

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**TRÁFICO DE LOS CANALES DE SODIO
ACTIVADOS POR VOLTAJE HACIA LA
MEMBRANA AXONAL EN UN MODELO
DE DAÑO DE NERVIÓ CIÁTICO**

**Memoria presentada a la Universidad de Chile para
optar al título profesional de Bioquímico**

MACARENA FRANCISCA DÍAZ UBILLA

Director de Memoria:

Dr. Andrés Couve Correa

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular
Departamento de Fisiología y Biofísica
Instituto de Neurociencia Biomédica
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante:

Dr. Christian Wilson Moya

Laboratorio de Bioquímica
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago de Chile, mayo de 2017

Para aquellos que:

Cuando estuve estresada, me abrazaron

Cuando no había comido, me cocinaron

Cuando me quedé dormida, bajaron la voz

Y cuando estuve nerviosa, me dijeron que todo estaría bien.

Agradecimientos

Agradezco al doctor Andrés Couve, por haberme permitido formar parte de su laboratorio y realizar mi tesis de pregrado en el área que considero mi favorita desde el primer semestre de la carrera, la neurociencia. A Carolina González, por haberme acogido como su aprendiz y haberme enseñado todas las técnicas que me permitieron realizar este trabajo. Gracias por el cariño y la guía. A todos quienes me ayudaron con los Western blots, especialmente a Estefanía López y Víctor Hugo Cornejo. Agradezco a Angélica Figueroa, por su ayuda técnica y amable apoyo laboral. Y a aquellos que alegraron mis días con su amistad, Javiera Gallardo, Patricia Ayala, Silvia Cantellano, Sebastián Silva, Romina San Juan, María de Los Ángeles Juricic y Andrés Köhler. Agradezco a todos los miembros del Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, quienes me acompañaron durante esta importante etapa.

Agradezco todas las fuentes de financiamiento de este trabajo: la Iniciativa Científica Milenio (ICM, número de proyecto P09-015-F) y el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt, 1140617).

Finalmente agradezco a mi familia por el apoyo constante a mi educación, a mis amigas del colegio y a todos mis amigos de carrera por comprenderme y vivir esta etapa conmigo y a Gonzalo Neira, por su inmenso amor.

Tabla de contenido

Agradecimientos	3
Índice de Contenidos	4
Índice de Ilustraciones y cuadros	6
Abreviaturas	7
Resumen	8
Abstract	10
I. Marco teórico	12
I.1. Estructura y función neuronal	12
I.2. Morfología de axones mielinizados	13
I.3. Nodos de Ranvier	17
I.4. Canales de sodio activados por voltaje	18
I.5. Regulación del proteoma axonal	22
I.6. Síntesis axonal de proteínas	23
I.7. Ruta secretoria axonal	24
I.8. Daño axonal	25
II. Hipótesis y Objetivos	28
II.1 Hipótesis	28
II. 2 Objetivo general	28
II. 3 Objetivos específicos	28
III. Materiales y Métodos	29
III.1 Materiales	29
III.1.1 Animales	29
III.1.2. Anticuerpos	29
III.1.3. Fármacos	30
III.1.4. Reactivos	30
III.2 Métodos	31
III.2.1 Cirugía de daño de nervio ciático	31
III.2.2 Inhibición local de la síntesis proteica y de la ruta secretoria axonal	32
III.2.3 Inmunofluorescencia de axones individuales de nervio ciático de rata	33
III.2.4 Western Blot de nervio ciático de rata	34
III.2.5 Procesamiento de imágenes	35
III.2.6 Análisis estadístico	36

IV. Resultados	37
IV.1 Obtención de axones individuales, identificación de Nav mediante inmunofluorescencia y generación de daño axonal mediante transección del nervio ciático de ratas macho adultas.	37
IV.2 Efecto del daño axonal sobre la abundancia de los canales de sodio activados por voltaje en la membrana axonal.	42
IV.3 Efecto de la inhibición de la síntesis local axonal y de la ruta secretoria axonal sobre la abundancia y la distribución de los canales de sodio dependientes de voltaje en un modelo de daño axonal.	46
V. Discusión	52
V.1 Efecto del daño axonal sobre la abundancia de los Nav	53
V.2 Relación de la sobreexpresión de los Nav con la síntesis local	55
V.3 Relación de la sobreexpresión de los Nav con la ruta secretoria local	57
VI. Conclusión	59
VII. Mecanismo propuesto	60
VIII. Proyecciones	61
IX. Referencias	62

Índice de ilustraciones y cuadros

Figura 1: Dominios y componentes moleculares de axones mielinizados.	16
Figura 2: Estructura general de los canales de sodio activados por voltaje.	20
Tabla 1: Canales de sodio activados por voltaje de mamíferos.	21
Figura 3: Obtención de axones individuales.	38
Figura 4: Identificación de zona nodal, paranodal e internodal en axones individuales.	39
Figura 5: Transección de nervio ciático de rata.	41
Figura 6: Efecto del daño sobre la abundancia de los canales de sodio activados por voltaje.	44
Figura 7: Efecto de la inhibición de la síntesis local de proteínas mediante CHX sobre la abundancia y distribución de los canales de sodio activados por voltaje.	49
Figura 8: Efecto de BFA sobre la sobreexpresión de los canales de sodio activados por voltaje en un modelo de daño axonal.	51

Abreviaturas

AIS: Segmento inicial del axón

BFA: Brefeldina A

CAM: Molécula de adhesión celular

CHX: Cicloheximida

CNS: Sistema nervioso central

COPI: Proteína I del complejo de cubierta

COPII: Proteína II del complejo de cubierta

DRG: Ganglio de la raíz dorsal

ER: Retículo endoplásmico

ERES: Sitio de salida del ER

ERGIC: Compartimento intermedio entre el ER y el aparato de Golgi

HRP: Peroxidasa de rábano

IF: Inmunofluorescencia

K_v: Canal de potasio activado por voltaje

Na_v: Canal de potasio activado por voltaje

PNS: Sistema nervioso periférico

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas

UTR: Región no traducida

WB: Western blot

μL: Microlitro

μm: Micrómetro

Resumen

Tráfico de los canales de sodio activados por voltaje hacia la membrana axonal en un modelo de daño de nervio ciático.

Las neuronas son células que permiten la conducción nerviosa mediante potenciales de acción. Para lograr esto, evolucionaron y desarrollaron una proyección altamente especializada llamada axón, en la cual se concentran canales iónicos de membrana que permiten el flujo de iones. Los canales de sodio activados por voltaje (Na_v) son los canales iónicos que permiten la generación y propagación de los potenciales de acción. En el caso de los axones mielinizados, estos se concentran en el segmento inicial del axón y en los nodos de Ranvier, constricciones simétricas de la vaina de mielina donde se regenera el potencial de acción. Su abundancia y distribución a lo largo del axón no son fijas, sino que varían durante procesos como desarrollo y regeneración axonal. Se sabe que los axones son capaces de sintetizar proteínas localmente. A la fecha se ha reportado que la síntesis axonal de proteínas se ve aumentada en respuesta a daño axonal. Sin embargo, se desconoce si proteínas de membrana también son sintetizadas y traficadas localmente. En este contexto se ha reportado un aumento de Na_v luego de daño axonal.

El objetivo de este trabajo es establecer si la síntesis axonal de proteínas y la ruta secretoria local contribuyen a reestablecer los niveles de Na_v en nodos de Ranvier luego de daño axonal.

Para evaluar esto, se utilizó un modelo de daño axonal generado a partir de la transección de nervio ciático de rata. Se inhibió la síntesis y ruta secretoria axonal mediante la aplicación *in vivo* de cicloheximida (CHX) y brefeldina A (BFA) respectivamente. Ambos fármacos fueron inyectados independientemente en el nervio transectado. Se evaluó su efecto sobre la abundancia y distribución de Na_v mediante inmunofluorescencia y western blot.

En primer lugar, se corroboró que el daño axonal produce un aumento de los Na_v en los nodos de Ranvier. Esta sobreexpresión de los canales de sodio activados por voltaje producto de daño axonal es bloqueada al inhibir la síntesis y ruta secretoria axonal con herramientas farmacológicas. Estos datos sugieren la existencia de una ruta biosintética y de tráfico axonal capaz de mediar el rápido aumento de Na_v en procesos de regeneración axonal.

Abstract

Trafficking of voltage gated sodium channel to the axonal membrane in an injury model.

Neurons are highly polarized cells that evolved to transmit nerve impulses. To achieve this function, they developed a process called the axon that concentrates ion channels. Voltage gated sodium channels (Na_v) are responsible for generating and propagating action potentials. In myelinated axons, these proteins are concentrated at the axon initial segment (AIS) and at the nodes of Ranvier. Nodes are symmetric constrictions of the myelin sheath where action potentials are regenerated. The availability and distribution of Na_v are plastic, meaning they change during developmental stages or regeneration. It is currently known that axonal protein synthesis is enhanced in response to axonal injury. However, it is still unknown whether local protein synthesis controls the abundance of membrane proteins in the axon and if Na_v are subject to this regulation. The aim of this work is to study if Na_v upregulation after axonal injury is related with axonal protein synthesis and the axonal secretory route.

To evaluate this, we used an axonal injury model generated from the transection of the rat sciatic nerve. Local synthesis and the function of the axonal secretory route were inhibited *in vivo* using cycloheximide (CHX) or brefeldin A (BFA) respectively. Both drugs were injected in the nerve right after transection. The effect on Na_v was evaluated by immunofluorescence and western blot.

First, we corroborated that axonal injury enhances Na_v at nodes of Ranvier. This upregulation disappears when axonal protein synthesis or the local secretory route were inhibited. Our data suggest the existence of an axonal synthetic and trafficking route capable of mediating the fast Na_v upregulation during axonal regeneration.

I. Marco teórico

Durante los años 60 en el laboratorio de Montemar en Valparaíso, se llevó a cabo uno de los descubrimientos más fundamentales de la neurociencia. Allí, científicos chilenos demostraron por primera vez que los componentes de la membrana axonal responsables de la transmisión del impulso nervioso eran proteínas¹. Hoy en día, a más de 50 años de aquel hallazgo, aún quedan muchas interrogantes por responder respecto a estas proteínas.

I.1. Estructura y función neuronal

Las neuronas son células del sistema nervioso especializadas en la conducción eléctrica. Están interconectadas en el sistema nervioso y se comunican entre ellas y con los demás tejidos presentes en un organismo. La comunicación entre neuronas se denomina sinapsis y puede ser de tipo química o eléctrica. Estructuralmente, las neuronas se caracterizan por ser altamente polarizadas y por poseer una morfología única, en la cual se identifican dos dominios principales: el somato-dendrítico y el axonal². El dominio somato-dendrítico posee estructuras funcionales especializadas en la recepción de señales provenientes de axones de otras neuronas. El conjunto de dendritas y sus ramificaciones se conoce como árbol dendrítico. Esta formación incrementa significativamente el número de contactos sinápticos al aumentar el área de recepción disponible, lo que permite aumentar la interconectividad neuronal². También se ha visto que mientras mayor sea el número de dendritas de una

neurona, mayor también será el número de axones atraídos hacia dicha neurona². Las dendritas poseen espinas dendríticas; pequeñas protuberancias membranosas donde hace contacto un axón y se produce una única sinapsis. Al ser proyecciones especializadas en la recepción de señales, las dendritas poseen receptores ionotrópicos y metabotrópicos para las sinapsis químicas y *Gap Junctions* para las sinapsis eléctricas³.

El axón por su parte, es una única ramificación, especializada tanto funcional como morfológicamente. Su función es transmitir el impulso nervioso, normalmente desde el soma hacia los terminales axonales. Esta proyección puede alcanzar desde micrones a metros de longitud. Se piensa que el axón más grande está presente en la ballena azul y podría exceder los 30 metros⁴. La velocidad de conducción de un axón está determinada por su diámetro y por la presencia o ausencia de mielina. La vaina de mielina es una extensión citoplasmática de origen glial dispuesta alrededor del axón⁵, lo que condiciona que la conducción del impulso nervioso no sea continua sino saltatoria. En el sistema nervioso central (CNS) esta función la cumplen los oligodendrocitos mientras que en el sistema nervioso periférico (PNS) lo hacen las células de Schwann².

