces, que a su vez forman miofibrillas. Cada miofibrilla es rodeada por el retículo sarcoplásmico (RS), que es un complejo de membranas cuya función es crucial, ya que es el principal almacén de calcio intracelular. Las células musculares esqueléticas presentan un bandeo que las caracteriza, como si fueran estrías, bandas claras y oscuras, orientándose de manera perpendicular al eje de la célula, y es resultado de la superposición de los filamentos proteicos de actina y miosina nombrados anteriormente. Las bandas A son las bandas oscuras que se observan al microscopio y las claras se conocen como bandas I. En el interior de la banda A se puede observar la zona H, así mismo se destaca en el interior de la banda I, las líneas Z (https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_muscular.php).

El sector que se encuentra entre dos líneas Z, es la unidad contráctil, la cual se repite a lo largo de toda la fibra y se denomina sarcómero (Kaisto & Metsikko, 2003).

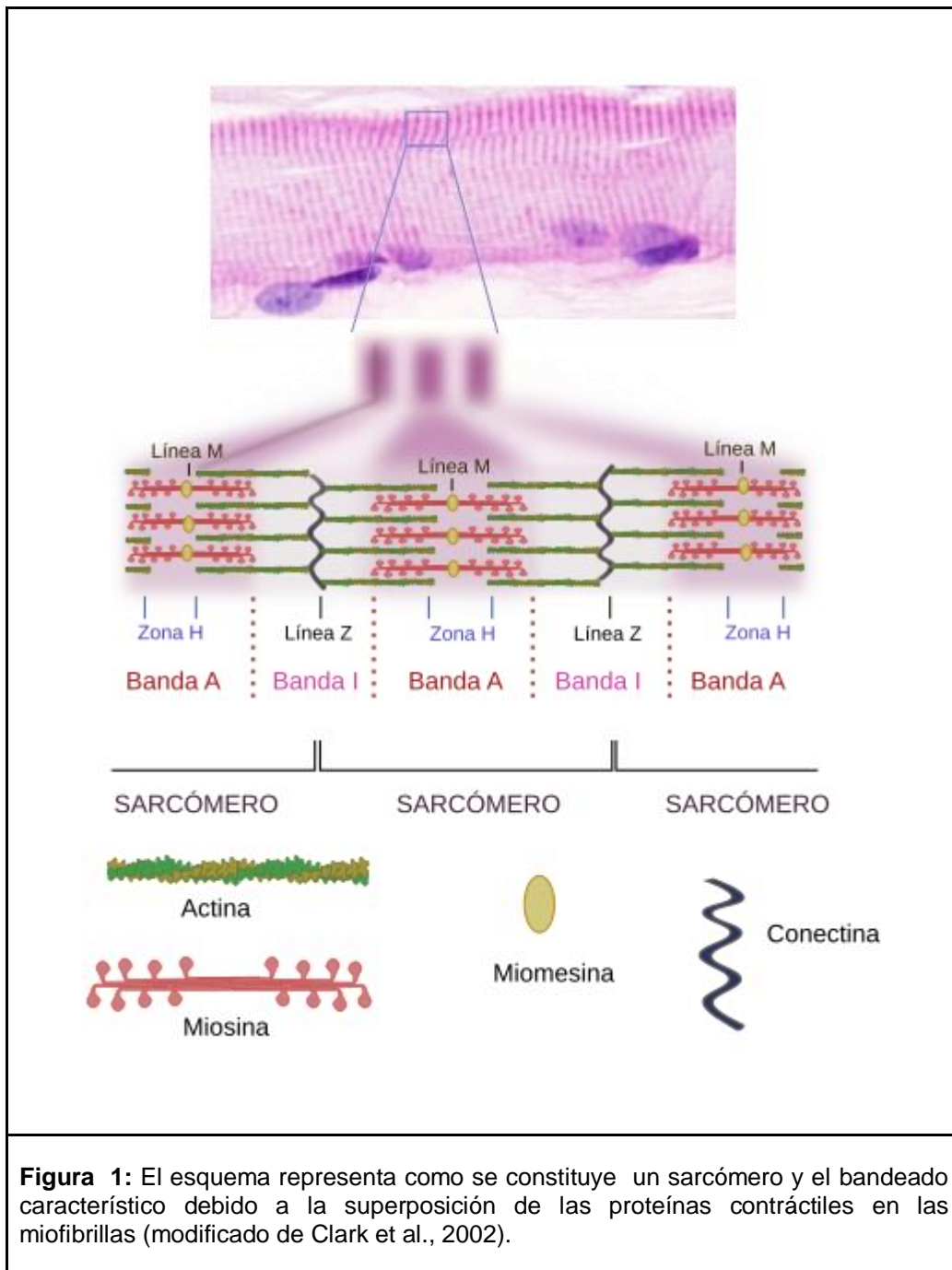


Figura 1: El esquema representa como se constituye un sarcómero y el bandeo característico debido a la superposición de las proteínas contráctiles en las miofibrillas (modificado de Clark et al., 2002).

El principal componente de los filamentos delgados es la actina. Los mismos están formados por dos hélices alfa enrolladas que se unen con las proteínas tropomiosinas y troponinas. La función de la tropomiosina y la troponina es mediar la interacción entre los filamentos de actina y las cabezas de miosina, mediante cambios conformacionales, los mismos habilitan o no, el contacto de las cabezas de miosina con los filamentos de actina. Cuando la tropomiosina interviene bloquea el contacto entre actina y miosina, generando relajación muscular. Para que ocurra la

contracción las proteínas actina y miosina deben interactuar, lo cual ocurre como consecuencia del aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

El filamento grueso está formado principalmente por miosina, la cual posee una parte globular, responsable de generar el movimiento de la miosina sobre la actina y una parte filamentosa. Los extremos del filamento grueso se relacionan con los filamentos de actina, formando la banda A nombrada al inicio (<https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/miocito.php>).

Aparte de la miosina hay otras proteínas asociadas al filamento grueso entre las que se encuentran, la titina, las proteínas C y H localizadas en la zona C, AMP-desaminasa. El movimiento de las miofibrillas se genera cuando las cabezas globulares de la miosina forman puentes con la actina (Clark et al., 2002).

Como se citó anteriormente la contracción muscular es un proceso altamente regulado y dependiente de la concentración de Ca^{2+} , el mismo es almacenado en el RS, el cual tiene la capacidad de almacenar grandes cantidades de Ca^{2+} , de hecho se considera una cisterna de almacenamiento, dividiéndose en compartimentos especializados. Los extremos de cada RS están formados por cisternas terminales que junto con los túbulos transversos (túbulo T) que son la invaginación de la membrana, conforman las estructuras denominadas tríadas (Reyes-Juárez & Zarain-Herzberg, 2006; Van Winkle & Entman, 1979).

Ciertas características morfológicas sugieren que el acoplamiento entre la excitación y contracción muscular (AEC) ocurre casi exclusivamente por señales originadas en las uniones tríadicas en el músculo esquelético (Fabiato & Fabiato, 1979; Fabiato et al., 1983).

Las regiones del RS más alejadas de los túbulos T, se conocen como RS longitudinales y son membranas en forma de tubo que se ramifican en el interior de la célula transportando activamente el Ca^{2+} al interior del RS durante la relajación muscular (Franzini-Armstrong et al., 2005).

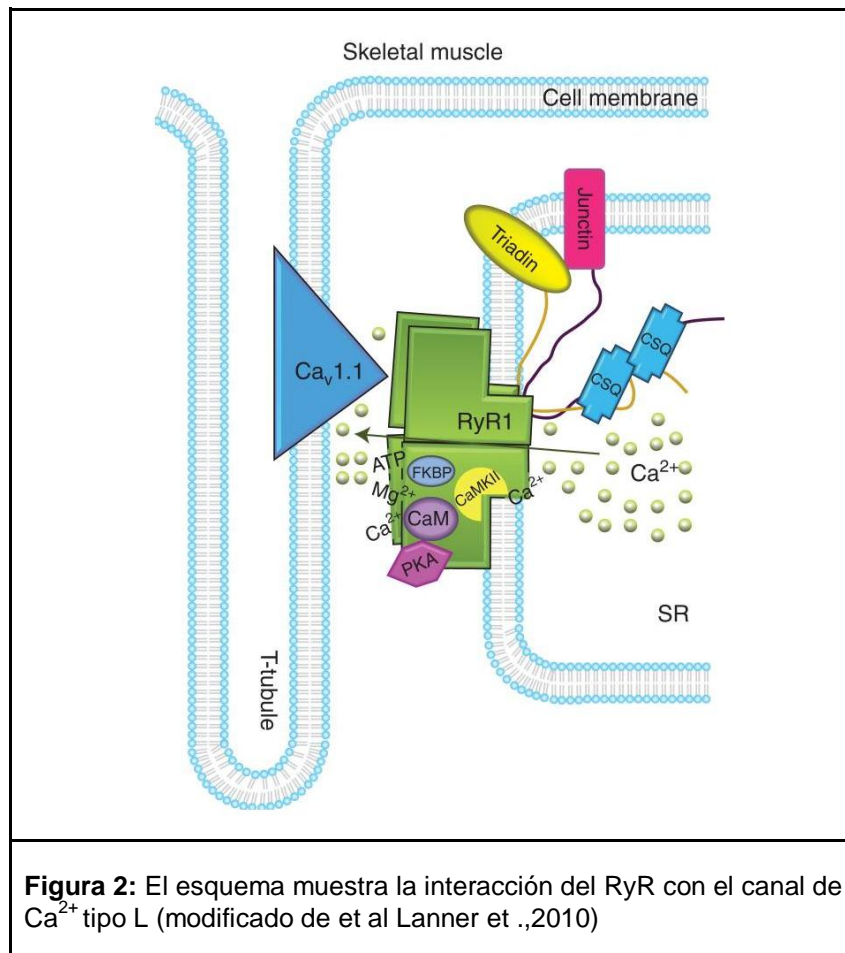
La fuerza en la contracción muscular, se regula por la unión de Ca^{2+} a la troponina C, generando el entrecruzamiento de actina y miosina (Martonosi & Pikula., 2003).

Las principales proteínas que regulan la captación, almacenaje y liberación de Ca^{2+} en el RS, se encuentran en la zona de la tríada, entre ellas se destaca el receptor de rianodina (RyR) (Michalak & MacLennan, 1980; Wientzek & Katz et al., 1991).

Por ésta razón los principales componentes proteicos del RS han sido estudiados en profundidad, debido a la importancia de esta región en la fisiología de la contracción. Uno de los componentes de mayor importancia es el RyR, el cual es un receptor central del AEC, que controla la salida de Ca^{2+} del RS, activando y regulando la contracción muscular (Lehnart & Wehrens., 2004).

Los RyRs pertenecen a una familia de canales de liberación de Ca^{2+} altamente conservados evolutivamente, se encuentran formando tetrámeros y en esta conformación son el canal iónico de mayor peso, estimado de 2000 kDa (Beard et al., 2004).