I.2. Morfología de axones mielinizados

La vaina de mielina de los axones mielinizados posee pequeñas interrupciones denominadas nodos de Ranvier, los cuales corresponden a microdominios

altamente organizados entre dos segmentos de mielina. Toda el área comprendida entre nodos se denomina zona internodal, la cual a su vez contiene unos pequeños segmentos denominados paranodo y juxtapanodo. Durante la mielinización, los diferentes dominios se forman de manera gradual; primero los N_{av} forman agrupaciones en los nodos, seguidos por la generación de la unión paranodal y finalmente ocurre la agrupación de los K_v en el juxtapanodo⁵.

En el paranodo es donde ocurre la unión axoglial. Los extremos de la mielina se orientan hacia el axón, formando los *loops* paranodales, los cuales se anclan al axón. Estos *loops* poseen una proteína transmembrana llamada neurofascina 155 (Nf155), la cual interactúa con la proteína transmembrana axonal Caspr1 (*contactin associated protein 1*) mediante su interacción con contactina1 (Cntn1)⁵. A su vez, Caspr1 se encuentra anclada al citoesqueleto de actina axonal. Esta unión glía-axón que ocurre en el paranodo funciona como una barrera física entre el nodo y el juxtapanodo, lo que permite separar la actividad eléctrica al impedir la difusión de los canales de membrana de ambos segmentos. En el juxtapanodo se encuentran los canales de potasio activados por voltaje (K_v), normalmente encargados de reestablecer el potencial de membrana. Mediante microscopía electrónica se ha observado que en esta región se encuentran principalmente las isoformas K_v 1.1, K_v 1.2 y K_v β 2. Ellos se concentran más cerca de los paranodos y luego difunden hacia el internodo⁵. Es fundamental para la acumulación de estos canales la presencia en el juxtapanodo del complejo entre Caspr2 y Tag1 (*transient axonal glycoprotein-*

1), ya que se ha demostrado que la ausencia de cualquiera de estas dos proteínas reduce la acumulación de K_v tanto en el PNS como en el CNS⁶.

Por último, el internodo, localizado entre dos juxtapanodos, corresponde a la región más extensa de esta organización, aproximadamente 100 veces el diámetro axonal, y a la de mayor interacción entre el axón y la glía⁷. Si bien está prácticamente libre de estructuras organizadas, se ha descrito que la CAM (*cell adhesion molecule*) axonal Necl1 y la glial Necl4 mediarían la interacción axón-glía durante el proceso de mielinización⁸.

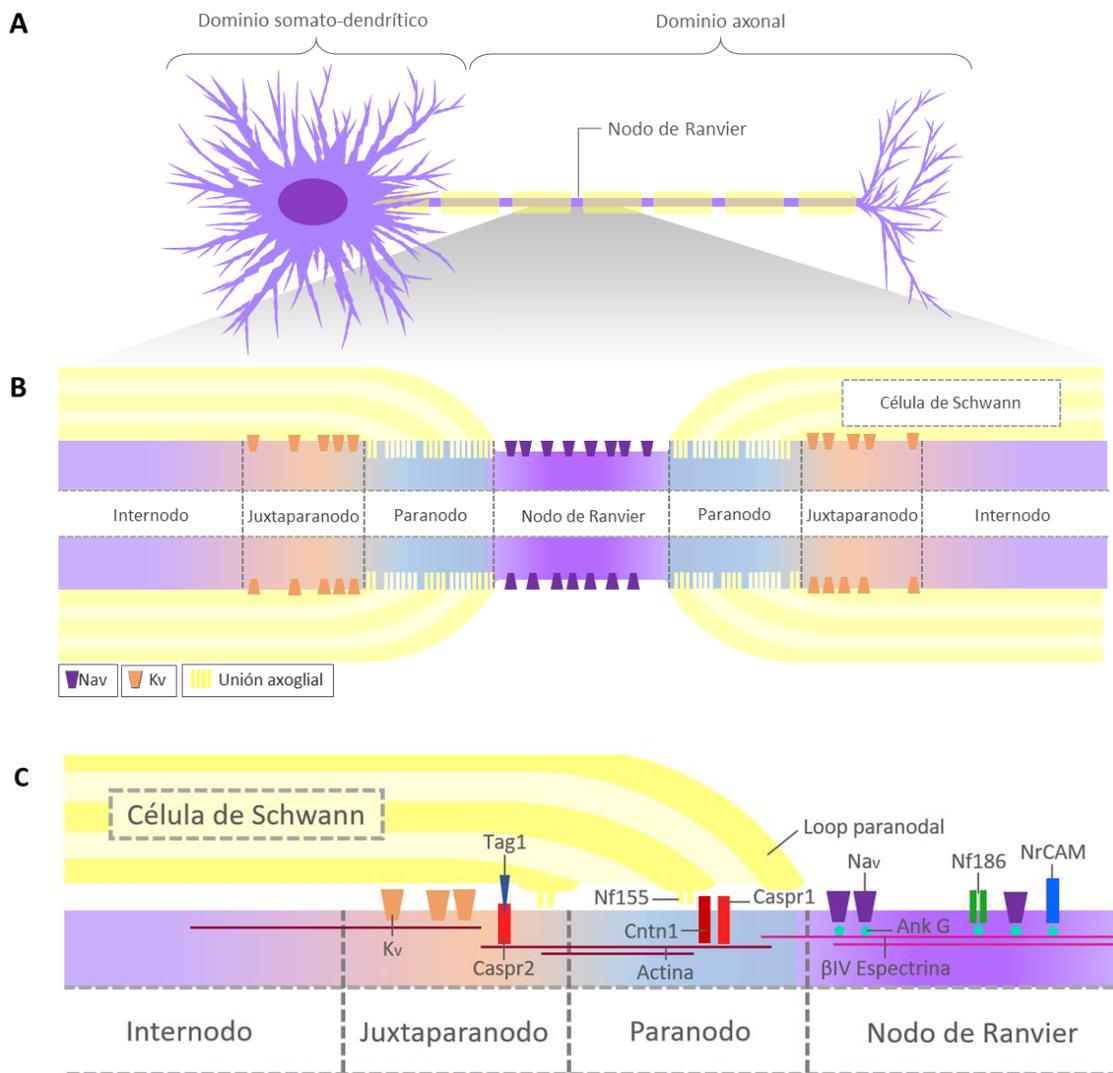


Figura 1: Dominios y componentes moleculares de axones mielinizados. (A) Esquema de una neurona mielinizada. Se muestran los dominios somato-dendrítico, axonal y los nodos de Ranvier. En amarillo se ilustra la vaina de mielina. **(B)** Subdominios presentes en una neurona mielinizada: nodo de Ranvier, paranodo, juxtaparanodo e internodo. **(C)** Componentes moleculares característicos de cada subdominio.

I.3. Nodos de Ranvier

La conducción saltatoria del impulso nervioso ocurre entre los nodos de Ranvier, los cuales se encuentran espaciados por un segmento cuyo largo aproximado es de 100 veces el diámetro del axón⁵. Los nodos deben su importancia a que en esta zona es donde el potencial de acción es regenerado, gracias a la presencia en alta densidad de los canales de sodio activados por voltaje (Na_v , $>1200/\mu\text{m}^2$)⁵. Su presencia elimina la necesidad de regenerar el potencial de acción a lo largo de toda la membrana axonal. Esto aumenta la velocidad de conducción y reduce los requerimientos metabólicos de la célula⁵.

Además de Na_v , en los nodos se encuentran K_v (K_v 3.1b), moléculas de adhesión celular (CAMs), proteínas de andamiaje y componentes de matriz extracelular^{9,10}. Dentro de los canales de sodio activados por voltaje presentes en el nodo, se encuentran Nav 1.1, Nav 1.2, Nav 1.6 (el más abundante en los nodos de mamíferos adultos), Nav 1.8 y Nav 1.9¹⁰.

Tanto en axones del CNS como en PNS, la formación nodal comienza con la agrupación de los Na_v , la cual ocurre en sitios cercanos a los bordes de proyecciones extendidas por los oligodendrocitos o por las células de Schwann⁵. El crecimiento longitudinal de estas proyecciones causa el desplazamiento de estos agregados, lo que provoca la fusión de agregados vecinos, formando un nuevo nodo de Ranvier⁵. También es necesaria la acumulación de neurofascina-186 (NF186) y de NrCAM (*neuronal cell adhesion molecule*) en la membrana nodal. La llegada de NF186 provoca el acoplamiento de la proteína de andamiaje

ankirina-G (Ank G), encargada de la mantención y estabilización de los demás componentes nodales a través de su unión con el citoesqueleto de actina por medio de la proteína β IV espectrina¹¹.

I.4. Canales de sodio activados por voltaje (Na_v)

Los canales de sodio activados por voltaje (Na_v) son los encargados de iniciar y reestablecer el potencial de acción¹². Existen 10 tipos de Na_v , siendo el Na_v 1.6 el más abundante en los microdominios nodales y en el segmento inicial del axón. Este canal se encuentra en axones del PNS y del CNS y es el único canal localizado de manera específica en el nodo de Ranvier de axones del PNS de mamíferos adultos^{13,14}. Los Na_v están constituidos por varias subunidades, las cuales forman heterodímeros o heterotrímeros compuestos por una subunidad α y una o dos subunidades β ^{13,15} (Fig. 2). A la fecha hay 10 genes registrados - tanto en humanos como en ratones- que codifican para diferentes subunidades α (las que dan origen a las 10 isoformas) y además, existen variantes producto de corte y empalme alternativo¹⁶ (Tabla 1). El mRNA codificante de la subunidad α es suficiente para expresar un Na_v funcional¹⁵. Esta subunidad está compuesta por aproximadamente 2000 residuos organizados en 4 dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales contiene 6 segmentos transmembrana (S1-S6) (Fig. 2). Estos 4 dominios se pliegan para formar el poro¹⁷. Hoy se sabe que los cuatro segmentos S4 sirven como sensores de activación^{17,12} y su movimiento es responsable de la apertura del canal^{12,15}. Las subunidades β auxiliares son

moduladores importantes de la función de los Na_v . Existen 4 subunidades β reportadas a la fecha ($\beta 1$ - $\beta 4$)¹⁸, las cuales están conformadas por un N-terminal extracelular del tipo inmunoglobulina, un único dominio transmembrana y un pequeño segmento intracelular (Fig. 2). Los dominios tipo inmunoglobulina sirven como moléculas de adhesión que interactúan con proteínas de la matriz extracelular y otras moléculas de adhesión celular¹⁵.

Los Na_v sufren regulación a nivel transcripcional, de interacción de sus subunidades y por modificaciones post traduccionales (principalmente glicosilación y fosforilación)¹⁷. La glicosilación co-traducciona es esencial para la mantención y expresión de los Na_v en la superficie celular tanto en neuronas como en las células de Schwann¹². Mutaciones regulan la expresión de los Na_v en la epilepsia hereditaria, migraña, parálisis periódica, arritmia cardíaca y síndromes de dolor crónico¹².

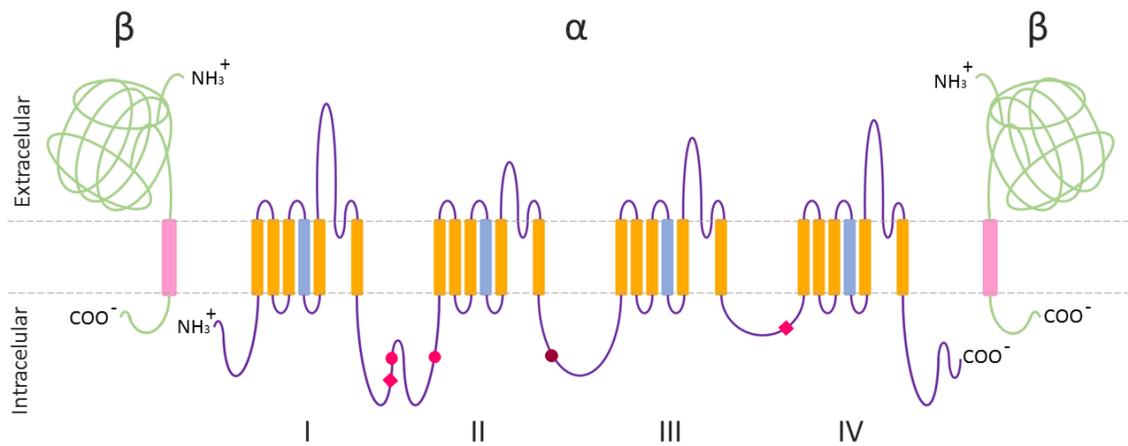


Figura 2: Estructura general de los canales de sodio activados por voltaje. Se muestra un heterotrímero conformado por una subunidad α y dos subunidades β . Subunidad α : Los cilindros amarillos representan los segmentos transmembrana (S1-S6) de cada dominio (I-IV). En celeste se muestran los segmentos S4 (sensores de activación). Los círculos fucsia indican zonas de fosforilación por la PKA y los diamantes zonas de fosforilación por la PKC. El círculo burdeo muestra la zona de interacción con Ank G. Subunidades β : Los cilindros rosados representan el segmento transmembrana. Los dominios extracelulares se muestran como dominios del tipo inmunoglobulina.

Nombre del canal	Especies	Variantes	Tejido	Gen
Nav 1.1	Rata Humano Conejillo de Indias	Nav 1.1a	CNS PNS CNS CNS	SCN1A
Nav 1.2	Rata Humano	Nav 1.2a	CNS CNS	SCN2A
Nav 1.3	Rata	Nav 1.3a Nav 1.3b	CNS CNS	SCN3A
Nav 1.4	Rata Humano		Músculo esquelético Músculo esquelético	SCN4A
Nav 1.5	Rata Humano		Músculo esquelético no innervado Corazón Corazón	SCN5A
Nav 1.6	Rata Ratón Humano Conejillo de Indias	Nav 1.6a	CNS PNS CNS CNS PNS CNS	SCN8A
Nav 1.7	Rata Humano Conejo		PNS Médula Células de Schwann	SCN9A
Nav 1.8	Rata Ratón Perro		PNS (DRG) PNS PNS	SCN10A
Nav 1.9	Rata Ratón Humano	Nav 1.9a	PNS PNS PNS	SCN11A
Nax	Humano Rata Ratón		Corazón Útero Astrocitos PNS (DRG) Corazón Útero	SCN6A SCN7A

Tabla 1: Canales de sodio activados por voltaje de mamíferos. Se muestran las 10 isoformas de canales de sodio activados por voltaje registradas a la fecha en mamíferos, las cuales se han identificado y clasificado según la subunidad α que poseen.

I.5. Regulación del proteoma axonal

Debido a la alta especialización de cada compartimiento axonal (nodo, paranodo, juxtapanodo e internodo), el proteoma axonal debe ser regulado de manera muy fina. La localización y abundancia de los componentes proteicos otorga especificidad tanto morfológica como funcional y es por esto que las proteínas deben expresarse acorde al contexto espacio temporal y los requerimientos de cada dominio.

Existen 3 mecanismos principales que regulan el proteoma axonal: la síntesis y el transporte de proteínas desde el soma, la transferencia de ciertos elementos desde células gliales y la síntesis axonal de proteínas.

El movimiento de proteínas desde el soma a lo largo del axón ocurre mediante los procesos de transporte axonal rápido y lento¹⁹. De esta forma las proteínas se desplazan, anterógrada y retrógradamente, gracias a su asociación con motores moleculares (kinesinas y dineínas, respectivamente)²⁰ que median el transporte a lo largo de un sistema longitudinal de microtúbulos. Este mecanismo es el más aceptado y ha sido el más estudiado, ya que es la principal fuente de proteínas axonales en individuos adultos. Por el contrario, la transferencia de elementos que contribuyen al proteoma axonal -desde células gliales- es un mecanismo de regulación relativamente nuevo en términos de estudio. Considerando la enorme área de contacto entre glías y axones del PNS, no es difícil imaginar el traspaso de material entre ambas células. La mayoría de las investigaciones ha estudiado la transferencia desde las células de Schwann. A

la fecha se ha reportado la transferencia de mRNAs y componentes de la maquinaria biosintética^{21,22,23}. Se piensa que el movimiento de estos elementos hacia el axón ocurre por medio de exosomas y que estaría aumentado en un contexto de daño axonal, al igual que la síntesis local²⁴. La síntesis axonal de proteínas de membrana es un mecanismo que ha recibido atención sólo recientemente, ya que se han detectado marcadores funcionales de los componentes de la ruta biosintética en axones^{19,25}, pero no se han podido observar las estructuras clásicas de todos estos organelos, especialmente del aparato de golgi⁴²⁶. Es bien aceptado que la síntesis local se encuentra activa principalmente durante el desarrollo y debido a daño axonal. Una forma de cubrir la necesidad de suplir demandas inmediatas en regiones distales al soma es sintetizar, de manera local, proteínas en el axón²⁷, dado que el movimiento de proteínas a lo largo del axón podría no ser suficientemente eficiente.

I.6. Síntesis axonal de proteínas

Las primeras evidencias de síntesis de proteínas en axones provienen de estudios en invertebrados¹⁹. En ellos se reportó la presencia de rRNA²⁸, mRNA²⁹, polisomas³⁰ y síntesis *de-novo* de proteínas³¹. Más tarde, se investigó la biosíntesis axonal en neuronas de vertebrados en desarrollo¹⁹. Actualmente, se ha reportado la presencia de mRNAs, rRNAs, factores de traducción y una importante cantidad de trabajos han establecido de manera convincente la síntesis local en axones^{32,33}. Los mRNA son transportados desde el soma al axón

en forma de ribonucleo partículas (RNP). Las señales de destinación son variadas y se pueden encontrar en regiones codificantes o en cualquiera de los UTRs³⁴.

Se ha descrito un número importante de fenómenos biológicos relevantes en los cuales la síntesis local juega un rol fundamental, tales como memoria, formación de sinapsis, ramificación del árbol dendrítico, sobrevivencia neuronal y conducción axonal^{26,35,36}. Sin embargo, la gran mayoría de estos estudios se han centrado en la síntesis de proteínas citosólicas. Por lo tanto, a pesar que componentes de la ruta secretoria han sido visualizados en axones maduros de vertebrados^{19,25}, la síntesis local, modificación, tráfico y función de proteínas secretadas y de membrana han recibido mucho menos atención.

I.7. Ruta secretoria axonal

El organelo membranoso predominante en axones –tanto de PNS como de CNS– es el retículo endoplásmico (ER)³⁷. Se ha observado su estructura mediante microscopía electrónica³⁸ y más relevante aún, se han detectado componentes moleculares funcionales³⁹. Tanto la presencia de sitios de salida del ER (ERES) como de componentes de la maquinaria COPII sugieren que el ER axonal participa en síntesis y tráfico de proteínas. Además del ER, la ruta secretoria incluye el compartimento intermedio entre el ER y el aparato de Golgi (ERGIC) y el complejo de Golgi. Se ha demostrado la presencia de marcadores específicos de Golgi en axones periféricos^{27,22,40}, sin embargo, aún no se ha logrado

observar su estructura típica compuesta por cisternas⁴. Con respecto al ERGIC, un trabajo reciente realizado en nuestro laboratorio demostró la presencia del marcador de ERGIC, ERGIC-53 en axones²⁵. Además, este mismo estudio reportó componentes del ER y Golgi en axones del PNS maduros y demostró la participación de la ruta secretoria en el tráfico de Nav hacia la membrana axonal²⁵.

I.8. Daño axonal

La síntesis local de proteínas en sitios distales al soma puede otorgar al sistema la capacidad de respuesta rápida. Uno de los escenarios fisiológicos en los cuales se hace necesaria la síntesis de nuevas proteínas axonales es el daño axonal. Cuando ocurre interrupción del axón debido a daño tanto en el CNS como en el PNS, el axón sufre degeneración Walleriana^{41,42,43,44}. Este proceso debe su nombre a su descubridor Augustus Volney Waller e implica la degeneración del axón desde la zona de daño hacia el terminal axonal mediante la infiltración de macrófagos, la ruptura de la vaina de mielina y finalmente la degradación del axón⁴¹. Para que este tipo de degeneración se gatille, basta una lesión axonal focalizada que puede provenir de orígenes tan variados como metabólicos, traumáticos, tóxicos inflamatorios y hereditarios, es decir, no necesariamente debe ocurrir una interrupción completa del axón para que ocurra degeneración Walleriana^{43,44}. El segmento axonal que se encuentra entre el daño y el terminal sináptico sufre degeneración. A las 36 horas luego del daño

ya se ha fragmentado el axón, a las 48 horas se desintegra la vaina de mielina y aparecen las bandas de Büngner (estructura tubular conformada por la lámina basal de las células de Schwann mielinizantes, las cuales orientan el crecimiento del axón en regeneración⁴²). La degeneración Walleriana puede durar hasta 7 días. Por otra parte, el extremo dañado que sigue unido al soma (porción proximal al daño) inicia un proceso de regeneración (una vez completada la degeneración Walleriana). Este proceso ocurre con mayor facilidad en el PNS, debido a que en el CNS, las neuronas se encuentran en un ambiente con señales que inhiben la regeneración, ralentizándola o impidiéndola^{45,44}. Los extremos axonales comienzan a formar conos de crecimiento, los cuales darán origen a una nueva estructura axonal, capaz de reinervar su tejido blanco⁴². Su crecimiento estará orientado por las bandas de Büngner. Este proceso de regeneración depende de la edad neuronal, el tipo neuronal, la distancia del daño al soma (más cerca, mejor regeneración) y el contexto celular⁴⁶. Junto con volver a establecer la estructura del axón, se debe reestablecer su funcionalidad. Esto implica recuperar la maquinaria nodal, paranodal, juxtapanodal e internodal, para restablecer la apropiada conducción del impulso nervioso. Considerando la recuperación de la conductividad, se deben recuperar también de manera rápida los canales iónicos de membrana. Se ha observado que en axones dañados ocurre un aumento de Na_v . En axones dañados del PNS, utilizando un anticuerpo anti Pan- Na_v , se observó un aumento significativo comparado con una condición control a partir de la segunda semana luego del daño¹³. Este aumento se

mantiene hasta aproximadamente 20 semanas después del daño, período durante el cual ocurre la regeneración¹³. También se ha observado el aumento de isoformas específicas. Persson *et al.* demostraron la sobreexpresión de Nav 1.7 en axones de nervio ciático transectados⁴⁷. Henry *et al.*, reportaron el incremento significativo de la isoforma 1.6 en la zona nodal de axones del nervio intraorbital, dos semanas después del daño⁴⁸. A pesar de estos estudios, no existen reportes a la fecha que den cuenta de un mecanismo que explique el rápido aumento en la expresión de los Nav en los nodos de Ranvier, en respuesta a daño axonal.

II. Hipótesis y Objetivos

II.1 Hipótesis

El aumento en la abundancia de los canales de sodio activados por voltaje en los nodos de Ranvier luego de daño es dependiente de síntesis local y de la ruta secretoria axonal.

II. 2 Objetivo general

Evaluar *in vivo* la participación de la síntesis local y de la ruta secretoria axonal en el aumento de los canales sodio activados por voltaje en los nodos de Ranvier de axones de nervio ciático de rata.

II. 3 Objetivos específicos

II.3.1 Implementar la técnica de disociación manual de axones, inmunofluorescencia y detección de Na_v y generar daño axonal local mediante transección del nervio ciático de ratas macho adultas

II.3.2 Comparar la abundancia de los canales de sodio activados por voltaje en un modelo de daño axonal y en una condición control.

II.3.3 Evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis local axonal y de la ruta secretoria axonal sobre la abundancia y la distribución de los canales de sodio activados por voltaje en un modelo de daño axonal.

III. Materiales y Métodos

III.1 Materiales

III.1.1 Animales

Para las cirugías se utilizaron 28 ratas macho Sprague-Dawley entre 120 y 150 gramos. Estos animales provienen del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fueron solicitados bajo el protocolo CBA0620FMUCH.