La región amino-terminal (N-terminal) es el mayor porcentaje de la estructura del canal, ubicada hacia el citosol, con funciones reguladoras de gran importancia. Esta parte de la molécula constituye los “pies” que se observan en imágenes de microscopía electrónica de la tríada. Esta región controla la apertura del mismo y le confiere también propiedades de proteína de andamiaje (Wagenknecht & Samsó., 2002; Franzini-Armstrong et al., 1994).



Se ha demostrado, que la activación del RyR es afectada por la concentración luminal de Ca^{2+} (Kawasaki & Kasai., 1994; Ikemoto et al., 1991).

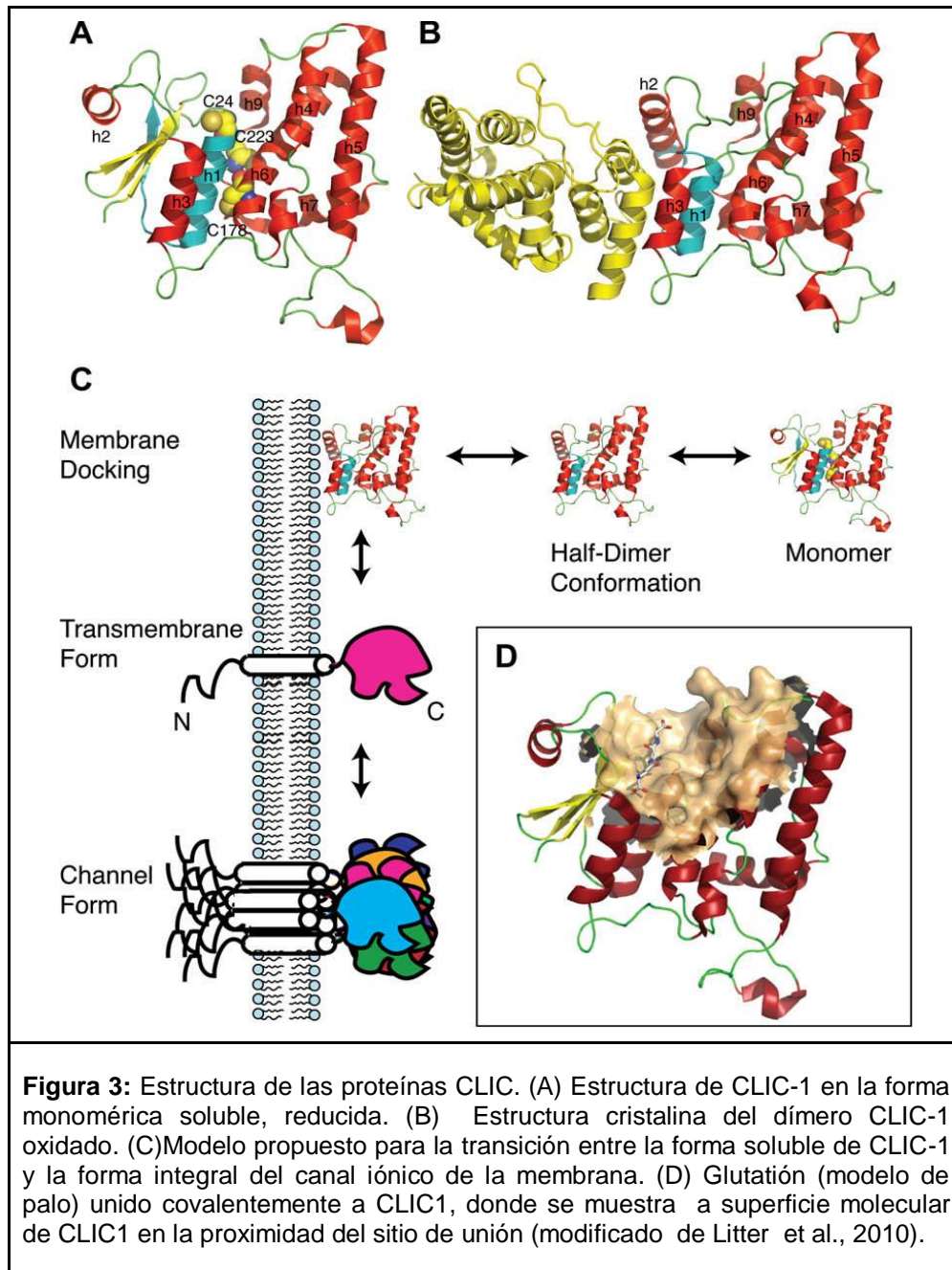
Debido a su importancia en la contracción muscular, la liberación de Ca^{2+} es modulada por distintas proteínas, como la triadina, la junctina asociadas al RyR. Se ha descrito también que las proteínas CLIC podrían tener un rol modulador de la liberación de Ca^{2+} como se indicó anteriormente. Estas proteínas son el objeto de investigación de la presente tesina y tienen la particularidad de encontrarse formando canales iónicos como proteínas integrales de membrana y también se encuentran como proteínas globulares solubles, dependiendo del estado redox del medio (Goodchild et al., 2009). Los cambios redox producen modificaciones estructurales dramáticas, tal es el caso del isotipo CLIC-1 que se encuentra en solución como un monómero tipo GST (glutación transferasa) y tras la oxidación sufre modificaciones reversibles de transición a un dímero no covalente soluble. Se ha propuesto que la superficie hidrofóbica del dímero se acopla a la bicapa, siendo el paso inicial de inserción a la membrana. Luego se inserta el extremo N-terminal (participando Cys24 y Val46), mientras que el extremo carboxilo terminal permanece en el citosol, obteniéndose como resultado la estructura integral de membrana. Los canales están formados por varias subunidades, siendo el canal CLIC-1 de naturaleza oligomérica (Littler et al., 2004).

La familia de proteínas CLIC está constituida por proteínas de aproximadamente 26 kDa que tienen similitud con la glutación transferasa (GST) (Harrop et al., 2001).

Las GST clásicas son proteínas citosólicas que catalizan la conjugación del tripéptido Glutación (GSH) a centros electrofílicos en células endógenas no deseadas o moléculas xenobióticas (Wilce & Parker., 1994).

Las CLIC difieren de las GSTs en un residuo de cisteína en el sitio activo (Cys24 en CLIC-1 humano), que se vuelve reactiva por la propia proteína, en contraste con lo que ocurre con las GSTs donde se activa el grupo tiol del GSH, que se une a los grupos no covalentes dentro de sus sitios activos con muy alta afinidad. La localización del tiol de GSH en los GST clásicos es aproximadamente equivalente a la localización del sitio activo cisteína en las proteínas CLIC, todos los CLIC tienen dos cisteínas adicionales que se conservan (Cys178 y Cys223 en CLIC1, Fig. 3A).

Otra diferencia de GST respecto a las CLIC, es que no tienen la capacidad de auto insertarse en las membranas ni de formar canales iónicos, en cambio las proteínas CLIC parecen tener poca o ninguna actividad enzimática (Dulhunty et al., 2001).



Las proteínas CLIC están altamente conservadas en vertebrados (CLIC-1 y CLIC-6) aunque presentan ciertas variantes de empalme (CLIC-2, CLIC-5).

De los integrantes de esta familia los CLIC-1, CLIC-2, CLIC-4, CLIC-5 forman canales que generalmente presentan baja selectividad para el Cl^- , presentando un solo segmento transmembrana (TM) y formando canales en bicapas artificiales uniéndose de 6 a 7 unidades (Edwards & Kapadia, 2000; Littler et al., 2010).

Pueden actuar como sustratos de varias quinasas (Tulk & Schlesinger, 1998), como se ha demostrado para CLIC-5B, la fosforilación de tirosina puede afectar su actividad (Edwards & Kapadia, 2000; Edwards et al., 2006).

También se conoce que participan en una serie de interacciones proteína-proteína, y se ha propuesto que estas interacciones, particularmente con los componentes del citoesqueleto, podrían desempeñar un papel importante en la regulación de su actividad in vivo (Berryman et al., 2004; Berryman & Goldenring, 2003; Shanks et al., 2002; Berryman & Bretscher, 2000).

CLIC-1 se clonó por primera vez en macrófagos humanos activados (Valenzuela et al., 1997) y se lo asocia con la activación de los mismos; una regulación negativa de la función CLIC-1 previene la liberación del factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), lo que sugiere que participa en procesos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer (Novarino et al., 2004).

Los homólogos CLIC-1 han sido identificados también en nematodos (Berry et al., 2003), insectos (Litter et al., 2007) y plantas (Elter et al., 2007), también se conoce que su actividad de inserción es claramente dependiente de la composición lipídica de las membranas, con un requerimiento aparente de lípidos con carga negativa (Tulk et al., 2002; Singh & Ashley, 2006).

En segundo lugar, se ha informado que el pH afecta su actividad de inserción, aunque diferentes grupos han informado diferentes formas de la curva de actividad de pH (Warton et al., 2002). También la evidencia muestra que el estado de oxidación afecta la actividad de CLIC-1, la cual forma un dímero al oxidarse, aunque no está claro si CLIC-1 se oxida in vivo (Singh & Ashley, 2006; Littler et al., 2004).

El análisis de su estructura reveló que son proteínas transmembrana con un dominio TM cerca del extremo N-terminal (Tonini et al., 2000; Duncan et al., 1997).

CLIC-2 es un isotipo de la familia CLIC, forma canales y algunas evidencias demuestran que modula al RyR asociándose al mismo (Meng et al., 2009).

El gen CLIC-2 se descubrió mediante un análisis de transcripciones en la región cromosómica Xq28 (Heiss et al., 1997). Se demostró que tiene la propiedad de intervenir en la actividad de liberación de calcio de los RyR (Dulhunty et al., 2001).

CLIC-3 presenta homología con CLIC-1 de humanos y CLIC-2 de riñón bovino, su mayor localización es en el núcleo de células humanas y según evidencia al expresarse estimula la conducción de cloruro. Según estudios realizados CLIC-3 se asocia específicamente con la cola carboxilo de ERK7 (proteína quinasa activada por mitógeno), sugiriendo que CLIC-3 puede desempeñar un papel en la regulación del crecimiento celular (Qian et al, 1999).

CLIC-4 se descubrió en cerebro de rata, donde se demostró que está co-localizado con canales RyR cerebrales (Ashley., 1989), encontrándose altamente conservada en vertebrados que van desde peces hasta mamíferos (Shorning et al., 2003).

Además del cerebro, el ARNm de CLIC-4 también se expresa en muchos otros tejidos de mamíferos, incluyendo el músculo esquelético (Fernández-Salas et al., 1999; Duncan et al., 1997) y presenta un dominio citoplasmático que forma complejos proteicos con actina y tubulina, entre otras proteínas (Dulhunty et al., 2001).

A menores concentraciones se encuentra como proteína integral de membranas no periféricas (Duncan et al., 1997) en organelos, incluyendo retículo endoplasmico, mitocondrias (Fernández-Salas et al., 1999) y vesículas secretorias (Chuang et al., 1999).

Los niveles de CLIC-4 están dinámicamente regulados, aumentando con TNF α y señales de proteína supresora de tumores (p53) (Fernández-Salas et al., 1999). Curiosamente, la sobreexpresión de CLIC-4 induce la apoptosis mediada por p53 asociada con despolarización mitocondrial, liberación de citocromo C y activación de caspasas (Fernández-Salas et al., 2002). Aunque todavía no es claro, si esto implica que la proteína debería encontrarse soluble o como proteína de membrana, o ambas, cabe destacar que la implicancia de un canal de iones mitocondrial en la apoptosis claramente podría ser muy significativo y es notable que algunas células, especialmente las células de mamífero, expresan muchas proteínas CLIC

diferentes, lo que sugiere que algunas o todas sus funciones pueden ser de gran importancia (Qiu, 2003).

Los estudios de proteólisis mostraron que la proteína CLIC-4 formaba un único paso a través de la membrana, con una porción C-terminal más grande que queda en el citoplasma (Tonini et al., 2000; Duncan et al., 1997).

CLIC-5 fue inicialmente aislado en microvellosidades placentarias humanas y se asocia con la actina del citoesqueleto, funciona como un canal de cloruro, participa en transporte de HCl y resorción ósea (Berryman & Bretscher, 2000; Berryman et al., 2004; Edwards et al., 2006).

Ayuda a formar o estabilizar conexiones entre la membrana plasmática y el filamento de actina (Gagnon et al., 2006). Sin embargo, los detalles de las funciones moleculares de CLIC-5 siguen sin estar claras.

CLIC-6 fue identificado en el cerebro, placenta, páncreas y el hígado. Se cree que juega un papel crítico en las células secretoras, posiblemente a través de la regulación del transporte de cloruro (Ashley, 2003).

Se diferencia del resto de la familia CLIC por ser significativamente más largo. El gen CLIC-6 contiene un segmento rico en GC, que codifica un motivo de 10 aminoácidos repetido 14 veces en el extremo amino-terminal, expresándose principalmente en el citoplasma. En el caso de CLIC-5 y CLIC-6 tienen un dominio N-terminal adicional al módulo CLIC. Estos dominios a menudo incluyen secuencias repetitivas que están mal conservados tanto en secuencia como en tamaño (Strippoli et al., 2002).

La función molecular, celular y fisiológica de dichas proteínas todavía se está desentrañando, se están realizando diferentes experimentos para abordar cada uno de estos niveles de la función CLIC.

HIPÓTESIS

Se ha demostrado que las proteínas CLIC, forman canales transmembrana con permeabilidad para aniones, principalmente cloruro y se ha propuesto que dichas proteínas interactúan con el RyR modulando la liberación de Ca^{2+} de manera directa. También podrían influir los movimientos de Ca^{2+} a través del RyR ya que son una vía de entrada o salida de aniones que compensan los cambios de carga dentro del RS.

La escasa información respecto a proteínas CLIC ha sido producto mayoritariamente de estudios en músculo cardíaco. En músculo esquelético es muy pobre la información sobre su localización y los tipos que se expresan.

Cómo hipótesis central se plantea que los canales CLIC se expresan en el músculo esquelético y que probablemente se localizan en zonas cercanas a los RyR, los cuales se encuentran en el RS, en la zona próxima a los túbulos T.

Objetivos generales y específicos

Objetivo general

Estudiar la expresión de los canales intracelulares en músculo esquelético de mamífero. En el desarrollo del estudio se utilizarán técnicas de inmunohistoquímica combinadas con microscopía confocal, así como técnica de Dot Blot para confirmar la expresión de estas proteínas.

Objetivos específicos

- Identificación de los canales intracelulares de la familia CLIC que se expresan en músculo esquelético de mamífero, mediante anticuerpos específicos, determinando que integrantes de la familia CLIC están presentes.
- En caso de confirmarse la expresión de CLIC en el músculo esquelético, estudiar su distribución en la fibra muscular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Disección de músculos de ratón.

Para los experimentos se utilizaron ratones B6D2F1 o BALB/c los cuales se sacrificaron por dislocación cervical de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales de la Universidad de la República (Expediente N° 071140-000127-12) y luego se les extrae el músculo flexor corto de los dedos (FDB) y extensor largo de los dedos (EDL) por disección manual bajo lupa. La superficie en donde se realiza el protocolo se limpia con alcohol, luego se preparan 10 ml de DMEM (low glucose) suplementado con 10% de suero fetal (1 ml), gentamicina (50 ug/ml). La disección se realiza en 5-10 ml de solución de Tyrode normal filtrado con filtro de 0,22 µm, la cual contiene NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2.0 mM, CaCl₂ 2,5 mM y HEPES 10 mM (pH=7.4, osmolaridad = 320 mOsm/l).

Los instrumentos de disección se ponen en alcohol 70% y luego se dejan secar antes de su uso.

Una vez sacrificado el ratón se lavan las patas posteriores con alcohol 70% y solución Tyrode. Se cortan las patas utilizando tijeras y pinzas limpias y se transfieren a la cámara de disección.

Para realizar la disección, se utilizan 4 ml de Tyrode. Los músculos aislados se transfieren a otra placa conteniendo aproximadamente 3 ml de DMEM, en donde se mantendrán hasta que se les realicen los análisis correspondientes. Con este procedimiento se obtienen músculos en condiciones adecuadas para el fijado posterior con formol.

Fijación con formol

La finalidad del procedimiento de fijación es evitar cambios en la morfología de las fibras, una vez realizada la disección, manteniendo su estructura morfológica, frenando la autólisis, garantizando así la integridad de las fibras.

El fijador utilizado es formol, el cual emite vapores que son muy irritantes para los tejidos conjuntivos y las mucosas, por eso se deben extremar las condiciones de trabajo, su función de fijación se debe a que coagula las proteínas (med.unne.edu.ar).

Lo empleamos en una solución al 10% (10 del formol comercial y 90 partes de agua).

El tiempo de fijación de las muestras, es de 48 horas, en refrigeración.

Al finalizar la fijación, se lava con alcohol al 95%, para evitar que las fibras se endurezcan demasiado.

Técnicas histológicas

Con la finalidad de preparar y obtener las mejores condiciones para poder analizar las fibras musculares y sus componentes morfológicos a través de microscopía, se aplican las técnicas histológicas que se describen a continuación.

Inclusión en parafina

Para que las fibras adquieran mayor dureza y se facilite la obtención de las secciones, se infiltran las muestras en parafina, la cual sirve de soporte formando un bloque homogéneo. Para que los tejidos puedan ser incluidos en parafina se requiere deshidratarlos e infiltrarlos con el solvente de la sustancia de inclusión.

Las muestras se deshidratan sucesivamente en soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico, cumpliendo el siguiente protocolo:

- 1) alcohol etílico al 95 %(coplin 1) ----- 1 hora
- 2) alcohol etílico al 95 %(coplin 2) ----- 1 hora
- 3) alcohol etílico al 100 % (absoluto, coplin 1) -----1 hora
- 4) alcohol etílico al 100 % (absoluto, coplin 2) -----1 a 1.5 horas.
- 5) cloroformo al 10%-----toda la noche

Armado de bloque

La penetración de la parafina al interior de las fibras se realiza cuando la misma se encuentra en estado líquido dentro de la estufa (37° C), de la siguiente manera:

- 6) parafina líquida (37°C, frasco de vidrio 1) -----20 minutos
- 7) parafina líquida (37°C, frasco de vidrio 2) -----20 minutos

Se utiliza un molde, el cual se llena con parafina caliente, en donde las fibras se orientan de manera correcta, sumergiéndolas en el interior de la parafina.

Luego los moldes se enfrían en refrigerador de manera homogénea y se guardan en freezer a - 20 °C, para su posterior uso.

Cortes del preparado

En esta etapa, se procede a realizar los cortes utilizando un micrótopo, el cual es un instrumento semiautomático, que secciona el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme. En el mismo se encuentran unas abrazaderas en donde se sujeta el bloque, orientado correctamente para luego ajustar la navaja, corroborando que el filo está en la posición adecuada. Los primeros cortes se hacen con la finalidad de desgastar la superficie del bloque, descartando las secciones que se obtienen hasta alcanzar la fibra. El dial se ajusta de acuerdo a los micrómetros de grosor que quiero sean los cortes, 5-10 micras en nuestro caso, luego se acciona la manivela que desplaza la abrazadera con el bloque de parafina para obtener los cortes.

Para extender los cortes, se depositan en el baño con agua a 40°- 45°C, y se recogen con mucho cuidado por flotación y se depositan en el portaobjetos en donde quedan adheridas.

En este punto se debe extraer toda la parafina del tejido, utilizando Xilol (derivado dimetilado del benceno).

El procedimiento de desparafinización se realiza de la siguiente manera:

- 8) xilol de desparafinización (coplin 1) -----20 minutos
- 9) xilol de desparafinización (coplin 2) -----10 minutos
- 10) portaobjetos a 60°C, dejar gotear parafina -----15 a 20 minutos

Como último paso se hidratan las muestras (ya que la mayoría de los colorantes son de base acuosa):

- 11) alcohol 100 -----2 minutos
- 12) alcohol 95(coplin 1) -----2 minutos
- 13) alcohol 95(coplin 2) -----2 minutos*
- 14) alcohol 70 -----2 minutos
- 15) agua corriente -----2 minutos

16) agua destilada -----2 minutos (hematoxilina eosina)

17) buffer PBS -----toda la noche *

*si la muestra se prepara para inmunohistoquímica, se puede obviar.

Las muestras deben agitarse continuamente para permitir la renovación de los líquidos.

Tinción hematoxilina-eosina

Para facilitar la observación de los cortes obtenidos en el microscopio, se les realiza una tinción con colorantes hematoxilina y eosina. La acción de los colorantes facilita la visualización de los núcleos, citoplasma y material extracelular. La hematoxilina es básica y tiñe los núcleos, intercalándose en los grupos fosfatos del ADN y ARN que tienen carga negativa. La eosina es débilmente ácida y muy soluble en agua. El color que genera la eosina al citoplasma, tejido conjuntivo y fibras colágenas es un rosado intenso (mmegias.webs.uvigo.es).

A continuación se describe la técnica:

- 1) Agitar hematoxilina -----10 minutos
- 2) filtrar hematoxilina y eosina usando papel filtro.
- 3) sumergir la muestra en hematoxilina-----10 minutos
- 4) trasvasar la muestra a coplin con agua corriente-----10 minutos
- 5) cambiar a coplin con agua destilada-----10 minutos
- 6) pasar a coplin con eosina-----1 minuto
- 7) alcohol 95%-----1 minuto
- 8) alcohol 100%-----1 minuto
- 9) xilol de montar (medio de espera) -----15 minutos
- 10) montar con bálsamo Entellan (solución a base de polímeros de xileno).

El problema presentado al momento de realizar la tinción con hematoxilina-eosina es que las secciones se “lavan” del portaobjeto, imposibilitando éste paso y los siguientes protocolos a realizar en las fibras, por lo tanto se procede al uso del criostato como método alternativo.