III.1.2. Anticuerpos

Anticuerpo	Marca	Código	Dilución
Anti β III tubulina hecho en ratón	Abcam	Ab78078	1:200
Anti CASPR hecho en conejo	Abcam	Ab34151	1:300
Anti NF-M hecho en pollo	Millipore	AB5735	1:200
Anti Pan-Nav hecho en conejo	Alomone	ASC-003	1:50 (IF) 1:1000 (WB)
Anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rabanito (HRP) hecho en cabra	Jackson Immuno Research Laboratories	111-035-144	1:7000
Anti-IgG de conejo conjugado a tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC) hecho en mono	Jackson Immuno Research Laboratories	711-025-152	1:300

Anti-IgG de pollo conjugado a fluoresceína isotiocianato (FITC) hecho en mono	Jackson Immuno Research Laboratories	703-095-155	1:300
Anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rabanito (HRP) hecho en mono	Jackson Immuno Research Laboratories	715-035-150	1:5000

III.1.3. Fármacos

- Brefeldina A (BFA). Sigma, código: B7651 (5mg).
- Cicloheximida (CHX). Carbiochem, código: 239763.
- Ketoprofeno solución inyectable 1%. Naxpet.
- Isoflorano USP 100%. Baxter.

III.1.4. Reactivos

- Acetona pura. Merck, código: #K44063214.
- Acetona Técnica. Winkler, código: #AC-0020.
- Acrilamida: Bis-Acrilamida 29:1 30% p/v. Winkler, código #BM-0100.
- Gelatina de pez de agua fría. Sigma, código: #G7765 (250ml).
- Lápiz Hidrofóbico. Cancer Diagnostics Inc., código: #SPR0905-5.
- Paraformaldehido (PFA). Sigma, código: #P6148.
- Portaobjetos Super Frost Plus con carga positiva. Thermo Scientific, código: #10143352.
- 3-Aminopropyltriethoxysilane (Silane). Sigma, código: #A3648 (100ml).

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate. Thermo Scientific, código: #3408.
- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) para electrophoresis, 99%. Sigma, código: #110-18-9.
- Tritón X-100. Winkler, código: #BM-2020.
- Vectashield. Vector Laboratories, código: #H-1000

III.2 Métodos

III.2.1 Cirugía de daño de nervio ciático

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 120-150 grs, las cuales fueron anestesiadas con Isoflurano inhalatorio 2-3% y O₂ al 2,0-2,5%. Una vez dormidas, se les inyectó de manera subcutánea una dosis de ketoprofeno 2mg/kg. Se rasuraron ambas extremidades inferiores con una rasuradora eléctrica y se desinfectó el área con etanol 70%. Se realizó una incisión a la altura del glúteo para exponer el nervio ciático. En la pata izquierda el nervio fue transectado (cortado de manera transversal, generando una separación completa del nervio en dos segmentos) mientras que en la extremidad contralateral, el nervio fue dejado intacto como condición control. Los animales fueron suturados y se recuperaron de la anestesia sobre una almohadilla calefaccionada. Veinticuatro horas después de la cirugía, los animales fueron sacrificados mediante inhalación de exceso de isoflurano. De cada nervio

ciático se extrajeron 2 segmentos; uno proximal al daño (1 cm) y uno distal al daño y más próximo al DRG (0,5 cm). Ambas secciones estaban distanciadas por 1,5 cm aproximadamente. Las muestras fueron fijadas en PFA-sacarosa al 4% para ser analizadas mediante microscopía de fluorescencia o bien, fueron extraídas e inmediatamente almacenadas a -80°C para posteriormente ser homogenizadas y analizadas mediante western blot.

III.2.2 Inhibición local de la síntesis proteica y de la ruta secretoria axonal

La anestesia, analgesia y recuperación de los animales fue realizada de la misma manera que la cirugía de daño previamente descrita (sección III.2.1), pero en este caso se transectaron ambos nervios ciáticos. Utilizando una jeringa Hamilton, se inyectó el nervio inmediatamente después de la transección. La inyección se realizó de manera longitudinal por el interior del nervio en dirección hacia el DRG. La extremidad izquierda fue inyectada con 10 µL de BFA (50 µg/ml diluida en metanol) -para inhibir la ruta secretoria- o con 10 µL de CHX (500 µg/ml diluida en PBS 1X estéril) -para inhibir la síntesis local. De manera paralela, la extremidad contralateral fue inyectada con solución control, MetOH o PBS respectivamente. Veinticuatro horas después de la cirugía las muestras fueron extraídas y almacenadas según lo descrito anteriormente.

III.2.3 Inmunofluorescencia de axones individuales de nervio ciático de rata

Una vez extraídas las muestras, se fijaron por una hora a 4°C en PFA-sacarosa al 4% y luego se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS 1X. Utilizando pinzas quirúrgicas n°5, en una placa de 40 mm con PBS 1X se extrajo el perineuro bajo lupa y se comenzó a disociar el nervio. Una vez separadas lo más posible las fibras, se fueron pasando pequeñas porciones a portaobjetos previamente tratados con silane al 3% en acetona (ayuda a la adhesión de los nervios a la superficie del vidrio). La disociación se terminó extendiendo los axones sobre el portaobjeto utilizando agujas de acupuntura. Las muestras se dejaron secar y se almacenaron a -20°C. Para la inmunofluorescencia, las muestras se permeabilizaron incubando los portaobjetos en acetona pura (previamente enfriada) durante 10 minutos a -20°C. Una vez terminada la permeabilización y evaporada la acetona de las placas, se enmarcó la zona del portaobjetos donde se encontraban los axones utilizando un lápiz hidrófobo. En esta área se trabajó con la solución de bloqueo y con los anticuerpos. El bloqueo se realizó durante una hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (gelatina de pez 5% + tritón 0,05% + PBS 1X). Los anticuerpos primarios anti neurofilamento y anti Pan-Nav se incubaron toda la noche en solución de bloqueo a 4°C en una cámara húmeda. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X. Luego se incubaron los anticuerpos secundarios en solución de bloqueo, por tres horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X y se montaron las muestras, utilizando Vectashield y sellando el

portaobjeto con el cubreobjeto utilizando esmalte de uñas. Las muestras fueron almacenadas a 4°C.

III.2.4 Western Blot de nervio ciático de rata

Para la extracción de proteínas, las muestras previamente almacenadas a -80°C, fueron homogenizadas en 100 µL de PBS 1X estéril con inhibidor de proteasas 1X, utilizando un homogenizador manual de vidrio esmerilado en hielo. Se añadió 10 µL de RIPA 5X y se sonicó por 3 segundos. Las proteínas totales de los homogenizados fueron cuantificadas utilizando el ensayo de BCA (ácido bicincoínico) y la medición se realizó mediante un espectrofotómetro. A las muestras se les añadió Laemmli Buffer 5X con DTT 1M y fueron calentadas 5 minutos a 95°C. Se prepararon geles de poliacrilamida al 6% y se cargó 30 µg de proteínas por pocillo. La electroforesis se realizó a 110 V por aproximadamente 2 horas en buffer de electroforesis 1X. La transferencia en medio húmedo se realizó a 0,4 mA utilizando una membrana de nitrocelulosa y buffer de transferencia 1X durante 2 horas en hielo. La membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% (leche en polvo Svelty, PBS Tween) durante una hora en agitación, a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (anti Pan-Nav y anti β III tubulina) se incubaron en leche durante la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS Tween en agitación a temperatura ambiente y se incubaron los anticuerpos secundarios (anti IgG de conejo y anti IgG de ratón, ambos conjugados a HRP). Esta

incubación se realizó en leche a temperatura ambiente y en agitación por una hora. Nuevamente la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos en PBS Tween y en agitación a temperatura ambiente. Luego se dejó en PBS 1X. La detección de proteínas se llevó a cabo utilizando un sustrato quimioluminiscente de HRP (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate, Thermo Scientific*), en el cual se incubó la membrana durante 3 minutos, manteniéndola en movimiento con la ayuda de una pinza. La visualización de las bandas se logró exponiendo la membrana a una película fotográfica, la cual se sumergió en líquido revelador y finalmente en líquido fijador.

III.2.5 Procesamiento de imágenes

Las imágenes de las inmunofluorescencias fueron adquiridas mediante un microscopio de fluorescencia (Spinning disk Microscopy) Olympus BX61WI (Center Valley, PA, USA) usando un lente objetivo UPlanFLN 60X de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1.25. El microscopio utiliza el programa Cell ^R (Olympus, Tokyo, Japón) con el cual se obtuvieron las imágenes. Las imágenes obtenidas a partir de las inmunofluorescencias fueron cuantificadas mediante ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, EE. UU). utilizando un ROI definido para todas las imágenes. Esta región de interés rectangular de 611 μm por 108 μm se orientó de manera longitudinal a lo largo del axón y centrada en el del nodo de Ranvier. Se evaluó la intensidad de fluorescencia de los Nav normalizada por la fluorescencia del ruido de fondo. La intensidad de cada pixel

fue comparada con la intensidad del mismo pixel, pero de una condición diferente, dentro de la misma área de interés.

Las imágenes obtenidas a partir del western blot se obtuvieron escaneando las películas fotográficas. Las imágenes fueron cuantificadas mediante ImageJ, seleccionando cada banda de manera individual. Cada banda fue normalizada restando la banda del control de carga (BIII tubulina) correspondiente a su mismo carril.

III.2.6 Análisis estadístico

Los datos fueron tratados como promedios de pixeles. Se promedió la intensidad de fluorescencia de cada pixel con su pixel homólogo de un conjunto de imágenes representativas de cada condición. Cada promedio obtenido se comparó con el promedio de pixeles control. Para la comparación de los promedios se utilizó el test t-student (Excel, Microsoft). Se consideró significativo un * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

IV. Resultados

IV.1 Obtención de axones individuales, identificación de Na_v mediante inmunofluorescencia y generación de daño axonal mediante transección del nervio ciático de ratas macho adultas.

Se estableció la técnica de disociación manual de axones de nervio ciático de rata utilizando pinzas quirúrgicas y agujas de acupuntura bajo lupa (Fig. 3). Se comprobó la obtención de fibras individuales tiñendo las muestras con anticuerpo anti neurofilamento y observándolas en un microscopio de fluorescencia (Spinning Disk Microscopy). Una vez dominada esta técnica, se procedió a distinguir la zona nodal (Fig. 4B, 4D). Esto se logró observando las diferencias morfológicas entre ambas zonas (Fig. 4B) y, por otro lado, también se pudo identificar mediante marcadores moleculares específicos, el nodo (Na_v) (Fig. 4D) y el paranodo (CASPR) (Fig. 4C). El nodo de Ranvier también se puede detectar como la zona entre dos paranodos (Fig. 4C, cabeza de flecha). Para facilitar la distinción de cada zona se muestra un esquema general de un axón mielinizado (Fig. 4A). En resumen, podemos concluir que la disociación manual del nervio ciático y la obtención de axones individuales permite la observación detallada de la estructura axonal. Esto posibilita el reconocimiento visual de compartimientos axonales -como el nodo y el paranodo- mediante inmunofluorescencia.