Criostato

En muchos casos para evitar la inclusión de los tejidos, teniendo en cuenta el tiempo que esto requiere, se acude directamente a la congelación de los mismos, obteniendo resultados rápidos respecto a la dureza de la muestra, manteniendo casi intacta la estructura a nivel molecular, lo cual es de gran importancia en ésta investigación ya que luego se realizara la técnica de inmunohistoquímica. Se obtienen cortes del orden de 5-15 μm . Cuánto más rápida es la congelación, mejor se preserva la estructura de la fibra (<https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/4-criotomos.php>).

El criostato tiene una cámara refrigerada con temperatura regulable, dentro de la cual está instalada toda la maquinaria para realizar los cortes, con una plataforma en donde se realiza la congelación.

A continuación se describen los primeros pasos:

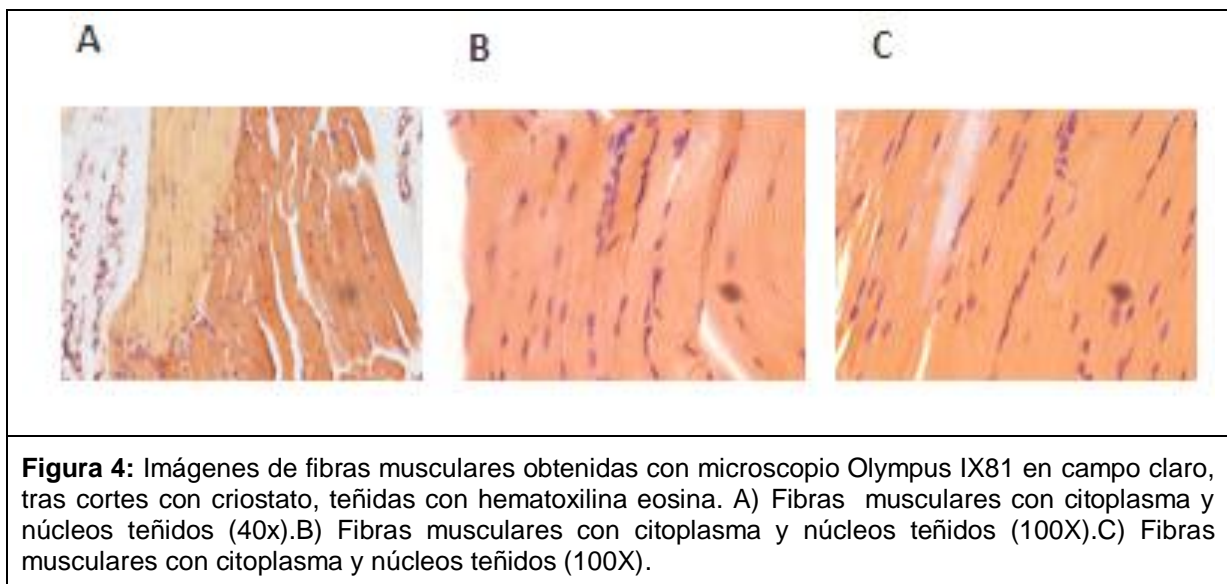
- 1) Formol 4%-----24 horas (temperatura ambiente)
- 2) PBS 1x-----2 horas
- 3) sucrosa 10% en PBS 1x-----24 horas
- 4) sucrosa 20% en PBS 1x-----24 horas
- 5) sucrosa 30% en PBS 1x-----24 horas en heladera

En este punto las muestras se sacan de la heladera, continuando con el armado de los bloques con papel de aluminio, en donde se pone una solución anticongelante que contiene glicoles y resinas, de la marca comercial Tissue Tek, compuesto soluble en agua, utilizado como matriz ya que no genera residuos, y evita la formación de cristales que puedan modificar la estructura de la fibra, también evitan daños si la congelación se realiza de manera apresurada. En casos donde no es importante resguardar la ultraestructura de la muestra se trabaja con temperaturas entre -80°C y -20°C .

Las fibras se colocan en el fondo del bloque, utilizando pinzas, por lo tanto se encuentran encastradas en un bloque sólido, el cual se deposita en el criostato (Criostato Leica CM1850 UV, departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, UdeLaR) durante 10 minutos, se retiran cuando el monitor del criostato nos indica PE (se coloca la muestra en la cámara del criostato para igualar su temperatura con la de la cámara y así obtener secciones homogéneas).

A continuación se adhiere la muestra en el soporte portamuestras, el cual se encuentra en un eje que avanza sobre la cuchilla. La preparación del bloque y el mecanismo de corte son similares al que se describió para el micrótopo en inclusión de parafina. Los primeros cortes se realizan hasta que aparezca el tejido de interés. Las secciones obtenidas (5-10 μm) se adhieren por contacto al portaobjetos con superficie cargada (el portaobjetos se posiciona a 45 ° para levantar las muestras). Las secciones se descongelan rápidamente en este proceso de pegado puesto que los portaobjetos están a temperatura ambiente.

A pesar de haber cambiado el método para realizar los cortes y probar la adhesión de la muestra en cubreobjetos cargados positivamente, cubreobjetos con polilisina y otras opciones como cubrirlos con gelatina ó exponerlos al calor, al momento de realizar la tinción con hematoxilina eosina las fibras se siguen “lavando”, generando la pérdida de muestras (de cada 10 cubreobjetos con tres cortes de la misma muestra, se obtiene un corte de un cubreobjeto).



Al ser tan escasa la cantidad de muestras que se obtienen para tan largo tratamiento de las mismas, se opta por disgregar el músculo cuidadosamente utilizando pinzas de disección para obtener fibras aisladas y realizar directamente sobre las fibras las técnicas de dot blot e inmunohistoquímica, salteando los pasos de histología descriptos.

Dot blot

El dot blot, es una prueba ampliamente utilizada en laboratorios de baja complejidad debido a su fácil diagnóstico y bajo presupuesto. Consiste en una fase sólida que retiene el antígeno, que en nuestro caso son las proteínas CLIC de distintos isotipos, como fase sólida se utiliza membrana de nitrocelulosa. Teniendo en cuenta su simpleza es muy sensible y específica. El antígeno de interés es detectado directamente sin necesidad de realizar pasos previos de purificación ya que se divide a través de plantillas circulares directamente sobre la membrana y no electroforéticamente (Agudeo-Flórez et al., 2005; Plancarte et al., 1994; Tellez-Girón et al., 1987; Vaz et al., 1990).

Como control positivo de la expresión de proteínas CLICs se utiliza un cultivo de células HELA (línea celular inmortal derivada de una muestra de cáncer cérvicouterino utilizada en investigación científica), ya que se sabe sobre-expresan los canales CLIC (Edwards et al., 1998).

Las mismas se cultivaron con medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, antibióticos (penicilina 100 unidades/ml + estreptomycin 100 µg/ml), en estufa de cultivo con 5% CO₂ a 37 °C.

Se realiza el siguiente procedimiento:

- 1) Se prepara la membrana de nitrocelulosa, dibujando con un lápiz la región en donde se va a sembrar la muestra. Las muestras preparadas son músculo de ratón y células HELA, se explica el protocolo para músculo, pero cabe destacar que en paralelo se realiza el mismo protocolo en células HELA.
- 2) Los músculos previamente centrifugados, se ponen en DMEM por 10 minutos, al sacar el DMEM, se agrega 300 µL de buffer de lisis RIPA (150 mM de NaCl, Tritón 1.0% X-100, deoxicolato 0.5%, SDS 0.1% y 50 mM Tris-HCl pH 8)
- 3) Realizar diluciones seriadas por triplicado en PBS 1X y 10 µL de dilución correspondiente (1/10, 1/100 y 1/1000).
- 4) Dejar bloqueando toda la noche en BSA-PBS 3% (0,9 gramos de BSA en 30 mL de PBS 1X).
- 5) Incubar con anticuerpos primarios toda la noche, usando dilución 1/500 de CLIC (C-16) anticuerpo goat polyclonal para detección de CLIC-4, CLIC-5 Y CLIC-6

(sc-65033, Santa Cruz Biotechnology, INC.), dilución 1/500 de CLIC-1 (P-19) anticuerpo goat polyclonal para detectar CLIC-1 (ACL-021, Alomone labs) y dilución 1/2000 de CLIC-5 anticuerpo rabbit polyclonal para detectar CLIC-5(ACL-025, Alomone labs), diluidos en PBS-BSA 0.5% y Tween 0.01%.

6) Lavar tres veces con PBS 1X, 15 minutos por lavado.

7) incubar la membrana durante 1 hora con los anticuerpos secundarios anti-goat o rabbit IgG conjugados con IR Dye-800 e ir Dye-680(Li-cor) en PBS con 0.1% Tween 20 (Sigma Aldrich).

8) Lavar tres veces con PBS-Tween 0.01%, 5 minutos.

9) Las proteínas inmunoreactivas se visualizan con el sistema de detección de fluorescencia infrarroja (Odyssey, Li-cor Biosciences).

Inmunohistoquímica

Es un análisis que combina inmunología y microscopía, permitiendo observar la localización de una estructura, identificando proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, compuestos sintéticos, antígenos virales y bacterianos entre otras cosas. La base de la técnica son reacciones antígeno-anticuerpo. En la preparación se deja expuesto al antígeno, permitiendo la inmuno-marcación con el anticuerpo. Es importante que durante la realización del protocolo, el antígeno no pierda la capacidad de unión al anticuerpo. Los anticuerpos seleccionados deben ser específicos, sensibles y estables (Cooper., 1985).

Se utilizan anticuerpos comerciales para identificar los distintos tipos de canales CLIC , anticuerpos primarios: CLIC(C-16) anticuerpo goat polyclonal(dilución 1/500) para detección de CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6 (sc-65033,Santa Cruz Biotechnology,INC.), CLIC1(P-19) anticuerpo goat polyclonal (dilución 1/500) para detectar CLIC-1 (ACL-021, Alomone labs) y CLIC5 anticuerpo rabbit polyclonal (dilución 1/2000) para detectar CLIC-5 (ACL-025, Alomone labs), anticuerpos secundarios: Alexa Flúor 488 goat anti-rabbit IgG(H+L) (A11034,Life Technologies) y Alexa Flúor 488 donkey anti-goat IgG(H+L) (A11055,Life Technologies).

El análisis inmunohistoquímico se realiza en fibras obtenidas de la disgregación del músculo esquelético, ya que como se explicó anteriormente los cortes incluidos en parafina y criostato se lavaban de los portaobjetos.

Las fibras aisladas se fijan en paraformaldehído 4% en PBS por aproximadamente 5 minutos, se lavan 3 veces con PBS 1X (5 minutos cada lavado), el siguiente paso es permeabilizar con 0.1 % Tritón X-100 en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Se vuelve a lavar 3 veces con PBS.

Para bloquear los sitios no específicos se utiliza BSA (seroalbúmina bovina) 0.5% en PBS. Luego se incuban con los anticuerpos primarios toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se realizan 3 lavados con PBS 1X.

Posteriormente se incuban con el anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo 1 hora a temperatura ambiente. Se realizan 3 lavados con PBS 1X para quitar el exceso de anticuerpo, se incuba con DAPI (Nucleic Acid Stain, D1306, Invitrogen) para teñir los núcleos. Los músculos así procesados son estudiados en el microscopio confocal (Leica modelo TCS SP5 II, de la unidad de microscopia confocal, Facultad de Medicina) para la localización de las proteínas marcadas.