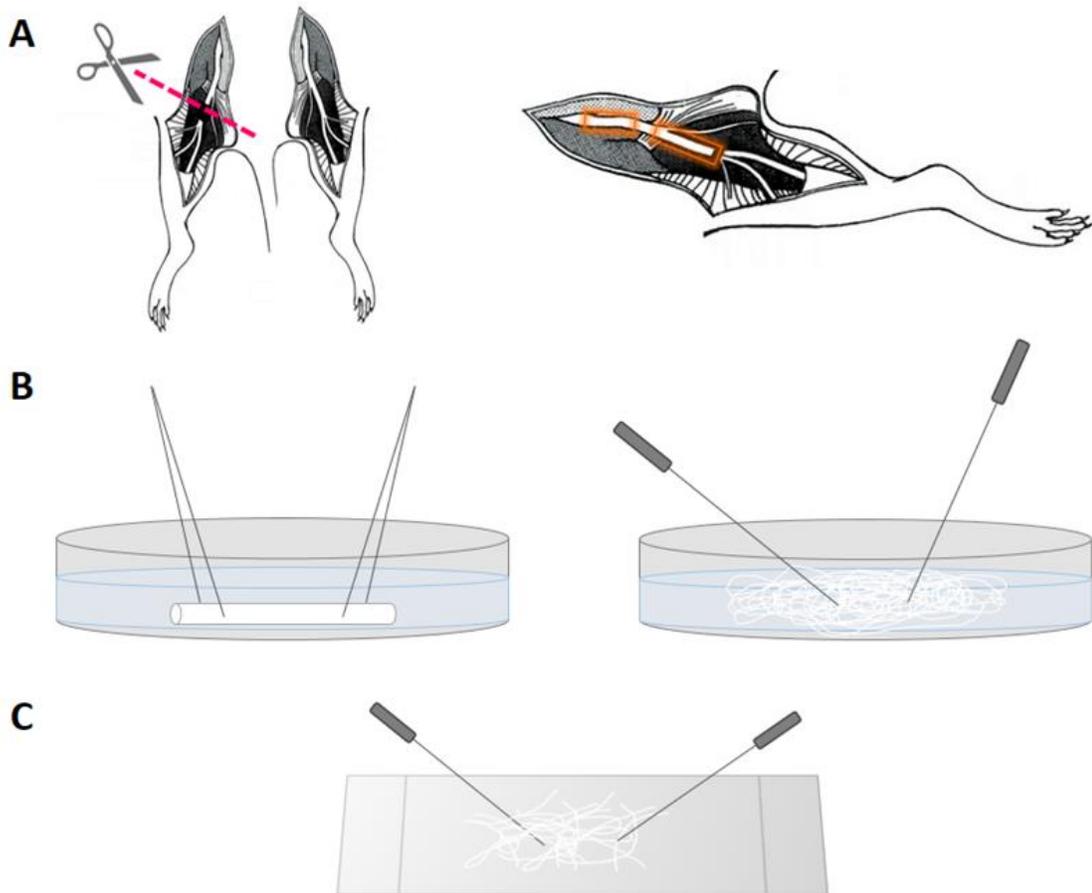


Figura 3: Obtención de axones individuales. (A) Izquierda: Cirugía de daño. Ambos nervios ciáticos fueron expuestos, pero solo el izquierdo fue transectado. Derecha: Veinticuatro horas después, dos segmentos fueron extraídos de cada nervio (4 segmentos en total). (B) Cada segmento de nervio ciático fue disociado primero mediante pinzas quirúrgicas n°5 y luego mediante agujas de acupuntura, en una placa de 40 mm con PBS 1X hasta obtener un conglomerado de axones. (C) Un pequeño grupo de axones fue separado del conglomerado y traspasado a un portaobjetos, donde se terminó la disociación utilizando agujas de acupuntura.

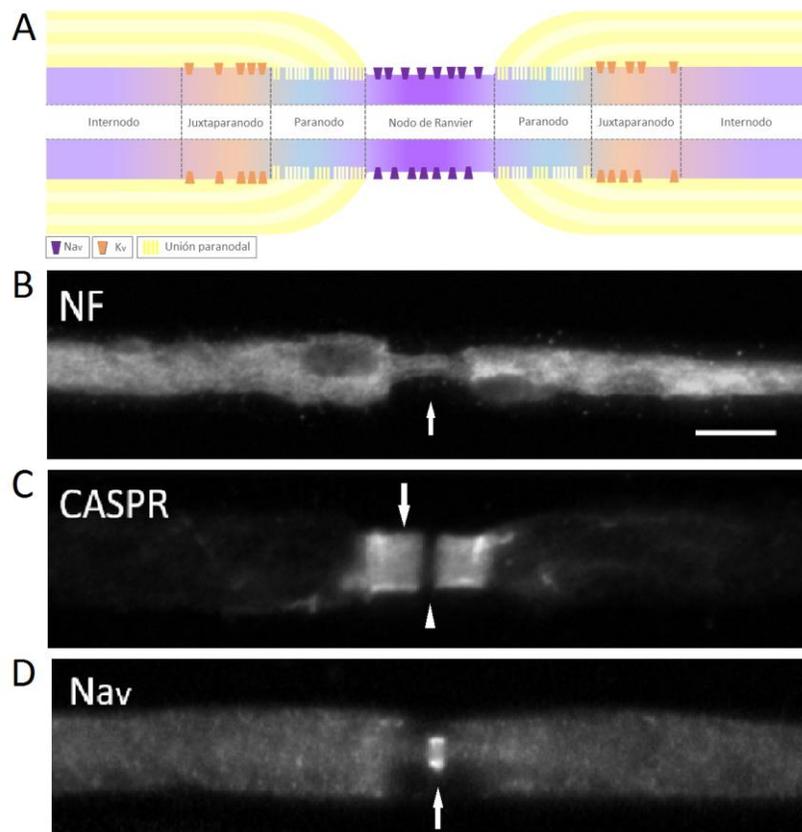


Figura 4: Identificación de zona nodal, paranodal e internodal en axones individuales.

(A) Esquema general de un axón mielinizado. Dos células de Schwann (amarillo) rodean al axón y están separadas por el nodo de Ranvier (morado). A ambos costados del nodo le siguen los paranodos (celeste), luego los juxtaparanodos (naranja) y finalmente los internodos (lila). **(B)** Usando un anticuerpo anti-neurofilamento (NF) sobre muestras de axones disociados, se observó la estructura de los nodos de Ranvier como constricciones simétricas espaciadas regularmente a lo largo del axón (flecha). **(C)** Utilizando un anticuerpo anti-CASPR se pudo visualizar el paranodo (flecha). CASPR (*contactin-associated protein*) participa en la unión axoglial permitiendo el anclaje de las células de Schwann al axón. El paranodo corresponde a la zona internodal más cercana al nodo. El espacio entre dos paranodos corresponde al nodo (cabeza de flecha). **(D)** Los nodos de Ranvier también pueden ser identificados utilizando un anticuerpo anti Pan-Nav (flecha), el cual reconoce a toda la familia de canales de sodio activados por voltaje. Estas proteínas se encuentran concentradas en el nodo, por lo que en esta zona se observa una marca muy brillante, normalmente distribuida con mayor intensidad hacia los extremos de la membrana axonal. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. Barra de calibración de tamaño: 5 μm .

Para obtener el modelo de daño axonal y poder estudiar este fenómeno *in vivo*, se transectó el nervio ciático. Si bien son 3 los tipos de daño más utilizados experimentalmente (ligación, compresión o en inglés *crush* y transección)⁴⁹, se decidió realizar la transección debido a que este método nos permitía una corroboración visual inmediata de que el daño se realizó con éxito. Esto debido a que, al cortar el nervio, ambos extremos se recogen y quedan separados por un pequeño espacio (Fig. 5, cabeza de flecha). Por lo tanto, debido a la corroboración visual de separación del nervio durante la cirugía se puede concluir que el daño axonal quedó correctamente efectuado.

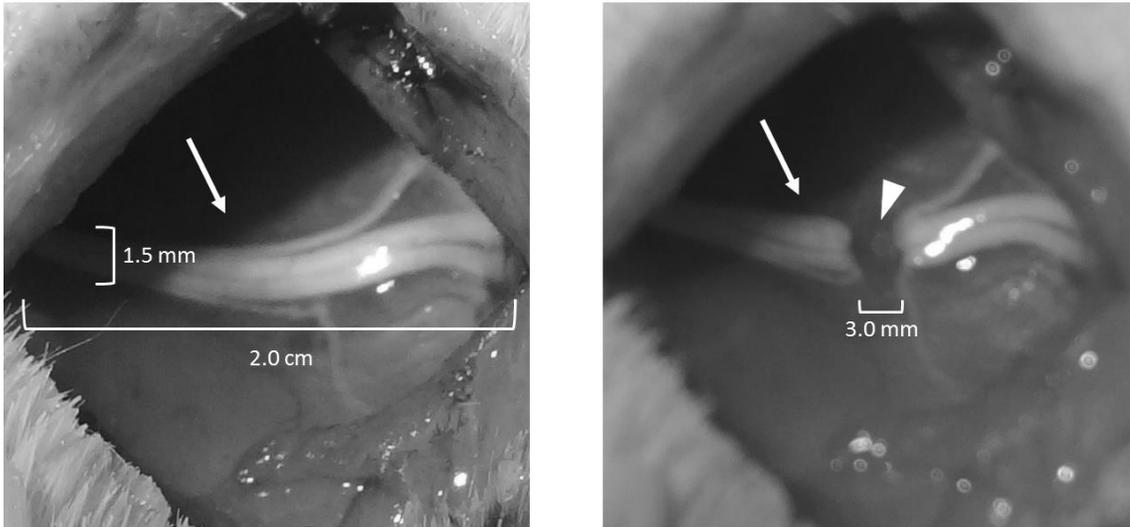


Figura 5: Transección de nervio ciático de rata. El nervio ciático (flecha) fue expuesto a la altura del glúteo mediante una incisión de 2 centímetros aproximadamente. Para todos los experimentos, el nervio de la extremidad izquierda fue donde se evaluó la condición de interés y el nervio derecho fue utilizado como condición control. La transección se realizó con unas tijeras quirúrgicas pequeñas mediante un único corte. El espacio que separa ambos extremos producto del corte del nervio corresponde a aproximadamente 3 milímetros (imagen derecha, cabeza de flecha).

IV.2 Efecto del daño axonal sobre la abundancia de los canales de sodio activados por voltaje en la membrana axonal.

Para evaluar el efecto del daño axonal sobre la abundancia de los canales de sodio activados por voltaje, se comparó la intensidad de fluorescencia obtenida con el anticuerpo anti Pan-Nav_v, en un nervio transectado versus una condición control. La intensidad relativa de fluorescencia bajo condiciones constantes de adquisición de imágenes fue evaluada en nodos de Ranvier de un segmento proximal y distal al daño (Fig. 6A). El anticuerpo detecta los canales de sodio dependientes de voltaje en los nodos de Ranvier (marca axonal) con alta intensidad y también detecta canales en la zona internodal. Esta señal corresponde a proteínas presentes tanto en el axón como en las células de Schwann que lo rodean^{50,51}. Si se analiza la zona internodal, en el segmento proximal se observa un mayor aumento de los Nav producto del daño en comparación con el segmento distal (Fig. 6C, 6D). En los nodos proximales se observó un aumento significativo del 31% en los axones dañados, mientras que en los nodos distales el aumento alcanzó un 44% (Fig. 6E). Este resultado fue corroborado mediante western blot. Esta técnica no permite la evaluación exclusiva de axones, debido a que el lisado celular utilizado también contiene células gliales y células del sistema inmune, entre otras. En este caso, se observó una razón de aumento de 3,9 veces en el segmento proximal al daño y en el segmento distal, un aumento de 1,9 veces (Fig. 6E, 6G). Ambos

experimentos permiten concluir que el daño axonal efectivamente produce un aumento en los canales de sodio activados por voltaje, el cual es detectable 24 horas después del daño, tanto en la zona proximal como en la zona distal al daño. Este aumento se pudo observar tanto de manera general en el nervio ciático (WB) como de manera particular en los nodos de Ranvier (IF). La diferencia en magnitud detectada entre ambas técnicas podría sugerir que la transección no afecta de igual manera al axón que a las células de Schwann y/o demás células presentes en el nervio.

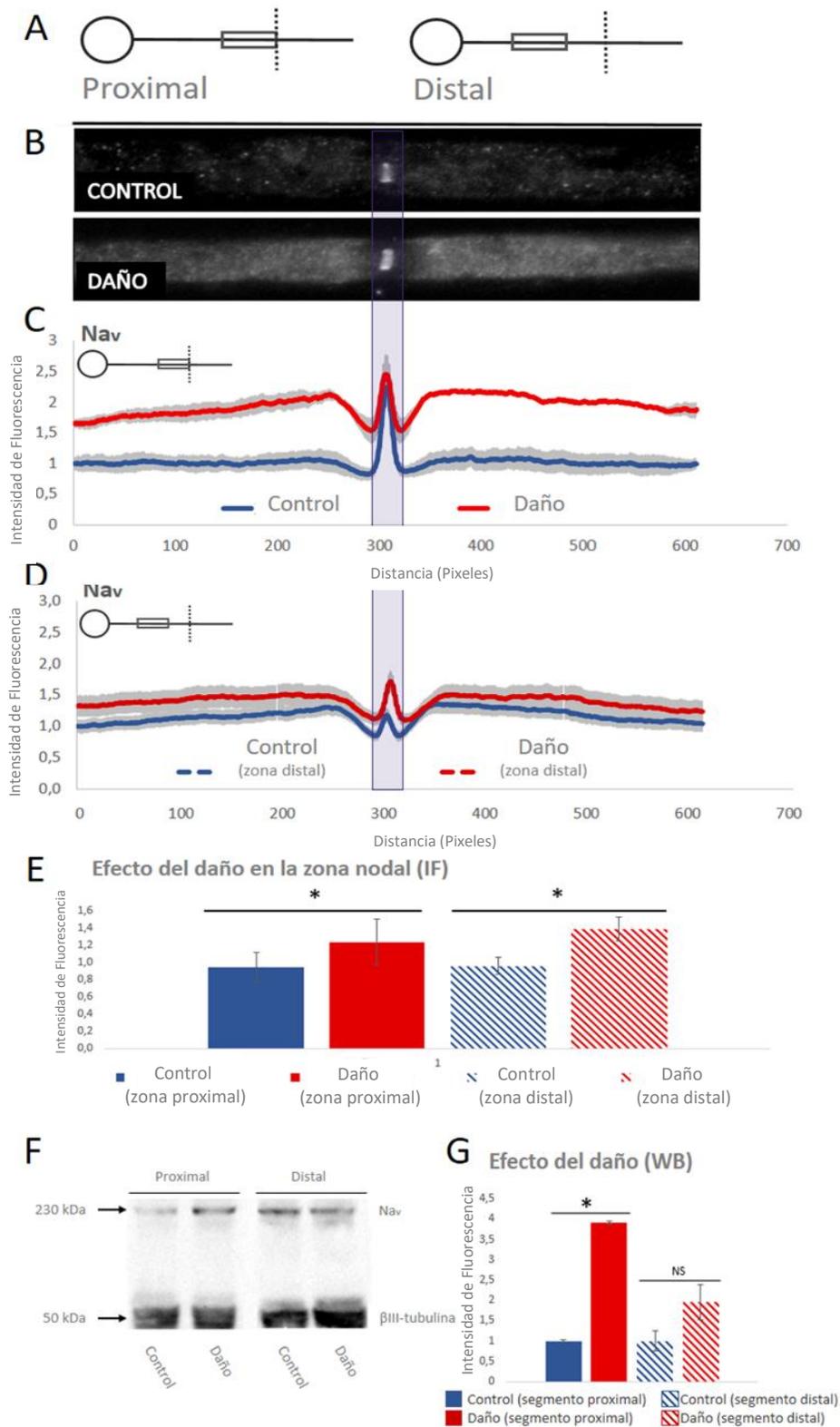


Figura 6: Efecto del daño sobre la abundancia de los canales de sodio activados por voltaje. (A) Esquema explicativo de los segmentos proximal y distal con relación al corte (línea punteada) en el nervio ciático. El círculo representa al DRG (somatos) y el rectángulo el segmento extraído para ser evaluado. **(B)** Imágenes representativas de axones mielinizados, con y sin daño. Todos los axones fueron teñidos con anticuerpo anti Pan-Nav. La fluorescencia de cada muestra fue normalizada por la fluorescencia del ruido de fondo y fue graficada para segmentos proximales **(C)** y distales al daño **(D)** (n = 24). **(E)** Para evaluar el efecto del daño de manera exclusiva en el axón, se cuantificó la intensidad de fluorescencia en la zona nodal. **(F)** El análisis mediante western blot corroboró que el daño produce un aumento en la cantidad de Nav en el nervio. Este aumento es significativo únicamente en el segmento proximal al daño **(G)**. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes (n= 3). *p<0.05; N.S. (No significativo) > 0.05; prueba t.

IV.3 Efecto de la inhibición de la síntesis local axonal y de la ruta secretoria axonal sobre la abundancia y la distribución de los canales de sodio dependientes de voltaje en un modelo de daño axonal.

Para lograr la inhibición de la síntesis axonal de proteínas, se transectó el nervio ciático e inmediatamente, se inyectó cicloheximida (CHX) por el interior del nervio de manera longitudinal en dirección al DRG (Fig. 7A). Esta droga bloquea la fase de elongación durante la traducción eucariote al evitar la traslocación del péptido nascente mediante su unión al ribosoma^{52,53}. Para evaluar el efecto de esta inhibición sobre la abundancia y distribución de los Na_v , 24 horas después de la cirugía 2 segmentos del nervio fueron extraídos (proximal y distal al daño) y evaluados mediante inmunofluorescencia de axones individuales. Los nervios tratados con CHX presentaron una disminución en la marca de Pan- Na_v en comparación con los tratados con PBS (control) (Fig. 7B, 7C). Se cuantificó la fluorescencia de la zona nodal, donde hubo una disminución del 16% en el segmento proximal al daño y de un 13% en el segmento distal (Fig. 7D). Este resultado sugiere que el aumento de los canales de sodio activados por voltaje en la membrana axonal luego de daño es dependiente de síntesis axonal de proteínas. Con respecto a la distribución de los Na_v , se observó que al inyectar CHX ocurre un cambio en el patrón de fluorescencia de la zona internodal en el segmento proximal al daño. En los axones control, la fluorescencia del paranodo

es más baja que la del resto del internodo. Al inyectar CHX, esta diferencia se perdió, unificándose ambas intensidades (Fig. 7B). Este efecto de la droga no se apreció en el segmento distal al daño (Fig. 7C).

Con el fin de evaluar la participación de la ruta secretoria axonal en el aumento de Na_v en la membrana axonal en el modelo de daño, se interrumpió el tráfico de proteínas desde el ER hacia el Golgi mediante una inyección localizada de Brefeldina A (BFA). BFA inhibe la actividad enzimática de ARF, proteína necesaria para catalizar la formación de la cubierta de COPI en vesículas que trafican desde el ER al Golgi. De esta forma, esta droga tiene como efecto la dispersión del aparato de Golgi y posterior acumulación en el interior del retículo endoplásmico^{54,55}. La droga fue inyectada de la misma manera que la CHX en el sitio de corte (Fig.7A). El nervio contralateral fue inyectado con el vehículo en el que se resuspendió la droga (metanol). Se evaluó el efecto de la BFA sobre la expresión de los Na_v mediante inmunofluorescencia. Se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia en las muestras tratadas con BFA en comparación a las muestras control. Este efecto de la droga se detectó tanto en los segmentos proximales al daño (Fig. 8A) como en los segmentos distales (Fig. 8B). Al igual que CHX, BFA afecta la ruta secretoria tanto de axones como de las células de Schwann y demás células presentes en el nervio, por lo que para evaluar exclusivamente el efecto sobre los Na_v axonales se cuantificó la zona nodal. En los nodos de axones proximales a la zona de daño hubo una disminución del 42%, mientras que, en la zona lejana al daño, la inhibición solo

disminuyó la fluorescencia en un 3% (Fig. 8C). Esto sugiere que la sobreexpresión de los canales de sodio activados por voltaje debido a daño axonal es un fenómeno dependiente de la ruta secretoria axonal. La fuerte diferencia detectada entre ambos segmentos (distal y proximal al daño) sugiere que la participación de la ruta secretora es variable a lo largo del axón y sería dependiente de la distancia a la zona de daño.

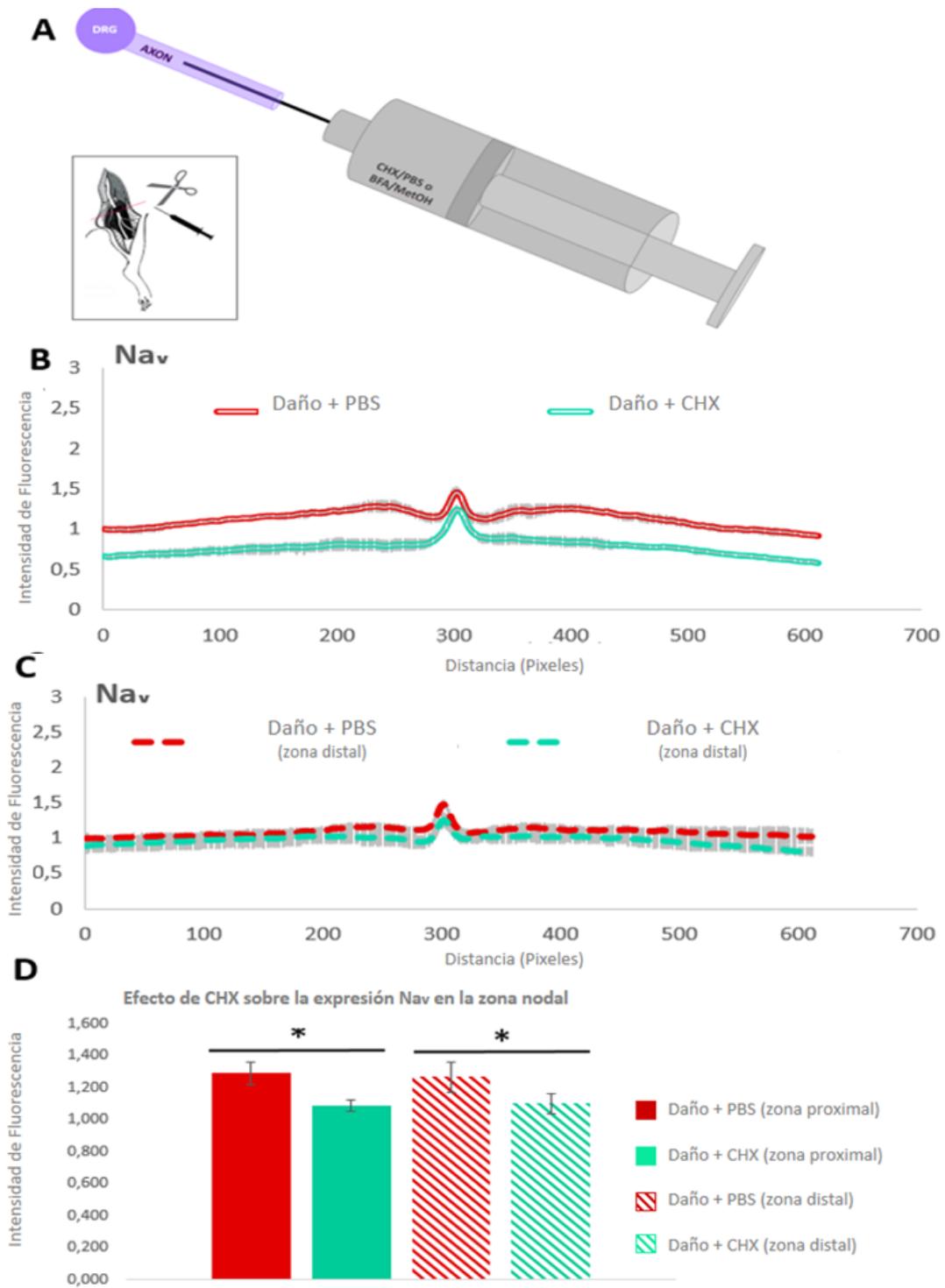


Figura 7: Efecto de la inhibición de la síntesis local de proteínas mediante CHX sobre la abundancia y distribución de los canales de sodio activados por voltaje. (A) Esquema que muestra como fue inyectada la CHX por el interior del nervio ciático recién transectado. De esta misma manera fue inyectada en la extremidad contralateral PBS 1x estéril como solución control. Los segmentos proximales **(B)** y distales al daño **(C)** fueron teñidos con anticuerpo anti Pan-Nav y se graficó su intensidad de fluorescencia. Para evaluar el efecto de la CHX sobre la síntesis exclusivamente axonal, se cuantificó la fluorescencia del área nodal **(D)**. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes (n=41). *p<0.05; prueba t.