Como control se utilizan células HELA, ya que se sabe sobreexpresan canales CLIC (Edwards et al., 1998). Se utilizaron células HELA como control positivo de expresión de los canales, ya que no se tenía una referencia de que patrón de expresión se podía esperar en las células musculares esqueléticas.

Las mismas se cultivaron con medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, antibióticos (penicilina 100 unidades/ml + estreptomycin 100 µg/ml), en estufa de cultivo con 5% CO₂ a 37 °C.

Debido a la falta de información sobre que células no expresan CLIC, no se realizaron controles negativos sobre la expresión de los canales.

Se realizaron controles negativos de la técnica de inmunohistoquímica tratando fibras musculares y células HELA con los anticuerpos secundarios utilizados. Estos controles negativos tuvieron como objetivo verificar que los anticuerpos secundarios no tuviesen un marcaje inespecífico. Además se exploró la autofluorescencia de las fibras musculares a las longitudes de onda utilizadas. Se observaron resultados negativos en todos los casos.

RESULTADOS

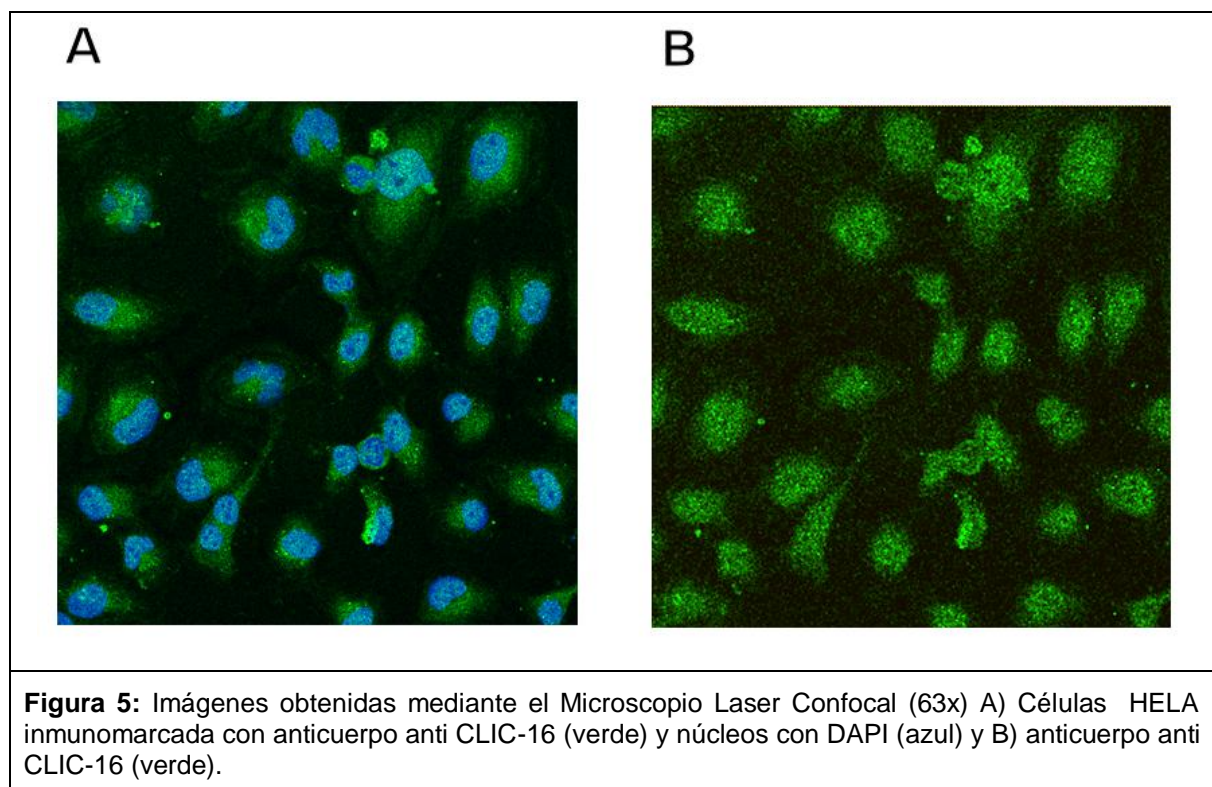
La familia de proteínas CLIC, está formada por los isotipos CLIC-1, CLIC-2, CLIC-3, CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6. Los isotipos investigados en éste trabajo son CLIC-1, CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6.

Para CLIC-1 y CLIC-5 se adquirieron Kits específicos, siendo la expresión de CLIC-5 también analizada en conjunto con la expresión de CLIC-4 y CLIC-6 utilizando el kit CLIC-16 (ver métodos).

Cómo primer resultado se describe la expresión de CLIC en células HELA mediante inmunohistoquímica.

Previo a realizar los estudios inmunohistoquímicos de las respectivas CLIC en fibras musculares, se realizó un dot blot para conocer la expresión de cada isotipo, sembrándose en paralelo para músculo y células HELA.

Identificación y localización de los isotipos CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6 (CLIC-16) mediante inmunohistoquímica en células HELA.



El resultado refiere a la expresión de proteínas CLIC en células HELA, las CLIC son sobreexpresadas en este grupo celular, por esa razón se toma a las células HELA como modelo positivo de expresión.

Con la finalidad de adquirir resultados propios y hacer una puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica, se investiga la expresión de CLIC-16 en células HELA.

Como se puede apreciar en la Figura 5, el tratamiento inmunohistoquímico de las células HELA, genera resultados positivos utilizando el kit CLIC-16, que comprende a CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6.

Los núcleos se tiñen con DAPI, confirmando el correcto uso del protocolo de la técnica.

En figura 5A, se observa la localización citoplasmática de los CLIC y los núcleos marcados con DAPI, mientras que en figura 5B se refiere a la expresión de CLIC.

El resultado obtenido sugiere la expresión de CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6, o al menos una de ellas en células HELA (es necesario usar kits específicos para detectar a cada subfamilia CLIC).

Detección de expresión de isotipos CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6 (Kit CLIC-16) mediante Dot Blot de fibras musculares y células HELA.

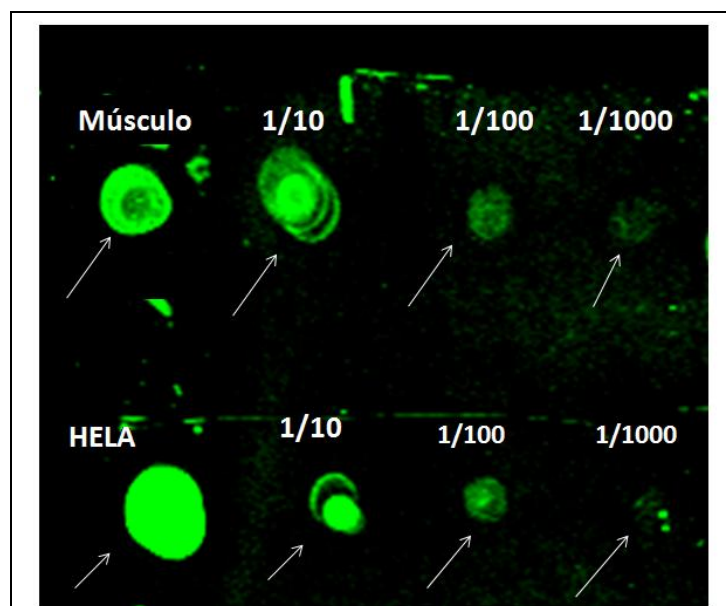


Figura 6: Fotografía de resultados de dot blot obtenidos con el kit CLIC-16 en fibras musculares y sus respectivas diluciones (arriba), en conjunto con los resultados en células HELA y sus respectivas diluciones (abajo).

En figura 6 se muestra el resultado obtenido utilizando el kit CLIC-16 en fibras musculares y en células de HELA, indicando su expresión en músculo esquelético de mamífero.

Sabiendo que las células HELA sobreexpresan CLIC, son usadas como control positivo en el dot blot.

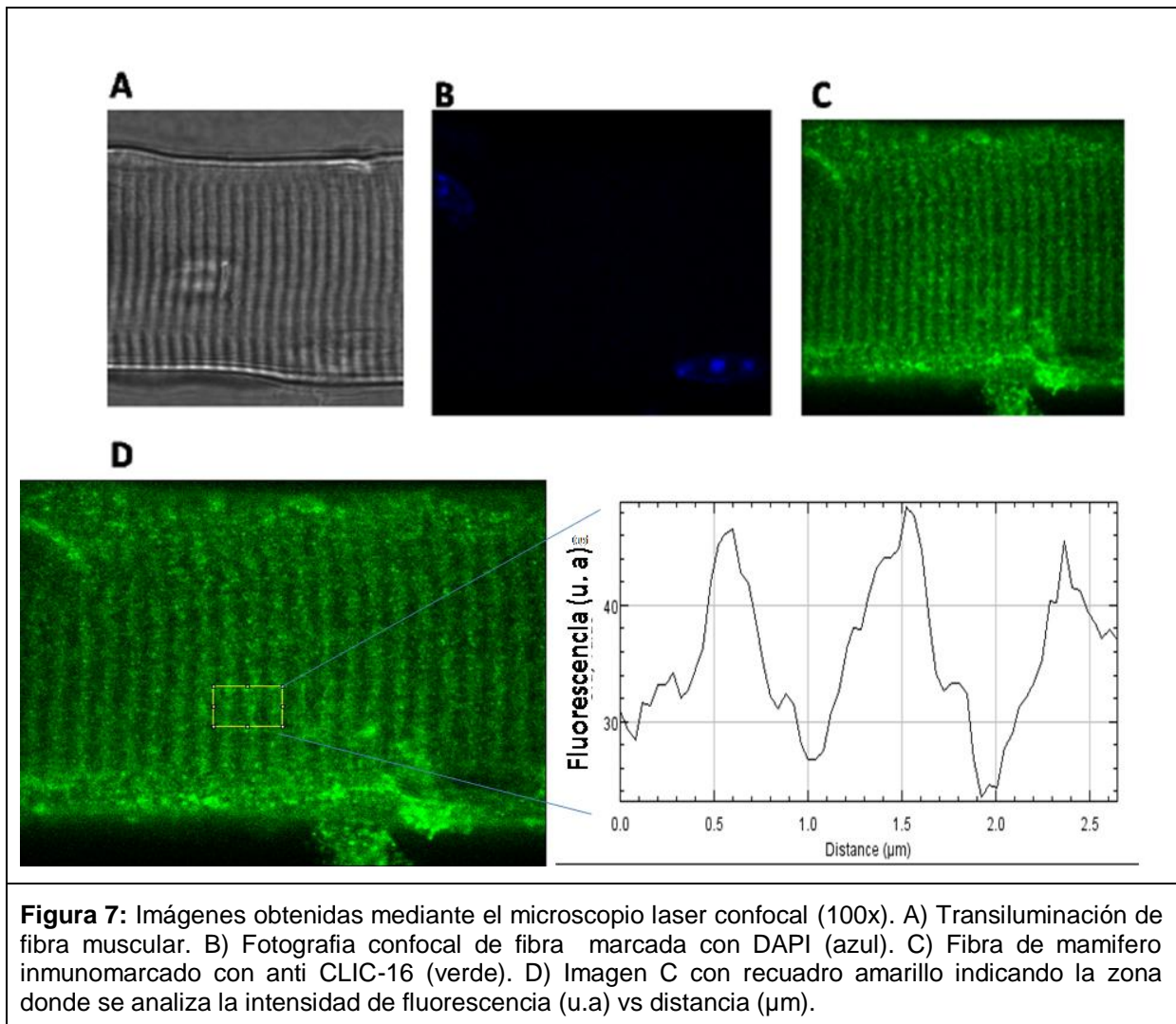
Las flechas en color blanco muestran el lugar donde se sembraron las respectivas muestras.

Los resultados obtenidos tanto para la muestra de células HELA como sus diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) son positivos, en la muestra de HELA (sin diluir) se nota mayor concentración de proteínas respecto a sus diluciones, resultado esperable si consideramos que en las diluciones hay menor concentración proteica.

Respecto a los resultados de la fibra muscular, se observa mayor fluorescencia en la muestra sembrada sin diluir; la misma decae al ir aumentando las diluciones, indicando que a mayor dilución menor es la concentración de la proteína estudiada.

No existen grandes diferencias entre la fluorescencia obtenida en células HELA y músculo.

Identificación y localización de isotipos CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6 (Kit CLIC-16) mediante inmunohistoquímica en fibras musculares.



La información obtenida de las fotografías brinda un resultado positivo respecto a la expresión reportada por CLIC-16, que corresponde a las subfamilias CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6, por lo tanto podríamos estar frente a la expresión de las tres subfamilias, o al menos una de ellas. Esto se podrá comprobar mediante la utilización de kits específicos para detectar a cada subfamilia CLIC.

El resultado inmunohistoquímico de la imagen 7C, indicaría la localización de estas proteínas en regiones específicas, dado que muestra con un patrón de fluorescencia que se repite a lo largo de toda la fibra, sugiriendo que se asocia a alguna estructura organizada de la misma. Esto se evidencia más claramente en el perfil de fluorescencia (en unidades arbitrarias) vs distancia (μm), obtenido del

recuadro amarillo de la imagen 7D. Un patrón de estas características podría corresponder al RS.

La cuantificación de fluorescencia se realiza con programa ImageJ, seleccionando la ventana Analyze y dentro de esa opción se selecciona Plot Profile.

En la imagen 7B se observan también dos núcleos teñidos con DAPI, situados inmediatamente por debajo del sarcolema.

Detección de expresión de isotipo CLIC-5 mediante Dot Blot de fibra muscular y células HELA.



Figura 8: Fotografía de resultados de dot blot para CLIC-5 de fibra muscular (arriba), en conjunto con los resultados de CLIC-5 en HELA (abajo).

Sabiendo que las células de HELA sobreexpresan CLICs, son usadas como control positivo en el dot blot.

Las flechas en color blanco muestran el lugar donde se sembraron las respectivas muestras.

En figura 8 se detecta CLIC-5 en fibras musculares y en células HELA, indicando su expresión.

Identificación y localización de isotipo CLIC-5 mediante inmunohistoquímica en fibras musculares.

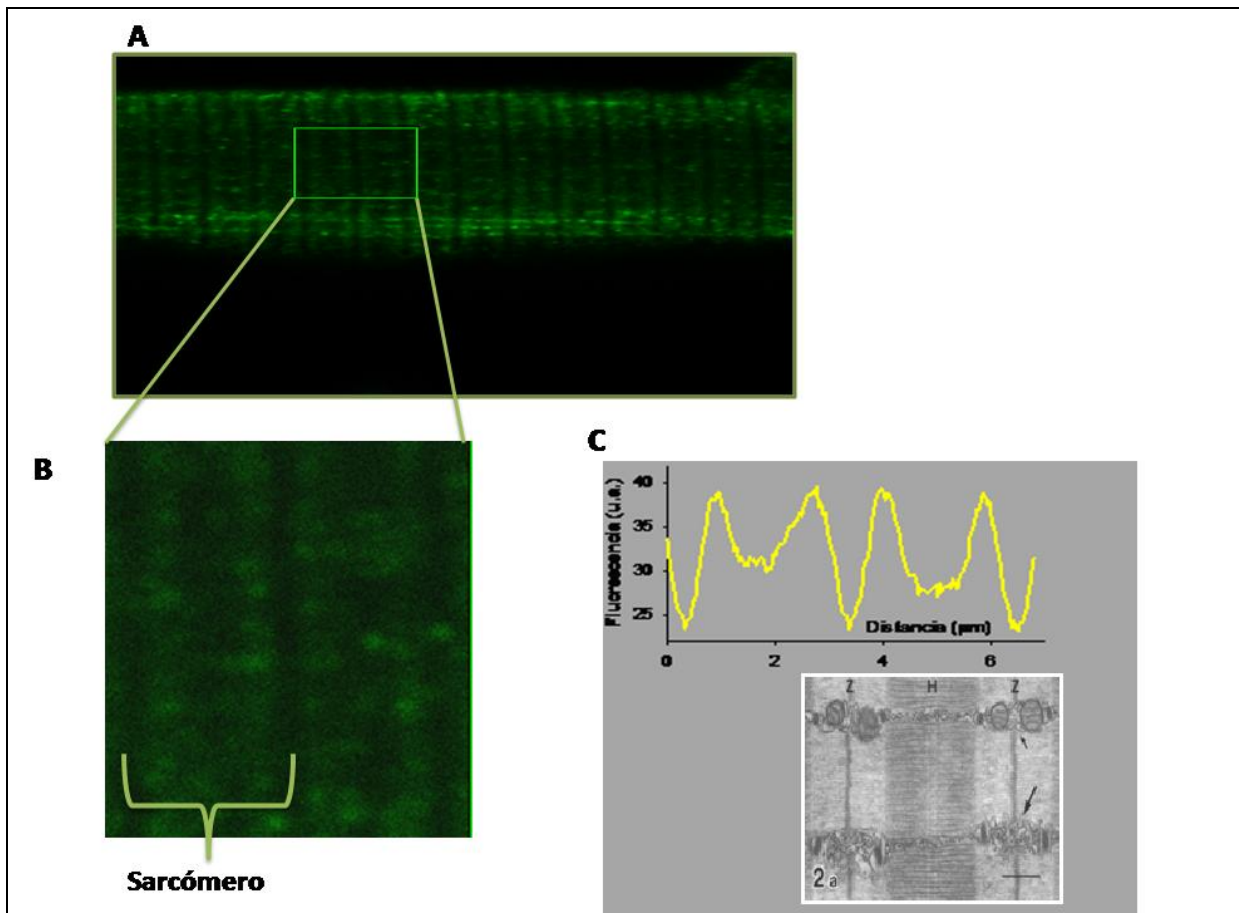


Figura 9: Imágenes obtenidas mediante el microscopio laser confocal (100x).

A) Fibra muscular inmunomarcada con anti CLIC-5 (verde)

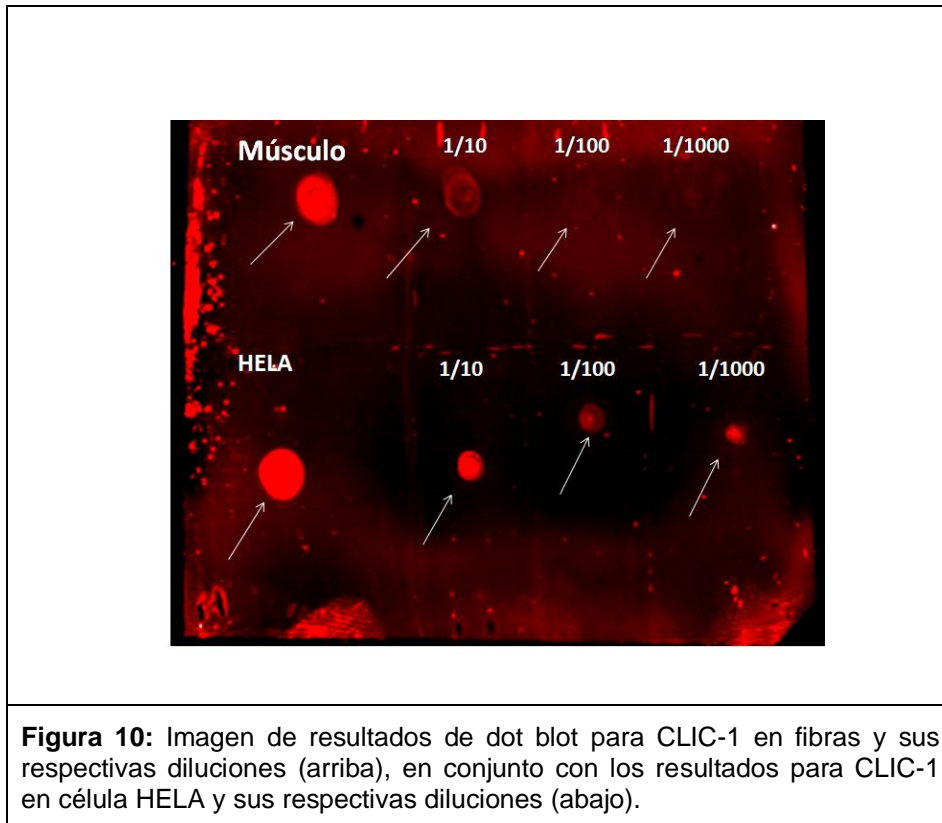
B) Imagen ampliada de recuadro verde marcado en la imagen A, donde se destaca con una llave la longitud del sarcómero. C) Intensidad de fluorescencia (u.a) vs distancia (μm) con esquema comparativa de un sarcómero. El perfil de fluorescencia se correlaciona con la estructura del sarcómero lo que sugeriría que el CLIC-5 se expresa fundamentalmente a nivel del RS. Imagen en C tomada de Ogata & Yamasaki (1985).

La calidad de las imágenes de la figura 9, permite obtener con más en detalle el patrón de fluorescencia del isotipo CLIC-5. El perfil de fluorescencia se correlaciona con la distribución del RS en la fibra, sugiriendo que CLIC-5 podría encontrarse asociado a alguna estructura del RS ó a alguna proteína ubicada en la zona de la tríada aunque también se observa fluorescencia aumentada en la zona que corresponde al centro del sarcómero.

En la imagen 9B, se puede apreciar que la señal de fluorescencia reproduce el patrón de los sarcómeros. En el perfil de fluorescencia (u. a) vs distancia (μm) graficado en 9C, se observa que los picos se corresponderían con la posición de

las cisternas terminales del RS, sugiriendo que los CLIC-5 se encuentran en zonas cercanas a los receptores RyR. El hecho de que la fluorescencia no disminuya hacia el centro del sarcómero indicaría que los CLIC-5 se estarían expresando también a nivel de las cisternas intermedias y collar fenestrado.