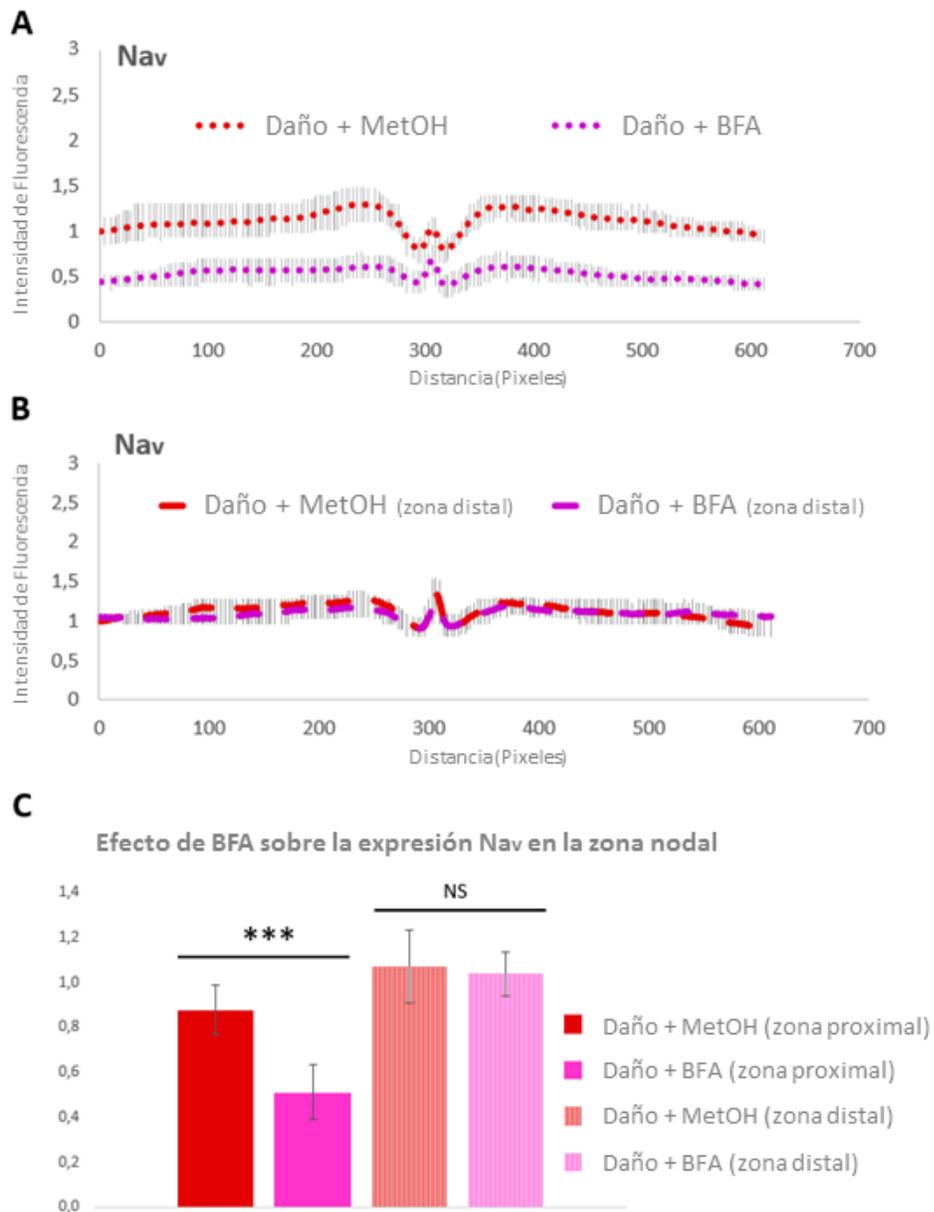


Figura 8: Efecto de BFA sobre la sobreexpresión de los canales de sodio activados por voltaje en un modelo de daño axonal. Axones disociados a partir de nervios inyectados con BFA y sus respectivos controles fueron teñidos con anticuerpo anti Pan-Nav. Se graficó la intensidad de fluorescencia de muestras cercanas al daño (proximal) **(A)** y lejanas al daño (distal) **(B)**. **(C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en los nodos de Ranvier, tanto de segmentos proximales como distales al daño. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes (n = 28). ***p<0.0005; N.S. (No significativo) > 0.05; prueba t.

V. Discusión

La morfología neuronal posee una complejidad única dentro del mundo celular. Esto implica que las neuronas requieren una fina regulación de sus componentes proteicos, para que así cada uno de sus compartimientos responda de manera específica a su función. La regulación del proteoma axonal, específicamente de los canales iónicos de membrana, le permite a la célula regular su conductividad acorde al contexto espacio temporal en que se encuentre. Se sabe que los componentes axonales de mamíferos adultos se transportan en su mayoría desde el soma, sin embargo, axones en desarrollo o axones dañados señalizan al soma para cambiar su programa celular, desde mantención a crecimiento o regeneración axonal⁴⁶. Este cambio induce un aumento en la síntesis axonal de proteínas y le garantiza al axón contar con nuevas proteínas tanto estructurales como funcionales de manera rápida. A pesar de toda esta información, la mayoría de los reportes acerca de síntesis axonal de proteínas involucran proteínas solubles, por lo que faltan estudios que relacionen este mecanismo con proteínas de membrana. Este trabajo relacionó por primera vez el rápido aumento de los canales de sodio activados por voltaje en los nodos de Ranvier producto de daño axonal, con la síntesis axonal de proteínas y con la ruta secretoria local *in vivo*.

V.1 Efecto del daño axonal sobre la abundancia de los Na_v

En primer lugar, se estableció el modelo de daño axonal y se evaluó su efecto sobre los canales de sodio activados por voltaje. Utilizando axones individuales obtenidos a partir de nervios ciáticos transectados y de nervios control, se observó una sobreexpresión de la marca correspondiente al anticuerpo anti Pan- Na_v en los nodos de Ranvier, producto del daño axonal. Se debe tener en consideración que este anticuerpo detecta toda la familia de canales de sodio activados por voltaje y no una isoforma específica. Esto es beneficioso para nosotros ya que lo que se quiere estudiar, es la relación de la ruta secretoria axonal y de la síntesis axonal con la síntesis general de proteínas axonales de membrana. Además, se sabe que las isoformas de Na_v presentes en la membrana axonal varían según el contexto celular^{14,56}, por lo que haber enfocado el estudio en una isoforma específica nos hubiese desviado del verdadero fin de esta tesis.

Al analizar el efecto del daño sobre la abundancia de los Na_v , se observa que estas proteínas aumentan tanto en el segmento proximal al daño como en el segmento distal. Si se analiza exclusivamente la zona nodal, el incremento es un 13% mayor en la zona distal. Esto puede sugerir que 24 horas después del daño, ya comienzan a traficar canales sintetizados desde el soma, los cuales aún no han llegado a la zona proximal al daño. La mayoría de los estudios publicados evalúan la sobreexpresión de Na_v dos semanas después del daño^{13,47, 48}. Sin embargo, este análisis no permite excluir el aporte de proteínas somático, por lo

que los datos obtenidos en esta tesis son novedosos en cuanto a la temporalidad del análisis. Es interesante destacar que en la zona nodal, se observa una diferencia importante entre el segmento distal y el segmento proximal de la condición control. Según nuestros datos, habrían más Na_v en los nodos de la zona proximal al daño que en la zona distal, lo que podría sugerir una diferencia en la distribución endógena de los Na_v a lo largo del axón. Esta observación deberá ser estudiada a futuro. Si se observa ahora la zona internodal, se aprecia lo contrario; el aumento producido por el daño es mayor en el segmento proximal que en el segmento distal. Este mismo patrón, para ambos segmentos, se confirmó mediante western blot, pero con una diferencia más exacerbada entre ambos segmentos. Esta diferencia entre ambas técnicas podría deberse a que el western blot abarca una mayor variedad de tipos celulares (a diferencia de la inmunofluorescencia, en donde se analizan solo axones y células de Schwann), las cuales son analizadas en conjunto. Estas otras células, como células del sistema inmune o células de los capilares, también podrían estar presentando un alza en sus Na_v producto del daño. Otro análisis interesante que puede dar cuenta de esta diferencia entre ambos métodos es la anatomía del nervio ciático. Un reporte de este año indica que debido a las ramificaciones del nervio ocurre una variación en el número de fibras en distintos segmentos de un mismo nervio⁵⁷. Para el western blot se utilizan segmentos completos de nervio, los cuales pueden contener distintos números de axones (segmento distal y segmento proximal), mientras que para la inmunofluorescencia se selecciona un

número fijo de axones representativos, que es igual o muy similar para todas las condiciones. Por lo tanto, todas estas diferencias podrían estar explicando el hecho de que la inmunofluorescencia y el western blot muestren el mismo fenómeno, pero con distinta intensidad.

Al analizar la fluorescencia de la zona internodal, se debe tener en consideración la presencia de las células de Schwann, las cuales aportan la mayoría de la intensidad de fluorescencia detectada. Esto debido a que poseen una masa considerablemente mayor al axón y además, los axones concentran los Na_v en la zona nodal, no en el internodo. Según Frieboes *et al.*, existe un incremento de Na_v en las células de Schwann debido a daño axonal⁵⁸ (correspondiente a la isoforma 1.8), lo que concuerda con nuestra observación.

V.2 Relación de la sobreexpresión de los Na_v con la síntesis local

Para dilucidar si el fenómeno de sobreexpresión de los Na_v efectivamente es dependiente de síntesis axonal de proteínas, se inhibió este proceso inyectando de manera local CHX en un nervio recién transectado. El análisis de este experimento se realizó en la zona nodal, ya que en esta región tenemos la seguridad de que la fluorescencia detectada corresponde a canales exclusivamente axonales. La cuantificación indicó una disminución significativa del 16% en el segmento proximal al daño y de un 13% en el segmento distal. Considerando que previamente se han reportado efectos de la CHX 24 horas después de su aplicación⁵⁹ y que la vida media de los Na_v es de 30 horas⁶⁰,

podemos deducir que la disminución en la fluorescencia de los Nav detectada es efecto del bloqueo de la síntesis de nuevos Nav producto de CHX. Este resultado apoya la suposición de que el aumento de los Nav producto del daño sería dependiente de síntesis axonal. Al ser un experimento *in vivo*, siempre se tendrá la presencia de células no neuronales que están interactuando con el axón. Esto nos genera una ambigüedad al momento de sacar conclusiones precisas, ya que, si bien al usar CHX se está disminuyendo la síntesis de proteínas, esta droga no está afectando únicamente a la síntesis axonal. Todas las células presentes en el nervio son blancas de la droga. Como ya ha sido reportado previamente, las glías son capaces de transferir organelos a las neuronas. Los astrocitos pueden transferir mitocondrias después de un infarto (isquemia)⁶¹ y las células de Schwann son capaces de traspasar ribosomas a axones luego de daño axonal⁶². Para este estudio, esto implica que tanto el aumento de los Nav producto de daño, como la inhibición de este aumento producto de CHX en los axones, pudiesen ser fenómenos dependientes de la influencia de las células de Schwann. Para reducir esta ambigüedad, se podría utilizar un cultivo axonal libre de glías, sin embargo, un modelo *in vitro* implica alejarse del contexto biológico que incluye muchos otros factores que favorecen el proceso de regeneración axonal. Otro tipo de aproximaciones como animales que no producen mielina, o el bloqueo específico de la síntesis axonal utilizando un vector viral que presente tropismo axonal, podrían utilizarse en trabajos futuros.

V.3 Relación de la sobreexpresión de los Nav con la ruta secretoria local

Por último, se observó que al inhibir la ruta secretoria local mediante una inyección de BFA, se pierde la sobreexpresión de Nav producto del daño axonal. Si bien una publicación previa de nuestro laboratorio demostró que al inyectar BFA en un nervio ciático de rata los Nav sufren una redistribución -en lugar de una disminución- desde la membrana axonal hacia el axoplasma e incluso aparecen estructuras discretas contenedoras de Nav en el internodo²⁵, se debe tener en cuenta que esos axones no fueron transectados. Se sabe que en contexto de daño axonal tanto en el CNS como en PNS se ve afectada la proteostasis del ER, lo que gatilla estrés y activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)⁶³. La activación de la UPR implica degradación de proteínas y podría dar cuenta de la disminución que se observó en la fluorescencia de los Nav en este experimento. La fluorescencia disminuyó significativamente un 42% en la zona cercana al daño y solo un 3% en la zona lejana al daño, lo que es una diferencia muy notoria entre ambos segmentos. Esto podría sugerir que la ruta secretoria axonal está comprometida con distinta intensidad en el rápido aumento de Nav a lo largo del axón. Al parecer, este compromiso podría ser dependiente de la distancia a la zona donde se produjo el daño. Es importante destacar que, en este experimento, la fluorescencia del tratamiento con BFA fue bastante menor que la de su respectivo control (inyección con MetOH). Una posible explicación es que el uso de este fármaco, al estar induciendo la acumulación de los canales al interior del ER^{54,55}, esté induciendo también la

degradación de los mismos (mediante UPR). A pesar de que a la fecha todavía no hay reportes que confirmen la presencia de Golgi en axones, una publicación reciente demostró la funcionalidad de una ruta secretoria no convencional (Golgi independiente) en dendritas⁶⁴. Esta ruta permite la generación de proteínas inmaduras, las cuales al no pasar por el aparato de Golgi, son sintetizadas de manera más rápida⁶⁴. Una ruta secretoria no convencional similar a esta, que esté presente en el axón, podría dar cuenta de nuestros resultados observados al inyectar BFA.

VI. Conclusión

Con los resultados obtenidos a partir de esta tesis, se puede concluir que 24 horas después de daño axonal ocurre un aumento significativo de los canales de sodio activados por voltaje en los nodos de Ranvier. Nuestros resultados sugieren que esta sobreexpresión sería un proceso dependiente tanto de síntesis axonal de proteínas como de la ruta secretoria axonal, debido a que al inhibir cada uno de estos procesos, se pierde el incremento de estas proteínas producto del daño axonal.

VII. Mecanismo propuesto

El conjunto de datos obtenidos a partir de esta tesis y los datos reportados en la literatura, permiten proponer que luego de la transección del nervio ciático, ocurre una sobreexpresión de los canales de sodio activados por voltaje en la membrana axonal. Estos canales detectados 24 horas después de la generación del daño en la zona proximal al daño estarían siendo sintetizados de manera local en el axón, utilizando las reservas axonales de mRNA y traficando hacia la membrana axonal por la ruta secretoria local. El aumento de los Na_v también podría deberse a un aporte glial, tanto de mRNA como de proteínas. Por su parte, en la zona distal al daño como se registra una sobreexpresión mayor que en la zona proximal, este aumento podría explicarse -además de por los mecanismos recién descritos- por un transporte de proteínas sintetizadas en el soma. Todas estas respuestas están gatilladas por una señalización que se origina en la zona de daño y viaja hasta el soma, cambiando el programa celular de la neurona de mantención a regeneración.

VIII. Proyecciones

A pesar del rol clave que juegan los Na_v en la función neuronal, este es el primer trabajo que da cuenta de un mecanismo que permite el rápido aumento de estas proteínas en respuesta a daño axonal. Dado que este estudio fue realizado en un modelo *in vivo*, lo que involucra cierta ambigüedad al interpretar resultados debido a la alta complejidad del sistema, trabajos futuros podrían corroborar estos resultados con axones aislados en un sistema *in vitro*. Otra interesante proyección es evaluar qué rol cumple la sobreexpresión en la regeneración axonal, dado que es esperable una recuperación de los canales perdidos producto de daño, pero es curioso que ocurra una sobreexpresión de ellos. Por último, dos interrogantes más que se desprenden de esta tesis son, la función que cumplen las células de Schwann en el proceso de regeneración; ¿serían capaces de traspasar canales iónicos a los axones?, y qué tipo de canales se sintetizan de manera rápida y local producto de daño; ¿son iguales a las isoformas descritas?

IX. Referencias

1. Rojas, E. Luxoro, M. Micro-injection of Trypsin into Axons of Squid. *Nat. Publ. Gr.* **199**, 78, 79 (1963).
2. Purves, D. *et al. Neuroscience.* (2004).
3. Pereda, A. E. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat. Publ. Gr.* **15**, 250–263 (2014).
4. González, C. & Couve, A. The axonal endoplasmic reticulum and protein trafficking: Cellular bootlegging south of the soma. *Semin. Cell Dev. Biol.* **27**, 23–31 (2014).
5. Poliak, S. & Peles, E. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 968–980 (2003).
6. Traka, M. *et al.* Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. **162**, 1161–1172 (2003).
7. Salzer, J. L. Polarized Domains of Myelinated Axons. *Neuron* **40**, 297–318 (2003).
8. Maurel, P. *et al.* Nectin-like proteins mediate axon–Schwann cell interactions along the internode and are essential for myelination. **178**, 861–874 (2007).
9. Fricker, D. *et al.* Mechanisms of sodium channel clustering and its influence on axonal impulse conduction. 723–735 (2016).
10. Chang, K. & Rasband, M. N. *Excitable Domains of Myelinated Nerves : Axon Initial Segments and Nodes of Ranvier. Functional Organization of Vertebrate Plasma Membrane* **72**, (Elsevier Inc., 2013).
11. Schafer, D. P. & Rasband, M. N. Glial regulation of the axonal membrane at nodes of Ranvier. 508–514 (2006).
12. Payandeh, J. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**, 353–358 (2011).
13. Nakata, M. *et al.* Changes in Na⁺ channel expression and nodal persistent Na⁺ currents associated with peripheral nerve regeneration in mice. *Muscle and Nerve* **37**, 721–730 (2008).
14. Luo, S. *et al.* The Sodium Channel Isoform Transition at Developing Nodes of Ranvier in the Peripheral Nervous System : Dependence on a Genetic Program and Myelination- Induced Cluster Formation. **4073**, 4057–4073 (2014).
15. Catterall, W. A. Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels at Atomic Resolution. **99**, 1–26 (2015).

16. Goldin, A. L. Resurgence of Sodium Channel Research. *Annu Rev Physiol* **63**, (2001).
17. Marban, E. Topical Review Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J. Physiol.* 647–657 (1998).
18. Yu, F. H. *et al.* Sodium Channel beta 4 , a New Disulfide-Linked Auxiliary Subunit with Similarity to beta 2. **23**, 7577–7585 (2003).
19. Piper, M. & Holt, C. RNA Translation in Axons. *Annu Rev Cell Dev Biol.* (2004).
20. Hirokawa, N. Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. *Science (80-)*. **279**, (1998).
21. Fabrizi, C. *et al.* Transient Expression of the Neurofilament Proteins NF-L and NF-M by Schwann Cells Is Regulated by Axonal Contact. **299**, 291–299 (1997).
22. Sotelo, J. R. *et al.* Myosin-Va-Dependent Cell-To-Cell Transfer of RNA from Schwann Cells to Axons. *PLoS One* **8**, (2013).
23. Court, F. a. 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 (2008).
24. Alvarez, J. & Court, F. A. Origin of Axonal Proteins: Is the Axon-Schwann Cell Unit a Functional Syncytium? **639**, 629–639 (2016).
25. González, C. *et al.* Axons provide the secretory machinery for trafficking of voltage-gated sodium channels in peripheral nerve. **113**, 1823–1828 (2016).
26. Holt, C. E. & Schuman, E. M. Perspective The Central Dogma Decentralized : New Perspectives on RNA Function and Local Translation in Neurons. *Neuron* **80**, 648–657 (2013).
27. Merianda, T. T. *et al.* A functional equivalent of endoplasmic reticulum and Golgi in axons for secretion of locally synthesized proteins. *Mol. Cell. Neurosci.* **40**, 128–142 (2009).
28. Martin, R. Protein synthesizing units in presynaptic and postsynaptic domains of squid neurons. *J. Cell Sci.* **111**, 3157–3166 (1998).
29. Giuditta, A. Rapid important paper Messenger RNA in squid axoplasm. *Neurochem. Int.* **8**, 435–442 (1986).
30. Crispino, M. *et al.* Active polysomes are present in the large presynaptic endings of the synaptosomal fraction from squid brain. *J. Neurosci.* **17**, 7694–7702 (1997).
31. Ingoglia, N. a *et al.* 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 (1983).
32. Jung, H., Yoon, B. C. & Holt, C. E. Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 514–514 (2012).
 33. Van Minnen, J. *et al.* De novo protein synthesis in isolated axons of identified neurons. *Neuroscience* **80**, 1–7 (1997).
 34. Vuppalanchi, D. Regulation of mRNA Transport and Translation in Axons. *Results Probl Cell Differ* (2009). doi:10.1007/400
 35. Deglincerti, a. & Jaffrey, S. R. Insights into the roles of local translation from the axonal transcriptome. *Open Biol.* **2**, 120079–120079 (2012).
 36. Obara, I. & Hunt, S. P. Axonal Protein Synthesis and the Regulation of Primary Afferent Function. *Wiley Online Libr.* (2013).
 37. Merianda, T. & Twiss, J. Peripheral nerve axons contain machinery for co-translational secretion of axonally-generated proteins. *Neurosci. Bull.* **29**, 493–500 (2013).
 38. Tsukita, S. & Ishikawa, H. Three-dimensional distribution of smooth endoplasmic reticulum in myelinated axons. **25**, 141–149 (1976).
 39. Aridor, M. & Fish, K. Selective Targeting of ER Exit Sites Supports Axon Development. **10**, 1669–1684 (2009).
 40. Valdés, V. *et al.* Endoplasmic reticulum sorting and kinesin-1 command the targeting of Axonal GABAB receptors. *PLoS One* **7**, (2012).
 41. Rotshenker, S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J. Neuroinflammation* **8**, 109 (2011).
 42. Scheib, J. & Höke, A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 668–76 (2013).
 43. Coleman, M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 889–898 (2005).
 44. Vargas, M. E. & Barres, B. A. Why Is Wallerian Degeneration in the CNS So Slow ? (2007).
 45. Sousa, M. M. Cell intrinsic control of axon regeneration. *EMBO Rep.* **15**, 254–263 (2014).
 46. Daroff, R. *Bradley's Neurology in Clinical Practice.* (2016).
 47. Persson, A. Nav 1.7 accumulates and co-localizes with phosphorylated ERK1 / 2 within transected axons in early experimental neuromas. *Exp. Neurol.* **230**, 273–279 (2011).
 48. Henry, M. A. & Freking, A. R. Sodium channel Nav1.6 accumulates at the

- site of infraorbital nerve injury. **8**, 1–8 (2007).
49. Alant, J. D. D. V. *et al.* The impact of motor axon misdirection and attrition on behavioral deficit following experimental nerve injuries. *PLoS One* **8**, 1–16 (2013).
 50. Barres, B. A. Ion Channel Expression by White Matter Glia: I . Type 2 Astrocytes and Oligodendrocytes. *Glia* **30**, 10–30 (1988).
 51. Ritchie, J. M. & Waxman, S. G. Sodium channels in the cytoplasm of Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci* (1990).
 52. Schneider-poetsch, T. *et al.* Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nat Chem Biol* **6**, 209–217 (2010).
 53. Christner, C. *et al.* Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Cycloheximide Derivatives as Potential Inhibitors of FKBP12 with Neuroregenerative Properties ∇ . 3615–3622 (1999).
 54. Fujiwara, T. & Oda, K. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **263**, 18545–18552 (1988).
 55. Helms, B. & Rothman, J. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**, 133–135 (1992).
 56. Waxman, S. G. & Kocsis, J. D. Type III Sodium Channel mRNA Is Expressed in Embryonic But Not Adult Spinal Sensory Neurons , and Is Reexpressed Following Axotomy. **72**, (1994).
 57. Adelino Suaid, C. & Santos, A. P. Aspects of the Macro and Microscopic Anatomy of the Sciatic Nerve in Wistar Rats. *Int J. Morphol* **34**, 877–884 (2016).
 58. Frieboes, L. R. & Palispis, W. A. Nerve Compression Activates Selective Nociceptive Pathways and Upregulates Peripheral Sodium Channel Expression in Schwann Cells. 753–761 (2010).
 59. Usdin, E. & Bunney Jr, W. Endorphins in Mental Health Research. *Macmillan Press LTD I*, 1980 (1979).
 60. Schmidt, J. W. & Catterall, A. Biosynthesis and Processing of the α Subunit of the Voltage-Sensitive Sodium Channel in Rat Brain Neurons. **46**, 437–445 (1985).
 61. Hayakawa, K. *et al.* Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nat. Publ. Gr.* **535**, 551–555 (2016).
 62. Court, F. A. *et al.* Morphological Evidence for a Transport of Ribosomes from Schwann Cells to Regenerating Axons. **1539**, 1529–1539 (2011).
 63. Oñate, M. Hetz, C. Bursting the unfolded protein response accelerates

axonal regeneration. *Neural Regen. Res.* **11**, 11–12 (2016).

64. Hanus, C. *et al.* Unconventional secretory processing diversifies neuronal ion channel properties. 1–27 (2016).