Detección de la expresión de isotipo CLIC-1 mediante Dot Blot de fibra muscular y células HELA.



Las flechas en color blanco muestran el lugar donde se sembraron las respectivas muestras. En figura 10 se detecta CLIC-1 en fibra muscular y células HELA, mostrando su expresión en las respectivas muestras.

Los resultados obtenidos tanto para la muestra de células HELA como sus diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) son positivos. En la muestra de HELA (sin diluir) se observa mayor concentración de proteínas respecto a sus diluciones, resultado esperable, ya que en las diluciones se asume que hay menor concentración proteica, si bien no podemos cuantificar la concentración mediante técnica de dot

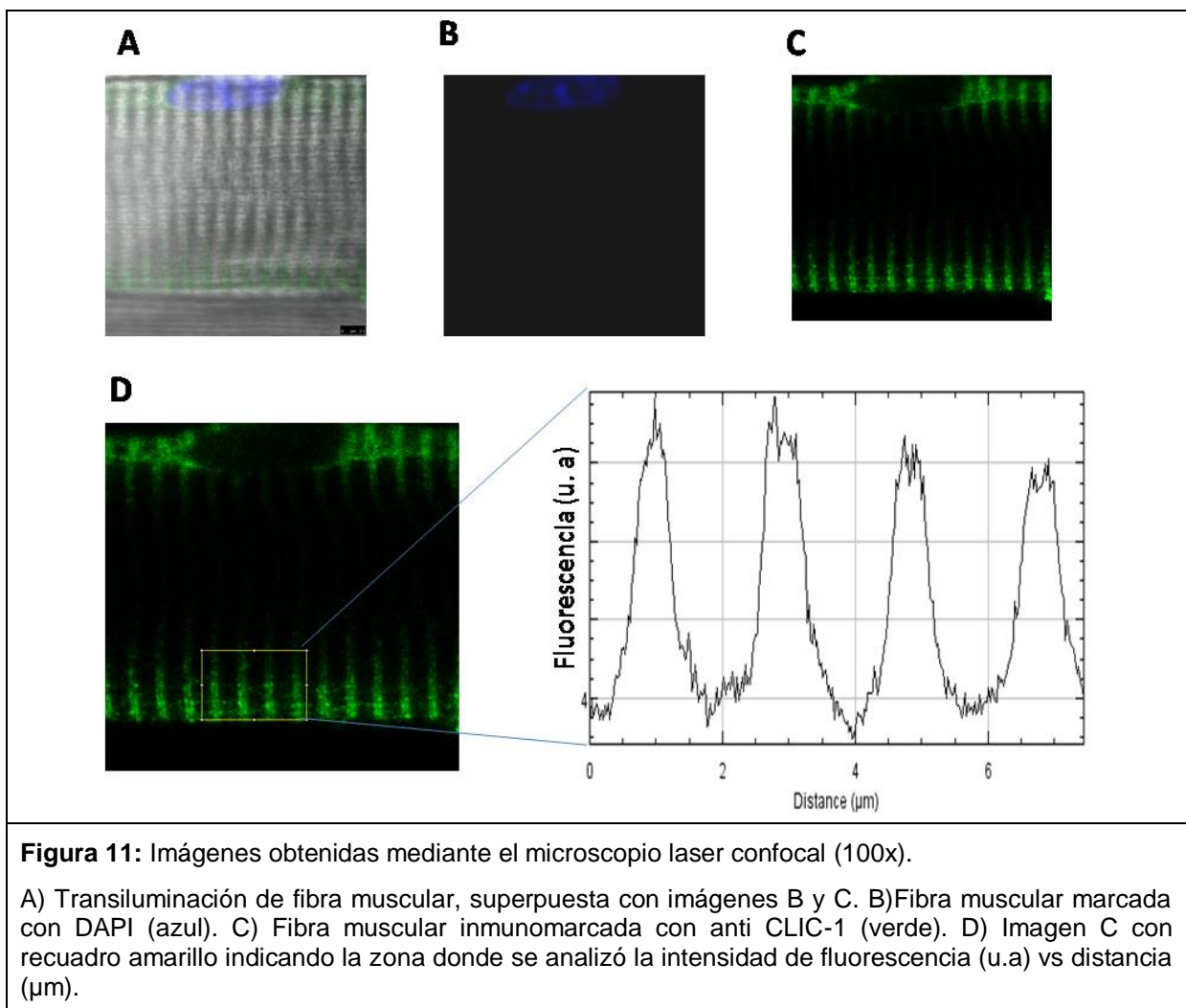
blot, se puede asociar mayor fluorescencia detectada a mayor expresión de proteína.

La dilución de células HELA 1/1000, presenta mayor fluorescencia que la dilución de células HELA 1/100, tal vez por algún error de manipulación de la muestra, o se sembró de manera inadecuada en la membrana.

Respecto a los resultados de fibra, se observa fluorescencia en la muestra sembrada sin diluir y en menor medida en la dilución 1/10, en el caso de las diluciones 1/100 y 1/1000 es prácticamente indetectable la presencia de proteína.

De todas maneras es correcto que en células HELA se observe mayor expresión respecto a la fibra que no sobreexpresa y se concluye que esta isoforma de CLIC también se expresa en el músculo.

Identificación y localización de isotipo CLIC-1 mediante inmunohistoquímica en fibra muscular.



El resultado inmunocitoquímico de la imagen C y D en la figura 11, muestra la localización de CLIC-1, con un patrón de fluorescencia similar al descrito para el CLIC-5. Aquí también la proteína se ubica en regiones específicas en la fibra muscular, pudiendo estar asociada a una estructura altamente organizada de la fibra.

La calidad de las imágenes no es tan buena como en la figura 9 pero sin embargo aparentemente se repite el mismo patrón de fluorescencia que sugiere fuertemente la asociación de la expresión de CLIC-1 con el RS. En la fotografía 11B se observa un núcleo teñido con DAPI, situado inmediatamente por debajo del sarcolema.

DISCUSIÓN

La familia de proteínas de canal intracelular de cloruro (CLIC), forman canales aniónicos intracelulares, pudiendo existir como proteínas globulares solubles, dependiendo del estado redox del medio (Goodchild et al., 2009). Según evidencia se ha sugerido que el ambiente ácido encontrado por los CLICs en la superficie de la membrana modifica la región transmembrana del dominio N-terminal, lo que le permitiría interactuar e insertarse en la membrana (Fanucchi et al., 2008).

Están constituidas por proteínas de aproximadamente 26 kDa que tienen similitud con la glutatión transferasa (GST) (Harrop et al., 2001).

Tienen la capacidad de auto insertarse en las membranas (Dulhunty et al., 2001). Hasta la fecha se conocen CLIC-1, CLIC-2, CLIC-3, CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6. Se ha demostrado que CLIC-2 modula el canal de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS), conocido como receptor de rianodina (RyR) (Board et al., 2004) que se localiza a nivel de la tríada formando un gran complejo en la membrana del retículo sarcoplásmico (Ríos & Brum, 1987).

El objetivo de este estudio fue identificar los canales intracelulares de la familia CLIC expresados en músculo esquelético de mamífero, mediante anticuerpos específicos, determinando que isotipos están presentes en el mismo. Los isotipos que se estudiaron fueron CLIC-1, CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6.

Para cumplir los objetivos propuestos se utilizaron ratones B6D2F1 o BALB/c, a los cuales se les extrajo el músculo flexor corto de los dedos (FDB) y extensor largo de los dedos (EDL), usando como control positivo células HELA.

Los resultados obtenidos de los Dot Blot revelan la expresión de CLIC-1, CLIC-5 en el músculo esquelético. Se utilizó un anticuerpo policlonal (CLIC-16) que detecta la expresión de los isotipos CLIC-4, CLIC-5 y CLIC-6. Dado que no contamos con los anticuerpos específicos para CLIC-4 y 6 no fue posible determinar la expresión de estas isoformas en forma aislada. Por tema de costos y tiempo no se pudieron adquirir dichos kits, quedando pendiente el estudio de estos isotipos así como el de los isotipos CLIC-2 y CLIC-3.

La información obtenida de la inmunohistoquímica nos permite obtener información sobre la localización de los isotipos estudiados. En la hipótesis de este trabajo se planteaba una posible ubicación de los CLICs en el RS, en las zonas próximas a los receptores de RyR. En base al resultado obtenido de CLIC-5, donde se obtuvieron imágenes de gran calidad creemos que la hipótesis planteada sobre la localización puede ser correcta. De todas maneras para confirmarla se debería inmunomarcarse los receptores RyR o los túbulos-T, para luego co-localizarlos con los CLIC inmunomarcados.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como conclusión de lo planteado anteriormente podemos inferir que CLIC-1, CLIC-5 y eventualmente CLIC-4 y CLIC-6 se expresan en músculo esquelético de mamífero observándose un patrón de fluorescencia en las fibras musculares esqueléticas, que sugiere se asocia a una estructura muy organizada que se encuentra de manera repetida.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el isotipo CLIC-5, se concluye que el patrón de fluorescencia es muy similar al patrón conocido de RS, en donde se localizan los receptores RyR, sugiriendo que los CLIC se asocian de alguna manera, ya sea directa o indirectamente con los receptores RyR, para confirmar se

podrían inmunomarcarse los RyR para luego co-localizarlos con los resultados inmunohistoquímicos de CLIC-5, en conjunto con experimentos electrofisiológicos en donde se podrían bloquear las CLIC para conocer cómo afecta a los RyR y al Ca^{2+} .

La importancia de los CLIC en la modulación de la liberación de Ca^{2+} hace que la dilucidación de la expresión y localización de sus isotipos sea de particular interés.

Se continuará con el estudio de la expresión y localización del resto de los isotipos, con la finalidad de hacer un mapa completo de localización de CLIC en músculo esquelético de mamífero. También se determinará la concentración de cada subfamilia mediante Western Blot, en paralelo se realizará el marcaje inmunohistoquímico de los túbulos T, para co-localizarlos con proteínas CLIC.

Estos estudios deberán ser complementados por estudios funcionales y de supresión de la expresión para dilucidar el rol de estas proteínas en la fisiología del músculo esquelético.

BIBLIOGRAFÍA

Ashley, R. H. (1989). Activation and conductance properties of ryanodine-sensitive calcium channels from brain microsomal membranes incorporated into planar lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology*, 111(2), 179-189.

Beard, N. A., Laver, D. R., & Dulhunty, A. F. (2004). Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Progress in biophysics and molecular biology*, 85(1), 33-69.

Berry, K. L., Bülow, H. E., Hall, D. H., & Hobert, O. (2003). A *C. elegans* CLIC-like protein required for intracellular tube formation and maintenance. *science*, 302(5653), 2134-2137.

Berryman, M., & Bretscher, A. (2000). Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC5) that associates with the actin cytoskeleton of placental microvilli. *Molecular biology of the cell*, 11(5), 1509-1521.

Berryman, M., Bruno, J., Price, J., & Edwards, J. C. (2004). CLIC-5A functions as a chloride channel in vitro and associates with the cortical actin cytoskeleton in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34794-34801.

Berryman, M. A., & Goldenring, J. R. (2003). CLIC4 is enriched at cell-cell junctions and colocalizes with AKAP350 at the centrosome and midbody of cultured mammalian cells. *Cytoskeleton*, 56(3), 159-172.

Board, P. G., Coggan, M., Watson, S., Gage, P. W., & Dulhunty, A. F. (2004). CLIC-2 modulates cardiac ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(8), 1599-1612.

Chuang, J. Z., Milner, T. A., Zhu, M., & Sung, C. H. (1999). A 29 kDa intracellular chloride channel p64H1 is associated with large dense-core vesicles in rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 19(8), 2919-2928.

Cooper D, S., & Sun, T. T. (1985). Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins, strategies, applications and limitations. *Lab Invest*, 52, 243.

Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G., & Board, P. (2001). The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3319-3323.

Duncan, R. R., Westwood, P. K., Boyd, A., & Ashley, R. H. (1997). Rat brain p64H1, expression of a new member of the p64 chloride channel protein family in endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23880-23886.

Edwards, J. C., Cohen, C., Xu, W., & Schlesinger, P. H. (2006). c-Src control of chloride channel support for osteoclast HCl transport and bone resorption. *Journal of Biological Chemistry*, 281(38), 28011-28022.

Edwards, J. C., & Kapadia, S. (2000). Regulation of the bovine kidney microsomal chloride channel p64 by p59 fyn, a Src family tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 31826-31832.

Edwards, J. C., Tulk, B., & Schlesinger, P. H. (1998). Functional expression of p64, an intracellular chloride channel protein. *Journal of Membrane Biology*, 163(2), 119-127.

Elter, A., Hartel, A., Sieben, C., Hertel, B., Fischer-Schliebs, E., Lüttge, U. ... & Thiel, G. (2007). A plant homolog of animal chloride intracellular channels (CLICs) generates an ion conductance in heterologous systems. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8786-8792.

Fabiato, A., & Fabiato, F. (1979). Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annual review of physiology*, 41(1), 473-484.

Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 245(1), C1-C14.

Fanucchi, S., Adamson, R. J., & Dirr, H. W. (2008). Formation of an unfolding intermediate state of soluble chloride intracellular channel protein CLIC1 at acidic pH. *Biochemistry*, 47(44), 11674-11681.

Fernández-Salas, E., Sagar, M., Cheng, C., Yuspa, S. H., & Weinberg, W. C. (1999). p53 and tumor necrosis factor α regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), 36488-36497.

Fernández-Salas, E., Suh, K. S., Speransky, V. V., Bowers, W. L., Levy, J. M., Adams, T., ... & Steven, A. C. (2002). mtCLIC/CLIC4, an organellar chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53. *Molecular and cellular biology*, 22(11), 3610-3620.

Franzini-Armstrong, C., & Jorgensen, A. O. (1994). Structure and development of EC coupling units in skeletal muscle. *Annual review of physiology*, 56(1), 509-534.

Gagnon, L. H., Longo-Guess, C. M., Berryman, M., Shin, J. B., Saylor, K. W., Yu, H. ... & Johnson, K. R. (2006). The chloride intracellular channel protein CLIC5 is expressed at high levels in hair cell stereocilia and is essential for normal inner ear function. *Journal of Neuroscience*, 26(40), 10188-10198.

Goodchild, S. C., Howell, M. W., Cordina, N. M., Littler, D. R., Breit, S. N., Curmi, P. M., & Brown, L. J. (2009). Oxidation promotes insertion of the CLIC1 chloride intracellular channel into the membrane. *European biophysics journal*, 39(1), 129.

Harrop, S. J., DeMaere, M. Z., Fairlie, W. D., Reztsova, T., Valenzuela, S. M., Mazzanti, M., ... & Bauskin, A. R. (2001). Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44993-45000.

Heiss, N. S., & Poustka, A. (1997). Genomic structure of a novel chloride channel gene, CLIC2, in Xq28. *Genomics*, 45(1), 224-228.

Ikemoto, N., Antoniu, B., Kang, J. J., Meszaros, L. G., & Ronjat, M. (1991). Intravesicular calcium transient during calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 30(21), 5230-5237.

Ikemoto, N., Yano, M., El-Hayek, R., Antoniu, B., & Morii, M. (1994). Chemical depolarization-induced SR calcium release in triads isolated from rabbit skeletal muscle. *Biochemistry*, 33(36), 10961-10968.

Kaisto, T., & Metsikkö, K. (2003). Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers. *Experimental cell research*, 289(1), 47-57.

Kawasaki, T., & Kasai, M. (1994). Regulation of calcium channel in sarcoplasmic reticulum by calsequestrin. *Biochemical and biophysical research communications*, 199(3), 1120-1127.

Kourie, J. I. (1997). Chloride channels in the sarcoplasmic reticulum of muscle. *Progress in biophysics and molecular biology*, 68(2), 263-300.

Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., & Hamilton, S. L. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(11), a003996.

Lehnart, S. E., Wehrens, X. H., Kushnir, A., & Marks, A. R. (2004). Cardiac ryanodine receptor function and regulation in heart disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1015(1), 144-159.

Littler, D. R., Harrop, S. J., Brown, L. J., Pankhurst, G. J., Mynott, A. V., Luciani, P., & Breit, S. N. (2008). Comparison of vertebrate and invertebrate CLIC proteins: The crystal structures of *Caenorhabditis elegans* EXC-4 and *Drosophila melanogaster* DmCLIC. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(1), 364-378.

Littler, D. R., Harrop, S. J., Fairlie, W. D., Brown, L. J., Pankhurst, G. J., Pankhurst, S., ... & Mazzanti, M. (2004). The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9298-9305.

Littler, D. R., Harrop, S. J., Goodchild, S. C., Phang, J. M., Mynott, A. V., Jiang, L., ... & Curmi, P. M. (2010). The enigma of the CLIC proteins: Ion channels, redox proteins, enzymes, scaffolding proteins?. *FEBS letters*, 584(10), 2093-2101.

Martonosi, A. N., & Pikula, S. (2003). The network of calcium regulation in muscle. *Acta biochimica Polonica*, 50(1), 1-30.

Meissner, G., & Lu, X. (1995). Dihydropyridine receptor-ryanodine receptor interactions in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Bioscience reports*, 15(5), 399-408.

Meng, X., Wang, G., Viero, C., Wang, Q., Mi, W., Su, X. D., ... & Yin, C. C. (2009). CLIC2-RyR1 interaction and structural characterization by cryo-electron microscopy. *Journal of molecular biology*, 387(2), 320-334.

Michalak, M., & MacLennan, D. H. (1980). Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Biosynthesis of the high affinity calcium binding protein in rat skeletal muscle cell cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 255(4), 1327-1334.

Novarino, G., Fabrizi, C., Tonini, R., Denti, M. A., Malchiodi-Albedi, F., Lauro, G. M., & Breit, S. N. (2004). Involvement of the intracellular ion channel CLIC1 in microglia-mediated β -amyloid-induced neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 24(23), 5322-5330.

Ogata T & Yamasaki Y (1985) Scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of sarcoplasmic reticulum in the mammalian red, white and intermediate muscle fibers. *Cell Tissue Res* 242:461-467

Plancarte, A., Fexas, M., & Flisser, A. (1994). Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *International journal for parasitology*, 24(5), 733-738.

Qian, Z., Okuhara, D., Abe, M. K., & Rosner, M. R. (1999). Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel. *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), 1621-1627.

Qiu, M. R. (2003). *Functional and molecular aspects of ion channels in macrophages* (Doctoral dissertation, University of New South Wales). Reyes-Juárez, J. L., & Zarain-Herzberg, Á. (2006). Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. *Archivos de cardiología de México*, 76, 18-32.

Shanks, R. A., Larocca, M. C., Berryman, M., Edwards, J. C., Urushidani, T., Navarre, J., & Goldenring, J. R. (2002). AKAP350 at the Golgi Apparatus II. Association of AKAP350 with a Novel Chloride Intracellular Channel (CLIC) Family Member. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 40973-40980.

Shorning, B. Y., Wilson, D. B., Meehan, R. R., & Ashley, R. H. (2003). Molecular cloning and developmental expression of two Chloride Intracellular Channel (CLIC) genes in *Xenopus laevis*. *Development genes and evolution*, 213(10), 514-518.

Singh, H., & Ashley, R. H. (2006). Redox regulation of CLIC1 by cysteine residues associated with the putative channel pore. *Biophysical journal*, 90(5), 1628-1638.

Steele, G. A., Beard, N. A., Board, P. G., & Dulhunty, A. F. (2014). CLIC-2 Determines FKBP12 and FKBP12. 6 Association with Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Biophysical Journal*, 106(2), 124a.

Strippoli, P., D'addabbo, P., Lenzi, L., Giannone, S., Canaider, S., Casadei, R., ... & Zannotti, M. (2002). Without Title. *Mammalian genome*, 13(8), 456-462.

Sukhareva, M., Morrissette, J., & Coronado, R. (1994). Mechanism of chloride-dependent release of Ca²⁺ in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biophysical journal*, 67(2), 751-765.

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., ... & Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 328(6128), 313-318.

Téllez-Girón, E., Ramos, M. C., Dufour, L., Alvarez, P., & Montante, M. (1987). Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 37(1), 169-173.

Tonini, R., Ferroni, A., Valenzuela, S. M., Warton, K., Campbell, T. J., Breit, S. N., & Mazzanti, M. (2000). Functional characterization of the NCC27 nuclear protein in stable transfected CHO-K1 cells. *The FASEB Journal*, 14(9), 1171-1178.

Tulk, B. M., Kapadia, S., & Edwards, J. C. (2002). CLIC1 inserts from the aqueous phase into phospholipid membranes, where it functions as an anion channel. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(5), C1103-C1112.

Valenzuela, S. M., Martin, D. K., Por, S. B., Robbins, J. M., Warton, K., Bootcov, M. R., ... & Breit, S. N. (1997). Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12575-12582.

Vaz, A. J., Ferreira, A. W., Camargo, M. E., Nakamura, P. M., & Camargo, E. D. (1990). DOT-ELISA for detection of anti-Cysticercus cellulosae antibodies in human cerebrospinal fluid using a new solid-phase (resin-treated polyester fabrics): preliminary report. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 32(5), 355-359.

Wagenknecht, T., & Samsó, M. (2002). Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors. *Front Biosci*, 7(1464-74).

Warton, K., Tonini, R., Fairlie, W. D., Matthews, J. M., Valenzuela, S. M., Qiu, M. R., ... & Campbell, T. J. (2002). Recombinant CLIC1 (NCC27) assembles in lipid bilayers via a pH-dependent two-state process to form chloride ion channels with identical characteristics to those observed in Chinese hamster ovary cells expressing CLIC1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26003-26011.

Wientzek, M., & Katz, S. (1991). Isolation and characterization of purified sarcoplasmic reticulum membranes from isolated adult rat ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 23(10), 1149-1163.

Wilce, M. C., & Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205(1), 1-18.